Entwicklung und Anwendung einer SPE-GC-MS-Methode zur Analytik von Pestiziden in Wasserproben mit Fokus auf Boscalid

Masterarbeit

Studiengang M.Sc. Hydrologie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

Finnian Freeling

Erstprüfer: PD Dr. Jens Lange

Institut für Geo- und Umweltwissenschaften

Professur für Hydrologie

Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

Zweitprüfer: Prof. Dr. Klaus Kümmerer

Institut für Nachhaltige Chemie und Umweltchemie

Professur für Nachhaltige Chemie und Stoffliche Ressourcen

Leuphana Universität Lüneburg

Bearbeitungszeitraum: 16. Juni – 16. Dezember 2014

Zusammenfassung

Zusammenfassung

Eine analytische Methode basierend auf einer Festphasenextraktion (SPE) gefolgt von einer Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) wurde entwickelt, um den als Fungizid eingesetzten Wirkstoff Boscalid in natürlichen Wasserproben nachweisen und quantifizieren zu können. Aufgrund detaillierter Informationen über die im Hauptuntersuchungsgebiet am südlichen Ende des Kaiserstuhls im Weinbau eingesetzten Wirkstoffe, wurde die Analyse durch weitere zehn Fungizide und ein Insektizid ergänzt, wenngleich für diese Stoffe lediglich qualitative Aussagen getroffen werden konnten.

Der gewählte Geräteaufbau zur Probenvorbereitung mittels SPE ermöglichte die einfache Überführung der untersuchten Pestizide in eine für die gaschromatographische Messung geeignete Form. Bei der anschließenden GC-MS-Analyse zeigte sich eine starke Einflussnahme der Probenmatrix auf das Messsignal, welche sich in einer Überschätzung der gemessenen Analytkonzentration in der Probe äußerte und auf das Phänomen der Matrix-induzierten Signalverstärkung zurückgeführt wurde. Um eine Verfälschung der Messergebnisse der Umweltproben durch Matrixeffekte zu vermeiden, wurden Veränderungen an den Injektionsparametern vorgenommen und die Wirkung von Sorbit als Analyte Protectant getestet. Da dadurch keine ausreichende Korrektur der überhöhten Signale erzeugt werden konnte, wurden die Messergebnisse von Boscalid über die Intensität des vor der Extraktion einer jeder Probe zugesetzten Standards Triphenylphosphat korrigiert.

Diese Methode wurde schließlich auf Wasserproben aus Oberflächenabfluss und aus zwei Tiefbrunnen angewandt. Zudem wurden Proben aus drei Versickerungsbecken, in die der Abfluss aus der lokalen Straßenentwässerung geleitet wird, auf Pestizidrückstände hin untersucht. Mit Ausnahme von Indoxacarb konnten alle der in die Methode mit aufgenommenen Pestizide in den untersuchten Umweltproben identifiziert werden, wobei in den Proben der Versickerungsbecken und des Oberflächenabflusses die meisten Pestizide und die größten Wirkstoffkonzentrationen nachgewiesen werden konnten, während die Grundwasserproben deutlich geringer belastet waren. Für die Proben aus den Versickerungsbecken lag die gemessen Boscalidkonzentration zwischen 0,22 und 0,71 μg L⁻¹ und damit über dem Pestizidgrenzwert der EG-Trinkwasserrichtlinie. Ähnliche Werte wurden im beprobten Oberflächenabfluss ermittelt (0,06-0,63 μg L⁻¹). Lediglich in fünf der insgesamt 17 Grundwasserproben konnte Boscalid in Konzentrationen unter der Bestimmungsgrenze gemessen werden.

Es bedarf weiterer Versuche zur Optimierung- und Validierung der SPE-GC-MS-Methode um zuverlässigere qualitative und quantitative Aussagen über das Auftreten von Boscalid in Wasserproben treffen zu können.

Schlüsselwörter: Pestizide; Boscalid; Festphasenextraktion; Gaschromatographie; Massenspektroskopie; Matrix-induzierte Signalverstärkung; Oberflächenabfluss; Grundwasser.

II Summary

Summary

An analytical method based on solid phase extraction (SPE) followed by gas chromatography—mass spectrometry (GC-MS) was developed to identify and quantify the fungicide boscalid in natural waters. Due to detailed information regarding the use of active substances at the main study site located at the southern end of the Kaiserstuhl, the analysis was completed with an additional ten fungicides and one insecticide. Only qualitative statements could be made for these substances.

The chosen equipment for sample pretreatment by SPE allowed for an easy transfer of the analyzed pesticides to the gas chromatographic environment. The subsequent analysis by GC-MS indicated a strong influence of the sample matrix on the signal, leading to an overestimation of the measured analyte concentration in the sample. This was attributed to the phenomenon of matrix-induced signal enhancement. The injection parameters were altered and the effect of sorbitol as analyte protectant was tested for the environmental samples, in order to avoid strong falsification of the results by matrix effects. As this lead to an insufficient correction of the excessive signals, the results in regard to boscalid were corrected by means of the standard triphenyl phosphate which was added to every sample before extraction.

This method was applied to water samples originating from surface runoff and two deep wells. In addition, samples from three drainage basins in which the runoff of the local road drainage is channeled were examined for pesticide residues. Except for indoxacarb, all pesticides that were included in the method could be identified. The highest number of pesticides and the highest concentrations were measured in the samples of the drainage basins and surface runoff, while the groundwater was significantly less pesticide-laden. The concentration of boscalid for the drainage basin samples was between 0.22 and 0.71 µg L⁻¹, and therefore above the maximum residue level for drinking water as defined by the European Communities. Similar values were found in the surface runoff samples (0.06-0.63 µg L⁻¹). Boscalid was found in only five out of 17 groundwater samples, however with concentrations below the quantitation limit.

Further experiments for optimization and validation of the SPE-GC-MS-method are required to permit more reliable qualitative and quantitative statements in regard to the occurrence of boscalid in water samples.

Keywords: Pesticides; Boscalid; Solid-Phase Extraction; Gas Chromatography; Mass Spectrometry; Matrix-induced signal enhancement; Surface runoff; Groundwater.

Danksagungen

Danksagungen

Bei meinem Betreuer Herrn PD Dr. Jens Lange möchte ich mich für die interessante Fragestellung und der Übernahme der Erstkorrektur bedanken.

Herrn Prof. Dr. Klaus Kümmerer danke ich für die spontane Übernahme der Zweitkorrektur.

Weiterhin danke ich Frau Barbara Herbstritt für ihre Hilfe bei Wartungsarbeiten am Analysegerät und für die Hinweise bei der Nutzung diverser Laborgeräte. Ferner möchte ich Dr. Tobias Schütz für die Diskussionen und Anregungen sowie für die Proben am Tuniberg danken. Stefan Seeger, Jakob Sohrt und Nikos Anestis danke ich für deren Hilfe bei der Probenahme (alle Professur für Hydrologie Freiburg).

Ein großer Dank geht an Dr. Hanns-Heinz Kassemeyer und Frank Fischer (Staatliches Weinbauinstitut Freiburg) für die Spritzung der Rebfläche am Blankenhornsberg mit Boscalid, der Zurverfügungstellung der Pestizidpräparate und für die Möglichkeit bei der Pestizidapplikation im Feld dabei sein zu können.

Bei Frau Barbara Ressler (Shimadzu Deutschland GmbH) bedanke ich mich für die Beantwortung von Fragen zur Hard- und Software des GC-MS-Gerätes. Herrn Dr. Karsten Bergmann (Restek GmbH) danke ich für den hervorragenden Support und den Ratschlägen bei technischen Angelegenheiten. Ferner danke ich Herrn Dr. Bernd Grillenberger, Herrn Dr. Bernd Thierfelder (Phenomenex Ltd. Deutschland) sowie Frau Dr. Andrea Junker-Buchheit (Bekolut GmbH) für die Überprüfung der SPE-Methode.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Dr. Michelangelo Anastassiades und Frau Ellen Scherbaum (CVUA Stuttgart) für die Hinweise bezüglich Matrixeffekte und den Einsatz von Analyte Protectants bedanken. Daniela Dörk (ebenfalls CVUA Stuttgart) danke ich für die Bereitstellung der Massenspektren von Fluopyram und Proquinazid.

Für die hilfreichen fachlichen Ratschläge danke ich Dr. Sebastian Paczkowski (Professur für Forstliche Biomaterialien Freiburg) und Marco Reich (Professur für Nachhaltige Chemie und Stoffliche Ressourcen Lüneburg).

Bei Frau Dr. Michelle Hladik (USGS California Water Science Center Sacramento) bedanke ich mich für die Informationen bezüglich der Langzeitstabilität von Boscalid.

Schließlich möchte ich mich noch bei Herrn Christof Kienzler (Vermögen und Bau BW, Amt Freiburg) für die Hinweise bezüglich der Wasserversorgung am Blankenhornsberg und der Zurverfügungstellung des hydrogeologischen und hydrochemischen Gutachtens des Trinkwasserbrunnens bedanken.

