

Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt  
Fakultät für Biowissenschaften  
Lehrstuhl für Ökologische Chemie und Umweltanalytik  
Technische Universität München

**Entwicklung einer LC/MS/MS- Methode zur Analytik polarer  
Pflanzenschutzmittel-Wirkstoffe und ihrer Metabolite in Erntegütern**

Monica Elena Pantiru

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für  
Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München  
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender

Univ.-Prof. Dr. rer. nat. habil. W. Huber

Prüfer der Dissertation

1. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Dr. h. c. (RO) A. Kettrup
2. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Dr. agr. habil. H. Parlar

Die Dissertation wurde am 04.05.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung  
und Umwelt am 21.07.2004 angenommen.

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Oktober 2001 bis Juli 2004 im Institut für ökologische Chemie, GSF- Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit. Für die Finanzierung bedanke ich mich beim Deutschen Akademischen Austauschdienst.

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Antonius Kettrup

Danke ich herzlich für die interessante Themenstellung, die guten Arbeitsmöglichkeiten im Institut, sowie für seine wohlwollende Förderung in jeglicher Hinsicht.

Herrn Dr. Dieter Martens

Gilt mein besonderer Dank für die gute Betreuung der Arbeit, die wissenschaftliche Diskussion, die ständige Hilfsbereitschaft, die vielfältigen Unterstützungen, die aufmerksame Korrektur dieser Arbeit und seine Freude am Lehren.

Herrn Dr. Patrick Bohn gilt mein Dank für die Beratung, die weiterführenden Diskussionen und die sehr gute Zusammenarbeit.

Im Besonderen möchte ich mich bei Frau Vera Meyer und Herrn Stephan Forster für die tatkräftige Unterstützung bei der Probenaufarbeitung und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Karin Fischer, Dr. Jutta Lintelmann, Dr. Georg Matuschek, Dr. Willibald Kamm, Agnes Fekete und Dariusz Antkowiak danke ich besonders für das hervorragende Arbeitsklima.

Für meinen Sohn

## Abkürzungsverzeichnis

2,4,5-T	(2,4,5-Trichlorphenoxy)-essigsäure
2,4-D	(2,4-Dichlorphenoxy)-essigsäure
2,4-DB	4-(2,4-Dichlorphenoxy)-buttersäure
ACN	Acetonitril
amu	atomic mass unit
APCI	athmospheric pressure chemical ionization
API	athmospheric pressure ionization
APPI	athmospheric pressure photoionization
CE	collision energy (auch ChemElut)
CEP	cell entrance potential
cps	counts per second
CXP	cell exit potential
D1M-Diuron	Desmethyldiuron
D2M- Diuron	Didesmethyldiuron
D1M-Ipo	D1M- Isoproturon, Desmethylisoproturon
D2M-Ipo	D2M-Isoproturon, Didesmethylyisoproturon
DAD	diode array detector
DDA	1-(2,2-bis-(4-Chlorphenyl))-essigsäure
DP	declustering potential
EP	entrance potential
ESI+/-	electrospray ionisation, positiver / negativer Ionisierungsmodus
FP	focusing potential
GC	gas chromatography
HLB	hydrophilic-lipophilic balance
(HP)LC	high performance liquid chromatography
HRP	high resolution polymer
Ipo-anilin	4-Isopropylanilin
$K_{ow}$	Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
LLE	liquid-liquid extraction
LS	Standard in Lösungsmittel
MAX	mixed-mode anion exchange
MCPA	(4-Chlor-2-methylphenoxy)-essigsäure
MCPB	4-(4-Chlor-o-tolyloxy)-buttersäure
MCX	mixed-mode cation exchange
MeOH	Methanol
MRM	multi reaction monitoring
MS	Massenspektrometer (auch Matrixstandard)
m/z	Verhältnis Masse/Ladung
NH <sub>4</sub> Ac	Ammoniumacetat
NP	normal phase
PCP	Pentachlorphenol
pK <sub>a</sub> /pK <sub>b</sub>	negativer dekadischer Logarithmus des Dissoziationskonstanten, a= Säure, b= Base
PS-DVB	Polystyrol-Divinylbenzol
RHmV	Rückstandshöchstmengen-Verordnung
RP	reversed phase (Umkehrphase)
Q	Quadrupol
SIM	selected ion monitoring
SPE	solid phase extraction
TIC	total ion current (Totaler Ionenstrom)
t <sub>R</sub>	Retentionszeit
WFR	Wiederfindungsrate
XIC	single ion current

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
2	Ziele der Arbeit .....	5
3	Stand der Forschung und theoretische Grundlagen.....	6
3.1	Entwicklung von Multimethoden.....	6
3.2	Sequenzschritte in der klassischen Multimethode für die Pestizidanalyse .....	7
3.2.1	Probenvorbereitung .....	7
3.2.2	Extraktion .....	7
3.2.3	Aufreinigung .....	10
3.2.4	Instrumentelle Analytik.....	16
3.2.4.1	Chromatographische Verfahren .....	16
3.2.4.2	andere Bestimmungsverfahren.....	21
3.3	Massenspektrometrie.....	23
3.3.1	Kopplungstechniken.....	23
3.3.1.1	ESI.....	24
3.3.1.2	APCI.....	24
3.3.1.3	APPI .....	25
3.3.2	Massenanalytatorsysteme .....	26
3.3.2.1	Beschleunigung .....	27
3.3.2.2	Massenspektrometer .....	27
3.3.2.3	Auflösung .....	30
3.3.3	MS/MS .....	31
3.4	Matrixeffekte in der LC/MS.....	33
4	Materialien und Methoden .....	36
4.1	Verwendete Geräte .....	36
4.2	Verwendete Materialien .....	38
4.3	Statistische und mathematische Methoden .....	43
4.3.1	Statistische Methoden .....	43
4.3.2	Mathematische Methoden .....	44
4.4	Weitere Angaben.....	45
5	Ergebnisse .....	46
5.1	Trennung und Detektion.....	46
5.1.1	Optimierung der Ionisierung .....	47

5.1.2	Bestimmung der intensivsten Ausgangs- und Tochterionen und Optimierung der substanzabhängigen Detektionsparameter .....	48
5.1.3	Auswahl der Ionisierungsquelle (Vergleich ESI-APCI) .....	52
5.1.4	HPLC- Methode .....	59
5.1.4.1	Vorversuche mit HPLC-DAD .....	59
5.1.4.2	Laufmittel .....	60
5.1.4.3	Trennsäulen .....	61
5.1.4.4	HPLC- Gradienten.....	62
5.1.4.5	Scanfenster .....	66
5.1.5	Empfindlichkeitssteigerung.....	67
5.1.5.1	Vergleich von Modifiern .....	67
5.1.5.2	Injektionsvolumina .....	68
5.1.6	Kenndaten der instrumentellen Analyse .....	68
5.1.6.1	Ermittlung der Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze .....	68
5.1.6.2	Kalibrierfunktionen .....	70
5.1.6.3	Präzisionstest der LC/MS/MS-Methode .....	72
5.2	Optimierung der Extraktion .....	73
5.2.1	Vorversuche .....	73
5.2.2	Einfluss des pH-Wertes .....	73
5.2.3	Lösungsmittel .....	74
5.2.4	Extraktion fettreicher Matrices.....	77
5.2.5	Extraktion trockener Matrices.....	82
5.3	Aufreinigung der Extrakte.....	84
5.3.1	Reinigung der Acetonextrakte.....	85
5.3.1.1	GPC- Aufreinigung .....	85
5.3.1.2	Erprobung verschiedener Festphasen für die Extraktreinigung .....	87
5.3.1.3	Matrixeinfluss.....	90
5.3.2	Reinigung der Methanolextrakte.....	93
5.3.2.1	ChemElut (Hydromatrix) .....	93
5.3.2.2	Oasis HLB .....	96
5.3.2.3	EnviCarb.....	97
5.3.2.4	Chromabond-HRP .....	98
5.3.2.5	Effizienz der HRP- Festphase für die Reinigung von Probenextrakte.....	99
5.3.2.6	Vergleich von ChemElut und HRP .....	105

5.3.3	Reinigung von Acetonitrilextrakten .....	109
5.3.3.1	C18 .....	109
5.3.4	Versuche mit Oasis MCX .....	112
5.4	Untersuchungen zur Verminderung oder Vermeidung der Matrixeffekte .....	114
5.4.1	Einflüsse der Matrix .....	114
5.4.2	Extraktreinigung .....	116
5.4.2.1	Vergleich von GPC, Hydromatrix und SPE .....	116
5.4.2.2	Vergleich von Extraktionslösungsmittel .....	118
5.4.2.3	Fettreiche Matrices .....	119
5.4.3	Quantifizierung über externe Standards .....	120
5.4.4	Quantifizierung über isotopenmarkierte Standards .....	121
5.4.5	Quantifizierung über Matrixstandards .....	123
5.5	Validierung der Methode .....	125
5.5.1	Methodenvorschrift .....	125
5.5.2	Analytische Kenngrößen und statistische Bewertung .....	128
5.5.2.1	Bestimmungsgrenzen und Blindwerte .....	128
5.5.2.2	Wiederfindungsraten und Wiederholbarkeit .....	130
6	Zusammenfassung .....	141
7	Ausblick .....	143
8	Literaturverzeichnis .....	144
9	Anhang .....	157

## 1 Einleitung

Pestizide finden seit Jahrzehnten Anwendung in der Land- und Forstwirtschaft, im Obst-, Gemüse- und Weinbau sowie bei der Entkrautung von Frei- und Verkehrsflächen. Allein in Deutschland werden jährlich rund 28.000 – 31.000 t Pflanzenschutzmittel eingesetzt. Dabei entfallen 55% auf Herbizide (vor allem im Getreidebau), 30% auf Fungizide (Obst-, Wein- und Kartoffelbau) und 4% auf Insektizide (besonders bei Obst, Wein und Hopfen). Die restlichen 11% setzen sich aus Pestizidgruppen wie z.B. Akarizide, Bakterizide, Molluskizide und Rodentizide zusammen [1].

Neben Kontamination von Böden, Gewässern und Atmosphäre verursacht der Einsatz von Pflanzenschutzmitteln Rückstände in den behandelten pflanzlichen Erzeugnissen. Die Aufgabe der Rückstandsanalytik bei Lebensmitteln ist die Aufdeckung von Höchstmengenüberschreitungen oder unerlaubten Anwendungen und die kontinuierliche Ermittlung der Lebensmittelbelastung, um eine Abschätzung der daraus eventuell folgenden Risiken zu ermöglichen.

Die Vielzahl der eingesetzten Pflanzenschutzmittelwirkstoffe stellt eine große Herausforderung für die Rückstandsanalytik dar. Nach einem deutlichen Rückgang zu Beginn der 90er Jahre, hat die Anzahl der in Deutschland zugelassenen Wirkstoffe wieder leicht zugenommen und lag Anfang 2003 bei 255. In Europa wurden Anfang der 90er Jahre noch über 800 Wirkstoffe gelistet, weltweit wird mit dem Einsatz von über 1000 Wirkstoffen gerechnet. Im Rahmen der Harmonisierungsmaßnahmen in der Europäischen Union wurden im Jahr 2003 über 400 Altwirkstoffe vom Markt genommen. Bis zum geplanten Abschluss der Harmonisierungsverfahren im Jahre 2008 werden europaweit ca. 60% aller Pflanzenschutzmittel, die 1993 noch auf dem Markt waren, nicht mehr zugelassen sein [2].

Weil die zulässigen Rückstandshöchstmengen für Lebensmittel meist zwischen 0,01 und 10 mg/kg liegen, muss der Analytiker in diesem Spurenbereich, qualitativ und quantitativ, zuverlässige Analysenergebnisse erzielen können. Darüber hinaus unterliegt das Wirkstoffspektrum einem kontinuierlichen Wandel, weil ständig neue Wirkstoffe auf den Markt kommen, während den älteren die Zulassung entzogen wird.

Augrund der oft unbekanntem Vorgeschichte der Proben, der großen Anzahl der möglichen Pflanzenschutzmittel und der geringen Konzentrationen, die es in Lebensmitteln aufzuspüren gilt, stellt die Analytik von Pflanzenschutzmittel-Rückständen oft ein sehr schwieriges Unterfangen dar. Der analytische Schwierigkeitsgrad erhöht sich im allgemeinen mit der



Komplexität der Probenzusammensetzung, weil eine sichere Bestimmung meist nur nach einer selektiven Anreicherung der Rückstände möglich wird. Folglich zielen die analytischen Strategien auf die möglichst verlustfreie Trennung der Rückstände von anderen Matrixbestandteilen. Dabei wird versucht, die Unterschiede in den physikalisch-chemischen Eigenschaften von Pflanzenschutzmitteln und Matrixbestandteilen (z.B. Lipophilie / Hydrophilie, Dampfdruck, Molekülgröße) so zu nutzen, dass der erwünschte Trennungsgrad erzielt wird. Dafür werden verschiedene Methoden wie Extraktion, Verteilung, Wasserdampfdestillation und Chromatographie verwendet.

Da sich die Eigenschaften von Pflanzenschutzmitteln sehr unterscheiden, ist es praktisch unmöglich, das gesamte Spektrum mit einer einzigen Multimethode zu erfassen. Daher ist eine Multimethode stets ein Kompromiss, der insbesondere darin besteht, dass auf die Erfassung bestimmter Pflanzenschutzmittel verzichtet werden muss, um einen akzeptablen Reinigungseffekt zu erzielen. Eine Ausweitung des erfassbaren Spektrums geht somit oft zwangsläufig auf Kosten der Selektivität der Methode.

Effiziente Probenvorbereitung, Detektion und Identifizierung im Spurenbereich sind wichtige Aspekte für die Entwicklung einer Analysenmethode, insbesondere wegen der ständig sinkenden Nachweisgrenzen, die von den verantwortlichen Behörden verlangt werden, und wegen der komplexen Natur der Matrizes, die die zu untersuchenden Analyten enthalten.

In der Rückstands-Höchstmengenverordnung (RHmV) [3] sind Grenzwerte für Pflanzenschutzmittelwirkstoffe in Lebensmitteln angegeben. Lebensmittel und deren Ausgangsprodukte werden auf diese Wirkstoffe laufend untersucht, wobei viele Analyten in Multikomponentenverfahren gemeinsam bestimmt werden. Die in Deutschland am meisten eingesetzten Verfahren sind in der DFG-Methodensammlung zur Rückstandsanalytik [4] beschrieben, aber auch die Methoden der US-amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) [5] sind allgemein anerkannt.

Die Entwicklung eines Multikomponentenverfahrens setzt die Erfüllung zweier schwierig zu vereinigenden Bedingungen voraus: die gemeinsame, zuverlässige und ausreichend empfindliche Bestimmung vieler Wirkstoffe mit verschiedenen physikalisch-chemischen Eigenschaften und die Trennung der Analyten von den Begleitstoffen aus der Matrix, die einen störenden Einfluss auf die Analytik haben könnten.

Die Trennung der Matrixinhaltsstoffe von den Analyten ist ein schwieriges Unterfangen, weil sie oft sehr ähnliche Eigenschaften wie die Analyten haben. Aus diesem Grund werden häufig

Multikomponentenmethoden für Analyten einzelner Wirkstoffgruppen mit sehr ähnlichen physikalischen Eigenschaften und identischen chemischen Grundstrukturen entwickelt (DFG S6, S6A, S7, S12, S16, S17, S22, S24, S25, S26) [4].

Mit diesen Methoden können die Analyten weitestgehend von den Matrixbestandteilen abgetrennt werden, und zwar durch Ausnutzung der sehr spezifischen Stoffeigenschaften. Allerdings sind diese Methoden auf die Bestimmung der Wirkstoffe dieser speziellen Gruppe beschränkt.

Die gemeinsame Analyse von Substanzen verschiedener Wirkstoffgruppen wird durch die Breite der physikalisch-chemischen Eigenschaften der Analyten erschwert, weil hier das Problem der mangelnden Abtrennung mitextrahierter Matrixbestandteile zum Tragen kommt. Der störende Einfluss der Matrixkomponenten kann aber durch Fraktionierung des Extraktes und Anwendung verschiedener selektiven Detektionsmethoden, wie in der DFG S19 beschrieben, vermindert werden [4]. Diese Methode wurde von Specht & Tillkes [6] für über 400 Wirkstoffe und deren Abbauprodukte entwickelt, und ist sicher das in Deutschland am häufigsten angewandte Multikomponentenverfahren [7,8].

Alle erwähnten DFG-Methoden beinhalten die Gas-Chromatographie (GC) als sehr leistungsfähiges Trennsystem mit variablen Detektionsmöglichkeiten. Für Substanzen die nicht flüchtig oder temperaturinstabil, und somit für die gaschromatographische Trennung nicht geeignet sind, bietet sich die LC/MS als universell einsetzbares und trotzdem selektives und empfindliches Analysensystem für Multimethoden an.

Flüssig-Chromatographie / Massenspektrometrie-Methoden (LC/MS) werden meistens für schwerflüchtige oder thermolabile Substanzen entwickelt, die mittels GC nicht analysierbar sind. Darunter fallen auch Pflanzenschutzmittelwirkstoffe wie N-Methylcarbamate, Benzoyl- und Phenylharnstoffe, sowie saure Substanzen. Viele Wirkstoffe, meistens mit ähnlichen Eigenschaften, werden in Multikomponentenverfahren gemeinsam analysiert. Es gibt aber auch Wirkstoffe, wie Glyphosat [9] oder geladene Substanzen wie Chlormequat [10], die schwer in solche Multikomponentenverfahren zu integrieren sind.

Aufgrund der hohen Selektivität ist die LC/MS gerade für komplexe und sehr unterschiedliche Matrices wie Lebensmittel gut geeignet. Die Flüssig-Chromatographie / Tandem Massenspektrometrie (LC/MS/MS) ist seit dem Jahr 2000 als allgemein verfügbare analytische Technik etabliert, und darf somit in Überwachungsmethoden eingesetzt werden [11].

Wie in einigen Fällen demonstriert wurde, kann prinzipiell auf eine Aufreinigung des Extraktes verzichtet werden [12]. Meistens werden Acetonitril, Aceton, Methanol oder

Ethylacetat als Extraktionslösungsmittel eingesetzt, wobei je nach Lösungsmittel und Probenart mehr oder weniger hohe Gehalte an Inhaltsstoffen der Probenmatrix mitextrahiert werden. Die Interferenzen dieser mitextrahierten Substanzen sind trotz der hohen Selektivität zwar selten, aber nicht auszuschließen. Die Inhaltsstoffe der Probenmatrix können zudem das MS-Gerät verschmutzen und damit die Standzeiten zwischen den Reinigungsintervallen erheblich verkürzen. Während der Ionisierung können mitextrahierte Matrixbestandteile in Konkurrenz zu den Analyten treten, die Ionisierungsausbeute verringern (Ionensuppression) und damit zu einem falschen Ergebnis führen [13,14].

Die unterschiedlichen Verfahren, die zur Extraktreinigung herangezogen werden, sind meistens für bestimmte Substanzklassen und Probenmatrizes entwickelt worden, und es bleibt fraglich, ob der Reinigungseffekt für andere Matrizes ausreicht, um lange Standzeiten zu ermöglichen und Ionensuppression zu verhindern.

Die Auswirkungen der mitextrahierten Matrixbestandteile auf die Analytenbestimmung, die sich meist durch die Signalverringern bestimmter Analyten bemerkbar machen, stellen ein großes Problem in der Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln dar. Diese Matrixeffekte können erhebliche Fehler verursachen, wenn die Wirkstoffe in matrixhaltigen Probelösungen gegen Kalibrierstandards in reinem Lösungsmittel gemessen werden. Um dieses Problem zu umgehen, wird die Herstellung von Standardlösungen aus wirkstofffreien Matrixextrakten empfohlen. Jedoch ist das Beschaffen dieser Proben sehr aufwendig. In der Praxis wird daher oft die Quantifizierung nach den Verfahren der Standardaddition durchgeführt. Die wohl eleganteste Möglichkeit, diese Fehlerquellen zu minimieren, ist die Verwendung von isotopenmarkierten Standards, die über nahezu gleiche chemische und physikalische Eigenschaften verfügen wie die jeweiligen Wirkstoffe (Isotopenverdünnungsanalyse). Problematisch ist allein, dass solche Standards entweder sehr teuer sind oder nicht auf dem Markt angeboten werden.

Für die Routineanalytik ist es daher notwendig, ein einfaches Multikomponentenverfahren für die gemeinsame Analyse von basischen, neutralen und sauren Pflanzenschutzmittelwirkstoffen in Lebensmitteln mittels LC/MS zu entwickeln, aber auch sicherzustellen, dass die Methode für verschieden Probenarten richtige Ergebnisse liefert.

## 2 Ziele der Arbeit

Polare Pflanzenschutzmittel können bisher nur mit schwierigen und aufwendigen Methoden in Erntegütern analysiert werden. Durch die erfolgreiche Kopplung von Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie (LC/MS) steht ein sehr selektives und empfindliches Analysenverfahren zur Verfügung, mit dem prinzipiell schwerflüchtige und temperatur-empfindliche Substanzen bestimmt werden könnten. Damit würde ein auf der LC/MS basierendes Multikomponenten-Analysenverfahren eine dringend benötigte Ergänzung zur bisherigen Analytik von Pflanzenschutzmitteln darstellen.

Anhand von über 100 der wichtigsten Pflanzenschutzmittelwirkstoffe und Metabolite mit sehr unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften soll geklärt werden, ob und unter welchen Bedingungen die LC/MS für diese Substanzen eine robuste und sichere Analysenmethode darstellen kann.

Zudem muss ein geeignetes Aufarbeitungsverfahren für sehr unterschiedliche Lebensmittel entwickelt werden, das die sichere und möglichst kostengünstige Analyse erlaubt.

Es soll eine Analysenmethode entwickelt werden, welche

- die Analyten effektiv extrahiert
- die mitextrahierten Begleitstoffe entfernt
- eine selektive Bestimmung der Analyten im Spurenbereich und deren quantitative Wiederfindung ermöglicht.

Im Rahmen der Arbeit sind einige grundlegende Untersuchungen und Optimierungen einzelner Verfahrensschritte durchzuführen, deren Resultate für die Erweiterung der Methode auf andere polare Wirkstoffe und zusätzlichen Matrizes hilfreich sein werden.

Die durch Matrixeffekte verursachte Verfälschungen des Analysenergebnisses sollen durch geeignete Analysen- und Kalibrationstechniken weitestgehend kompensiert werden, damit eine hohe Analysenqualität garantiert werden kann.

Die entwickelte Methode wird schließlich an sehr unterschiedlichen Erntegütern validiert.

### 3 Stand der Forschung und theoretische Grundlagen

#### 3.1 Entwicklung von Multimethoden

Die ersten nennenswerten Multimethoden für Pflanzenschutzmittelrückständen in Lebensmitteln wurden Anfang der 60er Jahre in den USA entwickelt – in zeitlichem Zusammenhang mit der Ausreifung der Gaschromatographie zu einem leistungsfähigen Trennverfahren, sowie der steigenden Sensibilisierung der Öffentlichkeit für die Gefahren, die aus der unkontrollierten Anwendung von Pflanzenschutzmitteln resultieren.

Die ersten Multimethoden waren relativ einfach und darauf bedacht, die damals angewendeten stark lipophilen Organochlor- und Organophosphor-Verbindungen zu erfassen [15]. Der Extraktion nach Zugabe von Acetonitril folgte eine flüssig/flüssig-Verteilung mit Petrolether. Mit der steigenden Anwendung von polarerer Wirkstoffen in der Landwirtschaft Anfang der 70er Jahre ergab sich die Notwendigkeit zur Entwicklung neuer Multimethoden. Dabei wurde das Extraktionsmittel Acetonitril durch Aceton ersetzt, das sich beim Verteilungsschritt besser in die organische Phase überführen lässt, wodurch diese eine breitere Palette an polaren Wirkstoffen aufnehmen kann. Die Ausweitung des erfassbaren Polaritätsspektrums brachte jedoch auch Schwierigkeiten mit sich, da gleichzeitig viele störende Komponenten aus der Matrix mitextrahiert wurden. Um dennoch einen ausreichenden Reinigungseffekt zu erzielen, wurden die Extrakte zahlreichen Reinigungsschritten unterworfen [6]. Mitte der 90er Jahre führte die Forderung nach einer drastischen Reduzierung chlorierter Lösungsmittel zu Varianten dieser Methoden, bei denen Dichlormethan durch nichthalogenierte Lösungsmittel ersetzt wurde [7].

Der steigende Bedarf an kostengünstigeren und schnelleren Analysenverfahren führte ab Mitte der 90er Jahre zur Entwicklung von Geräten, die eine Automatisierung verschiedener Arbeitsschritte der Probenaufarbeitung ermöglichten. Dies betraf sowohl die Extraktion als auch die Aufreinigung der Extrakte. Ein hoher Automatisierungsgrad wurde z.B. bei der Gel Permeation- Chromatographie (GPC) und der Festphasenextraktion (SPE) erreicht. Zur Automatisierung der Extraktion wurden im Bereich der Pflanzenschutzmittelanalytik vor allem die beschleunigte Lösemittelextraktion (ASE) und die „supercritical fluid extraction“ (SFE) eingesetzt.

## 3.2 Sequenzschritte in der klassischen Multimethode für die Pestizidanalyse

### 3.2.1 Probenvorbereitung

Um eine repräsentative Probenahme unabhängig von der Matrixheterogenität zu gewährleisten, werden verschiedene Methoden für die Zerkleinerung und Homogenisierung der Matrizes angewandt. Repräsentative Portionen von der festen Probe, ganzem Obst oder Gemüse, werden zerkleinert und/oder homogenisiert mittels Mörsermühle, Mixgerät, Rührer [16] oder Schüttler [17].

### 3.2.2 Extraktion

Im Idealfall sollen Pestizidrückstände möglichst quantitativ extrahiert werden und gleichzeitig möglichst wenige Begleitsubstanzen in den Extrakt übergehen, wobei die Polarität des Analyten und ihre Wasserlöslichkeit wichtige Aspekte sind. Die Beschaffenheit der Matrix, insbesondere der Fettgehalt, entscheidet darüber, welche Methode für Trennung, Reinigung und Analyse geeignet ist [18]. Proben mit Fettgehalt über 2% gelten als fett [18]. Für nicht-fette Proben ist der Wassergehalt wichtiger, da er zur Probenklassifizierung hinsichtlich der Extraktion führt, und zwar in Proben mit großem oder mittlerem Wassergehalt, einschließlich denen mit 5-30% Zuckergehalt, und trockene Proben [19,20]. Ein inhärentes Problem bei einer Multirückstandsmethode ist, dass je breiter der Polaritätsbereich der Analyten ist, desto mehr Begleitstoffe mitextrahiert werden. Keine aktuelle Methode ist dazu geeignet, alle Pestizide aus allen Matrizes zu extrahieren [21].

Obst, Gemüse und Getreide werden üblicherweise mit einem organischen Lösungsmittel, Lösungsmittelgemischen, Wasser oder Wasser mit eingestelltem pH extrahiert. Aceton, Acetonitril, Methanol und Ethylacetat sind die meist benutzten organischen Lösungsmittel für die Extraktion von Pestiziden aus pflanzlichen Matrizes [22].

Anfänglich wurde Acetonitril als Extraktionslösungsmittel eingesetzt, seine Nachteile sind aber die hohen Kosten, die Toxizität und die Phasentrennung bei zucker- oder salzreichen Matrizes [17,23-28]. Bei den meist benutzten Methoden für die Analyse von Pestiziden in Obst und Gemüse, wie die FDA PAM I 302 E1 [5] oder die Luke Methode, wurde später Acetonitril (Siedepunkt 81,6°C) durch Aceton ersetzt wegen dessen höheren Flüchtigkeit (Siedepunkt 56,5°C) [8, 17, 29-33]. Extraktion mit trocknendem Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Ethylacetat ist

weniger arbeitsaufwendig, eignet sich aber nicht für fettreiche Matrices [12, 24, 31, 34-36]. In vielen anderen Methoden wird Methanol für die Extraktion eingesetzt [37-43].

Flüssige Proben wie Obstsaft, Wein und Honig werden direkt extrahiert, manchmal nach Verdünnung mit destilliertem Wasser, um die Matrixeffekte zu minimieren [19]. Für Pestizide mit starker Matrixaffinität, wie quartäre Amine, wurden spezielle Verfahren entwickelt, wie z.B. Erhitzen in Schwefel- oder Salzsäure unter Rückfluss [44].

Im Folgenden werden die verschiedenen Extraktionsmethoden beschrieben:

#### *Soxhlet- Extraktion*

Die Extraktion in einem Soxhlet Gerät, mit einem organischen Lösungsmittel wie Hexan, Dichlormethan oder Methanol war lange Zeit die Standardextraktionsmethode und wird heute immer noch angewandt. Die Systemgröße kann variieren, die meisten Konfigurationen aber benutzen etwa 100 ml Lösungsmittel und 5 bis 50 g Probe, bei Extraktionszeiten von 4 bis 18 Stunden [45].

#### *Festphasenextraktion*

Der wesentliche Vorteil der Festphasenextraktion (**Solid Phase Extraction**) liegt in der erheblichen Einsparung von Lösungsmittel und in der Möglichkeit zur Automatisierung. SPE kann direkt als Extraktionstechnik für flüssige Matrices, oder als Reinigungsmethode für Extrakte in Lösungsmitteln benutzt werden [19,46]. Das wohl wichtigste analytische Gebiet, in dem die SPE zum Einsatz kommt, ist die Wasseranalytik. Große Volumina von Wasser werden durch SPE- Kartuschen gesaugt, wobei lipophile Substanzen extrahiert werden. Die erzielbaren Anreicherungsraten sind erheblich. SPE- Verfahren, die verschiedene Festphasen wie C8- oder C18- modifizierte Kieselgele, porösen graphitischen Kohlenstoff, Polymerharze, Kationenaustauscher und Umkehrphasensorbentien benutzen, fanden eine breite Anwendung [44, 46-49].

#### *Immunoaffinitäts-chromatographie*

Die Immunoaffinitäts-chromatographie (IAC) ist sehr viel selektiver [50]. Es werden Antikörper auf der Festphase angebracht, was zur spezifischen Retention bestimmter Analyten auf diesem Material führt. Diese Methode hat die Analyse von einzelnen Phenylharnstoffen und Triazinen in Pflanzenproben wesentlich erleichtert [51]. Aufgrund der sehr spezifischen Wechselwirkungen sind diese Materialien nur für wenige Analyten geeignet.

### *Festphasenmikroextraktion*

Die „Solid-Phase Microextraction“ ist ein einfaches automatisierbares, lösungsmittelfreies Extraktionsverfahren mit hoher Anreicherungskapazität [52]. Sie erlaubt Extraktion und Anreicherung in einem einzigen Schritt. Am häufigsten werden Sorbentien auf Polydimethylsiloxan-Basis eingesetzt, die auf verschiedenen Trägermaterialien als sehr dünne Schichten auf dünne Fasern (SPME) oder auf Magnetrührstäbchen (SBSE) aufgezogen werden. Bei Kontakt mit flüssigen Proben werden die hydrophoben Analyten angereichert bzw. extrahiert. In einem speziellen Injektor des Gaschromatographen erfolgt die Desorption thermisch, teilweise automatisiert. Obwohl dieses Verfahren auf organische Lösungsmittel völlig verzichtet, wirken sich jedoch Einflüsse der Matrix und lange Equilibrierungszeiten nachteilig aus. Diese Methode eignet sich nicht für polare Analyten, weil das Gleichgewicht ungünstig und die Extraktionseffizienz niedrig ist [53, 54].

### *SBSE*

Bei der „Stir Bar Sorptive Extraction“ handelt es sich, wie bei der SPE, um ein Verfahren zur Anreicherung von Analyten aus flüssigen Proben [54]. Der wesentliche Unterschied zur SPME besteht darin, dass das Sorbens nicht aussen, sondern um einen Magnetkern in einer Glasummantelung in größerer Filmdicke angebracht ist.

### *MSPD*

Die „Matrix Solid-Phase Dispersion“ ist eine Extraktions- und Reinigungsmethode, die für Multirückstandsmethoden entwickelt wurde [55]. Sie erlaubt die Pestizidextraktion von homogen mit Florisil oder Kieselgel (C8, C18) gemischten Proben. Die homogenisierte Matrix wird in eine Röhre gefüllt, und die Analyten mit organischen Lösungsmitteln eluiert. Auf diese Art werden Extraktion und Reinigung im selben Schritt durchgeführt, mit guten Wiederfindungsraten und guter Reproduzierbarkeit, während die Extraktionszeit und das Lösungsmittelvolumen reduziert werden. Multirückstandsmethoden auf MSPD- Basis mit Aluminiumoxid, Kieselgel und Florisil wurden für die Pestizidanalyse in Gemüse entwickelt [56-58]. Für Carbamate in Orangen, Trauben, Zwiebel und Tomaten [59] und für Carbamate und Harnstoffe in Zitrusfrüchte wurden C8-Phasen erfolgreich eingesetzt [60].



### *SFE*

Die „Supercritical Fluid Extraction“ hat wegen des niedrigen Lösungsmittelverbrauchs und der guten Selektivität viel Beachtung gefunden [21]. Die Technik benutzt Gase im überkritischen Zustand, die flüssigkeitsähnliche Dichten, niedrigere Viskosität und höhere Diffusionskoeffizienten haben. Aufgrund dieser Eigenschaften extrahiert dieses Medium die Analyten mit besserem Auflösungsvermögen, und schneller als flüssige Lösungsmittel [61]. Prinzipiell erlaubt die SFE eine höhere Extraktionsselektivität, im Vergleich zu solvensbasierten Verfahren. In Kombination mit Festphasen gelingen Extraktion und Reinigung in einem Schritt [62, 63].

### **3.2.3 Aufreinigung**

Welche Extraktionstechnik auch benutzt wird, es müssen immer verschiedene mitextrahierte Komponenten, wie Lipide, Pigmente und Harze entfernt werden, um eine sicherere Identifizierung der Rückständen zu ermöglichen und Störungen an den Detektoren zu minimieren. Nur wenige Multimethoden können auf den Reinigungsschritt verzichten [24, 26-28, 31, 37, 64]. Ursprünglich wurden vor allem Flüssig-flüssig- Verteilung und Adsorptionschromatographie für die Extraktreinigung eingesetzt, mittlerweile werden aber SPE und GPC immer populärer.

#### *Flüssig-flüssig-Verteilung (LLE)*

Durch die Flüssig-flüssig-Verteilung (Liquid-Liquid Extraction) zwischen zwei nicht miteinander mischbaren Lösungsmitteln lassen sich die zu analysierenden Substanzen von einem großen Anteil der mitextrahierten Begleitstoffen abtrennen. In Deutschland, wo die Pestizidanalyse in Obst und Gemüse meist nach der DFG-S19-Methode durchgeführt wird, wird das Dichlormethan in der LLE teilweise durch Ethylacetat-Cyclohexan ersetzt [7, 8, 33]. Mittels LLE kann eine sehr gute Reinigung bei der Analyse saurer oder basischer Pestizide erreicht werden. Die notwendige Vorgehensweise mit Ionisierung der Wirkstoffe und pH-Einstellung der wässrigen Phase verhindert aber die gleichzeitige Extraktion dieser Substanzen [65].

Die wichtigsten Nachteile der LLE sind:

- es ist sub-optimal für ölige Erntegüter, die zusätzliche Reinigung verlangen
- der niedrige Probandurchsatz, wegen handdurchgeführte Aufkonzentrierungsschritte
- die großen Mengen an organischem Lösungsmittel, die als große Mengen Abfall enden

Eine Bedingung für die LLE ist die Unmischbarkeit von wässriger und organischer Phase, die bei polaren Lösungsmitteln nicht gegeben ist. Neue miniaturisierte LLE, auf Basis von Fliessinjectionstechnologie, werden die Herabsetzung des organischen Solvensvolumens erlauben und eine günstige Phasenverteilung ergeben [50].

### *Adsorptionschromatographie*

Die Anwendung der Adsorptionschromatographie (AC) zur Extraktreinigung mit Aluminiumoxid, Kieselgel oder Florisil in verschiedenen mesh-Größen, Aktivitätsniveaus und Säulendimensionen, entweder getrennt oder kombiniert, um Probenhandhabung und Analysenzeit zu reduzieren, ist weit verbreitet [19].

### *GPC*

Die Gel-Permeations-Chromatographie hat sich als universelle Reinigungsmethode bewährt, und wird in vielen offiziellen Methoden eingesetzt (USA, Holland, Deutschland und Schweden) [31]. Die automatisierbare Chromatographie an Trenngelen mit niedriger Ausschlussgrenze ist ein besonders schonendes Reinigungsverfahren, gleichermaßen geeignet für unpolare und polare Pestizidrückstände und ebenso für thermisch empfindliche Wirkstoffe und Umwandlungsprodukte. Weil die molaren Massen der Pestizide geringer sind als die von vielen natürlichen Pflanzenbestandteilen, werden sie bei der GPC erst nach den Begleitstoffen eluiert, wobei die Reihenfolge der Elution auch von Wechselwirkungen zwischen Gel, Lösungsmittel und chromatographierten Substanzen beeinflusst wird [65]. Bei der Aufarbeitung von Pflanzenextrakten, Fetten und Ölen für die Analyse verschiedener Pestizide haben sich insbesondere Polystyrol- Gele als Substrat bewährt. Nachteile dieser Technik sind die Zeitaufwendigkeit und die großen notwendigen Lösungsmittelvolumina.

### *SPE*

Die Festphasenextraktion wurde als Alternative zur LLE für die Trennung, Reinigung, Anreicherung und/oder das Lösungsmittelwechsel der gelösten Analyten entwickelt. Dank ihrer Einfachheit und Sparsamkeit in Bezug auf Zeitaufwand und Lösungsmittelsverbrauch hat diese Methode eine weite Akzeptanz gefunden.

Die Entwicklung der SPE in den 70er Jahren [66] folgte unmittelbar nach Einführung der HPLC. Bei der SPE werden im wesentlichen die gleichen Sorbentien verwendet wie bei der HPLC, jedoch sind hier die Partikelgrößen mit einem Durchmesser von typischerweise 40  $\mu\text{m}$  größer als bei der HPLC (5  $\mu\text{m}$ ). Die Sorbentien werden entweder in kleine Säulen unterschiedlicher Größe gepackt oder in eine Membran (meist Teflon) eingebettet. Die wichtigsten Nachteile der klassischen Säulenchromatographie, wie fehlende Automatisierungsfähigkeit, zeitaufwendige Säulenfertigung im Labor oder schwierige Einstellung des Aktivitätsgrades der Sorbentien, ließen sich weitgehend beseitigen durch die industrielle Herstellung der SPE-Säulen und die Verwendung von Formaten, die eine automatisierte Anwendung ermöglichen.

Zur Isolierung der Analyten wird bei der SPE meist nach zwei Prinzipien vorgegangen. Entweder werden die Analyten selektiv an das Säulenmaterial adsorbiert, die Begleitstoffe aus der Säule gespült und anschließend die Analyten eluiert, oder die Begleitstoffe werden zurückgehalten, während die Analyten die Säule passieren. Die Wahl des Adsorbens und der Elutionsbedingungen hängt von der Natur der Analyten und der Matrix ab; sie werden meist empirisch ermittelt.

Die SPE besteht aus vier verschiedenen Schritten:

Zuerst wird das Sorbens mit einem Lösungsmittel konditioniert, um die Reproduzierbarkeit der Analytenretention zu verbessern und mögliche Unreinheiten von der Festphase zu entfernen.

Das Konditionierungslösungsmittel wird dann mit dem Probenlösungsmittel ersetzt und die Probe wird unter kontrolliertem Fluss auf die Phase gegeben. Die Flussrate ist insbesondere für Kartuschen wichtig, da hier Kanäle gebildet werden können. Der pH-Wert der Probe kann eingestellt werden, um die Ionisierung von schwachen Säuren oder Basen zu reduzieren.

Das Sorbens wird weiter mit einem Lösungsmittel von mittlerer Stärke gewaschen, um Matrixkomponenten zu entfernen, ohne aber Analyten zu eluieren. Die Trocknungszeit muss ausreichend sein, damit das in den Sorbenssporen befindliche Lösungsmittel entfernt werden kann.

Anschließend werden die Analyten mit einem starken Lösungsmittel eluiert.

Die Auswahl eines geeigneten SPE- Sorbens hängt von den Wechselwirkungen zwischen Material und den zu analysierenden Komponenten ab [67].

Unpolare Wechselwirkungen treten zwischen Kohlenwasserstoffresten der funktionellen Gruppen des Sorbens und des Analyten auf. Die meisten organischen Komponenten können auf unpolaren Sorbentien über van-der-Waals-Kräfte adsorbiert werden. Fast alle organischen Verbindungen haben ein gewisses Potential für unpolare Wechselwirkungen. Ausnahmen sind Verbindungen, die sehr viele polare oder sogar ionische Gruppen enthalten (z.B. Kohlenhydrate).

Unmodifiziertes Kieselgel zeigt im Gegensatz zu den meisten modifizierten Kieselgelen keine unpolaren Wechselwirkungen. Da die funktionellen Gruppen an die Kieselgeloberfläche gebunden sind, zeigen die modifizierten Varianten dieses Sorbens zu einem gewissen Grad unpolare Wechselwirkungen.

Typische Sorbentien mit einem stark ausgeprägten unpolaren Charakter sind z.B. C18- und C8- modifizierte Kieselgele. Diese besitzen eine scheinbar geringe Selektivität, da sie über die den Alkyl- Rest in der Lage sind, nahezu alle unpolaren Substanzen anzureichern. Dies kann man besonders für die Isolierung von Substanzgruppen mit unterschiedlicher Struktur nutzen. Die apolare C18- Phase zeigt keine Affinität für ionische Analyten [44], eignet sich aber sehr gut für unpolare Substanzen [66]. Das Sorbens wurde in verschiedenen Analysemethoden für Pestizide eingesetzt [5, 28, 32].

Allgemein wird die Adsorption unpolarer Analyten an unpolaren Oberflächen durch eine polare Lösungsumgebung begünstigt, während die Elution dieser Analyten mit unpolaren Lösungsmitteln gelingt. Genau umgekehrt verhält es sich bei der Adsorption von polaren Verbindungen an polaren Sorbentien, die gut aus einer unpolaren Umgebung auf polaren Sorbentien adsorbiert werden und sich dann bevorzugt mit polaren Lösungsmitteln eluieren lassen.

Zu den polaren Wechselwirkungen gehören Wasserstoffbrückenbindungen, Dipol/Dipol- und  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen, die zwischen vielen verschiedenen Sorbentien und funktionellen Gruppen des Analyten zustande kommen. Solche Wechselwirkungen können von Amino-, Hydroxyl- und Carbonylgruppen sowie aromatischen Ringen, Doppelbindungen und Gruppen mit Heteroatomen wie Stickstoff, Schwefel, Phosphor und Sauerstoff gebildet werden.

Typische Vertreter für Sorbentien mit polaren Wechselwirkungen sind unmodifiziertes Kieselgel und modifizierte Kieselgele mit CN-, NH<sub>2</sub>- und Diol- Gruppen.

Kieselgel wird aufgrund seiner großen Kapazität oft für Normalphasen- SPE eingesetzt [68]. Modifizierte Kieselgele besitzen, solange sie nicht einer Silanisierung der verbliebenen Silanolgruppen mit kurzkettingen Silanen (Endcapping) unterzogen wurden, noch viele freie Silanolgruppen, die sekundäre Wechselwirkungen eingehen können.

Ionische Wechselwirkungen treten zwischen geladenen Analyten und einem Sorbens mit umgekehrt geladener funktioneller Gruppe auf. Kationische Gruppen sind protonierte primäre, sekundäre und tertiäre Amine, geladene quartäre Amininen oder anorganische Kationen, wie z.B. Calcium, Natrium, Magnesium etc. Beispiele für anionische Gruppen sind deprotonierte Carboxyl- und Sulfonsäuren. Für die Elution werden Eluenten mit hoher Ionenstärke und hoher Selektivität (z.B. Citrat bzw. Ca<sup>2+</sup> ) bevorzugt.

Für Matrices mit hohem Wassergehalt existieren verschiedene Anwendungsmöglichkeiten der SPE.

Unpolare bis mittelpolare Analyten werden aus polaren Lösungen mit unpolaren Kieselgel-Festphasen extrahiert, die mit Octadecyl-, Octyl-, Cyclophenyl- oder Phenyl-Gruppen modifiziert wurden [19, 69, 70].

Das Copolymer Styrol-Divinylbenzol ist gut bekannt als hydrophobes Sorbens mit gleicher oder größerer Retention als C18-Kieselgel. Chromabond HR-P wurde für die Extraktion polarer Substanzen im Umweltbereich entwickelt [71]. Die extrem große spezifische Oberfläche (1200 m<sup>2</sup>/g) und die spezielle Struktur erklären die sehr gute Adsorptionskapazität für polare organische Substanzen. Bei der Herstellung bleiben Doppelbindungen erhalten, demzufolge steht ein größeres delokalisiertes System von  $\pi$ -Elektronen zur Verfügung, um  $\pi$ - $\pi$ - Verbindungen aufzubauen und zur leichten Induzierung von Dipolen. Als Vorteil zeichnet sich auch der mögliche Einsatz von Säuren oder Basen über den ganzen pH- Bereich aus [72,73].

Graphitisierte Kohlenstoffe wie EnviCarb haben ein großes Potential für die Extraktion polarer Substanzen [68]. Aufgrund seiner positiv geladenen Aktivzentren auf der Oberfläche, können Anionen besonders stark adsorbiert werden. Mit einer gezielten Elution kann die Trennung der basischen und neutralen Substanzen von den sauren Wirkstoffen erreicht werden. Graphitische Festphasen werden normalerweise für Extraktion und Aufreinigung wässriger Proben eingesetzt [74]. Die Untersuchungen von Di Corcia [40] zeigen, dass diese Festphase für die Analyse bestimmter Substanzen in verschiedenen pflanzlichen Matrices geeignet ist.

Die Oasis-HLB-, MCX- und MAX- Festphasen bestehen aus einem N-Vinylpyrrolidon-Divinylbenzol-Copolymer, mit gebundenen Sulfonsäuregruppen bei MCX und quartären Aminogruppen bei MAX. Das Sorbens ist wasserbenetzbar, weshalb es ohne Auswirkung auf die Wiederfindungsraten der retardierten Substanzen zeitweise trocken laufen darf. Die HLB-Phase hat einen hydrophil-lipophilen Gleichgewicht (hydrophilic-lipophilic-balance), und eine spezifische Oberfläche von 831 m<sup>2</sup>/g. Das Material ist stabil über den ganzen pH-Bereich und sowohl für polare als auch für unpolare Substanzen einsetzbar. MCX und MAX retardieren die Analyten sowohl durch Adsorption als auch durch Ionenaustauschmechanismus. MCX ist ein starker Kationenaustauscher mit großer Selektivität für basische Substanzen. Der Anionenaustauscher Oasis MAX hat dementsprechend eine hohe Selektivität für saure Substanzen. Die Oasis-Festphasen finden Anwendung in der Analyse zahlreicher unterschiedlicher Pestizidwirkstoffe in verschiedenen Matrices [75, 76].

Die SPE- Kartuschen sind sehr gut brauchbar und effizient für die automatisierte Extraktreinigung, da sie weniger Lösungsmittel und Zeitaufwand erfordern. Bisher werden C18- und Aminopropyl- Festphasen für Acetonitrilextrakte, und Hydromatrix für Acetonextrakte in offiziellen Methoden (USA) angewandt [23, 77].

Die vereinfachte Variante der Säulen- SPE ist die *dispersive SPE*, bei der das Sorbens direkt mit dem Extrakt vermischt und anschließend durch Zentrifugation entfernt wird [17]. Alternativ wurden Membranextraktionsdisks entwickelt, in denen das Sorbens in einer Membran integriert wurde. Diese Disks erlauben hohen Probendurchfluss, mit geringerem Risiko einer Verstopfung der Poren im Vergleich zur konventionellen SPE [78].

### *Spül- und Co-Destillation*

Die kombinierte Spül- und Co-Destillation (Sweep co-distillation) ist gleichzeitig Extraktions- und Reinigungsmethode, geeignet für unzersetzt flüchtige Substanzen. Unter einem Strom von inertem Gas, z.B. Stickstoff, werden die Extrakte in einem erhitzten Glasgefäß destilliert, das Glaswolle oder Glaspartikel enthält. Die gelösten Bestandteile aus der Probe werden als dünne Schicht auf dem heißen Inertmaterial niedergeschlagen. Mit dem Dampf eines leichtflüchtigen Lösungsmittels (z.B. Hexan, Essigsäureethylester) werden bevorzugt die Spurenbestandteile aus dem Niederschlag herausgelöst, während die meist weniger flüchtigen Begleitsubstanzen aus der Probe zurückbleiben. Das Destillat wird eingeeengt, gegebenenfalls mit SPE gereinigt und mittels GC analysiert. Die Methode eignet sich für viele Pestizide, wie N-Methylcarbamate, Triazine und ihre Metaboliten, wird aber allmählich durch GPC ersetzt [79, 80].

### *Dialyse*

Die Dialyse (passive diffusion) durch eine polymere Membran mit Porengröße von 50 µm ist eine einfache Reinigungsmethode. Die Analyten diffundieren in das umgebende Lösemittel, während mitextrahierte Substanzen in der Probe bleiben [81]. Die Methode hat sich für die Bestimmung von Pestiziden in fettreichen Matrices, wie z.B. Öle oder Eier, bewährt [45].

## **3.2.4 Instrumentelle Analytik**

### *3.2.4.1 Chromatographische Verfahren*

Chromatographische Verfahren sind aus der modernen Rückstandsanalytik nicht mehr wegzudenken, da sie sowohl bei der Probenaufarbeitung zur Anreicherung von Wirkstoffen und Abtrennung von Begleitstoffen als auch beim Bestimmungsschritt die Methoden der Wahl sind.

### *Gaschromatographie*

Die GC ist die am weitesten verbreitete Trenntechnik für Gemische aus unzersetzt verdampfenden organischen Substanzen. Die im Injektor verdampften Gemische werden mit dem Trägergas (mobile Phase) durch eine mit der stationären Phase belegte Trennsäule transportiert. Durch die unterschiedlichen Verteilungskoeffizienten der Substanzen zwischen der mobilen und der stationären Phase (Verteilungschromatographie) können die

Komponenten des Gemisches am Säulenende zeitlich getrennt detektiert werden. Die in der GC vorhandene große Vielfalt an Injektorsystemen, mobilen und stationären Phasen, Säulen (Materialien, Säulenlängen und –durchmesser) und Detektoren erlaubt eine optimale Anpassung an verschiedene analytische Aufgabenstellungen.

Die Wahl der Säule hängt von der Natur der zu trennenden Pestizide ab. Dank ihrer Robustheit werden unpolare Phasen generell bevorzugt [51]. Weil sie die Trennung einer großen Zahl von Pestiziden mit ähnlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften ermöglichen, haben in den letzten Jahren die Quarz- Kapillarsäulen die gepackten Säulen fast ersetzt [18, 64].

Phenylharnstoffe und Carbamate sind thermisch zu labil und Carbonsäuren zu polar, somit werden für diese Substanzen meist Derivate hergestellt, die für die GC-Trennung besser geeignet sind [19, 65, 82, 83]. Die Derivate sind flüchtiger und unpolarer als die Ausgangssubstanzen und lassen sich effizienter trennen.

Die meisten GC-Methoden benutzen element-selektive Detektoren wie Elektroneneinfangdetektoren (Electron-Capture Detector) oder Thermionische Detektoren (Nitrogen-Phosphorus Detektor) [24, 84-90]. Die Detektoren werden manchmal parallel verbunden, um mittels einer einzigen Injektion mehrere Ergebnisse zu ermöglichen [61, 64].

Die GC/MS Kopplung übertrifft alle anderen spezifischen GC-Detektoren in Bezug auf Einsatzbreite, Identifizierungsvermögen und Strukturaussage. Zur Kopplung an die GC lassen sich Quadrupolgeräte, Ion-Trap-Massenspektrometer und hochauflösende Sektorfeldgeräte einsetzen (siehe Abschnitt 3.3.2.2). Im „Single Ion Recording“- (SIR) Modus zählt das Massenspektrometer zu den empfindlichsten Detektoren. In der Laborpraxis sind Quadrupol- und Ion-Trap-Massenspektrometer als Detektoren für die GC am weitesten verbreitet. Sie haben sich durch ihre Robustheit und geringe Größe bewährt und bieten mit der dazugehörigen Software oft komfortable Spektrenbibliotheken, womit die Identifizierung der Substanzen stark erleichtert wird.

Matrixkomponenten, die gleichzeitig mit den gesuchten Analyten eluieren, komplizieren die Pestizidanalyse mit GC-MS, und zwar besonders für Analyten mit niedrigen Massen. Dieses Problem kann z.B. durch die Optimierung der chromatographischen Trennung gelöst werden. Im Vergleich zu der konventionellen GC hat die neu entwickelte GC x GC- Technik, die mit zwei seriell verbundenen Säulen arbeitet, ein erheblich überlegenes Trennungspotential. Der Durchbruch dieser Technik in der Spurenanalyse wurde aber erst durch die Kopplung mit dem TOF- (Time-of-Flight) Massenspektrometer ermöglicht [91].



Die Kopplung der GC mit der Massenspektrometrie ist bei der Entwicklung von Multirückstandsmethoden für die Pestizidanalyse sehr erfolgreich eingesetzt worden [8, 24-28, 68, 72, 73, 91-94].

### *Hochleistung- Flüssig- Chromatographie*

Wegen höherer Empfindlichkeit und Auflösung der GC wurde die „High Performance Liquid Chromatography“ lange Zeit nur komplementär zur GC verwendet und zwar für solche Stoffe, die wegen ihrer hohen Polarität, geringen Flüchtigkeit oder ihrer Thermolabilität nicht mittels GC bestimmt werden konnten. Im Gegensatz zur GC, wo man nur mit Hilfe unterschiedlicher stationärer Phasen und Temperaturen trennt, kann man bei der HPLC den Chromatographiemechanismus (Adsorption, Verteilung, Ionenaustausch, Ionenpaarbildung usw.) und die Zusammensetzung der mobilen Phase in weitem Umfang variieren. Die Gradientenelution bietet dabei ähnliche Trennmöglichkeiten wie das Temperaturprogramm in der GC.

Die Techniken der HPLC sind für die Trennung von polaren und thermolabilen Verbindungen weit verbreitet. Ziel der Optimierung einer Trennung ist die Verbesserung der Auflösung bei möglichst kurzer Analysenzeit. Die Auflösung ist von der Selektivität und Trennleistung des chromatographischen Systems anhängig. Die Selektivität kann weiterhin durch Veränderungen der Eigenschaften der mobilen und stationären Phasen (z.B. Polarität, pH-Wert, Hydrophobizität, Partikelgröße, Porenvolumen) beeinflusst werden [85].

Typische analytische Säulen sind zwischen 50 und 300 mm lang und haben einen Innendurchmesser zwischen 2 und 4 mm. Die Trennung wird thermostatisiert bei einem Druck zwischen 50 und 250 bar durchgeführt.

Bei der Flüssigchromatographie wird unter anderem je nach Polarität der stationären Phase zwischen Normalphasen- (NP) und Umkehrphasen- (RP) Chromatographie unterschieden. Bei der NP-Chromatographie wird als stationäre Phase hochporöses Material mit großer spezifischer Oberfläche, oft Kieselgel ( $\text{SiO}_2$ ) oder Aluminiumoxid ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) verwendet (Adsorptionschromatographie). Um die Trenneigenschaften weiter zu modifizieren, können diese Materialien durch Einbringen von funktionellen Gruppen (z.B.  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NH}_3^-$ ) verändert werden. Die Analyten werden durch unterschiedlich starke Adsorption an die stationäre Phase getrennt. Als mobile Phase werden unpolare Lösungsmittel, z.B. n-Hexan eingesetzt [65].

Bei der RP-Chromatographie wird die Polarität der stationären Phase durch chemische Anbindung einer unpolaren Verbindung an das Basismaterial umgekehrt. Am weitesten

verbreitet ist die sogenannte ODS-Phase (von octadecyl silica) auf Kieselgelbasis. Bei diesem Material wird meistens durch Reaktion mit Alkyldimethylchlorsilan eine lange apolare C18 Alkygruppe chemisch an das Kieselgel gebunden. Kommerziell sind aber auch Materialien mit anderer Alkylkettenlänge erhältlich. Neben den stark unpolaren Alkylsilanen werden häufig Silane eingesetzt, die Nitrile, Diole oder andere funktionellen Gruppen besitzen. Einen gravierenden Nachteil der Säulen auf Kieselgelbasis sind die restlichen Silanolgruppen, die insbesondere die Analyse basischer Substanzen erschweren. Die meist angewandte Möglichkeit, diese Gruppen zu eliminieren, ist das sogenannte Endcapping. Viele der bei der ersten Derivatisierung mit langkettigen Silanen verbleibenden Silanolgruppen werden im „Endcappingverfahren“ durch kurze Silane, meist mit Trimethylchlorsilan, zu inaktiven Gruppen umgesetzt.

Für Untersuchungen sehr polarer Molekülen werden polare RP- Sorbentien eingesetzt. Bei diesen Phasen werden zwischen hydrophober Alkylkette und Kieselgeloberfläche polare Gruppen eingebunden, die vorhandene Restsilanole „deaktivieren“ und sogar den Einsatz rein wässriger Eluenten ermöglichen.

Die in der HPLC eingesetzten Sorbentien haben sehr kleine Partikelgrößen und homogenen Korngrößenverteilungen. Diese kleine Partikel erzeugen jedoch einen beträchtlichen Gegendruck, was zum Absetzen oder zu Risse des Säulenbettes führen kann.

Im Gegensatz zu partikulär gefüllten HPLC-Säulen weisen monolitische Säulen eine höhere Permeabilität und stark erniedrigte Gegendrücke auf. Diese Sorbentien sind beispielweise für die Pestizidanalytik im Wasser eingesetzt worden [95, 96].

Als stationäre Phasen für die LC sind etliche neue RP- Materialien entwickelt worden [97]:

- Endcapping- und Doppelendcapping- Phasen
- alternatives Basismaterial wie z.B.  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{ZrO}_2$
- Sorbentien mit einer Polymerschicht als Schutzschicht
- Phasen aus metallionfreien Kieselgelen
- geschützte Phasen
- Hybridphasen

Der breite Einsatz von RP-Trennsäulen bei der Pestizidanalytik ist neben ihrer Robustheit unter anderem darauf zurückzuführen, dass die Analyte in flüssigen polaren Matrices auf das Trennsystem aufgegeben werden können. Im Bereich der Umweltanalytik ist dies vor allem für die Wasseranalyse von zentraler Bedeutung und beispielweise bei GC-Techniken häufig nicht möglich. Da die untersuchten Pestizide sich oft in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften stark unterscheiden, muss die Trennung mit einem Lösungsmittelgradienten erfolgen.

Die Retentionszeiten der Analyten unterscheiden sich normalerweise so stark voneinander, dass die Analyse eines komplexen Gemisches innerhalb realistischer Analysenzeiten nicht möglich ist. Der gebräuchlichste Weg zur Beeinflussung der Retentionszeiten der Analyte ist die zeitlich programmierte Änderung der Zusammensetzung der mobilen Phase (Lösungsmittelgradienten). Dabei ändert sich vor allem die Polarität des Lösungsmittelgemisches und somit die Löslichkeit der Analyte in der mobilen Phase, wodurch sich die Retentionszeiten verkürzen. Die Trenneigenschaften des Systems können durch Zusatz von Additiven zu den Lösungsmitteln der mobilen Phase beeinflusst werden, indem beispielweise der pH-Wert verändert wird. Bei der Variation der Zusammensetzung der mobilen Phase muss jedoch darauf geachtet werden, dass die Detektion nicht gestört wird. So können bei der massenspektrometrischen Analyse keine unverdampfbaren Puffer eingesetzt werden, da ihre Rückstände die Einlasssysteme verstopfen können [98].

Der Nachweis von Pestiziden erfolgt vorherrschend mit UV-vis- und Fluoreszenzdetektoren. Bei Einsatz eines Dioden-Array-Detektors (DAD) liefert die UV- Detektion neben der Retentionszeit als zusätzliche Information noch das Spektrum der Analyten, so dass sich Spektrenbibliotheken aufbauen lassen, die bei der Untersuchung unbekannter Analyten hilfreiche Aussagen liefern. Die HPLC mit UV-Detektion wird z.B. für die Multirückstandsanalyse von schwerflüchtigen Bipyridylum-Herbiziden und temperaturempfindlichen Benzoylharnstoffen eingesetzt, ohne die Notwendigkeit einer Derivatisierung und ohne komplizierte Reinigungsprozeduren [60].

Die UV- Bestimmung von sauren Pestiziden in Wasser wird von mitextrahierten Huminstoffe erschwert. Hier hat sich die LC- LC-UV-Methode erfolgreich erwiesen, indem C18- und „Restricted Access Medium“- Säulen seriell gekoppelt wurden [51].

Weil es nur wenige gut fluoreszierende Pestizide gibt, kann der Fluoreszenz- Detektor nur für bestimmte Stoffe oder erst nach einer Derivatisierung zu fluoreszierenden Substanzen, wie z.B. für N-Methylcarbamate, eingesetzt werden [28, 65].

Unter den HPLC- Detektoren nimmt die Massenspektrometrie wegen ihrer Universalität eine besondere Stellung ein. Sie ist einerseits empfindlich und selektiv, andererseits auch in der Lage, Molekulargewicht- und Strukturaussagen zu liefern. Die Selektivität ermöglicht es in vielen Fällen sogar, chromatographisch unvollständig getrennte Komponenten massenspektrometrisch aufzulösen und quantitativ zu erfassen.

Die Anzahl der Publikationen im Bereich der Untersuchungen von Pestiziden in Lebensmitteln mittels LC/MS ist in den letzten Jahren erheblich angewachsen. Zu den untersuchten Substanzgruppen gehören Benzoylharnstoffe [75, 99, 100], Benzimidazole [12, 75, 101, 102, 118], Carbamate [12, 37, 40, 59, 75, 100, 102-108], Imidazole [12, 75, 101, 109], Sulfonylharnstoffe [43], Phenylharnstoffe [37, 75, 106], quartäre Ammoniumsalze [110, 111], Triazine [37, 105] und Organophosphor-Verbindungen [37, 102, 112]. Für die gemeinsame Bestimmung von Benzimidazolen, Carbamaten, N-Methylcarbamaten und Organophosphor-Verbindungen wurde eine Multimethode mit Ethylacetatextraktion, keine Reinigung und eine Nachweisgrenze von 10 ppm veröffentlicht [113].

#### *Dünnschichtchromatographie*

Die Dünnschichtchromatographie (Thin Layer Chromatography) wird für die Analyse von N-Methylcarbamaten, Pyrethroiden und deren Metaboliten eingesetzt, seltener aber als GC und HPLC wegen ihrer hohen Bestimmungsgrenzen [65].

#### *3.2.4.2 andere Bestimmungsverfahren*

##### *Kapillarelektrophorese und Kapillarelektrochromatographie*

Die Kapillarelektrophorese (Capillar Electrophoresis) ist eine vorteilhafte analytische Technik, häufig angewandt in der Pestizidanalytik wegen ihrer Einfachheit und Trennungseffizienz [114, 115].

Die Kapillarelektrochromatographie (Capillar Electrochromatography) ist eine Hybridtechnik, die die HPLC- Selektivität mit der Trennungseffizienz von CE verbindet [54]. Der Einsatz beider Techniken in der Spurenanalytik ist aber durch hohe Bestimmungsgrenzen und das Fehlen selektiver Detektoren limitiert.

*Biotechniken*

Die Immunoassay- Technik (IA) ergänzt traditionelle Analysenmethoden, aufgrund extremer Empfindlichkeit, niedriger Kosten und einfachen Instrumenten. Die meist benutzten IA für die Pestizidanalyse sind Immunsensoren (IS), Immunoassay- Chromatographie (IAC), „Immunolabeling“ und „enzym-linked immunosorbent assay“ (ELISA) [64].

Molekülprägnierte Polymere sind sehr selektiv und hochempfindlich, eignen sich aber nur für einzelne Substanzen [116, 117]. ELISA ist sehr spezifisch, weil Matrixeffekte und die Notwendigkeit für Reinigung und Aufkonzentrierung stark reduziert werden. Notwendige Antikörper sind aber nur für wenige Substanzen verfügbar und machen Multirückstandsanalysen sehr schwierig. Das Verfahren hat Nachweisgrenzen im ppb- Bereich [83, 118, 103].

*Andere Techniken*

Verschiedene polarographische, photokinetische, voltametrische oder spektrophotometrische Techniken wurden für die Bestimmung von Pestiziden in Lebensmitteln entwickelt, obwohl sie weniger informativ sind als jene die GC oder HPLC benutzen [54, 64, 83].

### 3.3 Massenspektrometrie

Die erfolgreiche Kopplung der HPLC mit der Massenspektrometrie eröffnete der Rückstandsanalytik neue Möglichkeiten. Das Erfassungsspektrum der Multimethoden konnte drastisch erweitert werden, so dass viele Verbindungen, die lange Zeit wegen der komplizierten Analysenverfahren nicht routinemäßig untersucht wurden, jetzt einfach miterfasst werden können.

Um Verbindungen in kleinsten Konzentrationen mit hoher Sicherheit zu identifizieren, ist die Massenspektrometrie heute die Methode der Wahl, nach ihrem Einzug als routinemäßige GC/MS-Kopplung in der Pflanzenschutzmittelanalytik vor etwa 10 Jahren. Hierzu werden MS-Detektoren der GC oder HPLC nachgeschaltet. Massenspektrometer sind empfindlicher als UV- Detektoren, universell einsetzbar, und liefern dazu substanzspezifische Informationen, wodurch die Identifizierungssicherheit drastisch erhöht wird.

Das Prinzip der Massenspektrometrie beruht auf der Ionisierung der Analytmoleküle oder Atome, welche dann anhand ihres Masse/Ladungsverhältnisses  $m/z$  getrennt und detektiert werden. Diese physikalische Trennungsart haben alle Massenspektrometer gemeinsam, dennoch gibt es starke Unterschiede in Aufbau und Auswertung.

Der generelle Aufbau der Geräte setzt sich aus einem Einlasssystem, einer Ionenquelle, einem Trennsystem und einem Detektor zusammen.

#### 3.3.1 Kopplungstechniken

Die normalen Arbeitsbedingungen eines Massenspektrometers (Hochvakuum, hohe Temperatur, Ionen in Gasphase) sind denen der HPLC diametral entgegengesetzt (flüssige Phase, hoher Druck, relativ niedrige Temperaturen). Wegen dieser Gegensätzlichkeit der Bedingungen ist es erst seit kurzer Zeit gelungen, effektive und robuste Kopplungstechniken zu entwickeln [119].

