

# Analyse af pesticider i vand

**Fokus på LC-MS- og LC-MS-MS-teknikker til pesticidanalyser. Her gives en kort gennemgang af metoderne og en beskrivelse af den seneste udvikling**

Af Rossana Bossi, [rb@ajl.dk](mailto:rb@ajl.dk), Steen Hopfner Petersen, [shp@ajl.dk](mailto:shp@ajl.dk) og Jean Schneider, [js@ajl.dk](mailto:js@ajl.dk), Alfred Jørgensen Laboratorium

Gennem de sidste 10 år er antallet af fund af pesticider i dansk grundvand steget betydeligt. For 10 år siden omfattede Miljøstyrelsens monitoringsprogram for pesticider i grundvand kun 8 stoffer. I de sidste fem år er monitoringsprogrammet først udvidet til ca. 25 stoffer og senere til 45 stoffer. Listen omfatter pesticider tilhørende forskellige kemiske klasser og udvalgte nedbrydningsprodukter.

Grænseværdien for pesticider og deres nedbrydningsprodukter i drikkevand er 0,1 µg/l, og summen må ikke overstige 0,5 µg/l. Det kræver analysemetoder, hvor der kan opnås en detektionsgrænse på en faktor 10 under dette niveau, hvilket vil sige 0,01 µg/l.

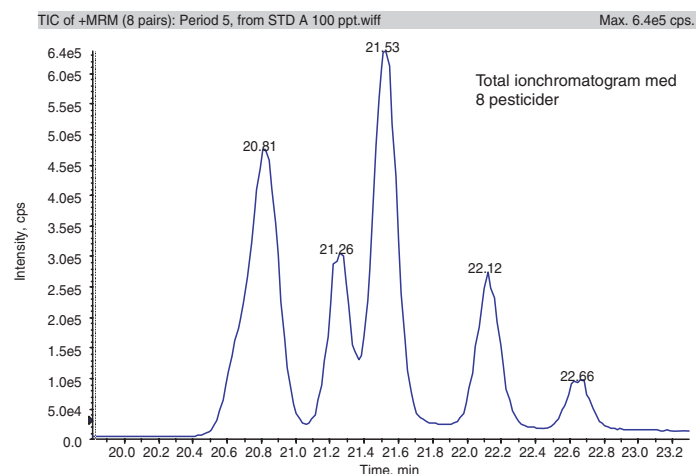
For at vurdere kvalitetsniveauet af pesticidanalyser i vand arrangerer Danmarks Miljøundersøgelser præstationsprøvnings, hvor laboratorierne kan afprøve deres metoder. På baggrund af resultater og kvalitetssystemer udpeges laboratorierne herefter af Miljøstyrelsen. For at undgå falske positive resultater kræves det, at der benyttes et massespektrometer, da det er den eneste detektor, som kan opnå lave detektionsgrænser og høj specificitet.

Gaschromatografi koblet til massespektrometri (GC-MS) har før været den mest anvendte metode til analyse af pesticider i vand. GC-MS er velegnet til analyse af upolære og termotabile stoffer svarende til de pesticider, man anvendte for 10 år siden. De sidste 10 år er der sket en udvikling i pesticidforbruget, idet de gamle og persistente pesticider er erstattet med moderne pesticider, som er letnedbrydelige i miljøet. Mange af disse er mere polære og termolabile og kan derfor ikke analyseres ved GC-MS. Polære stoffer, som er stabile ved høj temperatur, kan analyseres med GC, men kun efter derivatisering, f.eks. med diazomethan. Det kræver ekstra forberedelse før analysen samt brug af sundhedsskadelige kemikalier. Ud over dette kan der under derivatiseringen dannes andre stoffer, som kan interferere med analysen. Derfor har væskechromatografi (LC) med Diode Array Detector (DAD) eller ultraviolet detektor (UV) været brugt som komplementær analyseteknik til monitorering af pesticider i vand.

