

Nitrofen

Bestimmung mit GC/MSD-NCI

Applikationsschrift

H. – Jürgen Schulz
Agilent Technologies, LSCA

Keywords

GC/MS, Negativ-Chemische Ionisierung, GC-Pulsed Injection, Retention Time Locking (RTL), RTL-Pestizid MS-Spektrenbibliothek, Nitrofen-Bestimmung in Putenfleisch-Matrix.

Einführung

Aktueller Hinweis

Im Frühjahr 2002 wurde die Öffentlichkeit in Deutschland erneut über einen Lebensmittelskandal informiert. Es betraf das Herbizid Nitrofen, das u.a. in Fleisch nachgewiesen wurde. Als Erklärung wurde die Kontamination von Futtergetreide genannt, das im Verlauf der Nahrungskette letztlich für den positiven Befund z.B. in Geflügelfleisch führte.

Negative Chemische Ionisierung (NCI)

In der Analytik von Lebensmitteln ist die GC/MS Methodik ein erprobtes, zuverlässiges Verfahren. Im Modus der Elektronenstoßionisierung (EI) werden Substanzen anhand der charakteristischen MS-Spektren nachgewiesen und im Selected Ion Monitoring (SIM) Modus quantifiziert. Für ausgewählte Analyten bietet sich ergänzend zur EI Messung, die chemische Ionisierung (CI) an. Im Modus der Negativen Chemischen Ionisierung (NCI) bietet sie für Molstrukturen, die eine hohe Elektronenaffinität aufweisen, sowohl selektive, als auch sensitive Messungen. Die Matrix der Probe bleibt weitgehend unberücksichtigt; das Signal/Rausch Verhältnis der Messung zeigt eine hohe Messempfindlichkeit, so dass Substanzkonzentrationen im ppt- Bereich gemessen werden können. Bei dieser Technik wird ein sog. Moderatorgas in die Ionenquelle des



MS eingeleitet, das mit den energiereichen Elektronen in der Quelle kollidiert und thermische, d.h. energetisch schwache Elektronen bildet, die für eine Elektroneneinfangreaktion zur Verfügung stehen. Analyte, die sich mit dieser Technik messen lassen, bilden bevorzugt das negative Molion und/oder wenige, signifikante negative Fragmentationen[1]. Der Analyt Nitrofen zeigt eine hohe Elektronenaffinität und wird bevorzugt im NCI Modus gemessen.

Pulsed Splitless Injection

Eine Optimierung der GC-Technik – insbesondere für die Spurenanalytik – bietet die Splitlose-Injektion im Druckstoß-Modus (Pulsed Injection) wie sie mit Agilent Gaschromatographen der Serien 5890II, 6890 und 6850 möglich ist. Diese sind mit einem Electronic Pneumatic Control (EPC) Modul ausgerüstet. Während der Injektion wird der Trägergasdruck im Injektor drastisch erhöht, so dass die Probe vollständig und äußerst schnell in die Trennsäule transferiert wird. Das bedeutet Verbesserung der Messempfindlichkeit und Reduzierung diskriminierender Reaktionen im Einlasssystem. Zu dem lässt sich das Injektionsvolumen bis auf 5µL erhöhen[2,3].

Retention Time Locking (RTL)

Mit dem RTL Verfahren werden unter vorgegeben GC-Bedingungen die Retentionszeiten konstant gehalten, selbst wenn die Länge der Trennsäule verändert wird. Besonders bemerkenswert ist die Möglichkeit die Retentionszeiten der Analyten von einem Messsystem auf ein anderes übertragen zu können. Diese Technik ist zum Beispiel für Screening Verfahren in der Pestizid Analytik interessant, wenn die Analyten mit einem selektiven GC Detektor (ECD/

NP-FID) erkannt wurden und dann mit MS bestätigt werden. Für alle Systeme gilt – in enger Toleranz – identisches Retentionsverhalten der relevanten Komponenten. Die Software der Agilent MSD ChemStation nutzt das RTL Verfahren in Kombination mit einer Pestizid-MS-Spektrenbibliothek (567 Einträge). Es wird primär die Retentionszeit des Pestizids in der Probeanalyse mit denen in der RTL Bibliothek verglichen. Bei positivem Vergleich werden nun zusätzlich die Massenspektren und die charakteristischen Ionenchromatogramme aufgerufen, um eine zweifelsfreie Zuordnung des Pestizids zu gewährleisten.

Experimentelle Ausführung

Probenvorbereitung

Die Putenfleischprobe wurde nach DFGS 19, wie folgt aufgearbeitet. Das Fleisch im Mixer homogenisiert, die Einwaage mit Aceton und Wasser versetzt, filtriert und die Lösung mit Methylenchlorid gemischt. Die organische Phase abgenommen, mit Natriumsulfat getrocknet und mit dem Rotationsverdampfer bei 40°C fast bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand mit einer Mischung 1/1 Cyclohexan/Ethylacetat aufgenommen über GPC gereinigt und nach erneutem Einengen für die Analyse verwendet.