IV Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
Danksagungen	III
Inhaltsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
Verzeichnis der Symbole und Abkürzungen	X
1 Einleitung	1
2 Grundlagen	3
2.1 Pestizide in aquatischen Systemen	
2.1.1 Verbleib von Pestiziden in der Umwelt	
2.1.2 Eintragspfade	
2.2 Präanalytische Verfahren	
2.2.1 Aufgabe der Probenvorbereitung	
2.2.2 Theoretische Grundlagen	
2.2.3 Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE)	
2.2.4 Festphasenextraktion (SPE)	
2.2.5 Festphasenmikroextraktion (SPME)	
2.3 Instrumentelle Analytik von Pestiziden	9
2.3.1 Wichtige Trenn- und Analysemethoden	
2.3.2 Grundlagen des Trennprozesses	
2.3.3 Gaschromatographie (GC)	
2.3.4 Flüssigchromatographie (LC)	11
2.3.5 Massenspektrometrie (MS)	
Materialien und Methoden	13
3.1 Untersuchungsgebiete	13
3.1.1 Blankenhornsberg Doktorgarten	13
3.1.2 Eingesetzte Pestizide am Blankenhornsberg	13
3.1.3 Probenahme und Datengrundlage	16
3.1.4 Tuniberg	19
3.1.5 Lagerung der Wasserproben	20
3.2 Reagenzien, Kleingeräte und Standards	20
3.3 Abtrennung fester Störsubstanzen	21
3.4 Abtrennung gelöster Störsubstanzen	22

Inhaltsverzeichnis

	.5 Eindampfung und Lösungsmitteltransfer	23
	.6 GC-MS-Parameter	23
4	Ergebnisse	24
	.1 Auswahl der Analyten und Messung mittels GC-MS	24
	.2 Prüfung der GC-MS-Performance	
	.3 Kalibrierung zur quantitativen Analyse	
	4.3.1 Interne Kalibrierung	
	4.3.2 Zusammensetzung der Kalibrierlösungen	30
	4.3.3 Ermittlung der Kalibrierfunktion	30
	.4 Vergleich der Aufnahmemodi	33
	.5 Festphasenextraktion	34
	4.5.1 Versuche zur Überprüfung des Einflusses der Probenmatrix auf die Analyse	34
	4.5.2 Maßnahmen zur Kompensierung von Matrix-induzierter Signalverstärkung	39
	.6 Anwendung der SPE-GC-MS-Methode auf Umweltproben	
5	Diskussion	
3	.1 Auswahl der Analyten und Identifizierung mittels GC-MS	
	.2 Prüfung der GC-MS-Performance	
	.3 Kalibrierung zur quantitativen Analyse	
	.4 Vergleich der Aufnahmemodi	
	.5 Festphasenextraktion	49
	Analyse	49
	5.5.2 Maßnahmen zur Kompensierung von Matrix-induzierter Signalverstärkung	53
	.6 Anwendung der SPE-GC-MS-Methode auf Umweltproben	55
6	Schlussfolgerungen und Ausblick	59
7	Literaturangaben	62
8	Anhang A: Auswahl des Injektionslösungsmittels	75
9	Anhang B: Maßnahmen gegen Matrix-induzierte Signalverstärkung	5 77
	.1 Beweggründe und Einflussfaktoren	77
	.2 Schaffung möglichst hoher Inertheit des Analysegerätes	77
	.3 Auswahl der geeigneten Injektionstechnik	78
	.4 Aufreinigung der Probe	
	.5 Kompensations-/Korrekturmaßnahmen	79
	.6 Analyte Protectants	80

VI Inhaltsverzeichnis

	9.6.1 Funktionsweise	80
	9.6.2 Anfertigen der AP-Mixtur	82
	9.6.3 Anpassung der Reinigung der Injektionsspritze	82
10	Anhang C: Festphasenextraktion	83
10.	1 Geräteaufbau	83
10.	.2 Extraktionsschritte	.84
	10.2.1Konditionierung und Equilibrierung	84
	10.2.2Beladung	84
	10.2.3Waschung	.85
	10.2.4Trocknung	86
	10.2.5Eluierung	86
10.	.3 Eindampfung und Lösungsmitteltransfer	87
11	Anhang D: Wartung und Fehlerbehebung	88
11.	1 Beseitigung einer Kontamination des GC-MS	. 88
	11.1.1 Ausgangslage	88
	11.1.2Identifikation der Kontamination	88
	11.1.3Vorgehensweise	89
11.	.2 Septum- und Säulenbluten	.91
	11.2.1 Ausgangslage	
	11.2.2Identifikation	91
12	Anhang E: Ergebnisse aus der Analyse des Grob-Testgemisches	94
13	Anhang F: Stoffeigenschaften der Pestizide	96
14	Anhang G: Physikalische und chemische Wasserparameter der Proben	99
Erkl	ärung1	100

Digitaler Anhang - Übersicht über die Ordner auf der Daten-CD:

- Ordner "Text": Enthält Masterarbeit in digitaler Form (.pdf; .word)
- Ordner "Daten": Enthält Rohdaten der Analytpeakflächen der untersuchten Umweltproben, welche mit der FASST-("Peakflächen_FASST.csv") und SIM-Methode ("Peakflächen_SIM.csv") gemessen wurden.

Abbildungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Rebfläche "Doktorgarten Mitte" auf der Boscalid appliziert wurde15
Abbildung 2: Links: Abwiegen der Aufwandmenge an Cantus; Mitte: Herstellen einer Dispersion mit Wasser; Rechts: Abfüllen der Dispersion
Abbildung 3: Links: Fächer-Radialgebläse; Rechts: Ausbringung von Cantus16
Abbildung 4: Rebflächen und Probennahmestellen am Blankenhornsberg.
Abbildung 5: Links und Mitte: Wasserentnahmestelle des Bewässerungsbrunnens. Rechts: Öffentlicher Laufbrunnen am Blankenhornsberg17
Abbildung 6: Links: Unmittelbare Nähe der Rebflächen zum Wegenetz. Rechts: Erosionsrille auf einem Schotterweg nach einem Niederschlagsereignis18
Abbildung 7: Links: Oberflächenabfluss auf dem Hauptweg am Blankenhornsberg während des Starkregenereignisses am 22.07.2014. Rechts: Probenahme des oberflächlich abfließenden Wassers
Abbildung 8: Zeitpunkte der Boscalid-Spritzung und Probenahme sowie tägliche Niederschlagssummen am Blankenhornsberg im Zeitraum 19.07-03.09.2014.19
Abbildung 9: Probenahmestellen am Tuniberg
Abbildung 10: Links: Mit Wasser gefülltes Versickerungsbecken an der Probenahmestelle Oberrimsingen, Leienweg. Rechts: Wassereinlass des Versickerungsbeckens nahe des Golfclubs Tuniberg
Abbildung 11: Diverse Pestizidformulierungen
Abbildung 12: EI-Massenspektrum von Boscalid in der NIST 11
Abbildung 13: SIM-Chromatogramm einer mit Pestiziden und Standards versetzen Wasserprobe
Abbildung 14: EI-Massenspektrum des natürlich vorkommenden Chrysen in der NIST 11. 29
Abbildung 15: EI-Massenspektrum des Chrysen-d12 in der NIST 1129
Abbildung 16: Gemessene Datenpunkte der Kalibrierlösungen und Kalibriergerade der abgeleiteten linearen Kalibrierfunktion bei Verwendung von TPP31
Abbildung 17: Plot zur Bewertung der Linearität des Zusammenhanges zwischen Signal bzw. Signalverhältnis und Konzentration mit TPP31
Abbildung 18: Gemessene Datenpunkte der Kalibrierlösungen und Kalibriergerade der abgeleiteten quadratischen Kalibrierfunktion bei Verwendung von TPP31
Abbildung 19: Gemessene Datenpunkte der Kalibrierlösungen und Kalibriergerade der abgeleiteten linearen Kalibrierfunktion bei Verwendung von Chrysen-d10 32
Abbildung 20: Plot zur Bewertung der Linearität des Zusammenhanges zwischen Signal bzw. Signalverhältnis und Konzentration mit Chrysen-d10
Abbildung 21: Gemessene Datenpunkte der Kalibrierlösungen und Kalibriergerade der abgeleiteten quadratischen Kalibrierfunktion bei Verwendung von Chrysen-
d10 als internen Standard
d10 als internen Standard
Abbildung 22: SIM-Chromatogramme von Myclobutanil und Tebucunazol in zwei
Abbildung 22: SIM-Chromatogramme von Myclobutanil und Tebucunazol in zwei Umweltproben

VIII Abbildungsverzeichnis

Abbildung 25: Relatives Signal der Post-SPE-gespikten Wasserproben (1 L Reinstwasser extrahiert mit Strata-X) gegenüber direkt eingedampfter Spiking	<u>-</u>
Lösungen	
Abbildung 26: Relatives Signal der Post-SPE-gespikten Wasserproben (1 L Reinstwasser extrahiert mit Oasis HLB) gegenüber direkt eingedampfter Spiking-Lösungen.	38
Abbildung 27: Relatives Signal der Post-SPE-gespikten Wasserproben (1 L Oberflächenwasser extrahiert mit Strata-X) gegenüber direkt eingedampfter Spiking-Lösungen.	39
Abbildung 28: Peakflächen von TPP und Boscalid ohne Zusatz von Sorbit	4 0
Abbildung 29: Peakflächen von TPP und Boscalid mit Zusatz von Sorbit	4 0
Abbildung 30: Relatives Signal der Post-SPE-gespikten Wasserproben (1 L Reinstwasser) gegenüber direkt eingedampfter Spiking-Lösungen mit Zusatz von Sorbit	41
Abbildung 31: Peakflächen der mit der FASST-Methode in den Umweltproben identifizierten Analyten	42
Abbildung 32: Gemessenes TIC und Chromatogramme der SIM-Ionen von Metrafenon einer analysierten Probe des Trinkwasserbrunnens	47
Abbildung 33: Peaks der beiden Diastereomere von Iprovalicarb und Dimethomorph im Totalionenstrom-Chromatogramm.	
Abbildung 34: Schematische Darstellung des Effektes der Matrix-induzierten Signalverstärkung.	50
Abbildung 35: Boxplots zur visuellen Darstellung der Lage und Streuung der Peakflächen (FASST-Methode) von TPP	51
Abbildung 36: Erster Filtrationsschritt einer Wasserprobe aus einem Versickerungsbecken am Tuniberg.	52
Abbildung 37: Für die Pestizidanalytik ausgewählter Single Taper-Splitless-Liner	78
Abbildung 38: Schematische Darstellung der Wirkungsbereiche dreier Analyte Protectants mit den Elutionszeitpunkten diverser Pestizide	81
Abbildung 39: Schematischer Aufbau der Festphasenextraktion	83
Abbildung 40: Geräteaufbau zur Festphasenextraktion	84
Abbildung 41: Beladung der SPE-Kartuschen	85
Abbildung 42: Eluierungsschritt der Festphasenkartuschen	86
Abbildung 43: Massenspektrum des Kontaminationspeaks	88
Abbildung 44: Protoniertes Phthalsäureanhydridkation	
Abbildung 45: Kürzen der Kapillarsäule auf Injektorseite	
Abbildung 46: EI-Massenspektrum von Hexamethylcylcotrisiloxan (D3)	
Abbildung 47: EI-Massenspektrum des Dodecamethylcyclohexasiloxans (D6)	
Abbildung 48: SIM-Chromatogramm von m/z 73 und m/z 207	
Abbildung 49: SIM-Chromatogramm von m/z 73 und m/z 207 mit neu erworbenem	
Aceton	
Abbildung 50: Totalionenstrom-Chromatogramms des Grob-Testgemisches (4,0 - 10 min)	
Abbildung 51: Totalionenstrom-Chromatogramms des Grob-Testgemisches (10,5 - 17,0 min)	94

