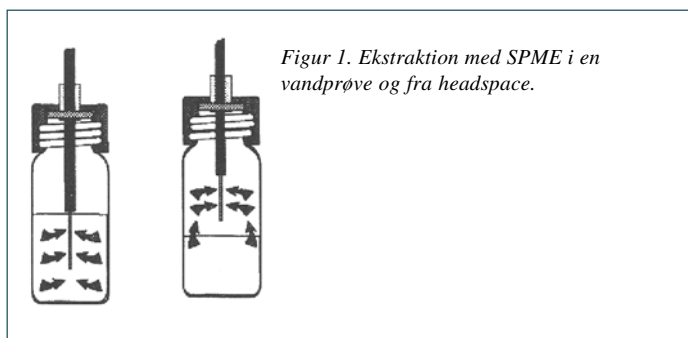


Pesticidanalyser på små prøvevolumener - SPME og immunkemiske analyser

Analyser til måling af pesticider i grundvand skal opfylde et myndighedskrav om at kunne detektere 10 gange under den vedtagne grænseværdi på 0,1 µg pesticid/liter drikkevand. I denne forbindelse er SPME og immunkemiske analyser et interessant alternativ

Af Trine Henriksen & Leif Bruun, lbr@geus.dk, GEUS



Figur 1. Ekstraktion med SPME i en vandprøve og fra headspace.

Forurening af grundvandet med pesticider og deres nedbrydningsprodukter udgør et stadigt stigende problem for den danske vandsektor. I forbindelse med kildepladsundersøgelser, kortlægning af forurening, overvågning af vandboringer og rensset vandværkssvand mv. er der et stort behov for at få foretaget analyser for pesticider i vandprøver. I dag anvendes hovedsageligt chromatografisk baserede analysemetoder såsom GC/MS, LC/MS og HPLC. For at opnå den krævede detektionsgrænse på 0,01 µg/l er det med disse metoder nødvendigt først at opkoncentrere prøven. Dette gøres ved, at op til 2 liter vandprøve inddampes og/eller ekstraheres til en organisk fase, hvorved koncentrationen af pesticiderne i prøven øges til et niveau, der kan detekteres af apparaturet. Dette

medfører en række ulemper, såsom anvendelse af organiske opløsningsmidler, og at hver eneste prøve skal igennem en betydelig, og fordyrende, arbejdsproces inden selve analysen kan foretages. Sidst og ikke mindst er det meget upraktisk at håndtere, transportere og forsende bare et lille antal analyser, når disse vejer mellem 1 og 2 kg stykket.

For at reducere det nødvendige prøvevolumen og samtidig opfylde detektionskravene forskes der i nye metoder og teknikker, der kan erstatte og/eller supplere de analysemetoder, der anvendes i dag. Blandt disse er SPME og immunkemiske analyser.

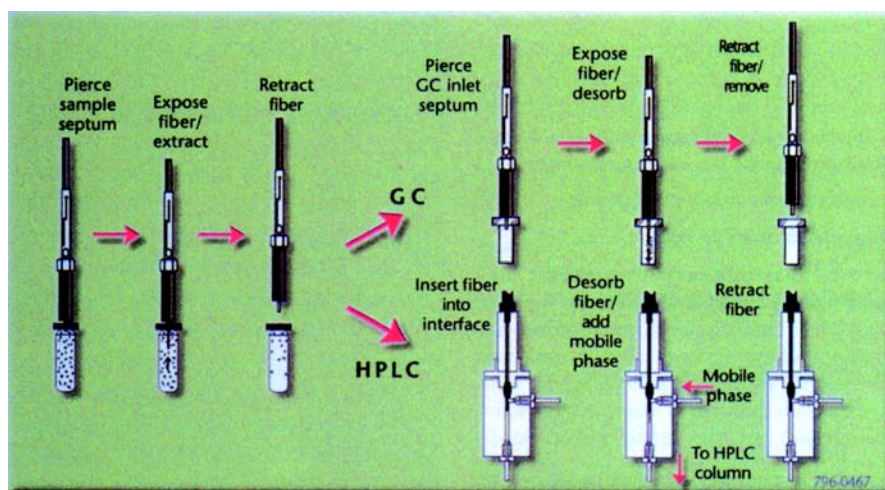
SPME (Solid Phase Microextraction)

SPME er en relativ ny teknik til ekstraktion af organiske forbindelser. Metoden skal kombineres med traditionel analyse med gaschromatografi (GC) eller væskechromatografi (HPLC).