GC/MSD Analyse

Für die Messungen wurden Nitrofen Standards (Ehrenstorfer L 15560000CY-CAS: 1836-75-5) und eine dotierte Putenfleischprobe verwendet. Die MS Detektion wurde in den Modi EI und NCI vorgenommen, als NCI Moderatorgas diente Methan. Die außerordentliche Messempfindlichkeit wird im NCI Modus in der SIM Technik erreicht. Nach EI Messung im Scan Modus sind die Parameter Retentionszeit und signifikante Ionen des Analyten

bekannt und können für die SIM Messung und für die quantitative Bestimmung verwendet werden.

Instrumentierung

Gaschromatograph: Agilent 6890Plus
Massenspektrometer:
Agilent 5973N, MSD, CI-Option

GC Parameter

Säule: 30m x 0,25mm x 0,25µm,
5% Phenylmethylsilikon
(HP 19091S-433)

Injektion:

1µL, Pulsed Pressure Splitless
Trägergas:

He, 2,3mL/Min, const. pressure
Ofentemp. Programm: 70°C (2Min)
– 25°C/Min – 150°C (0Min)
3°C/Min – 200°C (0Min)
8°C/Min – 280°C (16Min)

MS Parameter

EI Scan, Atune
Messbereich 34amu – 600amu
EM Voltage: Tune + 100
NCI Scan: NCI/CH₄ Tune
Messbereich 34amu – 600amu
Ionenquelletemperatur: 150°C
EM Voltage: Tune + 400
Emission Current: Tune + 50
Moderatorgasfluss (Methan):
2mL/Min

Ergebnisse

EI Modus

Das Nitrofen EI Spektrum zeigt **Abb. 1**. Auffällig ist das Chlorisotopen Cluster des Molions. Diese signifikanten Ionen werden für die SIM Messung verwendet. Das Totalionenstromchromatogramm (TIC) der Scan Messung einer Putenfleischprobe, der 1ppm Nitrofen zugesetzt wurde, ist in **Abb. 2** dargestellt. Der Ausschnitt, **Abb. 3**, weist auf die Elutionsposition des Analyten hin, der nur schwach im TIC zu erkennen ist. Ein Screening auf relevante Pestizide ist in dieser Probenqualität im Normalfall außerordentlich zeitaufwendig.

Das RTL Screening Verfahren, in Kombination mit der RTL Pestizid Referenzspektrenbibliothek, ist dagegen komfortabel gestaltet und schnell ausgeführt. Die MSD ChemStation Software zeigt in einer Liste zu den registrierten Retentionszeiten der Pestizide, die möglichen Treffer an, bildet die Ionenchromatogramme ab, das komplette Spektrum zu der Retentionszeit des relevanten Pestizids und das entsprechende Referenzspektrum aus der RTL Bibliothek. Die Zuordnung und Entscheidungsfindung kann anhand der präsentierten Daten mit hoher Sicherheit getroffen werden, siehe am Beispiel des Nitrofens aus der Putenfleischmatrix, **Abb. 4**. Die Abweichung der Retentionszeit des Analyten in der Spektrenbibliothek in Relation zur Matrixprobe beträgt +6 Sekunden.

Abb. 5 zeigt die SIM Messung des Nitrofens im EI Modus. Das Signal/Rausch Verhältnis, 3/1, für die Standardkonzentration von 10pg/µL kann als Nachweisgrenze der EI Messtechnik unter den genannten Bedingungen betrachtet werden.

NCI Modus

Das Spektrum der NCI Scan Messung zeigt das Molion und fast keine Fragmentierung, **Abb. 6**. In **Abb. 7** werden die TIC der NCI (oben) und der EI (unten) Messung der Putenfleischprobe miteinander verglichen. In dem NCI TIC sind die Analyte Vinclozolin, Nitrofen und Hexabrombenzol, je 1ng, markiert. Für die SIM Messungen bieten sich die signifikanten Ionen der Chlorisotope des Molions an. Es wurde eine Kalibrierfunktion im Konzentrationsbereich von 50fg/µL bis 100pg/µL erstellt. Die Funktion zeigt über drei Dekaden Linearität. Ein Ausschnitt für den Ultraspurenbereich wird mit **Abb. 8** dokumen-