Tabellenverzeichnis IX

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Aufwandmengen und –Zeitpunkte der am Blankenhornsberg eingesetzter Pestizide.	
Tabelle 2: Retentionszeiten (t _R), Target- und Referenzionen, SIM-Gruppen der mit de SIM- und FASST-Methode gemessenen Pestizide und Standards	er
Tabelle 3: Relative Standardabweichungen der Peakflächen von Boscalid, TPP und de PAK bei Mehrfachinjektion dreier Lösungen mit unterschiedlichen Boscalidkonzentrationen.	
Tabelle 4: Zusammensetzungen der Kalibierlösungen.	30
Tabelle 5: Arbeitsschritte beim Vergleich der Signalintensitäten extrahierter Proben und nicht-extrahierter Proben.	36
Tabelle 6: Boscalidkonzentrationen in den untersuchten Wasserproben vom Blankenhornsberg und Tuniberg	43
Tabelle 7: Charakteristische Ionen häufiger Kontaminationen in der GC-MS	93
Tabelle 8: Konzentrationen des Grob-Testgemisches	94
Tabelle 9: Durch Mehrfachmessung ermittelte Retentionszeiten, Peakflächen undhöhen sowie relative Standardabweichungen von 12 Substanzen eines Grob-Testgemisches.	95
Tabelle 10: Interpretation der Zahlenwerte chemischer und physikalischer Stoffeigenschaften von Pestiziden	96
Tabelle 11: Allgemeine physikalisch-chemische Eigenschaften der untersuchten Pestizide	97
Tabelle 12: Kenngrößen zur Degradation, Adsorption und Mobilität der untersuchter Pestizide	
Tabelle 13: Probenahmestellen, Zeitpunkte der Probenahme und physikalisch- chemische Eigenschaften der untersuchten Wasserproben kurz vor der Extraktion	99

Verzeichnis der Symbole und Abkürzungen

Lateinische und griechische Symbole

Symbol	Einheit	Bedeutung
DT ₅₀ bzw. DT ₉₀	[d]	Zeitraum, nachdem 50% bzw. 90% der ursprünglichen Menge abgebaut sind
K_{AW}	[hPa m³ mol-¹]	Verteilungskoeffizient zwischen gasförmiger und in verdünnter Lösung befindlicher Phase
Koc	$[mL g^{-1}]$	K _{SW} normiert auf die organische Substanz
K_{OW}	$[mL g^{-1}]$	Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
K_{sw}	$[mLg^{-1}]$	Verteilungskoeffizient zwischen gelöster und adsor- bierter Phase
M	$[g \text{ mol}^{-1}]$	Molare Masse des Lösungsmittels
P'	[-]	Polaritätsindex nach Snyder
P_a	[kPa]	Außendruck
P_{atm}	[kPa]	Atmosphärendruck
P_{inj}	[kPa]	Kopfdruck bei initialer Ofentemperatur
T_{inj}	[°C]	Injektionstemperatur
$t_{ m R}$	[min]	Retentionszeit
$ m V_{Gas}$	[µL]	Volumen der Gaswolke
V_{ideal}	[ml]	Volumen eines Mols eines idealen Gases unter Normbedingungen
V_{inj}	[µL]	Injektionsvolumen
6	$[g mL^{-1}]$	Dichte des Lösungsmittels

Abkürzungen

Kürzel	Bedeutung
AP	Analyte Protectant
ВВСН	Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und Chemische Industrie
CVUA	Chemie- und Veterinäruntersuchungsamt
DOC	Dissolved Organic Carbon (Gelöster organischer Kohlenstoff)
EPA	Environmental Protection Agency

El Electron Impact Ionization (Elektronenstoßionisation)

ES Entwicklungsstadium

FASST Fast Automated Scan/SIM Mode

FDA Food and Drug Administration

GC Gas Chromatography (Gaschromatographie)

GUS Groundwater Ubiquity Score

HDPE High-density polyethylene

HPLC High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigkeits-

chromatographie)

ICH International Conference on Harmonisation of Technical Require-

ments for Registration of Pharmaceuticals for Human Use

IS Internal Standard (Interner Standard)

LDPE Low-density polyethylene

LLE Liquid-liquid extraction (Flüssig-Flüssig-Extraktion)

MS Mass Spectrometry (Massenspektrometrie)

NIST National Institute of Standards and Technology

PTFE Polytetrafluorethylen

PAK Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe

POC Particulate Organic Carbon (Partikulärer organischer Kohlenstoff)

PTV Programmed Temperature Vaporizing

SDB Styrendivinylbenzen

Sdp Siedepunkt

SIM Selected Ion Monitoring

S/N-Verhältnis Signal/Rausch-Verhältnis

SPE Solid Phase Extraction (Festphasenextraktion)

SPME Solid Phase Microextraction (Festphasenmikroextraktion)

SUR Surrogate (Surrogat/Ersatzstoff)

TIC Total Ion Current (Totalionenstrom)

TOC Total Organic Carbon (Gesamter organischer Kohlenstoff)

TPP Triphenylphosphat

Einleitung

1 Einleitung

Unter Pestiziden versteht man natürliche und synthetische Substanzen oder Substanzgemische, die zur Bekämpfung und Abwehr von Schädlingen wie Insekten, Mikroben, Säugetiere oder Unkräuter eingesetzt werden. Pestizide spielen eine wichtige Rolle bei der Steigerung der landwirtschaftlichen Produktivität und tragen damit zur Sicherung der Nahrungsmittelressourcen bei (Tadeo, 2008). Infolge ihres massiven globalen Einsatzes (Sabik et al., 2000; Zhang et al., 2011) und der überwiegend hohen Persistenz dieser Stoffe sind sie in verschiedenen Umweltkompartimenten anzutreffen (Filho et al., 2010; Kouzayha et al., 2012). Aufgrund ihrer meist hohen Toxizität, Mobilität und Fähigkeit zur Bioakkumulation stellt die Kontamination von Wasserkörpern durch Pestizide eine signifikante Gefahr für die aquatische Umwelt und für die Trinkwasserressourcen dar (Badach et al., 2007; Herrero-Hernández et al., 2013; Kuivila and Foe, 1995). Die steigende Anzahl der in Wasserkörpern gefundenen Substanzen hat zur Einführung strikter Richtlinien durch die Europäische Kommission geführt, um die negative Einflussnahme durch Pestizide auf die Umwelt zu minimieren. Die Wasserrahmenrichtline 2000/60/EC wurde geschaffen, um die Wasserpolitik stärker auf eine nachhaltige und umweltverträgliche Wassernutzung auszurichten, wobei das vorrangige Ziel die Erreichung des "guten Zustandes" aller Wasserkörper darstellt (EC, 2000). Durch die Implementation der Richtlinie soll die Überwachung aquatischer Ökosysteme intensiviert werden und zu einer verstärkter Kontrolle von Verunreinigungen führen (Coquery et al., 2005). Um diesen Richtlinien nachzukommen, sind effektive Methoden zur Analyse der relevanten Substanzen in aquatischen Systemen erforderlich. Die Fähigkeit zur Identifizierung und Quantifizierung von Pestiziden in Umweltproben ist eine Voraussetzung zur ausreichenden Charakterisierung und Bewertung des Verhaltens dieser Stoffe in der Umwelt. Das dabei gewonnene Verständnis ermöglicht wiederum die Entwicklung und Implementierung von Maßnahmen und Mitigationsstrategien, welche zur Reduktion der Pestizidfracht in aquatischen Systemen beitragen können.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer SPE-GC-MS-Methode zur Quantifizierung des Fungizids Boscalid in Wasserproben und die Anwendung der Methode auf Umweltproben aus Gebieten mit intensiver weinbaulicher Nutzung. Da für das Hauptuntersuchungsgebiet detaillierte Informationen über Aufwandmengen und Zeitpunkte der eingesetzten Pestizide verfügbar waren, wurden zehn weitere Fungizide und ein Insektizid in die Analyse mit aufgenommen, wenngleich für diese Stoffe lediglich qualitative Aussagen getroffen werden konnten.