Durch die Entwicklung von Ionisierungsverfahren, die bei Atmosphärendruck (Atmospheric Pressure Ionization) arbeiten und nahezu vollständig kompatibel mit der RP-Chromatographie sind, lassen sich auch thermolabile und schwerflüchtige Substanzen sehr empfindlich analysieren.

Charakteristisch für die Ionisierungstechniken ist die geringe Energie, die auf die Analyten übertragen wird. Hieraus resultiert nur eine geringe Fragmentierung und einfache Spektren, deren Basispeak meist dem protonierten (im positiven Modus) bzw. deprotonierten (im

negativen Modus) entspricht. Häufig werden auch Addukte der Analyten mit Ammonium- und Natriumionen im positiven Modus oder Chloridionen im negativen Modus beobachtet. Die Überführung in die Gasphase und die Ionisierung der Analytmoleküle erfolgen in einer dem hochevakuierten Massenanalysator vorgeschalteten Ionenquelle.

### 3.3.1.1 ESI

Die Elektrospray-Ionisierung basiert auf der Überführung der Ionen, die in der flüssigen Phase vorgebildet wurden, in die Gasphase [121]. Die Vernebelung der flüssigen Probe erfolgt mit Hilfe von Stickstoff-Gas in ein Hochspannungsfeld, wobei kleine positiv oder negativ geladene Tröpfchen entstehen. Im weiteren Prozess der Lösungsmittelverdampfung verkleinert sich der Tropfenradius, wodurch sich die Oberflächenspannung bis zu einer kritischer Größe erhöht und der Tropfen platzt (Coulomb-Explosion). Nach kompletten Verdampfen und Absaugen des Lösungsmittels liegen die geladenen Teilchen am Ende gasförmig in der Ionenquelle vor (Abbildung 3.1). Bei Molekülen mit großem Molekulargewicht (Proteine, Peptide, Oligonucleotide) entstehen mehrfach geladene (protonierte) Molekülionen, die dann mit konventionellen Massenanalysatoren detektiert werden können [121].

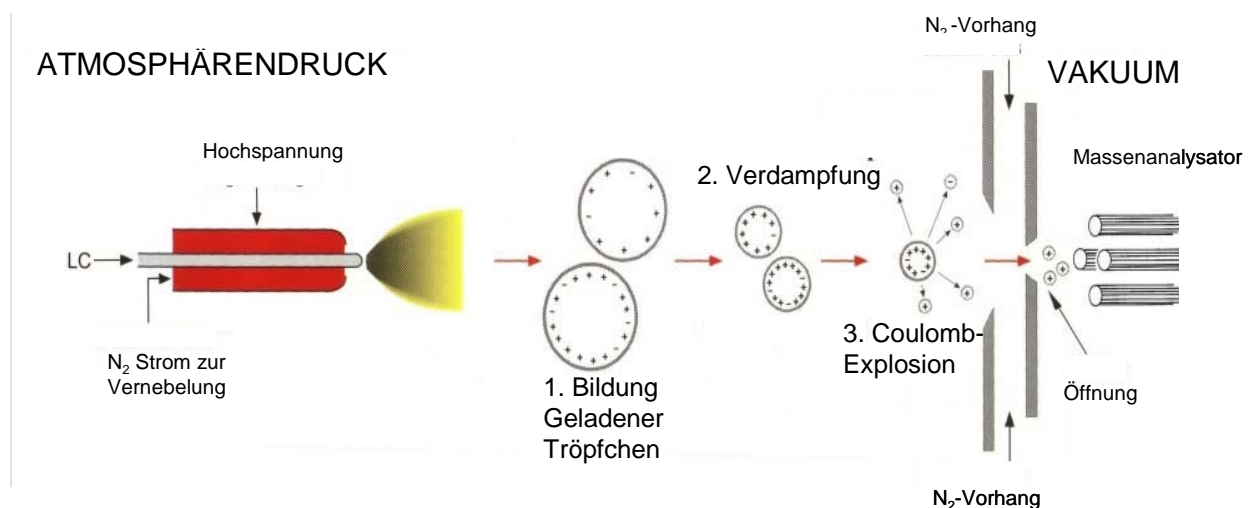


Abbildung 3.1: Electrospray Ionisierung, verändert nach Applied Biosystems [122]

### 3.3.1.2 APCI

Die APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation) ist der ESI-Technik sehr ähnlich. Die Ionisationsbedingungen sind jedoch härter als bei der ESI-Technik, so dass auch die Ionisierung weniger polarer Verbindungen gelingt.

Es findet eine chemische Ionisierung statt, bei der die Ladung mittels eines Reaktands, in der Regel die mobile Phase, übertragen wird. Der Unterschied zwischen ESI und APCI besteht darin, dass bei der APCI keine Hochspannung an der Einlasskapillare anliegt, sondern das Eluat durch verschiedene Gasflüsse zerstäubt, fokussiert und anschließend mit einem Heizer verdampft wird (siehe Abbildung 3.2).

Die mobile Phase wird unter Temperaturen von bis zu 600°C durch eine Kapillare versprüht und komplett verdampft. Eine unter Spannung stehende Stahlnadel erzeugt Entladungen, in deren Folge die im Überschuss vorhandenen Bestandteile der mobilen Phase wie z.B. Methanol oder Wasser protoniert bzw. deprotoniert werden. Anschließend erfolgt ein Protonentransfer zu (positiver Modus) oder von (negativer Modus) den Analytmolekülen. Diese chemischen Reaktionen sind Gleichgewichtsreaktionen und damit von der Gasphasen-Säure-Base-Chemie der beteiligten Moleküle abhängig.

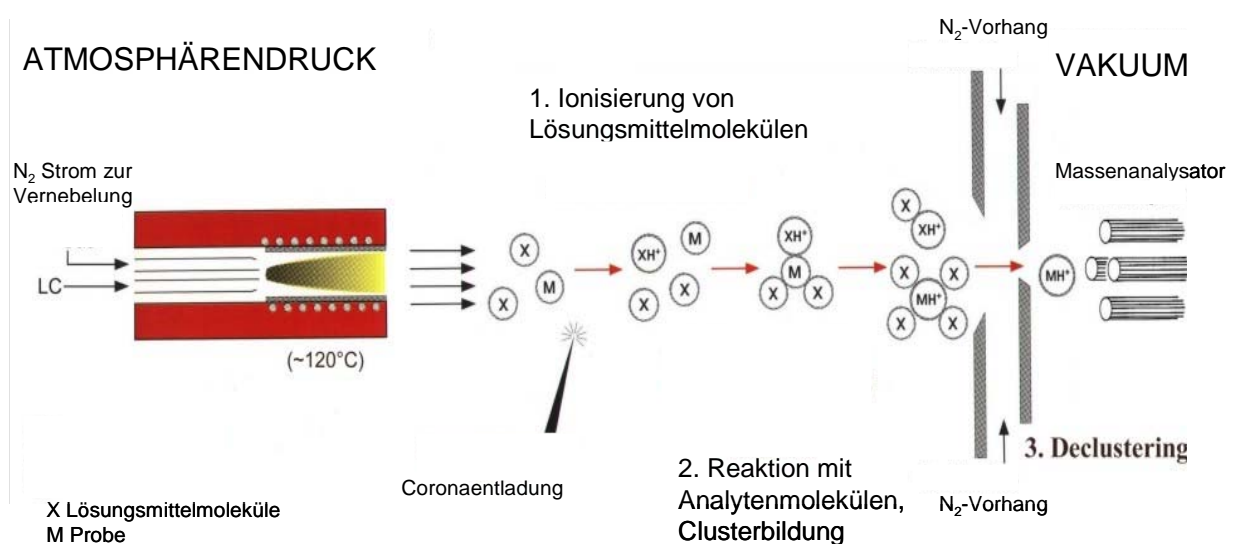


Abbildung 3.2: Chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck, verändert nach Applied Biosystems [122]

### 3.3.1.3 APPI

Für Substanzen von geringer Polarität, die mit ESI oder APCI nicht zugänglich sind, besteht die Möglichkeit der Photoionisierung in der „Atmospheric Pressure Photoionization“ (APPI)-Interface. Die Photoionisierung erfolgt mit Hilfe einer Lampe, die energiereiches Licht ausstrahlt. Das Emissionsmaximum der Lampe ist so gewählt, dass die Analyten in der Gasphase photoionisiert werden, das Lösungsmittel und die Trägergaskomponenten jedoch



nicht. Die Ionisierung wird hierbei durch Photonen anstelle von Elektronen erreicht, was die APPI unabhängig von der Säure-Base-Chemie macht.

Für die HPLC-MS Kopplung standen in dieser Arbeit die zu den API zählenden ESI- und APCI- Techniken zur Verfügung. Sie sind empfindlich, robust, erfassen ein breites Substanzspektrum und werden deshalb auch in der Umweltanalytik verstärkt eingesetzt. In der Tabelle 3.1 sind die kennzeichnenden Eigenschaften dieser Ionisierungstechniken zusammengefasst.

Tabelle 3.1 Gegenüberstellung der beiden möglichen Ionisierungstechniken APCI und ESI

Ionisierungstechnik	APCI	ESI
verfügbare Probenköpfe	Heated Nebulizer (HN)	IonSpray (IS), TurboIonSpray (TIS)
unterer Massenbereich	ab ca. 100 (ausnahmsweise ab 30)	ab ca. 100 (ausnahmsweise ab 30)
oberer Massenbereich	bis ca. 2000	>> 3000
Ionisierung	einfache Ionisierung (positiv oder negativ)	ein- oder mehrfache Ionisierung (positiv oder negativ)
Flussraten (bei 90% Wasser)	bis ca. 1.5 mL/min	bis ca. 40 µL/min (IS), bis ca. 400 µL/min (TIS)
ionische Analyten	ungeeignet	gut geeignet
polare Analyten	geeignet	gut geeignet
unpolare Analyten	gut geeignet	wenig geeignet (nur über Adduktbildung)
Polarität der Analyten	gering bis mittel	mittel bis hoch
Verdampfbarkeit der Analyten	erforderlich	nicht erforderlich
Eluenten- Split	verringert Intensität	annähernd keine Wirkung
Sensitivität bestimmender Faktor	eingebrachte Masse	Konzentration
thermolabile Analyten	bedingt geeignet	geeignet (IS), bedingt geeignet (TIS)
einsetzbare Puffer	nur flüchtige Puffer, max. ca. 100 mM	nur flüchtige Puffer, max. ca. 100 mM
bevorzugt gebildete Ionen	$[M + H]^+$ , $[M - H]^-$	$[M + xH]^{x+}$ , $[M - H]^-$

### 3.3.2 Massenanalysatorsysteme

Abhängig von ihrem Masse/Ladung-Verhältnis, werden die Gasphasenionen im Massenanalysator physikalisch getrennt und dann zum Detektor, einem Sekundärelektronen-Vervielfacher, weitergeleitet.

Die verschiedenen verfügbaren Massenanalysatoren können jeweils für unterschiedliche Applikationsbereiche eingesetzt werden. Namentlich sind das Sektorfeld-MS, Quadrupol-MS, Ionenfalle (Ion Trap), Flugzeit- (Time of Flight)-Systeme und Ionen-Cyclotron-Resonanz (ICR)- Systeme [85,120].

### 3.3.2.1 Beschleunigung

Um ein Massenspektrum zu erhalten, müssen die gebildeten Ionen nach ihren Massen getrennt werden. Die Ionen werden generell durch ein schwaches Feld aus der Ionisierungsregion der Quelle entfernt und anschließend über ein Potentialgefälle beschleunigt. Die Geschwindigkeit  $v$  der einzelnen Ionen hängt von der Ladung  $e$  und der Masse  $m$  der Ionen sowie von der Beschleunigungsspannung  $U$  ab:

$$e \cdot U = \frac{m \cdot v^2}{2} \quad (1)$$

$$v = \sqrt{\frac{2 \cdot e \cdot U}{m}} \quad (2)$$

### 3.3.2.2 Massenspektrometer

#### Sektorfeld-Massenspektrometer

Die Ionen werden mit der Hochspannung  $U$  beschleunigt, dann in einem Magnetfeld  $B$  entsprechend ihres  $m/z$  getrennt und mit einem zusätzlichen elektrischen Sektorfeld bezüglich ihrer Energiedispersion fokussiert.

Der Ablenkungsradius  $r$  ergibt sich durch Gleichsetzen von Lorentz- ( $B \cdot e \cdot v$ ) und Zentrifugalkraft ( $m \cdot v^2/r$ ) aus Gleichung (3).

$$r = \frac{m \cdot v}{e \cdot B} \quad (3)$$

Substituiert man  $v$  nach Gleichung (2), so wird für jede Masse  $m$  einen bestimmten Bahnradius  $r$  erhalten:

$$r = \sqrt{\frac{2m \cdot U}{e \cdot B^2}} \quad \therefore \quad \frac{m}{e} = \frac{B^2 \cdot r^2}{2U} \quad (4)$$

Aus der Gleichung (4) geht hervor, dass die Ionen nicht nach ihrer Masse, sondern nach dem Verhältnis Masse zu Ladung ( $m/e$ , praktisch  $m/z$ ) getrennt werden.

Das so erreichte Auflösungsvermögen ermöglicht die Differenzierung von Isonukliden und in vielen Fällen eine sichere Identifizierung der Substanz über ihre Elementarzusammensetzung.

Doppelfokussierende Geräte können wie mehrfach hintereinandergeschaltete Massenspektrometer (MS/MS) zur Untersuchung des Fragmentierungsverhaltens und damit zur Strukturaufklärung der Substanzen eingesetzt werden. Ein bekanntes Fragmentierungsverhalten ist im umgekehrten Fall eine extrem selektive Nachweismethode, die sowohl in der Pharmaforschung als auch in der Umweltanalytik verstärkt Eingang findet.

#### *Quadrupol-Massenspektrometer*

Der Quadrupol ist ein Massenfilter aus vier parallelen Metallstäben, wo unter vorgegebenen physikalischen Bedingungen nur Ionen mit bestimmten  $m/z$ -Werten den Detektor erreichen. Die Metallstäbe sind kreuzweise miteinander leitend verbunden. Die Ionentrennung erfolgt mit Hilfe elektrischer Felder.

An je zwei gegenüberliegende Stäbe werden jeweils eine Wechselspannung und eine positive bzw. eine negative Gleichspannung angelegt. Die zweite Wechselspannung ist um  $\pi$  versetzt. Die Wechselspannung bewirkt, dass relativ zur Mittelachse abwechselnd positive und negative Felder entstehen. Durch das Stabsystem fliegende positive Ionen werden während der positiven Phase zur Mittelachse, während der negativen zu den Stäben hin beschleunigt. Die seitliche Ablenkung hängt von der angelegten Spannung, der Frequenz und der Masse der Ionen ab. Die positive Gleichspannung bewirkt eine generelle Ablenkung zur Mittelachse hin, und unterstützt damit schwere Ionen, die das System passieren können. Leichte Ionen schwingen aus und werden entladen, indem sie die Stäbe treffen. Eine umgekehrte Wirkung hat die negative Gleichspannung, die Ionen über eine bestimmte Masse zu den Stäben hin ablenkt. Das positive Feld der entsprechenden Wechselspannung reicht aus, um Ionen mit niedriger Masse zur Mitte des Stabsystems zu bringen.

Zwei gegenüberliegende Stäbe sperren somit für niedrige Massen, die anderen zwei für hohe Massen. Durch die geeignete Abstimmung dieser Spannungen wird erreicht, dass jeweils nur Ionen einer Masse das Stabsystem durchfliegen können.

#### *Ionenfalle*

Die Ionenfalle ist die zyklische Variante des Quadrupol. Hier werden Ionen über einen weiten  $m/z$ -Bereich in einem elektrischen Feld gespeichert. Die Auswahl der gesuchten Ionen erfolgt durch Veränderung der angelegten Elektrodenspannungen. Die Erzeugung und Registrierung der Ionen findet gepulst statt. In der Ionenfalle kann man auch Reaktionen ablaufen lassen oder ausgewählte Ionen durch Stoßaktivierung fragmentieren. Die Ionenfalle ermöglicht die

Durchführung multipler MS/MS-Experimente, wobei die MS<sup>n</sup>- Spektren vollautomatisch und datenabhängig generiert werden können.

#### *Flugzeit-Massenspektrometer*

TOF- Analysatoren nutzen die unterschiedlich langen Flugzeiten von Ionen mit unterschiedlichen m/z-Werte durch den evakuierten Raum. Setzt man in Gleichung (2) für  $v = s/t$  ein ( $s$  Länge des Flugrohres und  $t$  Flugzeit), so ergibt sich nach Gleichung (5), dass leichtere Ionen das Ende des Flugrohres schneller erreichen als schwerere und so nacheinander registriert werden können.

$$\frac{m}{e} = \frac{2U \cdot t^2}{s^2} \quad (5)$$

Die Messung findet gepulst statt, um die gleichzeitige Ankunft von Ionen mit unterschiedlichen m/z-Werten zu vermeiden. Die hohe Auflösung und genaue Massenbestimmung der TOF- Systemen ist für die qualitative Analytik sehr hilfreich [123].

#### *Ionen-Cyclotron-Resonanz-Massenspektrometer*

Der ICR- Massenspektrometer erlaubt eine Speicherung der Ionen in einem starken magnetischen Feld. Hier bewegen sich Ionen auf Kreisbahnen entsprechend Gleichung (3). Für die einzelnen Ionenmassen ist  $v$  nicht konstant, weil die Ionen sich in unterschiedlicher Entfernung vom Zentrum der Zelle befinden. Deshalb wird statt  $v$  die Winkelgeschwindigkeit  $\omega$  verwendet, und über  $v$  die Winkel- oder Cyclotronfrequenz.

$$\omega = \frac{v}{r} = \frac{e \cdot B}{m} \quad (6)$$

$$\frac{\omega}{2\pi} = \nu \quad (7)$$

Für  $m/e$  ergibt sich nach Gleichung (8)

$$\frac{m}{e} = \frac{B}{2\pi\nu} \quad (8)$$

Die Ionen werden in ihrer kreisenden Bewegung durch Plattenelektroden eingegrenzt. Bei modernen Geräten werden die Ionen durch einen Hochfrequenzimpuls in Phase gebracht, was letztlich zu einer komplexen elektromagnetischen Welle führt. Durch Fourier-Transformationen wird aus dieser Welle das Massenspektrum erhalten (FT-ICR).

Diese Geräte zeichnen sich durch eine sehr hohe Auflösung aus. Weil dabei die Möglichkeit der exakten Massenbestimmung besteht, kann über die Isotopenverteilung die Elementarzusammensetzung eines Moleküls berechnet werden [51,119,120,124-128].

### *Kopplung*

Als Kopplung mit der LC werden einzelne Detektoren oder verschiedene Kombinationen eingesetzt, wobei Informationen über das Molekulargewicht der untersuchten Substanzen in erster Linie von Single- Quadrupol (Q) und TOF- Systemen geliefert werden. Kombinationen des TOF- Systems mit einer Ionenfalle oder ein zweites TOF sind schon untersucht worden. Das meist eingesetzte ist das Hybridinstrument Q-TOF, mit dem MS/MS- Daten mit hoher Auflösung und Massengenauigkeit erzeugt werden können [127]. Dreidimensionale Quadrupol- Ionenfalle- Geräte (Q-Trap) sind besonders erfolgreich in Strukturaufklärungsstudien eingesetzt worden [127].

### *3.3.2.3 Auflösung*

In Massenspektren werden die Ionenmassen gewöhnlich als ganze Zahlen angegeben, obwohl die Massen einzelner Isotope nicht exakt ganzen Zahlen entsprechen. Doppeltfokussierende Massenspektrometer können Ionen gleicher nominaler Massenzahl und verschiedener Zusammensetzung trennen, und die entsprechenden Massen bis in die 4. Dezimale bestimmen.

Zur Beurteilung der Trennleistung eines Massenspektrometers dient das sogenannte Auflösungsvermögen  $A$ :

$$A = \frac{m}{\Delta m}$$

Ein Auflösungsvermögen von 1000 bedeutet, dass die Masse  $m=1000$  von der Masse  $m=1001$  getrennt wird ( $\Delta m=1$ ) [120].

Für moderne Geräte wird das Auflösungsvermögen durch die Breite des Signals (Peak) in halber Höhe (full width half maximum, FHMW) definiert. Das MS/MS- System in dieser Arbeit hat eine „unit resolution“ von  $0.7 \pm 0.1$  amu (FHMW).

### 3.3.3 MS/MS

Durch Nacheinanderschalten von mehreren Massenspektrometer- Einheiten ergibt sich eine Kopplungsmöglichkeit, die Tandem- MS oder auch MS/MS genannt wird. Diese ist an ein chromatographisches Trennsystem angeschlossen. Die Kopplung ermöglicht eine exakte Identifizierung und Quantifizierung sowohl von reinen Substanzen als auch von Substanzgemischen. Vor allem die Schnelligkeit ist ein großer Vorteil der MS/MS. So können Messungen innerhalb von Millisekunden durchgeführt werden.

Das Tandem- MS umfasst meist 3 Quadrupole, auch Triple- Quadrupol genannt, wobei nur beim Ersten und beim Dritten eine Messung erfolgt. Der mittlere Quadrupol (Stoßkammer) dient zur zweiten Ionisierung des vorher ausgesuchten Analyten (Abbildung 3.3). Die gebildeten Ionen werden mithilfe mehreren Potentialdifferenzen fokussiert, fragmentiert und durch die Vakuumkammer geleitet.

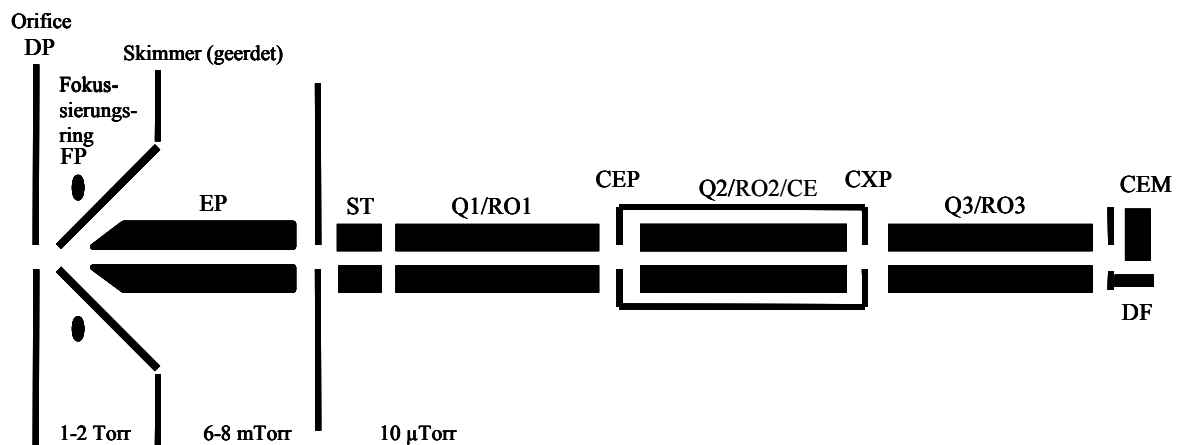


Abbildung 3.3 Schematische Darstellung des verwendeten MS/MS-Systems, Q1-3= Quadrupole, ST= Stubbies (Vorfilter), DF= Deflector, CEM= Channel Electron Multiplier, RO= offset voltages; DP= declustering potential, EP= entrance potential, CEP= cell entrance potential, CE= collision energy, CXP= cell exit potential

#### Scan-Modi

Beim Scan- Modus werden Ionen verschiedener Massen nacheinander in den stabilen Bereich des Quadrupols gebracht und können ihn auf einer stabilen Flugbahn passieren. Hier werden die Massen eines bestimmten Bereiches in der gleichen Weise gemessen, wobei die Intensität des Signals verglichen mit dem SIM- bzw. SRM-Modus geringer ausfällt.

Im „Single Ion Monitoring“ (SIM)- Modus (Single- Quadrupol) kann nur ein  $m/z$ -Wert den Quadrupol passieren. Das vergleichbare „Selected Reaction Monitoring“ (SRM)- Modus für

den Triple- Quadrupol hat wegen der Selektivität der MS/MS eine höhere Empfindlichkeit. SIM und SRM sind die besten Techniken für quantitative Bestimmungen, da sie beste Empfindlichkeit und Präzision gewährleisten.

Die Fragmente einer Verbindung können mit dem Produkt Ion Scan detektiert werden. Q1 filtert dabei die gewählten  $m/z$ -Verhältnisse heraus, die im Q2 durch Kollisionen mit Stickstoffmolekülen (Collisionally Activated Dissociation, CAD) fragmentiert werden. Im Q3 werden analog zum Q1-Scan alle Massen des festgelegten Massenbereichs herausgefiltert und zum Detektor weitergeleitet. Molekülfragmente können auch in der Ionenquelle generiert werden, und zwar über die sogenannte „In Source collision induced dissociation“ (CID). Hier erfolgt die Fragmentierung durch Kollisionen mit Stickstoff- und Lösungsmittelmoleküle.

Im „Multi Reaction Monitoring“ (MRM) wird das Molekülion im ersten Quadrupol selektiert, und in das zweite Quadrupol transferiert, wo es durch Kollisionen mit zudosiertem Stickstoffgas fragmentiert wird. Ein charakteristisches Produkt-Ion wird im dritten Quadrupol selektiert und anschließend detektiert (Abbildung 3.4). Ein Messsignal kommt somit nur dann zustande, wenn gleichzeitig im ersten Quadrupol das entsprechende Vorläuferion und im dritten Quadrupol das daraus entstehende Produkt-Ion vorliegt.

Weitere Messmodi wie Precursor-Ion-Scan und Neutral-Loss-scan werden besonders zur Identifikation unbekannter Analyten und Aufklärung von Molekülstrukturen eingesetzt. Wird unter Verwendung von Scanfenstern gemessen, werden nur bestimmte Massen/ Massenübergänge oder auch bestimmte Scanbereiche in zeitlich festgelegten Abschnitten des Messprogramms detektiert, wodurch eine Intensitätssteigerung erreicht werden kann.

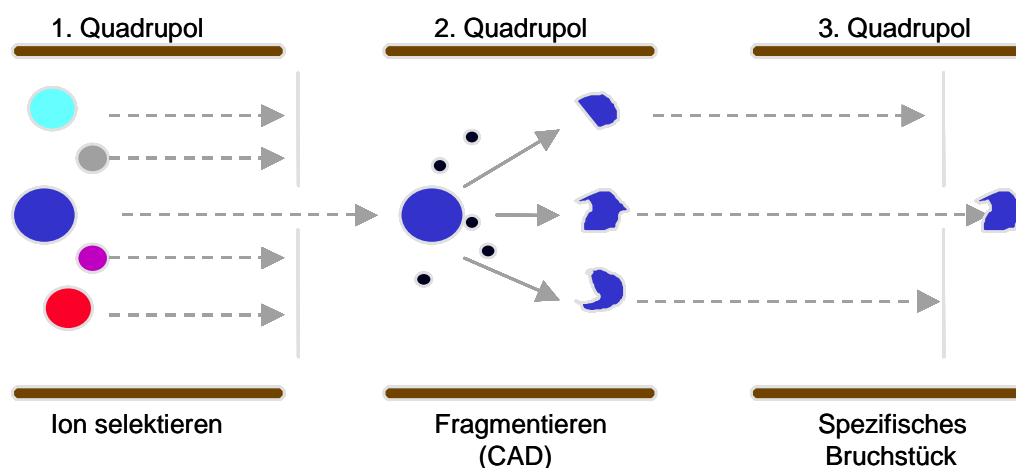


Abbildung 3.4: Multi Reaction Monitoring, verändert nach Applied Biosystems [122]

### 3.4 Matrixeffekte in der LC/MS

Ein großes Problem der Analytik mit der LC/MS sind die Matrixeffekte, die auf unterschiedliche Weise auftreten. Wenn die im vielfachen Überschuss vorliegenden Matrixkomponenten die Ionenausbeute des Analyten verringern, findet eine Ionensuppression durch konkurrierende Ionisierung statt. Die organischen Komponenten in der Probe konkurrieren mit den Analyten um die Oberfläche des geladenen Tropfens, um in die Gasphase zu gelangen. In Einzelfällen ist auch eine erhöhte Ionenausbeute bei Anwesenheit von Störmatrix beobachtet worden.

Eine andere Hypothese für die Verringerung der Ionisierungseffizienz ist, dass die geladenen Tropfen den kritischen Radius nicht erreichen können, wenn die Probe nicht flüchtige Komponenten enthält. Matrixkomponenten können auch die Oberflächenspannung beeinträchtigen und mit den Analyten Addukte bilden [129]. Dabei werden andere Ionen gebildet, als bei Proben in organischem Lösungsmittel (z.B. Standard liefert  $[M+H]^+$ , aufgestockte Matrix liefert  $[M+Na]^+$ ).

Die Verbindungen, die Ionensuppression verursachen, sind weitestgehend unbekannt [129].

Zur Elimination oder Verringerung des Matrixeffektes können verschiedene Strategien eingesetzt werden [14]:

- Abreicherung der Matrixbestandteile durch verbesserte Probenvorbereitung
- Veränderung der chromatographischen Bedingungen um zeitgleiche Elution zu vermeiden
- Verdünnung der Probe

Mit den ersten beiden Strategien kann versucht werden, die Analytik matrixunabhängig zu gestalten. Aus Kostengründen und hinsichtlich der Analysenqualität ist ein Hauptziel dieser Methoden die Vermeidung von manuellen Arbeitsschritten.

Die Vermeidung der Matrixeffekte durch optimierte Gradientenelution ist eine erfolgreiche Strategie [130], kann aber in Multimethoden wegen der Vielzahl der untersuchten Substanzen nicht eingesetzt werden.

Die HPLC- Bedingungen können weiter durch den Einsatz verschiedener Säulen oder durch zwei dimensionale Chromatographie (LC x LC) optimiert werden. Die nächste Alternative wäre die Modifizierung der mobilen Phase, wobei die Matrixeffekte auf Kosten der Empfindlichkeit verringert werden [129].



Eine Probenverdünnung scheidet bei Messungen im Spurenbereich aus. Um den Matrixanteil in den injizierten Proben zu reduzieren, muss eine selektivere Extraktionsmethode oder eine intensivere Extraktenreinigung eingesetzt werden. Dieser Ansatz kann zu niedrigeren Matrixeffekten führen, ist aber zeitaufwendig und erhöht das Risiko der Analytenverluste.

Zur Kompensation von Matrixeffekten, die sich durch o.g. Punkte nicht vermeiden lassen, werden in der Literatur weitere Verfahren diskutiert [14, 129]:

- Quantifizierung über Standardadditionsverfahren

Die Standardaddition stellt bei nicht reproduzierbaren Matrixeffekten eine Quantifizierungsmöglichkeit dar, die jedoch laborintensiv und somit nicht für Routineanalysen geeignet ist. Die zu erwartende Konzentration der Analyten in der Probe sollte bekannt sein, weil die Konzentration des addierten Mischstandards in dem selben Bereich liegen muss. Für eine Multimethode mit unterschiedlichen Bestimmungsgrenzen stellt sich dies aufgrund der Vielzahl der Analyten als schwierig heraus.

- Quantifizierung über externe Matrixstandards

Ein Matrixstandard ist der Extrakt einer unbelasteten Probe, der mit den Kalibrierlösungen versetzt wurde. Matrixstandards beinhalten im Idealfall identische Matrixkomponenten wie die unbekanntes Proben. Die Matrixeffekte betreffen dadurch die Analyten im Kalibrierstandard und die Analyten in der Probe gleichermaßen, was zu richtigen Ergebnissen führt. Es muss aber gesichert werden, dass der Extrakt für die Kalibrierlösung und der Probenextrakt gleiche Konzentrationen an Matrixkomponenten enthalten. Die Methode ist zeit- und arbeitsaufwendig, wird jedoch in der Pestizidanalyse häufig eingesetzt [17,129].

- Quantifizierung über interne isopenmarkierte Standards

Als interne Standards können  $^{13}\text{C}$ - oder  $^2\text{D}$ -markierte Wirkstoffe eingesetzt werden. Die Matrixeffekte werden dadurch nicht verhindert, sie beeinflussen aber die nativen und markierten Substanzen gleichermaßen und können somit effektiv kompensiert werden. Die Aufarbeitung kann im Idealfall ohne zusätzliche Aufreinigung der Extrakte durchgeführt werden. Verluste, die während der Aufarbeitung auftreten, werden durch die Berechnung der Ergebnisse über isopenmarkierte interne Standards exakt ausgeglichen. Somit kann die Genauigkeit des Analyseergebnisses erhöht werden. Die Auswertung über interne Standards

stellt zudem einen deutlich geringeren Aufwand zur Kalibrierung des LC/MS/MS-Systems dar.

Für eine sichere Analyse beliebiger Matrices müsste aber jeder Analyt in isotopenmarkierter Form eingesetzt werden. Isotopenmarkierte Standards von Dibenzo-p-Dioxinen und Dibenzo-Furanen, polychlorierten Biphenylen (PCB), chlorierten Insektiziden und polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAH) sind mittlerweile günstig erhältlich. Hier hat sich der Einsatz von markierten internen Standards bewährt, und ist in vielen Fällen sogar unumgänglich [131,132].

Im Bereich der polaren Pflanzenschutzmittel gibt es bisher keine etablierte Methode, die die vorteilhafte Kombination von Massenspektrometrie und markierten internen Standards ausnutzt. Dabei ist der Einsatz isotopenmarkierter Standards für instabile Substanzen, wie die Carbamatmetabolite, weniger möglich.

- Quantifizierung durch Doppelinjektion von Probe und Kalibrierstandard

Die Echo-Peak- Technik ist eine neue Variante der Quantifizierung über interne Standards. Dabei werden Probe und Kalibrierstandard kurz nacheinander oder vor bzw. hinter der Vorsäule injiziert. Damit werden die Peaks durch sogenannte Echo-Peaks in der selben Chromatogramm bestätigt. Die Analyten haben sehr ähnlichen Retentionszeiten, und werden auf gleicher Weise von den Matrixkomponenten beeinflusst, was zur Kompensation der Matrixeffekte führt [129]. In diesem Verfahren werden gleiche oder strukturähnliche Substanzen für die Kalibrierung eingesetzt. Es ist eine kostengünstige Möglichkeit, gut geeignet für Spezialfragestellungen. Für eine Multimethode kommt sie aber aufgrund des komplexen Aufbaus und der extremen Anfälligkeit gegenüber Retentionszeitschwankungen nicht in Frage.

## 4 Materialien und Methoden

### 4.1 Verwendete Geräte

Eine Übersicht über die verwendeten Geräte gibt die folgende Aufstellung:

#### *Probenvorbereitung*

Mühle	Messermühle Grindomix GM200, Retsch, Haan, Deutschland
Waagen	Präzisionswaage Standard TS400S, Ohaus Corporation, New Jersey, USA Sartorius analytic A210P-OD1, Sartorius, Göttingen, Deutschland
Extraktion	Ultra Turrax Polytron PT-MR 2100 Fa. Kinematica AG, Luzern, Schweiz
Zentrifugen	Cryofuge 8500i, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland Hettich Universal, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Filtration	Glas-Vakuum-Filtrationsgerät 47/50mm 250ml, Sartorius, Göttingen, Deutschland
Filter	Faltenfilter 597 ½, Schleicher&Schuell, Dussel, Deutschland Rundfilter GF6 Glasfaser, Schleicher&Schuell, Dussel, Deutschland Spritzenaufsätze Spartan 13/0.2 RC 0.2µm, Schleicher&Schuell, Dussel, Deutschland
SPE	Vakuum-Box Supelco Visiprep, Bellefonte, USA
Rotationsverdampfer RE 111A mit:	Vacuum/Distillation Controller 168, Büchi, Flawil, Schweiz IKA TS2 Temperierbad, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Trockentemperier- System TCS,	Labor Technik Barkey, Leopoldshöhe, Deutschland
Ultraschallbad Bandelin electronic,	Berlin

#### *LC/MS/MS*

API 2000 Triple- Quadrupol,	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
HPLC 1100:	G1322A degasser G1311A quaternary pump G1329A autosampler G1330A autosampler thermostat G1316A column oven, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland

Säulen: BDS Hypersil C18 50 x 2.1mm 5 $\mu$   
Aquasil C18 50 x 2.1mm 5 $\mu$   
HyPurity C18 50 x 2.1mm 5 $\mu$ , mit Vorsäulen, Thermo Finnigan, Dreieich,  
Deutschland  
Synergi MAX-RP C12 75 x 2.0mm 4 $\mu$   
Synergi MAX-RP C12 150 x 3.0mm 4 $\mu$   
Synergi MAX-RP 150 x 4.6mm 4 $\mu$  mit Vorsäulen MAX-RP 4 x 2.0mm  
Luna C18(2) 250 x 4.60 mm 5 $\mu$ , Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland

Säulentemperatur: 20°C

Software: Analyst 1.2, 1.3.2, 1.4, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

#### *HPLC-DAD*

sample processor ISS200

200 lc pump

Degasys DG-1310

DAD 235c

900 series interface, PE Nelson, Cupertino, California, USA

column oven Mistral, Spark, Holland

Säule: Luna C18 (2) 250 x 4.60 mm, Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland

Säulentemperatur: 25°C

Software: Turbochrom 4, PE Nelson, Cupertino, California, USA

#### *GPC-Anlage*

dilutor 401C

sampling injector 231 XL

305 pump

fraction controller 201-202

fraction collector 201, Abimed Gilson, Villiers Le Bel, Frankreich

Säule: 33 x 3 cm, mit Bio Beads SX3 200-400 mesh, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

Laufmittel: Ethylacetat/Cyclohexan 1:1 mit einem Fluss von 5 ml/min

#### *Weitere Geräte*

Ofen Heraeus, Hanau, Deutschland

Reinstwasseranlage Millipore Molsheim, Deutschland

## 4.2 Verwendete Materialien

Reinheiten und Hersteller aller verwendeten Chemikalien befinden sich im Anhang (Seite 157).

### *Standards*

Die ausgewählten Analyten, einschließlich ihrer RHMV- Grenzwerte [3] sind in Tabelle 4.1 aufgeführt. Ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften sind in der Tabelle 9.1 (Seite 158) zusammengefasst.

Die Stammlösungen der Einzelstandards mit einer Konzentration von 1mg/ml wurden in Acetonitril vorbereitet, mit Ausnahme von Carbendazim in Tetrahydrofuran und die Triazole in Cyclohexan. Aus den Stammlösungen wurden Mischstandards mit 1 ng/μl in Acetonitril hergestellt, aus denen die gewünschten Endverdünnungen hergestellt werden konnten. Die Messstandards mit einer Konzentration von 100 pg/μl wurden in Methanol / 10 mM NH<sub>4</sub>Ac 1:1 eingesetzt, und sofort verwendet.

Für die isotonenmarkierten Standards wurden einzelne Stammlösungen mit einer Konzentration von 10 ng/μl in Acetonitril vorbereitet. Das Arbeitsstandard mit 1 ng/μl wurde in Methanol eingesetzt.

Die Stammlösungen und die Zwischenverdünnungen der Einzel- und Mischstandards wurden bei -4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

### *Proben*

Erntegütern aus verschiedenen Gruppen [3] wurden ausgewählt (Tabelle 4.3) und im Einzelhandel besorgt.

Tabelle 4.2: Ausschnitt aus den in der RHMV [3] beschriebenen Erntegütern, mit denen die Methode entwickelt und validiert werden soll, einschließlich ihre pH-Werte [134]

Gruppen von Erntegütern	Ausgewählte Erntegüter	pH
Gemüse und Obst mit hohem Wassergehalt	Erdbeere	5.2-6.8
	Grünkohl	4.3-4.9
	Pfirsich	3.3-4.0
	Tomate	3.0-3.9
Obst mit hohem Säuregehalt	Apfel	3.3-4.0
	Zitrone	2.0-2.4
Trockene Getreide	Reis	
	Weizen	6.0-6.7
Fettreiche Erntegüter	Avocado	6.3-6.6
	Raps	

Tabelle 4.1 Ausgewählte Analyten und ihre RHmV- Grenzwerte [3] in pflanzlichen Lebensmitteln

	Wirkstoff	Wirkstoffbezeichnung	Grenzwerte mg/kg
<i>N-Methylcarbamate und Metabolite</i>			
I	Aldicarb	2-Methyl-2-(methylthio)-propionaldehyd-O-(methylcarbamoyl)oxim	0.05-0.5 (a)
	Aldicarb-sulfoxid	2-Methyl-2-(methylsulfinyl)-propionaldehyd-O-(methylcarbamoyl)oxim	
	Aldoxycarb	2-Methyl-2-(methylsulfonyl)-propionaldehyd-O-(methylcarbamoyl)oxim	
I	Butocarboxim	3-Methylthio-2-butanon-O-methylcarbamoyl-oxim	0.1-4 (a)
	Butocarboxim-sulfoxid	3-Methylsulfinyl-2-butanon-O-methylcarbamoyl-oxim	
I	Butoxycarboxim	3-Methylsulfonyl-2-butanon-O-methylcarbamoyl-oxim	
I	Carbaryl	1-Naphtylmethylcarbamat	0.1-10
I	<b>Carbofuran</b>	2,3-Dihydro-2,2-dimethyl-7-benzofuranyl-methylcarbamat	0.1-10 (a1)
	3-Hydroxy-carbofuran	2,3-Dihydro-2,2-dimethyl-3-hydroxy-7-benzofuranyl-methylcarbamat	
I	Ethiofencarb	2-(Ethylthiomethylphenyl)-N-methylcarbamat	0.05-10 (a)
	Ethiofencarb-sulfoxid	2-(Ethylsulfinylmethylphenyl)-N-methylcarbamat	
	Ethiofencarb-sulfon	2-(Ethylsulfonylmethylphenyl)-N-methylcarbamat	
I	Fenobucarb	(2-sek-Butylphenyl)-methylcarbamat	
I	<b>Methiocarb</b>	3,5-Dimethyl-4-methylthiophenyl-N-methylcarbamat	0.01-1 (a)
I	Methomyl	S-Methyl-N-[(methylcarbamoyl)-oxy]-thioacetimidat	0.05-10 (a2)
I	<b>Thiodicarb</b>	Dimethyl-N,N'-[thiobis-(methylimino) carbonyloxy]-bis-(ethanimidothioat)	
I	Oxamyl	Methyl-N,N-dimethyl-N'-[(methylcarbamoyl)oxy]-1-thio-oxamidat	0.05
I	Promecarb	3-Methyl-5-isopropylphenyl-N-methylcarbamat	0.05-0.2
I	Propoxur	2-Isopropoxyphenyl-N-methyl-carbamat	0.05-3
I	Thiofanox	3,3-Dimethyl-1-methylthio-2-butanon-O-methylcarbamoyl-oxim	0.01-0.05 (a)
<i>Carbamate</i>			
I	Fenoxycarb	Ethyl-2-(4-phenoxy-phenoxy)-ethylcarbamat	0.05-0.5
I	Furathiocarb	O-Butyl-O'-(2,3-dihydro-2,2-dimethylbenzofuran-7-yl)-N,N'-dimethyl-N,N'-thiodicarbamat	0.05-5
I	<b>Pirimicarb</b>	2-dimethylamino-5,6-dimethylpyrimidin-4-yl-dimethylcarbamat	0.05-1 (a3)
F	<b>Propamocarb</b>	Propyl-3-(dimethylamino)-propylcarbamat	0.1-15
H	<b>Prosulfocarb</b>	S-Phenylmethyl-N,N-di-n-propyl-thiocarbamat	0.05
<i>Benzimidazole</i>			
F	<b>Carbendazim</b>	Methyl-benzimidazol-2-yl-carbamat	0.1-5 (a4)
F	<b>Thiophanat-methyl</b>	Dimethyl-4,4'-o-phenylen-bis-(3-thioallophanat)	
F	<b>Thiabendazol</b>	2-(4'-Thiazolyl)-benzimidazol	0.01-6
<i>Harnstoffderivate</i>			
<i>Sulfonylharnstoffe</i>			
H	<b>Metsulfuron-methyl</b>	Methyl-2-[3-(4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-yl)ureidosulfonyl]-benzoat	0.05
H	<b>Thifensulfuron-methyl</b>	Methyl-3-[3-(4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-yl)-ureidosulfonyl]-2-thiophencarboxylat	0.05
<i>Benzoylharnstoffe</i>			
I	Diflubenzuron	1-(4-Chlorphenyl)-3-(2,6-difluorbenzoyl)-harnstoff	0.05-2
I	Hexaflumuron	1-83,5-Dichlor-4-(1,1,2,2-tetrafluoretoxy)phenyl]-3-(2,6-difluorbenzoyl)harnstoff	

Tabelle 4.1 (Fortsetzung)

	Wirkstoff	Wirkstoffbezeichnung	Grenzwerte mg/kg
I	<b>Teflubenzuron</b>	1-(3,5-Dichlor-2,4-difluorphenyl)-3-(difluorbenzoyl)-harnstoff	0.05-1
I	Triflumuron	N-(2-Chlorbenzoyl-N'-(4-trifluormethoxyphenyl)-harnstoff	0.05-1
<i>Phenylharnstoffe</i>			
H	Buturon	3-(4-Chlorphenyl)-1-methyl-1-(1-methyl-prop-2-ynyl)-harnstoff	0.05-1 (c1)
H	Monolinuron	3-(4-Chlorphenyl)-1-methoxy-1-methylharnstoff	0.05-1 (c1)
H	Monuron	3-(4-Chlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff	0.05-1 (c1)
H	Chloroxuron	3-[4-(Chlorphenoxy)-phenyl]-1,1-dimethylharnstoff	0.05-0.5 (c2)
H	Chlortoluron	3-(3-Chlor-p-tolyl)-1,1-dimethylharnstoff	0.05-0.1 (c3)
H	Difenoxuron		
H	Dimefuron	N,N-Dimethyl-N'-[3-chlor-4-(2-tert-butyl-1,3,4-oxadiazolin-5-on)-4-yl]-phenylharnstoff	0.05-0.1
H	<b>Diuron</b>	3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff	0.05-0.5 (c4)
	D1M-Diuron	3-(3,4-Dichlorphenyl)-1-methylharnstoff	0.05-0.5 (c4)
	D2M-Diuron	3-(3,4-Dichlorphenyl)-harnstoff	0.05-0.5 (c4)
H	Linuron	3-(3,4-Dichlorphenyl)-1-methoxy-1-methylharnstoff	0.05-0.5 (c4)
H	Neburon	3-(3,4-Dichlorphenyl)-1-methyl-1-n-butylharnstoff	0.05-0.5 (c4)
H	Fenuron	1,1-Dimethyl-3-phenylharnstoff	
H	Fluometuron	1,1-Dimethyl-3-(3-trifluor-methylphenyl)harnstoff	
H	<b>Isoproturon</b>	3-(4-Isopropylphenyl)-1,1-dimethylharnstoff	0.01-0.05(c5)
	D1M-Isoproturon	N',-(4-Isopropylphenyl)-N-methyl-harnstoff	
	D2M-Isoproturon	N',-(4-Isopropylphenyl)-harnstoff	
H	Metoxuron	3-(3-Chlor-4-methoxyphenyl)-1,1-dimethyl-harnstoff	
F	<b>Pencycuron</b>	1-(4-chlorbenzyl)-1-cyclopentyl-3-phenylharnstoff	0.05-0.1
<i>Andere Harnstoffe</i>			
	Methabenzthiazuron	3-(2-benzthiazol-2-yl)-1,1-dimethylharnstoff	0.1
<i>Säure</i>			
<i>Propionsäuren</i>			
H	Dalapon	Natrium-2,2-dichlorpropionat	0.1-50
H	Diclofop	2-[4-(2',4'-Dichlorphenoxy)-phenoxy]-propionsäure	0.1-0.5 (b1)
H	<b>Dichlorprop</b>	2-(2,4-Dichlorphenoxy)-propionsäure	0.05-0.2 (b)
H	Fenoprop		
H	<b>Fenoxaprop</b>	(RS)-2-[4-(6-Chlor-1,3-benzoxazol-2-yloxy)phenoxy]-propionsäure	0.1 (b)
H	Flamprop	N-Benzoyl-N-(3-chlor-4-fluorphenyl)-2-aminopropionsäure	0.05 (b2)
H	<b>Fluazifop</b>	(RS)-2-[4-(5-trifluormethyl-2-pyridyloxy)-phenoxy]-propionsäure	0.05-5 (b)
H	<b>Haloxyfop</b>	2-[4-(3-chlor-5-trifluormethyl-pyridin-2-yl-oxy)-phenoxy]-propionsäure	0.02-1 (b)
H	<b>Mecoprop</b>	2-(4-Chlor-2-methylphenoxy)-propionsäure	0.1 (b)
H	<b>Quizalofop</b>	2-[4-(6-chlorchinoxalin-2-yl-oxy)-phenoxy]-propionsäure	0.05-0.1 (b)
H	<i>Essigsäure</i>		
	<b>2,4-D</b>	(2,4-Dichlorphenoxy)-essigsäure	0.1-2 (b)
	<b>Fluroxypyr</b>	4-Amino-3,5-dichlor-6-fluorpyridin-2-yl-oxy-essigsäure	0.05-0.1 (b)
	<b>MCPA</b>	(4-Chlor-2-methylphenoxy)-essigsäure	0.1 (b)
	2,4,5-T	(2,4,5-Trichlorphenoxy)-essigsäure	0.05 (b)
	Benazolin	4-Chlor-2,3-dihydro-2-oxobenzothiazol-3-yl-essigsäure	0.05-0.1 (b)
<i>Oxynile</i>			
H	<b>Bromoxynil</b>	3,5-Dibrom-4-hydroxybenzonnitril	0.02-0.1 (b)
H	<b>Ioxynil</b>	3-(3,5-Dichlorphenyl)-N-isopropyl-2,4-dioxo-1-imidazolidincarboxamid	0.02-10 (b)

Tabelle 4.1 (Fortsetzung)

	Wirkstoff	Wirkstoffbezeichnung	Grenzwerte mg/kg
	<i>Sonstige Derivate</i>		
H	Acifluorfen	5-(2-Chlor-4-trifluormethyl-phenoxy)-2-nitrobenzoesäure	
H	<b>Bifenox</b>	Methyl-5-(2',4'-dichlorphenoxy)-2-nitrobenzoat	0.01-0.05
	2,4-DB	4-(2,4-Dichlorphenoxy)-buttersäure	
I	DDA	1-(2,2-bis-(4-Chlorphenyl)-essigsäure	
H	<b>Dicamba</b>	2-Methoxy-3,6-dichlor-benzoesäure	0.05
H	Dinoseb	6-(1-Methyl-propyl)-2,4-dinitrophenol	0.05-0.1 (b)
H	Dinoterb	2,4-Dinitro-6-tert-butylphenol	0.05 (b)
H	MCPB	4-(4-Chlor-o-tolyloxy)-buttersäure	
HF	PCP	Pentachlorphenol	
	<i>Phosphor-Verbindungen</i>		
I	Acephat	O,S-Dimethyl N-acetylamidothiophosphat	0.02-3
I	<b>Dimethoat</b>	O,O-Dimethyl-S-(n-methyl-carbamoylmethyl)-dithiophosphat	0.05-1
I	Ethoprophos	O-Ethyl-S,S-dipropyl-dithiophosphat	0.01-0.02
I	<b>Methamidophos</b>	O,S-Dimethyl-amidothiophosphat	0.01-2
I	Omethoat	O,O-dimethyl-S-(N-methylcarbamoylmethyl)-thiophosphat	0.05-10
	<i>Triazole</i>		
F	<b>Difenoconazol</b>	1-{2-[4-(4-Chlorphenoxy)-2-chlorphenyl-(4-methyl)-1,3-dioxolan-2-yl]-methyl};-1H-1,2,4-triazol	0.05-0.2
F	Diniconazol	(E)-(RS)-1-(2,4-Dichlorphenyl)-4,4-dimethyl-2-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)-pent-en-3-ol	
F	<b>Epoxiconazol</b>	(2RS,3SR)-1-[3-(2-Chlorphenyl)-2,3-epoxy-2-(4-fluorphenyl)propyl]-1H-1,2,4-triazol	0.05-0.2
F	Etaconazol	(±)-1-[2-(2,4-Dichlorphenyl)-4-ethyl-1,3-dioxolan-2-yl-methyl]-1H-1,2,4-triazol	
F	<b>Flusilazol</b>	1-[Bis(4-fluorphenyl)methyl]-1H-1,2,4-triazol-1-yl-methyl-silan	0.01-0.2
F	Hexaconazol	(RS)-2-(2,4-dichlorphenyl)-1-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)-hexan-2-ol	0.01-0.1
F	<b>Propiconazol</b>	1-[2-(2,4-Dichlorphenyl)-4-propyl-1,3-dioxolan-2-yl-methyl]-1H-1,2,4-triazol	0.05-0.5
F	<b>Tebuconazol</b>	(RS)-1-p-Chlorphenyl-4,4-dimethyl-3-1H-1,2,4-triazol-1-ylmethylpentan-3-ol	0.05-2
	<i>Imidazole</i>		
F	Imazalil	1-[2-(2,4-dichlorphenyl)-2-(2-propenyloxy)-ethyl]-imidazol	0.02-5
I	<b>Imidacloprid</b>	1[(6-Chlor-3-pyridinyl)methyl]-4,5-dihydro-N-nitro-1H-imidazol-2-amin	0.05-2 (d)
	<i>Anilinopyrimidine</i>		
F	<b>Cyprodinil</b>	4-Cyclopropyl-6-methyl-2-phenylamino-pyrimidin	0.05-2
F	<b>Pyrimethanil</b>	2-Anilino-4,6-dimethylpyrimidin	0.05-5
	<i>Andere Wirkstoffe</i>		
F	<b>Azoxystrobin</b>	Methyl-(E)-2-[2-[6-(2-cyanophenoxy)-pyrimidin-4-yloxy]phenyl]-3-methoxy-acrylat	0.05-2
	Fenhexamid	N-(2,3-Dichlor-4-hydroxyphenyl)-1-methyl-cyclohexancarbonsäure-amid	0.02-5
F	Fludioxonil	4-(2,2-Difluor-1,3-benzodioxol-4-yl)-1H-pyrrol-3-carbonitril	0.05-2
	Ipo-anilin	4-Isopropylanilin	
F	Procymidon	N-(3,5-Dichlorphenyl)-1,2-dimethylcyclopropan-1,2-dicarboximid	0.02-10
F	Tolylfluanid	N-Dichlorfluormethylthio-N,N'-dimethyl-N-p-tolylsulfamid	0.1-30
I	<b>Tebufenozid</b>	N-tert-Butyl-N-(4-ethylbenzoyl)-3,5-dimethylbenzohydrazid	0.02-1

Die markierten Wirkstoffe (fettgedruckt) waren im Jahr 2003 zugelassen [133,134].

F= Fungizid, H= Herbizid, I= Insektizid



- a: Einschließlich Sulfon- und Sulfoxid-Metabolite, insgesamt berechnet als...
- a1: Carbofuran und 3-Hydroxycarbofuran, insgesamt berechnet als Carbofuran
- a2: Methomyl und Thiodicarb, insgesamt berechnet als Methomyl
- a3: Pirimicarb, Desmethyl-pirimicarb und Desmethyl-formamido-pirimicarb, insgesamt berechnet als Pirimicarb
- a4: Benomyl, Carbendazim, Thiophanat-methyl, insgesamt berechnet als Carbendazim
- b: einschließlich Salze und Ester, insgesamt berechnet als...
- b1: Diclofop und Diclofop-methyl, insgesamt berechnet als Diclofop-methyl
- b2: Flamprop-isopropyl, Flamprop und deren Konjugate, insgesamt berechnet als Flamprop-isopropyl
- c1: Buturon, Monolinuron, Monuron insgesamt einschließlich Abbau- und Reaktionsprodukte, soweit sie noch die 4-Chloranilin-gruppe enthalten, berechnet als 4-Chloranilin
- c2: einschließlich Abbau- und Reaktionsprodukte, soweit sie noch die 4-(4-Chlorphenoxy)-anilin-gruppe enthalten, insgesamt berechnet als 4-(4-Chlorphenoxy)anilin
- c3: einschließlich Abbau- und Reaktionsprodukte, soweit sie noch die 3-Chlor-4-methylanilin-gruppe enthalten
- c4: Diuron, Linuron und Neburon insgesamt, einschließlich Abbau- und Reaktionsprodukte, soweit sie noch die 3,4-Dichloranilingruppe enthalten, berechnet als 3,4-Dichloranilin
- c5: einschließlich Abbau- und Reaktionsprodukte, soweit sie noch die 4-Isopropylanilingruppe enthalten, insgesamt berechnet als 4-Isopropylamin
- d: Imidacloprid einschließlich der Abbau- und Reaktionsprodukte, die als 6-Chlornicotinsäure bestimmt werden können, insgesamt berechnet als Imidacloprid

### *Festphasen*

Kieselgel, Merck, Deutschland

Das Sorbens wurde bei 400°C für 12 Stunden aktiviert, dann mit 1.5% H<sub>2</sub>O deaktiviert und in 1 g - Kartuschen gepackt.

Chem Elut CE 1005 5 ml, ungepuffert, Varian, Harbor City, USA

Mega BondElut-C18 1 g, 6ml, Varian, Darmstadt, Deutschland

Envicarb 250 mg, 3 ml, Supelco, Bellefonte, USA

Chromabond HR-P 200 mg, 3 ml, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland

Oasis HLB 200 mg, 6ml

Oasis MCX 150 mg, 6 ml

Oasis MAX 150 mg, 6 ml, Waters, Massachusetts, USA

### *Lösungen*

Puffer pH=7: 2.24 ml KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 2.58 ml Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> auf 1 L Wasser

Puffer pH=6: 0.93 ml KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 0.11 ml Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> auf 1 L Wasser

Puffer pH=4: 321 µl CH<sub>3</sub>COOH konz. + 10 ml NaAc 100 mM auf 1 L Wasser

Lösung pH=3: 0.1% HCOOH

Lösung pH=2: 0.1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

### 4.3 Statistische und mathematische Methoden

#### 4.3.1 Statistische Methoden

*Pearsonscher Korrelationskoeffizient  $r$  [135]*

$$r = \frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2 \sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2}}$$

$i$	Laufindex
$x$	unabhängige Variable
$y$	abhängige Variable
$\bar{x}$	Mittelwert aller $x_i$
$\bar{y}$	Mittelwert aller $y_i$
$N$	Anzahl aller $x_i$

$$\text{Bestimmtheitsmaß} = r^2$$

*Standardabweichung  $s$  [135]*

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

*Variationskoeffizient (relative Standardabweichung)  $V_k$  [135]*

$$V_k = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100\%$$

$x_i$	Einzelwert
$\bar{x}$	Mittelwert
$n$	Anzahl der Messungen
$s$	Standardabweichung
$V_k$	Variationskoeffizient (relative Standardabweichung)

### 4.3.2 Mathematische Methoden

*Auflösung* [85]

$$R_S = 1.177 \cdot (t_{R2} - t_{R1}) / (W_{h2} + W_{h1})$$

$R_S$  Auflösung

$t_{R1}, t_{R2}$  Retentionszeit

$W_{h1}, W_{h2}$  Peakbreite in halber Höhe

*Nachweisgrenze (NWG) und Bestimmungsgrenze (BSG)* [135]

$$NWG = 3 \cdot \text{Blindwert} \quad \text{oder} \quad NWG = 3 \cdot S / N$$

$$BSG = 10 \cdot \text{Blindwert} \quad \text{oder} \quad BSG = 9 \cdot S / N$$

$S/N$  Signal/Rausch- Verhältnis

*Wasservolumen*

Die gewählte Formel dient der Berechnung des Wasservolumens, das bei der Extraktion von 10 g Probe eingesetzt wurde.

$$W = 10 \text{ ml} - 10 \text{ ml} \cdot x$$

$W$  notwendiges Wasservolumen, ml

$x$  Wasseranteil der Probe, %

*Wiederfindungsrate*

$$WFR = \frac{P_P}{P_S} \cdot 100$$

$WFR$  Wiederfindungsrate, %

$P_P$  gemessene Peakhöhe in der Probe

$P_S$  gemessene Peakhöhe im Standard

#### **4.4 Weitere Angaben**

##### *HPLC*

Die Laufmittel für die HPLC wurden je nach Bedarf, jedoch mindestens alle drei Wochen erneuert. Die hierfür benötigten Puffer wurden frisch hergestellt. Für die Herstellung der Laufmittel wurden bidestilliertes Wasser und HPLC-reine Lösungsmitteln verwendet.

##### *Reinigungsmethode*

Während der Arbeiten wurde festgestellt, dass die regelmäßige Reinigung der Säulen und Erneuerung der Vorsäulen notwendig sind. Dementsprechend wurde die Säule nach jedem Probensatz 5 Minuten mit Wasser, 5 Minuten mit 35% Wasser in Acetonitril, 50 Minuten mit Acetonitril und 20 Minuten mit Methanol gereinigt. Zur Schutz der analytischen Säulen vor Verunreinigungen wurden die Vorsäulen beim Druckanstieg im System gewechselt.

##### *Quantifizierung*

Die automatische Integration aller quantifizierten Peaks wurde überprüft und gegebenenfalls manuell korrigiert.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Trennung und Detektion

Um eine möglichst hohe Empfindlichkeit der Methode zu erreichen, müssen eine Vielzahl von Parameter zu Beginn der Methodenentwicklung optimiert werden. Die Wahl der Laufmittel und der Modifier, das HPLC- Programm und die Tuning- Parameter können die Empfindlichkeit der Detektion beeinflussen [85, 126, 130]. Zahlreiche Publikationen wurden bereits über die Analyse von Pflanzenschutzmitteln mit LC/MS/MS mit ESI oder APCI veröffentlicht, diese sind untereinander jedoch schwer vergleichbar, da bestimmte Größen wie Laufmittelzusammensetzung und Geräteparameter differieren [43]. Selbst zwischen baugleichen Geräten können die auf maximale Empfindlichkeit optimierten Geräteparameter variieren, so dass eine Methode für jedes Gerät separat entwickelt werden muss und nicht einfach aus Literaturdaten übernommen werden kann.

Neben Lösemitteln haben organische und anorganische Modifier wie Säuren und Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten Einfluss auf die Retentionszeiten und die Signalintensitäten einer Verbindung. Da eine Kontamination der Ionenquelle mit nicht flüchtigen Substanzen zu einer Verringerung der Ionisierungseffizienz führen kann, müssen bei der LC/MS/MS-Analytik flüchtige Modifier verwendet werden [120, 126].

Für die Auswirkungen von Modifiern und Laufmitteln auf die Signalintensität einer Verbindung existieren jedoch keine allgemein gültigen Regeln, diese Effekte sind stark von der Verbindung und der verwendeten Methode abhängig [37].

Um möglichst niedrige Nachweisgrenzen zu erreichen, sollten für die Analyten eine möglichst große Peakhöhe durch eine schmale Peakform sowie eine möglichst hohe Signalintensität durch die Wahl der intensivsten Ausgangs- und Fragmentionen, der Optimierung der Ionisierungs- und Detektionsbedingungen und die Wahl der Laufmittel und Modifier erreicht werden.

### 5.1.1 Optimierung der Ionisierung

Die optimale Einstellung der Ionisierungsparameter ist für einen hohe Ionisierungsausbeute und einen möglichst vollständigen Transfer der Ionen in das erste Quadrupol (Q1) ausschlaggebend. Die Position der Sprühkegel auf die „curtain plate“ ist wichtig, um den maximalen Ionentransfer zu gewährleisten, dabei aber die Ionenoptik hinter der curtain plate nicht übermäßig zu verschmutzen.

Die Geschwindigkeit bzw. die Drücke der Vernebelungsgase (nebulizer gas) und des Turbogases sowie dessen Temperatur müssen an den Probenfluss und den organischen Anteil der mobilen Phase angepasst werden. Die Spannung am Ausgang der Kapillare (IonSpray voltage) sollte um 4000-5000V betragen. Es wurde aber eine optimale Spannung von 1100 V ausgewählt, bei der die Signale bis zu 4-fach höher waren, als mit 5000 V.

Die Ionisierungsparameter wurden mittels Fliessinjektion (Pumpenspritze) mit 10 ng/ $\mu$ l Pirimicarb in Methanol / 10 mM NH<sub>4</sub>Ac 1:1 nach Herstellerempfehlungen (Applied Biosystems) optimiert und sind in der Tabelle 5.1.1 zusammengefasst.

Tabelle 5.1.1: Optimierte Ionisierungs- und Fragmentierungsparameter

Parameter		ESI+	ESI-	APCI+	APCI-
Curtain gas (N <sub>2</sub> )	CUR [psi]	20	20	20	20
Heater gas temperature	TEM [°C]	350	350	500	500
Collision gas (N <sub>2</sub> )	CAD [psi]	3	3	3	3
Ion spray voltage	IS [V]	1100	-1100		
Nebulizer gas	GS1 [psi]	50	50		
Heater gas	GS2 [psi]	60	60		
Auxiliary gas	GS1 [psi]			75	75
Nebulizer gas	GS2 [psi]			60	50
Needle current	NC [ $\mu$ A]			3	3

### 5.1.2 Bestimmung der intensivsten Ausgangs- und Tochterionen und Optimierung der substanzabhängigen Detektionsparameter

Die Ionisierungs- und Detektionsbedingungen wurden manuell für jeden einzelnen Analyten optimiert, um möglichst hohe Signalintensitäten zu erreichen.

Verschiedene verbindungsspezifische Größen können beim „Tuning“ für die Optimierung der Signalintensität in der angegebenen Reihenfolge für jede Verbindung variiert werden (siehe auch Abbildung 3.3):

- Optimierung Ausgangsion

Ionisierungsmodus: positiv bzw. negativ

Declustering Potential DP

Focussing Potential FP

Entrance Potential EP

Diese Potentialdifferenzen werden benötigt, um Wasser- und Lösungsmittelcluster zu zerstören, die Ionen zu fokussieren und in die Vakuumkammer zu leiten. Um eine effektive Fragmentierung des Mutterions zu erreichen müssen folgende Parameter optimiert werden:

- Optimierung Tochterion

Cell Entrance Potential CEP

Collision Energy CE

Cell Exit Potential CXP

Für jeden Wirkstoff wurden zuerst durch Injektionen der Einzelsubstanz mittels Fließinjektion die Massen der intensivsten Ausgangs- und Tochterionen ermittelt. Die Analyten wurden mit einer Konzentration von 10 ng in Methanol / 10 mM Ammoniumacetat 1:1 eingespritzt.

Um den für die Optimierung notwendigen konstanten Fluss zu erreichen, wurden die Lösungen mittels einer Spritzenpumpe mit einer Flussrate von 20  $\mu\text{l}/\text{min}$  direkt in die Ionenquelle des MS/MS gepumpt.