Ved ekstraktion af en række forskellige pesticider med SPME er der opnået detektionsgrænser på 0,01 µg/l eller mindre. Metoden er også velegnet til analyser for andre miljøfremmede stoffer som PAH'er, PCB'er, chlorerede opløsningsmidler og phenoler.

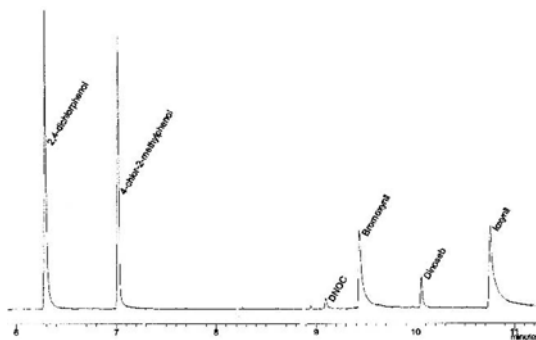
SPME-teknikken

Ekstraktion med SPME udføres uden brug af organiske opløsningsmidler. I stedet anvendes en tynd silica-fiber, overtrukket med en organisk polymer, der eksponeres direkte i vandprøven. ➡



Figur 2. Fremgangsmåde ved ekstraktion med SPME, kombineret med enten GC eller HPLC.

(Kilde: Supelco)



Figur 3. Chromatogram fra analyse med SPME og GC-MS. DNOC, bromoxynil, dinoseb og ioxynil er pesticider, mens de to chlorphenoler er nedbrydningsprodukter fra phenoxy-syre-herbiciderne. Koncentration i prøven var 10 µg/l.

Ved analyse for flygtige forbindelser kan der ekstraheres fra headspace over prøven. Metoden kan derfor også anvendes til faste prøver, f.eks. jord (figur 1, side 8).

SPME er baseret på en ligevægtsfordeling af de organiske analytter mellem vandfasen og den organiske fase på fiberen. Selv om der ikke sker en fuldstændig ekstraktion fra prøven, er den ekstraherede mængde ofte tilstrækkelig til analyse, hvis blot ligevægten er tilstrækkelig forskudt mod fiberens organiske fase.

Fiberen er monteret inde i en injektionsnål og fastgjort til et stempel, så den kan skydes ud fra nålen under ekstraktionen, og trækkes ind i nålen under overførslen mellem prøven og analyseinstrumentet. Nålen er udformet så den kan overføres direkte til injektionskammeret på gaschromatografen, hvor de ekstraherede forbindelser desorberes fra fiberen ved høj temperatur (200-300°C). Ved kombination med HPLC desorberes fiberen til den mobile fase (eluenten). Dette kræver et særligt interface på injektionssystemet. Fremgangsmåden er illustreret i figur 2. Efter desorptionen foregår resten af analysen som en traditionel GC- eller HPLC-analyse. I figur 3 er der vist et chromatogram fra SPME-ekstraktion af seks forskellige phenoler.

Selektivitet og optimering

SPME-fibre kan fås med forskellige polymerer, der varierer i deres affinitet for forskellige stofgrupper mht. deres polaritet, vandopløselighed, størrelse m.m. Hvis der skal ekstraheres forskellige stofgrupper fra samme prøve, må man prøve sig frem til den bedst egnede fiber, evt. må der anvendes to forskellige fibre.

I de fleste tilfælde fremmes ekstraktionen ved tilsætning af NaCl eller et andet letopløseligt salt. Den positive effekt er størst for de mest vandopløselige forbindelser.

Tiden for opnåelse af ligevægt kan variere fra få minutter til flere timer. I de fleste tilfælde er det dog ikke nødvendigt at afvente ligevægt. Ud fra en effektivitetsbetragtning skal ekstraktionstiden helst ikke overstige længden af den efterfølgende analyse, men ved meget lave koncentrationer kan ekstraktionstider på 40-60 min. være nødvendige. Effektiv omrøring af vandprøven er nødvendig for at opnå en tilstrækkelig ekstraktion inden for rimelig tid.

Ekstraktionstiden kan afkortes ved at forøge temperaturen. Til gengæld forskydes ligevægten i negativ retning, så ligevægtskoncentrationen i fiberen bliver mindre. Den optimale temperatur må vælges ud fra en konkret afvejning mellem kravene til effektivitet og følsomhed.