Boscalid wurde aufgrund seiner breiten Verwendung in Landwirtschaft und Weinbau in den vergangenen Jahren ausgewählt. Allein in der BRD lag der Inlandsabsatz des Wirkstoffes seit 2004 jährlich bei mindestens 100 t, meist jedoch zwischen 250 und 1000 t (BVL, 2004-2013). Im Wirkstoffranking des Julius Kühn-Instituts (Bundesforschungsinstitut für Kulturpflan-

2 Einleitung

zen), welches im Zuge des PAPA-Projektes seit 2011 Daten über den Pflanzenschutzmitteleinsatz in Deutschland erhebt, gehörte Boscalid, gemessen an dessen prozentualen Anteil am Gesamt-Behandlungsindex, zu den am häufigsten im Weinbau ausgebrachten Fungiziden (2011: Rang 5 von 37; 2012: 7 von 41; 2013: 8 von 42), wobei der Wirkstoff in jedem Jahr in über 70% aller Erhebungsbetriebe eingesetzt wurde. Als Behandlungsindex wird dabei die Anzahl der angewandten Pflanzenschutzmittel bezogen auf die zugelassene Aufwandmenge und die Anbaufläche bezeichnet. Er dient als quantitatives Maß zur Beschreibung der Intensität des chemischen Pflanzenschutzes (JKI, 2014).

Der Blick in die Literatur verdeutlicht zudem das Auftreten von Boscalid in zahlreichen Umweltkompartimenten und Matrices: Smalling et al. (2013) fanden diverse Fungizide, darunter Boscalid, im Sediment kleiner landwirtschaftlich geprägter Einzugsgebiete in den Vereinigten Staaten. Chen and Zhang (2010) untersuchten den Abbau von des Fungizids in Böden, Schummer et al. (2010) wiesen Boscalid in der Luft der Stadt Straßburg nach und Vialle et al. (2013) detektierten den Wirkstoff im Abfluss eines Hausdaches in einer ländlich geprägten Gegend in Südwestfrankreich. Sehr häufig wurde Boscalid in die Analyse von Lebensmitteln, wie Früchte, Gemüse, Honig oder Wein mittels GC (Gaschromatographie) und LC (Flüssigchromatographie) aufgenommen, wobei diverse Detektoren zum Einsatz kamen darunter LC-MS/MS (Carneiro et al., 2013; Kmellár et al., 2010; Muñoz et al., 2012; Tran et al., 2012), GC-MS/MS (Panseri et al., 2014), GC-NPD (Hanafi et al., 2010), GC-μ-ECD (Munitz et al., 2013) oder GC-MS (Cserháti and Szogyi, 2012; Čuš et al., 2010; González-Rodríguez et al., 2009; Lagunas-Allué et al., 2012; Mezcua et al., 2009).

Für die Rückstandsanalytik von Boscalid in aquatischen Systemen existieren dagegen vergleichsweise wenige Arbeiten (Battaglin et al., 2010; Kouzayha et al., 2012; Moreno-González et al., 2013; Reilly et al., 2012; Smalling and Orlando, 2008). Reilly et al. (2012) stellten, entgegen den Erwartungen, für Boscalid eine vergleichsweise hohe Mobilität fest, da der Wirkstoff sehr häufig in Oberflächengewässern und zudem in vielen der untersuchten Grundwasserproben detektiert werden konnte.

Da die Spurenanalytik von Pestiziden an der Professur für Hydrologie Freiburg zuvor keine Anwendung fand, bestand eine weitere Intention darin, während der Methodenentwicklung gesammelte Erfahrungen in dieser Arbeit festzuhalten und für weiterführende Projekte zugänglich zu machen.

2 Grundlagen

2.1 Pestizide in aquatischen Systemen

2.1.1 Verbleib von Pestiziden in der Umwelt

Der Einsatz von Pestiziden in der Landwirtschaft führt stets zu einem Verlust der aktiven Substanzen in die Nichtziel-Umwelt, da nur ein Teil der tatsächlich applizierten Menge in direkten Kontakt mit dem Schadorganismus kommt oder von diesem aufgenommen wird. Dies hat zur Folge, dass Nichtzielorganismen diesen Stoffen ausgesetzt sind, wodurch unerwünschte Nebeneffekte für einzelne Spezies oder das Ökosystem im Gesamten auftreten können. Der Umwelteinfluss eines Pestizids ist von dessen Aufwandmenge und Applikationsfläche, dessen Verteilung und Konzentration in den Umweltkompartimenten, sowie von der Degradation und den toxikologischen Eigenschaften des Stoffes abhängig (van der Werf, 1996). Der Verbleib von Pestiziden in der Umwelt wird zunächst von der anfänglichen Verteilung bestimmt, d.h. zu welchen Anteilen sich die aktive Substanz in verschiedenen Umweltkompartimenten nach der Ausbringung befindet. Die anfängliche Verteilung wird dabei unter anderem von der Pestizidformulierung, der Applikationstechnik und -rate, der Topographie, der Bodenbedeckung oder der Witterung gesteuert (Kerle et al., 1996).

Da Pestizide überwiegend organische Substanzen darstellen, unterliegen sie Abbauprozessen, d.h. anders als Schwermetalle besitzen sie in der Umwelt keine absolute Persistenz. Die Degradation von organischen Kontaminanten wie Pestizide, erfolgt durch chemische Prozesse ohne Beteiligung von Mikroorganismen (z.B. Hydrolyse), durch mikrobiellen sowie durch photochemischen Abbau (Thiele-Bruhn, 2010). Die Degradationsrate ist dabei stark abhängig von den chemischen Eigenschaften des jeweiligen Pestizids, sowie von den lokal bestehenden Umweltbedingungen (Kerle et al., 1996). Die Verweildauer in Böden oder in anderen Medien wird typischerweise in Form des DT₅₀ oder DT₉₀ quantifiziert, welcher den Zeitraum angibt, nachdem 50% bzw. 90% der ursprünglichen Menge abgebaut sind.

Neben der Dauerhaftigkeit der Substanz spielt die Mobilität eine zentrale Rolle. Pestizide sind in der Umwelt in festen, flüssigen und gasförmigen Phasen verteilt. Der Transport von Stoffen wird dabei wesentlich durch die Verteilung auf diese Zustandsformen kontrolliert, wodurch bestimmt wird, ob der Stoff eher in einer mobilen (Wasser oder Luft) oder wenig mobilen Phase (sorbiert oder unverändert) vorliegt. Wichtige chemisch-dynamische Stoff-kenngrößen sind der K_{SW}-Verteilungskoeffizient (solid/water), welcher die Verteilung des Stoffes zwischen gelöstem und adsorbiertem Zustand beschreibt, wobei sich die Adsorption auf die Anlagerung des Stoffes an Bodenbestandteile bezieht. K_{OC}-Werte (K_{SW} normiert auf den Gehalt der organischen Substanz) werden häufig verwendet, um Pestizide nach deren Mobilität zu klassifizieren. Je höher der K_{OC}, desto stärker ist das Pestizid an die organische Substanz gebunden und desto geringer ist dessen Mobilität, wenngleich jedoch dadurch auch Abbauprozesse verhindert werden können, da infolge der Adsorption die Stoffe sich in der

Regel in einem vor mikrobiellem Abbau wie auch vor Auswaschung und Aufnahme durch höhere Pflanzen weitgehend geschützten Zustand befinden (Thiele-Bruhn, 2010). Da adsorbierte Pestizide auch wieder desorbiert werden können, ist die Reversibilität der Adsorptionsvorgänge von wesentlicher Bedeutung im Hinblick auf die Mobilität dieser Stoffe in aquatischen Ökosystemen (Passeport et al., 2011).

Ein Maß für die Hydrophilie/Hydrophobie eines Stoffes stellt der K_{OW} (octanol/water) dar: Ist das Gleichgewicht stark in Richtung des Octanols verschoben, wird dieser i.d.R. kaum in gelöster Form verlagert, verbleibt also, sofern nicht flüchtig, überwiegend in der organischen Bodensubstanz. Der K_{OW} ist zudem ein wichtiges Beurteilungskriterium für die Anreicherungsgefahr in der Nahrungskette (van der Werf, 1996). Der K_{AW} (air/water), auch Henry-Konstante genannt, beschreibt dagegen die Verteilung zwischen gasförmiger und in verdünnter Lösung befindlicher Phase. Je höher der K_{AW}-Wert, desto stärker wird die Gasphase bevorzugt und desto größer ist das Potential zur Verflüchtigung. Die Verteilung zwischen fester bzw. flüssiger Form und der Gasphase wird durch den Sättigungsdampfdruck ausgedrückt, wobei ein hoher Sättigungsdampfdruck gleichbedeutend mit einer hohen Flüchtigkeit ist. Von großer Relevanz für das Verhalten in der Umwelt ist des Weiteren die Wasserlöslichkeit, da wasserlösliche Pestizide eher durch Abfluss oder Auswaschung in aquatische Systeme verfrachtet werden können (Kerle et al., 1996; van der Werf, 1996). Eine gebräuchliche Methodologie das Potential von Pestiziden zur Kontamination von Grundwasserkörpern abzuschätzen, ist der GUS-Index ("Groundwater Ubiquity Score"), bei dem die Information über die Persistenz (DT50) mit der Information über die Mobilität (KOC) in einem numerischen Wert zusammengefasst wird und so Pestizide gemäß ihres Potentials zur Auswaschung eingestuft werden können (Gustafson, 1989).