Die Optimierung wurde für die Mutterionen als Q1- Scan für die um 1 erhöhte (positive Ionisierung) bzw. verringerte (negative Ionisierung) Masse der häufigsten Isotopenzusammensetzung der jeweiligen Verbindung mit einem Scanintervall von  $\pm 4$  amu durchgeführt. Der Betrag der Ladung  $z$  war stets 1, da die Analyten nur einfach ionisiert wurden. Für die Bestimmung der intensivsten Fragmentationen wurde ein Product Ion Scan von 50 amu bis

50 amu über die Masse des Mutterions durchgeführt, um die Bildung von Cluster zu überprüfen. Die Fragmentionen mit den höchsten Intensitäten wurden für die Detektion und Quantifizierung ausgewählt.

Für die ermittelten Massenpaare wurden die DP-, FP- und EP-Werte im Product Ion Scan-Modus, die CEP-, CE- und CXP-Werte im MRM- Modus optimiert. Eine Änderung des Focussing Potential im Bereich von 300 bis 400 V bewirkte bei allen Substanzen nur geringe Intensitätsänderungen. Deswegen wurde ein Wert von 350 V für jeden Analyten verwendet.

Nach der Entwicklung der HPLC- Methode wurden die optimierten Potentiale, außer dem FP-Wert, unter HPLC- Fluss und HPLC- Lösungsmittelzusammensetzung überprüft. Für jeden Parameter wurden innerhalb des eigenen Wertebereiches gleichmäßig verteilte Werte ausgewählt, mit denen neue LC/MS/MS- Methoden gebildet wurden. Das Declustering-Potential kann z.B. Werte zwischen 0 und 180 V haben, und wurde in 5er- Schritten variiert. Mit dieser Methode wurden keine starken Unterschiede festgestellt im Vergleich zu den mittels Fließinjektion optimierten Werten, außer für das Declustering-Potential. Hier bewirkt die Umstellung von Fließinjektion (20 µl/min) auf HPLC-Bedingungen (300 µl/min) eine Änderung des optimalen DP-Wertes.

Die Carbamate und ihre Metabolite, die Organophosphate, die Triazole und die meisten Phenylharnstoffe zeigten im positiven Ionisierungsmodus die höchsten Intensitäten bzw. konnten nur im positiven Ionisierungsmodus detektiert werden. Die Sulfonylharnstoffe wurden in beiden Ionisierungsmodi detektiert, die höchsten Signale wurden aber im positiven Modus erreicht. Die Benzoylharnstoffe, die zweifach chlorierten Phenylharnstoffe und die Säuren konnten bei negativer Ionisierung empfindlicher detektiert werden.

Für die meisten Analyten wurden die einfach protonierten oder deprotonierten Moleküle  $[M+H]^+$  bzw.  $[M-H]^-$  als Ausgangsion ermittelt. Aldoxycarb, Butocarboxim, Butoxycarboxim, Butocarboxim-sulfoxid, Carbofuran-3-hydroxy, Ethiofencarb sulfon, Methiocarb und Oxamyl bildeten auch intensive Ammoniumaddukte  $[M+NH_4]^+$  und wurden in dieser Form analysiert. Wegen der sanften Ionisierungsart konnte für Pentachlorphenol keine Fragmentierung erzielt werden. Für diesen Analyt wurden die nicht fragmentierten Ionen gemessen (**Single Ion Recording**).



Für einige Substanzen, die nur ein einziges intensives Fragment zeigten, wurde zur Absicherung der Ergebnisse zusätzlich die Spur der nicht fragmentierten Ionen mitgemessen. In der Abbildung 5.1.1 sind beispielweise die für Metoxuron in einer Rapsprobe aufgenommenen Chromatogramme verglichen.

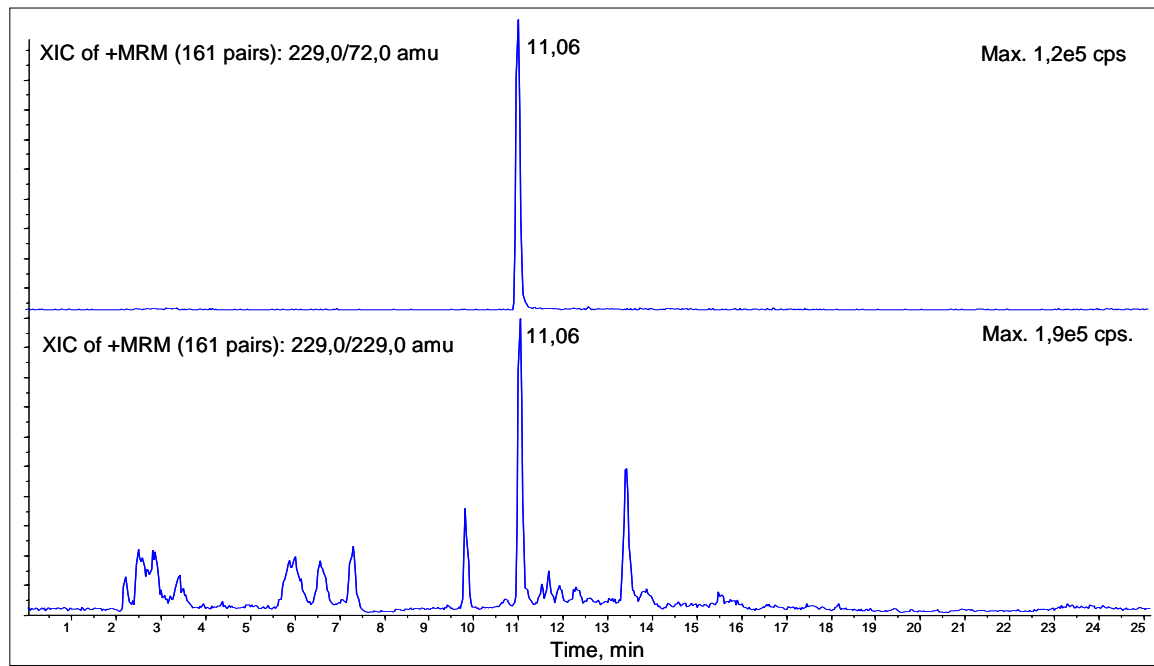


Abbildung 5.1.1: MRM- und SIR- Spuren von Metoxuron in Rapsextrakt

Der Massenübergang 229/72 liefert auch in Matrixproben sehr „saubere“ Chromatogramme, während in der Spur des nicht fragmentierten Ionen (229/229) mehrere Signale auftreten. Dies bestätigt, dass durch Fragmentierung eine viel bessere Empfindlichkeit erreicht werden kann, und dass die Selektivität des MRM- Scanmodus für die Spurenanalyse matrixhaltiger Proben sehr gut geeignet ist.

Aniline und einige Phenylharnstoffe, wie Desmethyl-Diuron (D1M-Diuron), Didesmethyl-Diuron (D2M-Diuron), Diuron, Monolinuron und Linuron haben relativ geringe Intensitäten bei Ionisierung im positiven Modus. Die Ursache sind die Zusammensetzung des HPLC-Eluenten und der pH- Wert [136]. Die Experimente von Di Corcia et al. [136] zeigten, dass Methanol/NH<sub>4</sub>Ac mit einem pH-Wert von 6,6 die Ionisierung dieser Substanzen nicht ausreichend unterstützt, da die Protonenkonzentration in der Lösung relativ gering ist. Mit Acetonitril und Ameisensäure (pH=4) könnten bessere Intensitäten erreicht werden [136].

Für die sauren Wirkstoffe konnten nur relativ niedrige Intensitäten erreicht werden. Bei der Ionisierung spaltet die ladungstragende Säuregruppe (COOH) leicht ab und bewirkt somit geringe Signalintensitäten für die restlichen Fragmente. Wegen der Stabilisierung der positiven Ladung auf den symmetrischen Molekülrest trat bei DDA keine weitere Fragmentierung auf. Diese Substanz wurde im SIR- Modus gemessen.

Für die chlorierten Substanzen wurden 2 Mutter- und/oder Tochterionen detektiert, entsprechend der  $^{35}\text{Cl}$ - und  $^{37}\text{Cl}$ - Isotopen.

Bei den Carbamaten und Carbamatmetaboliten spaltete sich häufig die Carbamatgruppe, wobei eine Isocyanatgruppe abging und der positiv geladene Rest detektiert wurde. In einigen Fällen bildete die ganze Carbamatgruppe das intensivste Fragmentation, z.B. bei Butocarboxim und Butocarboxim-sulfoxid.

Für die Phenylharnstoffe war im positiven Ionisierungsmodus der Harnstoffrest  $[\text{R}_2\text{N-CO}]$  als geladenes Fragmentation charakteristisch. Bei Linuron und Monolinuron traten Natriumaddukte als Fragmentationen auf.

Für die Triazole wurde häufig die protonierte Triazolgruppe als Fragmentationen registriert.

Je nach Signalintensität wurden zwei bis vier Massenübergänge pro Analyt ausgewählt, um eine sichere Substanzenbestimmung zu gewährleisten. Die Molekülstrukturen und die Fragmentierung der untersuchten Analyte sind in der Anlage (Seite 161) aufgeführt.

Die ermittelten Ionenmassen, die Retentionszeiten, die optimierten Parameter und die erzielten Signalintensitäten (Peakhöhe) in cps (counts per second) sind für die zwei Ionisierungsarten in der Tabellen 5.1.2 bzw. 5.1.3 aufgeführt.

Die Literaturangaben in diesen Tabellen beziehen sich auf Stellen in der Literatur, an denen die in dieser Arbeit verwendeten Massenübergänge bereits angegeben wurden.

Die optimierten Geräteparameter der intensivsten Ausgangs- und Tochterionen wurden mit den HPLC- Parametern in zwei Analysenmethoden zusammengefasst.

### 5.1.3 Auswahl der Ionisierungsquelle (Vergleich ESI-APCI)

Weil für APCI höhere Flüsse notwendig sind als für ESI, wurden hier separate Methoden entwickelt, mit einer längeren und breiteren Säule, die Phenomenex Synergi MAX-RP 150 x 4.6 mm, 4 $\mu$  Korngröße.

Der Vergleich der Ionisierung mit ESI und APCI zeigte, dass nur wenige Substanzen ein höheres Signal mit APCI erreichen, und zwar Carbaryl, Carbendazim, Fenoxycarb, Furathiocarb, Methiocarb, Promecarb, Prosulfocarb und Thiofanox. Für die meisten Substanzen und insbesondere für die polarsten eignet sich die sanftere ESI besser.

Daher wurden die Analysen einheitlich mit ESI durchgeführt, allerdings mit verschiedenen Polaritäten.

Tabelle 5.1.2 Massenübergänge und Detektionsparameter der untersuchten Analyten, positiven

## Ionisierungsmodus

Übergang	Analyt	t <sub>R</sub> min	DP V	EP V	CEP V	CE V	CXP V	Intensität cps	Referenzen
142.0 / 94.0	Metamidophos	4,32	22	8	9	20	5	41217	43,137,138
142.0 / 125.0	Metamidophos	4,3	22	8	6	20	9	14867	43,137,138
184.0 / 143.0	Acephat	5,02	14	8	9	12	12	67533	43,137,138
143.0 / 95.0	Acephat	5,01	30	12	9	23	8	21633	
207.0 / 75.0	Butocarboxim-sulfoxid	5,93	15	7	6	14	6	24533	12,43,112
224.0 / 132.0	Butocarboxim-sulfoxid	5,93	10	2	9	15	11	46600	
214.0 / 125.0	Omethoat	6,09	24	7	12	30	10	47517	43,138
214.0 / 183.0	Omethoat	6,08	23	6	9	17	16	42733	
224.0 / 132.0	Aldicarb-sulfoxid	6,65	5	2	9	10	11	121333	
207.0 / 89.0	Aldicarb-sulfoxid	6,65	12	7	3	14	6	32783	12,43,138,139
240.0 / 106.0	Butoxycarboxim	7,3	10	2	9	15	3	53750	42,138
223.0 / 106.0	Butoxycarboxim	7,31	25	10	7	10	3	45533	113
240.0 / 86.0	Aldicarb-sulfon	7,53	10	4	3	25	7	53633	12,126
223.0 / 86.0	Aldicarb-sulfon	7,53	10	11	8	17	3	28217	
237.0 / 72.0	Oxamyl	7,54	11	4	9	28	6	257833	12,43,113,126,138,139
237.0 / 90.0	Oxamyl	7,54	10	4	7	13	7	76050	43,126,138,139
163.0 / 88.0	Methomyl	8,33	20	6	9	15	7	173833	40,43,126,138,139
163.0 / 106.0	Methomyl	8,33	10	8	6	18	3	102550	40,43,113,126,138,139
189.0 / 102.0	Propamocarb	8,59	25	5	6	20	3	237800	43
189.0 / 144.0	Propamocarb	8,59	20	6	3	15	13	43683	43
382.0 / 167.0	Metsulfuron-methyl	8,72	20	6	8	19	6	79550	43,140,141
388.0 / 167.0	Thifensulfuron-methyl	8,75	15	5	12	18	6	41500	43,140,141
275.0 / 107.0	Ethiofencarb-sulfon	9,21	5	4	6	23	9	185833	43,138
258.0 / 107.0	Ethiofencarb-sulfon	9,22	17	10	10	17	3	127500	113
242.0 / 107.0	Ethiofencarb-sulfoxid	9,3	20	6	3	33	3	318000	43,113,138
242.0 / 185.0	Ethiofencarb-sulfoxid	9,3	10	9	3	10	6	107800	43,138
256.0 / 175.0	Imidacloprid	9,37	15	10	21	28	15	154000	43,138,142,143
256.0 / 209.0	Imidacloprid	9,37	20	8	15	26	18	144500	43,113,138,142,143
255.0 / 163.0	Carbofuran-3-hydroxy	9,9	10	4	6	20	15	115167	126
238.0 / 163.0	Carbofuran-3-hydroxy	9,9	10	9	7	17	15	73250	43,139,143
165.0 / 165.0	Fenuron	10,1	23	8	6	5	14	595667	
165.0 / 72.0	Fenuron	10,1	23	8	8	30	6	344167	
230.0 / 199.0	Dimethoat	10,2	9	8	6	14	16	193667	37,43,141,143,144
230.0 / 125.0	Dimethoat	10,2	5	7	4	30	3	146000	43,141,143,144
192.0 / 192.0	Carbendazim	10,9	25	10	9	10	16	1275000	
192.0 / 160.0	Carbendazim	10,9	25	8	9	25	14	1161667	12,36,43,74,76,113 138,142,143,144,145
229.0 / 229.0	Metoxuron	11	20	6	9	5	21	328500	
229.0 / 72.0	Metoxuron	11	25	6	6	42	6	212333	37
208.0 / 75.0	Butocarboxim	11,1	5	2	12	22	5	280000	43,138
191.0 / 75.0	Butocarboxim	11,1	10	8	9	15	6	120667	
208.0 / 116.0	Aldicarb	11,3	10	3	6	11	10	351833	43,113,126,138,141
208.0 / 89.0	Aldicarb	11,3	10	3	9	23	6	213833	43,126,138,141
343.0 / 151.0	Thiophanat-methyl	11,5	20	6	12	30	6	513167	12,36,43,77,113,138,142
343.0 / 93.0	Thiophanat-methyl	11,5	15	8	18	70	8	113333	

Tabelle 5.1.2 (Fortsetzung)

Übergang	Analyt	t <sub>R</sub> min	DP V	EP V	CEP V	CE V	CXP V	Intensität cps	Referenzen
202.0 / 175.0	Thiabendazol	11,7	35	12	15	37	15	745667	12,36,43,75,77 113,138,142,144
202.0 / 131.0	Thiabendazol	11,7	40	10	12	47	9	628500	43,77,138,142,144
228.0 / 171.0	ICarbofuran	11,9	14	8	9	17	15	33550	
222.0 / 165.0	Carbofuran	11,9	20	12	9	17	15	431667	12,16,37,43,75,113,126, 138,139,141,143,146,147
222.0 / 123.0	Carbofuran	11,9	20	8	15	30	9	403000	16,37,43,126,138, 139,143,146,147
210.0 / 111.0	Propoxur	11,9	10	6	9	21	10	277500	16,43,113,138,139,144
210.0 / 168.0	Propoxur	11,9	13	5	9	10	14	165000	16,43,138,139,144
205.0 / 78.0	Imonuron	11,9	40	6	6	35	6	18800	
199.0 / 72.0	Monuron	12	26	6	8	35	6	129333	
201.0 / 72.0	Monuron	11,9	15	6	9	35	6	36217	
355.0 / 88.0	Thiodicarb	12,3	12	5	12	27	7	137667	12,43,113,138
355.0 / 108.0	Thiodicarb	12,2	14	7	13	23	9	54967	42
219.0 / 127.0	D1M-Diuron	12,3	5	2	6	40	3	41533	
208.0 / 151.0	ICarbaryl	12,3	20	8	10	17	13	23050	
202.0 / 145.0	Carbaryl	12,3	10	8	9	17	13	155667	12,16,43,75,113, 126,138,139,141
202.0 / 127.0	Carbaryl	12,3	20	8	13	42	10	58050	16,40,43,126, 138,139,141
226.0 / 107.0	Ethiofencarb	12,7	20	4	11	23	10	293333	12,16,43,113,138,143
226.0 / 164.0	Ethiofencarb	12,7	15	6	12	10	7	73500	16,43,138,143
233.0 / 233.0	Fluometuron	12,8	25	8	9	5	15	184167	
233.0 / 72.0	Fluometuron	12,8	25	8	9	38	6	163000	
215.0 / 148.0	Monolinuron	12,8	25	6	12	22	13	8428	
215.0 / 88.0	Monolinuron	12,8	20	10	9	18	4	1637	
179.0 / 137.0	D2M-Ipo	12,8	23	4	8	18	12	84017	
179.0 / 94.0	D2M-Ipo	12,7	25	6	9	30	3	54217	
239.0 / 72.0	Pirimicarb	12,9	24	6	10	30	6	1295000	16,40,43,143,144
239.0 / 182.0	Pirimicarb	12,9	30	10	9	22	17	245833	18,40,43,143,144
219.0 / 57.0	Thiofanox	12,9	10	6	9	15	3	142500	43
219.0 / 61.0	Thiofanox	12,9	10	6	10	15	3	36783	43
219.0 / 78.0	ICHlortoluron	13,1	34	8	9	37	5	35850	
213.0 / 72.0	Chlortoluron	13,1	28	6	6	37	5	245667	
215.0 / 72.0	Chlortoluron	13,1	25	8	9	37	5	76467	
287.0 / 72.0	Difenoxuron	13,2	20	6	12	45	6	222167	
287.0 / 123.0	Difenoxuron	13,2	20	12	12	26	6	122500	
193.0 / 193.0	D1M-Ipo	13,3	25	6	6	5	12	258833	
193.0 / 94.0	D1M-Ipo	13,3	20	6	6	32	8	183500	
136.0 / 136.0	Ipo-anilin	13,5	40	4	6	5	8	12333	
136.0 / 94.0	Ipo-anilin	13,3	50	12	3	30	6	7323	
237.0 / 84.0	Buturon	13,4	20	7	10	22	6	44517	
237.0 / 126.0	Buturon	13,4	25	6	12	41	9	19017	
222.0 / 222.0	Methabenzthiazuron	13,4	16	8	9	5	19	190500	
222.0 / 165.0	Methabenzthiazuron	13,4	15	8	15	25	14	116167	
213.0 / 78.0	IIsoproturon	13,4	30	9	9	35	6	93450	
207.0 / 72.0	Isoproturon	13,4	25	8	6	35	5	432500	43,141,145,146
207.0 / 165.0	Isoproturon	13,4	30	8	7	21	15	74783	43,141,145,146

Tabelle 5.1.2 (Fortsetzung)

Übergang	Analyt	tR min	DP V	EP V	CEP V	CE V	CXP V	Intensität cps	Referenzen
339.0 / 72.0	Dimefuron	13,5	30	10	12	48	6	161167	
341.0 / 72.0	Dimefuron	13,5	25	12	12	48	6	45683	
404.0 / 372.0	Azoxystrobin	13,6	10	6	12	20	32	2491667	12,43
404.0 / 344.0	Azoxystrobin	13,6	10	6	15	34	30	744333	43
239.0 / 78.0	IDiuron	13,7	30	8	8	38	6	11750	
233.0 / 72.0	Diuron	13,7	25	8	8	38	6	76100	37,43,141,143,146
235.0 / 72.0	Diuron	13,7	20	10	9	38	6	37333	
208.0 / 95.0	Fenobucarb	14,3	25	8	15	21	8	208667	
208.0 / 152.0	Fenobucarb	14,3	15	10	6	13	13	107467	
249.0 / 160.0	Linuron	14,6	25	10	8	19	15	1975	37,43,75,113,138,141,147
249.0 / 182.0	Linuron	14,6	35	8	15	20	17	1818	43,75,138,141,147
226.0 / 169.0	Methiocarb	14,6	16	10	8	15	15	167167	75,113
243.0 / 169.0	Methiocarb	14,6	5	4	9	17	8	129667	43,138
208.0 / 109.0	Promecarb	14,8	25	8	9	22	10	214333	43,138,147
208.0 / 151.0	Promecarb	14,8	25	6	6	14	13	143000	43,113,138,147
200.0 / 200.0	Pyrimethanil	14,9	35	10	12	16	17	3246667	
200.0 / 107.0	Pyrimethanil	14,9	40	10	12	34	9	491500	12,43
200.0 / 82.0	Pyrimethanil	14,9	35	8	6	37	6	365000	43
302.0 / 97.0	Fenhexamid	15,1	35	12	9	36	8	96367	12,43
302.0 / 55.0	Fenhexamid	15,1	30	12	12	66	5	97517	43
291.0 / 72.0	Chloroxuron	15,2	30	6	11	48	6	188167	
293.0 / 72.0	Chloroxuron	15,2	20	8	12	48	6	66833	
330.0 / 121.0	Epoxiconazol	15,4	15	6	12	30	3	155333	75
330.0 / 70.0	Epoxiconazol	15,4	15	8	9	50	6	21617	
328.0 / 159.0	Etaconazol	15,5	20	8	12	40	15	55683	
330.0 / 161.0	Etaconazol	15,5	20	10	21	42	13	41433	
316.0 / 247.0	Flusilazol	15,7	26	10	12	27	21	129000	
316.0 / 165.0	Flusilazol	15,7	25	10	18	38	14	107167	
243.0 / 243.0	Ethoprophos	15,7	15	8	6	5	22	2498333	
243.0 / 173.0	Ethoprophos	15,7	20	8	6	22	15	1006667	
243.0 / 215.0	Ethoprophos	15,7	20	6	12	15	19	543500	
302.0 / 88.0	Fenoxycarb	15,9	25	8	9	25	3	62783	16,43,138
302.0 / 116.0	Fenoxycarb	15,9	20	8	9	15	10	43483	16,43,113,138
353.0 / 297.0	Tebufenozid	16	5	4	9	15	25	1042333	43
353.0 / 133.0	Tebufenozid	16	15	6	15	30	9	1680000	43
308.0 / 70.0	Tebuconazol	16,4	23	8	6	48	5	191833	12,43,145
310.0 / 70.0	Tebuconazol	16,4	30	10	9	48	5	63016	
275.0 / 88.0	Neburon	16,4	25	10	9	23	8	63700	
275.0 / 114.0	Neburon	16,4	20	10	12	21	9	30333	
342.0 / 159.0	Propiconazol	16,6	30	6	16	42	13	26950	12,40,75,144
342.0 / 69.0	Propiconazol	16,7	30	8	9	35	5	21150	
297.0 / 297.0	Imazalil	16,6	30	10	9	15	26	3565000	36,148
297.0 / 159.0	Imazalil	16,6	30	10	12	34	7	491333	12,43,77,113,138
297.0 / 69.0	Imazalil	16,6	25	12	9	38	5	350333	
226.0 / 226.0	Cyprodinil	16,9	35	10	12	15	20	5248333	
226.0 / 93.0	Cyprodinil	16,9	40	8	12	50	7	843667	43
226.0 / 77.0	Cyprodinil	16,9	30	12	12	68	5	620000	43
314.0 / 70.0	Hexaconazol	17	20	10	12	40	5	57167	
316.0 / 70.0	Hexaconazol	17	20	6	9	46	5	37067	

Tabelle 5.1.2 (Fortsetzung)

Übergang	Analyt	t <sub>R</sub> min	DP V	EP V	CEP V	CE V	CXP V	Intensität cps	Referenzen
406.0 / 251.0	Difenconazol	17,1	25	12	18	36	22	58383	
408.0 / 253.0	Difenconazol	17,1	25	10	12	37	22	38783	
329.0 / 125.0	Pencycuron	17,1	20	10	15	40	3	422000	
331.0 / 127.0	Pencycuron	17,1	30	8	12	35	10	110000	
326.0 / 70.0	Diniconazol	17,5	35	12	12	55	5	61700	
328.0 / 70.0	Diniconazol	17,5	30	8	12	55	5	39033	
252.0 / 91.0	Prosulfocarb	18	15	6	6	33	8	339000	
252.0 / 86.0	Prosulfocarb	18	15	6	12	20	6	19900	
383.0 / 195.0	Furathiocarb	18,1	25	8	12	25	17	266000	12,43,113,138
383.0 / 252.0	Furathiocarb	18,1	20	6	12	18	10	163333	43,138

Tabelle 5.1.3 Massenübergänge und Detektionsparameter der untersuchten Analyten, negativen Ionisierungsmodus

Übergang	Analyt	t <sub>R</sub> min	DP V	EP V	CEP V	CE V	CXP V	Intensität cps	Referenzen
141.0 / 97.0	Dalapon	3,3	15	8	6	10	10	8330	
141.0 / 105.0	Dalapon	3,31	25	4	6	10	11	2282	
219.0 / 219.0	Dicamba	6,1	2	4	15	5	21	1775	
219.0 / 175.0	Dicamba	6,08	5	4	6	7	18	7892	
198.0 / 170.0	Benazolin	6,86	15	10	6	10	18	1555	
242.0 / 198.0	Benazolin	6,79	15	4	12	7	21	840	
242.0 / 170.0	Benazolin	6,82	10	4	12	15	18	1554	
282.0 / 81.0	IBromoxynil	8,76	25	10	10	50	9	12600	
276.0 / 81.0	Bromoxynil	8,78	24	10	13	45	9	55050	43,146,149,150
278.0 / 81.0	Bromoxynil	8,78	25	10	8	50	9	55567	43,146,149,150
225.0 / 167.0	12,4-D	9,9	35	4	14	55	18	7320	
219.0 / 219.0	2,4-D	10	10	2	6	5	21	9190	
219.0 / 161.0	2,4-D	9,97	10	4	12	15	15	12375	12,43,141,146,149,150
221.0 / 163.0	2,4-D	9,99	5	10	10	14	15	8113	
199.0 / 199.0	MCPA	10	10	10	6	5	21	28100	
199.0 / 141.0	MCPA	10	10	9	12	18	15	29950	8,43,146,149,150
201.0 / 143.0	MCPA	10	5	9	12	18	15	9105	
370.0 / 370.0	Ioxynil	10,4	25	9	12	5	39	371000	
370.0 / 127.0	Ioxynil	10,4	30	10	10	45	12	252000	43,146,150
370.0 / 243.0	Ioxynil	10,4	20	10	10	32	24	8293	43,146,150
213.0 / 213.0	Mecoprop	10,9	10	5	6	5	21	48300	
213.0 / 141.0	Mecoprop	10,9	10	4	15	16	15	54417	8,43,141,146,149
215.0 / 143.0	Mecoprop	10,9	10	4	15	16	15	16850	
239.0 / 167.0	IDichlorprop	11	5	4	15	17	15	17300	
233.0 / 233.0	Dichlorprop	11,1	10	5	6	5	24	51450	
233.0 / 161.0	Dichlorprop	11,1	10	5	6	13	18	61350	
235.0 / 163.0	Dichlorprop	11	10	5	6	13	18	33333	
320.0 / 320.0	Flamprop	11	10	10	11	5	36	7493	
320.0 / 121.0	Flamprop	11	22	10	15	20	13	7678	
326.0 / 254.0	Fluazifop	11,1	10	10	12	20	24	19550	
254.0 / 108.0	Fluazifop	11,1	35	10	10	40	11	2815	
254.0 / 226.0	Fluazifop	11,1	33	10	6	24	22	3460	
259.0 / 201.0	12,4,5-T	11,6	5	10	15	20	21	5370	

Tabelle 5.1.3 (Fortsetzung)

Übergang	Analyt	t <sub>R</sub> min	DP V	EP V	CEP V	CE V	CXP V	Intensität cps	Referenzen
253.0 / 253.0	2,4,5-T	11,6	5	4	6	5	25	7763	
253.0 / 195.0	2,4,5-T	11,6	5	4	15	15	18	14125	
255.0 / 197.0	2,4,5-T	11,6	12	4	15	13	21	12733	
326.0 / 326.0	Bifenox	11,9	2	4	8	5	30	2115	
326.0 / 282.0	Bifenox	11,9	5	10	15	12	27	3720	
239.0 / 194.0	Dinoseb	12	30	9	6	28	18	95950	
239.0 / 134.0	Dinoseb	12	30	10	7	60	14	143167	
247.0 / 247.0	2,4-DB	12,2	5	4	15	5	21	1393	
247.0 / 161.0	2,4-DB	12,2	2	4	8	10	21	10553	
249.0 / 163.0	2,4-DB	12,2	2	4	6	10	15	6118	
239.0 / 207.0	Dinoterb	12,3	40	10	12	33	21	195167	
239.0 / 176.0	Dinoterb	12,3	40	10	15	50	18	77467	
227.0 / 227.0	MCPB	12,2	5	4	6	5	24	3148	
227.0 / 141.0	MCPB	12,2	5	5	3	13	14	8775	
229.0 / 143.0	MCPB	12,2	5	5	12	15	15	4063	
269.0 / 269.0	Fenoprop	12,5	10	10	10	5	25	18750	
269.0 / 197.0	Fenoprop	12,5	10	4	10	15	21	29150	
271.0 / 199.0	Fenoprop	12,5	5	10	10	20	18	9488	
360.0 / 360.0	Acifluorfen	12,6	5	4	10	5	35	8785	
360.0 / 316.0	Acifluorfen	12,6	5	4	8	12	35	11375	
362.0 / 318.0	Acifluorfen	12,6	2	4	12	10	35	3885	
343.0 / 343.0	Quizalofop	12,7	16	9	10	5	36	6520	
343.0 / 271.0	Quizalofop	12,8	20	9	15	17	26	7697	
345.0 / 273.0	Quizalofop	12,8	5	10	15	20	26	2580	
332.0 / 152.0	Fenoxaprop	13,1	20	10	15	30	18	4845	
332.0 / 260	Fenoxaprop	13,1	25	10	8	17	25	3955	
231.0 / 186.0	Fluometuron	12,2	23	10	15	25	21	107000	
231.0 / 231.0	Fluometuron	12,2	20	10	10	5	22	984333	
205.0 / 162.0	D2M-Diuron	12,3	22	10	15	18	16	62825	
203.0 / 160.0	D2M-Diuron	12,3	20	11	6	17	15	104967	
360.0 / 288.0	Haloxyfop	13,2	10	8	15	18	27	9735	
362.0 / 290.0	Haloxyfop	13,2	13	10	15	18	27	3728	
360.0 / 360.0	Haloxyfop	13,2	20	9	10	5	41	11017	
235.0 / 235.0	DDA	13,5	10	10	8	5	24	76525	
237.0 / 237.0	DDA	13,5	20	10	8	5	24	44633	
219.0 / 162.0	D1M-Diuron	13	7	10	15	15	16	186000	
219.0 / 219.0	D1M-Diuron	13	25	10	6	5	21	173500	
271.0 / 271.0	IPCP	14	56	4	10	11	25	54200	
265.0 / 265.0	PCP	14	25	10	12	5	24	215500	
267.0 / 267.0	PCP	14	26	10	15	5	25	157333	
325.0 / 325.0	Diclofop	14,2	20	10	10	5	31	11517	
325.0 / 253.0	Diclofop	14,3	10	10	12	20	24	13050	
327.0 / 255.0	Diclofop	14,3	10	10	15	20	24	7563	
337.0 / 166.0	Dimefuron	13,1	10	9	12	27	15	3060	
339.0 / 212.0	Dimefuron	13,1	10	9	12	20	21	1718	
237.0 / 192.0	IDiuron	13	25	11	12	15	19	5470	
231.0 / 186.0	Diuron	13,2	30	11	15	20	18	44117	
233.0 / 188.0	Diuron	13,2	15	11	15	20	18	27125	
247.0 / 160.0	Linuron	14,2	10	4	6	15	15	3585	



Tabelle 5.1.3 (Fortsetzung)

Übergang	Analyt	t <sub>R</sub> min	DP V	EP V	CEP V	CE V	CXP V	Intensität cps	Referenzen
249.0 / 162.0	Linuron	14,2	10	4	6	15	15	2925	
247.0 / 126.0	Fludioxonil	14,4	38	11	8	42	13	48350	43
247.0 / 169.0	Fludioxonil	14,4	37	10	8	44	18	20000	43
247.0 / 180.0	Fludioxonil	14,4	36	11	25	41	18	52200	
289.0 / 134.0	Chloroxuron	14,9	20	10	10	43	12	12867	
289.0 / 178.0	Chloroxuron	14,9	20	10	12	25	18	8918	
289.0 / 244.0	Chloroxuron	14,9	25	10	12	25	24	14675	
309.0 / 289.0	Diflubenzuron	15,7	5	4	9	12	24	12125	75,148
309.0 / 156.0	Diflubenzuron	15,7	10	4	10	13	15	26825	43,148
311.0 / 156.0	Diflubenzuron	15,7	15	4	12	13	18	7378	
273.0 / 160.0	Neburon	16,2	20	11	15	27	16	104000	
275.0 / 162.0	Neburon	16,2	20	10	10	27	16	84650	
357.0 / 154.0	Triflumuron	16,5	5	10	10	17	17	104000	43,75
357.0 / 85.0	Triflumuron	16,5	10	10	15	60	9	29183	
459.0 / 439.0	Hexaflumuron	17	5	4	15	18	21	28875	43
459.0 / 175.0	Hexaflumuron	17,1	15	10	13	48	17	21967	
441.0 / 42.3	Hexaflumuron	17	33	10	15	45	6	15817	
439.0 / 42.3	Hexaflumuron	17	25	10	15	47	6	22167	
379.0 / 339.0	Teflubenzuron	18,5	5	4	10	15	32	43333	43,75
379.0 / 196.0	Teflubenzuron	18,5	10	10	12	28	21	26083	

## 5.1.4 HPLC- Methode

### 5.1.4.1 Vorversuche mit HPLC-DAD

Für die Analyse der Carbamate, Carbamatmetabolite und sauren Wirkstoffe wurde für die Voruntersuchungen jeweils eine HPLC-Methode mit UV/Dioden-Array-Detektion entwickelt. Hierzu sind Lösungsmittelgradienten und Detektionswellenlängen für die Trennung, Detektion und Quantifizierung einiger ausgewählten Analyten optimiert worden.

Für die Trennung der Carbamate war der pH-Wert sehr wichtig. Mit reinem Wasser konnten einige Substanzen wie Carbendazim und Pirimicarb nur schlecht detektiert werden. Dies gelang besser mit einem Phosphatpuffer (0.5 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) bei pH=6. Ebenfalls war eine pH-Wert- Einstellung des wässrigen Eluenten mit Phosphorsäure auf pH=2 für die Analyse von sauren Wirkstoffen notwendig.

Die Analysenmethoden sind in der Tabelle 5.1.4, die Analyten und ihre Retentionszeiten in der Tabelle 5.1.5 aufgeführt.

Tabelle 5.1.4: HPLC-DAD Analysenmethoden

Carbamate und Metabolite			Saure Wirkstoffe		
Zeit	Eluent A %	Eluent B%	Zeit	Eluent A %	Eluent B%
0.2	85	15	0.5	60	40
2.2	70	30	8.5	40	60
12.2	50	50	18.5	0	100
17.2	0	100	23.8	0	100
22.2	0	100	27.5	60	40
23.2	85	15	32.5	60	40
32.2	85	15			

Säule:	Phenomenex Luna C18(2) 250 x 4.60 mm	Detektor:	Kanal A: 220nm
Detektor:	Kanal A: 220nm Kanal B: 240nm		Kanal B: 280nm
Eluent A:	Puffer pH=6 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ + $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Eluent A:	0,1% $\text{H}_3\text{PO}_4$
Eluent B:	Acetonitril	Eluent B:	Acetonitril
Fluss:	1 ml/min	Fluss:	1 ml/min
Injektion:	10 $\mu\text{l}$		

Tabelle 5.1.5: Retentionszeiten der Analyten

Carbamate	t <sub>R</sub>	Carbamatmetabolite	t <sub>R</sub>	Säure	t <sub>R</sub>
Oxamyl	5.79	Butocarboxim-sulfoxid	3.56	Picloram	3.91
Methomyl	6.48	Methomyl-oxim	4.90	Metsulfuron	6.80
Carbendazim	8.59	Aldicarb-sulfon	5.90	Dicamba	7.54
Butoxycarboxim	10.31	Ethiofencarb-sulfoxid	6.90	2,4-D	9.03
Aldicarb	11.07	Methiocarb-sulfoxid	7.44	Flamprop	9.78
Thiodicarb	13.24	Carbofuran 3-OH	8.07	Dichlorprop	10.62
Propoxur	13.60	Ethiofencarb-sulfon	8.07	2,4,5-T	10.92
Pirimicarb	14.18	Methiocarb-sulfon	10.10	2,4-DB	11.44
Carbaryl	15.03	Carbofuran 3-keto	11.15	Fenoprop	12.61
Ethiofencarb	15.57			Bifenox	13.49
Methiocarb	17.86			Haloxypop	13.75
Promecarb	18.2			DDA	14.18
Fenoxycarb	19.15			Diclofop	15.02
Benfuracarb	21.03			Dinoseb	15.75
Carbosulfan	23.41			PCP	16.56

#### 5.1.4.2 Laufmittel

Bei allen LC/MS-Untersuchungen wurden Pestizidmischungen mit einer Konzentration von 100 pg/μl in Methanol/Wasser 1:1 eingesetzt.

Kombinationen von Methanol bzw. Acetonitril mit 10 mM NH<sub>4</sub>Ac (pH=6.8) und 0.1% Ameisensäure (pH=2.4) wurden für die Gradientenmethoden getestet und hinsichtlich der jeweils erreichbaren Empfindlichkeit verglichen.

Die Analysen wurden auf einer C18-Säule durchgeführt, die HyPurity Aquastar 5 x 2.1 mm, mit 5 μ Partikelgröße und 190 Å Porenweite. Diese Säule ist speziell für die RP-Trennung polarer Komponenten entwickelt worden, verfügt über eine hohe Konzentration an C18-Alkylketten und ein hydrophiles (polares) Endcapping. Beides trägt dazu bei, dass hochpolare, wasserlösliche Substanzen mit deutlicher Verzögerung von der Säule eluieren. Die Säule kann für basische, polare und saure Komponenten eingesetzt werden [151].

Bei der Gradientenelution wurde das organische Lösungsmittel in 10 Minuten von 30, 20 oder 10% auf 100 % gebracht und 2 Minuten gehalten, dann wurde es in 1 Minute zurück auf die Anfangsbedingungen gefahren. Die letzten 7 Minuten dienten der Equilibrierung der Säule für den nächsten Lauf.

Für beide Ionisierungsmodi, positiv und negativ, war Methanol / 10 mM NH<sub>4</sub>Ac die beste Eluentenkombination. Die ESI- Ionisierungsausbeute hängt von der Protonierbarkeit des Solvens ab, dementsprechend lieferte Methanol im Vergleich zu Acetonitril viel bessere Signalintensitäten. Durch die Variation der Gradientensteigung wurden die Peakhöhen nicht entscheidend geändert.

Die im negativen Ionisierungsmodus mit Methanol / Ameisensäure erzielten Signalhöhen sind in der Abbildung 5.1.1 dargestellt. Als Referenz (100%) wurden hierzu die entsprechenden Peakhöhen mit Methanol / Ammoniumacetat genommen. Mit Ameisensäure wurden niedrigere Intensitäten erreicht, weil die verfügbare Konzentration an Wasserstoffionen bei der Ionisierung eine wichtige Rolle spielt. Bei einem pH-Wert von 2,4 wird die Deprotonierung der Analyten negativ beeinträchtigt, wie aus der Abbildung 5.1.2 ersichtlich.

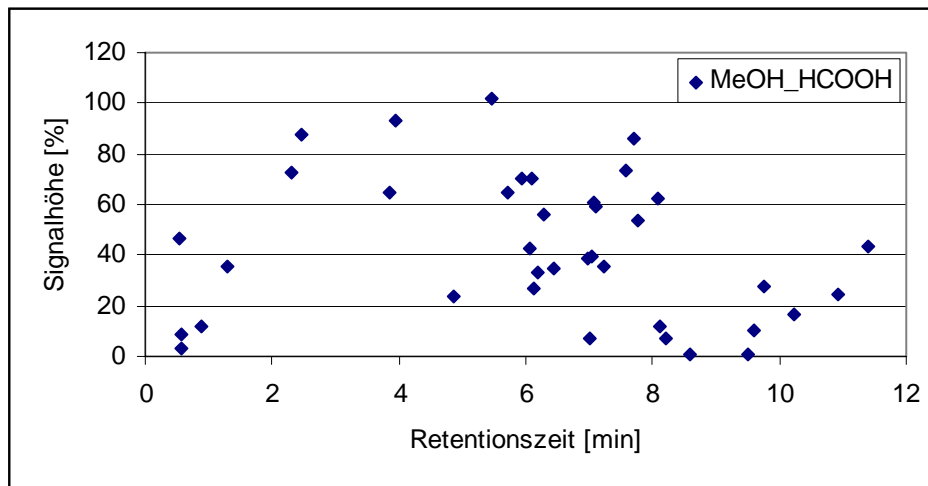


Abbildung 5.1.2: Signalhöhen im negativen Ionisierungsmodus

#### 5.1.4.3 Trennsäulen

Für die Säulenauswahl wurden drei weitere Säulen eingesetzt, die sich, wie HyPurity, für MS-Anwendungen eignen. Aquasil (50 x 2.1mm, 5 $\mu$ ) und Hypersil (50 x 2.1mm, 5 $\mu$ ) sind C18-Säulen, die auch für polare Komponenten entwickelt wurden. Der Porendurchmesser von Aquasil beträgt nur 100 Å, und daraus ergibt sich eine vergrößerte spezifische Oberfläche, die längere Retentionszeiten für polare Substanzen bewirkt [152].

Hypersil BDS ist ein „basendeaktiviertes Kieselgel“ mit reduzierter silanophiler Aktivität, das für die Chromatographie basischer Komponenten besonders gut geeignet ist [153].

Synergy MAX-RP (75 x 2.0mm, 4 $\mu$ ) ist ein C12-modifiziertes Kieselgel, endcapped mit Trimethylsilan und stabil bei pH-Werten zwischen 1,5 und 10. Die Porenweite beträgt 80 Å. Die große Oberfläche bewirkt C18- ähnliche Selektivität und zeigt bis zu 25% weniger Silanolgruppen als vergleichbare C18- Phasen. Die Säule eignet sich für polare oder hydrophobe, saure oder basische Substanzen, und insbesondere für MS-Analysen mit verschiedenen Modifiern [154].

Es wurde mit 30% Methanol angefangen, in 10 Minuten auf 100 % gefahren, weitere 2 Minuten gehalten, dann in 1 Minute zurück auf die Anfangsbedingungen gefahren. Die letzten 7 Minuten dienten der Equilibrierung der Säule für den folgenden Lauf.

Mit der Synergi Max-RP C12- Säule wurden die besten Ergebnisse erzielt. Durch die Chromatographie mit dem Methanol/ 10 mM Ammoniumacetat- Gradienten konnte eine gute Trennung der Analyten in 13 min erreicht werden (Abbildung 5.1.3).

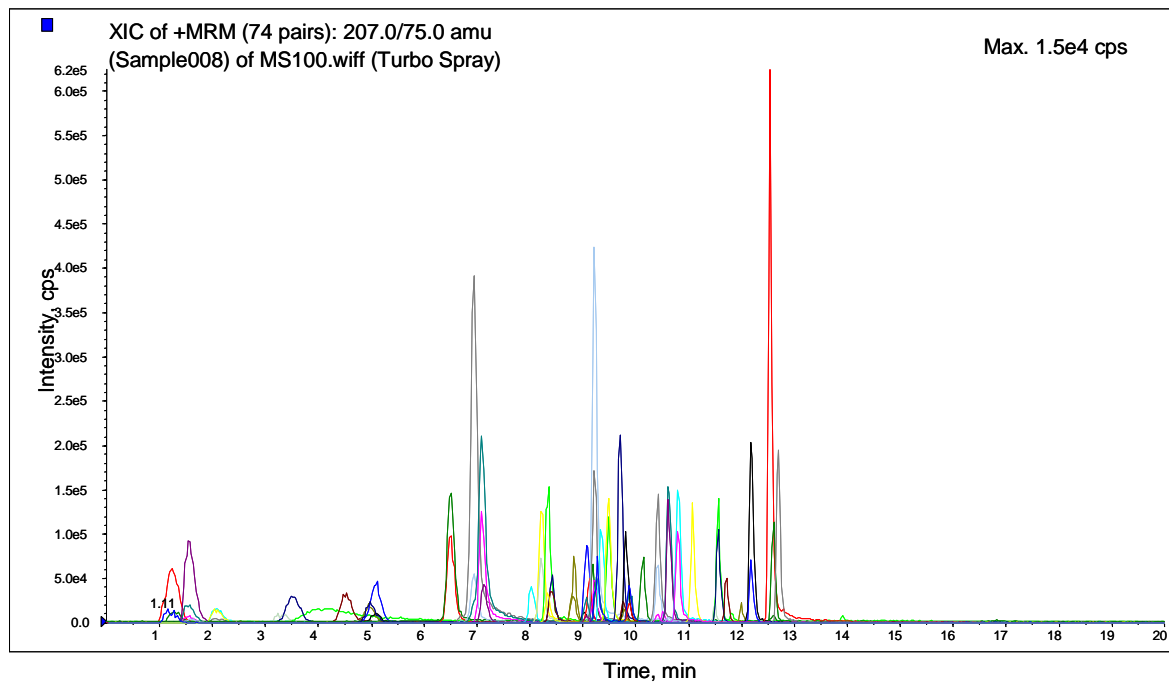


Abbildung 5.1.3 Chromatogramm – Gradientenelution von 48 Einzelsubstanzen im ESI (+) Modus

#### 5.1.4.4 HPLC- Gradienten

Obwohl die doppelte Ionisierung und Selektion im Tandem-MS Betrieb eine sehr selektive Detektion erlaubt, konnte auf der Trennung bestimmter Substanzen nicht verzichtet werden, die höchste Intensitäten bei den gleichen Fragment- und Tochterionen zeigten:

Butocarboxim-sulfoxid und Aldicarb-sulfoxid (Ammoniumaddukt)  $m/z$  224→132

Carbofuran und Methabenzthiazuron  $m/z$  222→165

I-Carbaryl und Promecarb  $m/z$  208→151

Diuron und Fluometuron ESI+  $m/z$  233→72 bzw. ESI-  $m/z$  231→186

Acifluorfen und Haloxyfop ESI-  $m/z$  360→360.

Das kritischste Paar war Butocarboxim-sulfoxid und Aldicarb-sulfoxid, das, wie die Chromatogramme in der Abbildung 5.1.4 zeigen, auf keiner dieser Säulen getrennt werden

konnte. Änderungen der Anfangsbedingungen des Elutionsgradienten waren nicht erfolgreich. Für alle anderen Substanzen traten keine Trennprobleme auf.

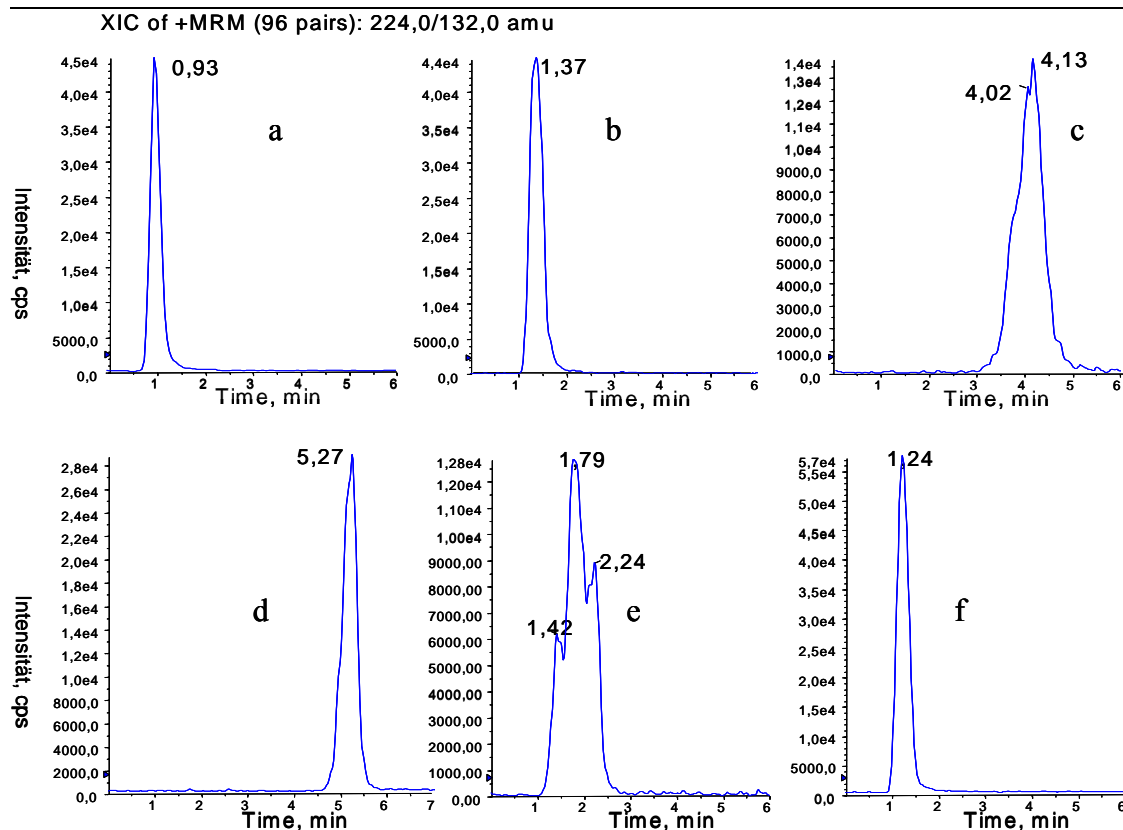


Abbildung 5.1.4: Versuche zur Trennung von Butocarboxim sulfoxid und Aldicarb sulfoxid (224.0 → 132.0) mit verschiedenen Anfangsbedingungen (% Methanol) auf:  
a - HyPurity 30%, b - HyPurity 20%, c - HyPurity 10%, d - Aquasil 10%, e - Hypersil 10% und  
f - Synergi MAX-RP 30%.

Die zwei Substanzen ließen sich auch durch eine raschere Gradientensteigung, von 20 oder 10% Methanol auf 100% in 10 Minuten, nicht trennen. Eine längere Variante der C12- Säule wurde daher hinsichtlich der Trennmöglichkeiten für diese Analyten untersucht. Durch eine stärkere Retention der Substanzen auf der Säule könnte auch die Trennung der ersten eluierenden Analyten von sehr polaren Matrixbestandteilen erreicht werden.

Abbildung 5.1.5 zeigt die Trennung der Analyten auf einer Synergi MAX-RP - Säule mit 15 cm Länge (MAX 15) innerhalb von 20 Minuten. Die ersten Substanzen sind viel stärker retardiert und besser voneinander getrennt im Vergleich zur Synergi MAX-RP - Säule mit 7,5 cm Länge. Die Auflösung beträgt aber nur 0.896. Die meisten Analyten eluieren zwischen 11 und 16 Minuten.

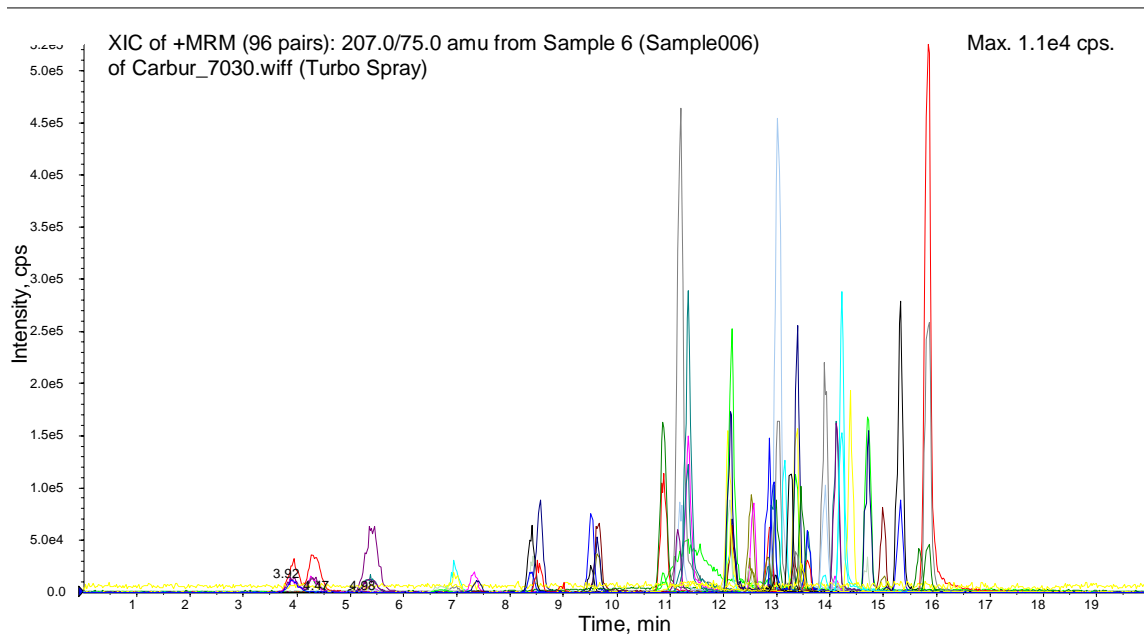


Abbildung 5.1.5: Trennung der 48 Substanzen im ESI+ auf MAX 15

Die Trennung von Butocarboxim-sulfoxid und Aldicarb-sulfoxid war auf MAX 15 immer noch nicht ausreichend. Daher musste der Gradienten so optimiert werden, dass die Peaks dieser Substanzen besser getrennt wurden, und sich die Analyten generell besser auf der Säule verteilen.

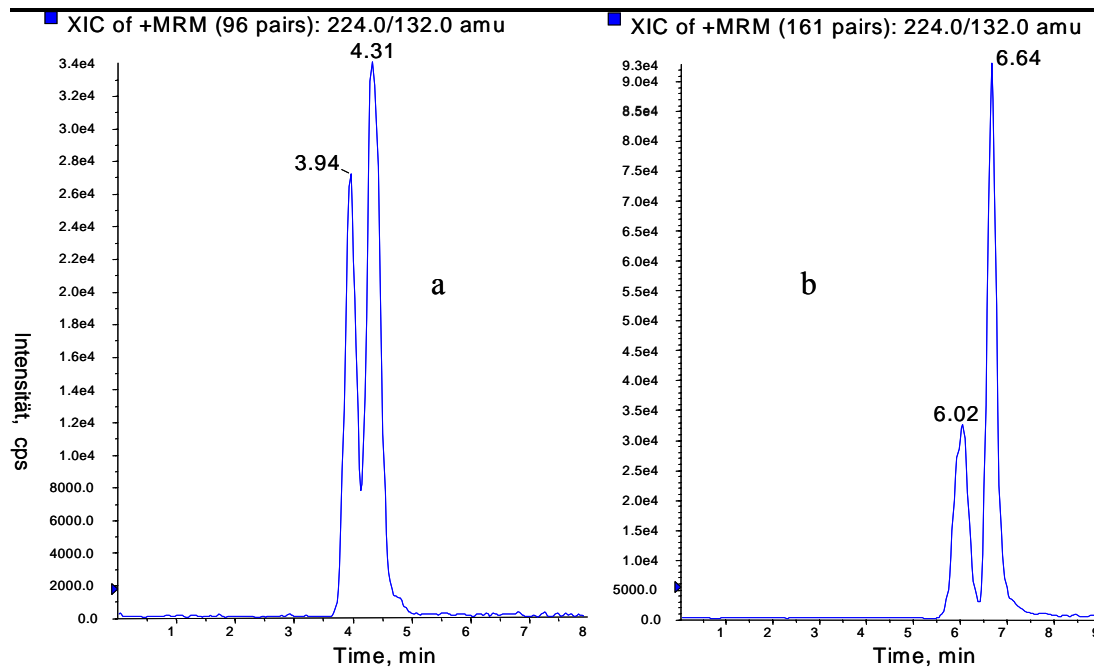


Abbildung 5.1.6: Trennung von Butocarboxim sulfoxid und Aldicarb sulfoxid auf MAX 15

Die erreichte Auflösung von Butocarboxim-sulfoxid und Aldicarb-sulfoxid betrug 1,4 (Abbildung 5.1.6). Auch Methamidophos und Acephat wurden stark genug retardiert, um ihre Beeinflussung durch die polarsten Matrixinhaltsstoffe zu verringern. Zudem wurde die Analysenzeit auf 25 min verlängert (vgl. Abbildung 5.1.7). Die letzten 7 Minuten dienten dabei der Equilibrierung der Säule vor dem nachfolgenden Lauf.

Die Analyten zeigten mit Ausnahme von Propamocarb ein relativ geringes Tailing. Propamocarb schien Wechselwirkungen mit dem Adsorbens der Säule einzugehen, weshalb ein starkes Tailing des Peaks zu beobachten war.

In der Tabelle 5.1.6 sind die Gradienten aufgeführt, die sich für die weiteren Untersuchungen als geeignet erwiesen haben.

Tabelle 5.1.6: Optimierte HPLC- Gradienten

Zeit	ESI+		ESI-	
	A	B	A	B
0.1	20	80	40	60
5	70	30	70	30
15	100	0	100	0
17	100	0	100	0
18	20	80	40	60
25	20	80	40	60

A: Methanol

B: 10 mM NH<sub>4</sub>Ac

Fluss: 300 µl/min

Für beide HPLC- Methoden wurden 10 µl Probe eingespritzt und die Temperatur des Säulenofens auf 20°C eingestellt. Bei Messungen von Proben im Lösungsmittel (Solventstandards) wurde während der Arbeiten die Zersetzung einiger Substanzen nach längeren Standzeiten beobachtet, deswegen wurde die Temperatur des Autosamplers auf 15°C eingestellt.



### 5.1.4.5 Scanfenster

Mit diesen Gradienten konnten ausreichende „Lücken“ zwischen den Peaks in den jeweiligen Chromatogrammen für die Wechsel der zu analysierenden  $m/z$ -Werte geschaffen werden (Abbildung 5.1.7).

Die Analyst- Software bietet die Möglichkeit des Aufbaus von Multiperiodenmethoden an. In der ESI+ Methode konnten z.B. 5 Perioden oder Fenster eingebaut werden. Eine Periode kann als einziges Chromatogramm betrachtet werden, innerhalb derer nur die Massen der in diesen Fenstern auftretenden Substanzen abgefragt und abgescannt werden. Dadurch kann für jede Masse mehr Messzeit verwendet werden, was die Genauigkeit des Messpunktes erhöht und die Nachweisgrenze verringert. Für eine Periodenmethode müssen aber stabile Retentionszeiten gewährleistet werden.

Dieser Ansatz, der zwar sehr vielversprechend für eine Multimethode ist, konnte aber nicht weiter verfolgt werden, weil während der Messungen das Gerät softwarebedingt sehr instabil wurde. Somit musste für weitere Untersuchungen auf die Periodenmethoden verzichtet werden.

Um auch für die schmalsten Peaks, am Ende der Chromatogramm, eine minimale Anzahl von 10 Messpunkten pro Peak zu gewährleisten, wurde pro Ionenpaar eine Analysenzeit von 10 ms ausgewählt.

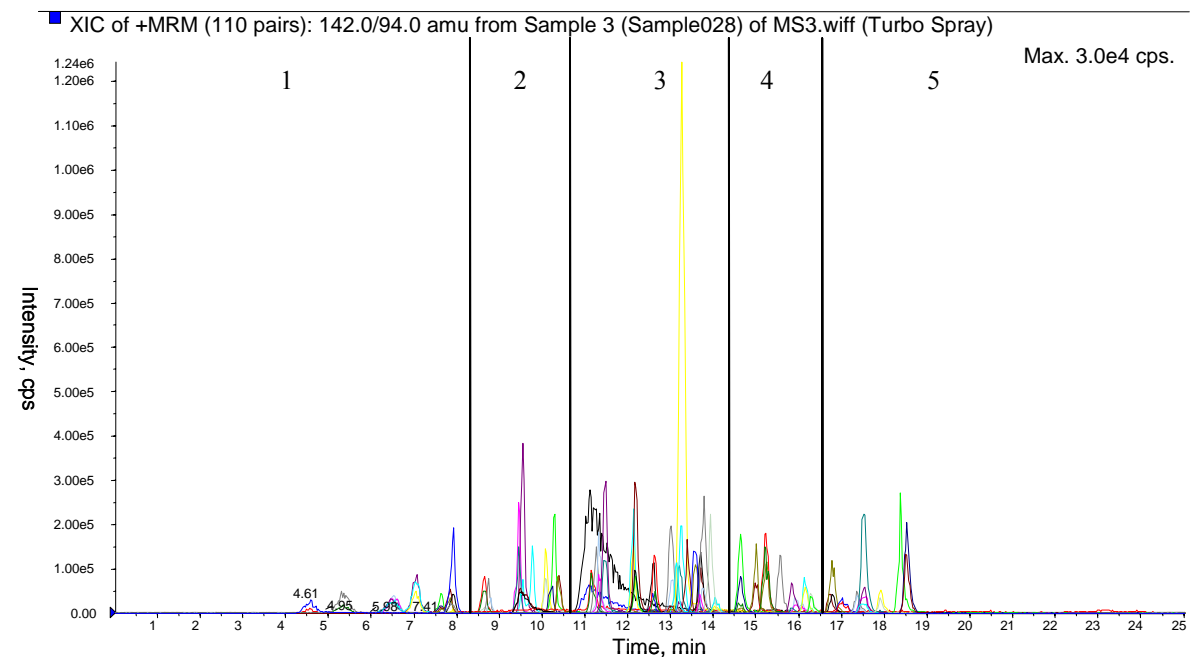


Abbildung 5.1.7: Trennung von 77 Substanzen im ESI+, 5 Perioden- Methode

## 5.1.5 Empfindlichkeitssteigerung

### 5.1.5.1 Vergleich von Modifiern

Für die Verbesserung der Signalintensität empfehlen die Hersteller (Fa. Applied Biosystems) den Einsatz von Formiat- Ionen für die Analysen im positiven Modus und Ammonium- Ionen für den negativen Modus. Diese Ionen unterstützen die Ionisierungsausbeute durch Deprotonierung bzw. Protonierung der zu untersuchenden Substanzen. Polare Analyten, die keine basischen oder sauren Gruppen aufweisen, können durch Protonierung oder Deprotonierung nicht ionisiert werden. Diese Substanzen werden „ionisiert“ durch Assoziation mit anderen Ionen in der Lösung [121].

Für den Vergleich wurde die 10 mM Ammoniumacetat-Lösung (pH=6,8) durch 10 mM Ammoniumformiat ersetzt (pH=3,45).

Die mit Ammoniumformiat erreichten Peakhöhen waren bis zu 7-mal höher. Propamocarb eluiert mit Ammoniumformiat 3 Minuten früher, ohne Tailing und mit einer Peakbreite von nur 1 Minute im Vergleich zu Ammoniumacetat (etwa 4 Minuten). Zwischen dem basischen Propamocarb und dem Säulenmaterial entstehen Ionenaustauschwechselwirkungen mit den sauren Silanolgruppen und hydrophobe Wechselwirkungen [155]. Weil die Ionisierung der Silanolgruppen bei einem niedrigeren pH-Wert (3,45 statt 6,8) geringer ist, wurden für Propamocarb mit Ammoniumformiat bessere Ergebnisse erreicht.

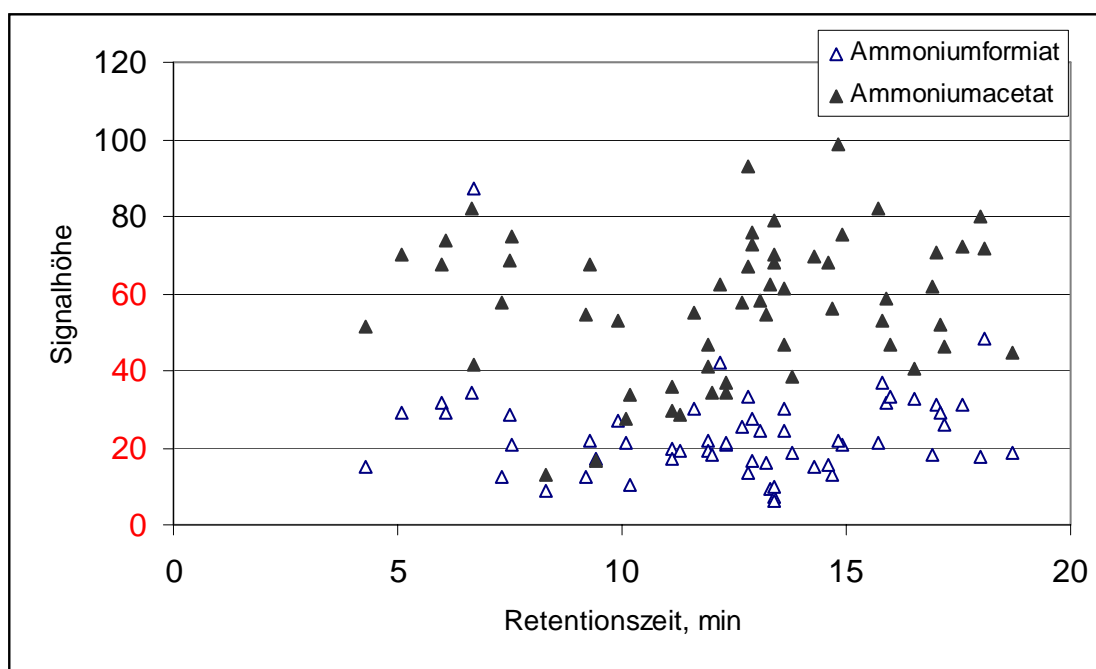


Abbildung 5.1.8 Einfluss des Puffers auf die Signalintensitäten in einem Grünkohlextrakt

Diese Daten sprechen deutlich für den Einsatz von Ammoniumformiat. Jedoch wurde bei den Untersuchungen festgestellt, dass die Matrixeffekte durch Ammoniumformiat verstärkt wurden. Die Messungen an Zitronen- und Grünkohlextrakten zeigten mit Ammoniumformiat bis zu 10 mal stärkere Matrixeffekte als mit Ammoniumacetat (Abbildung 5.1.8).