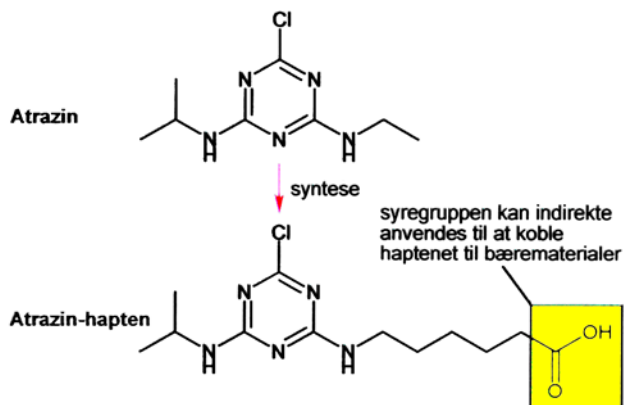
Kvantitative bestemmelser

SPME kan anvendes kvantitativt ved at kalibrere med en række vandige standarder, der ekstraheres efter samme metode som de ukendte vandprøver. Da ekstraktionen er baseret på en reel ligevægtsfordeling, er den imidlertid mere følsom overfor variationer i ekstraktionsbetingelserne end metoder, der er baseret på fuldstændig ekstraktion. Det er derfor afgørende for resultaternes nøjagtighed, at forhold som prøvevolumen, salttilsætning, ekstraktionstid, omrøring osv. er ens for alle prøver og standarder.

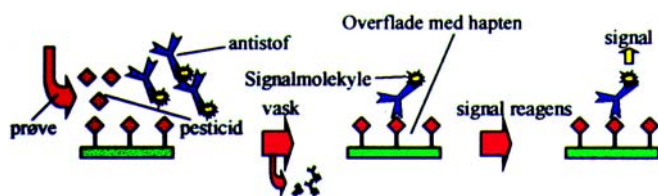
Ved kombination af SPME- og GC-analyse kan ekstraktionen udføres på autosamplers med automatisk kontrol af omrøring, ekstraktions- og desorptionstid. Dette er endnu ikke muligt med HPLC.

Prøvevolumen

Ved ekstraktion med SPME er det tilstrækkeligt med et prøvevolumen på 1-5 ml, selv for pesticidkoncentrationer under 0,1 µg/l. Det skyldes, at alt, hvad der ekstraheres på SPME-fiberen,



Figur 4. Struktur af pesticidet atrazin samt det tilsvarende hapten. Den forlængede alifatiske kæde sikrer, at atrazin-strukturen kan reagere med antistoffer, selvom haptenet sidder tæt på en overflade. Syregruppen (indrammet) aktiveres kemisk, så denne kan reagere med den overflade, man ønsker at sætte haptenet på.



Figur 5. Princippet ved en immunkemisk analyse. Prøve med frit pesticid tilsættes sammen med antistof til en overflade, hvorpå der sidder immobiliseret pesticid (hapten). Antistofferne binder både det frie pesticid og haptenet, og efter en vask detekteres kun de antistoffer, der har reageret med hapten på overfladen.

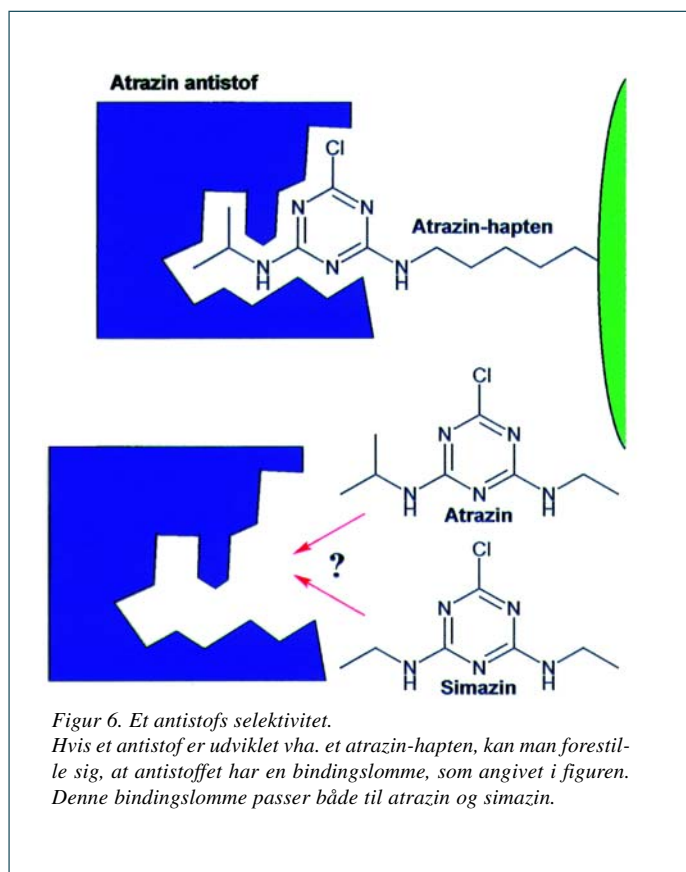
bliver overført til analyseinstrumentet. Ved traditionelle ekstraktionsmetoder er det kun nogle få mikroliter af det færdige ekstrakt på 1–2 ml, der anvendes til analysen. Det effektive prøvevolumen ved traditionel ekstraktion er derfor i samme størrelsesorden som ved ekstraktion med SPME. Desuden medfører ligevægtsprincippet i SPME, at der ikke er en lineær sammenhæng mellem prøvens volumen og den ekstraherede mængde. Ved stigende prøvevolumen nærmer koncentrationen i fiberen sig en grænseværdi, hvorefter der ikke vil kunne opnås yderligere ekstraktion.