2.1.2 Eintragspfade

Es kann zwischen diffusen und nicht-diffusen Quellen unterschieden werden, wodurch Pestizide in Wasserkörper gelangen können. Diffuse Quellen bestehen infolge der Pestizid-Applikation im Feld. Dagegen stellen nicht-diffuse Quellen den Input von spezifischen sowie örtlich beschränkten Standorten dar (z.B. Pestizidaustrag beim Füllen oder Reinigen von Spritzgeräten). Zu den diffusen Quellen zählen der Eintrag durch Oberflächenabfluss und Erosion, Drainageabfluss, Drift, Auswaschung ins Grundwasser, sowie atmosphärische und äolische Deposition (Reichenberger et al., 2007). In aquatischen Ökosystemen nehmen der Oberflächen- und der Drainageabfluss die wichtigste Rolle beim Austrag von Pestiziden in Oberflächengewässer ein. Die Relevanz von Eintragspfaden kann jedoch in Abhängigkeit von Bodeneigenschaften, Geologie, Topographie, Vegetation oder Bewirtschaftungsmaßnahmen lokal variieren (Carter, 2000). So kann in künstlich drainierten Einzugsgebieten der Oberflächenabfluss vermindert sein, während unterirdische Drainagerohre und -gräben den Haupteintragspfad von belastetem Wasser aus Niederschlag oder Bewässerung in natürliche Oberflächengewässer darstellen (Tournebize et al., 2013). Für aktive Substanzen, welche im Boden zurückblieben, nimmt die Auswaschung einen dominanten Eintragspfad ein, bei dem

gelöste oder suspendierte Partikel mit dem perkolierenden Wasser, in Abhängigkeit der Bodeneigenschaften und der Topographie, ins Grundwasser gelangen oder lateral verfrachtet werden. Der Verlust kann bis zu 5% betragen, liegt jedoch in der Regel unter 1% der applizierten Menge (Flury, 1996). Auch der Austrag aktiver Substanzen via Oberflächenabfluss und durch unterirdische Drainagen beträgt auf der Einzugsgebietsskala meist weniger als 1% (Carter, 2000). Neben Pestiziden in gelöster Form können auch an Festsubstanz adsorbierte Moleküle, infolge von Erosion, Oberflächengewässern zugeführt werden (Gregoire et al., 2008). Der Anteil der Pestizidfracht, welche mit der Sedimentphase transportiert wird, ist dabei umso größer, je stärker sorbierend das Pestizid ist (Arora et al., 2010).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in der Regel nur geringe Anteile der applizierten Stoffmengen in aquatische Systeme gelangen, die dabei auftretenden Konzentrationen dennoch groß genug sein können, um biologisch relevante Effekte zu verursachen (Gregoire et al., 2008).

2.2 Präanalytische Verfahren

2.2.1 Aufgabe der Probenvorbereitung

Trotz des technischen Fortschrittes der vergangenen Jahre sind für die Identifizierung und Quantifizierung von Pestiziden mit Hilfe der Instrumentellen Analytik präanalytische Methoden essentiell. Das Ziel besteht darin, durch Reinigung, Isolierung und Konzentrierung der Analyten die Probe in eine für die analytische Bestimmung geeignete Form zu überführen, da die Analyten in der Umweltprobe in der Regel zu verdünnt sind und in einer meist komplexen Matrix vorliegen (Gey, 2008). Die Probenaufbereitung stellt demnach einen kritischen Schritt in der Analyse einer Umweltprobe dar.

2.2.2 Theoretische Grundlagen

Unter Extraktion versteht man die Überführung eines oder mehrerer Analyten von einer Phase in eine andere. Die Grundlage ist dabei, wie auch in der Chromatographie, der Verteilungskoeffizient K_D zwischen zwei Phasen, welches durch das Nernstsche Verteilungsgesetz (1) beschrieben wird:

$$K_D = \frac{c_2}{c_1} = \frac{m_2 V_1}{m_1 V_2} = \frac{(1 - q) m V_1}{q m V_2}$$
 (1)

Dabei sind c_1 und c_2 die Analytkonzentrationen in den Phasen 1 und 2, m ist die Gesamtmenge des Analyten, V_1 steht für das Volumen der Phase 1 (hier: wässrige Probe) und V_2 für das Volumen der Phase 2 (Extraktionsmittel). Der nach einem Extraktionsschritt in der Phase 1 verbliebene Analytanteil wird durch q repräsentiert (2):

$$q = \frac{m_1}{m_1 + m_2} = \frac{V_1}{V_2 + K_D V_2} \tag{2}$$

Das Gesetz von Nernst besagt, dass das Verhältnis der Konzentrationen eines Stoffes in den beiden Phasen für ein gegebenes Lösungsmittelpaar bei konstanter Temperatur eine Konstante ist. Wenn es zur Gleichgewichtseinstellung kommt, wird sich demnach stets das gleiche Konzentrationsverhältnis einstellen. Die unterschiedlichen Extraktionstechniken lassen sich in Abhängigkeit von den jeweiligen Aggregatzuständen der Phasen einteilen (Gey, 2008). Aufgrund ihrer breiten Verwendung in der Analytik von Pestiziden in wässrigen Matrices sollen nachfolgend die Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE: liquid-liquid extraction), die Festphasenextraktion (SPE: solid-phase extraction) sowie die Festphasenmikroextraktion (SPME: solid-phase microextraction) kurz beschrieben werden.

2.2.3 Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE)

Als eine der ältesten und am häufigsten eingesetzten Aufbereitungstechniken zählt die Flüssig-Flüssig-Extraktion, bei der eine wässrige Lösung mit einem in Wasser nicht löslichen organischen Lösungsmittel extrahiert wird. Eine einfache Anwendung besteht darin, die zu extrahierende Wasserprobe in einen Scheidetrichter zu geben, mit dem organischen Lösungsmittel zu überschichten und anschließend durch Schütteln zu vermischen, wodurch die Phasengrenzen vergrößert werden. Liegt eine unpolare organische Substanz neben polaren und ionischen Substanzen in einer wässrigen Lösung vor, so verteilen sich die Stoffe in der Probe gemäß dem Nerntschen Verteilungsgesetz auf diese zwei Phasen. Die unpolaren Inhaltsstoffe werden dabei überwiegend in das unpolare organische Lösungsmittel überführt, während z.B. für Ionen das Verteilungsgleichgewicht dagegen auf der Seite der wässrigen Phase liegt. Neben dem Unterschied in der Polarität zwischen Lösungsmittel und Extraktionsgut ist ferner ein ausreichend großer Dichteunterschied zwischen dem zu extrahierenden Stoff und dem Extraktionsmittel wichtig, damit beide Phasen, beispielsweise mittels eines Scheidetrichters voneinander getrennt werden können. Bei der mehrfachen Extraktion wird der Trennvorgang mit einem frischen Extraktionsmittel wiederholt. Je größer die Anzahl der Extraktionsschritte bzw. Anzahl der Gleichgewichtseinstellungen, desto effektiver die Trennung (Gey, 2008). Die Flüssig-Flüssig-Extraktion zeichnet sich durch ihre Einfachheit in der Anwendung aus. Von Vorteil ist die Möglichkeit zur Extraktion von organischen Stoffen, welche eine starke Neigung zur Adsorption an partikulärer Substanz zeigen, da keine vorangehende Filtration der Probe nötig ist (Robles-Molina et al., 2013). Mittels LLE lassen sich jedoch keine polaren Pestizide oder deren polaren Degradationsprodukte extrahieren (Sabik et al., 2000). Zudem von Nachteil ist der höhere Zeit- und Arbeitsaufwand und der Bedarf großer Mengen potentiell toxischer organischer Lösungsmittel (Barrek et al., 2009; Sabik et al., 2000).

2.2.4 Festphasenextraktion (SPE)

Das Prinzip der Festphasenextraktion ist ähnlich der Säulenchromatographie, wobei der Ablauf allerdings nicht kontinuierlich abläuft und zu keiner zeitlichen Trennung der Analyten während der Zugabe des Eluenten führt. Die Extraktion läuft vielmehr in diskreten Schritten

ab: Zunächst erfolgt eine annähernd vollständige Adsorption der in einem Lösungsmittel gelösten Analyten an die feste Phase (Sorbens; engl.: *sorbent*), während das Lösungsmittel den Sorbens ungehindert passiert. Daraufhin werden die Analyten erneut vom Sorbens mit einem geeigneten Lösungsmittel eluiert. Anschließend kann das gewonnene Eluat weiterverarbeitet oder direkt analysiert werden.

Die SPE-Technik basiert auf den auch in der Flüssigchromatographie als stationäre Phase eingesetzten Sorbens (z.B. Kieselgel), die meist in kleine Polypropylen- oder Glaskartuschen gefüllt sind. Auf dem Markt ist eine weite Spanne an Sorbensmaterialien mit unterschiedlichen physiochemischen Eigenschaften erhältlich. Die Auswahl des optimalen Sorbens ist abhängig von den Eigenschaften des zu extrahierenden Zielanalyten, sowie von der Zusammensetzung und Menge der Probe. Silicagel-basierte Sorbens werden in der SPE am häufigsten eingesetzt. Sie zeichnen sich durch ihre Robustheit, ihren geringen Preis, der einfach zu realisierbaren Derivatisierung sowie der Stabilität gegenüber Schrumpfen und Quellen in wässrigen Lösungen und organischen Lösungsmitteln aus. In der Regel sind deren Oberflächen durch die kovalente Anlagerung diverser funktioneller Gruppen chemisch modifiziert, wodurch die chromatographische Selektivität verändert werden kann. So ist beispielsweise reines Silicagel strak polar und hält Analyten über das Normalphase- und Kationenaustausch-Prinzip zurück. Durch die Anlagerung gesättigter Kohlenstoffe, wie C18, wird die Oberfläche hingegen unpolar (Phenomenex Inc., 2011). Auch hydrophobe oder hydrophile Polymermaterialien aus vernetztem Styrendivinylbenzen (SDB) kommen für selektive Reinigungen und Konzentrierungen als Sorbens in der SPE zum Einsatz.