Abb. 1
Nitrofen, EI Spektrum,
[M]⁺: 283amu

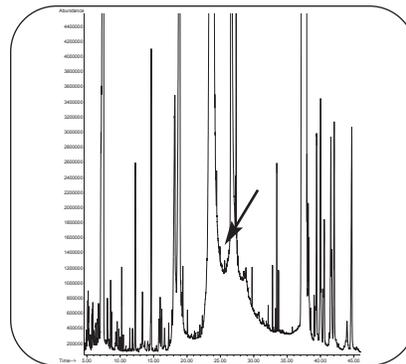
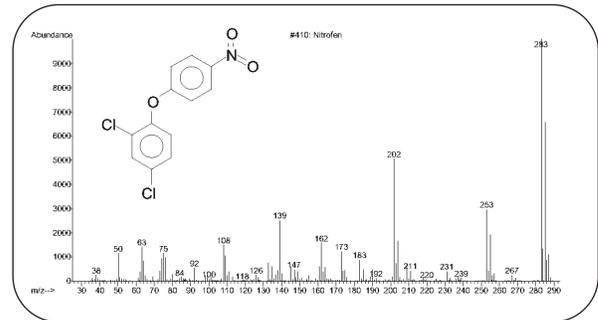


Abb. 2
Putenfleisch-Matrix, EI, TIC, Nitrofen, markiert

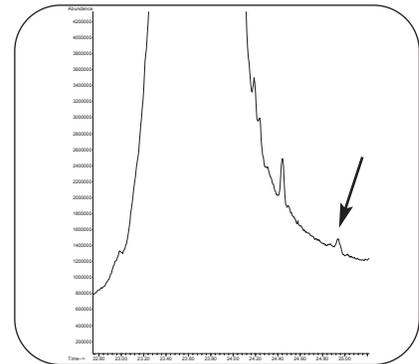


Abb. 3
EI, TIC Ausschnitt, Nitrofen, markiert

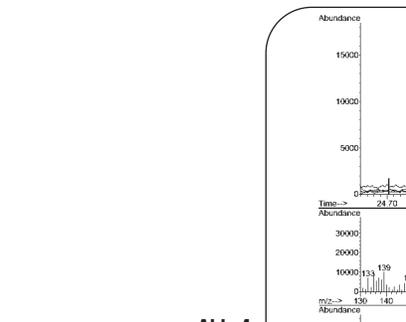


Abb. 4
Putenfleischprobe, EI,
RTL Screening,
Nitrofen Nachweis, 1ng/µL

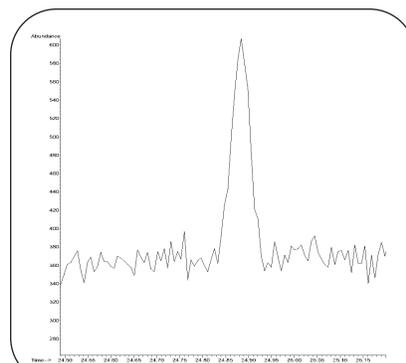
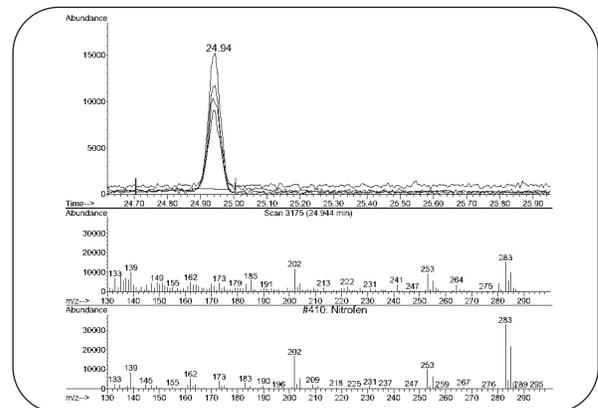


Abb. 5
Nitrofen, EI, SIM, Ionen: 283/285/287 amu

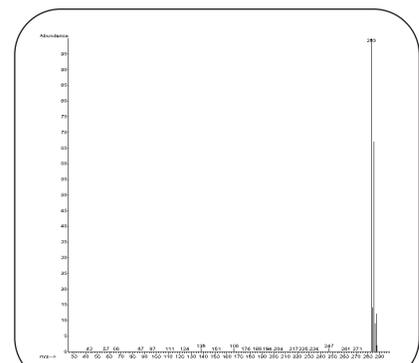


Abb. 6
Nitrofen, NCI Spektrum, [M]⁻: 283amu

tiert. Die Nachweisgrenze für Nitrofen liegt unter den o.g. Messbedingungen bei 50fg für den Standard und bei 200fg für die Putenfleischprobe, **Abb. 9**.