Deswegen wurden die Arbeiten weiterhin mit Ammoniumacetat 10 mM fortgeführt.

#### *5.1.5.2 Injektionsvolumina*

Es wurde versucht, die Signalintensität der Analyten zu erhöhen, indem 20 µl Standard statt 10 µl eingespritzt wurden. Das größere Injektionsvolumen führte besonders für die polarsten Substanzen zu breiteren Peaks. Zudem konnten Butocarboxim-sulfoxid und Aldicarb-sulfoxid nicht mehr getrennt werden. Diese Peakverbreiterung wurde von den Unterschieden in der Zusammensetzung der Probe und des Laufmittels hervorgerufen. In der Probe befanden sich die Analyten in einem 50:50 Methanol / Wasser- Gemisch, während die anfängliche Eluentenzusammensetzung etwa 20% Methanol und 80 % Ammoniumacetat betrug (vgl. Tabelle 5.1.6). Dementsprechend wurde es weiterhin mit einem Injektionsvolumen von 10 µl gearbeitet.

### **5.1.6 Kenndaten der instrumentellen Analyse**

#### *5.1.6.1 Ermittlung der Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze*

Unter der Nachweisgrenze (NWG) versteht man die kleinste nachweisbare Menge. Unter der Bestimmungsgrenze (BSG) versteht man die kleinste quantifizierbare Menge, die mit einer vorgegebenen Richtigkeit und Präzision quantitativ erfasst werden kann (DIN 32645) [135].

Es gibt eine Reihe von verschiedenen Möglichkeiten zur Ermittlung von Nachweis- und Bestimmungsgrenzen. In dieser Arbeit wurde die Bestimmung über das Peak/Rausch-Verhältnis gewählt, da diese auch von der zur Verfügung stehenden Software unterstützt wurde.

Für die Ermittlung der Nachweisgrenze wird ein Signal/Rausch Verhältnis von 3:1 und für die Bestimmungsgrenze von 9:1 empfohlen [135].

Es muss hierzu angemerkt werden, dass das Peak/Rausch- Verhältnis stark vom aktuellen Zustand der Anlage und den experimentellen Bedingungen abhängt, z.B. Detektor, Reinheit des Lösungsmittels, Temperatur usw. [135].

Ein Standard in Methanol/10 mM Ammoniumacetat mit einer Konzentration von 100 ng/ml wurde in beiden Ionisierungsmodi jeweils 10-fach gemessen. Aus den erzielten Peak/Rausch-Verhältnissen wurden die Mittelwerte berechnet.

In der Tabelle 5.1.7 und 5.1.8 sind die auf dieser Weise ermittelten Bestimmungsgrenzen und Nachweisgrenzen der im ESI+ bzw. ESI- analysierten Substanzen zusammengefasst.

Tabelle 5.1.7: Bestimmungsgrenzen und Nachweisgrenzen der im ESI+ untersuchten Substanzen

Analyt	BSG [pg/ $\mu$ l]	NWG [pg/ $\mu$ l]	Analyt	BSG [pg/ $\mu$ l]	NWG [pg/ $\mu$ l]
Acephat	0,18	0,06	Fluometuron	0,20	0,07
Aldicarb	0,02	0,01	Flusilazol	0,22	0,07
Aldicarb-sulfon	0,32	0,11	Furathiocarb	0,34	0,11
Aldicarb-sulfoxid	0,15	0,05	Hexaconazol	1,15	0,38
Azoxystrobin	0,12	0,04	Imazalil	0,25	0,08
Butocarboxim	0,04	0,01	Imidacloprid	0,31	0,10
Butocarboxim-sulfoxid	0,28	0,09	Ipo-anilin	1,59	0,53
Butoxycarboxim	0,26	0,09	Isoproturon	0,05	0,02
Buturon	0,38	0,13	Linuron	1,90	0,63
Carbaryl	0,13	0,04	Metamidophos	0,13	0,04
Carbendazim	0,11	0,04	Methabenzthiazuron	0,36	0,12
Carbofuran	0,08	0,03	Methiocarb	0,10	0,03
Carbofuran-3-OH	0,11	0,04	Methomyl	0,07	0,02
Chloroxuron	0,08	0,03	Metoxuron	0,06	0,02
Chlortoluron	0,12	0,04	Metsulfuron-methyl	0,11	0,04
Cyprodinil	0,22	0,07	Monolinuron	0,51	0,17
D1M-Diuron	0,31	0,10	Monuron	0,13	0,04
D1M-Ipo	0,14	0,05	Neburon	0,20	0,07
D2M-Ipo	0,34	0,11	Omethoat	0,23	0,08
Difenconazol	0,59	0,20	Oxamyl	0,09	0,03
Difenoxuron	0,03	0,01	Pencycuron	0,03	0,01
Dimefuron	0,10	0,03	Pirimicarb	0,05	0,02
Dimethoat	0,05	0,02	Promecarb	0,10	0,03
Diniconazol	0,45	0,15	Propamocarb	0,16	0,05
Diuron	0,28	0,09	Propiconazol	0,43	0,14
Epoxiconazol	0,31	0,10	Propoxur	0,03	0,01
Etaconazol	0,26	0,09	Prosulfocarb	0,16	0,05
Ethiofencarb	0,08	0,03	Pyrimethanil	0,12	0,04
Ethiofencarb-sulfon	0,17	0,06	Tebufenozide	0,10	0,03
Ethiofencarb-sulfoxid	0,08	0,03	Terbuconazol	0,29	0,10
Ethoprophos	0,10	0,03	Thiabendazole	0,29	0,10
Fenhexamid	2,09	0,70	Thifensulfuron-methyl	0,14	0,05
Fenobucarb	0,07	0,02	Thiodicarb	0,06	0,02
Fenoxycarb	0,21	0,07	Thiofanox	0,04	0,01
Fenuron	0,10	0,03			

Tabelle 5.1.8: Bestimmungsgrenzen und Nachweisgrenzen der im ESI- untersuchten Substanzen

Analyt	BSG [pg/ $\mu$ l]	NWG [pg/ $\mu$ l]	Analyt	BSG [pg/ $\mu$ l]	NWG [pg/ $\mu$ l]
2,4,5-T	2,16	0,72	Diuron	0,76	0,25
2,4-D	3,28	1,09	Fenoprop	1,38	0,46
2,4-DB	1,62	0,54	Fenoxaprop	6,87	2,29
Acifluorfen	2,65	0,88	Flamprop	3,77	1,26
Benazolin	19,40	6,47	Fluazifop	2,51	0,84
Bifenox	2,80	0,93	Fludioxonil	0,82	0,27
Bromoxynil	0,35	0,12	Fluometuron	0,50	0,17
Chloroxuron	3,06	1,02	Haloxypop	3,21	1,07
D1M-Diuron	0,37	0,12	Hexaflumuron	0,69	0,23
D2M-Diuron	0,51	0,17	Ioxynil	0,10	0,03
Dalapon	5,52	1,84	Linuron	2,88	0,96
DDA	2,75	0,92	MCPA	1,26	0,42
Dicamba	2,95	0,98	MCPB	3,30	1,10
Dichlorprop	0,57	0,19	Mecoprop	0,43	0,14
Diclofop	2,53	0,84	Neburon	0,40	0,13
Diflubenzuron	1,17	0,39	PCP	0,54	0,18
Dimefuron	7,56	2,52	Quizalofop	3,38	1,13
Dinoseb	0,20	0,07	Teflubenzuron	0,74	0,25
Dinoterb	0,22	0,07	Triflumuron	0,49	0,16

Außer für einige wenige Wirkstoffe konnten mit einem Injektionsvolumen von 10  $\mu$ l Bestimmungsgrenzen von 20 fg/ $\mu$ l bis 6 pg/ $\mu$ l erreicht werden. Damit ist die LC/MS-Methode ausreichend empfindlich, um Konzentrationen im Bereich der niedrigsten Grenzwerte in Lebensmitteln nach RHmV (10  $\mu$ g/kg) sicher analysieren zu können.

### 5.1.6.2 Kalibrierfunktionen

Die Linearität der Analysenmethoden wurden durch Standardaddition von Tomatenextrakten ermittelt. Zu diesem Zweck wurde ein Tomatenextrakt mit SPE gereinigt (siehe Kapitel 5.7.1) und mit verschiedenen Mengen Standardmischung (100 ng/ $\mu$ l) versetzt, so dass 10 Proben à 1 ml mit folgenden Konzentrationen angesetzt wurden: 0,5, 1, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 und 1000 ng/ml. Die Messungen wurden mit den LC/MS/MS- Methoden im positiven und negativen Ionisierungsmodus durchgeführt.

Der Korrelationskoeffizient  $r$  gilt als das wichtigste Kriterium für die Linearität einer Kalibriergeraden und soll möglichst  $>0.999$  sein [135]. Die Kalibriergeraden der Substanzen erfüllen im Bereich der Bestimmungsgrenze (vgl. Tabelle 5.1.7 und 5.1.8) bis 100  $\mu$ g/kg dieses Kriterium.

Korrelationsunterschiede werden jedoch mithilfe des Bestimmtheitsmaßes  $r^2$ , welches durch eine Quadrierung von  $r$  ermittelt wird, stärker sichtbar.

In dem Bereich 0,5 – 100 µg/kg könnten lineare Kalibrierfunktion mit guten Ergebnissen angewandt werden, wie die in der Tabelle 5.1.9 beispielhaft dargestellten Bestimmtheitsmassen zeigen.

Tabelle 5.1.9 Ermittelte Bestimmtheitsmassen einiger Analyten in Tomatenextrakten

Analyt	Lineare Regression		Quadratische Regression
	$r^2$ 1 - 100 µg/kg	$r^2$ 1 - 1000 µg/kg	$r^2$ 1 - 1000 µg/kg
Aldicarb-sulfoxid	0,9982	0,9460	0,9993
Carbendazim	0,9982	0,8776	0,9665
Dimethoat	0,9979	0,9668	0,9912
Epoxiconazol	0,9997	0,9466	0,9995
Etaconazol	0,9996	0,9986	0,9999
Ethoprophos	0,9986	0,9761	0,9995
Furathiocarb	0,9981	0,9857	0,9976
Hexaconazol	0,9995	0,9864	0,9998
Methabenzthiazuron	0,9986	0,9748	0,9937
Omethoat	0,9993	0,9941	0,9991
Pyrimethanil	0,9983	0,9908	0,9996
Terbuconazol	0,9978	0,9866	0,9992
Thiabendazole	0,9986	0,9682	0,9999
Thifensulfuron-methyl	0,9992	0,9933	0,9998
Thiodicarb	0,9986	0,8895	0,9998

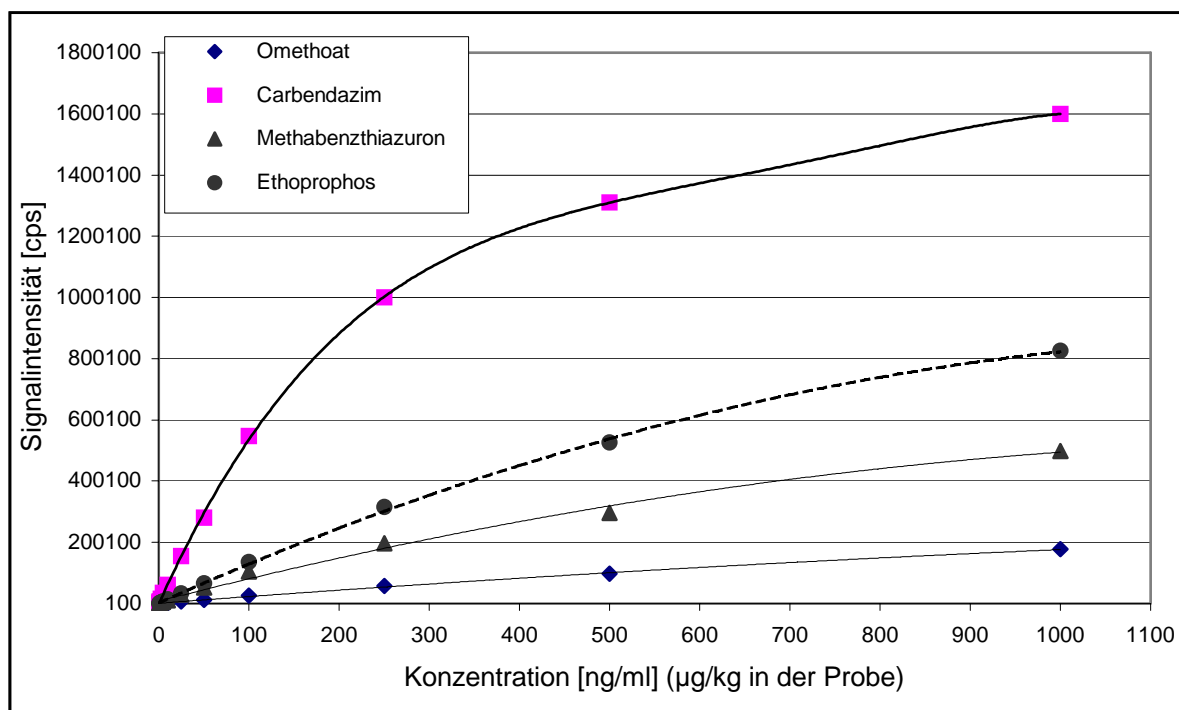


Abbildung 5.1.9 Beispiel von ermittelten Kalibrierfunktionen für einige Analyten in Tomatenextrakten, quadratische Regression

Für Konzentrationen ab 100 µg/kg würde sich die quadratische Regression besser eignen (Abbildung 5.1.9).

Bei größeren Konzentrationen wurde eine Abnahme der Signalintensitäten beobachtet, die von der Konkurrenz der Analyten um die Ladung während des Ionisierungsprozesses herrührt [43]. Um eine sichere Analytik zu gewährleisten, sollten in diesem Fall die Proben verdünnt, oder eine nicht lineare Kalibration angewandt werden.

#### 5.1.6.3 Präzisionstest der LC/MS/MS-Methode

Präzision ist das Maß für die Übereinstimmung unabhängiger Analysenergebnisse untereinander, oder das Maß für die Streuung von Analysenergebnissen. Als Streuung und damit als Präzisionsmaß wird die Standardabweichung  $s$  oder der Variationskoeffizient (relative Standardabweichung)  $V_k$  verwendet.

Die Wiederholpräzision ist die Präzision unter Wiederholbedingungen.

Wiederholbedingungen sind Bedingungen, unter denen voneinander unabhängige Ermittlungsergebnisse in kurzen Zeitabständen erhalten werden, und zwar mit demselben Verfahren, an identischen Objekten, in demselben Labor, durch denselben Bearbeiter und mit derselben Geräteausrüstung. Es gibt eine Präzision „within day“ oder „inter day“ und eine Präzision „day to day“ oder „inter day“.

Für die Ermittlung der Messpräzision „within day“ wurde ein Standard in Methanol/ 10 mM Ammoniumacetat mit einer Konzentration von 100 ng/ml 6-fach gemessen. Für die Messpräzision „day to day“ wurden Daten verwendet, die an 6 verschiedenen Tagen mit frisch vorbereiteten Standards erzielt wurden. Aus diesen Daten wurden die Mittelwerte gebildet.

Der Variationskoeffizient für die Messpräzision „within day“ soll nach Kromidas [135] bei HPLC- Bestimmungen in der Umweltanalytik unter 15% liegen. Diese Präzision wurde in diesem Fall für alle Analyten erreicht.

Die Präzision „day to day“ war naturgemäß etwas schlechter, mit Variationskoeffizienten unter 20% jedoch akzeptabel. Die erzielten Daten sind in der Anlage (Seite 170) zusammengefasst.

Die neu entwickelte Bestimmungsmethode mit der LC/MS/MS ist somit routinefähig und wurde in der vorliegenden Arbeit zur Quantifizierung von polaren Wirkstoffen in Erntegütern eingesetzt.

## 5.2 Optimierung der Extraktion

Das am häufigsten in der Literatur beschriebene Extraktionsverfahren für Lebensmittel ist das Zerkleinern der Probe im Lösungsmittel mit einem Dispergiergerät oder Mixer. Da es sich um ein einfaches, preiswertes und schnelles Verfahren handelt, das in den meisten Laboratorien mit guten Ergebnissen verwendet wird, soll es auch in der neuen Methode beibehalten werden. Fraglich ist das für die Extraktion zu verwendende Lösungsmittel.

### 5.2.1 Vorversuche

Bei den Vorversuchen wurden die in der Fachliteratur vorgestellten Extraktionsmethoden (S19 [4], S19 on-line[8], Godula et al. [35], Stan [8]) mit verschiedenen Matrices (Grünkohl, Weizen, Raps, Tomate, Zitrone, Äpfeln) durchgeführt, um sie in Hinsicht auf Durchführbarkeit, Handhabung und Eignung für die zu untersuchenden Matrices zu vergleichen.

Dementsprechend wurden Aceton:Wasser 2:1 (S19 [4]), Ethylacetat mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  [31,35], Aceton und Ethylacetat [8], und Methanol [40] als Lösungsmittel eingesetzt.

Neben großem Zeitaufwand, traten bei der S19- Methode Probleme beim Ablesen des Volumens auf. Die Leichtflüchtigkeit des Acetons verursachte Verluste während der Extraktion, die zu einer ungenauen Volumenbestimmung führten. Das Extraktionsverfahren der S19- Methode wurde in dieser Arbeit weiter untersucht und optimiert (siehe Abschnitt 5.2.3).

Bei der Extraktion mit Ethylacetat bildeten sich hartnäckige Emulsionen und große Mengen von unpolaren Begleitstoffen wurden mitextrahiert. Obwohl Ethylacetat und Wasser nicht komplett mischbar sind, musste das Restwasser mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  aus dem Extrakt entfernt werden.

### 5.2.2 Einfluss des pH-Wertes

Die gleichzeitige Extraktion und Weiterverarbeitung von sauren, neutralen und basischen Wirkstoffen ist ein Ziel dieser Methodenentwicklung. Die vom pH-Wert abhängige Ionisierbarkeit der Substanzen kann aber während der Extraktion und der flüssig-flüssig-Verteilung die entsprechenden Ausbeuten beeinflussen. Die ersten Vorversuche zeigten geringere Wiederfindungsraten einiger saurer Substanzen bei pH-Werten von 4 und 6



(Abbildung 5.2.1). Die meisten untersuchten sauren Substanzen konnten unabhängig vom pH-Wert gut extrahiert werden.

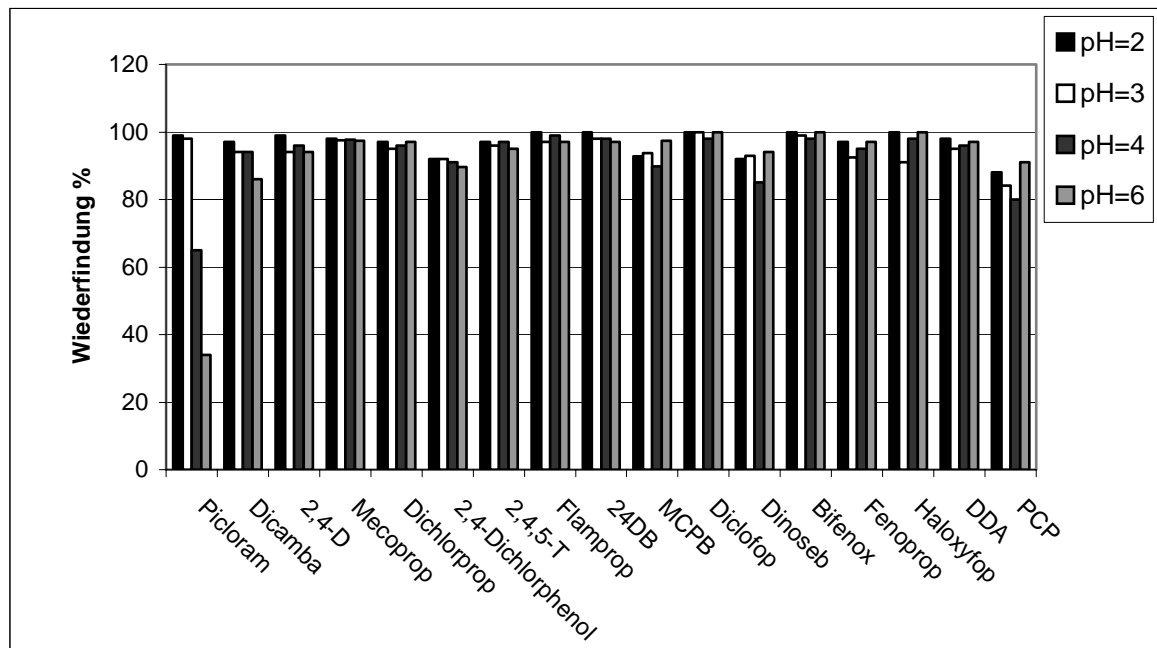


Abbildung 5.2.1: Einfluss des pH-Wertes auf die Wiederfindungsraten saurer Substanzen nach der Flüssig-Flüssig-Verteilung zwischen Aceton/Wasser und Aceton/Ethylacetat/Cyclohexan

### 5.2.3 Lösungsmittel

Die in der Literatur favorisierten Lösungsmittel Methanol/Wasser [40, 43] und Aceton/Wasser [4, 8] haben ihre speziellen Vor- und Nachteile. Methanol/Wasser ist sehr polar, hat gute Extraktionseigenschaften für sehr polare Analyten, aber auch für unerwünschte polare Matrixinhaltsstoffe, und kann theoretisch ohne weitere Bearbeitung direkt injiziert werden. Aceton/Wasser ist das Lösungsmittel der klassischen S19 Multimethode. Es ist sowohl für die Extraktion polarer als auch unpolarer Substanzen geeignet. Eine Multimethode für polare Substanzen könnte sehr elegant mit der schon bestehenden S19 Methode verknüpft, und damit unpolare und polare Substanzen aus einem Extraktionsansatz bestimmt werden. Acetonitril hat den Vorteil, dass es weniger Begleitsubstanzen, vor allem weniger Fette und Wachse, mitextrahiert [65, 75].

Diese Lösungsmittel wurden daher hinsichtlich des Gehaltes an mitextrahierten Matrixbegleitstoffen, ihrer Handhabung und einer möglichen weiteren Extraktreinigung untersucht.

Das Extraktionsverfahren mit Aceton/Wasser basiert auf der S19-Methode und einer Modifikation der von Stan [8] entwickelten Methode. Statt einer Ethylacetat-Cyclohexan 1:1-Mischung wurde reines Ethylacetat eingesetzt. Bei dem untersuchten Aceton/Wasser/Ethylacetat Verhältnis von 10:4:5 kommt es mit dieser Mischung zu einer einheitlichen Phase. Aceton hat einen niedrigen Siedepunkt ( $57^{\circ}\text{C}$ ), und ist daher leicht zu konzentrieren und zu entfernen, zumal es mit dem Ethylacetat ein Azeotrop bildet. Es ist billig, sehr effizient und nicht toxisch.

Die Proben wurden mit der Labormessermühle vorzerkleinert und vorhomogenisiert. Ein Aliquot von 40 g wurde in ein Zentrifugenglas oder in ein Dispergiergefäß eingewogen und mit soviel Wasser versetzt, dass mit dem Wasser in der Probe 40 ml erreicht wurden (siehe Tabelle 5.2.1). 100 ml Aceton wurden zugegeben und die Probe 2 Minuten mit dem Dispergiergerät intensiv gemischt. Dabei wurde die Probe stark zerkleinert und damit eine verbesserte Extraktion der Analyten ermöglicht. Zum Aceton/Wasser-Extrakt wurden 50 ml Ethylacetat zugegeben und die Probe wurde weitere 2 Minuten gemischt. Danach wurden die Extrakte 10 Minuten lang zentrifugiert. Vom klaren Aceton/Wasser/ Ethylacetat-Extrakt wurde ein Aliquot entnommen, in einen Messzylinder gegeben und mit 25 g Kochsalz und 25 ml Cyclohexan versetzt. NaCl bewirkt das Verdrängen der Analyten in die organische Phase (Aussalzeffekt), die durch Cyclohexan unpolarer wird, und somit weniger Wasser enthält. Die Phasentrennung erfolgte somit nicht durch Schütteln, sondern wurde abgewartet (über Nacht, im Kühlschrank). Das Volumen wurde abgelesen, ein Aliquot des Aceton/Ethylacetat/Cyclohexan- Gemisches entnommen und am Vakuum-Rotationsverdampfer bis zu einer Konzentration von 5 g Probe/ml aufkonzentriert.

Die in Ethylacetat/Cyclohexan vorliegenden Aceton-Extrakte können mit der GPC analog der S19- Vorschriften weiterverarbeitet werden.

Die bei der Extraktion verwendeten Wasservolumina sind in der Tabelle 5.2.1 dargestellt, zusammen mit den Wasser- und Fettanteilen der untersuchten Matrices [156].

Tabelle 5.2.1: Wassergehalt und Fettgehalt der untersuchten Matrices [156], für die Extraktion eingesetztes Wasservolumen

Matrix	% Fett	% Wasser	ml Wasser/ 10 g Probe
Apfel	0.17	85.56	1.44
Avocado	19.66	70.23	2.98
Erdbeere	0.30	90.95	0.90
Grünkohl	0.70	84.46	1.55
Olive	15.32	75.28	2.47
Pfirsich	0.25	88.97	1.10
Raps	48.31	7.80	9.22
Reis	0.55	10.46	8.95
Tomate	0.33	93.76	0.62
Weizen	0.98	11.92	8.81
Zitrone	0.30	88.98	1.10

Eine zweite Extraktionsvariante basierte auf der Extraktion mit Methanol bzw. Acetonitril [43]. Methanol ist ein deutlich polareres protisches Lösungsmittel mit der möglichen Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen. Dadurch eignet sich Methanol gerade für die Extraktion polarer Substanzen. Der Zusatz von Wasser (33%) bewirkt eine weitere Steigerung der Polarität, so dass die Extraktion von unpolaren Stoffen, wie z.B. Fette vermindert werden sollte. Im Gegensatz dazu hat Acetonitril als nicht-protisches Lösungsmittel keine von Wasserstoff unterstützten Wechselwirkungen [43].

Nach dem oben vorgestellten Verfahren wurden 10 g Probe mit Wasser bis zu 10 ml Gesamtgehalt versetzt und mit 20 ml Methanol oder Acetonitril homogenisiert, dann 10 Minuten lang zentrifugiert.

Die Methanol/Wasser- und Acetonitril/Wasser- Extrakte können durch SPE weiterverarbeitet oder direkt analysiert werden. Diese Verfahren sind einfach zu handhaben und eignen sich für jede der untersuchten Probenmatrices. Dabei zeigen sich folgende Vorteile:

- kleinere Mengen an Lösungsmitteln
- keine LLE notwendig
- Schnelligkeit

Zur Untersuchung der Menge der mitextrahierten Probeninhaltsstoffe wurden die nach diesen Verfahren gewonnenen Extrakte eingeeengt, bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und der Rückstand abgewogen.

Tabelle 5.2.2: Extraktückstände einiger Matrices (mg/g Probe)

	Methanol/Wasser	Aceton/EtOAc	Acetonitril/Wasser
Raps	71	127	85
Zitrone	71	14	53
Tomate	31	5	30
Avocado	40	94	50

Aus den Daten der Tabelle 5.2.2 wird ersichtlich, dass durch die Verteilung der Substanzen zwischen Wasser/Aceton – Ethylacetat/Cyclohexan schon ein gewisser Reinigungseffekt erzielt wird, obwohl bei den fettreichen Matrices eine weitere Reinigung notwendig ist.

#### 5.2.4 Extraktion fettreicher Matrices

Obwohl durch die polare Methanol/Wasser- Mischung nur wenig Fett gelöst wird, kommt es bei fettreichen Matrices zu niedrigeren Wiederfindungsraten für mittelpolare bis unpolare Substanzen ( $\log K_{ow} > 2.5$ , vgl. Tabelle 9.1). Mitextrahierte Begleitstoffe können während der Anreicherung die Festphase belegen (siehe Abschnitt 5.3.2.5), und somit bewirken, dass die weniger polaren Analyten nicht ausreichend retardiert werden.

Raps hat sich während der Untersuchungen als eine schwierige Matrix herausgestellt. Der hohe Fettgehalt (bis zu 50% [156]) und die Komplexität dieser Matrix bereiteten Probleme bei der Extraktion mit Methanol/Wasser 2:1. Große Mengen an Inhaltsstoffen wurden aus der Probe mitextrahiert und verursachten starke Matrixeffekte. Dabei wurden insbesondere für die weniger polaren Analyten niedrige Wiederfindungsraten erzielt (Abbildung 5.2.2).

Für diese Matrix wurden verschiedene Extraktionsmöglichkeiten untersucht, deren Ergebnisse in der Abbildung 5.2.3 dargestellt sind.

Rapsproben à 10 g wurden jeweils mit 1 µg pro Analyt gespikt, und nach der oben dargestellten Extraktionsmethode mit folgenden Lösungsmitteln extrahiert:

- 30 ml Acetonitril /Wasser 2:1 (9.22 ml Wasser + 20 ml Acetonitril)
- 30 ml Methanol/Wasser 9:1 (0.32 ml Wasser + 20 ml Methanol)
- 30 ml Methanol

Nach dem Zentrifugieren wurden jeweils 3 ml Extrakt auf der HRP- Festphase gereinigt (siehe Abschnitt 5.3.2.5) und mit LC/MS/MS vermessen.

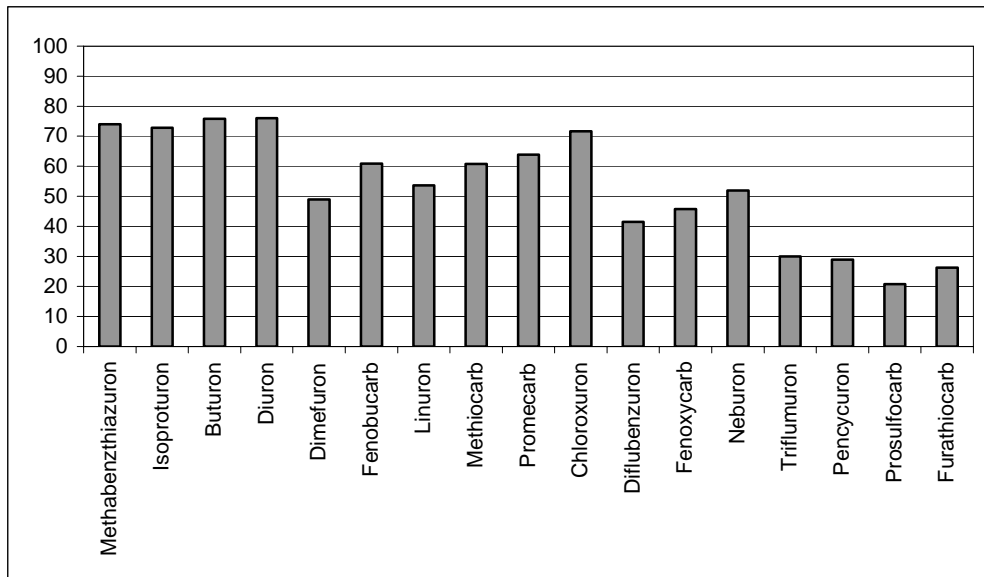


Abbildung 5.2.2: Wiederfindungsraten der mittelpolaren Analyte (ab  $\log K_{ow} = 2.5$ ) für einen Rapsextrakt, nach Extraktion mit Methanol/Wasser 2:1; Bestimmung mit LC/MS/MS im positiven Modus

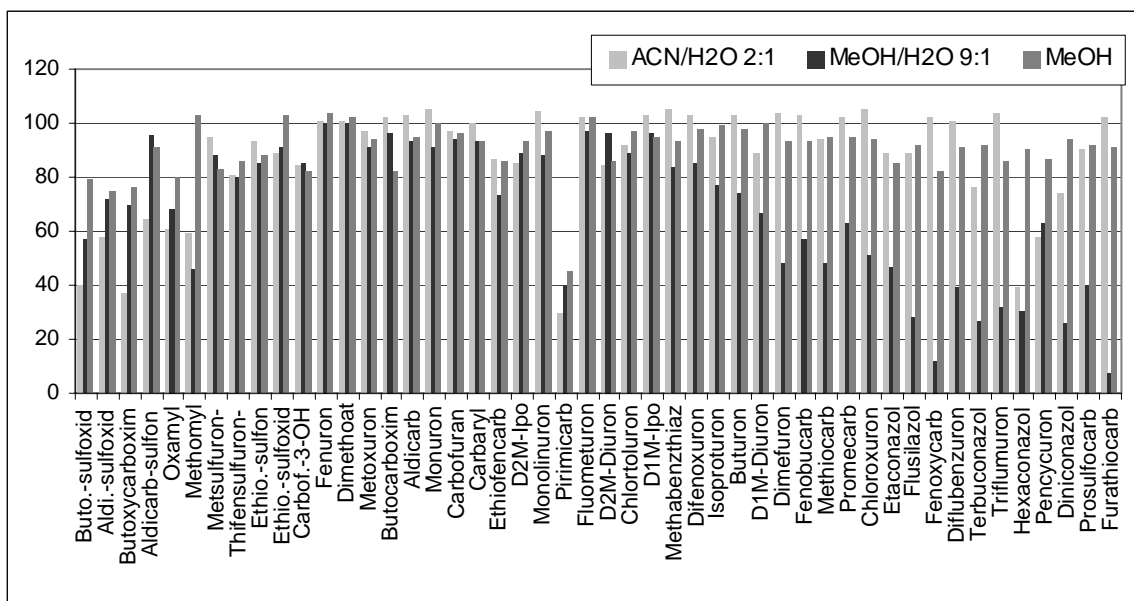


Abbildung 5.2.3: Wiederfindungsraten der Analyten aus gespikten Rapsproben nach Extraktion mit verschiedenen Lösungsmitteln, LC/MS/MS- Bestimmung im positiven Modus

Für die Wiederfindungsraten der mittelpolaren und unpolaren Analyten ist die Verteilung zwischen Methanol/Wasser und Fett sehr ungünstig. Selbst mit nur 10% Wasser in Methanol war die Wiederfindungsrate unpolarer Substanzen nicht befriedigend. Erst mit 100 % Methanol oder Acetonitril/Wasser-Mischung (2:1) konnte eine gute Extraktionseffizienz

erreicht werden. Dadurch wurden aber wiederum mehr Fette mitextrahiert, die eine zusätzliche Reinigung erforderten.

Die Polarität des Methanols ermöglicht bessere Wiederfindungsraten für die polarsten Analyten. Die Extraktion der Rapsproben wurde daher für weitere Untersuchungen ohne Wasserzugabe durchgeführt.

Die Extraktion mit Methanol bzw. Acetonitril wurde für weitere fetthaltige Matrices untersucht, die über 70% Wasser beinhalten.

Bei der Extraktion mit Methanol/Wasser 2:1 wurden erwartungsgemäß für die weniger polaren Analyte niedrige Wiederfindungsraten erzielt (Abbildung 5.2.4). Eine Extraktion mit „reinem“ Methanol ist für diese Matrices nicht machbar, weil sie schon einen hohen Wassergehalt aufweisen.

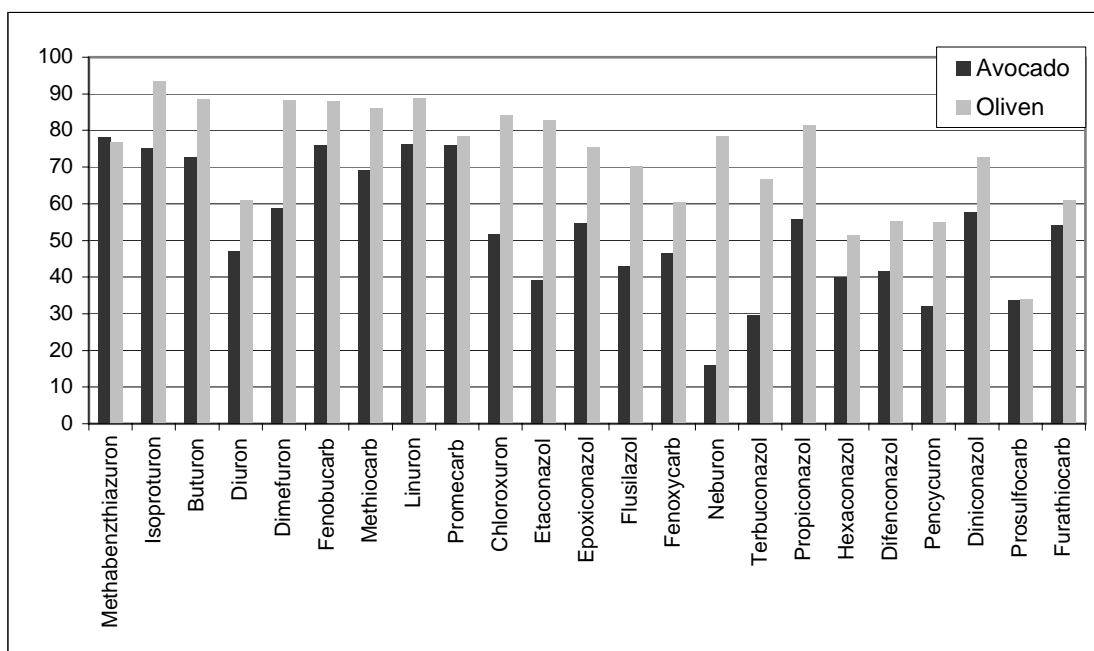


Abbildung 5.2.4: Wiederfindungsraten der weniger polaren Analyte aus Avocado und Oliven nach Extraktion mit Methanol/Wasser 2:1; Bestimmung mit LC/MS/MS im positiven Modus.

In der Abbildung 5.2.5 sind die nach Extraktion mit Acetonitril/Wasser 2:1 erzielten Wiederfindungsraten der Analyte für Avocado und Oliven dargestellt. Da Avocado im Vergleich zu Oliven einen größeren Fettgehalt aufweist, sind für diese Matrix die Wiederfindungsraten der weniger polaren Analyten merklich niedriger.

Die Ursache der stark erhöhten Wiederfindungsraten wurde in einer Aufkonzentrierung des Acetonitril/Wasser- Gemisches vermutet.

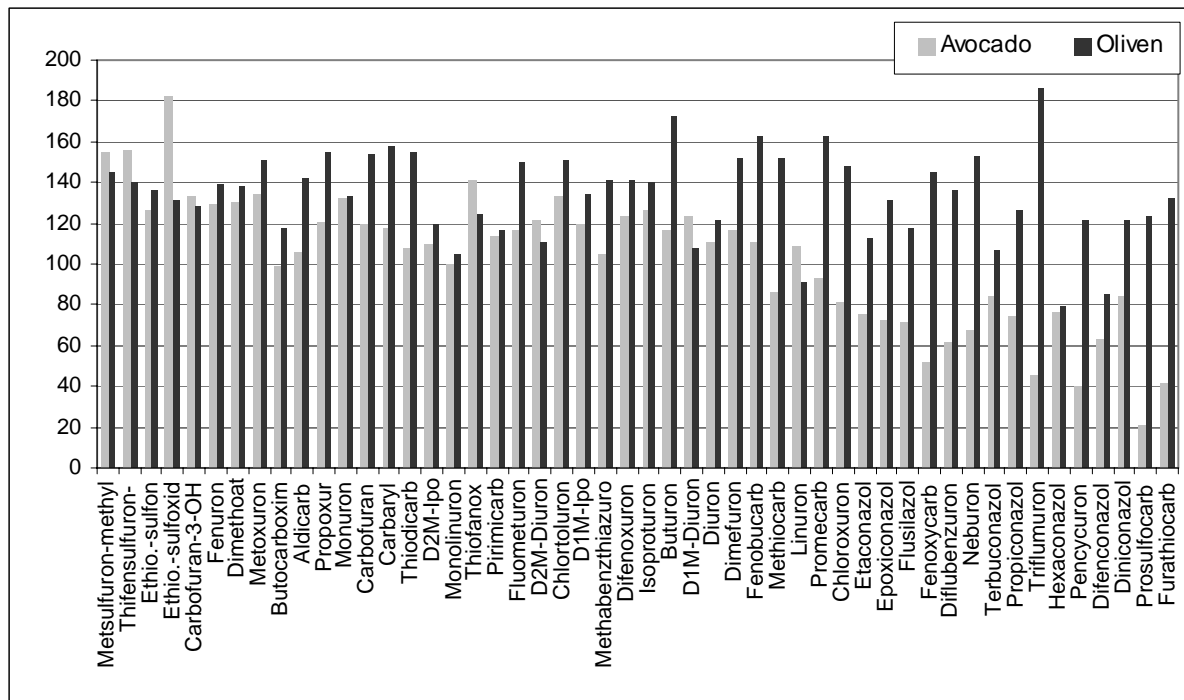


Abbildung 5.2.5: Wiederfindungsraten der Analyte aus Avocado und Oliven nach Extraktion mit Acetonitril/Wasser 2:1; Bestimmung mit LC/MS/MS im positiven Modus

Die Untersuchungen zeigten, dass nach der Extraktion nur 20 bis 22 ml Extrakt vorhanden waren. Wenn Acetonitril als Extraktionslösungsmittel eingesetzt wird, ist eine genaue Analytik wegen dieser Aufkonzentrierung des Extraktes nur mit internen Standards möglich. Die leichtere Verdampfbarkeit des Acetonitril im Vergleich zu Methanol und die Mischungslücke, die bei zucker- und salzreichen Matrices entsteht, erschweren die genaue Bestimmung des Extraktvolumens.

Eine Einstellung des pH-Wertes bei der Extraktion fettreicher Matrices mit Acetonitril zeigte keine eindeutige Verbesserung der Wiederfindungsraten, im Vergleich zur Extraktion mit Acetonitril/Wasser.

Im Gegensatz zu Oliven und Avocado, wurden bei der Extraktion von Rapsproben mit Acetonitril/Wasser für die weniger polaren Analyte keine Responseabnahme festgestellt (vgl. Abbildung 5.2.3). Weil der matrixeigene Wasseranteil die Methanol- Extraktion ohne Wasserzugabe erschwert, Acetonitril jedoch die Extraktion von weniger polaren Substanzen unterstützt, wurde weiter untersucht, ob diese Ansätze kombiniert werden können.

Avocado-Proben à 10 g wurden jeweils mit 1 µg pro Analyt gespickt, und ohne Wasserzugabe mit folgenden Lösungsmittelkombinationen extrahiert:

- 20 ml Methanol + 3 ml Acetonitril
- 11 ml Methanol + 12 ml Acetonitril

Das Volumen des organischen Lösungsmittels wurde so ausgewählt, dass zusammen mit dem Wassergehalt der Probe (7 ml) insgesamt 30 ml erreicht wurden. Die eingesetzten Acetonitrilvolumina entsprachen 10, bzw. 40% in 30 ml Endextrakt.

Nach dem Zentrifugieren wurden jeweils 3 ml Extrakt auf der HRP- Festphase gereinigt (siehe Abschnitt 5.3.2.5) und mittels LC/MS/MS vermessen.

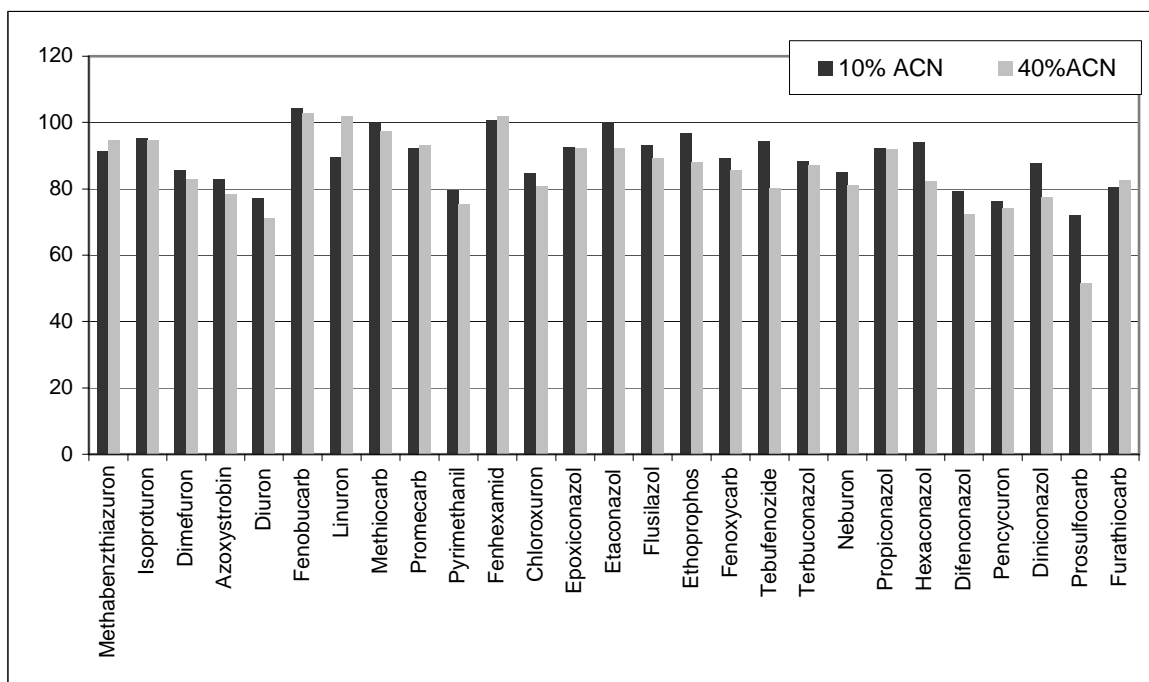


Abbildung 5.2.6: Wiederfindungsraten der weniger polaren Analyte (ab  $\log K_{ow} = 2.5$ ) für Avocadoextrakte mit verschiedenen Anteilen an Acetonitril in dem Extraktionslösungsmittel, Bestimmung mit LC/MS/MS im positiven Modus

Wie in der Abbildung 5.2.6 zu sehen, konnten für die weniger polaren Analyte schon mit der Zugabe von 10% Acetonitril gute Wiederfindungsraten erzielt werden. Für weitere Untersuchungen wurden die Avocado-Proben mit Methanol/Acetonitril 20:3 (v/v) extrahiert. Für die fettreichen Matrices konnte, wie oben dargestellt, kein einheitliches Extraktionsverfahren entwickelt werden. Um gute Wiederfindungsraten für unterschiedlich polare Substanzen zu erzielen, muss bei der Extraktion von fettreichen, trockenen Proben (Raps) reines Methanol, statt Methanol/Wasser 2:1 eingesetzt werden.



Die Extraktion von fett- und wasserhaltigen Proben (Avocado, Oliven) wird unter Berücksichtigung des Wassergehaltes mit Methanol und Acetonitril durchgeführt.

Alder und Klein [43] setzten ebenfalls Methanol/Wasser 2:1 für die Extraktion von Erntegütern ein. Die Untersuchungen von Avocado-Proben ergaben für weniger polare Analyte, wie Diflubenzuron, Fenoxycarb, Furathiocarb, Pyrimethanil, Teflubenzuron und Triflumuron Wiederfindungsraten unter 70% und Standardabweichungen über 25%.

### **5.2.5 Extraktion trockener Matrices**

Die Effizienz verschiedener Lösungsmittel wurde auch für die Extraktion weiterer trockener Matrices untersucht. Fraglich war, ob bei der Extraktion mit Methanol/Wasser 2:1 Verluste für die weniger polaren Analyte auftreten, wie es bei Raps festgestellt wurde, und welches Lösungsmittel bessere Wiederfindungsraten liefern kann.

Weizen und Reis enthalten sehr wenig Fett, und ihr Wassergehalt liegt unter 12% (vgl. Tabelle 5.2.1).

Für diesen Versuch wurden je 10 g Weizen mit 1 µg pro Analyt gespickt und mit Methanol/Wasser 2:1 bzw. Acetonitril/Wasser 2:1, nach dem oben vorgestellten Verfahren extrahiert. Jeweils 3 ml Extrakt wurde aufgereinigt (siehe Abschnitt 5.3.2.5 und 5.3.3) und die Proben mit LC/MS/MS vermessen.

Die Wiederfindungsraten der unpolaren Substanzen, z.B. Diniconazol, Prosulfocarb und Furathiocarb, lagen bei der Extraktion mit Acetonitril unter 70% (Abb. 5.2.7). Im Gegensatz dazu wurden bei der Extraktion mit Methanol für alle Analyten Wiederfindungsraten über 80% erzielt.

Die Extraktionen von Weizen und Reis konnten demzufolge mit Methanol/Wasser 2:1 durchgeführt werden.

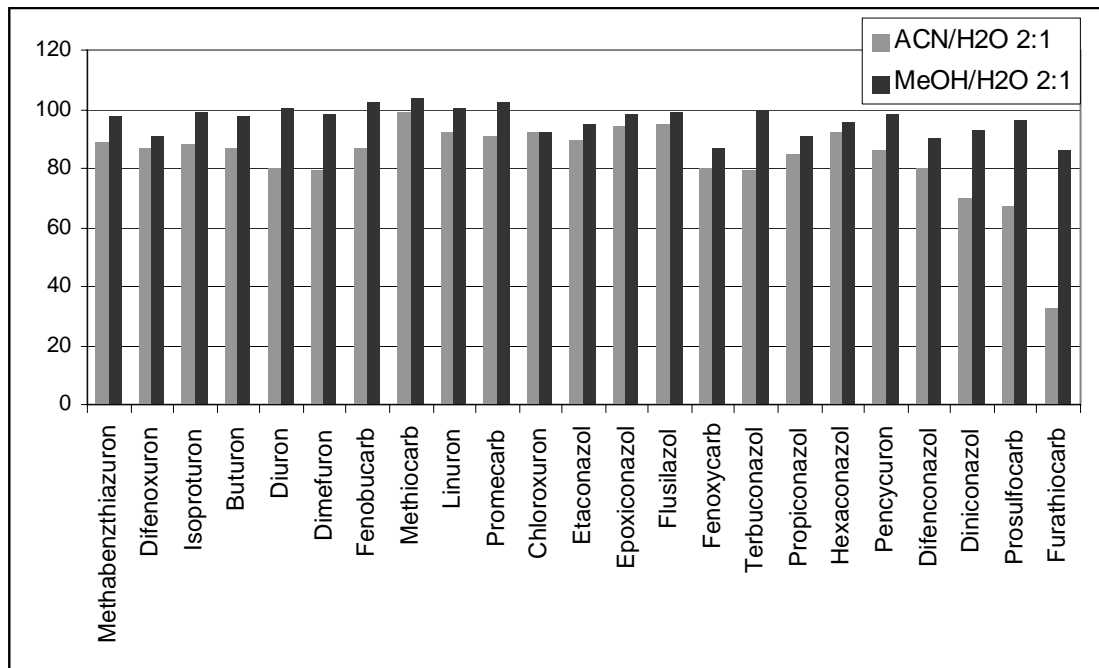


Abbildung 5.2.7: Wiederfindungsraten der weniger polaren Analyte (ab  $\log K_{ow} = 2.5$ ) für Weizenproben, nach Extraktion mit Acetonitril/Wasser 2:1 bzw. Methanol/Wasser 2:1

Die Untersuchungen von Alder und Klein [43] für die Extraktion von Weizenproben mit Methanol/Wasser ergaben für weniger polaren Analyten niedrige Wiederfindungsraten, z.B. Furathiocarb unter 50%. Wie auch die Experimente der vorliegenden Arbeit gezeigt haben, (siehe Kapitel 5.3) entstehen die häufigsten Verluste nicht während der Extraktion, sondern aufgrund von Wirkstoffzersetzungen bei der Aufreinigung der Extrakte.

### 5.3 Aufreinigung der Extrakte

Die Vorversuche und die verschmutzte „curtain plate“ (Abbildung 5.3.1) nach Messungen der Rohextrakte belegen, dass eine minimale Aufreinigung der Extrakte notwendig ist. Dies kann schon durch einfache Flüssig-Flüssig-Verteilungen oder Festphasenextraktion erfolgen. Ein Teil der Matrixinhaltsstoffe kann auch durch GPC- Reinigung, wie sie in der S19- Methode beschrieben ist, abgetrennt werden.



Abbildung 5.3.1 Verschmutzung der „curtain plate“ des API 2000 nach Injektion von ungereinigten Probenextrakten

Eine intensive Extraktreinigung kann auch eine wirksame Strategie zur Vermeidung des Matrixeffektes sein, indem die Störsubstanzen soweit abgetrennt werden, dass sie das Detektorsignal nicht mehr negativ beeinflussen können. Dies ist ein für ein Multikomponentenverfahren mit Substanzen unterschiedlicher physikalisch-chemischer Eigenschaften schwierig zu realisierender Anspruch. Sobald ein Teil der Matrix abgetrennt wird, besteht auch die Gefahr, dass ein Teil der zu untersuchenden Substanzen verloren geht.

Das Ziel unserer Untersuchungen war dementsprechend die Erzielung maximaler Wiederfindungsraten der Analyten nach Extraktreinigung, begleitet von einer möglichst weitgehenden Abtrennung der mitextrahierten Matrixinhaltsstoffe. Zu diesem Zweck wurden die GPC- und SPE- Techniken eingesetzt. Bei der Gelchromatographie beruht die Trennung auf einer Klassierung der Probenkomponenten nach Molekülgröße, was zu einer besonderen Aufreinigungseffizienz führt. Dagegen ist bei SPE die Polarität der entscheidende Faktor,

daher können mit dieser Technik polare und unpolare Matrixkomponente besonders gut abgetrennt werden.

### 5.3.1 Reinigung der Acetonextrakte

#### 5.3.1.1 GPC- Aufreinigung

##### Matrixabtrennung

Für die Abtrennung von großen Molekülen, vor allem Fette und Öle, wurde die GPC mit BioBeads SX3 und Cyclohexan/Ethylacetat (1:1) eingesetzt.

Die Elutionszeiten der Begleitstoffe wurden mithilfe eines Rapsextraktes ermittelt.

Als Probe wurden 2 ml Acetonextrakt (siehe Kapitel 5.2.3), Matrixkonzentration 1 g/ml, mit 2 ml Ethylacetat/Cyclohexan 1:1 verdünnt und auf die Trennsäule gegeben. Die Vorversuche ergaben, dass die Elution der untersuchten Analyten zwischen 90 und 180 ml erfolgt.

Dementsprechend wurden bei der Elution des Rapsextraktes zwischen 80 und 116 ml Fraktionen à 4 ml aufgefangen, danach noch eine Fraktion von 74 ml. Diese Eluate wurden bis zur Trockene eingengt und abgewogen.

Die Chromatographie des Rapsextraktes ergab folgende Elution der nichtflüchtigen Matrixbegleitstoffe. Wie in der Abbildung 5.3.2 zu sehen, wird der größte Teil der Matrixkomponenten, über 95%, schon mit den ersten 80 ml Lösungsmittel eluiert.

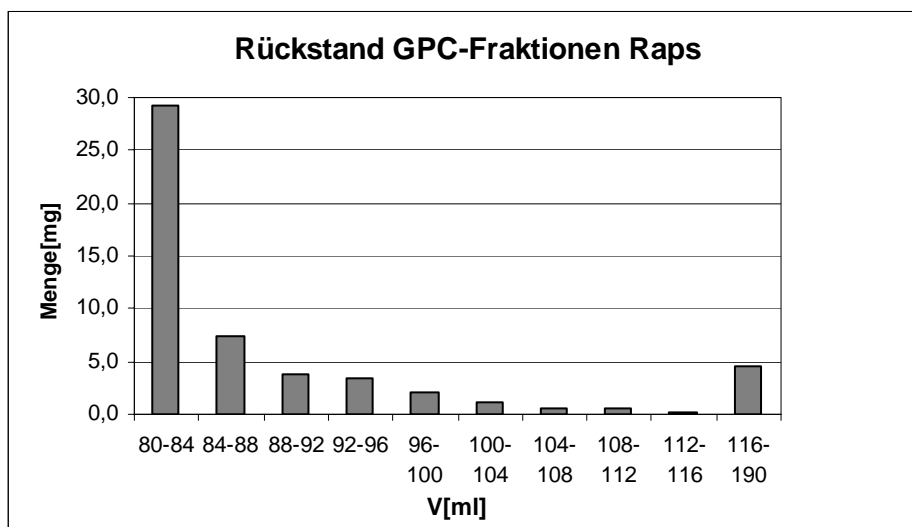


Abbildung 5.3.2: Elution von mitextrahierten Begleitstoffe eines Rapsextraktes

### GPC - Elutionszeiten der Analyten

Um die Elutionszeiten der Analyten zu bestimmen wurden 4 ml Ethylacetat / Cyclohexan mit 100 ng pro Analyt gespikt und auf der Polymersäule getrennt. Fraktionen mit verschiedenen Volumina wurden bis zu 1 Stunde Laufzeit, insgesamt 300 ml, aufgefangen, und zwar: eine erste Fraktion von 86 ml, dann von 86 ml bis 130 ml Fraktionen à 4 ml, von 130 ml bis 190 ml Fraktionen à 10 ml, und schließlich 60 ml und 50 ml. Diese Fraktionen wurden mit dem Rotationsverdampfer bis zu etwa 1 ml eingengt, dann unter Stickstoffstrom bis zur Trockene aufkonzentriert, in 1 ml Methanol / 10 mM NH<sub>4</sub>Ac 1:1 aufgenommen und mittels LC/MS/MS bestimmt.

Die Ergebnisse sind in der Abbildung 5.3.3 vorgestellt.

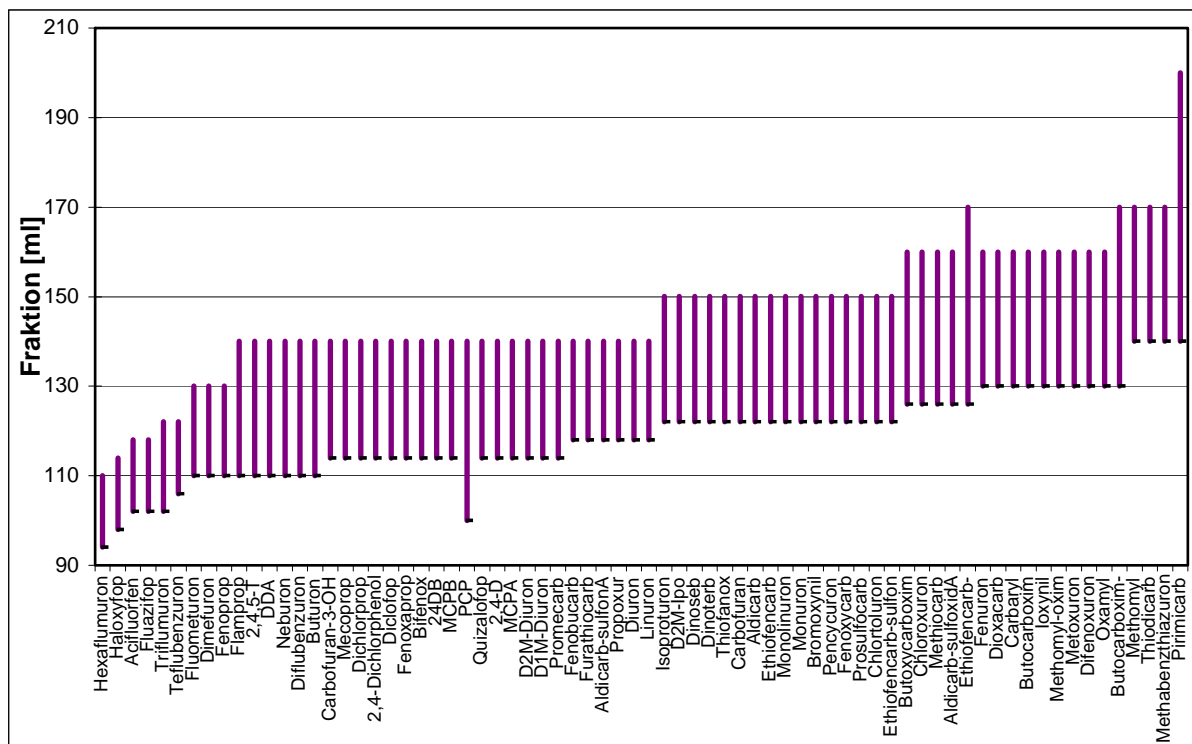


Abbildung 5.3.3: GPC- Fraktionierung der Analyten

Die fluorhaltigen Analyten haben sehr kurze Elutionszeiten, deswegen ist eine GPC-Abtrennung dieser Substanzen von den Fetten und Ölen in der Probe nicht vollständig möglich.

Carbendazim und Propamocarb wurden nach der GPC- Aufreinigung nicht wiedergefunden, diese Substanzen adsorbieren möglicherweise irreversibel auf der Polymeroberfläche.

Weil auch Pirimicarb sehr langsam eluiert wurde, sollte das Eluat zwischen 90 und 200 ml aufgefangen und weiter verarbeitet werden.

Es hat sich aber herausgestellt, dass beim Einengen der GPC- Eluate insbesondere für die oxidationsempfindlichen Analyten starke Verluste auftreten. Beim Aufkonzentrieren einer Probe aus Aceton/Ethylacetat/Cyclohexan konnte die Metabolisierung von Ethiofencarb, Aldicarb und Butocarboxim auch unter Stickstoffzufuhr nicht verhindert werden. Versuche mit Tocopherol und Ascorbinsäure als Stabilisatoren waren nicht erfolgreich.

### *5.3.1.2 Erprobung verschiedener Festphasen für die Extraktreinigung*

#### *Gruppenselektive Trennung*

Eine Möglichkeit der Extraktreinigung mit Hilfe der Festphasenextraktion ist die gruppenselektive Fraktionierung der Extrakte. So können etwa die sauren Substanzen von den neutralen Substanzen und von dem größten Teil der Begleitstoffe abgetrennt werden, so dass diese Substanzen ohne Beeinflussung durch den Matrixeffekt analysiert werden können.

Es wurden daher verschiedene Festphasen hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Extraktreinigung, zur gruppenselektiven Trennung von sauren und neutralen Substanzen, vor allem aber hinsichtlich der Wiederfindungsraten der Analyten untersucht.

Zu diesem Zweck sind in den Vorversuchen verschiedene Verfahren, mit getrennten Standardmischungen für Carbamate und saure Wirkstoffe (vgl. Tab. 5.1.4) und HPLC-DAD-Bestimmung, entwickelt worden

Für die gruppenselektive Trennung von Säuren und Carbamaten wurden drei Festphasen, Kieselgel, EnviCarb und Oasis MAX mit folgenden Verfahren miteinander verglichen:

Kieselgel (mit 1,5% H<sub>2</sub>O deaktiviert) 1 g

Das Sorbens in einer 6 mL Kartusche wurde mit 10 ml n-Hexan konditioniert. 1 ml Extrakt oder 5 µg Standardmischung in 1 ml Hexan wurden auf das Sorbens aufgetragen. Die Carbamate wurden mit 10 ml Aceton eluiert, die Säuren mit 10 ml MeOH.

Graphitisierter Kohlenstoff EnviCarb 250 mg

Die Konditionierung des Sorbens erfolgte mit 2.5 ml HCl 1%, 2.5 ml Methanol und 5 ml Ethylacetat/ Cyclohexan 1:1. Der Extrakt oder 5 µg Standardmischung in 5 ml Ethylacetat/ Cyclohexan 1:1 wurde aufgetragen und die Kartusche mit 2.5 ml Ethylacetat/Cyclohexan 1:1 gespült. Die Carbamate wurden mit 6 ml Dichlormethan/Methanol 4:1 eluiert, die Säuren mit 0.2% Trifluoressigsäure in Dichlormethan/Methanol 4:1.

## Anionenaustauscher Oasis MAX 150 mg

Die Festphase wurde mit 5 ml 0.1% Essigsäure, 5 ml Aceton und 5 ml Ethylacetat/Cyclohexan 1:1 konditioniert. Der Extrakt oder 5 µg Standardmischung in 5 ml Ethylacetat/Cyclohexan 1:1 wurde aufgetragen und aufgefangen. Es wurde mit 5 ml Ethylacetat/Cyclohexan 1:1 und 3 ml Aceton mit 2% NH<sub>4</sub>OH- Lösung pH=7 eluiert. Die Elution der Säuren erfolgte mit 6 ml 2% Ameisensäure in Aceton.

Alle Eluate wurden bei 30°C unter Stickstoff aufkonzentriert, in 500 µl MeOH aufgenommen und mittels HPLC-DAD gemessen.

Tabelle 5.3.1: Wiederfindung der Carbamate und Säuren nach Anreicherung und gruppenselektiver Elution auf verschiedenen Festphasen

	Kieselgel	ENVICarb	MAX		Kieselgel	ENVICarb	MAX
Oxamyl	101	100	100	Picloram	101	64	98
Methomyl	100	98	99	Metsulfuron	35	93	96
Carbendazim	24	83	93	Dicamba	96	84	95
Butocarboxim	96	97	94	2,4-D	94	77	96
Aldicarb	97	93	92	Flamprop	91	82	97
Thiodicarb	81	40	95	Dichlorprop	94	81	96
Propoxur	101	83	95	2,4,5-T	94	76	97
Pirimicarb	102	76	98	2,4-DB	91	78	96
Carbaryl	103	82	93	Fenoprop	94	82	97
Ethiofencarb	80	71	91	Bifenox	89	80	97
Methiocarb	104	96	96	Haloxypop	91	82	96
Promecarb	101	95	95	DDA	90	87	96
Fenoxycarb	103	99	97	Diclofop	91	76	98
Benfuracarb	103	96	99	Dinoseb	91	86	88
Carbosulfan	100	99	99	PCP	92	90	90

*Extraktenreinigung*

Zur Abschätzung der Extraktreinheit wurden die Matrices Apfel, Tomate, Raps und Weizen nach der Aceton/Wasser-Methode extrahiert. Nach Phasentrennung mit Ethylacetat / Cyclohexan und GPC- Aufreinigung wurden die Extraktproben mit der jeweiligen Festphase gereinigt. Die Extraktreinheit wurde anhand von UV- Chromatogrammen miteinander verglichen und beispielhaft an einem Rapsextrakt in Abbildung 5.3.4 dargestellt.

Die gruppenselektive Trennung der Analyten gelang sehr gut auf Kieselgel und auch die Wiederfindungsraten waren bis auf wenige Ausnahmen über 90%. Durch das relativ polare Elutionsmittel Aceton konnte aber kein nennenswerter Reinigungseffekt für die Carbamat-Fraktion erreicht werden, wohl aber für die Fraktion der sauren Substanzen.