SPE-Sorbens werden typischerweise anhand des Retentionsmechanismus mit dem Zielanalyten unterteilt. Als wichtigste Typen sind die Umkehrphase (engl.: reversed phase), die Normalphase (normal phase) sowie der Ionentausch (ion-exchange) zu nennen, auf die im Folgenden kurz eingegangen wird.

Umkehrphase

Dieser Extraktionsmechanismus wird insbesondere zur Extraktion hydrophober oder sogar polarer organischer Analyten aus wässrigen Matrices eingesetzt. Die Kohlenwasserstoffketten des Analyten und des Sorbens werden dabei durch Van-der-Waals Kräfte zusammengehalten. Als Sorbensmaterialien gebräuchlich sind gesättigte C8 und C18 Kohlenstoffketten, aromatische Ringe oder SDB. Da Sorbens, welche auf dem Prinzip der Umkehrphase basieren, relativ unspezifisch sind und dadurch ein vergleichsweise breites Spektrum an organischer Stoffe zurückhalten, ist eine Optimierung der Extraktionsbedingungen von größerer Relevanz. Als Extraktionsmittel kommen organische Lösungsmittel wie Acetonitril oder Methanol zum Einsatz, welche je nach Anforderung mit Wasser, Säuren, Basen oder anderen Lösungsmitteln versetzt werden.

Normalphase

Die Normalphase dient der Extraktion polarer Analyten von unpolaren organischen Lösungsmitteln. Der Retentionsmechanismus basiert auf Wasserstoffbrückenbindungen, Dipol-Dipol- sowie π - π -Wechselwirkungen zwischen dem polaren Analyten und der polaren stationären Phase aus Kieselgel, Aluminiumoxid und Magnesiumsilikat. Durch die gezielte Optimierung der Polarität des Lösungsmittels zur Konditionierung und zur Verdünnung der Probe kann eine hohe Spezifität erreicht werden. Der Vorgang des Herauslösens vom Sorbens wird durch ein unpolares organisches Lösungsmittel, welches mit einer geringen Konzentration eines polaren organischen Lösungsmittels versetzt ist, erreicht.

Ionen-Tausch

Dieser Retentionsmechanismus wird genutzt, um geladene Analyten von wässrigen oder organischen Proben geringer Ionenstärke zu extrahieren. Das Zurückhalten des Analyten beruht auf der gegensätzlichen Ladung des Sorbens. Beim Ionen-Tausch werden die Analyten mit Salzen hoher Ionenstärke und Puffern sowie durch starke Basen und Säuren vom Sorbensmaterial heruntergelöst (Phenomenex Inc., 2011).

Gegenüber der Flüssig-Flüssig-Extraktion zeichnet die Festphasenextraktion sich durch einen geringeren Kosten- und Zeitaufwand und einem verminderten Lösungsmitteleinsatz aus (Robles-Molina et al., 2013; Sabik et al., 2000). Aus diesem Grund wurde diese Technik bei der Analytik von Pestiziden und anderen organischen Kontaminanten in Wasser bereits vielfach eingesetzt (z.B. Barrek et al., 2009; Bonansea et al., 2013; D'Archivio et al., 2007; De Gerónimo et al., 2014; Herrero-Hernández et al., 2013; Jordan et al., 2009; Kouzayha et al., 2012; Lacorte et al., 2000; Portolés et al., 2014; Quintana et al., 2001; Reilly et al., 2012; Ruiz-Gil et al., 2008).

2.2.5 Festphasenmikroextraktion (SPME)

Die Festphasenmikroextraktion ist eine Methode zur Probenahme und zur -vorbereitung. Teil des Probenhemers ist eine an einer Stahlnadel befestigte Quarzfaser, welche mit einem Sorbens beschichtet ist. Die Selektivität und Anreicherungsmöglichkeit der Analyte aus einer komplexen Matrix richtet sich nach den chemischen Eigenschaften des Sorbens (meist unterschiedliche Polymere, wie Carbowax oder Polydivinylbenzen). Die Faser liegt innerhalb einer Schutzkanüle, womit das Septum des Probengefäßes durchstochen wird und anschließend zur Probenahme die Faser ausgefahren wird. Sobald die Faser frei liegt, werden Analytmoleküle adsorbiert. Nach Durchführung der Probenahme wird die angereicherte Faser in die Kanüle durch eine Feder zurückgesetzt, der Probenehmer durch das Septum des Gaschromatographen geschoben und die Faser erneut ausgefahren. Die hohe Temperatur im Injektor führt zu einer Desorption der Analyten und ermöglicht den Transfer der Analyten in die Trennsäule (Gey, 2008). Vorteile der SPME liegen in dem geringen Zeitaufwand, der hohen Automatisierbarkeit und den Verzicht auf organische Lösungsmittel (Robles-Molina et al., 2013).

2.3 Instrumentelle Analytik von Pestiziden

2.3.1 Wichtige Trenn- und Analysemethoden

Zur Analyse von Pestiziden gehören die Gaschromatographie (GC) (z.B. Barrek et al., 2009; Bonansea et al., 2013; Filho et al., 2010; Hladik et al., 2008; Kouzayha et al., 2012, 2011; Lagunas-Allué et al., 2012; Lozowicka and Jankowska, 2012; Momplaisir et al., 2010; Pang et al., 2006; Reilly et al., 2012) oder Flüssigchromatographie (LC) (z.B. D'Archivio et al., 2007; Hanafi et al., 2010; Herrero-Hernández et al., 2013), welche jeweils mit dem Verfahren der Massenspektrometrie gekoppelt werden (GC-MS bzw. LC/MS), zu den am häufigsten eingesetzten Analysetechniken. Auch die Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS), in Kombination mit den oben genannten Chromatographie-Verfahren, finden in der Praxis eine weit verbreitete Anwendung (z.B. Carneiro et al., 2013; Čuš et al., 2010; De Gerónimo et al., 2014; Kmellár et al., 2010; Panseri et al., 2014; Tran et al., 2012; Wang et al., 2011).

Nachfolgend soll auf den Aufbau und die Funktionsweise von Gas- und Flüssigchromatographen kurz eingegangen werden, bezüglich der Detektionssysteme wird lediglich die Massenspektrometrie behandelt. Für einen umfassenderen Überblick über die Instrumentelle Analytik sei auf das Lehrbuch von Gey (2008) verwiesen. Weiterführende Informationen über die Auftrennung von Gemischen und der massenspektrometrischen Detektion mittels GC-MS im Speziellen können Hübschmann (2008) entnommen werden.

2.3.2 Grundlagen des Trennprozesses

Die Chromatographie stellt einen Trennprozess dar, bei dem das Probegemisch zwischen zwei Phasen in einem chromatographischen Bett (Trennsäule oder Ebene) verteilt wird. Während die stationäre Phase ruht, strömt die andere Phase daran im chromatographischen Bett vorbei. Als stationäre Phasen kommen kleine Teilchen fester, poröser und oberflächenaktiver Materialien zum Einsatz, welche mit einem physikalisch oder chemisch gebundenen Flüssigkeitsfilm bedeckt sind. Der Trennprozess basiert auf einer kontinuierlichen Abfolge von Einstellungen des Verteilungsgleichgewichts von Analyten zwischen diesen untereinander nicht mischbaren Phasen. Aufgrund unterschiedlicher Verteilungskonstanten der Substanzen und damit unterschiedlichen Wechselwirkungen zwischen der Probe, der stationären Phase und der mobilen Phase, werden die zu untersuchenden Analyten unterschiedlich schnell durch das chromatographische Bett transportiert und infolgedessen voneinander getrennt (Gey, 2008).

2.3.3 Gaschromatographie (GC)

Ein Gaschromatographiesystem setzt sich aus den folgenden Komponenten zusammen: Gasversorgung, Injektor, Säulenofen mit Trennsäule, Detektor und Auswerteeinheit. Im Injektor wird das Stoffgemisch verdampft und anschließend mit Hilfe eines Stroms aus inertem Trägergas (überwiegend Helium, Wasserstoff oder Stickstoff) durch die Trennsäule geleitet.

Die Trennsäule enthält die stationäre Phase, mit der die Probe in ihre Bestandteile aufgetrennt wird. Nach dem Verlassen der Säule erfolgt die Erfassung der Analyten mittels eines Detektors, wobei eine große Auswahl an universellen oder sehr selektiven Detektoren zur Verfügung steht.

Das Trägergas stellt demnach die mobile Phase in der Gaschromatographie dar. Die Trennsäule befindet sich in einem Säulenofen, wodurch die Säule auf einer reproduzierbaren Betriebstemperatur eingestellt werden kann, wobei die Temperatur während der Analyse zur Optimierung des Trennvorgangs veränderbar ist.