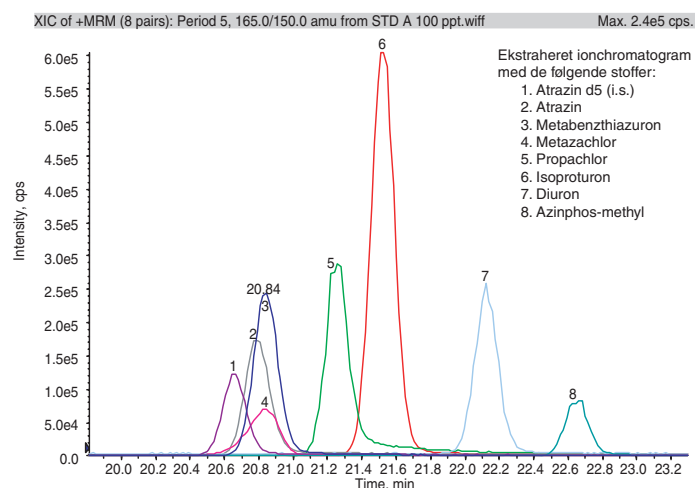
Da ioniseringsteknikkerne er blevet mere robuste, har LC koblet til massespektrometre (LC-MS) de sidste fem år for alvor kunnet konkurrere med GC-MS. Den hurtige udvikling af LC-MS-teknikken har gjort det muligt at producere forholdsvis billige og brugervenlige instrumenter. Derfor har LC-MS i de seneste år næsten erstattet GC-MS i forbindelse med pesticidanalyser, idet der kun er få pesticider tilbage fra monitoringsprogrammerne, som nødvendigvis skal analyseres med GC-MS. En oversigt over de seneste videnskabelige artikler om LC-MS i miljøanalyser publiceret i internationale tidsskrifter findes i [1].

## Ioniseringsteknikker med LC-MS

De tidligt udviklede ioniseringsteknikker for LC-MS (moving belt, particle beam og thermospray) havde for dårlig følsomhed og var ikke robuste nok til, at teknikken kunne bruges rutinemæssigt til sporanalyser. Først efter at Atmospheric Pressure Ionization (API) er blevet udbredt, er der sket et gennembrud med LC-MS som analyseteknik. API er en generel betegnelse for hovedsageligt to ioniseringsteknikker: Electrospray Ionization (ESI) og Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI). ESI er velegnet til meget polære forbindelser og/eller forbindelser med meget høj molvægt (f.eks. proteiner). Stofferne skal være let ioniserbare (f.eks. salte, syrer eller aminer) for at kunne analyseres med ESI. De tidlige udgaver af ESI kunne ikke anvendes ved almindelige LC-flowhastigheder, men efter den såkaldte »pneumatically assisted electrospray ionization« var blevet mulig, kunne ESI anvendes også ved flowhastigheder op til 1 ml/min. Ionerne dannes ved inddampning af ledede væskedråber i et højt elektrisk felt (4-5 kV), som kan være positivt eller negativt. Kemiske stoffer som syrer afgiver en proton og analyseres bedst ved negativ ionisering, mens stoffer som aminer optager en proton og analyseres bedst ved positiv ionisering. ESI er en mild ioniseringsteknik som hovedsageligt danner ioner, som svarer til molekylvægten plus



Figur 1. Total ionchromatogram (ESI positiv) med 8 pesticider.



Figur 2. Ekstraheret ionchromatogram fra total ionchromatogram i figur 1.



eller minus en atommasseenhed (amu), det vil sige  $[M + H]^+$  og  $[M - H]^-$ .

APCI anvendes mest til termisk stabile og mindre polære stoffer. En ladet corona-nål ioniserer den mobile fase, som herpå overfører ladningen til analytterne ved kemisk ionisering. APCI danner mest  $[M + H]^+$  og  $[M - H]^-$ , som er de mest intensive ioner, men der kan

også foregå en delvis fragmentering af molekylet på grund af den høje temperatur i ioniseringskammeret.

## LC-MS eller LC-MS-MS?

For at kunne identificere et stof ved massespektrometri skal der bruges mellem to og fire ioner, som er typiske for en bestemt