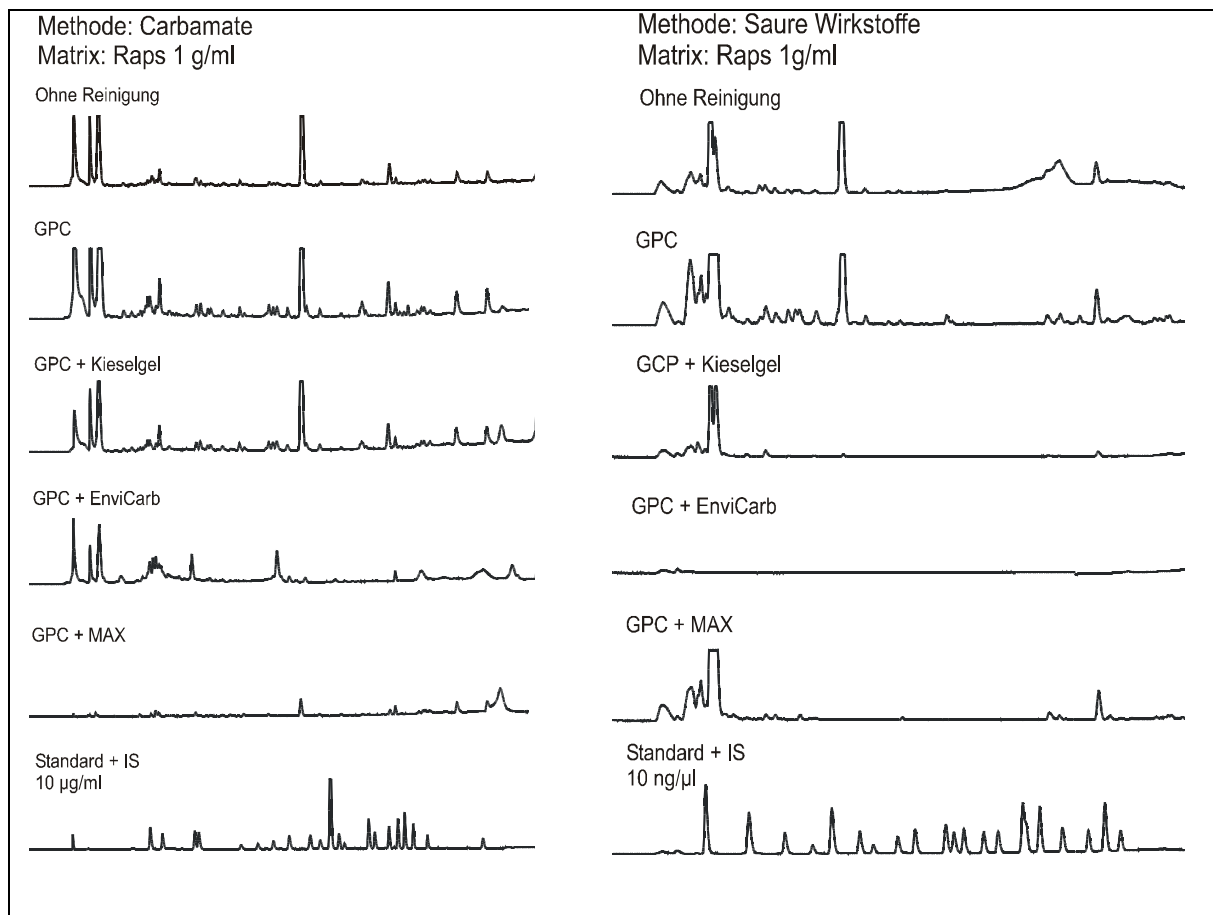


Abbildung 5.3.4: UV- Chromatogramme von Rapsextrakten nach verschiedenen Reinigungsverfahren und Fraktionierung (Kieselgel, EnviCarb, Oasis MAX)

Der graphitisierte Kohlenstoff ist bekannt für seine guten Eigenschaften zur Trennung von neutralen und sauren Substanzen unter RP- Bedingungen. Wurde das Material dagegen als Normalphase verwendet, mit Aufgabe des unpolaren Ethylacetat/Cyclohexan- Extraktes, konnte keine gruppenselektive Trennung mehr erreicht werden. Zudem kam es zu deutlich verringerten Wiederfindungsraten einiger Carbamate und Säuren. Die guten Sorptionseigenschaften werden durch Oxidationsprodukte in der Kohlenstoffmatrix unterstützt, deren genaue Zusammensetzung aber unbekannt ist [157]. Diese unbekanntes Sorptionsstellen könnten für die irreversible Adsorption und Oxidation verantwortlich sein.

Eine sehr gute gruppenselektive Trennung der Carbamaten und Säuren wurde mit Oasis MAX durch die quartären Amine erzielt. Auch die Wiederfindungsraten lagen mit Ausnahme des Dinoseb über 90%. Ein Großteil der im UV- Chromatogramm sichtbaren Verunreinigungen konnten sowohl in der Carbamat- Fraktion, als auch in dem für die Analyten relevanten Bereich der Säure-Fraktion entfernt werden.



Wegen seiner guten Eigenschaften wurde dieses auf einem Styrol-N-Divinylypyrrolidon-Copolymer basierende Festphasenmaterial nun für die weiteren Untersuchungen der modifizierten S19 Methode eingesetzt.

### 5.3.1.3 Matrixeinfluss

Es wurde mit den erarbeiteten LC/MS/MS- Methoden geprüft, ob auch unter Matrixeinfluss ebenso gute Trenneigenschaften und Wiederfindungsraten für alle Analyten zu erreichen sind und ob durch diese Aufreinigung Matrixeffekte verhindert bzw. verringert werden können. Die Wiederfindungsraten nach Aceton- Extraktion, GPC- und MAX- Aufreinigung wurden mit verschiedenen Matrices (Raps, Weißkohl, Tomate, Zitrone, Hopfen) untersucht und miteinander verglichen.

Für diesen Versuch wurden die Acetonextrakte jeweils vor der Extraktion, vor GPC und vor der MAX- Phase mit je 100 ng pro Analyt gespikt. Um die Wiederfindungen zu berechnen, wurde ein vierter Extrakt nach der Aufreinigung auf der MAX- Phase mit derselben Pestizidmenge gespikt und als Matrixstandard eingesetzt. Die erzielten Ergebnisse sind beispielweise für Weißkohl in der Abbildungen 5.3.5 und 5.3.6 dargestellt.

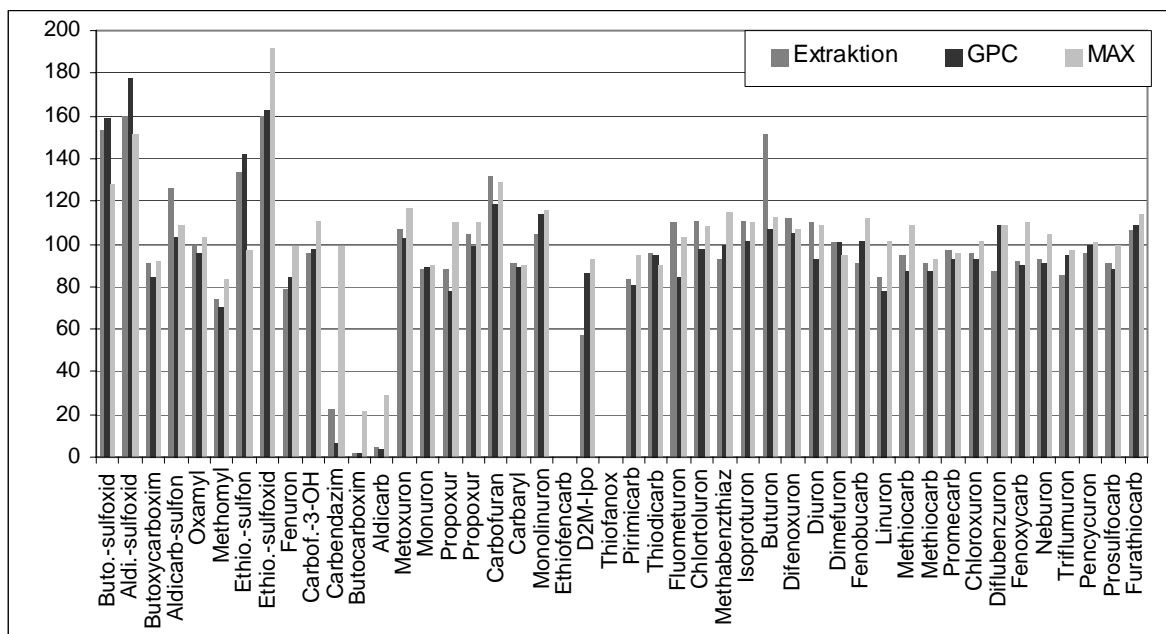


Abbildung 5.3.5: Wiederfindungsraten für Weißkohlextrakte, positiven Ionisierungsmodus

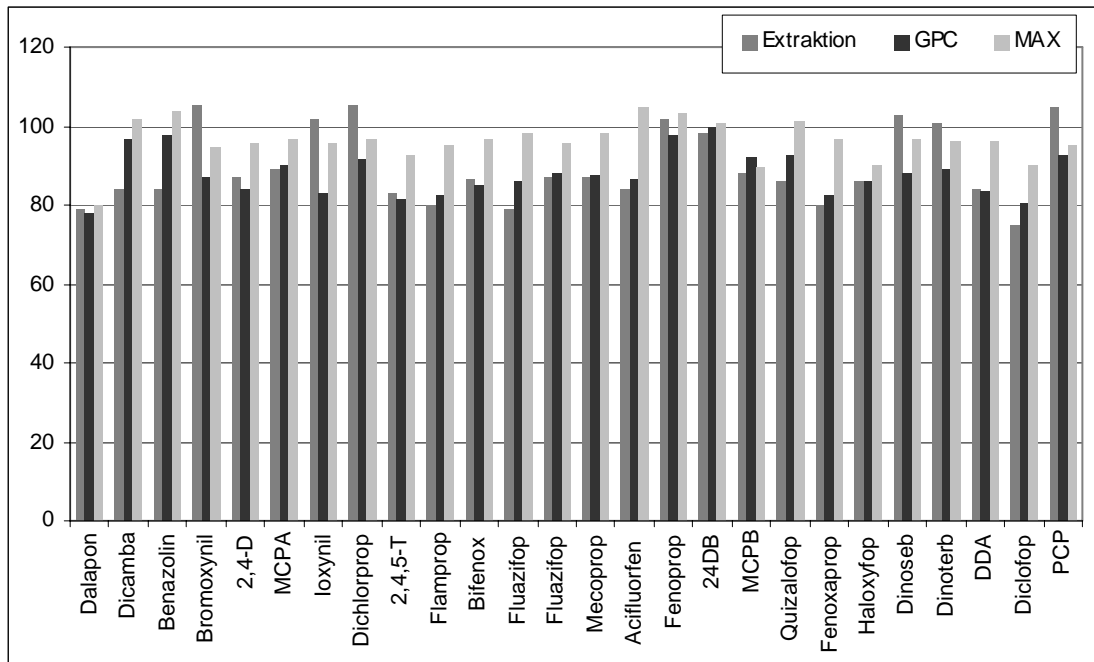


Abbildung 5.3.6: Wiederfindungsraten für Weißkohlextrakte, negativer Ionisierungsmodus

Die ESI+ Messungen (erste MAX- Fraktion) der Weißkohlextrakte zeigten gute Wiederfindungsraten, wenn auch starke Metabolisierungen einiger Substanzen.

Aldicarb, Butocarboxim, Ethiofencarb und Thiofanox sind oxidationsanfällig. In der RHMV [3] sind die Grenzwerte dieser Analyten als Summe von Ausgangsubstanz und Metabolite angegeben. Deswegen wurden die durchschnittlichen Wiederfindungsraten berechnet (Tabelle 5.3.2). Für die Aldicarb-, Butocarboxim- und Ethiofencarb- Gruppen lagen diese Werte über 80%. Die Oxidationsprodukte von Thiofanox wurden in dieser Arbeit nicht untersucht.

Bei den Messungen im negativen Ionisierungsmodus wurden für die sauren Wirkstoffe sehr gute Ergebnisse erzielt.

Die neutral-basische Fraktion des Zitronenextraktes zeigte gute Wiederfindungsraten, wenn auch wieder eine starke Metabolisierung. In der sauren Fraktion dagegen war quantitativ sehr wenig wiederzufinden (Abbildung 5.3.7).

Tabelle 5.3.2: Wiederfindungsraten der Carbamate und ihrer Metabolite, Weißkohlextrakte

	WFR Extraktion	WFR GPC	WFR MAX
Butocarboxim-sulfoxid	153	159	128
Butoxycarboxim	91	84	92
Butocarboxim	2	2	21
berechnete WFR	82	82	80
Aldicarb-sulfoxid	159	177	152
Aldicarb-sulfon	125	103	109
Aldicarb	5	4	29
berechnete WFR	97	95	97
Ethiofencarb-sulfon	133	142	96
Ethiofencarb-sulfoxid	160	162	192
Ethiofencarb	0	0	0
berechnete WFR	98	101	96

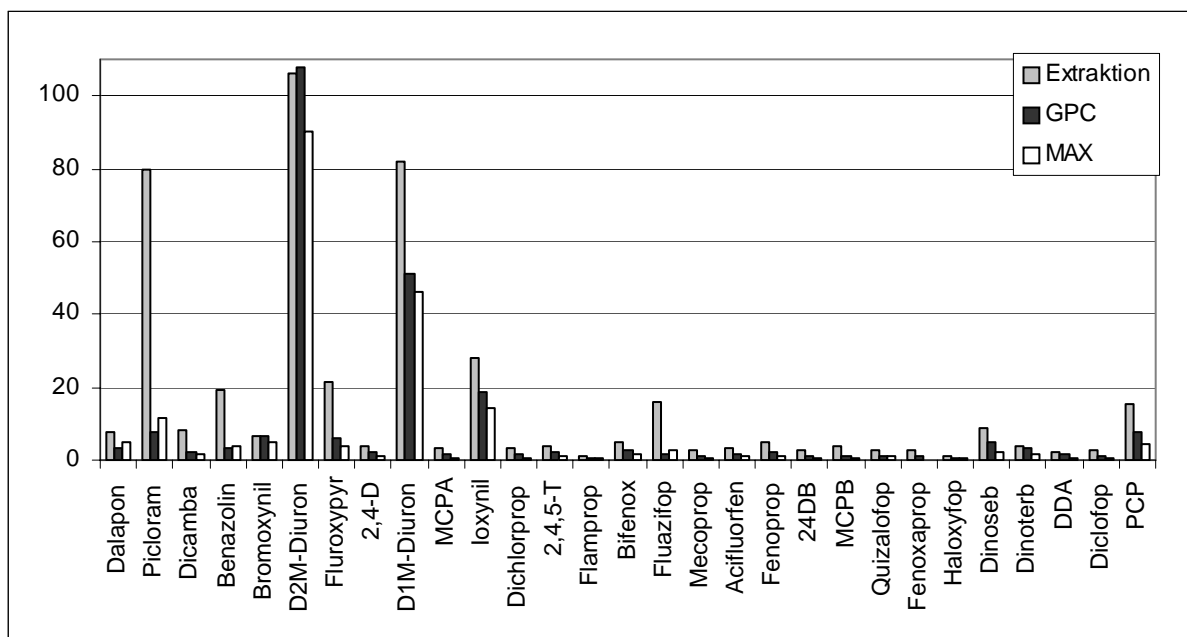


Abbildung 5.3.7: Wiederfindungsraten für Zitronenextrakte, negativer Ionisierungsmodus

Es wurde angenommen, dass die in der Matrix enthaltenen Säuren die basischen Adsorptionsstellen der MAX- Festphase belegen, was zu einer verringerten Retention der sauren Analyte führt. Um das zu untersuchen, wurde die erste MAX-Fraktion im negativen Modus vermessen. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 5.3.8 dargestellt und bestätigen, dass die gruppenselektive Trennung der Analyten auf der MAX- Festphase für saure Matrices nicht angewandt werden kann.

Obwohl die Acetonextraktion den Vorteil der Fettabtrennung mit GPC ohne Lösungsmittel-austausch hat, ist die entwickelte Methode für dieses Vorhaben nicht viel versprechend. Die Aufreinigung auf der MAX- Phase wird von mitextrahierten Stoffe, wie matrixeigenen Säuren

(Tomate, Zitrone) negativ beeinflusst. Die Methode ist darüber hinaus zeitaufwendig und benötigt eine Phasentrennung, was eine zusätzliche Fehlerquelle darstellt.

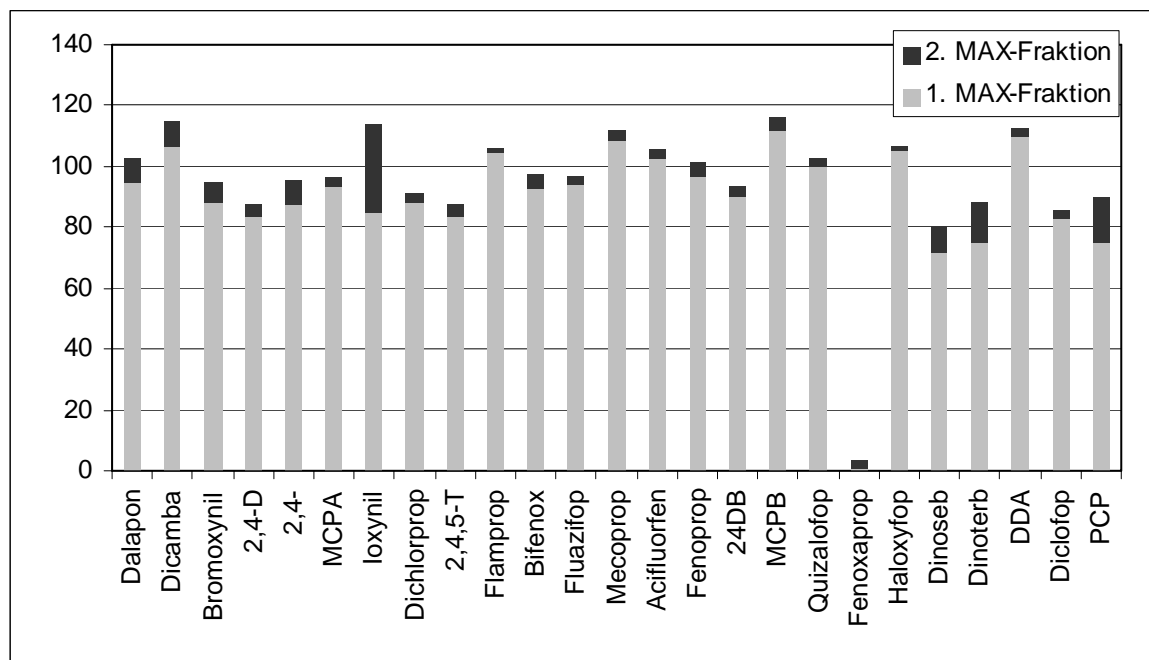


Abbildung 5.3.8: Verteilung der im negativen Ionisierungsmodus gemessenen Analyten in den zwei MAX- Fraktionen bei der Aufreinigung von Zitronenextrakten

### 5.3.2 Reinigung der Methanolextrakte

Alternativ zur intensiven Aufreinigung nach der S19 Methode sind einfachere Prozeduren zur Reinigung der Extrakte möglich. Die durch Methanol- Extraktion gewonnenen Extrakte sind relativ polar, daher bieten sich eine Flüssig-Flüssig-Extraktion mit einem unpolaren Lösungsmittel oder eine Festphasenextraktion mit einem unpolarem Sorbens an. Die Flüssig-Flüssig-Extraktion kann auf Diatomeenerde (Hydromatrix) durchgeführt werden [4, 43]. Durch Verdünnen der Extrakte mit Wasser besteht bei der Festphasenextraktion die Möglichkeit, Extraktaliquote nicht aufkonzentrieren zu müssen und entsprechende Analytenverluste zu vermeiden. Zu diesem Zweck bieten sich verschiedene Sorbentien an: Oasis HLB, EnviCarb, Chromabond HRP.

#### 5.3.2.1 ChemElut (Hydromatrix)

Wegen seiner Fähigkeit, Wasser aufzunehmen, wird Hydromatrix für die LLE polarer Lösungsmittlextrakte eingesetzt. Das Hydromatrix- Material adsorbiert das Wasser aus der Probe und verhält sich wie die wässrige Phase einer konventionellen Flüssig-Flüssig-

Extraktion [158]. Nach dem Auftragen des Extraktes ist für die Aufnahme des Wassers eine Equilibrierungszeit nötig. Danach werden die Analyten üblicherweise mit Dichlormethan eluiert. Die eingesetzten ChemElut- Festphasen hatten eine Kapazität von 5 ml, das heißt, bis zu 5 ml Wasser können theoretisch auf der Phase bleiben. Die Methanolextrakte enthielten verfahrensgemäß ein Drittel Wasser und es galt, das Wasser ohne Analytenverluste zu entfernen. Zu diesem Zweck wurde unter Beachtung der Kapazität gesättigte Kochsalzlösung zum Extrakt gegeben, um die Überführung der Analyten in die organische Phase zu unterstützen. Nach der Equilibrierung wurden die Analyten mit Dichlormethan eluiert.

*ChemElut- Verfahren, modifiziert nach Klein und Alder [43]:*

In dieser Arbeit wurde dieses Verfahren geändert, um eine Endkonzentration von 1 g Matrix in 1 ml Solvent zu erreichen.

Der Wassergehalt von 10 g Probe wurde auf 10 ml gebracht, dann wurde die Probe mit 20 ml Methanol 2 Minuten im Ultra Turrax homogenisiert und zentrifugiert. 5 ml Extrakt wurde mit 3,3 ml gesättigte Kochsalzlösung (20%) verdünnt und 5 ml davon auf die ChemElut- Phase gegeben. Nach 5 Minuten Equilibrierungszeit wurden die Analyten mit 20 ml Dichlormethan eluiert. Das Eluat wurde bei 30°C bis zur Trockene aufkonzentriert, in 500 µl Methanol aufgenommen, im Ultraschallbad aufgelöst und mit 500 µl NH<sub>4</sub>Ac auf 1 mL aufgefüllt. Der Endextrakt wurde schließlich durch einen PTFE- Filter (0,2 µm) filtriert und mittels LC/MS/MS vermessen.

*Wiederfindungsraten der Analyten nach ChemElut*

Die ChemElut- Festphase wurde zuerst ohne Matrix eingesetzt, um ihre Eignung für die untersuchten Analyte zu testen. Als Probe wurden ein Standardgemisch mit 100 ng pro Analyt in 5 ml Methanol/Wasser 2:1 nach dem oben vorgestellten Verfahren verarbeitet. Es wurden gute Wiederfindungsraten erzielt, mit Ausnahme von Ethiofencarb und Dicamba (Tabelle 5.3.3). Obwohl dieses Verfahren eine schonende Aufreinigungsmöglichkeit darstellt, traten für Ethiofencarb Verluste durch Oxidation auf.

Dicamba ist eine der polarsten sauren Substanzen ( $\log K_{ow} = 2.21$ ,  $pK_a = 1.97$ ) und wurde mit Dichlormethan nicht vollständig eluiert.

*Wiederfindungsraten der sauren Wirkstoffe nach ChemElut*

Bei der Untersuchung von Matrixextrakten traten erwartungsgemäß, neben guten Ergebnisse bei der ESI+ Messung, weitere Verluste für die polarsten sauren Substanzen auf.

In der Abbildung 5.3.9 sind die Wiederfindungsraten der im ESI- Modus gemessenen Analyten für einen Erdbeerextrakt dargestellt. Hierfür wurde die Probe mit 100 ng pro Analyt versetzt und nach der oben vorgestellten Methode verarbeitet. Für die Berechnung der Wiederfindungsraten wurde ein zweiter Extrakt vorbereitet und mit derselben Analytenmenge gespikt. Diese Ergebnisse zeigen, dass die polarsten sauren Wirkstoffe (Dalapon und Dicamba) bei dem ChemElut- Verfahren nicht miterfasst werden können.

Tabelle 5.3.3 Wiederfindungen der Analyten nach der Anreicherung auf der ChemElut- Festphase, Bestimmung mit HPLC-DAD (siehe Abschnitt 5.1.4.1)

	WFR %		WFR %
Methomyl	98	Dicamba	<b>69</b>
Carbendazim	88	2,4-D	96
Butocarboxim	106	Flamprop	97
Aldicarb	91	Dichlorprop	96
Thiodicarb	84	2,4,5-T	98
Propoxur	104	2,4-DB	97
Pirimicarb	101	Bifenox	102
Carbaryl	104	Haloxypop	100
Ethiofencarb	<b>75</b>	DDA	98
Methiocarb	103	Diclofop	99
Promecarb	103	Dinoseb	101
Fenoxycarb	105	PCP	102

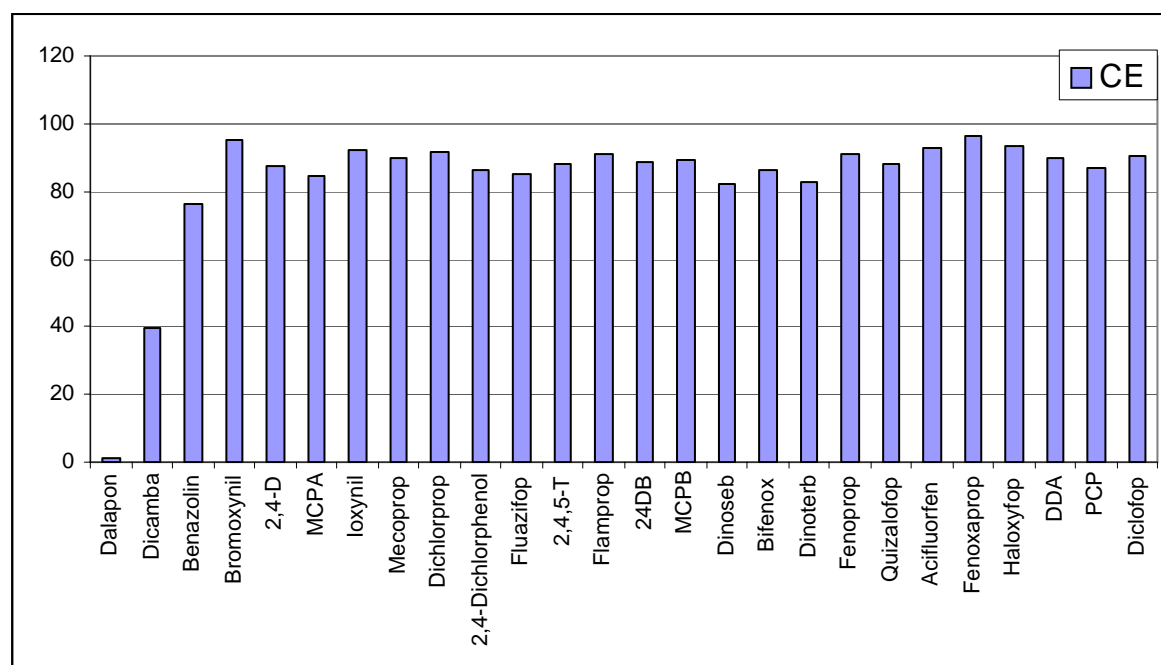


Abbildung 5.3.9: Wiederfindungsraten der sauren Analyten aus einem Erdbeerextrakt nach Extraktion mit Methanol/Wasser 2:1 und Aufreinigung mit ChemElut, Bestimmung mit LC/MS/MS

### 5.3.2.2 Oasis HLB

Ziel dieser Untersuchungen war, polare und unpolare Substanzen gemeinsam und mit guten Wiederfindungsraten aus den mit Wasser verdünnten Methanolextrakten anzureichern. In den Vorversuchen wurde die Oasis HLB 200 mg getestet, die nach Herstellerangaben (Fa. Waters) gute Adsorptionseigenschaften bietet, und für die Anreicherung polarer und unpolarer Substanzen aus Wasserproben eingesetzt wird [76].

Die Anreicherungs-effizienz dieses Sorbens, die auf hydrophoben Wechselwirkungen basiert, wurde mit Wasserproben und zwei übereinander stehenden Kartuschen untersucht. Die Kartuschen wurden mit 5 ml Methanol konditioniert und mit 5 ml pH=2 Lösung (0.1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) für Säure und pH=6 Puffer (Phosphatpuffer) für Carbamate equilibriert. 5 µg pro Analyt wurden zu jeweils 100 ml Wasser mit entsprechend eingestelltem pH- Wert zugesetzt, unter Vakuum angereichert und mit 5 ml Methanol und 5 ml Methanol/Aceton 8:2 eluiert. Um etwaigen Verlusten beim Einengen vorzubeugen, wurde das Eluat bis etwa 200 µl im Stickstoffstrom bei 30°C aufkonzentriert und mit Methanol auf 500 µl aufgefüllt.

Wie die Ergebnisse in Tabelle 5.3.4 zeigen, eignet sich diese Festphase gut für die Anreicherung polarer Analyten aus Wasserproben. Für Carbendazim, Dinoseb und Pentachlorphenol reichte aber die Elutionskraft von Methanol und Aceton nicht aus, um sie quantitativ zu eluieren.

Tabelle 5.3.4 Wiederfindungsraten der Analyte nach Anreicherung von Wasserproben auf HLB, Bestimmung mit HPLC-DAD

	Kartusche 1	Kartusche 2		Kartusche 1	Kartusche 2
Oxamyl	106	0	Picloram	107	0
Methomyl	103	0	Dicamba	104	0
Carbendazim	54	1	2,4-D	103	0
Butocarboxim	92	6	Flamprop	101	0
Aldicarb	94	0	Dichlorprop	103	0
Thiodicarb	91	0	2,4,5-T	102	0
Propoxur	89	0	2,4-DB	101	0
Pirimicarb	91	0	Bifenox	96	0
Carbaryl	94	0	Haloxypop	96	0
Ethiofencarb	87	0	DDA	93	0
Methiocarb	96	0	Diclofop	91	2
Promecarb	97	0	Dinoseb	76	0
Fenoxycarb	93	1	PCP	72	1

Untersuchungen zur Anreicherung methanolhaltiger Wasserproben waren nicht erfolgreich.

Die Retention der Analyten wurde dabei schon von geringen Mengen an organischem

Lösungsmittel negativ beeinflusst. Aus diesen Gründen wurde die HLB- Festphase in dieser Arbeit nicht weiter eingesetzt.

### 5.3.2.3 EnviCarb

Für die Bestimmung von Carbamaten in Obst und Gemüse wurde von Di Corcia ein Anreicherungsverfahren entwickelt, das auf Verdünnung eines Methanolextraktes mit Wasser und SPE- Aufreinigung auf graphitisiertem Kohlenstoff basiert [40].

Die Effizienz von graphitisiertem Kohlenstoff wurde in den Vorversuchen mit der EnviCarb- Festphase nach dieser Methode getestet.

Das Sorbens wurde mit 3 ml Methanol und 3 ml Wasser konditioniert. Eine mit 5 µg pro Analyt gespikete Probe aus 5% Methanol in 250 ml Wasser wurde auf EnviCarb unter Vakuum angereichert. Die Kartusche wurde mit 7 ml Wasser gewaschen und mit Luft, unter Vakuum, getrocknet. Die Elution erfolgte mit 1 ml Methanol und 6 ml Dichlormethan/ Methanol 4:1. Das Eluat wurde mit Stickstoff bei 30°C komplett aufkonzentriert und mittels HPLC-DAD vermessen. Die Wiederfindungsraten sind in der Tabelle 5.3.5 aufgeführt.

Tabelle 5.3.5: Wiederfindung der Analyten aus methanolhaltige Wasserproben nach Anreicherung auf EnviCarb, Bestimmung mit HPLC-DAD (siehe Abschnitt 5.1.4.1)

Analyt	WFR	Analyt	WFR
Oxamyl	72	Picloram	88
Methomyl	87	Metsulfuron	45
Carbendazim	77	Dicamba	83
Butocarboxim	45	2,4-D	83
Aldicarb	42	Flamprop	45
Thiodicarb	90	Dichlorprop	84
Propoxur	67	2,4,5-T	83
Pirimicarb	85	2,4-DB	46
Carbaryl	72	Fenoprop	86
Ethiofencarb	52	Bifenox	89
Methiocarb	56	Haloxypop	63
Promecarb	75	DDA	51
Fenoxycarb	87	Diclofop	83
Benfuracarb	77	Dinoseb	74
Carbosulfan	34	PCP	56

Es zeigte sich, dass auch weniger empfindliche Substanzen, wie Propoxur oder Pentachlorphenol, mit diesem Verfahren von der EnviCarb- Phase nicht zufriedenstellend eluiert werden können.

Damit haben sich graphitisierte Kohlenstoffe für dieses Vorhaben als ungeeignet erwiesen. Es wurde weiter versucht, diesen Ansatz mit einer PS-DVB- Festphase zu kombinieren.



Hierzu muss angemerkt werden, dass Luft die Zersetzung von Carbamaten und ihren Metaboliten begünstigt, wie von Santos Delgado et al. auch festgestellt wurde [89]. In dieser Arbeit wurden die Sorbentien unter Vakuum, 15 Minuten lang mit Stickstoff getrocknet.

#### 5.3.2.4 Chromabond-HRP

Wie bei der HLB- Festphase werden auch auf der HRP- Festphase hydrophobe,  $\pi$ - $\pi$ - und Dipol-induzierter Dipol-Wechselwirkungen zur Extraktion der Analyten aus dem polaren Lösungsmittel ausgenutzt. Das Festphasenmaterial ist chemisch reiner als der graphitisierte Kohlenstoff und sollte dementsprechend geringere Sekundärwechselwirkungen aufweisen, was zu besseren Wiederfindungsraten führen sollte. Wie EnviCarb bietet diese Festphase auch die Möglichkeit, die angereicherten sehr polaren Matrixbestandteile durch einen Spülschritt aus dem Extrakt zu entfernen.

Für eine vollständige Wiederfindung mussten Anreicherung und Elution, besonders für die polaren Analyten, optimiert werden.

Um einen vorzeitigen Durchbruch der polarsten Analyten zu verhindern, wurde an erster Stelle der Anteil an organischem Lösungsmittel in der Probe optimiert.

Es wurde auch untersucht, ob die Anreicherung durch eine Einstellung des pH-Wertes unterstützt werden kann. Die Experimente von Crescenzi et al. [157] ergaben, dass bei der Anreicherung von sauren Wirkstoffen auf PS-DVB- Festphasen die Wasserproben ein pH-Wert von 2 haben müssen.

#### *Optimierung des Methanol-Anteils in der Probe*

Die Anreicherungs-effizienz der HRP- Festphase wurde in Vorversuchen mit einigen der polarsten Analyten getestet, den Carbamatmetaboliten.

Drei Kartuschen wurden mit je 3 ml Methanol und 3 x 3 ml Puffer pH=6 (Phosphatpuffer) konditioniert.

Drei Proben aus 100 ml Wasser (pH=6, Phosphatpuffer) mit 20, 10 bzw. 5% Methanol wurden vorbereitet und mit je 5  $\mu$ g pro Analyt gespickt. Die Anreicherung der Proben fand unter Vakuum, bei 4-5 mm Hg, statt. Nach dem Trocknen wurden die Kartuschen mit je 2 x 3 ml Aceton eluiert. Die Eluate wurden mit Stickstoff bei 30°C bis zur Trockene aufkonzentriert, in 500  $\mu$ l Methanol aufgenommen und mit HPLC-DAD vermessen.

Mit 5 und 10 % Methanol in Wasser wurden die besten Ergebnisse erreicht, während 20% Lösungsmittel den Durchbruch des polarsten Metaboliten, Butocarboxim-sulfoxid, bewirkten.

Demzufolge wurden für weitere Untersuchungen Proben mit maximal 5% Methanol eingesetzt.

Tabelle 5.3.6: Wiederfindungsraten von Carbamatmetabolite aus methanolhaltigen Wasserproben nach Anreicherung und Elution auf HRP, Bestimmung mit HPLC-DAD (siehe Abschnitt 5.1.4.1)

Analyt	20% MeOH	10% MeOH	5% MeOH
Butocboxim sulfoxid	5	82	103
Aldicarb sulfon	98	83	102
Ethiofencarb sulfon	102	88	101
Methiocarb sulfoxid	97	91	102
Carbofuran 3-OH	99	99	100
Methiocarb sulfon	96	100	102
Carbofuran 3-keto	99	99	101

### 5.3.2.5 Effizienz der HRP- Festphase für die Reinigung von Probenextrakte

Die Aufreinigungseffizienz der HRP- Festphase, das Verhalten der Analyten auf der Festphase und deren Wiederfindungsraten nach Anreicherung wurden mit verschiedenen Matrices untersucht. Zweck dieser Experimente war, beste Wiederfindungsraten der Analyten und eine möglichst vollständige Matrixabtrennung zu erreichen.

10 g Weißkohl wurden mit Methanol/Wasser 2:1 nach der im Abschnitt 5.2.3 dargestellten Methode extrahiert.

Die HRP- Festphase wurde mit 3 ml Methanol und 3 x 3 ml Wasser konditioniert.

3 ml Extrakt (1 g Probe) wurden mit 100 ng pro Analyt gespikt, dann mit Wasser auf 100 ml verdünnt und auf die HRP- Festphase unter Vakuum (4-5 mm Hg) angereichert. Die Festphase wurde mit 10 ml 5% Methanol in Wasser gewaschen und unter Stickstoffstrom 15 Minuten lang getrocknet. Die Elution erfolgte mit 2 x 3 ml Aceton. Für die Analyse wurden die Eluate mit Stickstoff bei 30°C bis zur Trockene eingengt, in 1 ml Methanol/10 mM NH<sub>4</sub>Ac 1:1 aufgenommen und mit LC/MS/MS vermessen.

Bei der ESI+ Messung (Abbildung 5.3.10) zeigte das Verfahren sehr gute Ergebnisse. Wie bei ChemElut, wurde die Oxidation des Ethiofencarb festgestellt. Die durchschnittliche Wiederfindungsrate für Ethiofencarb, Ethiofencarb sulfon und Ethiofencarb sulfoxid lag jedoch bei 82%.

Problematisch hat sich die Messung im ESI- Modus erwiesen (Abbildung 5.3.11). Hier wurden für die Harnstoffe sehr gute Ergebnisse erzielt, doch die Wiederfindungsraten der

sauren Analyten waren alle unter 70%. Ursache war der hohe pH-Wert und dementsprechend zu hohe Probenvolumen, die den Durchbruch der zum Teil deprotonierten sauren Substanzen verursachten [157].

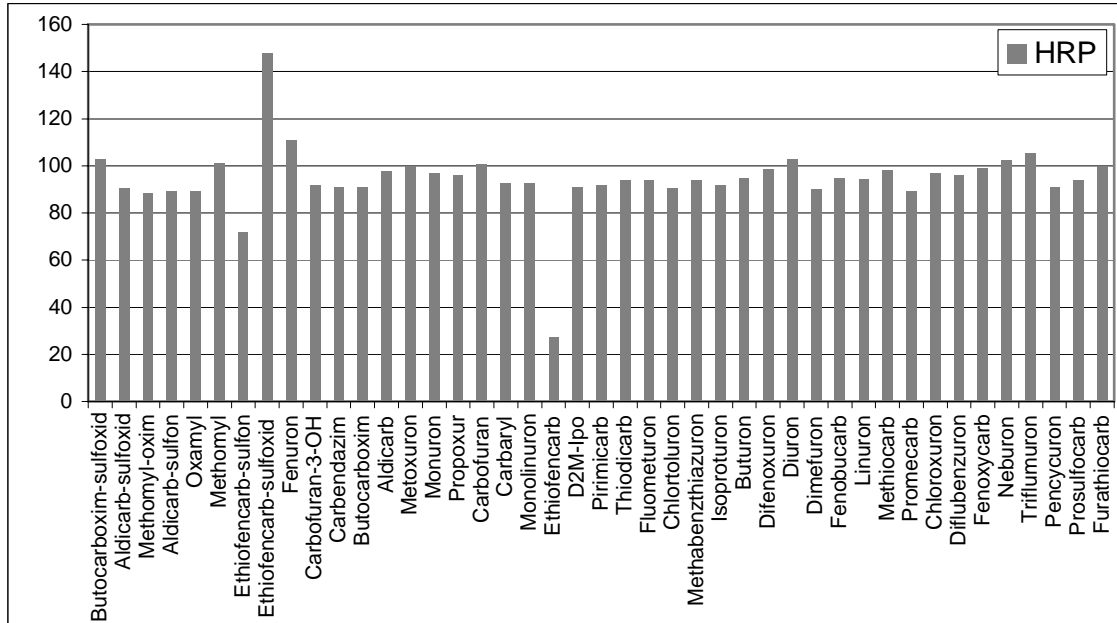


Abbildung 5.3.10: Wiederfindungsraten der Analyten für einen Weißkohleextrakt (Methanol-Extraktion) nach Anreicherung auf der HRP- Festphase, positiver Ionisierungsmodus

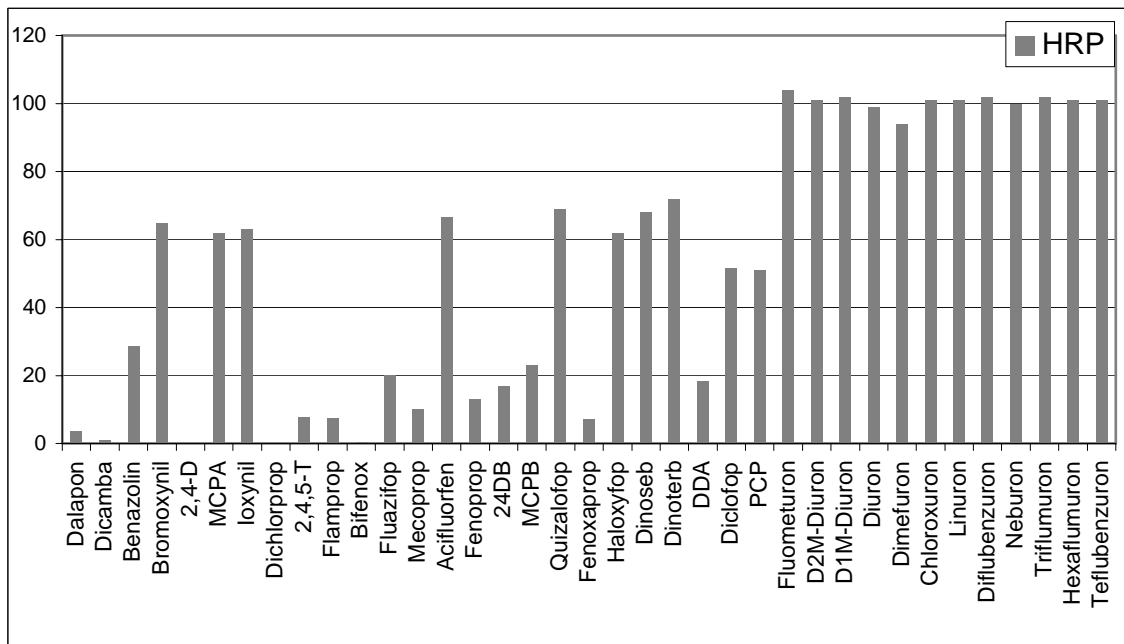


Abbildung 5.3.11: Wiederfindungsraten der Analyten für einen Weißkohleextrakt (Methanol-Extraktion) nach Anreicherung auf der HRP- Festphase, negativer Ionisierungsmodus

*pH-Wert und Volumen der Proben*

Im folgenden Experiment wurde der Einfluss des pH-Wertes und des Probenvolumina auf die Wiederfindungsraten der sauren Wirkstoffe bei der HRP- Aufreinigung untersucht.

20 g Raps wurden mit 60 ml Methanol nach der im Abschnitt 5.2.4 dargestellte Methode extrahiert.

Folgende Lösungen wurden für die Verdünnung der Extraktproben vorbereitet:

- 0,1%ige Phosphorsäure (1ml H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> konz auf 1000ml, pH=2)
- pH=2 - Lösung mit 5% Methanol
- pH=4 - Lösung (321 µl HAc konz. + 10 ml NaAc 0.1 M auf 1000 ml)
- pH=4 - Lösung mit 5% Methanol

Vier Aliquote à 3 ml Rapsextrakt wurden mit 100 ng pro Analyt gespikt und wie folgt verdünnt:

- mit Wasser auf 100 ml
- mit pH=4 - Lösung auf 100 ml
- mit pH=4 - Lösung auf 50 ml
- mit pH=2 - Lösung auf 50 ml

Die HRP- Festphasen wurden mit je 3 ml Methanol und 3 x 3 ml Wasser oder Wasser mit entsprechend eingestelltem pH-Wert konditioniert. Die Proben wurden unter Vakuum angereichert, anschließend wurden die Kartuschen mit je 10 ml von der entsprechenden 5%-ige Methanollösung gewaschen. Die Sorbentien wurden unter Stickstoffstrom, 15 Minuten lang getrocknet und mit jeweils 2 x 3 ml Aceton eluiert. Die Eluate wurden mit Stickstoff bei 30°C bis zur Trockene aufkonzentriert und in jeweils 500 µl Methanol aufgenommen. Nach Auflösen der Rückstände im Ultraschallbad wurden die Proben mit 10 mM Ammoniumacetat auf 1 ml aufgefüllt und mit LC/MS/MS vermessen.

Weitere 4 Aliquote à 3 ml Rapsextrakt wurden nach demselben Verfahren verarbeitet, vor der Messung mit je 100 ng pro Analyt gespikt und als Matrixstandards verwendet.

In der Abbildung 5.3.12 sind die Ergebnisse der im negativen Modus durchgeführten Messungen dargestellt. Die Wiederfindungsraten der Harnstoffe wurden von der Änderung des pH-Wertes nicht negativ beeinträchtigt. Für die zwei Diuronmetabolite und die sauren Wirkstoffe wurden schon bei pH=4 bessere Ergebnisse erreicht. Der Einfluss des Probenvolumens konnte besonders bei Bromoxynil, Ioxynil und Mecoprop beobachtet werden. Bei der 50 ml Proben wurden diese Substanzen mit über 80% wiedergefunden. Die polarsten sauren Wirkstoffe konnten jedoch nur bei pH=2 gut retardiert werden.

Die Wiederfindungsraten des Fenoxaprop sinken bei niedrigen pH-Werte, was auf die Instabilität dieser Substanz unter sauren Bedingungen zurückzuführen ist [74].

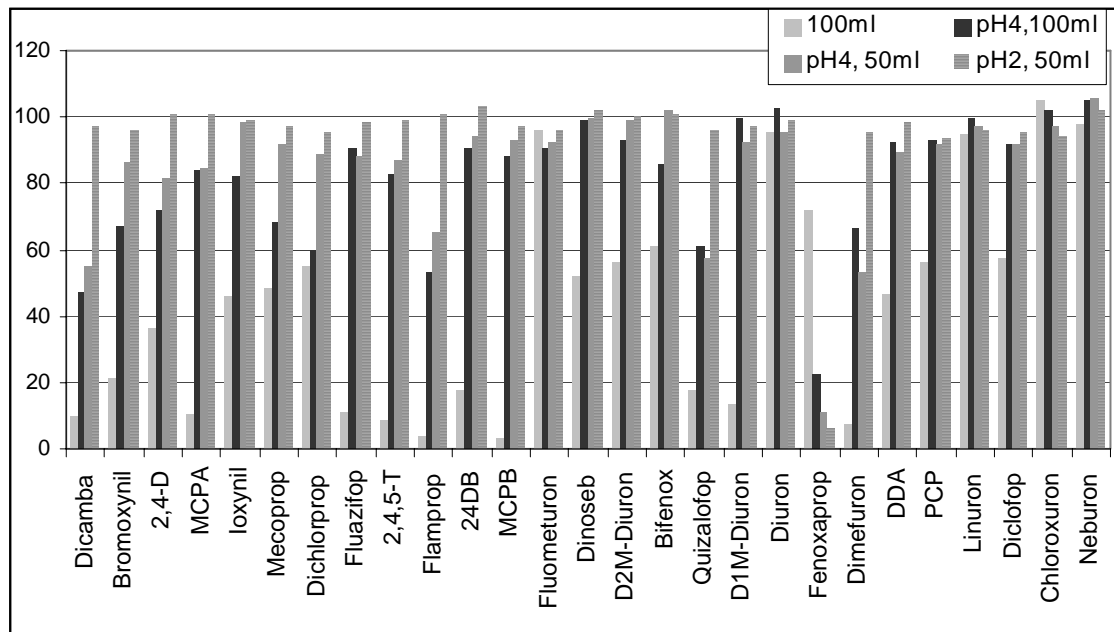


Abbildung 5.3.12: Vergleich der Wiederfindungsraten von sauren Analyten und Harnstoffen für Rapsextrakte (Methanol- Extraktion), nach Anreicherung verschiedener Probenvolumina auf der HRP-Festphase, mit und ohne pH-Wert- Einstellung

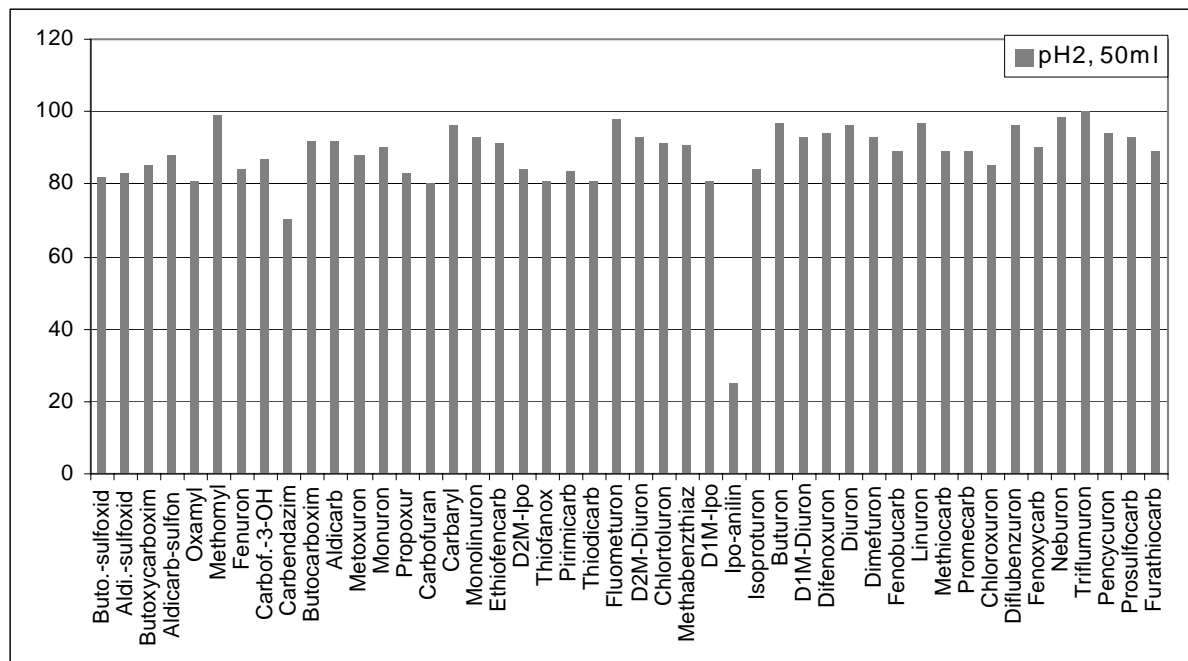


Abbildung 5.3.13: Vergleich der Wiederfindungsraten der im ESI+ gemessenen Analyten für Rapsextrakte (Methanol- Extraktion), nach Anreicherung verschiedener Probenvolumina auf der HRP-Festphase, mit pH-Wert- Einstellung

Auch die im positiven Modus durchgeführten Messungen (Abb. 5.3.13) zeigten sehr gute Ergebnisse nach der HRP- Anreicherung bei pH=2. Ausnahmen machten hier jedoch die basischen Analyten, Carbendazim, Propamocarb und Isopropylanilin, die unter sauren Bedingungen schneller durchbrechen.

Diese Ergebnisse haben bewiesen, dass die gemeinsame Anreicherung von neutralen und sauren Substanzen auf der HRP- Festphase bei pH=2 erfolgreich durchgeführt werden kann. Nachteilig für dieses Verfahren ist aber, dass basische Substanzen nicht miterfasst werden können.

Für die weiteren Untersuchungen wurden dementsprechend die Extraktaliquote für die Anreicherung auf der HRP- Festphase mit 0,1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (pH=2) auf 50 ml verdünnt.

#### *Optimierung der Elution*

Bei Elution der HRP- Festphase mit 6 ml reinem Aceton wurden niedrige Wiederfindungsraten für die mittelpolaren und basischen Analyte festgestellt. Für diese Substanzen hat sich während der Untersuchungen Methanol als gut geeignet erwiesen. Weil aber Methanol zu polar und schwer einzudampfen ist, wurde es in Kombination mit Aceton getestet.

Drei HRP- Kartuschen wurden mit jeweils 3 ml Methanol und 3 x 3 ml 0,1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (pH=2) konditioniert. 3 x 3 ml Methanol/Wasser 2:1 (v/v) wurden jeweils mit 100 ng pro Analyt gespikt und mit 0,1%ige H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> auf 50 ml verdünnt. Nach Anreicherung und Trocknen der Festphase wurden die Analyten mit folgenden Lösungsmitteln eluiert:

- 10 % Methanol in Aceton
- 20 % Methanol in Aceton
- 30 % Methanol in Aceton
- Aceton

Dabei wurden mehrere Fraktionen aufgefangen: die ersten 2 ml, die folgenden 4 x 1 ml und die letzten 4 ml.

Die Eluate wurden im Stickstoffstrom bei 30°C bis zur Trockene aufkonzentriert und in 1 ml Methanol / 10 mM Ammoniumacetat aufgenommen. Nach der LC/MS/MS- Analyse erfolgte die Berechnung der Wiederfindungsraten gegen einen Standard im Lösungsmittel.

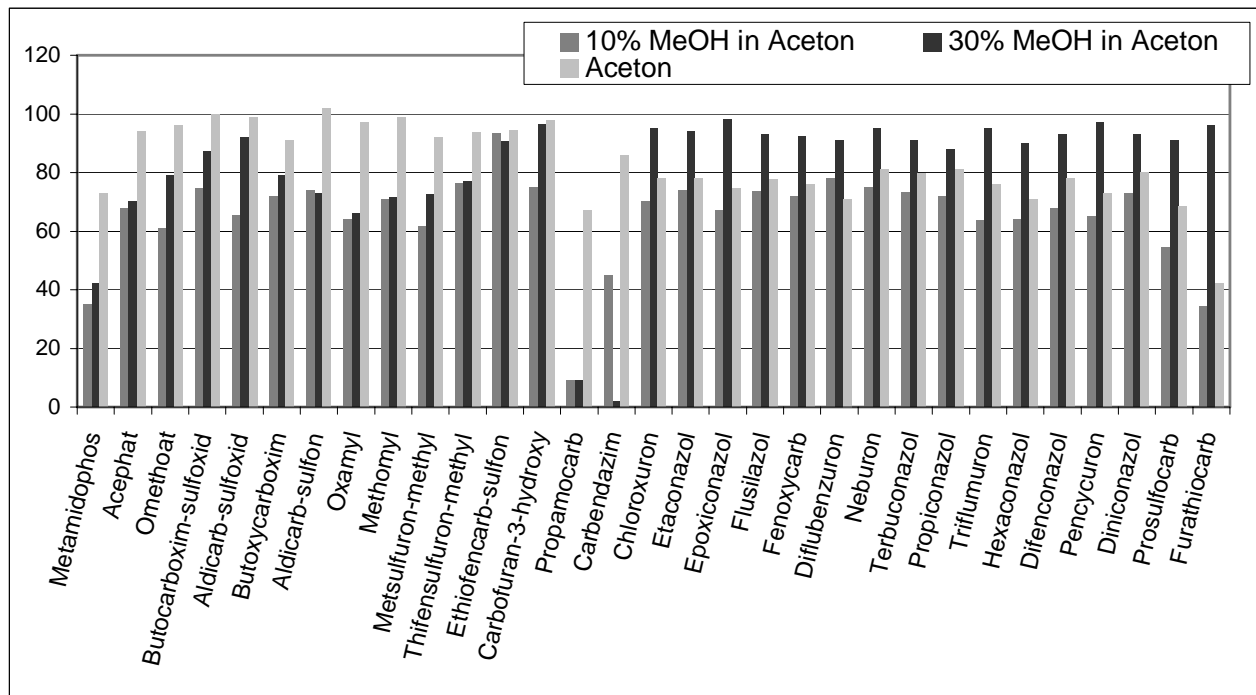


Abbildung 5.3.14: Wiederfindungsraten der Analyten nach Anreicherung auf der HRP- Festphase und Elution mit verschiedenen Lösungsmittel; Bestimmung mit LC/MS/MS im positiven Modus

In der Abbildung 5.3.14 sind einige dieser Ergebnisse dargestellt. Die Elution mit 30% Methanol in Aceton erzielte sehr gute Wiederfindungsraten für die sehr polaren Analyten. Der Einsatz von Methanol war für die basischen Substanzen besonders wichtig. Für die quantitative Elution der weniger polaren Substanzen war reines Aceton notwendig.

Die Hersteller der Chromabond- HRP- Sorbentien (Fa. Macherey-Nagel) empfehlen den Einsatz von Ammoniak für eine quantitative Elution der basischen Substanzen von der Festphase. Die Elution mit 10 und 100 mM  $\text{NH}_4\text{Ac}$  in Methanol führte zu Metabolisierung der anfälligen Substanzen und erreichte nicht die Effizienz von Aceton.

### HRP- Verfahren

3 ml Extrakt wurden mit 0,1 % iger  $\text{H}_3\text{PO}_4$  auf 50 ml verdünnt. Die HRP- Festphase wurde mit 3 ml Methanol und mit 3 x 3 ml 0,1 % iger  $\text{H}_3\text{PO}_4$  konditioniert. Die Probe wurde mit Hilfe eines Teflonschlauches, unter Vakuum (4-5 mm Hg), langsam auf der Festphase angereichert. Der Messkolben und die Kartusche wurden mit insgesamt 10 ml 5% Methanol in 0,1 %iger  $\text{H}_3\text{PO}_4$  gewaschen und anschließend unter Stickstoffstrom 15 Minuten lang getrocknet. Die Festphase wurde mit 3 ml 30 % Methanol in Aceton und mit 1ml Aceton eluiert. Das Eluat wurde unter Stickstoffstrom bis zur Trockene eingedampft. Der Rückstand

wurde in 500 µl Methanol gelöst und nach der Zugabe von 500 µl 10 mM NH<sub>4</sub>Ac-Lösung gut durchmischt. Die Probe wurde in ein Glasvial überführt und an der LC/MS/MS gemessen.

### 5.3.2.6 Vergleich von ChemElut und HRP

Die Wiederfindungsraten der Analyten bei der Extraktreinigung wurden für ChemElut und HRP mit einem Pfirsichextrakt verglichen.

20 g Probe wurden mit Methanol/Wasser 2:1 extrahiert (Abschnitt 5.2.3). Die Extraktaliquote wurden jeweils mit 100 ng pro Analyt gespikt, und die Extraktreinigung erfolgte nach den oben dargestellten Verfahren (Abschnitt 5.3.2.1 und 5.3.2.5). Die Proben wurden mit LC/MS/MS vermessen. Für die Berechnung der Wiederfindungsraten wurden zwei weitere Extraktaliquote verarbeitet, vor der Messung mit 100 ng pro Analyt gespikt und als Matrixstandards eingesetzt.

Die ESI+ und ESI- Messergebnisse sind in der Abbildung 5.3.15 bzw. 5.3.16 dargestellt.

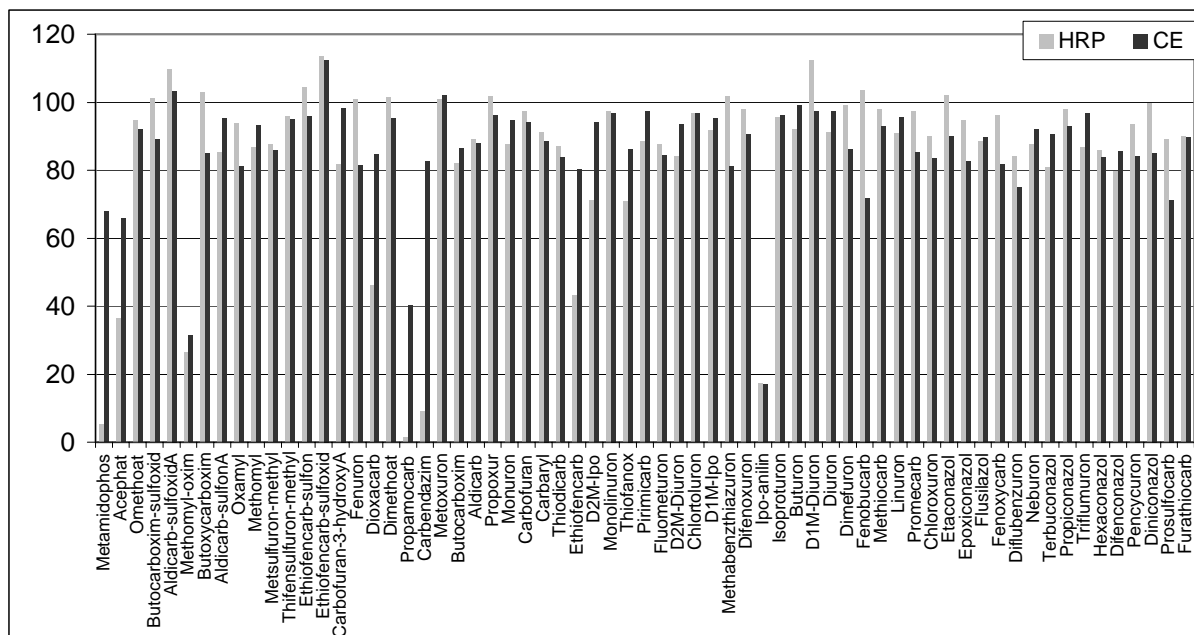


Abbildung 5.3.15: Wiederfindungsraten der Analyten nach ChemElut bzw. HRP- Aufreinigung eines Pfirsichextraktes, ESI+ Bestimmung

Im Vergleich zur HRP- Aufreinigung zeigte die ChemElut bessere Ergebnisse für die polarsten Analyten, mit Ausnahme von Methamidophos und Acephat, deren Wiederfindungsraten immer noch unter 70% lagen. Von der ChemElut konnte Carbendazim mit über 80% eluiert werden, die anderen zwei basischen Analyte, Propamocarb und Isopropylanilin lagen



jedoch weit unter 70%. Diese Daten haben bewiesen, dass die HRP- Festphase besonders für die Benzoylharnstoffe und die polarsten sauren Wirkstoffe bessere Ergebnisse liefern kann. Einen Nachteil der HRP- Phase ist, dass die stark polaren Methamidophos und Acephat ( $\log K_{ow} < 0$ ) nicht ausreichend retardiert werden [74].

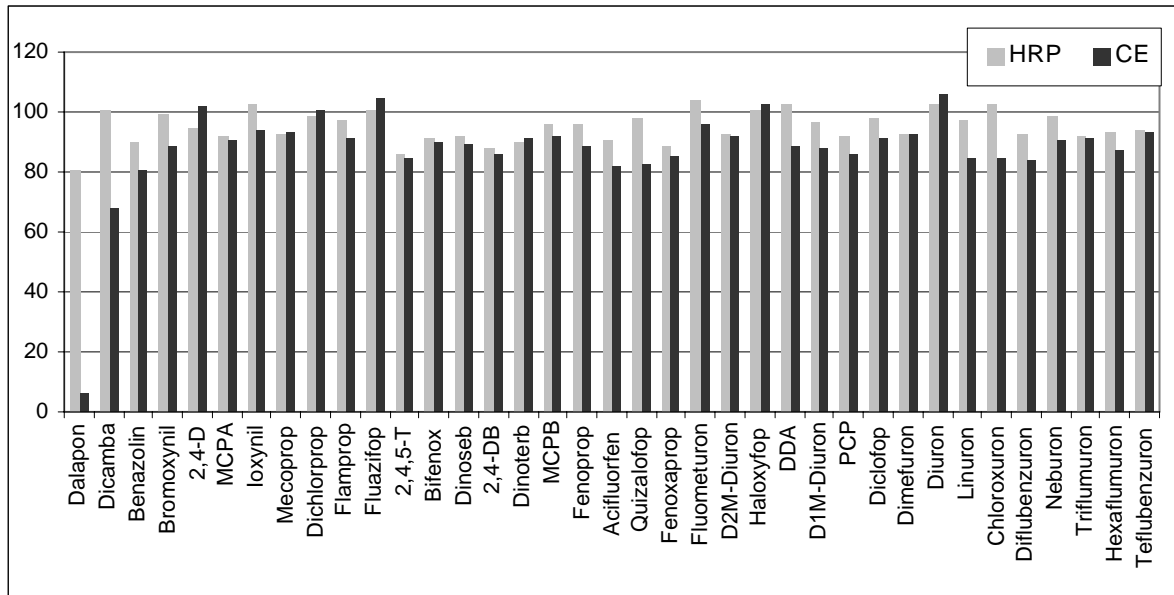


Abbildung 5.3.16: Wiederfindungsraten der Analyten nach ChemElut bzw. HRP- Aufreinigung eines Pfirsichextraktes, ESI- Bestimmung

Die Effizienz dieser Festphasen wurde weiter für Oliven untersucht. Die Proben wurden wie die Pfirsichextrakte vorbereitet. Die Extraktion wurde für die HRP-Festphase mit 19.5 ml Methanol und 3 ml Acetonitril (siehe Abschnitt 5.2.4) ohne Wasserzugabe durchgeführt. Im Vergleich wurde die Extraktion für die ChemElut- Aufreinigung mit Methanol/Wasser 2:1 durchgeführt. In dem Versuch, die Wiederfindungsraten der sauren Wirkstoffe bei der ChemElut- Aufreinigung zu verbessern, wurde die gesättigte Salzlösung mit 0,1%ige  $H_3PO_4$  statt Wasser vorbereitet.

Die in der Abbildung 5.3.17 und 5.3.18 dargestellten Wiederfindungsraten bestätigen die Ergebnisse, die mit den Pfirsichextrakten erzielt wurden. Zusätzlich erkennt man deutlich die niedrigeren Wiederfindungsraten der unpolaren Analyten, die durch die Extraktion mit Methanol/Wasser 2:1 verursacht wurden.