In der Gaschromatographie werden zwei Typen von Trennsäulen unterschieden: Bei gepackten Säulen, welche aus Edelstahl oder Glas gefertigt sind, befindet sich die flüssige mobile Phase als dünne Schicht auf 125–250 µm großen Partikeln, die in der Regel aus Kieselgur bestehen (Schmidt, 2011). Gepackte GC-Säulen sind zwischen 3 und 6 mm dick und ca. 1 bis 3 m lang (Gey, 2008). Da gepackte Säulen nur geringe Bodenzahlen aufweisen, ist ihre Trenneffizient eingeschränkt, weshalb sie in den letzten Jahren für die meisten analytischen GC-Anwendungen durch die leistungsfähigeren Kapillarsäulen ersetzt wurden (Schmidt, 2011). Kapillarsäulen sind deutlich länger (10-100 m) und bestehen überwiegend aus hochreinem Quarzglas. Zum Schutz der sehr dünnen Kapillarsäule (Innendurchmesser: 0,1-0,8 mm) wird das Quarzglas mit einer Polymerschicht auf Polymidbasis ummantelt. Meist ist die Innenwand der Kapillaren mit einer flüssigen stationären Phase chemisch modifiziert. Die Polarität der stationären Phase sollte stets so gewählt werden, dass sie möglichst ähnlich der Polarität der Analyten ist. Polare Phasen mit den charakteristischen CN-, C=O- oder OH-Gruppen sind gegenüber von Aminen, organischen Säuren und Alkoholen besonders selektiv. Zur Trennung von Aromaten, gesättigten oder halogenierten Kohlenwasserstoffen werden in der Gaschromatographie dagegen unpolare stationäre Phasen wie Siliconöle und Kohlenwasserstoffe eingesetzt (Gey, 2008). In der GC stellen Polysiloxane die häufigste stationäre Phase dar, da sie robust, vielfältig einsetzbar und in einer großen Spanne an chemischen Modifikationen erhältlich sind. In der Pestizidanalytik weit verbreitet sind apolare Säulen, bei denen das Polysiloxan zu 95% Methyl-substituiert ist, während die restlichen 5% Phenylgruppen darstellen (z.B. Čuš et al., 2010; Hladik et al., 2008; Kouzayha et al., 2012; Lagunas-Allué et al., 2012; Muñoz et al., 2012; Reilly et al., 2012; Walorczyk et al., 2013). Die Analyten werden dabei stark gemäß ihrer Siedepunkte getrennt, d.h. niedrige siedende Substanzen eluieren früher als Analyten mit hohem Siedepunkt.

Die Verwendung von Gasen als mobile Phase, die den Stofftransport durch die Säule bewirkt, bedingt, dass die Probe in die Dampf- oder Gasphase überführt und in der Regel bei Säulentemperaturen zwischen Zimmertemperatur und 350 °C gearbeitet werden muss. Damit beschränkt sich der Anwendungsbereich der GC auf ausreichend flüchtige und thermisch stabile Verbindungen, die sich schnell ohne Zersetzung oder Reaktion mit den anderen Komponenten der Probe verdampfen lassen. Da die Flüchtigkeit von der Größe und Polarität des Moleküls abhängt, liegt das Haupteinsatzgebiet der GC eher in der Analyse

unpolarer bis schwach polarer Verbindungen mit geringerem Molekulargewicht. Es ist jedoch möglich diese Substanzen infolge geeigneter chemischer Reaktionen (überwiegend Silylierung, Alkylierung, Acylierung) in stabile sowie flüchtige Derivate zu überführen und damit für die GC zugänglich zu machen (Kromidas and Kuss, 2008).

2.3.4 Flüssigchromatographie (LC)

Die heute am häufigsten eingesetzte instrumentelle Variante der Flüssigchromatographie (LC) ist die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC). Die Entwicklung pulsarmer Hochdruckpumpen sowie sehr kleiner monodisperser Partikel (5 µm-Bereich), welche dichter gepackt werden können, ermöglicht höhere Trennleistungen der HPLC gegenüber der klassischen LC.

Bei der HPLC befindet sich die mobile Phase in einem Elutionsmittelvorratsgefäß und wird mittels einer Hochdruckpumpe bei einem Druck von ca. 2 bis 20 MPa über eine Pulsationsdämpfung und einen Filter zum Injektor transportiert, wo die Probe aufgegeben wird. Die Probe wird schließlich mit der mobilen Phase durch eine Vorsäule (Schutz der Trennsäule vor Kontaminationen) und anschließend durch die Trennsäule gepumpt, welche die stationäre Phase enthält. Die Trennsäulen bestehen in der Regel aus Edelstahl, seltener sind sie aus Titan, Polymeren oder druckverfestigtem Glas gefertigt. Die Säulenenden sind mit feinmaschigen Filtersieben (ca. 0,45 µm) versehen, um das Ausspülen der kleinen Partikel der stationären Phase aufgrund des hohen Druckes zu verhindern. Es existieren viele Varianten der HPLC, welche auf unterschiedlichen Trennsystemen basieren und auf teilweise sehr spezifische Anforderungen zugeschnitten sind (Gey, 2008). Die stationäre Phase besteht meist aus Kieselgel, an dessen Oberfläche unterschiedliche funktionelle Gruppen chemisch gebunden sind. In der Flüssigchromatographie stellen Phasengleichgewichte, chemische Gleichgewichte (z.B. Ionenaustausch) und sterische Effekte (Ausschluss) die Basis für die Trennung dar. Im Falle der Phasengleichgewichte sind für die Trennung unterschiedliche zwischenmolekulare Wechselwirkungen der Analyten sowohl mit der stationären als auch mit der mobilen Phase verantwortlich. Da die Analytmoleküle mir den Lösungsmittelmolekülen um die Oberflächenplätze der stationären Phase konkurrieren, hat dies zur Folge, dass die Retention und die Auflösung der Analyten nicht alleinig von den Wechselwirkung der Analyten mit der stationären Phase, sondern auch von der Zusammensetzung der mobilen Phase abhängt (Kromidas and Kuss, 2008). Bei der Umkehrphasenflüssigchromatographie, welche die heute in der Praxis gängigste HPLC-Variante darstellt, ist die stationäre Phase apolar, weshalb die Moleküle in umgekehrter Elutionsreihenfolge nach ihrer Hydrophobizität getrennt werden. Als stationäre Phasen werden meist chemisch modifizierte Kieselgelpartikel verwendet, an deren Oberfläche Alkylketten (z.B. C18-Ketten) kovalent gebunden werden, wodurch die die stationäre Phase apolare Eigenschaften erhält. Die mobile Phase ist dagegen polar, wobei überwiegend Mischungen aus Wasser, Acetonitril oder Methanol zum Einsatz kommen. Apolare Stoffe gehen stärkere Wechselwirkungen mit der apolaren stationären Phase ein, weshalb sie stärker retendiert werden, während polare Stoffe die Säule früher verlassen.

Auch bei der HPLC lässt sich durch Anlegen von Gradienten (Lösungsmittel-, Durchfluss-, Temperaturgradient) während eines Chromatographielaufes die Analyse optimieren.

Vorteil der HPLC ist, dass auch thermolabile und nichtflüchtige Substanzen analysierbar sind. Nachteilig gegenüber der Kapillar-GC ist dagegen das bedeutend kleinere Trennvermögen. So könne mit HPLC-Säulen bis zu 100 Peaks in einem Lauf getrennt werden, mit GC-Kapillaren dagegen 500 bis 1000 (Kromidas and Kuss, 2008).

2.3.5 Massenspektrometrie (MS)

Wie die LC lässt sich auch die GC mit der Massenspektrometrie koppeln. Ein Massenspektrometer setzt sich aus einem Probeeinlass, einer Ionenquelle, einem Trennsystem bzw. einem Analysator und einem Detektor zusammen.

Im Massenspektrometer werden die Substanzen in die Gasphase überführt und mit Hilfe einer Ionenquelle in positiv oder negativ geladene Teilchen ionisiert, wobei als Ionisationstechnik überwiegend die Elektronenstoßionisation (EI) und seltener die chemische Ionisation (CI) eingesetzt werden. Die EI stellt eine harte Ionisationstechnik dar, da durch Beschuss der Moleküle mit energiereichen Elektronen diese in Bruchstücke fragmentieren. Die Elektronen werden dabei von einer Glühkathode (Filament) emittiert und durch eine angelegte Spannung von in der Regel 70 eV beschleunigt. Für weiche Ionisierungsmethoden, wie die chemische Ionisation, werden dagegen thermische oder elektrische Anregungen sowie energiearme Ionen oder Moleküle verwendet. Um die Kollision zwischen ionisierten Teilchen zu vermeiden, wird mit Hilfe von Pumpen im Massenspektrometer ein Hochvakuum erzeugt. Anschließend werden die ionisierten Moleküle in einem Analysator nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) getrennt, wobei die Trennung unter anderem anhand der Ablenkung im Magnetfeld, der Flugzeit- oder mittels der Ion-Trap- und der Cyclotron-Resonanz-Methode erfolgen kann.

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Analysator handelt es sich um einen Quadrupol-Massenspektrometer. Dieser besteht aus sind vier gegenüberliegend angeordneten Magnetstäbe, wobei zwei Stäbe mit einem positivem und zwei mit negativem Spannungspotential belegt sind (Stabelektroden). Zusätzlich wird eine Hochfrequenzwechselspannung im Winkel von 180° zu den Magnetpaaren angelegt. Die im Massenspektrometer erzeugten Ionen werden durch ein statisches elektrisches Feld beschleunigt und fliegen anschließend durch die Mitte der der vier parallel liegenden Stabelektroden. Dieser Ionenstrom kann nun durch Änderung der Spannung und Frequenz gesteuert werden, d.h. nur Teilchen mit einem ausgewählten m/z-Verhältnis können das Feld durchlaufen und den Detektor erreichen (Gey, 2008; Hübschmann, 2008)

Der Detektor registriert schließlich im Massenspektrum die nach Masse-zu-Ladung getrennten Ionen, wobei das das Ergebnis in der Regel in Form eines Strichspektrums dargestellt wird, in dem das Signal gegen das m/z-Verhältnis aufgetragen wird.

3 Materialien und Methoden

3.1 Untersuchungsgebiete

3.1.1 Blankenhornsberg Doktorgarten

Das Staatsweingut Blankenhornsberg bei Ihringen am Kaiserstuhl ist ein 24 ha großes Versuchs- und Lehrgut des Staatlichen Weinbauinstituts (WBI) Freiburg. Das Staatsweingut befindet sich an den südlichen Ausläufern des Kaiserstuhls, ca. 25 km westlich von Freiburg auf 200-280 m über NN.