| Forbindelse           | Kemisk klasse       | Detektionsgrænse (ng/l) | Præcision (RSD %) |
|-----------------------|---------------------|-------------------------|-------------------|
| Atrazin               | Triazine            | 0,4                     | 2                 |
| Bentazon              | Benzothiadiazinone  | 1,0                     | 8                 |
| Bromacil              | Uracil              | 1,0                     | 5                 |
| Bromoxynil            | Hydroxybenzonitrile | 1,0                     | 7                 |
| Carbofuran            | Carbamate           | 0,3                     | 4                 |
| Chloridazon           | Pyridazinone        | 1,0                     | 4                 |
| 4-Chlorophenoxytsyre  | Nedbrydningsprodukt | 5,0                     | 6                 |
| Chlorsulfuron         | Sulfonylurea        | 3,0                     | 15                |
| Cyanazin              | Triazine            | 1,0                     | 4                 |
| 2,4-D                 | Phenoxytsyre        | 5,0                     | 4                 |
| Desethylatrazin       | Nedbrydningsprodukt | 0,7                     | 2                 |
| Desethylterbutylazin  | Nedbrydningsprodukt | 0,7                     | 5                 |
| Desisopropylatrazin   | Nedbrydningsprodukt | 2,0                     | 3                 |
| 2,4-Dichlorobenzamid  | Nedbrydningsprodukt | 1,0                     | 5                 |
| 2,4-dichlorophenol    | Nedbrydningsprodukt | 10                      | 4                 |
| Dichlorprop           | Phenoxytsyre        | 3,0                     | 4                 |
| Dichlorvos            | Organophosphat      | 2,0                     | 9                 |
| Dimethoat             | Organophosphat      | 0,5                     | 4                 |
| Dinoseb               | Dinitrophenol       | 1,0                     | 12                |
| Diuron                | Phenylurea          | 0,7                     | 6                 |
| DNOC                  | Dinitrophenol       | 2,0                     | 5                 |
| Ethofumesat           | Benzofuranyl        | 0,7                     | 5                 |
| Fenpropimorph         | morpholine          | 2,0                     | 10                |
| Flamprop              | Phenoxytsyre        | 2,0                     | 5                 |
| Hexazinon             | Triazinone          | 0,2                     | 5                 |
| Hydroxyatrazin        | Nedbrydningsprodukt | 0,2                     | 8                 |
| Hydroxycarbofuran     | Nedbrydningsprodukt | 2,0                     | 30                |
| Hydroxysimazin        | Nedbrydningsprodukt | 2,0                     | 17                |
| Hydroxyterbutylazin   | Nedbrydningsprodukt | 0,2                     | 6                 |
| Imazalil              | Azole               | 2,0                     | 5                 |
| Ioxynil               | Hydroxybenzonitrile | 0,5                     | 7                 |
| Isoproturon           | Phenylurea          | 0,2                     | 5                 |
| Linuron               | Phenylurea          | 2,0                     | 11                |
| Metabenzthiazuron     | Phenylurea          | 0,5                     | 10                |
| Metamitron            | Triazinone          | 2,0                     | 2                 |
| Metazachlor           | Chloroacetanilide   | 2,0                     | 7                 |
| Metoxuron             | Phenylurea          | 0,4                     | 3                 |
| Metribuzin            | Triazinone          | 2,0                     | 4                 |
| MCPA                  | Phenoxytsyre        | 5,0                     | 6                 |
| MCPB                  | Phenoxytsyre        | 3,0                     | 8                 |
| Mechlorprop           | Phenoxytsyre        | 2,0                     | 5                 |
| Metsulfuron-methyl    | Sulfonylurea        | 3,0                     | 18                |
| p-Nitrophenol         | Nedbrydningsprodukt | 0,2                     | 11                |
| Pendimethalin         | 2,6-Dinitroanilin   | 3,0                     | 25                |
| Primicarb             | Carbamate           | 0,5                     | 5                 |
| Propachlor            | Chloroacetanilide   | 0,5                     | 6                 |
| Prochloraz            | Azole               | 1,0                     | 8                 |
| Propiconazol          | Azole               | 4,0                     | 11                |
| Propyzamid            | Amid                | 3,0                     | 8                 |
| Simazin               | Triazine            | 0,5                     | 5                 |
| Terbutylazin          | Triazine            | 0,3                     | 9                 |
| Thifensulfuron-methyl | Sulfonylurea        | 3,0                     | 22                |
| Triadimefon           | Azole               | 2,0                     | 4                 |
| Triadimenol           | Triazole            | 1,0                     | 6                 |
| Triasulfuron          | sulfonylurea        | 3,0                     | 9                 |

Tabel 1. Liste over pesticider og nedbrydningsprodukter omfattet af metoden samt kemisk klasse, detektionsgrænse og præcision.