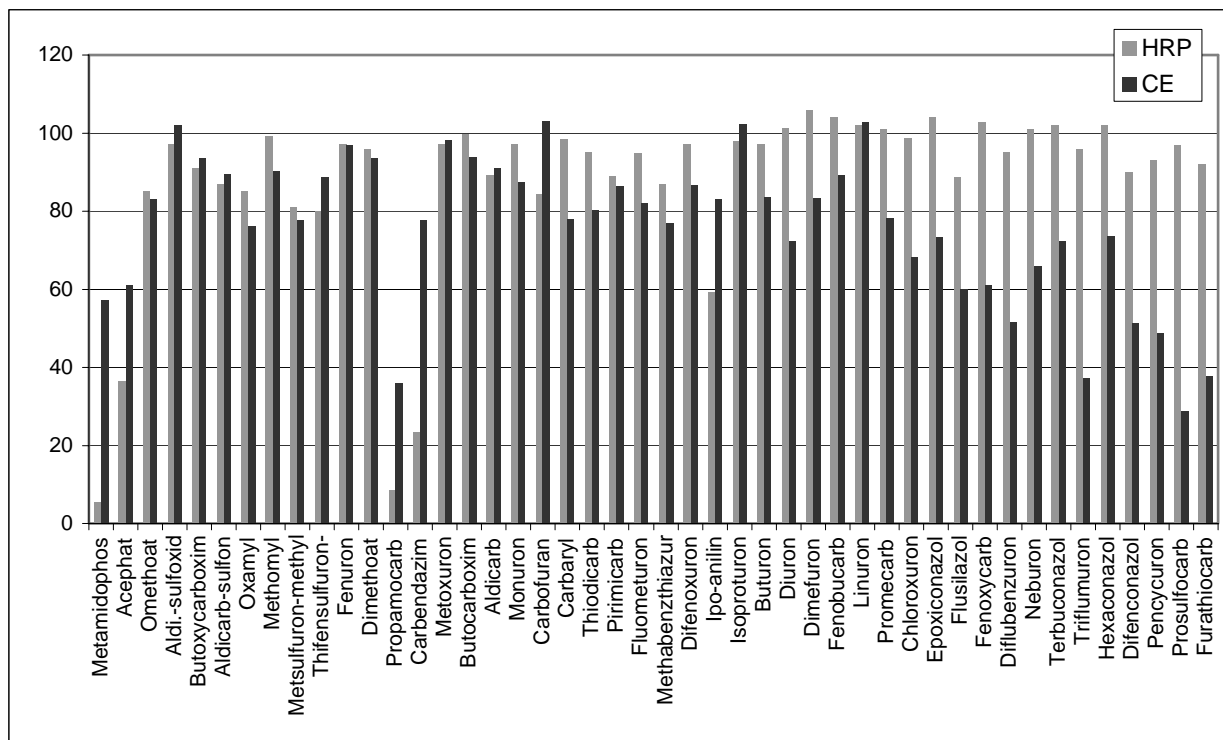


Abbildung 5.3.17: Wiederfindungsraten der Analyten für Olivenextrakte nach Aufreinigung auf ChemElut bzw. Chromabond-HRP; Bestimmung mit LC/MS/MS im positiven Modus

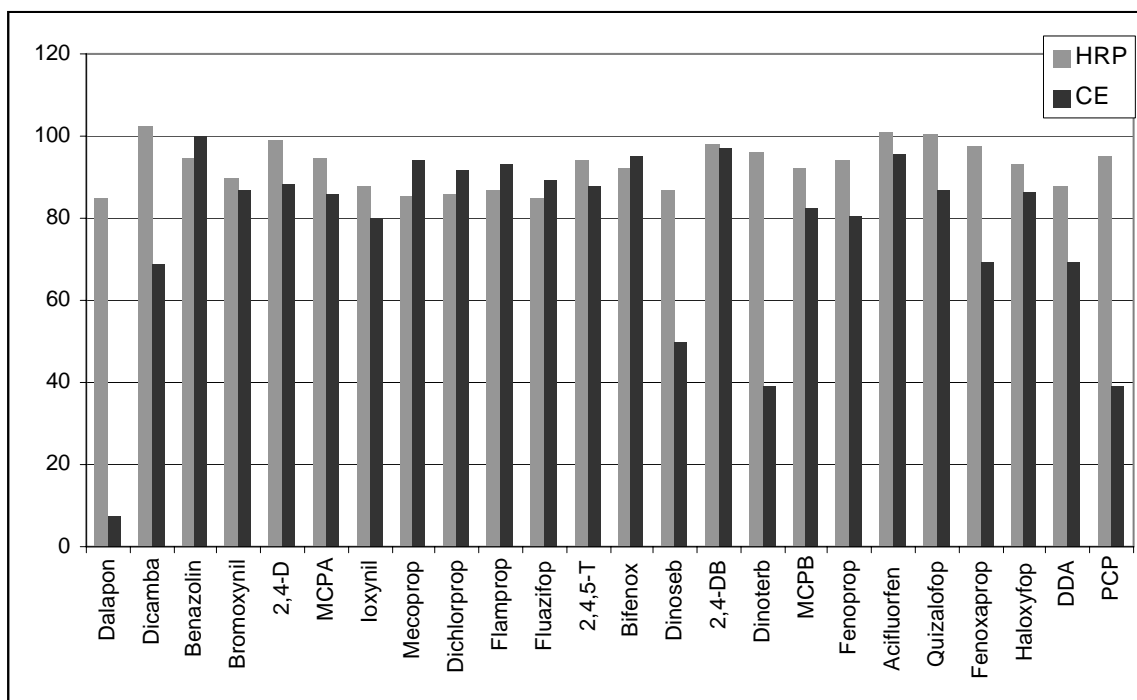


Abbildung 5.3.18: Wiederfindungsraten der sauren Wirkstoffe für Olivenextrakte nach Aufreinigung auf ChemElut bzw. Chromabond-HRP; Bestimmung mit LC/MS/MS

Mit der ChemElut- Festphase wurden bessere Wiederfindungsraten für die polarsten Analyten erreicht. Analog der sehr polaren Substanzen wie Methamidophos und Acephat werden aber

auch polare Matrixinhaltsstoffe von der HRP- Festphase frühzeitig eluieren. Ein Teil der Matrix wird auf diese Weise abgetrennt, und somit können Störwirkungen in der Ionisierungsquelle minimiert werden.

Das Ansäuern des Extraktes vor der ChemElut- Aufreinigung war nicht erfolgreich. Die Wiederfindungsraten der polarsten sauren Analyten, Dalapon und Dicamba, lagen immer noch unter 70 %, wie auch für Dinoseb und Dinoterb.

Der Vergleich der Wiederfindungsraten wurde auch mit Reisproben durchgeführt. Zwei Reisproben à 10 g wurden mit Methanol/Wasser 2:1 extrahiert. Die Extraktaliquote wurden mit jeweils 100 ng pro Analyt gespickt und auf ChemElut bzw. HRP gereinigt (siehe Abschnitt 5.3.2.1 und 5.3.2.5). Nach der LC/MS/MS- Analyse wurden die Wiederfindungsraten gegen Matrixstandards berechnet.

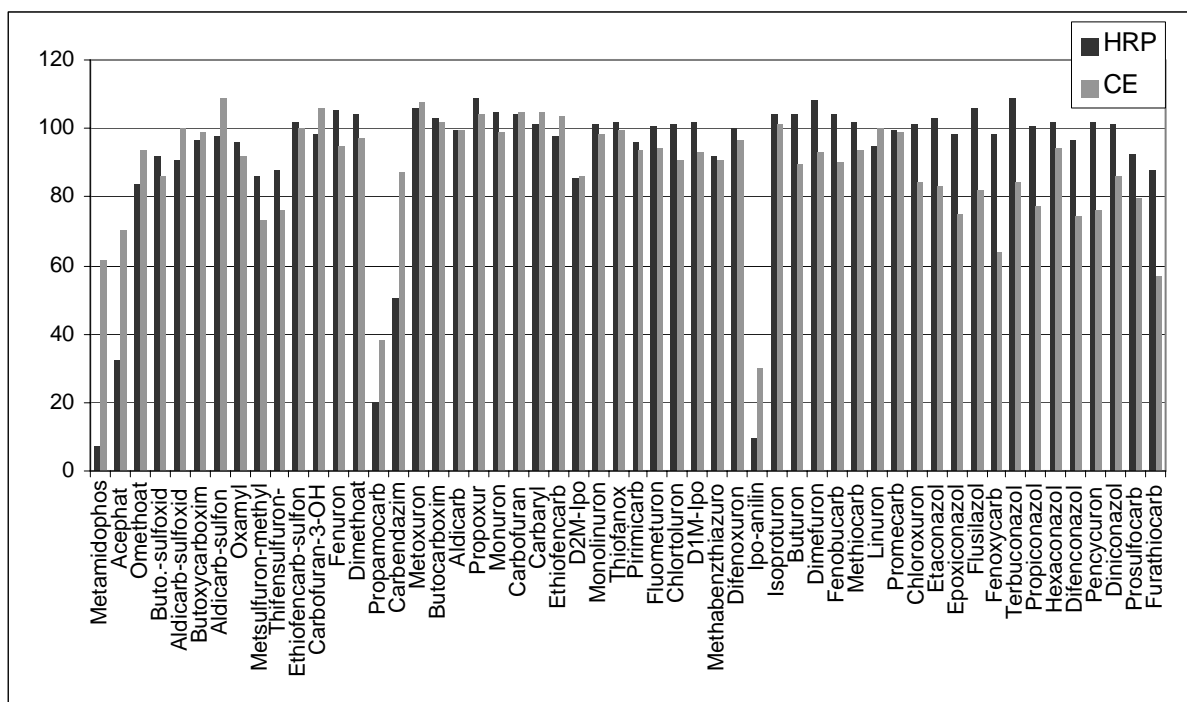


Abbildung 5.3.19: Wiederfindungsraten der Analyten für Reisextrakte nach Extraktion mit Methanol/Wasser 2:1 und Aufreinigung auf ChemElut bzw. Chromabond-HRP; Bestimmung mit LC/MS/MS im positiven Modus

Mit diesem Experiment wurde wiederholt bestätigt, dass die HRP- Festphase für die Aufreinigung verschiedener Methanolextrakte sehr gut geeignet ist (Abbildung 5.3.19).

### 5.3.3 Reinigung von Acetonitrilextrakten

Bei der Aufreinigung von Acetonitrilextrakten mit der HRP- Festphase traten Verluste für die polarsten Substanzen ( $\log K_{ow} < 1$ ) auf (Abbildung 5.3.20). Eine mögliche Ursache dafür war die Belegung des Sorbens durch mitextrahiertes Fett. Um diese Verluste durch eine bessere Matrixabtrennung zu minimieren, wurde die C18- Festphase als zusätzliche Aufreinigungsmöglichkeit eingesetzt.

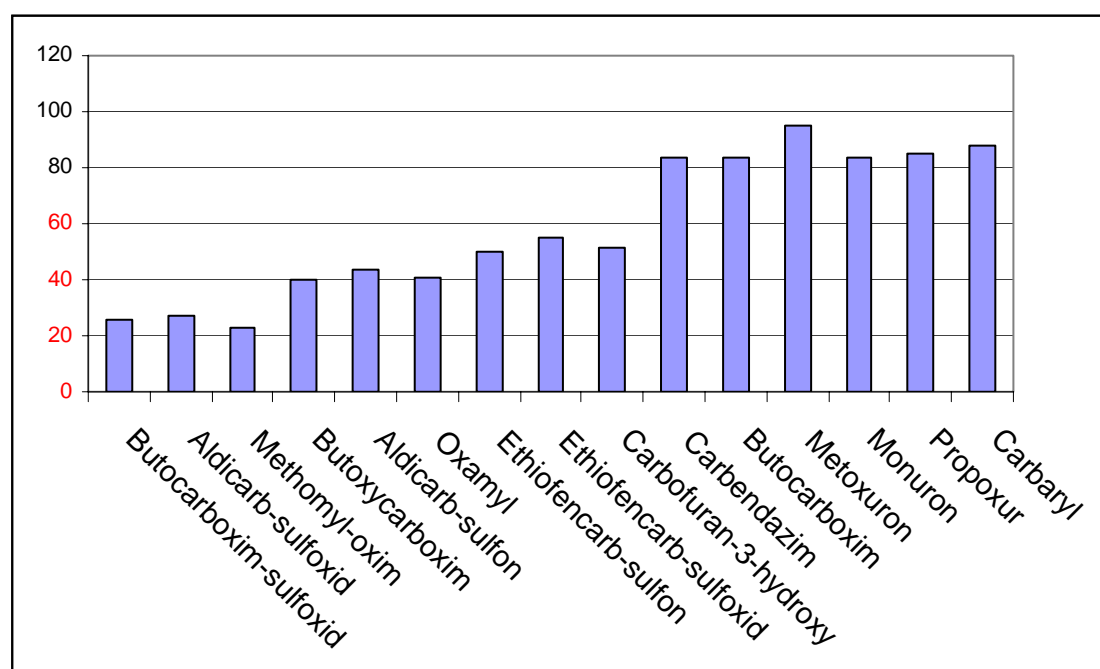


Abbildung 5.3.20: Wiederfindungsraten der polarsten Analyten für eine gespikete Rapsprobe, nach Extraktion mit Acetonitril/Wasser 2:1, Bestimmung mit LC/MS/MS im positiven Modus

#### 5.3.3.1 C18

Die Aufreinigung von Acetonitrilextrakte kann durch LLE mit Hexan durchgeführt werden, meistens wird aber die SPE mit C18- Festphasen eingesetzt, z.B. in der FDA- Methode [26]. In dieser Arbeit wurde eine C18- Phase vor der HRP- Aufreinigung eingesetzt.

#### Elution der C18- Festphase

Das C18- Sorbens (1 g) wurde mit 5 ml Acetonitril und 5 ml Wasser konditioniert.

100 ng pro Analyt in 5 ml Acetonitril/Wasser 2:1 wurden auf die C18- Festphase aufgetragen, eluiert und aufgefangen. Die Elution der Analyten wurde mit 2 x 1 ml Acetonitril und 1 ml Acetonitril / Aceton 1:1 durchgeführt, wobei die erste Fraktion des Eluates in dem Gefäß mit der Probe aufgefangen wurde. Die drei Fraktionen wurden im Stickstoffstrom, bei 30°C bis

zur Trockene eingedampft, und in 1 ml Methanol / 10 mM NH<sub>4</sub>Ac 1:1 aufgenommen. Die Wiederfindungsraten der Analyten wurden mithilfe eines Messstandards derselben Konzentration berechnet. Die Messungen wurden mit LC/MS/MS durchgeführt.

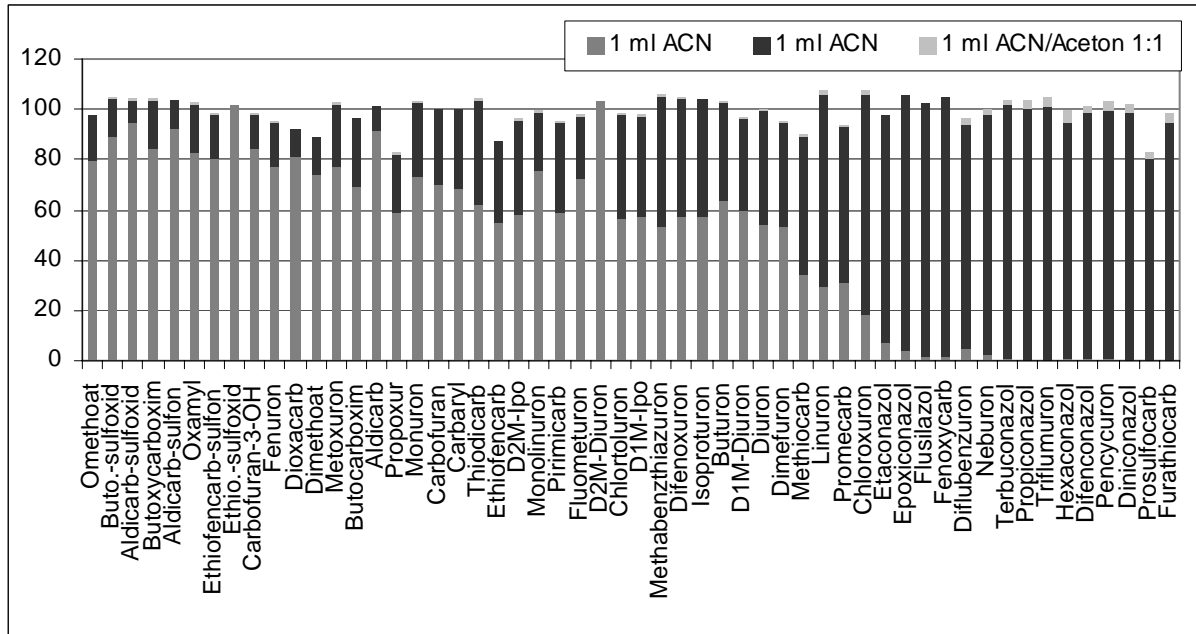


Abbildung 5.3.21: Wiederfindungsraten der Analyten nach der C18- Festphase mit verschiedenen Eluenten; Bestimmung mit LC/MS/MS im positiven Modus

Diese Ergebnisse zeigen, dass 2 ml Acetonitril ausreichend sind, um die Analyten quantitativ von der C18- Phase zu eluieren.

Um gute Wiederfindungsraten für die polarsten Analyten zu erreichen, darf der verdünnte Extrakt maximal 5 % organisches Lösungsmittel enthalten. Nach der Elution der C18- Festphase waren aber insgesamt etwa 4 ml Acetonitril vorhanden, was zu 8 % Lösungsmittel in der Probe führte.

Mithilfe eines Olivenextraktes wurde untersucht, ob das Aufkonzentrieren des Extraktes nach der C18- Reinigung Analytenverluste verursacht.

#### *Aufkonzentrieren des C18- Eluates*

10 g Oliven wurden mit Acetonitril/Wasser 2:1 extrahiert, nach der im Abschnitt 5.2.3 dargestellten Methode. Das Sorbens (2 Kartuschen) wurde mit 5 ml Wasser und 5 ml Acetonitril konditioniert. Zwei Aliquote à 3 ml wurden mit jeweils 100 ng pro Analyt gespikt, auf der C18- Phase angereichert, eluiert und aufgefangen. In demselben Gefäß wurden auch

die 2 ml Acetonitril aufgefangen, die zur Elution der Analyte von der C18- Festphase eingesetzt wurden.

Eine der Proben wurde im Stickstoffstrom, bei 30°C auf 3 ml eingedampft, die andere enthielt weiterhin 4 ml Acetonitril. Die zwei Extrakte wurden dann mit 0,1%iger H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>- Lösung auf 50 ml aufgefüllt und auf der HRP- Festphase aufgereinigt (siehe Abschnitt 5.3.2.5).

Auf derselbe Weise wurden zwei Matrixstandards vorbereitet und vor der Messung mit 100 ng pro Analyt gespikt.

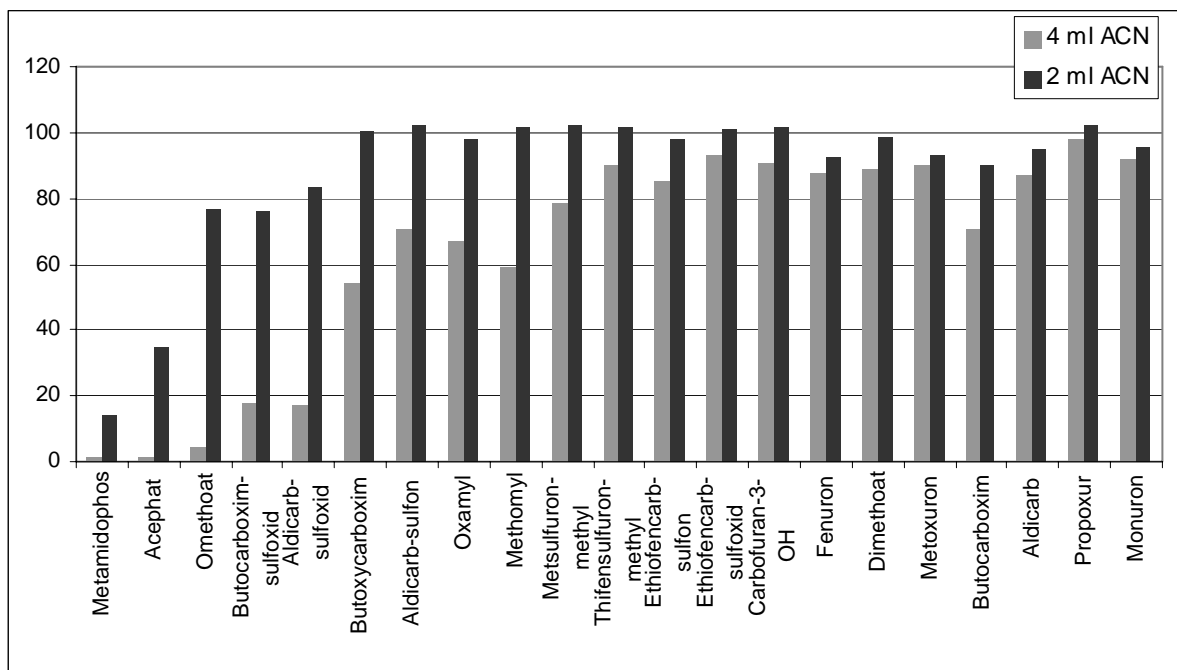


Abbildung 5.3.22: Wiederfindungsraten der polarsten Analyten für einen Olivenextrakt nach HRP-Aufreinigung von Proben mit verschiedenem Acetonitrilgehalt

Die größere Elutionskraft der Probe mit 4 ml Acetonitril bewirkte niedrige Wiederfindungsraten für die polarsten Analyten (Abbildung 5.3.22). Mit nur 2 ml Acetonitril in der Probe konnten für diese Analyten viel bessere Ergebnisse erzielt werden.

Weitere Experimente haben gezeigt, dass die C18- Eluate bis auf 1,5 ml aufkonzentriert werden können, ohne zusätzlichen Verluste zu verursachen.

Wie im Abschnitt 5.2.4 dargestellt, wurde bei der Extraktion mit Acetonitril eine Aufkonzentrierung des Rohextraktes festgestellt, die die genaue Bestimmung des Volumens erschwerte und zu erhöhten Wiederfindungsraten führte. Damit wurde auf diese Extraktionsmethode verzichtet. Die Aufreinigungsmethode mit der C18- Festphase wurde aber für die Verarbeitung von fettreichen Proben übernommen. Das entsprechend optimierte Verfahren ist unten dargestellt.

### *C18- Verfahren*

Die C18- Festphase wurde mit 5 ml Methanol und mit 5 ml Wasser konditioniert. 3 ml Extrakt wurden auf die C18- Phase gegeben und die Kartusche mit 3 ml Acetonitril gewaschen. Das Eluat wurde zusammen mit der Waschlösung in einem Wasserbad unter Stickstoffstrom bei 30°C auf 1,5 ml eingengt.

### **5.3.4 Versuche mit Oasis MCX**

Die bisherigen Untersuchungen zeigten, dass die basischen Analyten zum Teil sehr stark auf die HRP- Festphase retardiert werden. Mit 10 mM NH<sub>4</sub>Ac in Methanol als Eluent konnten maximal 70% Propamocarb und Carbendazim von der HRP eluiert werden.

Für die Elution basischer Substanzen von PS-DVB- Festphasen wurden Versuche mit Triethylamin erfolgreich durchgeführt [72], jedoch wird der Einsatz dieser Substanz in der LC/MS/MS nicht empfohlen. Triethylamin ist für diese Technik nicht ausreichend flüchtig, sammelt sich in der Quelle und führt zu hohen Hintergrundsignalen bei Messungen im positiven Modus [122].

Für die Anreicherung basischer Substanzen aus Apfelextrakten wurde ein Verfahren entwickelt, welches auf Extraktion mit Acetonitril, Verdünnung der Extrakte und anschließender Aufreinigung auf der Oasis MCX basiert [75].

Dieses Verfahren wurde ohne Matrix getestet, mit verschiedenen Proben: Wasser mit 20 % Acetonitril, 0,1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> mit 5% Methanol und Wasser mit 5% Methanol.

Bei der Probe in Acetonitril wurde Propamocarb mit über 80% wiedergefunden, Carbendazim lag jedoch unter 70%. Für die restlichen Substanzen eignete sich die Anreicherung aus Wasser bei pH=2 viel besser, wobei der kleinere Gehalt an organischem Lösungsmittel die Retention unterstützte. Die polarsten Analyten hatten sehr niedrige Wiederfindungsraten, sie wurden auf der MCX- Phase sehr schwach retardiert.

Bei weiteren Untersuchungen für die Elution der basischen Analyten von der MCX- Festphase wurden mit 1 M NH<sub>4</sub>Ac in Methanol gute Ergebnisse erzielt. Jedoch war die Reproduzierbarkeit dieser Elutionsmethode sehr schlecht. Für drei parallel eingesetzte MCX- Festphasen wurden relativen Standardabweichungen von bis zu 100% festgestellt.

Die Eluate in Methanol ließen sich nur schwierig und langsam aufkonzentrieren. Die Konzentration von Ammoniumacetat in der gemessenen Probe war auch sehr hoch, und beeinträchtigte erheblich die Effizienz der ESI- Ionisierung [121].

Es wurde auch untersucht, ob eine starke Base bessere Wiederfindungsraten bewirken kann. Elutionsversuche mit 0,1 Pyrrolidin in Aceton waren nicht erfolgreich, und die Analyten waren in Anwesenheit dieser Base sehr instabil. Pyrrolidin wirkte ungünstig auf die Ionisierung, dabei waren auch die Standardmessungen nicht reproduzierbar.

Für dieses Vorhaben zeigte die MCX- Festphase insgesamt keine Vorteile gegenüber der HRP- Festphase.



## 5.4 Untersuchungen zur Verminderung oder Vermeidung der Matrixeffekte

### 5.4.1 Einflüsse der Matrix

Die doppelte Ionisierung und Massenselektion erlaubt eine einzigartige Selektivität, so dass selbst in einer komplexen Matrix, wie z.B. einem Rapsextrakt, keine Interferenzen im Chromatogramm auftreten (Abbildung 5.4.1).

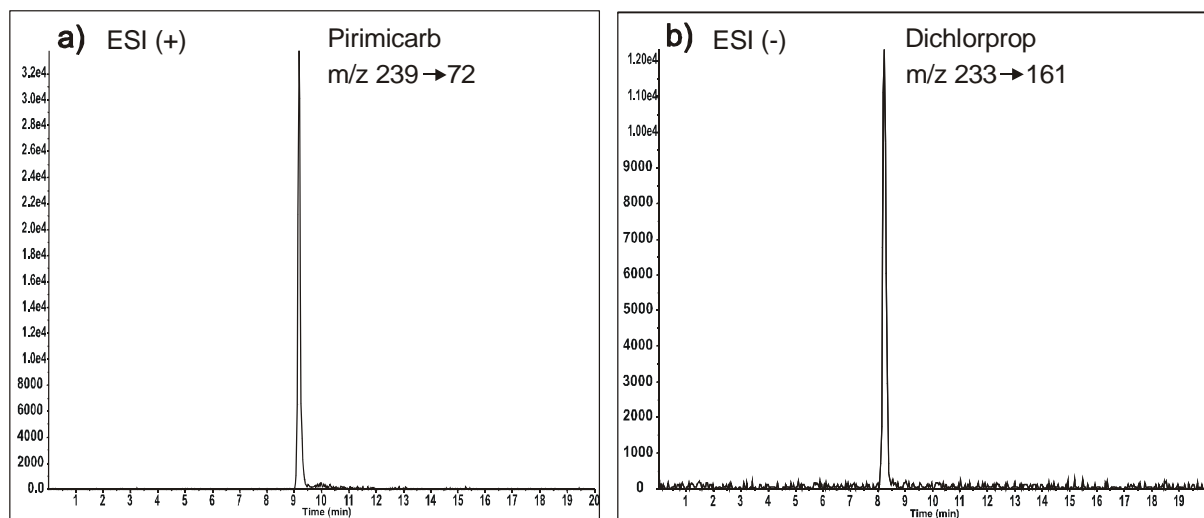


Abbildung 5.4.1: Chromatogramme von Pirimicarb (10 pg/ $\mu$ l) und Dichlorprop (10 pg/ $\mu$ l) in einer komplexen Raps-Matrix

Prinzipiell könnte deshalb nach der Extraktion auf eine Extraktreinigung verzichtet werden. Entsprechende Versuche zeigten aber schnell, dass die mitextrahierten Matrixbestandteile zu einer Verschmutzung der Geräteoptik führen und damit zu einer Verringerung der Empfindlichkeit.

Bei den Matrixeffekten handelt es sich um eine Verstärkung oder, in der LC/MS häufiger, eine Verminderung des Signals durch gleichzeitig eluierende Matrixbestandteile. Die ESI-Ionisierung ist für Matrixeffekte anfälliger als die APCI [159], weil die Bildungs- und Evaporationsprozesse stark matrixabhängig sind. Die Bildung eines gewünschten Ions, z.B. eines protonierten Moleküls, wird stark von den Bedingungen im Ionisierungsraum beeinflusst. Die Matrixkomponenten sind in dem Chromatogramm zwar nicht sichtbar, haben aber im Vergleich zu den Analyten höhere Konzentrationen und möglicherweise niedrigere Ionisierungspotentiale und höhere Protonenaffinitäten. Somit können sie die Ionisierungseffizienz gravierend beeinträchtigen. Weil der Gehalt der Matrixinhaltsstoffe von Matrix zu Matrix unterschiedlich ist, kann der MS/MS-Response sehr variieren [159, 160].

Wie groß dieser Matrixeffekt für die untersuchten Substanzen sein kann, wird an mehreren nicht aufgereinigten Probenextrakten demonstriert.

Verschiedene Rohextrakte, mit Methanol/Wasser 2:1 extrahiert, wurden mit einer definierten Menge Standardlösung versetzt und gleichzeitig ein Kontrollstandard gleicher Konzentration und Lösungsmittelzusammensetzung, aber ohne Matrix hergestellt und gegeneinander vermessen. Die Probenkonzentration betrug 0,3 g/ml in Methanol/Wasser (2:1), die Analytenkonzentration 100 ng/ml.

Die Signalintensitäten der meisten Substanzen im ungereinigten Tomatenextrakt zeigten kaum Abweichungen (<10%) zu denen im Lösungsmittel (Tabelle 5.4.1) und nur für vier Substanzen wurden Abweichungen von über 20% festgestellt. Eine deutlich stärkere Beeinflussung der Signale wurde in Zitronen- und Rapsextrakt beobachtet. Obwohl nicht alle Abweichungen durch Ionensuppression verursacht werden, zeigten diese Messungen deutlich, dass die Matrixinhaltsstoffe zu gravierenden Änderungen des Detektorsignals führen können und damit zu einer Verfälschung des Analyseergebnisses. Um eine gesicherte hohe Analysenqualität zu erreichen, müssen daher Maßnahmen zur Vermeidung der negativen Auswirkungen der Begleitmatrix getroffen werden.

Tabelle 5.4.1: Vergleich der Peakhöhen von Phenylharnstoffen und Carbamaten in einem ungereinigten Probenextrakt mit denen in reinem Lösungsmittel

	Tomate	Zitrone	Raps		Tomate	Zitrone	Raps
Aldicarb-sulfoxid	91	118	<b>33</b>	Chlortoluron	92	<b>56</b>	<b>74</b>
Butoxycarboxim	90	172	<b>45</b>	Methabenzthiazuron	92	81	<b>71</b>
Aldicarb-sulfon	112	150	<b>27</b>	D1M-Isoproturon	93	100	<b>77</b>
Methomyl-oxim	142	90	<b>33</b>	Isoproturon	103	99	81
Oxamyl	102	114	<b>27</b>	Buturon	104	<b>77</b>	81
Methomyl	107	104	<b>49</b>	D1M-Diuron	108	94	92
Fenuron	106	104	89	Difenoxuron	95	<b>77</b>	86
Carbendazim	136	851	97	Diuron	92	<b>78</b>	83
Butocarboxim	98	96	81	Dimefuron	107	113	83
Metoxuron	118	111	<b>68</b>	Fenobucarb	105	96	93
Aldicarb	101	95	<b>75</b>	Linuron	95	100	<b>77</b>
Monuron	98	92	<b>59</b>	Methiocarb	101	104	88
Propoxur	102	99	84	Promecarb	96	101	84
Carbofuran	102	112	73	Chloroxuron	97	111	91
Carbaryl	102	103	81	Diflubenzuron	107	94	93
Monolinuron	102	99	88	Fenoxycarb	97	106	83
Ethiofencarb	93	100	85	Neburon	<b>63</b>	90	86
Thiofanox	100	<b>79</b>	89	Triflumuron	97	120	82
Pirimicarb	96	<b>65</b>	<b>72</b>	Prosulfocarb	101	97	92
Fluometuron	105	<b>70</b>	83	Furathiocarb	97	98	81

Ein wichtiges Ziel der weiteren Untersuchungen war daher der Vergleich und die Beurteilung verschiedener Strategien zur Vermeidung der Matrixeffekte, um nicht nur ein einfaches, sondern auch ein sicheres Analysenverfahren zu entwickeln.

## **5.4.2 Extraktreinigung**

Es wurden verschiedenen Strategien überprüft, um Matrixeffekte zu verringern oder trotz der Matrixeffekte ein korrektes Ergebnis zu erzielen. Eine Möglichkeit bestand darin, die störenden mitextrahierten Begleitstoffe durch eine intensive Extraktreinigung abzutrennen.

### *5.4.2.1 Vergleich von GPC, Hydromatrix und SPE*

Wie im Abschnitt 5.3.1 dargelegt, wurde die Multimethode DFG-S19 erweitert, so dass nach einer Aceton/Wasser-Extraktion eine Flüssig-Flüssig-Verteilung, eine Gel-Permeations-Chromatographie und eine Festphasen-Aufreinigung an einem Anionenaustauscher (MAX) durchgeführt wurde.

Als Alternative wurden nach der Methanol/Wasser-Extraktion zwei einfache Reinigungsverfahren durchgeführt, eine Flüssig-Flüssig-Verteilung mit Hilfe von Hydromatrix (ChemElut) und eine Festphasenextraktion an dem hydrophoben PS-DVB-Material (Chromabond HRP).

Diese drei Verfahren wurden mit verschiedenen Proben durchgeführt, die stark unterschiedliche Wasser-, Säure- und Fettgehalte aufweisen.

Für die Berechnung der Matrixeffekte wurden die Proben nach der Aufarbeitung und vor der Messung mit 100 ng pro Analyt versetzt und gegen einen Standard derselben Konzentration in Lösungsmittelgemisch (Methanol / 10 mM NH<sub>4</sub>Ac 1:1) vermessen. Die Matrixkonzentration in der Endprobe betrug 1 g/ml.

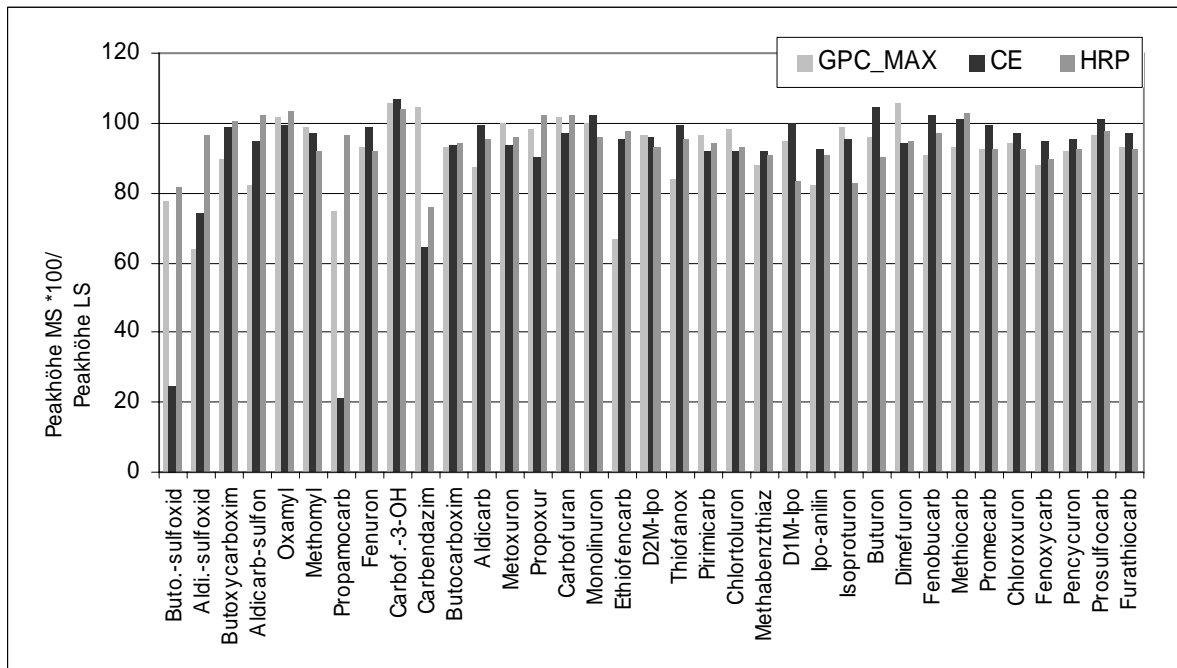


Abbildung 5.4.2: Signaländerung in Matrixstandards (MS) im Vergleich zu Standards in Lösungsmittel (LS), für Tomatenextrakte verschiedener Aufarbeitungsmethoden

Für die meisten der untersuchten Probenarten (z.B. Apfel, Erdbeere, Pfirsich) reichten die einfachen Reinigungsverfahren aus, um die Matrixeffekte auf ein akzeptables Maß zu reduzieren. Die für Tomatenextrakte erzielten Ergebnisse zeigten bei der HRP- Reinigung Signalreduktionen unter 30%, während bei GPC\_MAX und ChemElut für einige Analyten stärkere Matrixeffekte auftraten (Abbildung 5.4.2).

Bei einigen Matrices wie Hopfen, Oliven oder Raps traten jedoch selbst nach intensiver Extraktreinigung beträchtliche Signalreduktionen auf (Abbildung 5.4.3). Obwohl ein Großteil der mitextrahierten Probenbestandteile durch die verschiedenen Prozesse eliminiert werden konnte, blieb ein Teil der störenden Substanzen mit ähnlichen physikalischen Eigenschaften wie die der Analyten im Extrakt zurück.

Die intensive Extraktreinigung zeigte dabei keine Vorteile gegenüber der einfachen Extraktreinigung mit SPE.

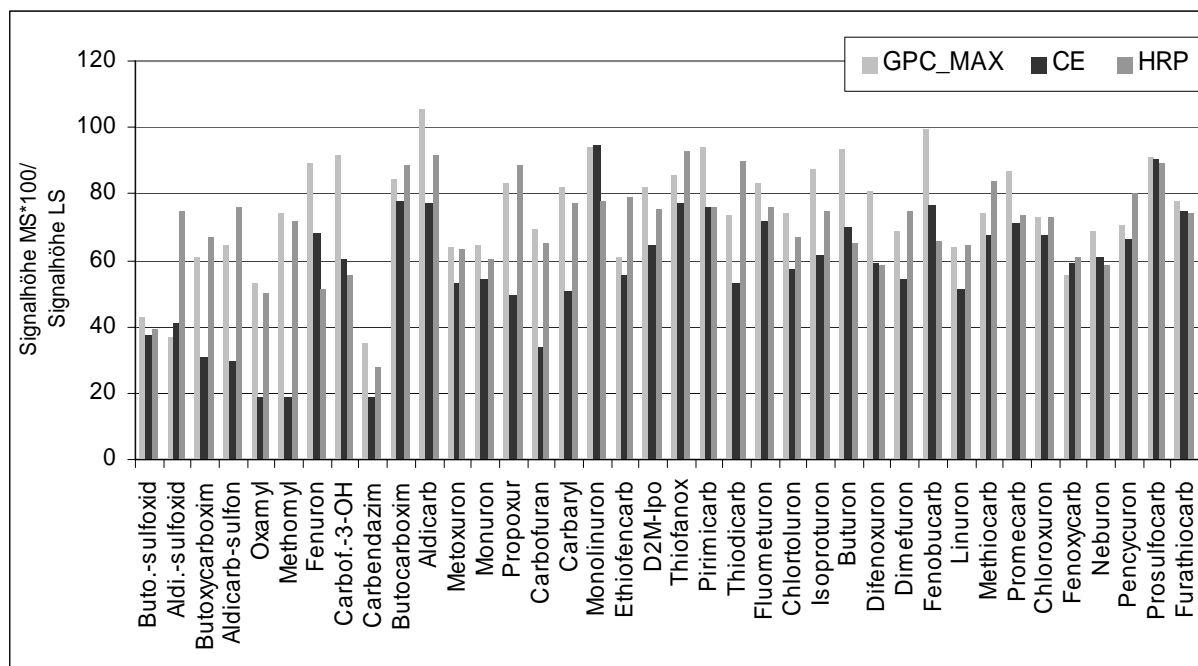


Abbildung 5.4.3: Vergleich der Matrixeffekte in Rapsextrakten, die nach verschiedenen Verfahren extrahiert und gereinigt wurden

#### 5.4.2.2 Vergleich von Extraktionslösungsmitteln

Die Reinigung mit SPE wurde in dieser Arbeit für Extrakte eingesetzt, die mit unterschiedlichen Lösungsmitteln vorbereitet wurden. Protische oder nicht protische Lösungsmittel können dabei verschiedene Begleitstoffe aus der Matrix extrahieren, wie der folgende Vergleich der Matrixeffekte zeigt. In der Abbildung 5.4.4 sind die Matrixeffekte nach Extraktion mit Acetonitril bzw. Methanol beispielweise für Weizenextrakte dargestellt.

Die Weizenproben wurden mit Acetonitril/Wasser 2:1, bzw. Methanol/Wasser 2:1 extrahiert. Die Aufreinigung der Extrakte erfolgte mit der HRP- Festphase, wobei für den Acetonitrilextrakt auch die C18- Phase eingesetzt wurde. Die Konzentration der Matrix in der Probe betrug 1 g/ml.

Diese Ergebnisse zeigten, dass die Matrixeffekte durch das Extraktionslösungsmittel beeinflusst werden können. Die Signalabnahme ist geringer, wenn die Extraktion mit einem protischen Lösungsmittel wie Methanol durchgeführt wird [112].

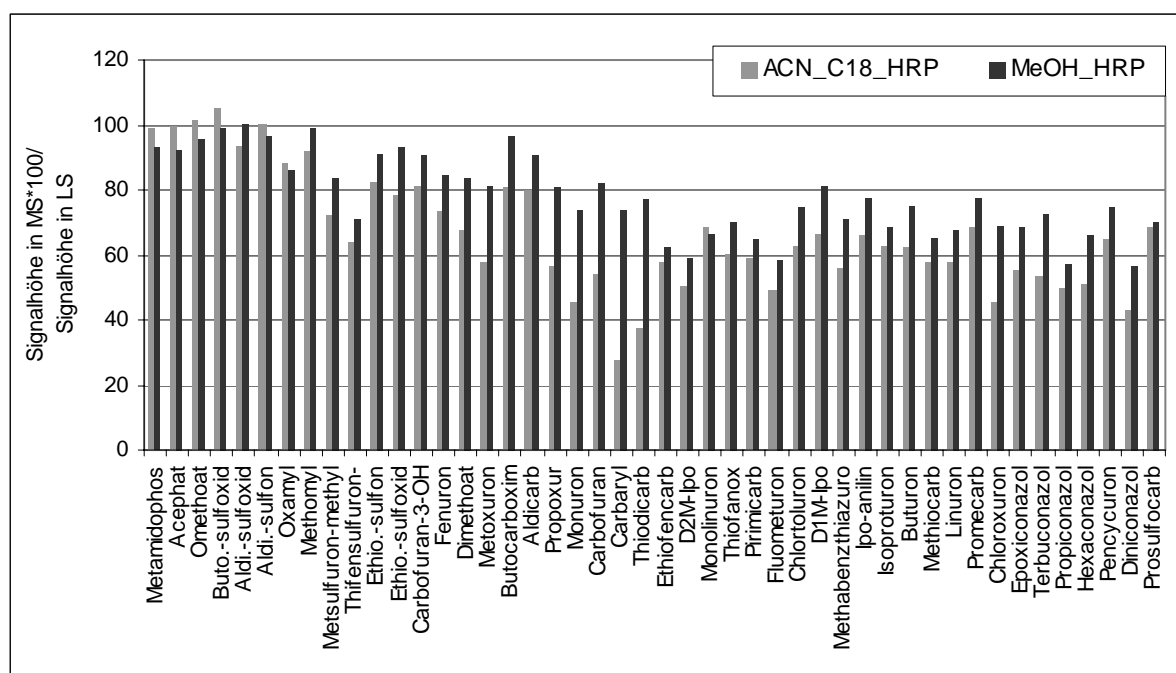


Abbildung 5.4.4: Vergleich der Matrixeffekte in Weizenextrakte, die mit Methanol bzw. Acetonitril extrahiert wurden

#### 5.4.2.3 Fettreiche Matrices

Für fettreiche Matrices bieten sich, wie im Kapitel 5.2 dargestellt, verschiedene Extraktions- und Aufreinigungsmöglichkeiten. Für Rapsproben wurden gute Ergebnisse bei der Extraktion mit reinem Methanol erzielt, wobei der hohe Fettgehalt in der Probe durch Aufreinigung auf der HRP- Festphase nicht ausreichend reduziert werden konnte. Für eine bessere Fettabtrennung wurde die C18- Festphase eingesetzt.

Im folgenden Experiment wurde die Effizienz einer zusätzlichen Aufreinigung von Rapsextrakten für die Vermeidung von Matrixeffekten untersucht.

10 g Rapsprobe wurden mit 30 ml Methanol extrahiert. Zwei HRP- Festphasen wurden jeweils mit 3 ml Methanol und 3 x 3 ml 0,1%-ige  $H_3PO_4$  konditioniert.

3 ml des Extraktes wurden mit 0,1%-ige  $H_3PO_4$  auf 50 ml verdünnt und auf HRP gereinigt. Eine C18- Kartusche wurde mit 5 ml Methanol und 5 ml Wasser konditioniert. Weitere 3 ml Rapsextrakt wurden zuerst auf die C18- Phase gegeben und aufgefangen. Im selben Gefäß wurde die C18- Phase mit 2 ml Methanol eluiert. Das gesamte Eluat wurde im Stickstoffstrom bei 30°C auf 1,5 ml aufkonzentriert, mit 0,1%-ige  $H_3PO_4$  auf 50 ml verdünnt und auf der HRP- Phase gereinigt. Die HRP- Festphasen wurden mit 3 ml 30% Methanol in Aceton und 1 ml Aceton eluiert. Die Eluate wurden im Stickstoffstrom komplett aufkonzentriert und in

1 ml Methanol / 10 mM Ammoniumacetat 1:1 aufgenommen. Die Proben wurden mit 100 ng pro Analyt gespikt und mit LC/MS/MS gegen einen Standard in Lösungsmittel vermessen.

Wie die Ergebnisse zeigten (Abbildung 5.4.5), ermöglicht die C18- Festphase eine zusätzliche Abtrennung der Matrixinhaltsstoffe, die sich im Sinne einer verringerten Signalreduktion im Vergleich zur Aufarbeitung ohne C18 auswirkt.

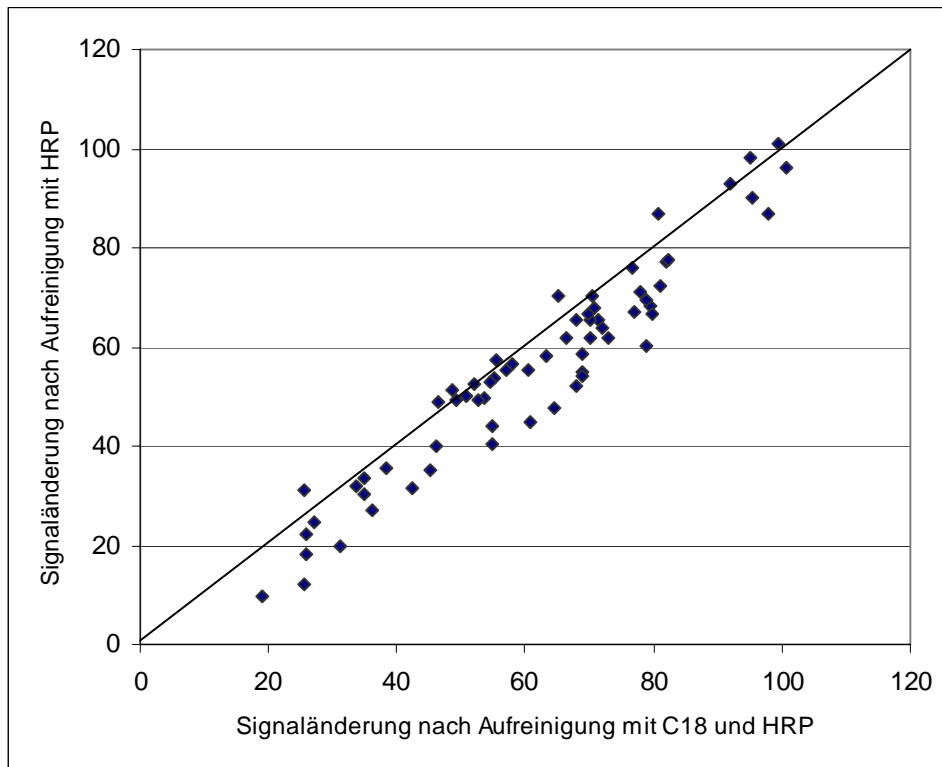


Abbildung 5.4.5: Vergleich der Matrixeffekte von Rapsextrakten, die mit C18 und HRP bzw. nur mit HRP gereinigt wurden

### 5.4.3 Quantifizierung über externe Standards

Entsprechend dieser Erkenntnisse ist die Kalibrierung über externe Standards für diese Methode nicht möglich, da die Verringerung des ESI- Response vom Analyten und von der Reinigung der Probe abhängig ist [160]. Die mitextrahierten Matrixbestandteile konnten durch die intensive Extraktreinigung nicht vollständig abgetrennt werden. Die im Extrakt verbliebenen Begleitstoffe verursachten weiterhin signifikante Signalreduktionen.

Es gibt wenige Literaturangaben über den Einsatz dieses Quantifizierungsverfahrens in einer Multimethode. Sie wurde z.B. von Di Corcia [40] für die LC/MS- Analyse von 12 Carbamaten in Obst und Gemüse eingesetzt.

Die Eliminierung der Matrixinterferenzen durch eine gezielte Optimierung des HPLC-Gradienten oder ihre Minimierung durch eine selektivere Extraktion [159] konnten in dieser Arbeit wegen der stark unterschiedlichen Matrices und der Vielzahl der Analyten nicht untersucht werden. Mit dem Einsatz einer längeren Säule wurden jedoch viel bessere Ergebnisse bei den polaren Substanzen erzielt.

#### 5.4.4 Quantifizierung über isotoopenmarkierte Standards

Durch den Einsatz isotoopenmarkierter Substanzen als interne Standards kann eine weitgehende Eliminierung der Auswirkungen der Matrixeffekte erreicht werden [159].

Wegen der identischen chemischen Struktur werden für interne Standards fast die gleichen Retentionszeiten wie für die untersuchten Analyten erreicht. So werden interner Standard und Analyt im gleichen Maß durch Matrixkomponenten beeinflusst. Die Kalibrierung kann dann über Solventstandards durchgeführt werden [129].

Für die verfügbaren isotoopenmarkierten Wirkstoffe (Tabelle 5.4.2) wurden die möglichen Vor- und Nachteile dieser Methode untersucht. Die isotoopenmarkierten Substanzen wurden bei den Validierungsarbeiten eingesetzt.

Die 3 ml Extraktaliquote wurden vor der Verdünnung mit der 0,1%igen  $H_3PO_4$  - Lösung jeweils mit 25 ng pro markierten Analyten gespikt. Die Wiederfindungsraten der 11 Substanzen wurden über die Standards im Lösungsmittel berechnet.

Tabelle 5.4.2 Verwendete isotoopenmarkierte Substanzen

ESI+	ESI-
Carbaryl- $^{13}C_6$	2,4,5-T- $^{13}C_6$
Carbofuran- $^{13}C_6$	2,4-D- $^{13}C_6$
Chlortoluron-D6	Bromoxynil- $^{13}C_6$
Diuron-D6	Dichlorprop- $^{13}C_6$
Isoproturon-D6	Diuron-D6
Monuron-D6	Pentachlorphenol- $^{13}C_6$



Für die isotopenmarkierten Substanzen und die entsprechenden Analyten wurden gleiche oder sehr ähnliche Matrixeffekte beobachtet (Abbildung 5.4.6). Durch die Berechnung über interne Standards konnten daher richtige Analysenergebnisse erzielt werden, ohne Matrixstandards herstellen zu müssen. Durch den Einsatz von isotopenmarkierten Substanzen konnte die Reproduzierbarkeit der Analysenmethode allerdings nicht verbessert werden. Für beide Quantifizierungsmethoden wurden relative Standardabweichungen von maximal 10% berechnet.

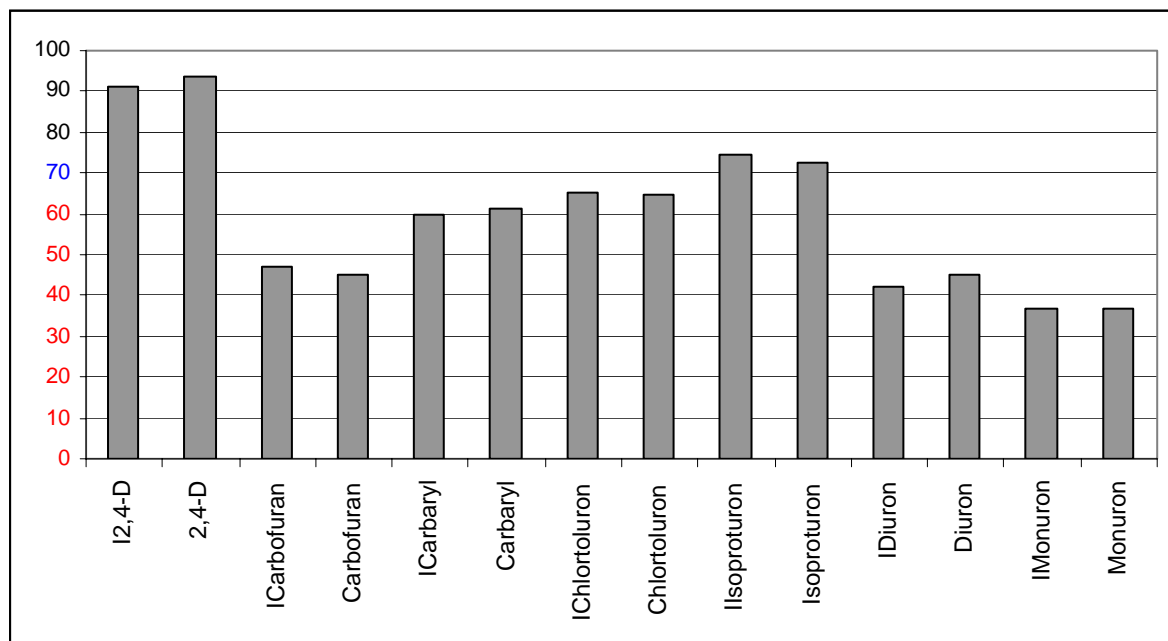


Abbildung 5.4.6 Vergleich der Matrixeffekte auf Analyten und isotopenmarkierten Substanzen (I) in einem Avocadoextrakt

Diese Methode konnte nur für wenige Analyten eingesetzt werden, da zur Zeit nur eine geringe Zahl isotopenmarkierter Wirkstoffe erhältlich ist. Aufgrund der durch einzelne Matrixkomponenten zu verschiedenen Elutionszeiten verursachten Ionensuppressionen wäre es weiterhin nicht ausreichend, einen markierten Standard für eine Pestizidgruppe zuzusetzen. Ebenfalls müsste der in der Probe zu erwartende Konzentrationsbereich berücksichtigt werden. Diese Methode wäre somit weder kostengünstiger noch weniger laborintensiv als die Kalibrierung über Matrixstandards.

Für den Einsatz dieser Quantifizierungsmethode gibt es weitere Einschränkungen. Die nicht ausreichende Isotopenreinheit und die Kontamination des markierten Analyten durch unmarkiertes Material stellen eine weitere Limitierung für hochempfindliche Analysen dar.

Auch wenn die Isotopenreinheit 99,9 % beträgt und der Gehalt des unmarkierten Material unter 0,1 % liegt, kann der isotonenmarkierte Standard besonders bei niedrigen Konzentrationen die Peakfläche (oder die Peakhöhe) des Analyten signifikant beeinflussen. Wenn die Stabilität des markierten Materials (deuteriert) nicht gewährleistet ist, können während der Probenaufarbeitung acide Deuteriumionen abspalten.

In solchen Fällen sollten strukturähnliche Substanzen eingesetzt werden, was wiederum eine genaue Bestimmung der Matrixeffekte verlangt [159]. Zöllner et al. [161] empfehlen auch den Einsatz strukturähnlicher Substanzen als interne Standards. Dabei muss aber erreicht werden, dass die betreffenden Substanzen so zeitgleich wie möglich eluieren, um eine maximale Kompensierung der Matrixeffekte zu ermöglichen.

#### **5.4.5 Quantifizierung über Matrixstandards**

Eine gute Möglichkeit, exakte Ergebnisse zu erzielen, ist die Kalibrierung über Matrixstandards, wobei die Kalibrierlösung in einem nicht belasteten Extrakt der zu untersuchenden Matrix angesetzt wird. Damit erfolgt die Signalunterdrückung in Probe und Kalibrierstandard gleichermaßen. Es können aber keine allgemein gültigen Regressionskurven benutzt werden, um sichere Daten in unterschiedlichen Matrizes zu bekommen, weil diese Effekte sehr stark variieren können.

Standard und Probe müssen eine sehr ähnliche Komposition aufweisen, damit eine komplette Vermeidung der Matrixeffekte erreicht werden kann. Deswegen sollten entsprechende Messstandards für jede einzelne Matrix vorbereitet werden [161]. Es ist eine arbeitsaufwendige Vorgehensweise, und oft steht die passende „reine“ Matrix nicht zur Verfügung [129]. Auch ergaben die Untersuchungen von Mol et al. [112], dass die Matrixeffekte nicht nur von der Matrixart und der Probenaufarbeitung, sondern auch durch das Messinstrument und das eingesetzte Interface beeinflusst werden.

Diese Quantifizierungsmethode wird in der LC/MS/MS- Analyse von Pestizidrückständen oft eingesetzt.

Taylor et al. [12] haben ein Aufbereitungsverfahren für 38 Pestizide mit Matrixstandards validiert, das auf der Extraktion mit Ethylacetat und einfacher Filtration des Extraktes basiert. Die Quantifizierung über Matrixstandards war auch für instabile Analyten wie Aldicarb, Butocarboxim und Thiophanat-methyl erfolgreich.

Ein ähnliches Verfahren wurde von Jansson et al. [113] für die Bestimmung von Benzimidazolen, Carbamaten und Organophosphor- Verbindungen in Obst und Gemüse eingesetzt. Für insgesamt 57 Analyten und 7 verschiedenen Matrixgruppen wurden Matrixeffekte unter 30 % festgestellt, mit relativen Standardabweichungen von 23%. Die Validierung der LC/MS/MS- Analysenmethode mittels Matrixstandards wurde von Zrostlikova et al. für polare Pestiziden in Äpfel und Aprikosen [75], von Blasco et al. für Fungiziden in Obst und Gemüse [109] und von Alder und Klein für über 100 Pestiziden in Erntegütern [43] durchgeführt.

Die Leitlinie zur Rückstandsanalysenmethoden für die Überwachung [162] empfiehlt den Einsatz von Matrixstandards bei der Validierung von Multimethoden, wenn die Wiederfindungsraten aufgrund von Störwirkungen durch die Matrix außerhalb des zulässigen Bereiches liegen.

Auch in dieser Arbeit wurden die Wiederfindungsraten der Analyten über Matrixstandards berechnet. Die Methode war deutlich aufwendiger, führte aber zu guten Ergebnissen, die im folgenden Kapitel dargestellt werden.

## 5.5 Validierung der Methode

Zur Beurteilung eines Analysenverfahrens werden allgemein gültige Größen benötigt, die den objektiven Vergleich mit anderen Verfahren und Methoden ermöglichen. Wiederfindungsraten und Verfahrensvariationskoeffizienten  $V_{ko}$  (relative Verfahrensstandardabweichung) sind zwei wichtige Verfahrensmerkmale. Diese Kenngrößen müssen mit der kompletten Probenaufarbeitung und anschließenden Quantifizierung für jeden einzelnen Analyten bestimmt werden.

Zur Validierung der Methode wurden sämtliche Matrices mit zwei Aufstockniveaus à 6 Wiederholungen auf die Analyten analysiert. Das untere Niveau lag im Bereich der niedrigsten Grenzwerte der RHmV [3] bei 10 µg/kg, das obere bei 100 µg/kg.

Die Anforderungen für die Validierung von Multimethoden sind in der Leitlinie zur Rückstandsanalysenmethoden für die Überwachung beschrieben [162]:

- Bei jedem Zusatzniveau und Substrat soll die mittlere Wiederfindungsrate im Bereich von 70 – 110% liegen.
- Die Wiederholbarkeit soll durch die relative Standardabweichung (%) und die Anzahl der Proben (n) ausgedrückt werden. Die relative Standardabweichung soll im allgemeinen  $\leq 20\%$  betragen.
- Die Bestimmungsgrenzen müssen deutlich unterhalb des niedrigsten Grenzwertes der RHmV [3] liegen. Die Blindwerte sollen 30% der Bestimmungsgrenze nicht überschreiten.

### 5.5.1 Methodenvorschrift

Die Validierung umfasste folgende Aufarbeitungs- und Bestimmungsverfahren.

Die Probe wurde mit der Labormessermühle bei einer Drehzahl von 4000 Umdrehungen/min für 2 Minuten vorzerkleinert und vorhomogenisiert. 10 g Probe wurden in ein 75 ml Zentrifugenglas eingewogen, mit 100 bzw. 1000 ng pro Analyt gespikt und 30 Minuten ruhen gelassen. Dazu wurde dann soviel Wasser gegeben, dass mit dem Wasser in der Probe ein Volumen von 10 ml erreicht wurde. 20 ml Methanol wurden zugegeben und das Probenmaterial 4 Minuten mit dem Dispergiergerät bei 11000 Umdrehungen/min zu feinsten Partikeln zerkleinert und Probe und Lösungsmittel intensiv miteinander gemixt. Die Probe

wurde dann 10 Minuten bei 9000 Umdrehungen/min und 18°C zentrifugiert. Vom klaren Methanol/Wasser- Extrakt wurde ein Aliquot von 3 ml entnommen und mit 25 ng pro internen Standard gespikt, dann mit 0,1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> in Wasser in einem Messkolben auf 50 ml verdünnt.

Die HRP- Kartusche wurde auf die Vakuumbbox gesetzt und mit 3 ml Methanol und 3 x 3 ml 0,1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> konditioniert. Durch das Zuschrauben des Ventils wurde nach den ersten 6 ml 0,1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> der Durchfluss abgebrochen. Der Kolben mit der Probe wurde mittels Adapter und Kunststoffschlauch mit der Kartusche verbunden. Das Ventil wurde geöffnet, die Wasserstrahlpumpe angeschlossen und die Probe mit einem Druck von 4-5 mm Hg durch die Festphase gesaugt. Wenn fast die ganze Probe durchgelaufen war, wurde das Ventil geschlossen, 10 ml 5% Methanol in 0,1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> zum Waschen der Kartusche in dem Kolben gegeben und ebenfalls durchgesogen. Die Kartusche wurde anschließend etwa 15 Minuten unter Stickstoffstrom getrocknet.

Die Elution erfolgte mit 3 ml 30% Methanol in Aceton und 1 ml Aceton. Das Eluat wurde in einem Reagenzglas (5 ml) aufgefangen und bei 30°C mit Stickstoff langsam aufkonzentriert. Der Rückstand wurde in 500 µl Methanol aufgenommen und, falls nötig, im Ultraschallbad kurz aufgelöst. 500 µl 10 mM NH<sub>4</sub>Ac wurden dazu gegeben, die Probe gemischt und in ein Messvial überführt.

Nach demselben Verfahren wurde je eine Leerprobe pro Matrix aufgearbeitet, vor dem Überführen ins Messvial mit der entsprechenden Menge an Standardmischung gespikt und als Matrixstandard verwendet.

Die Extraktion fettreicher Matrices, wie Raps und Avocado erfolgte ohne Wasserzugabe. 10 g Raps wurden mit 30 ml Methanol versetzt und wie oben beschrieben extrahiert und zentrifugiert. Die 10 g Avocadoproben wurde mit 20 ml Methanol und 3 ml Acetonitril extrahiert.

Eine C18- Kartusche wurde mit 5 ml Methanol und 5 ml Wasser konditioniert. 3 ml Extrakt wurden aufgetragen und in einem birnenförmigen markierten Kolben aufgefangen. Die Festphase wurde mit 3 ml Acetonitril eluiert, die in demselben Kolben aufgefangen wurden. Die Probe wurde bei 30°C unter Stickstoffstrom auf 1,5 ml eingeengt und mit 0,1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

auf 50 ml verdünnt. Dann wurde wie oben beschrieben mit der HRP- Anreicherung fortgefahren.

In der Abbildung 5.5.1 ist das entwickelte Aufarbeitungsschema für die Bestimmung polarer Analyten in Erntegütern dargestellt.