Immunkemiske analyser

Immunkemi er en teknik som næsten udelukkende har været kendt inden for den diagnostiske sektor. Immunkemiske analyser har hovedsageligt været anvendt til at detektere udvalgte proteiner og større organismer som bakterier i f.eks. blodprøver fra patienter og prøver fra fødevarer. I løbet af 90'erne begyndte man verden over at udvikle immunkemiske analyser til små molekyler, heriblandt pesticider. Dette har resulteret i, at der i dag eksisterer mange immunkemiske analyser, der kan detektere udvalgte pesticider i drikkevand. Flere af disse har opnået detektionsgrænser på omkring 0,01 µg/l uden forudgående opkoncentrering.

Hvad er immunkemi?

Immunkemiske analyser baserer sig på brugen af antistoffer, som er proteiner, der produceres af immunforsvaret. For at producere antistoffer mod et pesticid foretages en immunisering (vaccination) af mus med pesticidet i en modificeret udgave, et såkaldt hapten (figur 4). Modifikationen af pestici-



Figur 6. Et antistofs selektivitet.

Hvis et antistof er udviklet vha. et atrazin-hapten, kan man forestille sig, at antistoffet har en bindingslomme, som angivet i figuren. Denne bindingslomme passer både til atrazin og simazin.

AKTIVT KUL

DET RENE VAND

en renere verden

Aktivt kul til:

- Rensning af drikkevand for pesticider
- Effektiv spildevandsbehandling
- Fjernelse af lugt
- Genvinding af opløsningsmidler
- Dioxin-rensning af røggas

AageChristensen A/S

INGENIØR- OG HANDELSVIRKSOMHED

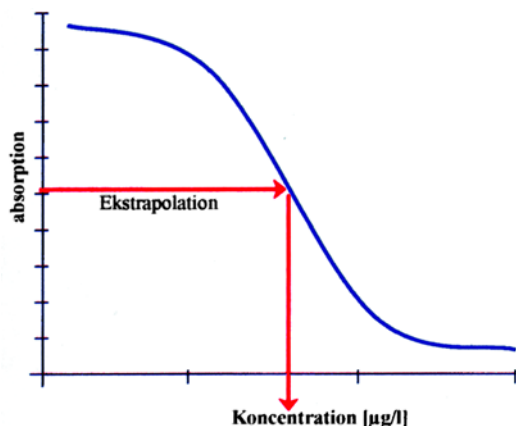
SKELMOSEVEJ 10 · POSTBOKS 399 · DK-2500 VALBY
TEL.: +45 3844 2444 · FAX: +45 3844 2024 · E-MAIL: info@aagechristensen.dk

Antistof	Pesticid	Detektionsgrænse
1	atrazin, simazin	0,02 µg/l *
2	cyanazin, terbutylazin	0,03 µg/l
3	simazin, cyanazin, atrazin, terbutylazin	0,03 µg/l
4	atrazin, terbutylazin	0,06 µg/l
5	simazin, atrazin	0,05 µg/l
6	atrazin	0,05 µg/l
7	simazin	0,05 µg/l
8	cyanazin, propazin, terbutylazin	0,01 µg/l *
9	cyanazin	0,07 µg/l
10	hydroxypropazin, hydroxyatrazin, hydroxysimazin	0,01 µg/l *
11	BAM	0,02 µg/l *

Tabel 1. Udvalgte pesticid-antistoffer.

Kolonnen med pesticider angiver, hvilke pesticider det pågældende antistof reagerer med. Er der flere pesticider ud for samme antistof, betyder det, at antistoffet krydsreagerer mellem de nævnte pesticider. De angivne detektionsgrænser gælder for det første pesticid i rækken. For de øvrige pesticider vil detektionsgrænsen være højere. Grænseværdien for pesticider i drikkevand er 0,1 µg/l.