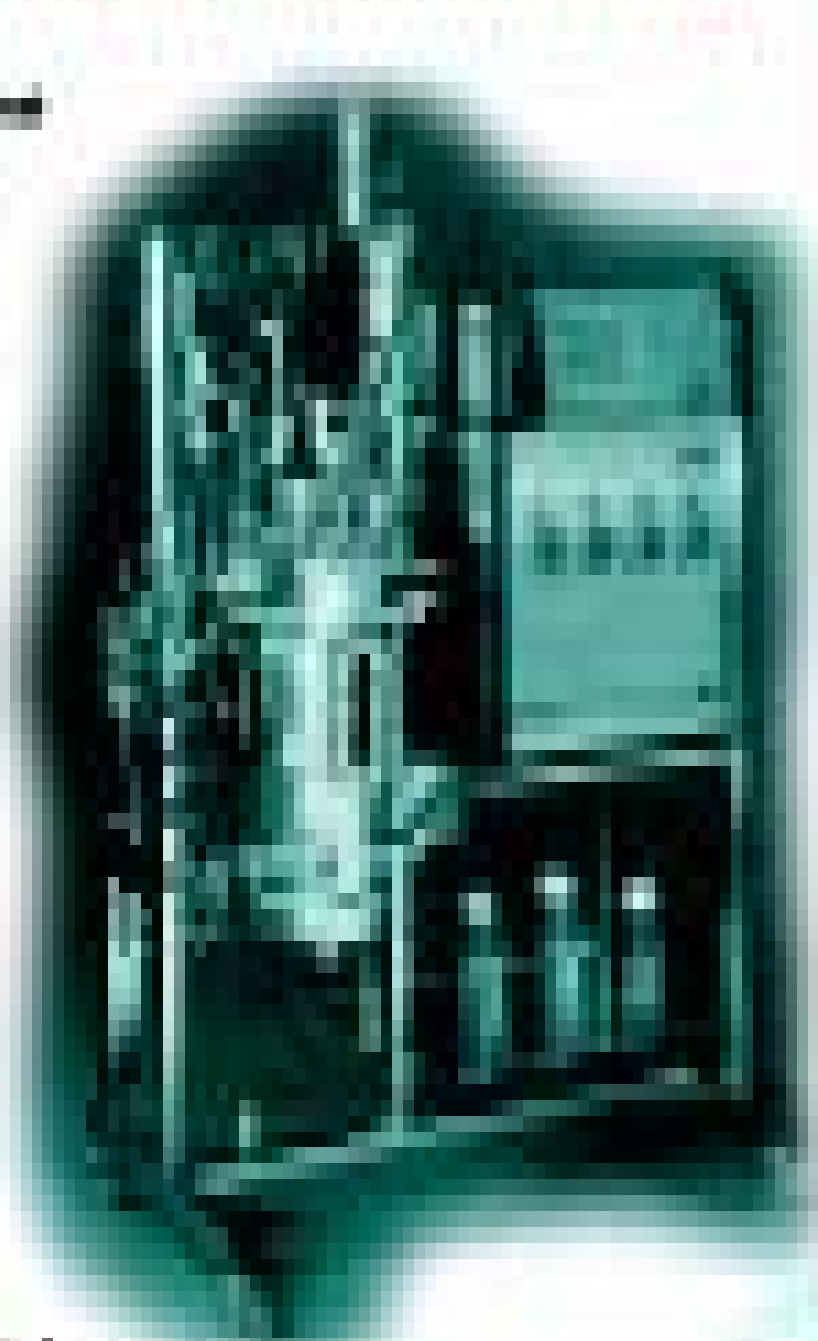
# Det komplette fermentorprogram

– til småskala – til produktionsniveau



**AB**  
Applied Biosystems

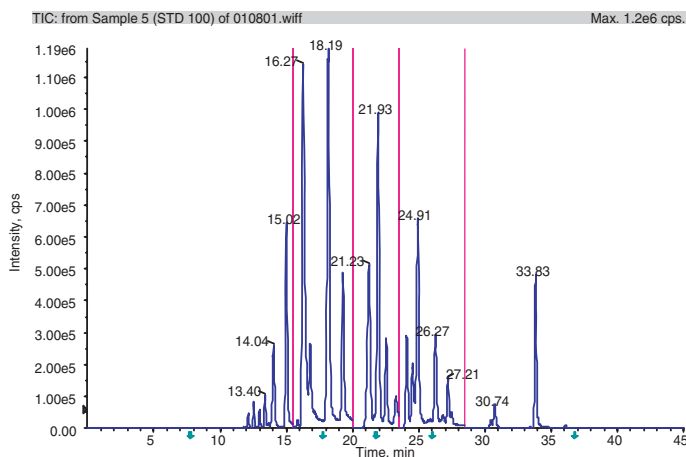
- Fermentoren
- Rørskakning
- Oksygensatning
- Temperaturkontrol
- Sterilisering



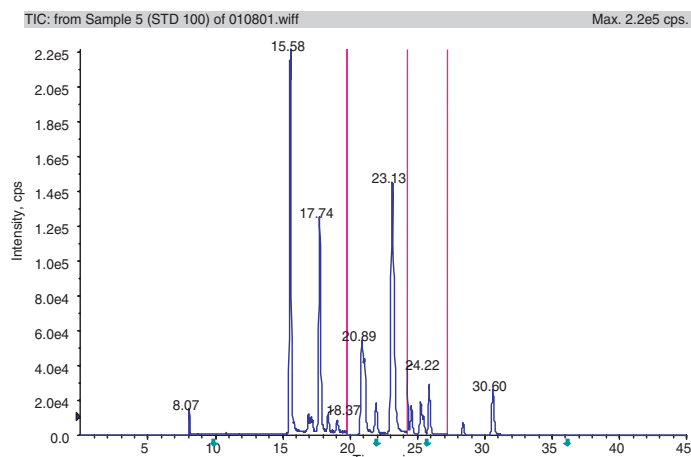
**Applied Biosystems**

Life Technologies Corporation

APPLIED BIOSYSTEMS, 2800 LEXINGTON AVENUE, NEW YORK, NY 10017, USA



Figur 3. Total ionchromatogram for ESI positiv-analyse



Figur 4. Total ionchromatogram for ESI negativ-analyse.

forbindelse. For at kunne måle de lave koncentrationer af pesticider i miljøprøver, bruger man typisk Selected Ion Monitoring (SIM), hvor massespektrometret kun måler de specifikke masser for de bestemte forbindelser og derfor opnår den højeste følsomhed.

Da ESI og APCI er milde ioniseringsteknikker, som giver ingen eller lidt fragmentering af molekylet, skal stofferne yderligere fragmenteres efter ioniseringen for at kunne identificeres med sikkerhed. Man anvender hovedsageligt to typer af instrumenter til LC-MS-analyse af pesticider: Enkelt MS eller MS-MS.