Fazit

Der Vergleich der Detektionsmodi EI und NCI zeigt deutlich den Vorteil der NCI Messtechnik. Im Scan EI Modus wird der Analyt in der Matrixprobe, Konzentration $1\text{ng}/\mu\text{L}$, schwach angezeigt und kann mit dem RTL Screening Verfahren in dem komplexen TIC nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze für die SIM Technik liegt im EI Modus bei $10\text{pg}/\mu\text{L}$. Im NCI Scan Modus werden im TIC nur die Analyten angezeigt, die eine hohe Elektronenaffinität aufweisen, die Matrix des TIC ist deutlich niedriger im Vergleich zur EI Messung. Diese Selektivität zeichnet die NCI Messung – besonders für matrixbelastete Probenqualität – aus. Die Messempfindlichkeit ist für Nitrofen im NCI SIM Modus etwa um den Faktor 100 größer verglichen mit der EI Messung. Selektivität und Sensitivität sind die hervorragenden Merkmale der NCI Messtechnik, sie werden am Beispiel des Analyten Nitrofen offensichtlich.

Danksagung

Das für die Messungen verwendete Probenmaterial wurde in der Fa. ILAU, Rott am Inn, aufgearbeitet. Der Autor dankt Frau Dr. Kramhöller für ihre freundliche Unterstützung.

Literatur

1. Alex G. Harrison, „Chemical Ionization Mass Spectrometry“, *CRC Press*
2. W. Brodacz, „Praxisrelevante Aspekte der Splitless-Injektion“, *Labor Praxis*, **5/2002**

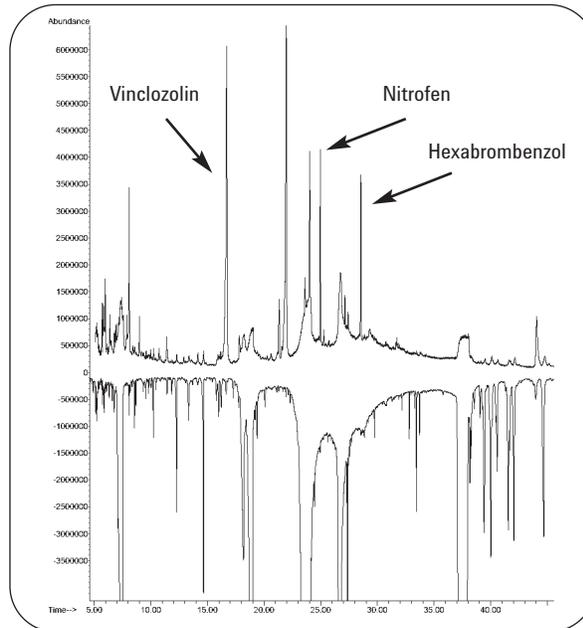


Abb. 7
Putenfleisch-Matrix, TIC,
NCI (positiv)/EI (negativ)

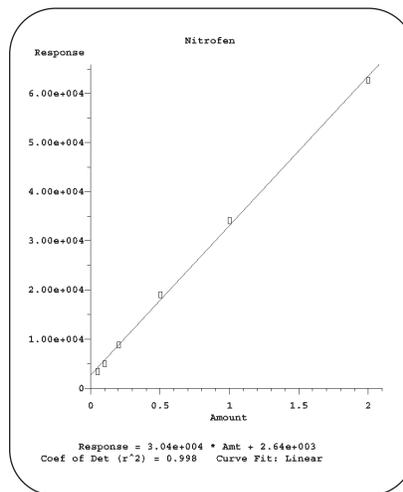


Abb. 8
Nitrofen Kalibrierfunktion: 50fg – 2 pg

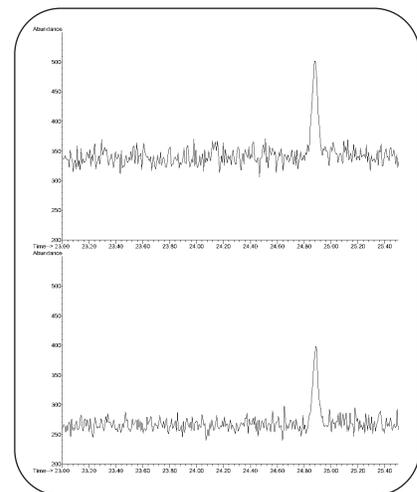


Abb. 9
Nitrofen, NCI, SIM. Oben: Standard, 50fg
Unten: Putenfleisch-Matrix, 200fg, S/N = 3/1

3. „Electronic Pressure Control in Gas Chromatography“, *Textbook*, **9/93**, HP Part No. 5182-0842

4. „Efficient Screening for Pesticides and Endocrine Disrupters Using HP 6890/5973/GC/MSD System“, *Appl. Note*, **4/99**, PN 5968-4884E

© Copyright Agilent Technologies, 2002.
Alle Rechte vorbehalten. Vervielfältigung,
Adaption oder Übersetzung ohne vorherige
schriftliche Erlaubnis ist außer in den durch
das Urhebergesetz erlaubten Fällen untersagt.

Gedruckt in Deutschland, Juli 2002
Publikationsnummer 5988-7328DEE