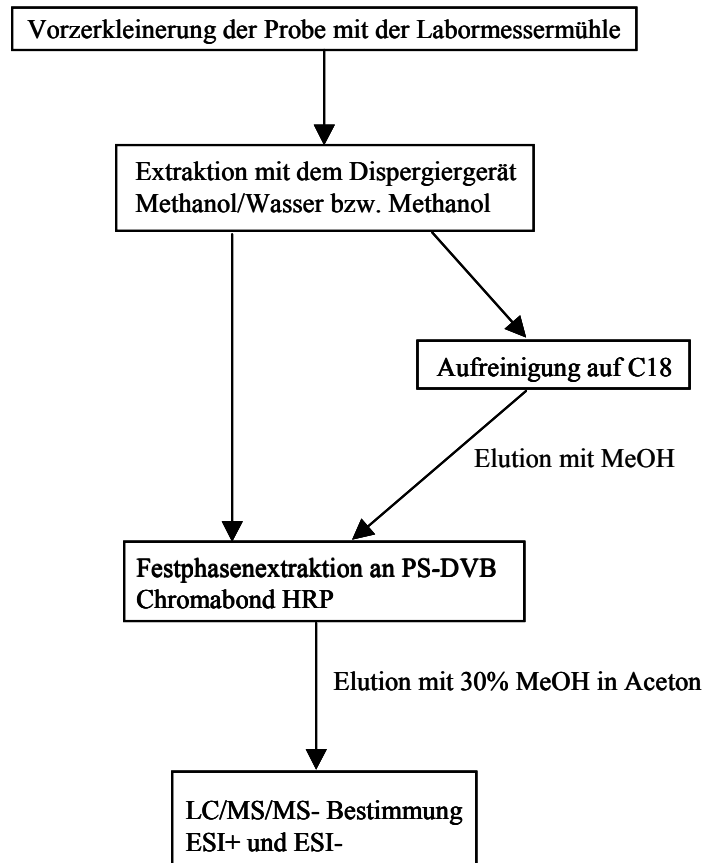


Abbildung 5.5.1 Aufarbeitungsschema

Die Matrixkonzentration in der Endprobe betrug 1 g/ml, die Standardkonzentration 10 bzw. 100 ng/ml. Die Proben wurden mittels LC/ESI-MS/MS im positiven und negativen Modus analysiert. Die Trennung der Analyten erfolgte an einer Synergi MAX-RP (C12) 150 x 4,6 mm 4  $\mu$  - Säule, mithilfe eines Methanol / 10 mM NH<sub>4</sub>Ac- Gradienten, bei einem Fluss von 300  $\mu$ l/min. Der Gehalt an Methanol wurde in 5 Minuten von 20 % (im positiven Ionisierungsmodus) bzw. 40 % (im negativen Ionisierungsmodus) auf 70% Methanol erhöht, dann in 10 min auf 100 % gebracht. Nach weiteren 2 Minuten bei 100 % wurde der Methanolanteil innerhalb einer Minute auf die Anfangsbedingungen gebracht, und die Säule 7 Minuten lang für die Analyse der nächsten Probe equilibriert. Die verwendeten Ionisierungsparameter sind in der Tabelle 5.1.1 (Seite 47) dargestellt. Die registrierten Massenübergänge, die

Retentionszeiten und die Detektionsparameter der Analyten sind in den Tabellen 5.1.2 (Seite 53) und 5.1.3 (Seite 56) zusammengefasst.

### **5.5.2 Analytische Kenngrößen und statistische Bewertung**

Für die Beurteilung der Qualität eines quantitativen Analysenverfahrens werden eine Reihe von Kenndaten verwendet, wie Präzision und Richtigkeit sowie die Nachweis- und Bestimmungsgrenze.

Die Auswertung der Daten wurde automatisch mit der Analyst-Software durchgeführt. Nach Überprüfung der Ergebnisse und, wenn nötig, manueller Korrektur der Basislinie, wurden die Ergebnisse in Excel ausgewertet und die Dateien als Excel-Files gespeichert. Diese Dateien enthielten die Namen der untersuchten Substanzen, Massenübergänge, Retentionszeiten, Peakhöhen, Peakflächen und Signal/Rausch-Verhältnisse. Somit konnte die Stabilität der Methode laufend überprüft werden. Mit diesen Dateien wurden die Bestimmungsgrenzen, die Wiederfindungsraten und die relativen Standardabweichungen berechnet.

#### *5.5.2.1 Bestimmungsgrenzen und Blindwerte*

Die Bestimmungsgrenzen der Analysenmethode wurden in dieser Arbeit durch das Signal/Rausch-Verhältnis und zum Vergleich im Falle der besonders schwierigen Rapsmatrix mit den Bestimmungsgrenzen nach der Leerwertmethode ermittelt.

Das Signal/Rausch-Verhältnis wurde von der zur Verfügung stehenden Software automatisch berechnet. Aus dem Neunfachen des Signal/Rausch-Verhältnisses wurden mit den Kalibrierstandards die Bestimmungsgrenzen errechnet.

Zur Ermittlung der Bestimmungsgrenze nach der Leerwertmethode wurden 10 Rapsproben mit einer Konzentration von 1 g/ml vorbereitet und mittels LC/ESI-MS/MS in beiden Ionisierungsmodi analysiert. Aus den Standardabweichungen der Blindwerte wurden dann die Bestimmungsgrenzen berechnet.

Die auf diese Weise ermittelten Werte sind in der Tabelle 5.5.1 beispielhaft für einige Analyten und Matrices dargestellt.

Tabelle 5.5.1 Bestimmungsgrenzen der Analysenmethode, berechnet über das Signal/Rausch-Verhältnis bzw. durch die Leerwertmethode

Übergang	Modus	Analyt	Bestimmungsgrenzen [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]					Leerwert-Methode
			Apfel	Erdbeere	Reis	Tomate	Raps	
326.0 / 326.0	SIR	Bifenox	4,3	6,1	5,3	4,5	3,9	2,6
326.0 / 282.0	MRM	Bifenox	0,4	0,4	0,7	0,4	0,6	0,4
193.0 / 193.0	SIR	D1M-Isoproturon	1,1	1,3	2,1	1,1	1,8	2,6
193.0 / 94.0	MRM	D1M-Isoproturon	0,5	0,3	0,5	0,5	0,4	0,2
233.0 / 233.0	SIR	Fluometuron	1,2	0,6	1,2	0,6	1,6	4,0
233.0 / 72.0	MRM	Fluometuron	0,5	0,4	0,5	0,4	0,5	0,3
199.0 / 199.0	SIR	MCPA	0,7	0,5	0,8	0,5	1,1	0,8
201.0 / 143.0	MRM	MCPA	0,4	0,5	0,5	0,9	0,5	0,4

Durch die zwei Ermittlungsmethoden wurden relativ ähnliche Bestimmungsgrenzen errechnet, außer für weniger polaren Analyten in fettreichen Matrices. Die Signalintensität dieser Analyten wird besonders durch mitextrahierte unpolare Matrixinhaltsstoffen verringert. Bei den untersuchten Substanzen traten starke Empfindlichkeitsunterschiede zwischen Single Ion Recording (SIR), in dem nur einmal ionisiert und nur ein Ion selektiert wurde und Multi Reaction Monitoring (MRM) auf. Die Bestimmungsgrenzen im SIR- Modus waren aufgrund geringerer Selektivität erheblich höher als im MRM- Modus.

Sämtliche ermittelte Bestimmungsgrenzen lagen zwischen 0,03 und 8,67  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Der niedrigste RHmV- Grenzwert ist aber 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , und gilt für Bifenox, Ethoprophos, Flusilazol, Hexaconazol, Isoproturon, Methamidophos, Methiocarb, Thiabendazol und Thiofanox. Für diese Analyten, außer Bifenox, wurden Bestimmungsgrenzen zwischen 0,30 und 2,56  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ermittelt. Die etwas höhere Bestimmungsgrenze des Bifenox, 8,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , wurde durch die geringere Signalintensität verursacht. Diese Daten bezeugen, dass die entwickelte Methode für Rückstandanalysen in Lebensmitteln eine ausreichende Empfindlichkeit aufweist.



### 5.5.2.2 Wiederfindungsraten und Wiederholbarkeit

Die Wiederfindungsraten wurden mittels Matrixstandards berechnet.

Aus den Werten von 6 Wiederholungen wurden die durchschnittlichen Wiederfindungsraten und die Standardabweichungen errechnet.

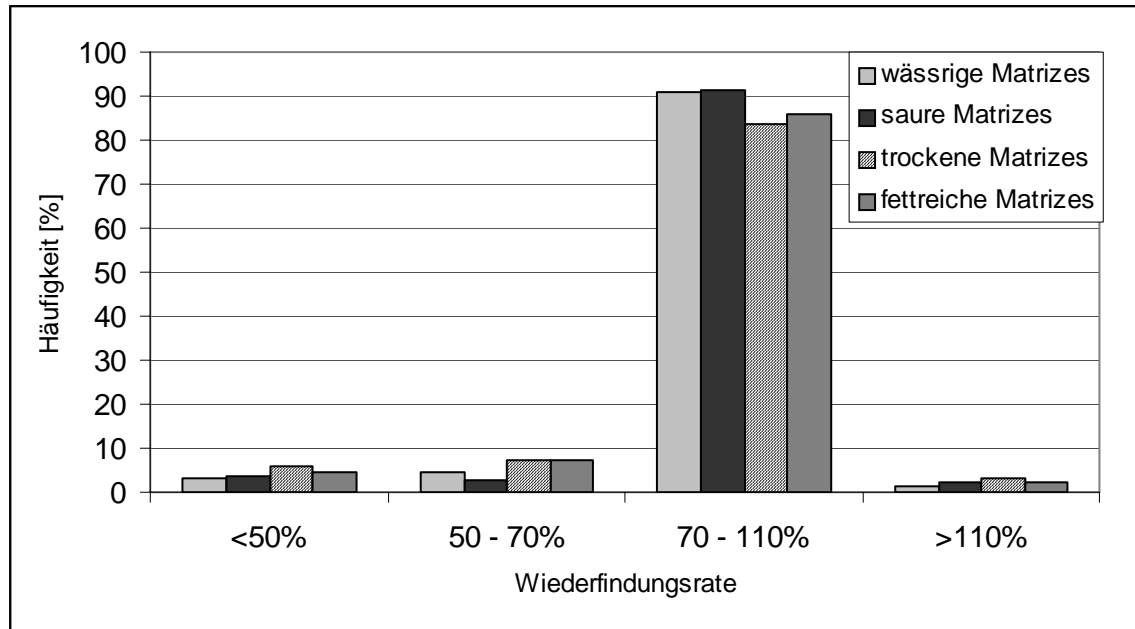


Abbildung 5.5.2 Wiederfindungsraten der 101 Analyten bei 2 Zusatzniveaus (0.01 µg/kg und 0.1 µg/kg)

Die erzielten Wiederfindungsraten, die über Matrixstandards berechnet wurden, sind in der Abbildung 5.5.2 zusammengefasst. In der Tabelle 5.5.3a und 5.5.3b sind die Ergebnisse dargestellt, die für das 10 µg/kg- Zusatzniveau erzielt wurden. Die mittleren Wiederfindungsraten und relativen Standardabweichungen für alle 101 Analyten und 10 Matrizes sind in der Tabelle 5.5.3.a enthalten.

Wie in der Abbildung 5.5.2 zu sehen, wurden in einigen Fällen Wiederfindungsraten erzielt, die außerhalb des zugelassenen Bereiches von 70-110% lagen. Sie wurden hauptsächlich durch Zersetzung und nicht ausreichenden Retardierung der Analyten verursacht.

Für Aldicarb, Butocarboxim, Carbofuran und Furathiocarb wurde im Gegensatz zu Ethiofencarb, Thiodicarb und Thiophanat-methyl eine relativ niedrige Metabolisierung beobachtet, was den schonenden Charakter des entwickelten Aufarbeitungsverfahrens unterstreicht. Aldicarb, Butocarboxim und Ethiofencarb können zu Sulfonen und Sulfoxiden

oxidiert werden, während Carbofuran 3-Hydroxy-Carbofuran bildet. Furathiocarb wird zu Carbofuran umgewandelt und Thiodicarb zu Methomyl. Thiophanat-methyl ist eine sehr instabile Substanz, die unter anderem [43] zu Carbendazim metabolisiert.

Trotzdem haben die meisten dieser Umwandlungsprozesse eine genaue Quantifizierung der Rückstände nicht beeinträchtigt, weil die Rückstandsdefinitionen der RHmV [3] die Bestimmung des Mittelwertes der Wiederfindungsraten von Ausgangssubstanz und Metaboliten vorschreiben. Die Tabelle 5.5.3 beruht demzufolge auf der mittleren Wiederfindungsrate als Rückstandsdefinition für Aldicarb, Butocarboxim, Buturon, Carbendazim, Ethiofencarb, Diuron, Isoproturon und Methomyl.

Trotz der signifikanten Zersetzung einiger Analyten während der Aufarbeitung wurde die Quantifizierung der Ergebnisse nicht negativ beeinträchtigt, da sich die Matrixstandards als ausreichend stabil gezeigt haben.

Die geringen Wiederfindungsraten für Pirimicarb in Avocado, Grünkohl und Zitrone werden auch durch Metabolisierung verursacht, doch wurden die Umwandlungsprodukte dieser Substanz, Desmethyl-Pirimicarb und Desmethyl-formamido-Pirimicarb [3] in dieser Arbeit nicht untersucht.

Fenoxaprop ist unter sauren Bedingungen instabil und wird nach der Anreicherung der Proben auf der HRP- Festphase nicht quantitativ wiedergefunden.

Acephat, Dalapon und Methamidophos sind sehr polar und werden bei der Aufreinigung der Extrakte auf der Festphase nicht ausreichend retardiert. Propamocarb und Imazalil sind basisch und liegen während der Anreicherung bei einem pH-Wert von 2 zum größten Teil ionisiert vor. Sie werden durch die unpolare Festphase nicht ausreichend retardiert und damit oft nicht zu 100 % angereichert.

Besonders für das 10 µg/kg - Zusatzniveau wurden Wiederfindungsraten unter 70%, vor allem aber relative Standardabweichungen über 20 % aufgrund von Ionensuppression und geringer Signalintensität festgestellt, wie z.B. für Neburon, Linuron und Monolinuron. Auf dem 100 µg/kg - Niveau waren die Kenndaten dieser Analyten dagegen zufriedenstellend. Auch die Wiederfindungsraten von Cyprodinil und Ioxynil lagen in 5 Fällen unter 70%, wegen Zersetzung bzw. Ionensuppression.

Für sehr polare Analyte wie Aldicarb-sulfoxid und Butocarboxim-sulfoxid wurden in den Rapsproben für beide Zusatzniveaus niedrigere Wiederfindungsraten erzielt, wie auch für Omethoat in den 100 µg/kg- Proben. Die quantitative Anreicherung dieser Substanzen wurde in diesem Fall dadurch verhindert, dass Begleitstoffe aus der Matrix, hauptsächlich Fett, die Festphase während der Anreicherung belegten.

Für etwa 90% von allen untersuchten Wirkstoff/Matrix- Kombinationen wurden Wiederfindungsraten zwischen 70-110 % erzielt, mit relativen Standardabweichungen unter 20 %. Somit erfüllt die entwickelte Analysenmethode, für diese Substanzen, die Bedingungen einer Überwachungsmethode [162].

Tabelle 5.5.3a Wiederfindungsdaten<sup>a</sup> der 101 untersuchten Analyten

Analyt	Apfel		Avocado		Erdbeere		Grünkohl		Pfirsich		Mittelwerte gesamt <sup>c</sup>	
	WFR %	RSA % <sup>b</sup>	WFR %	RSA %	WFR %	RSA %	WFR %	RSA %	WFR %	RSA %	WFR %	RSA %
2,4,5-T	99	16	85	12	78	11	82	9	99	5	91	9
2,4-D	105	11	99	9	106	13	107	8	105	11	94	9
2,4-DB	81	13	89	11	93	13	95	13	104	10	94	10
Acephat	70	5	103	16	70	23	69	10	62	9	62	12
Acifluorfen	89	9	92	14	107	15	103	11	92	17	92	9
Aldicarb	82	10	97	21	82	3	100	7	95	7	93	9
Aldicarb-sulfoxid	103	5	99	9	115	18	106	11	101	6	100	8
Aldoxycarb	109	6	112	16	101	10	99	8	108	4	99	10
Summe 3 <sup>d</sup>	98	7	102	15	99	10	102	9	101	6	97	9
Azoxystrobin	90	9	105	14	101	9	101	10	98	3	93	8
Benazolin	94	11	95	15	103	15	102	13	102	17	97	12
Bifenox	95	18	94	12	100	14	105	18	83	15	89	11
Bromoxynil	90	11	87	5	101	10	96	5	81	4	89	7
Butocarboxim	85	10	77	9	99	18	97	2	94	4	90	9
Butocarboxim-sulfoxid	109	7	99	32	112	6	110	9	108	5	100	9
Butoxycarboxim	100	5	97	14	102	14	107	12	108	6	99	9
Summe 3 <sup>d</sup>	98	8	91	18	104	13	105	7	104	5	96	9
Buturon	104	5	102	13	103	10	90	9	105	9	99	8
Monolinuron	95	9	95	16	101	11	108	8	101	8	95	10
Monuron	99	6	100	8	104	9	92	6	104	2	97	8
Summe 3 <sup>d</sup>	99	7	99	13	103	10	97	8	103	6	97	9
Carbaryl	97	13	110	15	103	3	100	8	107	6	101	7
Carbendazim	102	8	120	7	102	10	85	4	116	5	91	8
Thiophanat methyl	48	16	20	20	89	13	92	14	42	18	72	13
Summe 2 <sup>d</sup>	75	12	70	14	95	11	88	9	79	11	82	10
Carbofuran	102	7	104	5	99	10	104	8	101	4	99	7
Carbofuran-3-hydroxy	99	5	93	5	110	14	107	11	109	10	97	8
Summe 2 <sup>d</sup>	101	6	98	5	105	12	106	9	105	7	98	8
Chloroxuron	100	2	88	13	105	7	59	9	101	3	93	6

Tabelle 5.5.3a (Fortsetzung)

Analyt	Apfel		Avocado		Erdbeere		Grünkohl		Pfirsich		Mittelwerte gesamt	
	WFR %	RSA %	WFR %	RSA %	WFR %	RSA %	WFR %	RSA %	WFR %	RSA %	WFR %	RSA %
Chlortoluron	94	6	101	14	85	10	102	4	106	3	97	7
Cyprodinil	91	9	60	10	97	14	87	15	101	5	81	10
Dalapon	56	14	73	12	72	13	93	12	57	12	65	12
DDA	100	9	104	8	106	12	89	12	100	9	93	8
Dicamba	101	20	91	11	101	16	106	15	82	17	95	11
Dichlorprop	96	11	105	8	103	16	99	13	102	4	98	7
Diclofop	88	15	80	11	99	12	97	17	92	6	90	9
Difenoconazol	99	9	77	8	86	7	91	5	95	7	90	7
Difenoxuron	97	4	103	12	101	5	101	4	100	5	98	6
Diflubenzuron	103	16	82	17	100	17	104	11	99	3	96	10
Dimefuron	102	5	109	9	104	8	107	7	102	5	98	7
Dimethoat	100	3	102	8	105	9	94	6	106	8	100	7
Diniconazol	88	6	81	15	96	7	87	7	99	3	90	7
Dinoseb	73	5	75	12	73	9	80	6	79	3	80	6
Dinoterb	72	5	75	11	72	14	81	4	72	2	77	6
Diuron	95	6	101	15	109	7	97	12	106	3	100	6
D1M-Diuron	97	4	92	15	108	6	102	6	102	2	98	5
D2M-Diuron	90	9	85	9	101	7	94	6	104	2	92	7
Linuron	86	10	105	13	109	19	103	15	105	6	100	12
Neburon	95	7	84	19	108	9	106	8	100	8	92	9
Summe 5 <sup>d</sup>	93	7	93	14	107	10	100	9	103	4	97	8
Epoxiconazol	91	7	90	14	104	8	96	14	100	5	95	8
Etaconazol	98	6	102	12	99	11	94	12	98	4	95	7
Ethiofencarb	60	10	22	22	74	12	106	9	58	9	74	11
Ethiofencarb sulfon	91	5	104	13	103	12	84	9	104	5	97	8
Ethiofencarb sulfoxid	136	12	158	11	124	10	103	6	148	7	121	10
Summe 3	95	9	95	16	101	11	98	8	104	7	97	10
Ethoprophos	90	9	97	6	87	15	94	7	101	4	93	8
Fenhexamid	102	12	86	18	101	16	106	18	104	11	98	11

Tabelle 5.5.3a (Fortsetzung)

Analyt	Apfel		Avocado		Erdbeere		Grünkohl		Pfirsich		Mittelwerte gesamt	
	WFR %	RSA %	WFR %	RSA %	WFR %	RSA %	WFR %	RSA %	WFR %	RSA %	WFR %	RSA %
Fenobucarb	97	5	94	10	96	15	104	5	100	6	97	8
Fenoprop	92	11	108	13	109	11	86	8	101	9	94	8
Fenoxaprop	34	15	88	16	36	14	95	16	77	11	70	11
Fenoxycarb	80	3	70	15	103	10	91	5	100	6	91	8
Fenuron	104	5	94	4	109	9	93	4	103	8	99	7
Flamprop	101	13	107	9	96	7	107	18	102	10	97	9
Fluazifop	92	11	97	6	101	14	102	5	101	7	95	9
Fludioxonil	101	10	77	6	104	9	88	6	104	3	94	7
Fluometuron	97	6	105	8	108	14	102	6	108	4	95	7
Flusilazol	98	3	97	16	106	8	95	8	100	5	94	7
Furathiocarb	88	11	59	12	94	9	83	5	104	9	87	8
Haloxyfop	93	14	102	10	100	10	101	17	100	6	97	10
Hexaconazol	103	5	82	12	106	8	97	5	101	2	94	7
Hexaflumuron	86	14	70	12	94	15	83	14	87	3	84	9
Imazalil	86	11	48	17	88	8	81	6	105	3	73	8
Imidacloprid	107	11	93	13	102	20	95	10	105	12	97	11
Ioxynil	74	4	84	7	86	10	61	11	59	6	76	6
Isoproturon	101	4	103	12	108	12	109	4	104	4	101	5
Isopropylanilin	45	18	84	12	107	23	80	17	110	7	70	12
D1M-Isoproturon	91	9	85	12	109	8	105	6	98	3	92	9
D2M-Isoproturon	78	13	70	18	97	12	98	6	92	5	87	9
Summe 4 <sup>d</sup>	79	11	86	14	105	14	98	8	101	4	87	9
MCPA	92	8	86	12	104	11	95	13	99	6	94	7
MCPB	106	13	108	12	101	15	99	14	102	6	100	10
Mecoprop	94	6	100	10	105	9	101	6	101	6	97	6
Metamidophos	14	16	29	35	13	3	28	34	12	19	15	20
Methabenzthiazuron	104	6	98	15	106	9	96	5	99	4	99	6
Methiocarb	91	9	93	19	108	11	103	4	101	5	95	9
Methomyl	104	10	132	19	105	5	118	8	104	3	117	8
Thiodicarb	94	11	22	28	90	9	26	19	102	3	72	11

Tabelle 5.5.3a (Fortsetzung)

Analyt	Apfel		Avocado		Erdbeere		Grünkohl		Pfirsich		Mittelwerte gesamt	
	WFR %	RSA %	WFR %	RSA %	WFR %	RSA %	WFR %	RSA %	WFR %	RSA %	WFR %	RSA %
Summe 2 <sup>d</sup>	99	10	77	24	97	7	72	14	103	3	95	10
Metoxuron	94	5	101	7	108	8	105	3	102	3	99	6
Metsulfuron-methyl	99	6	80	11	101	10	90	14	92	6	91	8
Omethoat	100	4	100	11	102	14	106	9	102	3	95	7
Oxamyl	98	6	94	14	109	11	103	9	99	4	96	9
PCP	80	5	78	6	89	5	86	5	81	3	80	5
Pencycuron	103	12	63	19	99	9	85	5	97	7	88	8
Pirimicarb	96	3	62	4	91	8	51	9	100	4	71	8
Promecarb	93	3	98	9	99	12	100	6	106	5	96	7
Propamocarb	74	6	25	13	63	13	40	8	44	6	37	11
Propiconazol	97	13	94	9	106	10	101	14	99	7	94	9
Propoxur	92	4	105	11	104	16	102	3	100	4	93	8
Prosulfocarb	85	18	62	12	85	11	86	10	78	9	80	11
Pyrimethanil	104	3	79	5	105	5	93	9	105	3	88	7
Quizalofop	86	6	104	11	101	10	107	15	98	10	91	11
Tebuconazol	98	10	91	14	97	8	91	8	101	6	90	8
Tebufenozid	93	14	63	12	95	8	75	9	85	4	84	10
Teflubenzuron	99	7	95	17	102	7	83	6	98	19	93	10
Thiabendazol	86	8	94	13	90	17	105	12	92	10	86	10
Thifensulfuron-methyl	93	11	84	17	105	13	101	10	104	10	94	8
Thiofanox	86	9	59	16	92	11	101	5	92	5	93	8
Triflumuron	97	7	72	7	102	6	108	6	98	5	93	7

<sup>a</sup> Zusatzniveau 10 µg/kg; n=6

<sup>b</sup> RSA relative Standardabweichung

<sup>c</sup> 2 Zusatzniveaus (10 µg/kg und 100 µg/kg), 10 Matrices und je 6 Wiederholungen

<sup>d</sup> mittlere Wiederfindungsrate der *n* Analyten

Tabelle 5.5.3b Wiederfindungsdaten<sup>a</sup> der 101 untersuchten Analyten

Analyt	Raps		Reis		Tomate		Weizen		Zitrone	
	WFR %	RSA % <sup>b</sup>	WFR %	RSA %	WFR %	RSA %	WFR %	RSA %	WFR %	RSA %
2,4,5-T	80	17	89	6	102	7	83	15	94	8
2,4-D	81	13	88	10	101	13	87	12	100	12
2,4-DB	92	11	86	7	106	14	91	13	96	13
Acephat	41	27	66	11	65	9	67	18	62	12
Acifluorfen	73	8	83	5	88	10	100	10	87	19
Aldicarb	94	9	93	7	90	10	93	10	110	7
Aldicarb-sulfoxid	77	13	111	10	104	8	102	17	105	4
Aldoxycarb	66	16	106	9	105	9	118	14	90	3
Summe 3 <sup>c</sup>	79	12	103	9	100	9	104	14	102	5
Azoxystrobin	95	11	92	8	93	11	88	9	99	6
Benazolin	94	15	69	10	102	8	104	11	104	17
Bifenox	94	10	102	14	87	17	77	15	80	13
Bromoxynil	81	14	74	8	96	14	79	12	90	10
Butocarboxim	90	15	99	11	65	10	91	16	94	7
Butocarboxim-sulfoxid	62	15	107	12	107	7	99	19	114	7
Butoxycarboxim	93	13	101	14	106	7	101	19	117	11
Summe 3 <sup>c</sup>	82	14	102	12	92	8	97	18	108	8
Buturon	97	8	92	15	101	8	85	19	106	7
Monolinuron	92	18	28	12	82	5	98	13	109	14
Monuron	91	19	99	19	90	5	93	14	103	9
Summe 3 <sup>c</sup>	93	15	73	15	91	6	92	15	106	10
Carbaryl	97	8	90	13	102	7	98	7	106	7
Carbendazim	90	19	99	11	92	10	93	15	92	4
Thiophanat methyl	54	9	84	11	108	6	80	10	107	10
Summe 2 <sup>c</sup>	72	14	91	11	100	8	87	13	100	7
Carbofuran	91	19	84	11	104	4	93	14	118	5
Carbofuran-3-hydroxy	79	17	104	11	97	8	100	10	77	8
Summe 2 <sup>c</sup>	85	18	94	11	101	6	97	12	98	6
Chloroxuron	89	7	86	11	97	9	86	12	101	5
Chlortoluron	97	6	89	13	88	5	89	9	107	8



Tabelle 5.5.3b (Fortsetzung)

Analyt	Raps		Reis		Tomate		Weizen		Zitrone	
	WFR %	RSA %	WFR %	RSA %	WFR %	RSA %	WFR %	RSA %	WFR %	RSA %
Cyprodinil	72	9	80	14	94	7	88	12	80	7
Dalapon	77	5	68	14	73	8	62	18	54	19
DDA	81	8	62	7	99	5	75	10	100	10
Dicamba	108	13	74	17	100	17	88	10	101	17
Dichlorprop	98	3	78	7	103	5	94	11	100	6
Diclofop	77	8	69	5	92	12	87	9	86	11
Difenoconazol	84	12	98	12	90	8	88	12	90	6
Difenoxuron	94	7	90	9	102	5	90	14	103	5
Diflubenzuron	92	14	84	10	106	12	89	15	100	8
Dimefuron	88	11	97	7	94	7	98	7	106	6
Dimethoat	92	12	104	13	96	5	100	11	108	4
Diniconazol	84	12	98	12	96	7	80	5	87	8
Dinoseb	76	7	69	4	73	6	71	6	81	8
Dinoterb	75	5	60	5	74	13	58	7	88	4
Diuron	100	5	92	5	109	6	104	9	101	6
D1M-Diuron	92	7	99	4	93	5	75	7	101	6
D2M-Diuron	88	9	95	5	71	8	71	10	84	9
Linuron	86	17	104	18	99	18	100	19	102	13
Neburon	96	16	87	13	77	14	82	14	101	7
Summe 5 <sup>c</sup>	92	11	95	9	90	10	86	12	98	8
Epoxiconazol	87	12	90	16	100	10	96	13	103	6
Etaconazol	77	10	90	8	98	5	96	7	109	4
Ethiofencarb	63	8	57	22	90	14	78	14	79	9
Ethiofencarb sulfon	81	11	96	12	101	9	92	17	107	9
Ethiofencarb sulfoxid	108	17	113	18	120	5	136	17	131	9
Summe 3 <sup>c</sup>	84	12	89	17	104	9	102	16	105	9
Ethoprophos	90	5	96	9	98	8	99	13	102	3
Fenhexamid	89	7	86	11	97	5	98	12	103	12
Fenobucarb	104	15	89	16	87	6	100	10	102	5
Fenoprop	83	13	68	14	73	7	83	11	97	10

Tabelle 5.5.3b (Fortsetzung)

Analyt	Raps		Reis		Tomate		Weizen		Zitrone	
	WFR %	RSA %	WFR %	RSA %	WFR %	RSA %	WFR %	RSA %	WFR %	RSA %
Fenoxaprop	67	13	51	5	51	15	70	18	70	18
Fenoxycarb	83	10	84	7	101	6	83	11	109	7
Fenuron	92	12	96	13	98	5	100	11	94	6
Flamprop	84	9	81	11	101	12	83	13	101	14
Fluazifop	90	7	78	14	101	11	69	15	100	12
Fludioxonil	88	8	101	6	93	4	80	15	100	10
Fluometuron	90	7	90	13	56	13	98	7	94	8
Flusilazol	90	5	96	9	84	9	99	13	108	7
Furathiocarb	83	12	74	11	96	7	75	5	84	19
Haloxyfop	92	11	86	7	107	13	88	15	99	15
Hexaconazol	83	9	88	8	102	6	86	9	105	9
Hexaflumuron	105	18	76	13	85	7	73	15	80	8
Imazalil	96	11	47	13	105	8	28	13	100	6
Imidacloprid	90	15	104	14	104	10	91	15	104	18
Ioxynil	78	12	40	8	76	5	66	9	86	4
Isoproturon	98	8	97	7	99	4	98	7	106	2
Isopropylanilin	97	15	58	15	100	4	90	13	18	13
D1M-Isoproturon	90	14	87	13	82	18	70	9	122	7
D2M-Isoproturon	90	7	86	15	87	6	80	14	65	21
Summe 4 °	94	11	82	13	92	8	85	11	78	11
MCPA	86	8	84	5	91	8	88	11	102	13
MCPB	96	17	98	7	101	18	75	16	100	18
Mecoprop	92	7	85	3	107	10	89	6	101	7
Metamidophos	19	31	16	28	17	10	22	27	14	16
Methabenzthiazuron	98	8	97	9	104	7	97	14	104	9
Methiocarb	97	10	89	7	81	10	74	11	104	12
Methomyl	124	14	128	9	115	5	145	15	94	3
Thiodicarb	73	14	78	16	96	5	35	16	103	9
Summe 2 °	99	14	103	13	105	5	90	16	98	6
Metoxuron	95	10	93	7	89	8	97	11	102	4

Tabelle 5.5.3b (Fortsetzung)

Analyt	Raps		Reis		Tomate		Weizen		Zitrone	
	WFR %	RSA %	WFR %	RSA %	WFR %	RSA %	WFR %	RSA %	WFR %	RSA %
Metsulfuron-methyl	71	19	70	7	94	6	83	16	88	9
Omethoat	79	14	104	5	98	6	98	13	80	5
Oxamyl	83	12	100	16	100	9	103	17	78	6
PCP	94	7	46	5	83	6	53	3	94	9
Pencycuron	80	9	74	8	82	11	88	9	94	5
Pirimicarb	97	6	89	13	101	6	89	15	36	9
Promecarb	88	10	89	7	99	6	74	10	104	5
Propamocarb	53	14	26	15	40	16	34	14	32	14
Propiconazol	76	9	91	8	92	8	84	9	104	9
Propoxur	91	11	80	5	82	8	82	18	109	8
Prosulfocarb	79	14	71	15	82	11	88	9	68	5
Pyrimethanil	77	10	78	13	107	12	98	12	87	6
Quizalofop	86	15	76	8	84	10	88	17	100	17
Tebuconazol	83	12	84	7	99	6	83	10	90	6
Tebufenozid	85	17	72	15	96	6	78	7	88	14
Teflubenzuron	83	12	91	13	97	10	84	11	107	17
Thiabendazol	91	11	82	12	100	6	82	14	106	10
Thifensulfuron-methyl	68	10	75	6	102	10	84	16	101	6
Thiofanox	94	7	90	10	102	5	105	10	101	5
Triflumuron	81	10	80	6	104	11	86	12	97	6

<sup>a</sup> Zusatzniveau 10 µg/kg; n=6

<sup>b</sup> RSA Relative Standardabweichung

<sup>c</sup> mittlere Wiederfindungsrate der *n* Analyten

## 6 Zusammenfassung

Das wesentliche Resultat dieser Arbeit ist die Entwicklung einer Methode zur Bestimmung von polaren Pflanzenschutzmitteln in Erntegütern. 101 Substanzen aus den Gruppen der Carbamate, Harnstoffderivate, sauren Wirkstoffe, Triazole und anderer polarer Pestizide, die mit der Gaschromatographie schwer bestimmbar sind, konnten durch Einsatz der LC/MS/MS-Technologie und mit einem einfachen Aufarbeitungsverfahren zuverlässig analysiert werden.

Im Rahmen der Arbeit wurden grundlegende Untersuchungen und Optimierungen einzelner Verfahrensschritte durchgeführt. Es wurden Extraktionsmethoden mit Lösungsmitteln verschiedener Polarität entwickelt, und Aufreinigungsverfahren mit GPC- und SPE-Techniken erarbeitet. Die verschiedenen Verfahren wurden hinsichtlich Wiederfindungsraten der Analyten, Effizienz der Extraktreinigung und Schnelligkeit der Durchführung miteinander verglichen.

Die besten Resultate wurden mit einem Aufarbeitungsverfahren erzielt, in dem die meisten Matrices mit Methanol extrahiert und für fett- und wasserreiche Matrices Methanol und Acetonitril eingesetzt wurde. Mit der erarbeiteten Extraktionsmethode können saure, neutrale und basische Wirkstoffe gleichzeitig extrahiert werden.

Durch die Anwendung der SPE mit PS-DVB- und C18-Festphasen gelang die Entwicklung einer sehr effektiven und dennoch Zeit- und Material sparenden Aufreinigungsmethode, die eine Abtrennung sehr polarer und unpolarer mitextrahierter Matrixinhaltsstoffe ermöglicht.

Für die LC/MS/MS-Analysen im positiven und negativen Modus wurden Ionisierungsarten und Detektionsmassen untersucht und die Detektionsparameter für jede Substanz optimiert. 76 Analyten wurden im positiven Modus, 44 Analyten im negativen Ionisierungsmodus detektiert. Für die Trennung der analysierten Verbindungen wurden zwei leistungsfähige HPLC-Methoden mit einer C12- Säule und einem Methanol / 10 mM Ammoniumacetat-Gradienten entwickelt.

Quantifizierungsprobleme entstanden vor allem durch die koextrahierten Matrixkomponenten, die teilweise starke Ionensuppression verursachten. Daher erfolgten die Kalibrierung und Quantifizierung der Analyten über Matrixstandards. Die Wirksamkeit des Einsatzes isotopenmarkierter interner Standards wurde mit einigen Wirkstoffen untersucht.

Trotz der starken Matrixeffekte konnten selbst mit dieser einfacheren Kalibrierung genaue Ergebnisse erzielt werden. Isotopenmarkierte Standards sind aber nur für wenige Pestizide erhältlich. Deswegen kann dieses Kalibrationsverfahren nicht allgemein eingesetzt werden.

Leider können mit der erarbeiteten Methode einige Analyten nicht quantitativ analysiert werden. Sehr polare Substanzen wie Acephat, Dalapon und Methamidophos ( $\log K_{ow} < 0$ ) sind stark wasserlöslich und adsorbieren nicht gut genug auf PS-DVB- Festphasen in Anwesenheit organischer Lösungsmittel. Basische Stoffe, wie Propamocarb oder Imazalil liegen während der Anreicherung ionisiert vor und werden auf der Festphase nur teilweise retardiert.

Das Aufarbeitsverfahren wurde für sehr unterschiedliche Obst-, Gemüse- und Getreideproben entwickelt, und erlaubt eine sichere und kostengünstige Analyse. Die Validierung an 10 repräsentativ ausgewählten Matrices ergab gute Wiederfindungsraten, bis auf wenige Ausnahmen größer als 70%, sowie niedrige Variationskoeffizienten, in der Regel kleiner als 20%, die für die gute Anwendbarkeit der Aufarbeits- und Bestimmungsverfahren sprechen.

Die meisten Analyten konnten sehr empfindlich mit Bestimmungsgrenzen zwischen 0.03 und 8.67  $\mu\text{g}/\text{kg}$  analysiert werden, was deutlich unterhalb der niedrigsten gesetzlich vorgeschriebenen Grenzwerte von 10 bis 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  liegt.

Das entwickelte Aufarbeitsverfahren ist einfach zu handhaben und erlaubt einen Probendurchsatz von bis zu 10 Proben pro Tag. 96 polare Pflanzenschutzmittel-Wirkstoffe und Metabolite lassen sich mit dieser Methode selbst in komplexen Matrices schnell und sicher bestimmen.

Durch ihre Einfachheit, die breite Anwendbarkeit auf verschiedenartige Analyten in den unterschiedlichsten Matrices und ihre hohe Effizienz bildet die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Analysenmethode einen wichtigen Beitrag zum Fortschritt in der Lebensmittelanalytik.

## 7 Ausblick

Im Rahmen weiterer Forschungsvorhaben könnte das Verfahren mit leichten Modifikationen neben der Analyse von pflanzlichen Proben ebenso für die Bestimmung von Pflanzenschutzmittelwirkstoffen in anderen Umweltproben wie Wasser, Boden und Sediment eingesetzt werden. Die vorteilhafte Automatisierungsfähigkeit des Aufreinigungsverfahrens wäre dabei nur eine Technikfrage.

Für bestimmte Analyten wie D1M-Diuron, D2M-Diuron, Diuron, Linuron und 3,4-Dichloranilin, die mit der hier vorgestellten Methode relativ geringe oder gar keine ESI-Intensitäten haben, könnten die HPLC-Methoden weiter optimiert werden, indem die Zusammensetzung des HPLC-Eluenten und ihr pH-Wert geändert würden. Eine Umstellung auf Acetonitril und Ameisensäure könnte erfolgreich sein.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können für die Erweiterung der Methode auf andere polare Wirkstoffe und zusätzlichen Matrices hilfreich sein. Die erarbeitete Methode oder einzelne Verfahrensschritte können Ausgangspunkt für weitere Multimethoden werden, die mit Einsatz der LC/MS/MS die Analyse polarer Verbindungen wesentlich erleichtert.

Die Analytik von Pflanzenschutzmittelrückständen in Lebensmitteln wird auch in Zukunft zur Kontrolle der Einhaltung der guten landwirtschaftlichen Praxis, zur Abschätzung der Verbraucherbelastung, sowie zur Stärkung der Sicherheit der Verbraucher eine bedeutende Rolle spielen. Für polare Substanzen und ihre Metaboliten bietet sich, wie in dieser Arbeit bewiesen, die LC/MS/MS als selektives und empfindliches Analysensystem an.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Industrierverband Agrar e.V (1992-1999): Mengenmäßig bedeutende Wirkstoffe in der Bundesrepublik Deutschland, <http://www.iva.de>
2. Council Directive 91/414/EEC Annex I and II, <http://europa.eu.int/comm/food/fs/ph-ps/pest/index.htm>, <http://www.umweltinstitut.org/frames/all/m48.htm>
3. Verordnung über Höchstmengen an Rückständen von Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmitteln, Düngemitteln und sonstigen Mitteln in oder auf Lebensmittel und Tabakerzeugnissen (Rückstands-Höchstmengenverordnung – RHmV), BGB 1. I S. 2299, 1996 I S. 927, zuletzt geändert am 11.2.1999
4. Methodensammlung DFG, Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln, 1.-11. Lieferung, Verlag Chemie, Weinheim
5. Pesticide Analytical Manual Volume I (PAM) 3rd Edition (1994, updated october, 1999), <http://vm.cfsan.fda.gov/~frf/pami3.html>
6. Specht, W., Tillkes, M. (1985): Gas-chromatographische Bestimmung von Rückständen an Pflanzenbehandlungsmitteln nach Clean-up über Gel-Chromatographie und Mini-Kieselgel-Säulen-Chromatographie, Fresenius Z. Anal. Chem. 322: 443-455
7. Koinecke, A., Kreuzig, R., Bahadir, M., Siebers, J., Nolting, H.G. (1994): Investigations on the substitution of dichloromethane in pesticide residue analysis of plant materials, Fresenius J. Anal. Chem. 349: 301-305
8. Stan, H.-J. (2000): Pesticide residue analysis in foodstuffs applying capillary gas chromatography with mass spectrometric detection, State-of-the-art use of modified DFG-multimethod S19 and automated data evaluation, J. Chromatogr. A 892: 347-377
9. Grey, L., Nguyen, B., Yang, P. (2001): Liquid chromatography/electrospray ionization/isotopic dilution mass spectrometry analysis of n-(phosphonomethyl)glycine and mass spectrometry analysis of aminomethyl phosphonic acid in environmental water and vegetation matrixes, J. AOAC Int. 84: 1770-1780
10. Castro, R., Moyano, E., Galceran, M.T. (2001): Determination of chlormequat in fruit samples by liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry/mass spectrometry, J AOAC Int 84(6): 1903-1908
11. Guidance document on residue analytical methods, Document SANCO 825/00 rev. 6 of June 2000, [http://europa.eu.int/comm/food/fs/ph\\_ps/wrkd/doc/index\\_en.htm](http://europa.eu.int/comm/food/fs/ph_ps/wrkd/doc/index_en.htm)
12. Taylor, M.J., Hunter, K., Hunter, K.B., Lindsay, D., Le Bouhellec, S. (2002): Multi-residue method for rapid screening and confirmation of pesticides in crude extracts of fruits and vegetables using isocratic liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry, J. Chromatogr. A 982: 225-236

13. Dijkman, E., Mooibroek, D., Hoogerbrugge, R., Hogendoorn, E., Sancho, J.-V., Pozo, O., Hernández, F. (2001): Study of matrix effects on the direct trace analysis of acidic pesticides in water using various liquid chromatographic modes coupled to tandem mass spectrometric detection, *J. Chromatogr. A* 926: 113-120
14. Allmendinger, H., Schriftenreihe Biologische Abwasserreinigung 11, Anwendung der LC-MS in der Wasseranalytik, Berlin, 1999
15. Mills, P.A., Onley, J.H., Guither, R.A. (1963): Rapid method for chlorinated pesticide residues in nonfatty foods, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 46: 186-191
16. Fernández, M., Picó, Y., Mañes, J. (2000): Determination of carbamate residues in fruits and vegetables by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 871: 43-56
17. Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Štajnbaher, D., Schenck, F.J. (2003): Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and „dispersive solid-phase Extraction“ for the determination of pesticide residue in produce *J. AOAC Int.* 86(2): 412-431
18. Motohashi, N., Nagashima, H., Párkány, C., Subrahmanyam, B., Zhang, G.-W. (1996): Official multiresidue methods of pesticide analysis in vegetables, fruits and soil, *J. Chromatogr. A* 754: 333-346
19. Tekel, J., Hatrik, Š. (1996): Pesticide residue analyses in plant material by chromatographic methods: clean-up procedures and selective detectors, *J. Chromatogr. A* 754: 397-410
20. Arbus, A., Their, H.P. (1986): Application of multiresidue procedures in pesticides residues analysis, *Pure Appl. Chem.* 58: 1036-1061
21. Lehotay, S.J. (1997): Supercritical fluid extraction of pesticides in foods, *J. Chromatogr. A* 785: 289-312
22. Tadeo, J.L., Sánchez-Brunete, C., Pérez, R.A., Fernández, M.D. (2000): Analysis of herbicide residues in cereals, fruits and vegetables, *J. Chromatogr. A* 882: 175-191
23. Lee, S.M., Papathakis, M.L., Feng, H.-M.C., Hunter, G.F., Carr, J.E. (1991): Multipesticide residue method for fruits and vegetables: California Department of Food and Agriculture, *Fresenius J. Anal. Chem.* 339: 376-383 (CDFA)
24. Miyahara, M., Okada, Y., Takeda, H., Aoki, G., Kobayashi, A., Saito, Y. (1994): Multiresidue procedures for the determination of pesticides in food using capillary gas chromatographic, flame photometric, and mass spectrometric techniques, *J. Agric. Food Chem.* 42: 2795-2802
25. Sheridan, R.S., Meola, J.R. (1999): Analysis of pesticide residues in fruits, vegetables, and milk by gas chromatography/tandem mass spectrometry, *J. AOAC Int.* 82(4): 982-990



26. Cook, J., Beckett, M.P., Reliford, B., Hammock, W., Engel, M. (1999): Multiresidue Analysis of pesticides in fresh fruits and vegetables using procedures developed by the Florida Department of Agriculture and Consumer services, *J. AOAC Int.* 82(6): 1419-1435 (FDA)
27. Lehotay, S.J. (2000): Analysis of pesticide residues in mixed fruits and vegetable extracts by direct sample introduction/gas chromatography/tandem mass spectrometry, *J. AOAC Int.* 83(3): 680-697
28. Fillion, J., Sauvé, F., Selwyn, J. (2000): Multiresidue method for the determination of residues of 251 pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography with fluorescence detection, *J. AOAC Int.* 83(3): 698-713
29. Liu, C.H., Mattern, G.C., Yu, X., Rosen, R.T., Rosen, J.D. (1991): Multiresidue determination of nonvolatile and thermally labile pesticides in fruits and vegetables by thermospray liquid chromatography/mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* 39: 718-723
30. Tuinstra, L.G.M.T., Roos, A.H., Matser, A.M., Traag, W.A., van Rhijn, J.A. (1991): Development of a multi-residue/multi-matrix method for pesticide analysis in agricultural products, *Fresenius J. Anal. Chem.* 339: 384-386 (Holland)
31. Andersson, A., Pålsheden, H. (1991): Comparison of the efficiency of different GLC multi-residue methods on crops containing pesticide residues, *Fresenius J. Anal. Chem.* 339: 365-367
32. Page, M.J., French, M. (1992): Determination of N-Methylcarbamate insecticides in vegetables, fruits, and feeds using solid-phase extraction cleanup in the normal phase, *J. AOAC Int.* 75(6): 1073-1083
33. Specht, W., Pelz, S., Gilsbach, W. (1995): Gas-chromatographic determination of pesticide residues after clean-up by gel-permeation chromatography and mini-silica gel-column chromatography, 6. Communication: replacement of dichloromethane by ethyl acetate/cyclohexane in liquid-liquid partition and simplified conditions for extraction and liquid-liquid partition, *Fresenius J. Anal. Chem.* 353: 183-190
34. Thean, J.E., Fong, W.G., Lorenz, D.R., Stephens, T.L. (1978): High pressure liquid chromatographic determination of methomyl and oxamyl on vegetable crops, *Journal of the AOAC* 61(1): 15-17
35. Godula, M., Hajšlová, J., Alterová, K. (1999): Pulsed splitless injection and the extent of matrix effects in the analysis of pesticides, *J. High Resol. Chromatogr.* 22(7): 395-402
36. Fernández, M., Rodríguez, R., Picó, Y., Mañes, J. (2001): Liquid chromatographic-mass spectrometric determination of post-harvest fungicides in citrus fruits, *J. Chromatogr. A* 912: 301-310

37. Hogenboom, A.C., Hofman, M.P., Kok, S.J., Niessen, W.M.A., Brinkman, U.A.Th. (2000): Determination of pesticides in vegetable using large-volume injection column liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 892: 379-390
38. Krause, R.T. (1985): Liquid chromatographic determination of n-Methylcarbamate insecticides and metabolites in crops. I. Collaborative study, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 68(4): 726-733
39. Luchtefeld, R.G. (1987): Multiresidue method for determining substituted urea herbicides in foods by liquid chromatography, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 70(4): 740-745
40. Di Corcia, A., Crescenzi, C., Lagana, A., Sebastiani, E. (1996): Evaluation of a method based on liquid chromatography/electrospray/mass spectrometry for analyzing carbamate insecticides in fruits and vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 44: 1930-1938
41. Nunes, G.S., Alonso, R.M., Ribeiro, M.L., Barcelo, D. (2000): Determination of aldicarb, aldicarb sulfoxide and aldicarb sulfone in some fruits and vegetables using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 888: 113-120
42. Kontou, S., Tsipi, D., Oreopoulou, V., Tzia, C. (2001): Determination of ETU in tomatoes and tomato products by HPLC-PDA. Evaluation of cleanup procedures, *J. Agric. Food Chem.* 49: 1090-1097
43. Klein, J., Alder, L. (2003): Applicability of gradient liquid chromatography with tandem mass spectrometry to the simultaneous screening for about 100 pesticides in crops, *J. AOAC Int.* 86 (5): 1015-1037
44. Picó, Y., Font, G., Moltó, J.C., Mañes, J. (2000): Solid-phase extraction of quaternary ammonium herbicides, Review, *J. Chromatogr. A* 885: 251-271
45. Carabias-Martínez, R., Rodríguez-Gonzalo, E., Paniagua-Marcos, P.H., Hernández-Méndez, J. (2000): Analysis of pesticide residues in matrices with high lipid contents by membrane separation coupled on-line to a high-performance liquid chromatographic system, *J. Chromatogr. A* 869: 427-439
46. Odanaka, Y., Matano, O., Goto, S. (1991): The use of solid bonded-phase extraction as alternative to liquid-liquid partitioning for pesticide residue analysis of crops, *Fresenius J. Anal. Chem.* 339: 368-373
47. Castro, R., Moyano, E., Galceran, M.T. (2000): On-line ion-pair solid-phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry for the analysis of quaternary ammonium herbicides, *J. Chromatogr. A* 869: 441-449
48. Schlett, C. (1991): Multi-residue-analysis of pesticides by HPLC after solid phase extraction, *Fresenius J. Anal. Chem.* 339: 344-347
49. Holland, P.T., McNaughton, D.E., Malcolm, C.P. (1994): Multiresidue analysis of pesticides in wine by solid-phase extraction, *J. AOAC Int.* 77(1): 79-86

50. van der Hoff, G.R., van Zoonen, P. (1999): Trace analysis of pesticides by gas chromatography, Review, *J. Chromatogr. A* 843: 301-322
51. Hogendoorn, E., van Zoonen, P. (2000): Recent and future developments of liquid chromatography in pesticide trace analysis. *J. Chromatogr. A* 892: 435-453
52. Arthur, C., Pawliszyn, J. (1990): Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers, *Anal. Chem.* 62: 2145-2148
53. Fritz, J.S., Macka, M. (2000): Solid-phase trapping of solutes for further chromatographic or electrophoretic analysis, Review, *J. Chromatogr. A* 902: 137-166
54. Ahmed, F.E. (2001): Analyses of pesticides and their metabolites in foods and drinks, *Trends in Anal. Chem.* 20(11): 649-660
55. Sherma, J. (1997): Current status of pesticide residue analysis, *J. AOAC Int.* 80(2): 283-287
56. Viana, E., Moltó, J.C., Fouty, G. Optimization of a matrix solid-phase dispersion method for the analysis of pesticide residues in vegetables, *J. Chromatogr. A* 754: 437-444
57. Torres, C.M., Picó, Y., Redondo, M.J., Mañes, J. (1996): Matrix solid-phase dispersion extraction procedure for multiresidue pesticide analysis in oranges, *J. Chromatogr. A* 719: 95-103
58. Ling, Y.-C., Huang, I.-P. (1995): Multi-residue matrix solid-phase dispersion method for the determination of six synthetic pyrethroids in vegetables followed by gas chromatography with electron capture detection, *J. Chromatogr. A* 695: 75-82
59. Fernández, M., Picó, Y., Mañes, J. (2000): Determination of carbamate residues in fruits and vegetables by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 871: 43-56
60. Valenzuela, A.I., Lorenzini, R., Redondo, M.J., Font, G. (1999): Matrix solid-phase dispersion microextraction and determination by high-performance liquid chromatography with UV detection of pesticide residues in citrus fruits, *J. Chromatogr. A* 839: 101-107
61. Norman, K.N.T., Panteon, S.H.W. (2001): Supercritical fluid extraction and quantitative determination of organophosphorus pesticide residues in wheat and maize using gas chromatography with flame photometric and mass spectrometric detection, *J. Chromatogr. A* 907: 247-255
62. Hajslova, J., in : C.F. Moffat, K.J. White (Editors), *Environmental Contaminants in Food*, Sheffield Academic Press, 1999, Chapter 7, p. 215
63. Valverde-García, A., Fernández-Alba, A.R. (1995): Extraction of methamidophos residues from vegetable with supercritical fluid carbon dioxide, *J. AOAC Int.* 78(3): 867-872

64. Torres, C.M., Picó, Y., Mañes, J.(1996): Determination of pesticide residues in fruit and vegetables, *J. Chromatogr. A* 754: 301-331
65. Thier, H.-P., Frehse, H. (1986) *Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln*, Stuttgart; New York: Thieme
66. Hennion, M.C. (1999): Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 856: 3-54
67. Poole, C.F., Gunatilleka, A.D., Sethuraman, R. (2000): Contributions of theory to method development in solid-phase extraction, *J. Chromatogr. A* 885: 17-39
68. Haib, J., Hofer, I., Renaud, J.-M. (2003): Analysis of multiple pesticide residues in tobacco using pressurized liquid extraction, automated solid-phase extraction clean-up and gas chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1020: 173-187
69. Huck, C.W., Bonn, G.K. (2000): Recent developments in polymer-based sorbents for solid-phase extraction, *J. Chromatogr. A* 885: 51-72
70. Poole, C.F. (2003): New trends in solid-phase extraction, *Trends Anal. Chem.* 22(6): 362-373
71. Carabias-Martínez, R., Rodríguez-Gonzalo, E., Herrero-Hernández, E., Sánchez-San Roman, F.J., Flores, M.G.P. (2002) : Determination of herbicides and metabolites by solid-phase extraction and liquid chromatography, evaluation of pollution due to herbicides in surface and groundwaters, *J. Chromatogr. A* 950: 157-166
72. Štajnbaher, D., Zupančič-Kralj, L. (2003): Multiresidue method for determination of 90 pesticides in fresh fruits and vegetables using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chrom. A*, 1015: 185-198
73. [www.mn-net.com](http://www.mn-net.com), application notes
74. Hennion, M.-C. (2000): Graphitized carbons for solid-phase extraction, *J. Chromatogr. A* 885: 73-95
75. Zrostlíková, J., Hajšlová, J., Kovalczuk, T., Štěpán, R., Poustka, J. (2003): Determination of seventeen polar/thermolabile pesticides in apples and apricots by liquid chromatography/mass spectrometry, *J. AOAC Int.* 86(3): 612-622
76. *Environmental & Agrochemical Applications Notebook*, Waters Corporation, 2002
77. Hopper, M.L. (1988): Improved method of partition of organophosphate pesticide residues on a solid phase partition column, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71(4): 731-734
78. Beltran, J., López, F.J., Hernández, F. (1993): Solid-phase extraction of pesticide residues from ground water: comparison between extraction cartridges and extraction discs, *Anal. Chim. Acta* 283: 297-303
79. Karlhuber, B., Ramsteiner, K. (1979), *Triazin-Herbizide und Desalkyl-Metaboliten*, DFG-Methodensammlung, 1.-11. Lieferung, Verlag Chemie, Weinheim, Methode S14

80. Pflugmacher, J., Ebing, W. (1979), Erfahrungen mit der Sweep Co-Distillation-Technik in der Pflanzenschutzmittel-Rückstandsanalytik, *Landwirtsch. Forsch.* 32, 82-87
81. Ahmad, N., Guo, L., Mandarakas, P., Appleby, S., Bugueno, C. (1995): Determination of dithiocarbamate and its breakdown product ethylenethiourea in fruits and vegetables, *J. AOAC Int.* 78(5): 1238-1243
82. Mukherjee, I., Gopal, M. (1996): Chromatographic techniques in the analysis of organochlorine pesticide residues, *J. Chromatogr. A* 754: 33-42
83. Yang, S.S., Goldsmith, A.I., Smetena, I. (1996): Recent advances in the residue analysis of N-methylcarbamate pesticides, *J. Chromatogr. A* 754: 3-16
84. Escuderos-Morenas, M.L., Santos-Delgado, M.J., Rubio-Barosso, S., Polo-Díez, L.M. (2003): Direct determination of monolinuron, linuron and chlorbromuron residues in potato samples by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection, *J. Chromatogr. A* 1011: 143-153
85. Naumer, H., Heller, W. (Hrsg) (2002) *Untersuchungsmethoden in der Chemie*, Weinheim: WILEY-VCH, 3.Auflage
86. Kocourek, V., Hajšlová, J., Holadová, K., Poutska, J. (1998): Stability of pesticides in plant extracts used as calibrants in the gas chromatographic analysis of residues, *J. Chromatogr. A* 800: 297-304
87. Bernal, J.L., del Nozal, M.J., Jiménez, J.J., Rivera, J.M. (1997): Matrix effects in the determination of acaricides and fungicides in must by gas chromatography with electron-capture and nitrogen-phosphorus detection, *J. Chromatogr. A* 778: 111-117
88. Luke, M.A., Froberg, J.E., Doose, G.M., Masumoto, H.T. (1981): Improved multiresidue gas chromatographic determination of organophosphorus, organonitrogen, and organohalogen pesticides in produce, using flame photometric and electrolytic conductivity detectors, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 64(5): 1187-1195
89. Santos-Delgado, M.J., Rubio-Barosso, S., Toledano Fernández-Tostado, G., Polo-Díez, L.M. (2001): Stability studies of carbamates pesticides and analysis by gas chromatography with flame ionization and nitrogen-phosphorus detection, *J. Chromatogr. A* 921: 287-296
90. Cabras, P., Angioni, A., Melis, M., Minelli, E.V., Pirisi, F.M. (1997) : Simplified multiresidue method for the determination of organophosphorus insecticides in olive oil, *J. Chromatogr. A* 761: 327-331
91. Zrostlíková, J., Hajšlova, J., Čajka, T. (2003): Evaluation of two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry for the determination of multiple pesticide residues in fruit, *J. Chromatogr. A* 1019: 173-186
92. Schenck, F.J., Lehotay, S.L. (2000): Does further clean-up reduce the matrix enhancement effect in gas chromatographic analysis of pesticide residues in food?, *J. Chrom. A*, 868: 51-61

93. Van der Hoof, G.R., van Zoonen, P. (1999): Trace analysis of pesticides by gas chromatography, Review, *J. Chromatogr. A* 843: 301-322
94. Arrebola, F.J., Martínez Vidal, J.L., Mateu-Sánchez, M., Álvarez-Castellón, F.J. (2003) : Determination of 81 multiclass pesticides in fresh foodstuffs by a single injection analysis using gas chromatography-chemical ionization and electron ionization tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 484: 167-180
95. Sinz, K. (2002): Monolitische HPLC – weniger Druck im Labor, *GIT Spezial Separation*, 2: 48-49
96. Efer, J., Koal, T., Asperger, A., Engewald, W. (2002): Schnelle Pestizidanalytik im Wasser durch Kombination von Turbulentflow-SPE, schneller HPLC und Tandem-MS, *GIT Spezial Separation*, 2: 58-62
97. Gottwald, W. (2002): HPLC basischer Analyten, *GIT Spezial Separation*, 2: 50-51
98. Gardner, M.S., Voyksner, R.D., Haney, C.A. (2000): Analysis of pesticides by LC-Electrospray-MS with postcolumn removal of nonvolatile buffers, *Anal. Chem.* 72: 4659-4666
99. Barnes, K.A., Startin, J.R., Thorpe, S.A., Reynolds, S.L., Fussell, R.J. (1995): Determination of the pesticide diflubenzuron in mushrooms by high-performance liquid-chromatography atmospheric-pressure chemical-ionization mass-spectrometry, *J. Chromatogr. A* 712: 85-93
100. Barnes, K.A., Fussell, R.J., Startin, J.R., Pegg, M.K., Thorpe, S.A., Reynolds, S.L. (1997): High-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry with ionization polarity switching for the determination of selected pesticides, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 11: 117-123
101. Yoshioka, N., Akiyama, Y., Teranishi, K. (2004): Rapid simultaneous determination of o-phenylphenol, diphenyl, thiabendazole, imazalil and its major metabolite in citrus fruits by liquid chromatography-mass spectrometry using atmospheric pressure photoionisation, *J. Chromatogr. A* 1022: 145-150
102. Lacassie, E., Dreyfuss, M.F., Daguet, J.L., Vignaud, M., Marquet, P., Lachatre, G. (1999) : Liquid chromatography electrospray mass spectrometry multiresidue determination of pesticides in apples and pears, *J. Chromatogr. A* 830: 135-143
103. Mickova, B., Zrostlikova, J., Hajslova, J., Rauch, P., Moreno, M.J., Abad, A., Montoya, A. (2003): Correlation study of enzyme-linked immunosorbent assay and high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the determination of N-Methylcarbamate insecticides in baby food, *Anal. Chim. Acta* 495: 123-132
104. Baumann, C., Cintora, M.A., Eichler, M., Lifante, E., Cooke, M., Przyborowska, A., Halket, J.M. (2000): A library of atmospheric pressure ionization daughter ion mass spectra based on wideband excitation in an ion trap mass spectrometer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14: 349-356

105. Newsome, W.H., Lau, B.P.Y., Ducharme, D. (1995): Comparison of liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry and liquid chromatography postcolumn fluorometry for determination of carbamates in food, *J. AOAC Int.* 78: 1312-1316
106. Volmer, D.A. (1998): Investigation of photochemical behaviour of pesticides in a photolysis reactor coupled on-line with a liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry system – Application to trace and confirmatory analyses in food samples, *J. Chromatogr. A* 794: 129-146
107. Nuñez, G.S., Marco, M.P., Ribeiro, M.L. (1998): Validation of a immunoassay method for the determination of traces of carbaryl in vegetable and fruit extracts by liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometric detection, *J. Chromatogr. A* 823: 109-120
108. Rule, G.S., Mordehai, A.V., Henion, J. (1994): Determination of carbofuran by online immunoaffinity chromatography with coupled-column liquid-chromatography mass-spectrometry, *Anal. Chem.* 66: 230-235
109. Blasco, C., Picó, Y., Mañes, J., Font, G. (2002) : Determination of fungicide residues in fruits and vegetables by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 947: 227-235
110. Vahl, M., Graven, A., Juhler, R.K. (1998): Analysis of chlormequat residues in grain using liquid chromatography mass spectrometry (LC.MS/MS), *Fresenius J. Anal. Chem.* 361: 817-820
111. Juhler, R.K., Vahl, M. (1999): Residues of chlormequat and mepiquat in grain – results from the Danish National Pesticide Survey, *J. AOAC Int.* 82:331-336
112. Mol, H.G.J., van Dam, R.C.J., Steijger, O.M. (2003): Determination of polar organophosphoric pesticides in vegetables and fruits using liquid chromatography with tandem mass spectrometry: selection of extraction solvent, *J. Chromatogr. A* 1015: 119-127
113. Jansson, C., Pihlström, T., Österdahl, B.-G., Markides, K.E. (2004): A new multi-residue method for analysis of pesticides residues in fruit and vegetables using liquid chromatography with tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1023: 93-104
114. Menzinger, F., Schmitt-Kopplin, Ph., Freitag, D., Kettrup, A. (2000): Analysis of agrochemicals by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 891: 45-67
115. Picó, Y., Rodríguez, R., Mañes, J. (2003): Capillary electrophoresis for the determination of pesticide residues, *Trends in Anal. Chem.* 22(3): 133-151
116. Tamayo, F.G., Casillas, J.L., Martin-Esteban, A. (2003): Highly selective fenuron-imprinted polymer with a homogeneous binding site distribution prepared by precipitation polymerisation and its application to the clean-up of fenuron in plant samples, *Anal. Chim. Acta* 482: 165-173

117. Stevenson, D. (1999): Molecular imprinted polymers for solid-phase extraction, *Trends Anal. Chem.* 18(3): 154-158
118. Bushway, R. J. (1996): Complementation of direct-injection high-performance liquid chromatography and enzyme-linked immunosorbent assay for the analysis of thiabendazole in fruit juices and concentrates, *J. Chromatogr. A* 754: 431-435
119. Niessen, W.M.A. (1998): Advances in instrumentation in liquid chromatography-mass spectrometry and related liquid-introduction techniques, *J. Chromatogr. A* 794: 407-435
120. Budzikiewicz, H. *Massenspektrometrie: eine Einführung*, 4. Auflage, Weinheim; New York; Chichester; Brisbane; Singapore; Toronto: Wiley-VCH, 1998, 9-45
121. Bruins, A.P. (1998): Mechanistic aspects of electrospray ionization, *Review, J. Chromatogr. A* 794: 345-357
122. Applied Biosystems „API 2000 Operator Course“
123. Maizels, M., Budde, W.L. (2001): Exact mass measurements for confirmation of pesticides and herbicides determined by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry, *Anal. Chem.* 73: 5436-5440
124. Hager, J.W., Le Blanc, J.C.Y. (2003): High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with a new quadrupole/linear ion trap instrument *J. Chromatogr. A* 1020: 3-9
125. Niessen, W.M.A. (1999): State-of-the-art in liquid chromatography-mass spectrometry, *Review, J. Chromatogr. A* 856: 179-197
126. Slobodník, J., van Baar, B.L.M., Brinkman U.A.Th. (1995): Column liquid chromatography-mass spectrometry: selected techniques in environmental applications for polar pesticides and related compounds, *Review, J. Chromatogr. A* 703: 81-121
127. Niessen, W.M.A. (2003): Progress in liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation and its impact on high-throughput screening, *J. Chromatogr. A* 1000: 413-436
128. Hayen, H., Karst, U. (2003): Strategies for the liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of non-polar compounds, *Review, J. Chromatogr. A* 1000: 549-565
129. Hajšlová, J., Zrostlíková, J. (2003): Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices, *Review, J. Chromatogr. A* 1000: 181-197
130. Plattner, R.D., Maragos, C.M. (2003): Determination of deoxyvalenol and nivalenol in corn and wheat by liquid chromatography with electrospray mass spectrometry, *J. AOAC Int.* 86 (1): 61-65
131. Schramm, K.-W., Henkelmann, B., Kettrup, A. (1995): PCDD/F sources and levels in river Elbe sediments, *Wat. Res.* 29 (9): 2160-2166