LC-MS-instrumenter består typisk af en enkelt quadrupol, hvorfor fragmenteringen skal ske, før ionerne passerer quadrupolen. Det kan gøres ved at forhøje spændingen mellem atmosfæretryk-zonen og vakuum-zonen (in-source collision induced dissociation, CID). Ionerne accelereres og det ladede molekyle fragmenteres delvist. De to mest intensive ioner bruges til SIM-analyse, hvor den højeste ion bruges til kvantificering og den anden til identifikation. I dette tilfælde er et stof positivt identificeret på basis af dets retentionstid i forhold til en standard, tilstedeværelse af de to udvalgte ioner og forholdet mellem de to udvalgte ioner. En ulempe ved LC-MS med en enkelt quadrupol er, at følsomheden bliver generelt dårligere, da intensiteten af det ladede molekyle formindskes på grund af den nødvendige fragmentering. En anden ulempe er, at (under in-source CID) alle ionerne, som er tilstede i ioniseringskammeret ioniseres. I tilfælde af dårlig adskillelse mellem to stoffer er det umuligt at skelne, om en ion kommer fra det ene eller det andet stof. Ud over dette, kan der ved analyse af komplekse matricer, som overfladevand, være mange naturligt forekommende stoffer, som interfererer med analysen. I uheldigste fald kan en falsk positiv identifikation forekomme.