* Disse analyser anvendes for tiden på GEUS.



Figur 7. Typisk standardkurve for en immunkemisk pesticidanalyse.

Der er omvendt proportionalitet mellem pesticidkoncentration og absorption.



Figur 8. Illustration af en mikrotitreringsplade anvendt til immunkemiske analyser.

Pladen måler ca. 8x12 cm, og hver brønd kan rumme ca. 300 µl. Der anvendes specielt apparatur til at påfylde, vaske og aflæse sådanne plader. Mikrotitreringspladerne, som anvendes på GEUS, er i forvejen behandlet med pesticid-hapten, så de er klar til brug, når analyser behøves.

det gør, at man kan koble dette til en vaccine, så immunforsvaret danner antistoffer mod bl.a. pesticidet. Efter omfattende laboratorieprocedurer er det muligt at isolere de celler, som producerer det ønskede antistof. Ved at dyrke cellerne i laboratoriet er det muligt at producere ubegrænsede mængder af antistoffet. Antistofferne kan mere eller mindre selektivt binde de pesticider, der ligner det hapten, der blev anvendt ved immuniseringen.

Analysens princip

Den immunkemiske pesticidanalyse bygger på princippet om konkurrencen mellem to komponenters binding til samme antistof. De analyser, der anvendes på GEUS, er udviklet, så de udføres på en plastoverflade med immobiliseret hapten (modificeret pesticid). Tilsættes en prøve (figur 5, side 10) sammen med antistof til denne overflade, vil antistoffet binde både pesticid i prøven og hapten på overfladen. Dermed skabes en konkurrencesituation, hvor mængden af pesticid i prøven afgør hvor meget antistof, der bindes til plastoverfladen. Denne reaktion forløber i ca. 1 time, hvorefter plastoverfladen vaskes for at fjerne ubundet antistof. Da de anvendte antistoffer er »mærket« med enzymer (signal-molekyler), kan man efterfølgende måle, hvor meget antistof, der er bundet til plastoverfladen, hvorved man har et indirekte mål for mængden af pesticid i prøven.

Selektivitet og optimering

Hvad angår selektivitet er det vigtigt at gøre opmærksom på, at de immunkemiske pesticidanalyser sjældent er 100% selektive (monospecifikke). Det skyldes, at mange af de pesticider, der analyseres for (f.eks. atrazin og simazin), ligner hinanden meget i den molekulære struktur. Er antistoffet f.eks. udviklet vha. et atrazin-hapten, så vil dette antistof efterfølgende have svært ved at kende forskel på simazin og atrazin (figur 6, side 11). Efter at antistoffet er produceret, følger en omstændelig karakterisering af dets selektivitet overfor andre stoffer og pesticider, der ligner det pesticid, man gerne vil analysere for. Heri ligger også en test af, om antistoffet påvirkes af vandkomponenter såsom humussyrer, salte og mineraler. Tabel 1 er en oversigt over de antistoffer, der er udviklet på GEUS og giver samtidig en fornemmelse for, hvad der er muligt mht. selektivitet, når man taler om antistoffer mod pesticider.

Den endelige optimering af analysen ligger i at maksimere analysens stabilitet over for de ovennævnte faktorer uden at gå på kompromis med analysens detektionsgrænse.

Kvantitative bestemmelser

For at udføre kvantitative bestemmelser anvendes der på GEUS en standardrække med 8 forskellige koncentrationer gående fra ca. 0,001 til 100 µg/l. Hertil skal tilføjes 3 kontroller, hvor 2 stk. anvendes til at kontrollere genfindning ved 0,05 µg/l og den sidste som en »0-prøve«. Koncentrationen af pesticid i prøverne bestemmes ved at ekstrapolere absorptionen fra disse ind på den standardkurve (figur 7), der genereres af standardrækken. Detektionsgrænsen beregnes ud fra standardrækkens standardafvigelse. Nogen af disse detektionsgrænser kan ses i tabel 1.

Prøvevolumen

På GEUS anvendes såkaldte mikrotitreringsplader (figur 8) som plastoverflade. Disse er inddelt i 8x12 brønde og det er i disse brønde at standarder, kontroller og prøver fordeles med 4 brønde til hver (dvs. 4xbestemmelser). Da der anvendes 150 µl prøve pr. brønd er det mindste prøvevolumen 0,6 ml. Ved at benytte færre brønde pr. prøve kan prøvevolumen selvfølgelig reduceres, men på bekostning af præcisionen.