132. Henkelmann, B., Schramm, K.-W., Klimm, C., Kettrup, A. (1996): Quality criteria for the isotope dilution method with HRGC/MS, *Fres. J. Anal. Chem.* 354 (7-8): 818-822
133. <http://www.bvl.bund.de/pflanzenschutz/psmdb/InfoZulPSM.htm>
134. <http://www.chemlin.de>
135. Kromidas, S. (1999): *Validierung in der Analytik – Weinheim; New York; Chichester; Brisbane; Singapore; Toronto: Wiley-VCH*
136. Di Corcia, A., Constantino, A., Crescenzi, C., Samperi, R. (1999): Quantification of phenylurea herbicides and their free and humic acid-associated metabolites in natural waters, *J. Chromatogr. A* 852: 465-474
137. Lacorte, S., Molina, C., Barceló, D. (1998): Temperature and extraction voltage effect on fragmentation of organophosphorus pesticides in liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 795: 13-26
138. Ingelse, B.I., van Dam, R.C.J., Vreeken, R.J., Mol, H.G.J., Steijger, O.M. (2001): Determination of polar organophosphorus pesticides in aqueous samples by direct injection using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 918: 67-78
139. Wang, N., Budde, W.L. (2001): Determination of carbamate, urea, and thiourea pesticides and herbicides in water, *Anal. Chem.* 73: 997-1006
140. Marek, L.J., Koskinen, W.C. (1996): LC/MS Analysis of 4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-yl-containing sulfonylurea herbicides in soil, *J. Agric. Food Chem.* 44 (5): 3878-3881
141. Di Corcia, A., Nazzari, M., Rao, R., Samperi, R., Sebastiani, E. (2000): Simultaneous determination of acidic and non-acidic pesticides in natural waters by liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 878: 87-98
142. Fernández-Alba, A.R., Tejedor, A., Agüera, A., Contreras, M., Garrido, J. (2000): Determination of imidacloprid and benzimidazole residues in fruits and vegetables by liquid chromatography-mass spectrometry after ethyl acetate multiresidue extraction, *J. AOAC Int.* 83 (3): 748-755
143. Hernández, F., Sancho, J.V., Pozo, O., Lara, A., Pitarch, E. (2001): Rapid direct determination of pesticides and metabolites in environmental water samples at sub- $\mu\text{g/l}$  level by on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 939: 1-11
144. Perret, D., Gentili, A., Marchese, S., Sergi, M., D'Ascenzo, G. (2002): Validation of a method for the determination of multiclass pesticide residues in fruit juices by liquid chromatography/ tandem mass spectrometry after extraction by matrix solid-phase dispersion, *J. AOAC Int.* 85 (3): 724-730

145. Jeannot, R., Sabik, H., Sauvard, E., Genin, E. (2000) : Application of liquid chromatography with mass spectrometry combined with photodiode array detection and tandem mass spectrometry for monitoring pesticides in surface waters, *J. Chromatogr. A* 879: 51-71
146. Baglio, D., Kotzias, D., Larsen, B.R. (1999): Atmospheric pressure ionization multiple mass spectrometric analysis of pesticides, *J. Chromatogr. A* 854: 207-220
147. Giraud, D., Ventura, A., Camel, V., Bermond, A., Arpino, P. (1997): Determination of traces of pesticides in water by solid-phase extraction and liquid chromatography-ion spray mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 777: 115-125
148. Barnes, K.A., Startin, J.R., Thorpe, S.A., Reynolds, S.L., Fussell, R.J. (1995): Determination of the pesticide diflubenzuron in mushrooms by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 712: 85-93
149. Køppen, B., Spliid, N.H. (1998): Determination of acidic herbicides using liquid chromatography with pneumatically assisted electrospray ionization mass spectrometric and tandem mass spectrometric detection, *J. Chromatogr. A* 803: 157-168
150. Bossi, R., Vejrup, K.V., Mogensen, B.B., Asman, W.A.H. (2002): Analysis of polar pesticides in rainwater in Denmark by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 957: 27-36
151. <http://www.thermohypersil.de/produkte/800.html>
152. <http://www.thermohypersil.de/produkte/180.html>
153. <http://www.thermohypersil.de/produkte/030.html>
154. <http://www.phenomenex.com/Phen/Products/Brands/Synergi.htm>
155. Mendez, A., Bosch, A., Roses, M., Neue, U.D. (2003): Comparison of the acidity of residual silanol groups in several liquid chromatography columns, *J. Chromatogr. A* 986: 33-44
156. [http://www.nal.usda.gov/fnic/cgi-bin/list\\_nut.pl](http://www.nal.usda.gov/fnic/cgi-bin/list_nut.pl), USDA National Nutrient Database for Standard Reference
157. Crescenzi, C., Di Corcia, A., Passariello, G., Samperi, R., Turnes Carou, M.I. (1996): Evaluation of two new examples of graphitized carbon blacks for use in solid-phase extraction cartridges, *J. Chromatogr. A* 733: 41-55
158. Hirsch, M.J. (2000) : Hydromatrix purification techniques, Technical Reports 4 (17), <http://www.albmolecular.com/features/tekreps/vol04/no17vo04n17.pdf>

159. Matuszewski, B.K., Constanzer, M.L., Chavez.Eng, C.M. (1998): Matrix effect in quantitative LC/MS/MS analyses of biological fluids: a method for determination of finasteride in human plasma at picogram per milliliter concentrations, *Anal. Chem.* 70: 882-889
160. Bonfiglio, R., King, R.C., Olah, T.V., Merkle, K.: (1999): The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13: 1175-1185
161. Zöllner, P., Leitner, A., Berner, D., Kleinova, M., Jodlbauer, J., Mayer, B.X., Lindner, W. (2003): Improving LC-MS/MS analyses in complex food matrices, Part I – sample preparation and chromatography, *LC-GC Europe* March 2-8
162. Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Leitlinie: Rückstandsanaly-senmethoden für die Überwachung, 21. Juli 1998,  
<http://www.bvl.bund.de/pflanzenschutz/Analytik/LeitUeberw.pdf>
163. Tomlin, C. Editor (1994, reprinted 1995): *The Pesticide Manual incorporating the Agrochemicals Handbook*, Tenth Edition, The Bath Press, Bath, England
164. [www.chemfinder.com](http://www.chemfinder.com)

## 9 Anhang

### Verwendete Chemikalien

Aceton Pestanal, Fluka Riedel-de-Haën, Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland  
Acetonitril gradient grade für die LC Chromasolv, Riedel-de-Haën, Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland  
Ameisensäure p.a. 98-100%, Merck, Darmstadt, Deutschland  
Ammoniaklösung 25%, Merck, Darmstadt, Deutschland  
Ammoniumacetat p.a., Merck, Darmstadt, Deutschland  
Cyclohexan für Pestizidanalyse Nanograde, Mallinckrodt Specialty Chemicals, Paris, Kentucky, USA  
Dichlormethan Pestanal mit Amylen stabilisiert (ca. 25mg/L), Riedel-de-Haën, Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland  
Ethylacetat Pestanal, Riedel-de-Haën, Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland  
Flüssiger Stickstoff, Reinheit 5.0, Linde, Gablingen, Deutschland  
n-Hexan Pestanal, Riedel-de-Haën, Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland  
Kaliumdihydrogenphosphat p.a., Merck, Darmstadt, Deutschland  
Methanol gradient grade für die LC LiChrosolv, Merck, Darmstadt, Deutschland  
Natriumchlorid p.a., Merck, Darmstadt, Deutschland  
Natriumhydrogenphosphat p.a., Merck, Darmstadt, Deutschland  
Natriumsulfat wasserfrei reinst, Merck, Darmstadt, Deutschland  
Phosphorsäure min. 85% p.a., Merck, Darmstadt, Deutschland  
Salzsäure 1M, Merck, Darmstadt, Deutschland  
Tetrahydrofuran für die HPLC, Promochem, Wesel, Deutschland

### *Standardsubstanzen*

Pestizid-Standards 95-99.8% Reinheit, Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland  
mit Ausnahme von Benazolin, Clopyralid, Dinoterb, Fenoxaprop und Quizalofop von Riedel-de-Haën, Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland

### *Isotopenmarkierte Standards*

Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland:

Chlortoluron-D6, 99.5%, 100mg/L in Aceton  
2,4-D-13C6, 99%, 100mg/L in Aceton  
Diuron-D6, 99.2%, 100.1mg/L in Aceton  
Isoproturon-D6, 99%, 100.1mg/L in Aceton  
Monuron-D6, 99.6%, 100mg/L in Aceton  
Pentachlorphenol-13C6, 95.5%, 100mg/L in Aceton

CIL Cambridge Isotope Laboratories, Massachusetts, USA:

2,4,5-T-13C6, 99%, 100µg/mL in Dichlormethan  
Dichlorprop-13C6, 99%, 100±10µg/mL in Nonan  
Bromoxynil-13C6, 99%, 50±5ppm in Nonan  
Carbofuran-13C6, 99%, 100±10µg/mL in Acetonitril  
Carbaryl-13C6, 99%, 100±10µg/mL in Nonan

Tabelle 9.1 Physikalisch-chemischen Eigenschaften der ausgewählten Analyten [163,164]

Wirkstoff	Molekulare Masse	Dampfdruck [mm Hg] 25°C	pK <sub>a</sub>	Löslichkeit [mg/L] 25°C	Log K <sub>ow</sub>
2,4,5-T	255.48	3.75E-005	2.83	278	3.31
2,4-D	221.04	8.25E-005	2.73	677	2.81
2,4-DB	249.09	1.11E-005	4.95	46	3.53
Acephat	183.17	1.7E-006		8.18E+005	-0.85
Acifluorfen	361.66	1.53E-008		120	3.70
Aldicarb	190.26	3.47E-005		6030	1.13
Aldicarb sulfoxid	206.26				
Aldoxycarb	222.26	9,00E-05		1,00E+04	-0.57
Azoxystrobin	403.39				
Benazolin	243.66	7,50E-12	3.04	500	1.34
Bifenox	342.13	1,00E-07		0.398	4.48
Bromoxynil	276.91	7,50E-06	3.86	130	
Butocarboxim	190.26	7,95E-05		3500	1.11
Butocarboxim-sulfoxid	206.26				
Butoxycarboxim	222.26	2,00E-05		20900	1.11
Buturon	236.70	4.55E-006		30 *	3.00
Carbaryl	201.22	1.36E-006		110 *	2.36
Carbendazim	191.19	7.5E-010 *	4.2	29	1.52
Carbofuran	221.26	4.85E-006 *		320	2.32
Carbofuran 3-hydroxy	237.26				
Chloroxuron	290.75				
Chlortoluron	212.68	3.6E-008 *		70 *	2.41
Cyprodinil	225.30	3.68E-006	4.44	13	4.00
Dalapon	142.97	7,50E-08	1.74		
DDA	281.14				
Dicamba	221.04	3.38E-005	1.97	8310	2.21
Dichlorprop	235.07	7.5E-008	3.10	350 *	3.43
Diclofop	327.16	4.03E-008	3.43	453 *	4.58
Difenconazol	406.27	2,48E-04	<0	16	4.20
Difenoxuron	286.33	2.89E-008		20 *	2.54
Diflubenzuron	310.69	9E-10		0.08	3.88
Dimefuron	338.79	2.29E-010		16 *	2.51
Dimethoat	229.26	8.25E-006		2.5E+004 *	0.78
Diniconazol	326.23	3.68E-005		4	4.30
Dinoseb	240.22	7.5E-005	4.62	52	3.56
Dinoterb	240.22	1,50E-04		4.5	
Diuron	233.10	6.9E-008		42	2.68
D1M-Diuron	219.07				
D2M-Diuron	205.04				
Epoxiconazol	329.76				
Etaconazol	328.20	2.34E-007		80 *	3.10
Ethiofencarb	225.30	3,38E-06		1800	2.04
Ethiofencarb-sulfon	257.3				
Ethiofencarb-sulfoxid	241.3				
Ethoprophos	242.34	0.00038		750	3.59

Tabelle 9.1 (Fortsetzung)

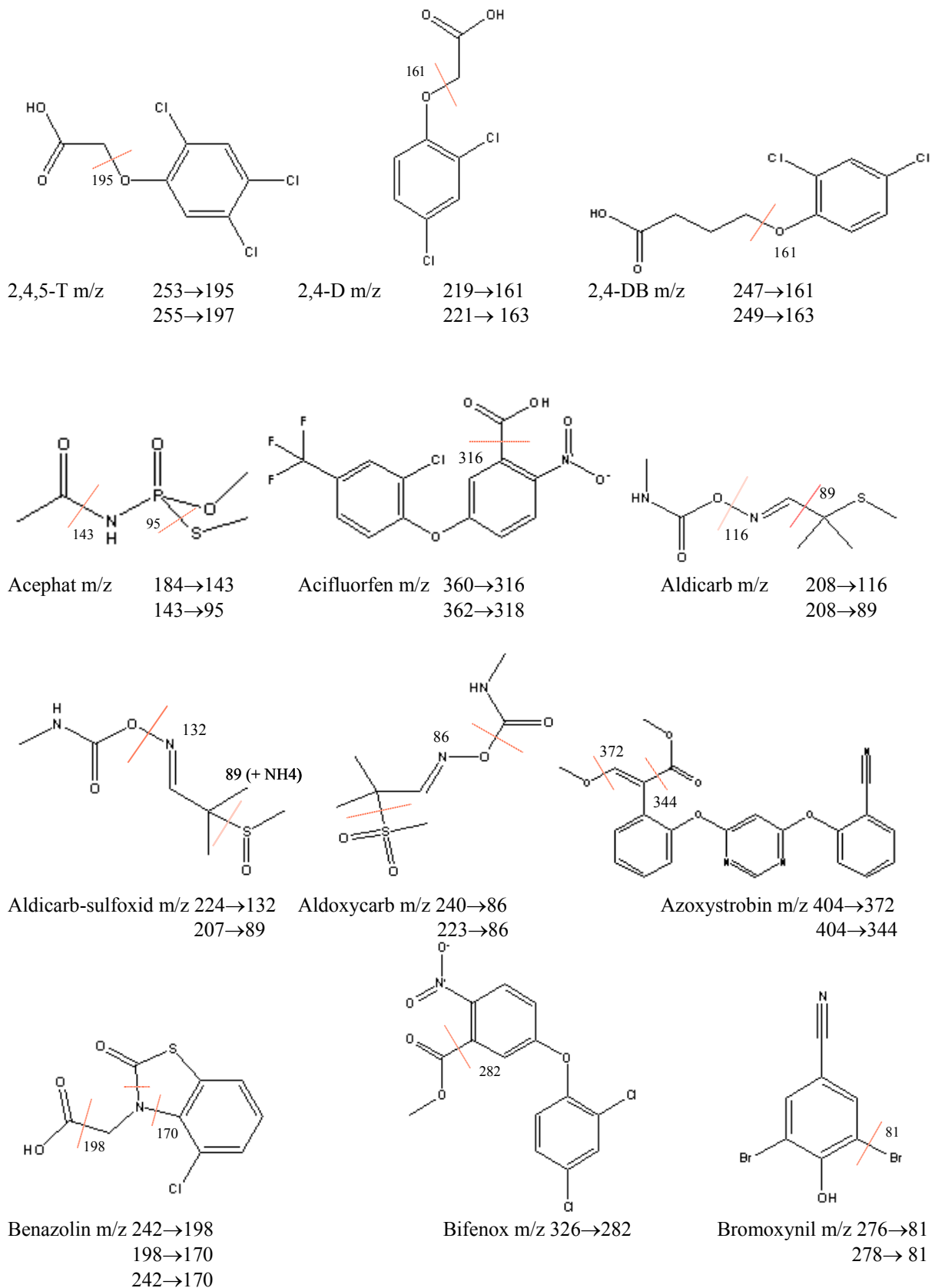
Wirkstoff	Molekulare Masse	Dampfdruck [mm Hg] 25°C	pK <sub>a</sub>	Löslichkeit [mg/L] 25°C	Log K <sub>ow</sub>
Fenhexamid	302.2				
Fenobucarb	207.27	0.000143		420 *	2.78
Fenoprop	269.51	9.97E-006	2.84	71	3.80
Fenoxaprop	333.73	3,15E-02		0.9	
Fenoxycarb	301.34	6.5E-009		6 *	4.30
Fenuron	164.21	3.75E-005		4030	0.98
Flamprop	321.74	7.78E-009	3.72	18.2 *	2.90
Fluazifop	327.26	4,13E-07		1	4.5
Fludioxonil	248.19	2.93E-009	<0	1.8	4.12
Fluometuron	232.20	9.38E-007		110 *	2.42
Flusilazol	315.4	2,93E-07		45	3.74
Furathiocarb	382.47	2.93E-008		11	4.70
Haloxyfop	361.70	1,23E-07	2.9	0.58	1.34
Hexaconazol	314.21	7,50E-08*		170	3.9
Hexaflumuron	461.15	4.43E-007		0.027 *	5.68
Imazalil	297.19	1.19E-006	6.53	180 *	3.82
Imidacloprid	255.67	3E-012 *		610 *	0.57
Ioxynil	370.92	<7,50E-06*	3.96	50	
Isopropylanilin	135.21				
Isoproturon	206.29	2.47E-008		65 *	2.87
D1M-Isoproturon	192.26				
D2M-Isoproturon	178.23				
Linuron	249.10	1.43E-006		75	3.20
MCPA	200.62	5.9E-006	3.13	630	3.25
MCPB	228.67	4,33E-05	4.84	44	2.79
Mecoprop	214.65	7.5E-007	3.10	320 *	3.13
Methabenzthiazuron	221.28	1.13E-007		59 *	2.64
Methamidophos	141.13	3.53E-005		1E+006 *	-0.80
Methiocarb	225.31	2.7E-007		27 *	2.92
Methomyl	162.21	5.4E-006		5.8E+004	0.60
Metoxuron	228.68	3.23E-005 *		678	1.64
Metsulfuron-methyl	381.36	2.5E-012	3.64	9500	2.20
Monolinuron	214.65	0.00015 *		930 *	2.30
Monuron	198.65	5.03E-007		230	1.94
Neburon	275.18	1.01E-006		4.8	4.10
Omethoat	213.19	2.48E-005 *		1E+006 *	-0.74
Oxamyl	219.26	0.00023		2.8E+005	-0.48
PCP	266.34	0.00011	4.70	14	5.12
Pencycuron	328.84	3.75E-012		0.3 *	4.82
Pirimicarb	238.29	7.28E-006	4.53	2700	1.70
Promecarb	207.27	3,00E-05		92	3.10
Propamocarb	188.27	6,00E-06	pK <sub>b</sub> =4.9	867000	
Propiconazol	342.23	1,00E-06	1.09	110 *	3.72
Propoxur	209.24	9.68E-006 *		1860 *	1.52
Prosulfocarb	251.39	5.18E-007		13.2 *	4.65

Tabelle 9.1 (Fortsetzung)

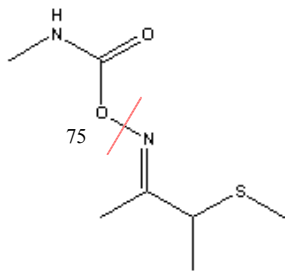
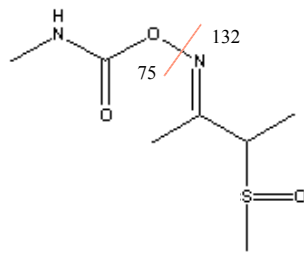
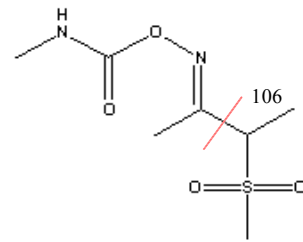
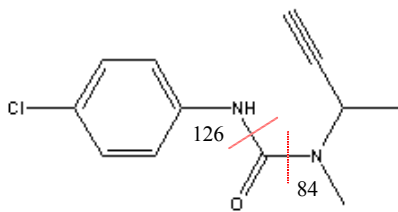
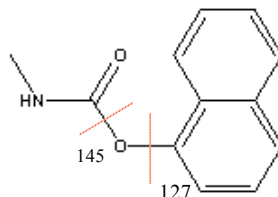
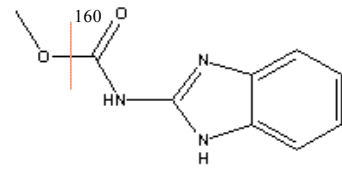
Wirkstoff	Molekulare Masse	Dampfdruck [mm Hg] 25°C	pK <sub>a</sub>	Löslichkeit [mg/L] 25°C	Log K <sub>ow</sub>
Pyrimethanil	199.25	1,65E-05	3.52	121	2.84
Quizalofop	344.75	6,49E-06*		0.3*	1.9
Quizalofop	344.75	6,49E-06*		0.3*	1.9
Tebuconazol	307.83	1.28E-008		36 *	3.70
Tebufenozid	352.48	2.25E-008		0.83	4.25
Teflubenzuron	381.11	6E-12		0.019	4.56
Thiabendazole	201.25	4,00E-09	4.64	50	2.47
Thifensulfuron-methyl	387.40	1.28E-010	4.0	230	1.56
Thiodicarb	354.46	7,00E-05		35	1.70
Thiofanox	218.31	1,70E-05		5200	
Thiophanat-methyl	342.40	7.13E-008	7.28	26.6 *	1.40
Triflumuron	358.70	3,00E-10*		0.025*	4.91

\* bestimmt bei 20°C

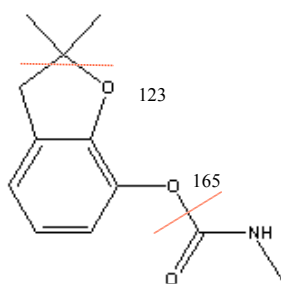
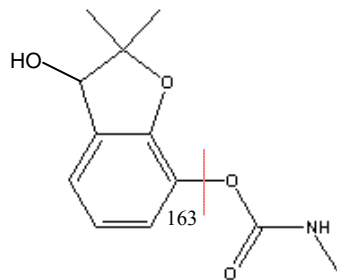
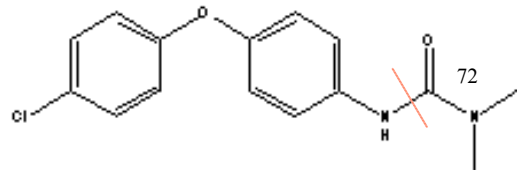
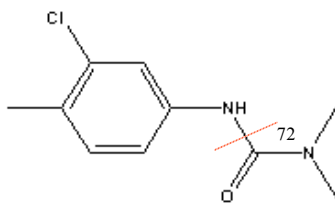
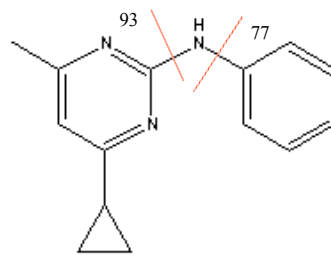
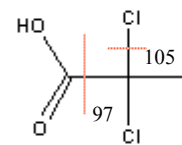
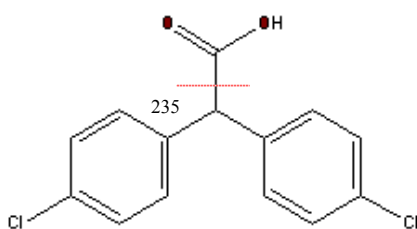
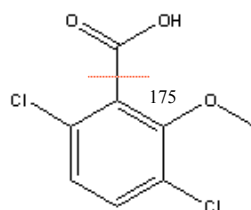
## Struktur [164] und Fragmentierung der untersuchten Analyten



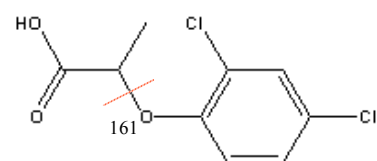


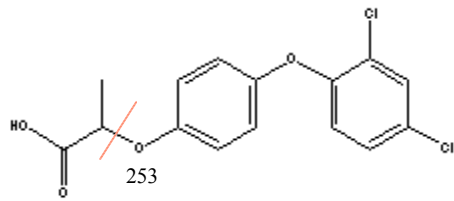
Butocarboxim m/z 208→75  
191→75Butocarboxim-sulfoxid m/z 224→132  
207→75Butoxycarboxim m/z 240→106  
223→106Buturon m/z 237→126  
237→84Carbaryl m/z 202→145  
202→127

Carbendazim m/z 192→160

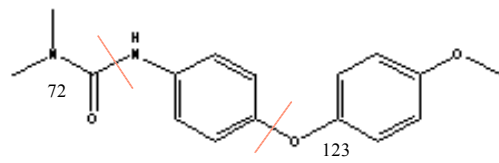
Carbofuran m/z 222→165  
222→123Carbofuran 3-hydroxy m/z 255→163  
238→163Chloroxuron m/z 291→72  
293→72Chlortoluron m/z 213→72  
215→72Cyprodinil m/z 226→93  
226→77Dalapon m/z 141→105  
141→97DDA m/z 235→235  
237→237

Dicamba m/z 219→175

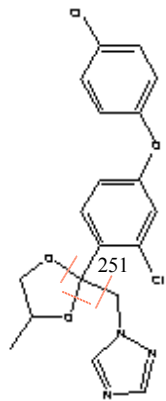
Dichlorprop m/z 233→161  
235→163



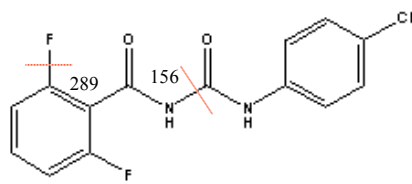
Diclofop m/z 325→253  
327→255



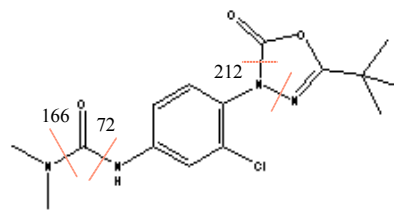
Difenoxuron m/z 287→123  
287→72



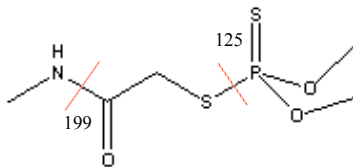
Difenconazol m/z 406→251  
406→253



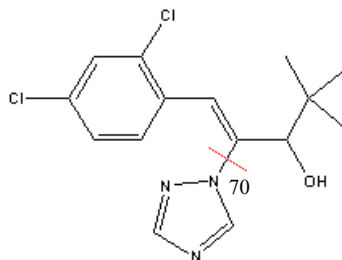
Diflubenzuron m/z 309→289  
309→156  
311→156



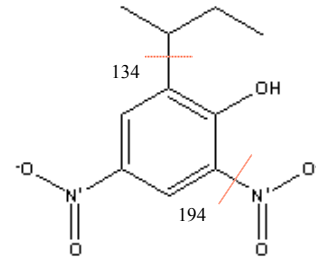
Dimefuron m/z 339→72  
341→72  
(-) 337→166  
339→212



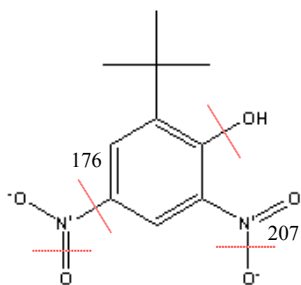
Dimethoat m/z 230→199  
230→125



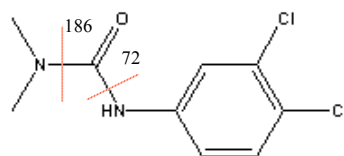
Diniconazol m/z 326→70  
328→70



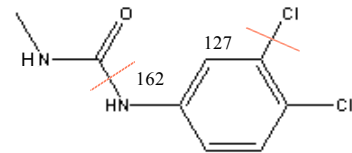
Dinoseb m/z 239→194  
239→134



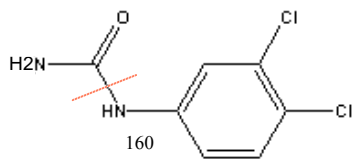
Dinoterb m/z 239→207  
239→176



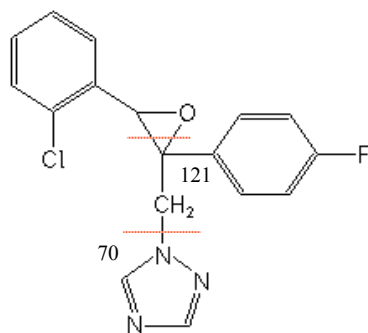
Diuron m/z 233→72  
235→72  
(-) 231→186  
233→188



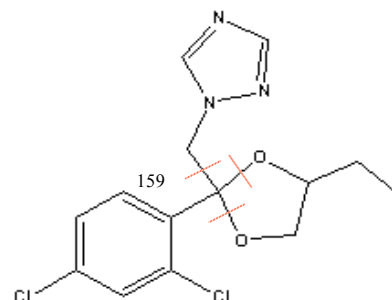
D1M-Diuron m/z 219→162  
(-) 219→127



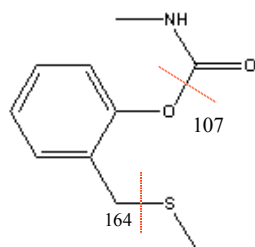
D2M- Diuron m/z (-) 203→160  
205→162



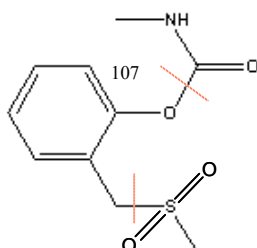
Epoxiconazol m/z 330→121  
330→70



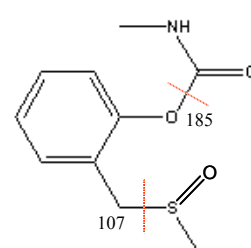
Etaconazol m/z 328→159  
330→161



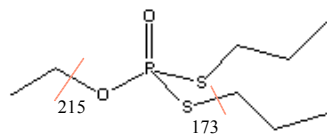
Ethiofencarb m/z 226→107  
226→164



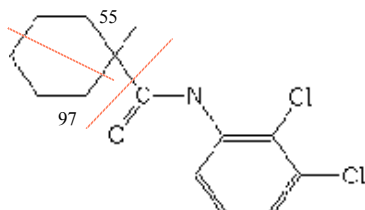
Ethiofencarb-sulfon m/z 275→107  
258→107



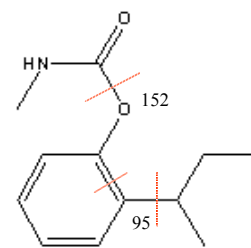
Ethiofencarb-sulfoxid m/z 242→185  
242→107



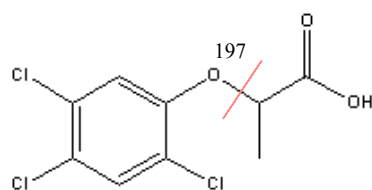
Ethoprophos m/z 243→215  
243→173



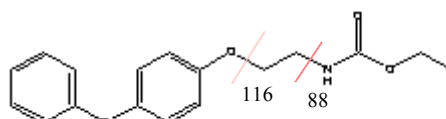
Fenhexamid m/z 302→97  
302→55



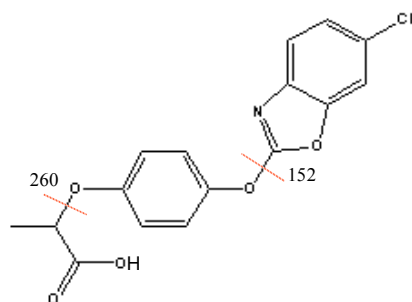
Fenobucarb m/z 208→152  
208→95



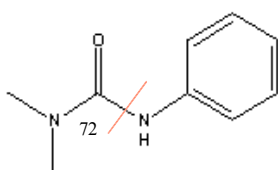
Fenoprop m/z 269→197  
271→199



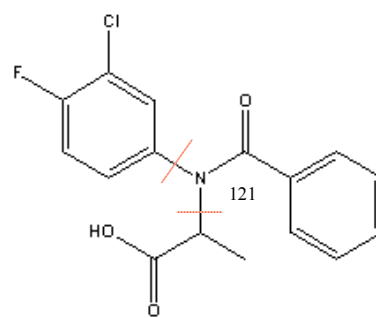
Fenoxycarb m/z 302→116  
302→88



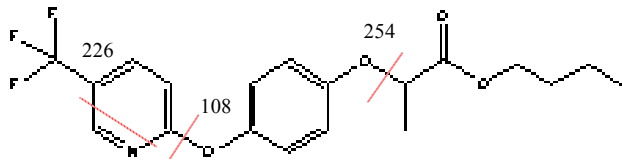
Fenoxaprop m/z 332→260  
332→152



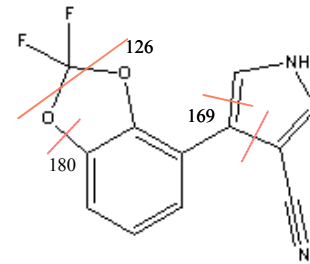
Fenuron m/z 165→72



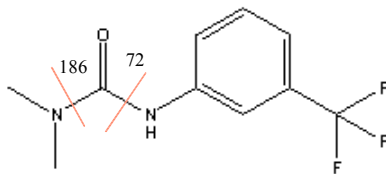
Flamprop m/z 320→121



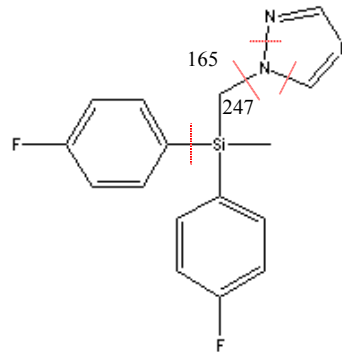
Fluazifop m/z 326→254  
254→226  
254→108



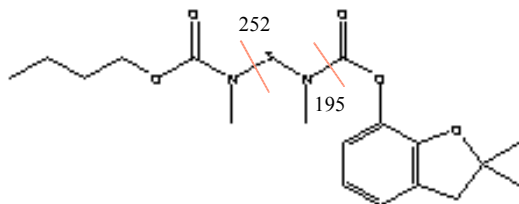
Fludioxonil m/z 247→180  
247→169  
247→126



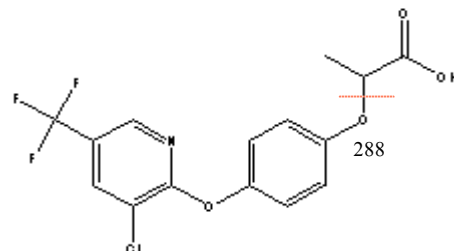
Fluometuron m/z 233→72  
(-) 231→186



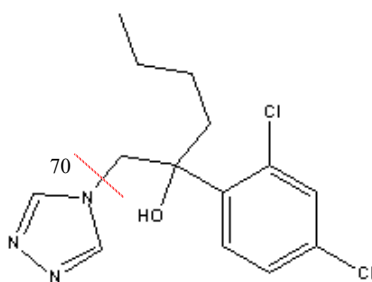
Flusilazol m/z 316→247  
316→165



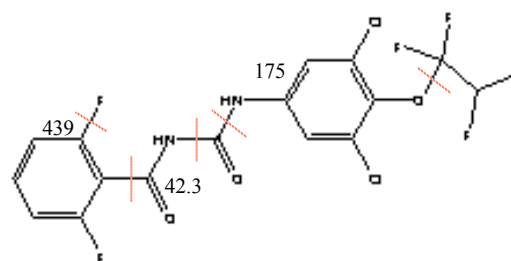
Furathiocarb m/z 383→252  
383→195



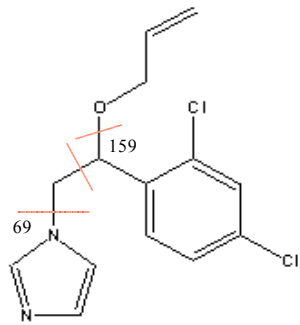
Haloxyfop m/z 360→288  
362→290



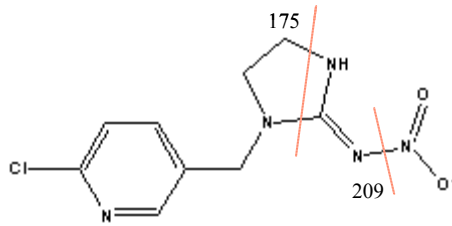
Hexaconazol m/z 314→70  
316→70



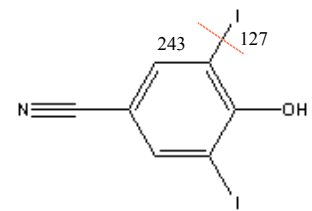
Hexaflumuron m/z 459→439  
459→175  
441→42.3  
439→42.3



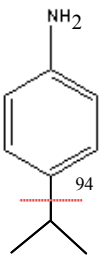
Imazalil m/z 297→159  
297→69



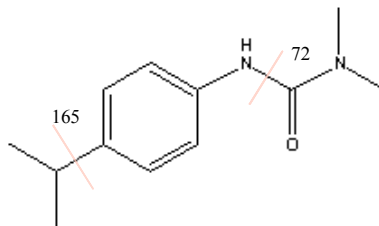
Imidacloprid 256→175  
256→209



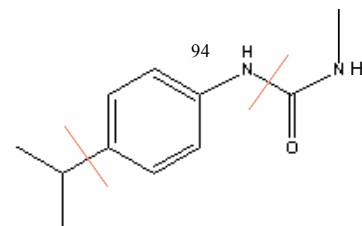
Ioxynil m/z 370→243  
370→127



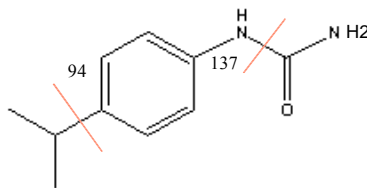
Isopropylanilin m/z 136→94



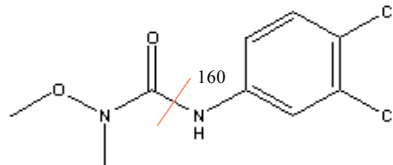
Isoproturon m/z 207→165  
207→72



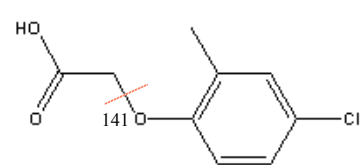
D1M-Isoproturon m/z 193→94



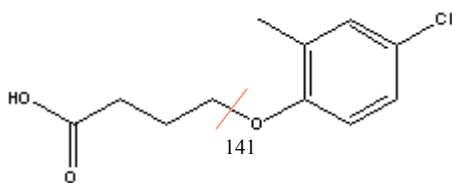
D2M-Isoproturon m/z 179→137  
179→94



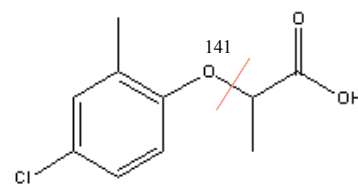
Linuron m/z 249→160  
249→182 (160+Na)  
(-) 247→160  
249→162



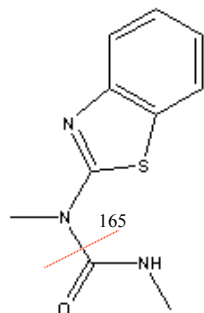
MCPA m/z 199→141  
201→143



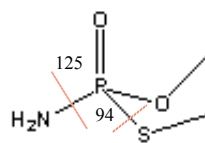
MCPB m/z 227→141  
229→143



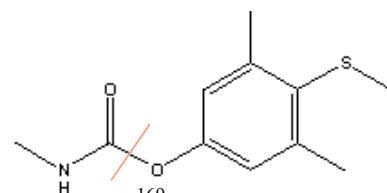
Mecoprop m/z 213→141  
215→143



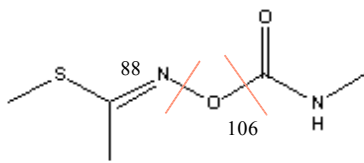
Methabenzthiazuron m/z 222→165



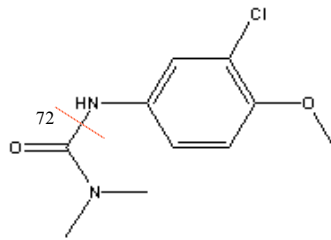
Methamidophos m/z 142→125  
142→94



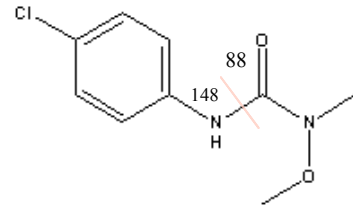
Methiocarb m/z 243→169  
226→169



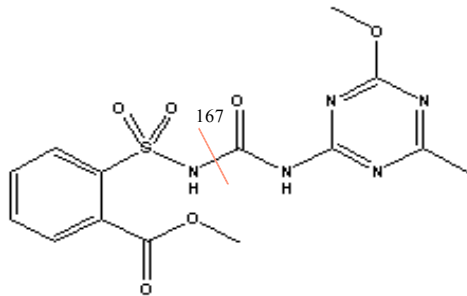
Methomyl m/z 163→106  
163→88



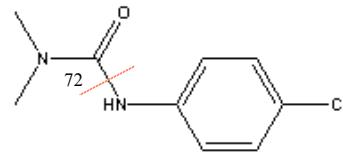
Metoxuron m/z 229→72



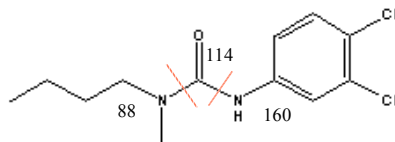
Monolinuron m/z 215→148 (+Na)  
215→88



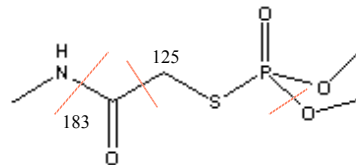
Metsulfuron-methyl m/z 382→167



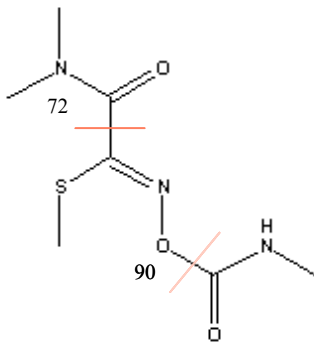
Monuron m/z 199→72  
201→72



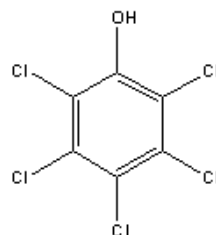
Neburon m/z 275→114  
275→88  
(-) 273→160  
275→162



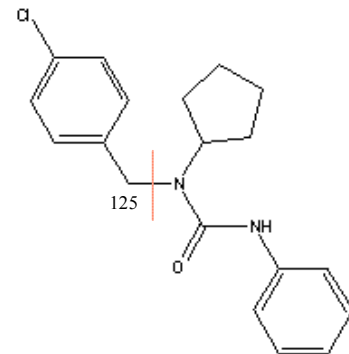
Omethoat m/z 214→183  
214→125



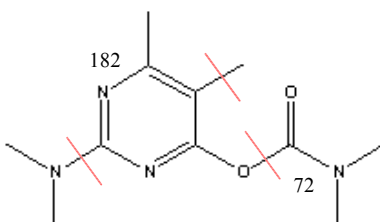
Oxamyl m/z 237→90  
237→72



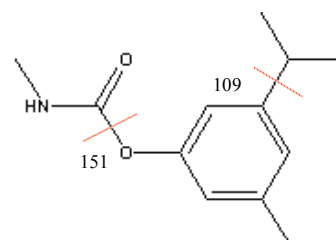
Pentachlorophenol m/z 265→265  
267→267



Pencycuron m/z 329→125  
331→127



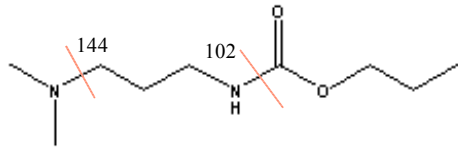
Pirimicarb m/z 239→182



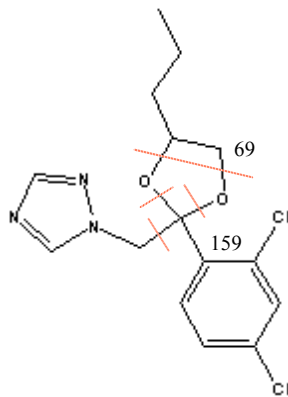
Promecarb m/z 208→151

239→72

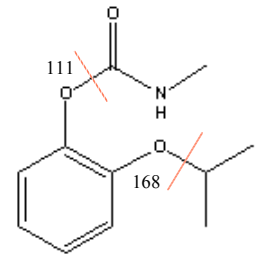
208→109



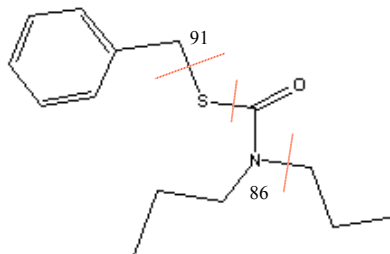
Propamocarb m/z 189→144  
189→102



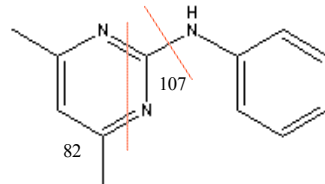
Propiconazol m/z 342→159  
342→69



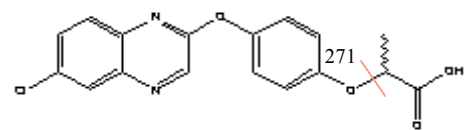
Propoxur m/z 210→168  
210→111



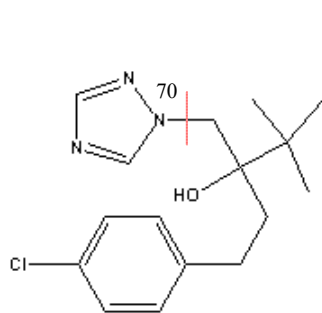
Prosulfocarb m/z 252→91  
252→86



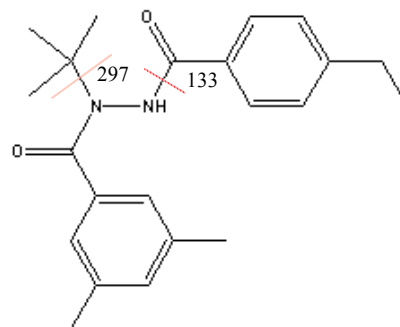
Pyrimethanil m/z 200→107  
200→82



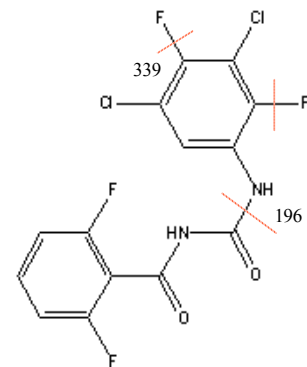
Quizalofop m/z 343→271  
345→273



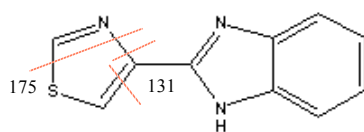
Tebuconazol m/z 308→70  
310→70



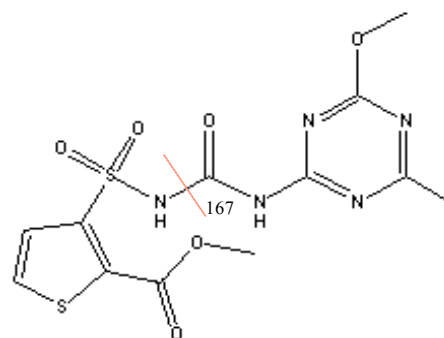
Tebufenozid m/z 353→297  
353→133



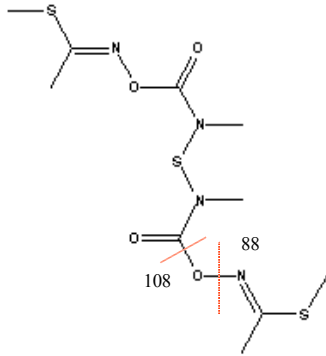
Teflubenzuron m/z 379→339  
379→196



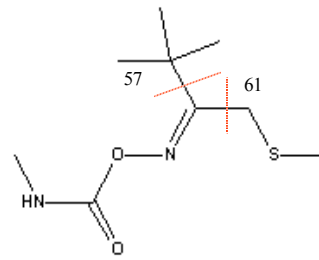
Thiabendazol m/z 202→175  
202→131



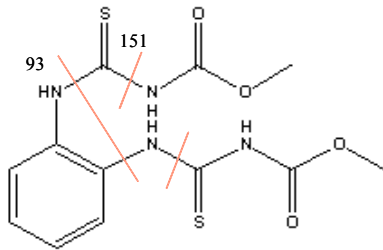
Thifensulfuron-methyl m/z 388→167



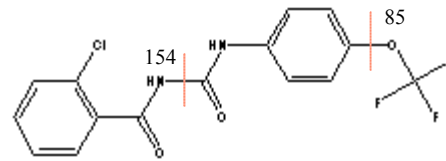
Thiodicarb m/z 355→108  
355→88



Thiofanox m/z 219→61  
219→57



Thiophanat methyl m/z 343→151  
343→93



Triflumuron m/z 357→154  
357→85



Tabelle 9.2.a: Präzision der HPLC- Methoden (Messpräzision) für die Bestimmung der Analyten, ESI+ Methode

Massen- übergang	Analyt	Variationskoeffizient	Variationskoeffizient
		"within day" [%] n=6	"day to day" [%] n=6
184.0 / 143.0	Acephat	5,26	12,12
143.0 / 95.0	Acephat	1,42	11,91
208.0 / 116.0	Aldicarb	5,80	9,55
208.0 / 89.0	Aldicarb	4,99	14,13
240.0 / 86.0	Aldicarb-sulfon	4,24	10,36
223.0 / 86.0	Aldicarb-sulfon	9,80	14,41
224.0 / 132.0	Aldicarb-sulfoxid	6,28	11,30
207.0 / 89.0	Aldicarb-sulfoxid	4,82	12,83
404.0 / 372.0	Azoxystrobin	2,71	5,50
404.0 / 344.0	Azoxystrobin	8,51	13,94
208.0 / 75.0	Butocarboxim	11,37	11,47
191.0 / 75.0	Butocarboxim	13,56	13,84
207.0 / 75.0	Butocarboxim-sulfoxid	4,30	15,97
224.0 / 132.0	Butocarboxim-sulfoxid	5,12	9,98
240.0 / 106.0	Butoxycarboxim	2,18	12,84
223.0 / 106.0	Butoxycarboxim	7,95	13,74
237.0 / 84.0	Buturon	3,98	9,79
237.0 / 126.0	Buturon	7,47	7,69
202.0 / 145.0	Carbaryl	7,20	11,81
202.0 / 127.0	Carbaryl	4,06	13,14
192.0 / 192.0	Carbendazim	6,28	15,92
192.0 / 160.0	Carbendazim	9,73	14,78
222.0 / 165.0	Carbofuran	5,92	7,87
222.0 / 123.0	Carbofuran	3,01	11,04
238.0 / 163.0	Carbofuran-3-hydroxy	7,40	7,49
255.0 / 163.0	Carbofuran-3-hydroxy	6,05	12,58
291.0 / 72.0	Chloroxuron	6,64	7,74
293.0 / 72.0	Chloroxuron	6,09	9,27
213.0 / 72.0	Chlortoluron	3,87	7,75
215.0 / 72.0	Chlortoluron	8,53	8,91
226.0 / 226.0	Cyprodinil	2,88	17,90
226.0 / 93.0	Cyprodinil	6,78	12,08
226.0 / 77.0	Cyprodinil	8,32	12,01
193.0 / 193.0	D1M-Ipo	4,43	5,18
193.0 / 94.0	D1M-Ipo	4,72	8,80
179.0 / 137.0	D2M-Ipo	5,95	13,48
179.0 / 94.0	D2M-Ipo	4,53	13,98
406.0 / 251.0	Difenconazol	6,50	13,86
408.0 / 253.0	Difenconazol	4,14	12,14
287.0 / 72.0	Difenoxuron	2,17	8,30
287.0 / 123.0	Difenoxuron	5,52	6,86
339.0 / 72.0	Dimefuron	6,11	8,08
341.0 / 72.0	Dimefuron	4,00	6,56
230.0 / 199.0	Dimethoat	8,12	11,45
230.0 / 125.0	Dimethoat	7,96	10,20
326.0 / 70.0	Diniconazol	6,48	13,43
328.0 / 70.0	Diniconazol	7,43	12,01

Tabelle 9.2.a: (Fortsetzung)

Massen- übergang	Analyt	Variationskoeffizient	Variationskoeffizient
		"within day" [%] n=6	"day to day" [%] n=6
233.0 / 72.0	Diuron	10,92	11,13
235.0 / 72.0	Diuron	7,07	13,73
330.0 / 121.0	Epoxiconazol	6,28	8,21
330.0 / 70.0	Epoxiconazol	10,77	12,59
328.0 / 159.0	Etaconazol	8,45	10,19
330.0 / 161.0	Etaconazol	5,36	10,45
226.0 / 107.0	Ethiofencarb	9,00	11,47
226.0 / 164.0	Ethiofencarb	6,39	9,81
275.0 / 107.0	Ethiofencarb-sulfon	10,32	12,61
258.0 / 107.0	Ethiofencarb-sulfon	10,84	11,38
242.0 / 107.0	Ethiofencarb-sulfoxid	7,90	11,86
242.0 / 185.0	Ethiofencarb-sulfoxid	5,81	8,57
243.0 / 243.0	Ethoprophos	3,01	14,28
243.0 / 173.0	Ethoprophos	3,87	5,89
243.0 / 215.0	Ethoprophos	5,85	11,49
302.0 / 97.0	Fenhexamid	6,36	9,02
302.0 / 55.0	Fenhexamid	8,46	15,03
208.0 / 95.0	Fenobucarb	5,59	7,03
208.0 / 152.0	Fenobucarb	6,72	8,26
302.0 / 88.0	Fenoxycarb	9,75	11,98
302.0 / 116.0	Fenoxycarb	7,12	10,38
165.0 / 165.0	Fenuron	4,45	12,41
165.0 / 72.0	Fenuron	6,54	13,11
233.0 / 233.0	Fluometuron	4,05	5,22
233.0 / 72.0	Fluometuron	3,36	4,91
316.0 / 247.0	Flusilazol	4,28	11,03
316.0 / 165.0	Flusilazol	4,59	10,81
383.0 / 195.0	Furathiocarb	6,52	7,51
383.0 / 252.0	Furathiocarb	9,12	13,93
314.0 / 70.0	Hexaconazol	4,11	8,95
316.0 / 70.0	Hexaconazol	5,78	17,39
297.0 / 297.0	Imazalil	10,04	12,95
297.0 / 159.0	Imazalil	8,01	9,97
297.0 / 69.0	Imazalil	6,79	7,56
256.0 / 175.0	Imidacloprid	9,28	12,28
256.0 / 209.0	Imidacloprid	6,16	6,17
136.0 / 136.0	Ipo-anilin	1,81	6,40
136.0 / 94.0	Ipo-anilin	4,25	6,23
207.0 / 72.0	Isoproturon	2,84	9,15
207.0 / 165.0	Isoproturon	5,92	6,13
249.0 / 160.0	Linuron	9,16	11,64
249.0 / 182.0	Linuron	12,85	13,92
142.0 / 94.0	Metamidophos	0,98	9,62
142.0 / 125.0	Metamidophos	5,47	14,63
222.0 / 222.0	Methabenzthiazuron	4,24	7,43
222.0 / 165.0	Methabenzthiazuron	6,64	9,12

Tabelle 9.2.a: (Fortsetzung)

Massen- übergang	Analyt	Variationskoeffizient	Variationskoeffizient
		"within day" [%] n=6	"day to day" [%] n=6
226.0 / 169.0	Methiocarb	7,81	8,00
243.0 / 169.0	Methiocarb	12,23	14,17
163.0 / 88.0	Methomyl	9,16	11,33
163.0 / 106.0	Methomyl	6,76	11,81
229.0 / 229.0	Metoxuron	6,40	11,58
229.0 / 72.0	Metoxuron	2,70	8,82
382.0 / 167.0	Metsulfuron-methyl	5,73	9,29
215.0 / 148.0	Monolinuron	6,98	9,13
215.0 / 88.0	Monolinuron	7,56	12,50
199.0 / 72.0	Monuron	2,74	6,71
201.0 / 72.0	Monuron	6,12	10,78
275.0 / 88.0	Neburon	8,04	9,12
275.0 / 114.0	Neburon	5,43	6,63
214.0 / 125.0	Omethoat	4,03	13,36
214.0 / 183.0	Omethoat	5,08	14,08
237.0 / 72.0	Oxamyl	9,49	10,79
237.0 / 90.0	Oxamyl	2,89	9,54
329.0 / 125.0	Pencycuron	6,36	9,09
331.0 / 127.0	Pencycuron	6,35	8,29
239.0 / 72.0	Pirimicarb	4,65	10,60
239.0 / 182.0	Pirimicarb	4,97	12,81
208.0 / 109.0	Promecarb	3,53	8,23
208.0 / 151.0	Promecarb	7,87	7,99
189.0 / 102.0	Propamocarb	4,04	8,29
189.0 / 144.0	Propamocarb	3,95	8,37
342.0 / 159.0	Propiconazol	7,31	15,47
342.0 / 69.0	Propiconazol	6,55	10,57
210.0 / 111.0	Propoxur	7,32	15,67
210.0 / 168.0	Propoxur	6,49	16,16
252.0 / 91.0	Prosulfocarb	6,09	10,22
252.0 / 86.0	Prosulfocarb	7,87	13,84
200.0 / 200.0	Pyrimethanil	7,13	18,07
200.0 / 107.0	Pyrimethanil	3,86	6,65
200.0 / 82.0	Pyrimethanil	6,92	8,28
353.0 / 297.0	Tebufenozide	4,88	5,85
353.0 / 133.0	Tebufenozide	8,64	9,85
308.0 / 70.0	Terbuconazol	5,24	8,73
310.0 / 70.0	Terbuconazol	6,15	9,85
202.0 / 175.0	Thiabendazole	7,89	9,74
202.0 / 131.0	Thiabendazole	9,42	16,44
388.0 / 167.0	Thifensulfuron-methyl	5,84	14,30
355.0 / 88.0	Thiodicarb	7,42	8,76
355.0 / 108.0	Thiodicarb	8,64	16,57
219.0 / 57.0	Thiofanox	4,14	12,34
219.0 / 61.0	Thiofanox	3,26	3,52

Tabelle 9.2.b: Präzision der HPLC- Methoden (Messpräzision), ESI- Methode

Massen- übergang	Analyt	Variationskoeffizient	
		"within day" [%] n=6	"day to day" [%] n=6
253.0 / 253.0	2,4,5-T	5,43	14,93
253.0 / 195.0	2,4,5-T	6,54	6,91
255.0 / 197.0	2,4,5-T	6,07	12,89
219.0 / 219.0	2,4-D	3,23	16,92
219.0 / 161.0	2,4-D	1,14	14,41
221.0 / 163.0	2,4-D	3,53	16,52
247.0 / 247.0	2,4-DB	9,46	13,05
247.0 / 161.0	2,4-DB	7,38	12,40
249.0 / 163.0	2,4-DB	5,34	10,98
360.0 / 360.0	Acifluorfen	6,16	16,90
360.0 / 316.0	Acifluorfen	4,69	15,25
362.0 / 318.0	Acifluorfen	8,94	16,13
198.0 / 170.0	Benazolin	6,78	12,68
242.0 / 198.0	Benazolin	4,71	12,64
242.0 / 170.0	Benazolin	5,79	11,87
326.0 / 326.0	Bifenox	5,13	12,95
326.0 / 282.0	Bifenox	7,18	18,58
276.0 / 81.0	Bromoxynil	1,93	9,28
278.0 / 81.0	Bromoxynil	0,40	7,75
289.0 / 134.0	Chloroxuron	3,35	16,71
289.0 / 178.0	Chloroxuron	4,39	14,71
289.0 / 244.0	Chloroxuron	3,70	15,67
219.0 / 162.0	D1M-Diuron	3,06	11,08
219.0 / 219.0	D1M-Diuron	4,60	7,18
205.0 / 162.0	D2M-Diuron	2,50	3,98
203.0 / 160.0	D2M-Diuron	2,89	5,56
141.0 / 97.0	Dalapon	6,45	14,37
141.0 / 105.0	Dalapon	6,81	19,23
235.0 / 235.0	DDA	4,97	12,83
237.0 / 237.0	DDA	8,95	14,41
219.0 / 219.0	Dicamba	8,36	16,90
219.0 / 175.0	Dicamba	7,30	16,25
233.0 / 233.0	Dichlorprop	5,20	9,89
233.0 / 161.0	Dichlorprop	4,45	8,08
235.0 / 163.0	Dichlorprop	4,75	16,52
325.0 / 325.0	Diclofop	1,60	7,64
325.0 / 253.0	Diclofop	4,94	10,19
327.0 / 255.0	Diclofop	1,30	13,04
309.0 / 289.0	Diflubenzuron	3,13	17,94
309.0 / 156.0	Diflubenzuron	3,87	8,66
311.0 / 156.0	Diflubenzuron	6,86	14,22
337.0 / 166.0	Dimefuron	6,48	19,29
339.0 / 212.0	Dimefuron	6,38	10,53
239.0 / 194.0	Dinoseb	3,00	10,09
239.0 / 134.0	Dinoseb	5,31	8,87
239.0 / 207.0	Dinoterb	3,94	5,07
239.0 / 176.0	Dinoterb	3,00	6,75
231.0 / 186.0	Diuron	3,09	8,73

Tabelle 9.2.b: (Fortsetzung)

Massen- übergang	Analyt	Variationskoeffizient	
		"within day" [%] n=6	"day to day" [%] n=6
233.0 / 188.0	Diuron	1,24	8,75
269.0 / 269.0	Fenoprop	7,76	11,33
269.0 / 197.0	Fenoprop	4,38	14,97
271.0 / 199.0	Fenoprop	4,46	19,35
332.0 / 152.0	Fenoxaprop	5,47	15,89
332.0 / 260.0	Fenoxaprop	9,63	15,95
320.0 / 320.0	Flamprop	6,23	10,81
320.0 / 121.0	Flamprop	2,38	12,67
326.0 / 254.0	Fluazifop	6,33	13,82
254.0 / 108.0	Fluazifop	5,56	17,56
254.0 / 226.0	Fluazifop	2,36	8,42
247.0 / 126.0	Fludioxonil	1,30	3,40
247.0 / 169.0	Fludioxonil	2,10	5,42
247.0 / 180.0	Fludioxonil	3,07	9,14
231.0 / 186.0	Fluometuron	4,42	12,44
231.0 / 231.0	Fluometuron	2,87	11,23
360.0 / 288.0	Haloxyfop	5,47	12,30
362.0 / 290.0	Haloxyfop	3,70	11,57
360.0 / 360.0	Haloxyfop	5,12	17,00
459.0 / 439.0	Hexaflumuron	2,16	4,48
459.0 / 175.0	Hexaflumuron	0,99	14,10
441.0 / 42.3	Hexaflumuron	1,32	13,93
439.0 / 42.3	Hexaflumuron	5,38	13,89
370.0 / 370.0	Ioxynil	0,93	12,13
370.0 / 127.0	Ioxynil	3,83	9,40
370.0 / 243.0	Ioxynil	2,06	13,91
247.0 / 160.0	Linuron	5,36	11,58
249.0 / 162.0	Linuron	6,90	16,77
199.0 / 199.0	MCPA	6,30	11,30
199.0 / 141.0	MCPA	6,13	12,18
201.0 / 143.0	MCPA	6,26	17,40
227.0 / 227.0	MCPB	8,42	14,31
227.0 / 141.0	MCPB	4,48	13,72
229.0 / 143.0	MCPB	7,38	12,16
213.0 / 213.0	Mecoprop	1,80	6,38
213.0 / 141.0	Mecoprop	3,23	12,53
215.0 / 143.0	Mecoprop	5,63	19,04
273.0 / 160.0	Neburon	1,85	11,49
275.0 / 162.0	Neburon	0,92	12,67
265.0 / 265.0	PCP	1,80	14,72
267.0 / 267.0	PCP	0,46	12,68
343.0 / 271.0	Quizalofop	4,88	11,03
345.0 / 273.0	Quizalofop	6,61	11,08
379.0 / 339.0	Teflubenzuron	2,09	6,90
379.0 / 196.0	Teflubenzuron	4,77	10,07
357.0 / 154.0	Triflumuron	0,99	7,19
357.0 / 85.0	Triflumuron	5,21	13,54

**Publikationen**

Pantiru, M., Tsiakatouras, G., Martens, D., Ochsenkühn-Petropoulou, M., Kettrup, A. (2002): Development of clean-up methods for the determination of carbamates and acidic pesticides in agricultural products, SECOTOX 2002 "Trends and advances in environmental chemistry and ecotoxicology", Book of Abstracts, Masarykova univerzita v Brně, ISBN 80-210-2971-4, 78-82

Martens, D., Pantiru, M., Forster, S., Kettrup, A.: LC/MS/MS- Analytik von Pflanzenschutzmitteln in Erntegütern - wie viel Extraktreinigung ist notwendig?, Poster, DFG- Workshop „Anwendung der LC-MS/MS in der Rückstandsanalytik“, Berlin, 24-25.06.2003

Pantiru, M., Tsiakatouras, G., Martens, D., Ochsenkühn-Petropoulou, M., Kettrup, A. (2003): Development of clean-up methods for the determination of carbamates and acidic pesticides in agricultural products, Fresenius Environmental Bulletin, 12 (8) : 871 - 875

## Lebenslauf

Name: Monica Elena Pantiru

Geburtsdatum: 14.02.1973  
Geburtsort: Toplita, Rumänien  
Staatsangehörigkeit: rumänisch  
Familienstand: ledig

Schule: 09.1979-06.1987 Grundschole in Subcetate-Mures,  
Harghita, Rumänien

Berufsausbildung: 09.1987-06.1991 Theoretisches Lyzeum „Unirea“  
Tg. Mures, Rumänien  
Berufserlaubnis als Chemie-Laborantin

Universitätsstudium: 10.1991-06.1996 Universität „Babes-Bolyai“ Cluj-Napoca,  
Fakultät für Chemie und chemische  
Ingenieurberufe,  
Lizentiat in Chemie und Physik,  
Fachgebiet Chemiephysik  
*Thema der Diplomarbeit:*  
Molekulare Topologie, Gleichartigkeitsstudien

Berufstätigkeit: 02.1997-08.1999 Diplom-Chemikerin bei der nationalen  
07.2000-09.2001 Wasserbehörde, Tg. Mures, Rumänien

Fortbildung: 09.1999-06.2000 Trainee-Programm des Bundesministeriums  
Entwicklung und Zusammenarbeit, mit  
Praxisphase im GSF-Forschungszentrum für  
Umwelt und Gesundheit, Institut für Hydrologie,  
Neuherberg

Doktorarbeit: 10.2001-07.2004 Diplom-Chemikerin am  
GSF-Forschungszentrum,  
Institut für ökologische Chemie,  
Prof. Dr. Dr. h.c. Antonius Kettrup  
*Thema der Dissertation:*  
Entwicklung einer LC/MS/MS-Methode zur  
Analytik polarer Pflanzenschutzmittel-  
Wirkstoffe und ihrer Metabolite in Erntegütern