Da LC-MS mangler både følsomhed og specificitet, anvendes LC-MS-MS stadig mere til pesticidanalyse. I de sidste to år er antallet af videnskabelige publikationer om analyse af pesticider med LC-MS-MS steget i forhold til LC-MS. Det viser, at der efter flere års erfaring med enkelt MS nu er et stigende behov for en mere specifik og mere følsom detektor. De fleste applikationer med LC-MS-MS i forbindelse med pesticidanalyser anvender triple quadrupoler som massespektrometer.

Der er kun få applikationer med ion-trap som massespektrometer til pesticidanalyser. Ion-trap-massespektrometre virker som en fælde, hvor ioner fanges af skiftende radiofrekvens. Ved hjælp af stigende energi kan de fangede ioner blive yderligere fragmenterede. På denne måde kan man udføre MS-MS<sup>n</sup> (hvilket vil sige, at fragmentioner bliver yderligere fragmenterede). Det er særlig nyttigt ved identifikation af komplekse molekyler (kvalitativ analyse).

Triple quadrupol-instrumenter anvendes mest til kvantitative analyser. Ved MS-MS-analyse fungerer den første quadrupol (Q1) som et filter, hvor de udvalgte ioner passerer videre til den anden quadrupol (Q2), som er en kollisioncelle. I Q2 sker fragmenterin-

gen af ionerne ved hjælp af høj spænding og en kollisionsgas. Et eller flere karakteristiske fragmenter udvælges i den tredje quadrupol (Q3), som fungerer som analytisk quadrupol (Selected Reaction Monitoring, SRM). Selv om mange fragmenter tabes i Q2, er følsomheden med SRM-analyse høj. Da alle interfererende ioner er valgt fra i Q1, bliver signal-/støjforholdet forhøjet, hvorved detektionsgrænsen formindskes. Det medfører, at det ved LC-MS-MS-analyse ikke er nødvendigt at adskille to stoffer chromatografisk, fordi dette kan gøres ved deres moderion/datterion.

I figur 1 (side 4) ses et total ionchromatogram, hvor den første top indeholder fire stoffer, som adskilles på deres moderion/datterion i figur 2 (side 4).

I figur 2 ses også de to pesticider diuron og isoproturon, som tilhører den samme kemiske klasse og derfor kan være svære at adskille chromatografisk. Disse to stoffer har to forskellige molvægte, men en fælles fragmentation ( $m/z$  72). Alligevel er de to forbindelser adskilt på grund af deres moderion/datterion. I dette tilfælde er de to stoffer også adskilt chromatografisk, men under mindre optimale betingelser (kortere gradient eller kortere LC-kolonne) ville adskillelsen af disse to stoffer ikke være fuldstændig.

Med LC-MS-MS er det muligt at analysere mange stoffer på én gang, hvilket netop kræves i de fleste pesticidmoniteringsprogrammer. Det skyldes, at et massespektrometer er i stand til at scanne flere moderioner/datterioner samtidigt, uden at følsomheden formindskes.

## Analyse af pesticider med LC-MS-MS

På Alfred Jørgensen Laboratorium er der udviklet en multimetode til analyse af over 60 pesticider og nedbrydningsprodukter i drikkevand, grundvand og overfladevand. Stofferne ekstraheres ved fast-fase ekstraktion og analyseres ved LC-MS-MS med ESI i positiv og negativ ionisering. Total ionchromatogrammer med ESI positiv-analysen og ESI negativ-analysen er vist i figur 3 og 4.

Et udvalg af stofflisten samt de forskellige kemiske klasser, detektionsgrænser og præcision fremgår af tabel 1 (side 6). Detektionsgrænsen er beregnet som tre gange signal-/støjforholdet i chromatogrammet af en vandprøve tilsat stofferne på 0,01 µg/l. Præcisionen er angivet som relativ standard-afvigelse (RSD%) af 8 ekstraherede vandprøver med en koncentration på 0,05 µg/l. Det skal bemærkes her, at for mange stoffer er detektionsgrænsen væsentligt under 0,01 µg/l, som er krævet for pesticidanalyser.

Metoden er akkrediteret af Danak og godkendt for alle relevante parametre i NOVA 2003 monitoringsprogrammet. Listen med stoffer i tabel 1 er under udvidelse med flere pesticider og nedbrydningsprodukter som analyseres med den samme metode.

## Referencer

1. Richardson, S.D. (2000): Environmental Mass Spectrometry. Analytical Chemistry, 72: 4477-4496.