Der Kaiserstuhl gehört zu den wärmsten Orten Deutschlands. Er steht unter dem Einfluss von Warmluft, welche durch die Burgundische Pforte aus dem Mittelmeerraum zugeführt wird (Weinzierl et al., 2010). Für den Zeitraum 2007-2013 lag am Blankenhornsberg die Jahresmitteltemperatur bei 11,3 °C, mit durchschnittlich über 1800 Sonnenstunden im Jahr. Da der Kaiserstuhl im Windschatten der Vogesen liegt, beträgt die mittlere Jahressumme des Niederschlags lediglich ca. 670 mm (Agrarmeteorologie BW, 2014).

Geologisch ist der Blankenhornsberg durch Vulkanverwitterungsgestein (überwiegend Tephrite) geprägt. In den Steilhängen im oberen Bereich wurzeln die Reben praktisch direkt auf dem Verwitterungsmaterial. Durch den mit der Tiefe stark ansteigenden Skelettanteil sind die ausgebildeten Böden nur im ersten halben Meter grabbar. Sie sind daher zwar gut durchlüftet, besitzen jedoch mit 50-150 L m⁻² ein geringes Wasserspeicherpotential, weshalb viele Reben durch eine Tröpfchen- oder Überkronenbewässerung zusätzlich mit Wasser versorgt werden. In den tieferen Lagen ist das vulkanische Gestein teilweise durch mächtige Lössauflagen bedeckt. Hervorgerufen durch das turnusmäßige tiefgründige Umgraben ("Rigolen") ist der dort anzutreffende Bodentyp ein Pararendzina-Rigosol. Gegenüber den Böden aus Vulkanverwitterungsgestein sind die Lössböden in der Lage in den ersten zwei Metern 350-400 L m⁻² Wasser zu speichern (Weinzierl et al., 2010).

3.1.2 Eingesetzte Pestizide am Blankenhornsberg

Detaillierte Informationen über die in einem Untersuchungsgebiet eingesetzten Pestizidpräparate helfen bei der Entwicklung einer Methode zur Analytik von Wasserproben, da die gesamte Analyse, von der Probenaufbereitung bis zur Messung, auf die zu erwartenden Substanzen angepasst und optimiert werden kann.

In Tabelle 1 sind sämtliche Präparate aufgeführt, welche ab Anfang April 2014 auf den 21,5 ha großen Rebflächen am Blankenhornsberg zur Bekämpfung diverser Schadorganismen ausgebracht wurden. Zudem können der Tabelle die Wirkstoffe, Aufwandmengen und -zeitpunkte der jeweiligen Präparate entnommen werden. Die Aufwandmenge pro ha (=Mittelaufwand) wird im Verlauf der Vegetationsperiode kontinuierlich an das Entwicklungsstadium (ES) und an die damit verbundene vergrößerte Zielfläche der Rebe angepasst. Dazu

wird der Basisaufwand (Mittelaufwandmenge zum Zeitpunkt des Austriebes pro ha) in Abhängigkeit des Entwicklungsstandes mit dem Faktor 1,5 bis 4 multipliziert. Die phänologischen Entwicklungsstadien der Weinrebe sind dabei in der BBCH-Scala angegeben (Meier, 2001). Um Resistenzbildungen zu vermeiden, werden mehrere Wirkstoffe kombiniert und zu unterschiedlichen Stadien appliziert. Immer dann, wenn das Präparat am Blankenhornsberg ausgebracht wurde, ist die Zelle in der Tabelle grün markiert.

Tabelle 1: Aufwandmengen und –Zeitpunkte der am Blankenhornsberg eingesetzten Pestizide. WG: Wasserdipergierendes Granulat; EC: Emulsionskonzentrat; Suspensionskonzentrat.

	Zulassungsinhaber	Wirkstoff/e	Wirkstoff- gehalt	Formulierung	Aufwandmenge			
Handelsname					ES 00-16	ES 61	ES 71	ES 75
					Ba- sis			
					[]	kg bzv	v. 1/ha]	
	Rebenperoneinsp			einreb	e			
	(Plasmopara vitio						
Enervin	BASF SE	Ametoctradin Metiram	120 g/kg 440 g/kg	WG	1,0	2,0	3,0	4, 0
Folpan 80 WDG	ADAMA Deutschland GmbH	Folpet	800 g/kg	WG	0,4	0,8	1,2	1,6
Polyram WG	BASF SE	Metiram	700 g/kg	WG	0,8	1,6	2,4	3,2
Profiler	Bayer CropScience	Fluopicolid	44,4 g/kg	WG	0,75	1,5	2,25	3
Tromer	Deutschland GmbH	Fosetyl-Al	621,9 g/kg		0,73	1,0	2,23	J
	Oidium /	Echter Mehltau						
Tomas	Symposite Agus Conhill	(Uncinula necat		EC	0.08	0.2	0.24	0,32
Topas	Syngenta Agro GmbH Bayer CropScience	Fluopyram	100 g/l 200 g/l	EC	0,08	0,2	0,24	0,32
Luna Experience	Deutschland GmbH	Tebucunazol	200 g/1 200 g/1	SC	0,125	0,25	0,375	0,5
Talendo	DuPont de Nemours GmbH	Proquinazid	200 g/l	EC	0,1	0,2	0,3	0,375
Vento Power	Dow AgroSciences GmbH	Quinoxyfen Myclobutanil	45 g/l 45 g/l	SC	0,4	0,8	1,2	1,6
Vivando	BASF SE	Metrafenon	500 g/l	SC	0,08	0,16	0,24	0,32
Netzschwefel Stulln	agrostulln GmbH	Schwefel	798,6 g/kg	WG	3,6	4,8 (2x)	2,4	3,2
	Botry	tis / Grauschim	melfäule					
		(Botrytis cinere						
Switch	Syngenta Agro GmbH	Fludioxonil Cyprodinil	250 g/kg 375 g/kg	WG	0,24	0,48	0,72	0,96 (0,5x)
Luna Privilege	Bayer CropScience Deutschland GmbH	Fluopyram	500 g/l	SC	ı	-	-	0,25
Cantus (Ausbringung auf 1 ha)	BASF SE	Boscalid	500 g/kg	WG	0,3	0,6	0,9	1,2 (0,66x)
Bekreuzter Traubenwickler (<i>Lobesia botrana</i>), Einbindigen Traubenwickler (<i>Eupoecilia ambiguella</i>), Springwurm (<i>Sparganothis pilleriana</i>), Rhombenspanner (<i>Peribatodes rhomboidarius</i>), Zikade (<i>Auchenorrhyncha</i>), Gemeiner Ohrwurm (<i>Forficula auricularia</i>)						la),		
Steward	DuPont de Nemours GmbH	Indoxacarb	300 g/kg	WG	Ausbringung auf 1,3 ha am Westhang des Blankenhornsberg mit 100 g/ha am 03.06.			

Boscalid wird seit einigen Jahren auf den Rebflächen am Blankenhornsberg nicht mehr eingesetzt. Der Grund hierfür ist zum einen die schnelle Resistenzbildung von Oidium gegen Fungizide aus der Wirkstoffgruppe der Strobuline, da diese sehr spezifisch und nur an einem Wirkort im Stoffwechsel eingreifen (Fischer, 2014a). Da das Präparat "Collis" neben Boscalid auch das Strobulin Kresoxim-methyl enthält, wird von dem Einsatz von Collis im Untersuchungsgebiet abgesehen. Auch gegen den Befall von Botrytis werden anstelle des

Boscalid-Präparats "Cantus" präferiert die Wirkstoffe Fludioxonil, Cyprodinil sowie Fluopyram ausgebracht. Um dennoch Wasserproben auf Boscalid untersuchen zu können, wurde die 0,96 ha großen Rebfläche "Doktorgarten Mitte" auf dem Blankenhornsberg (siehe blau umrandete Fläche in Abbildung 1 und Abbildung 4 an zwei Terminen mit Cantus behandelt. Die Rebfläche befindet sich an einem Osthang auf ca. 265 m ü. NN und ist mit einem zweijährigen Spätburgunder bestockt.



Abbildung 1: Rebfläche "Doktorgarten Mitte" (blau umrandet) auf der Boscalid appliziert wurde.

Zum Zeitpunkt der Behandlung befand sich die Rebe bereits in einem fortgeschrittenen Entwicklungsstadium (> ES 75). Gemäß der Herstellerempfehlung sollten in diesem Stadium 1,2kg pro Hektar eingesetzt werden (vgl. Tabelle 1). Da der Wirkstoff jedoch lediglich in der Traubenzone gespritzt wurde, wurde die applizierte Menge auf 400 g reduziert, da die Traubenzone ca. ein Drittel der Laubwand einnahm. Die erste Spritzung erfolgte am 06.08., die zweite am 20.08.2014.



Abbildung 2: Links: Abwiegen der Aufwandmenge an Cantus; Mitte: Herstellen einer Dispersion mit Wasser; Rechts: Abfüllen der Dispersion in den Tank des Sprühgerätes.



Abbildung 3: Links: Fächer-Radialgebläse des Staatsweingutes Freiburg; Rechts: Ausbringung von Cantus in der Traubenzone.

3.1.3 Probenahme und Datengrundlage

In Oberflächengewässern in landwirtschaftlich geprägten Einzugsgebieten treten die höchsten Pestizidkonzentrationen überwiegend während den ersten Niederschlag-Abfluss-Ereignissen nach der Applikation auf (Passeport et al., 2013; Tournebize et al., 2013). Da am Blankenhornsberg keine Oberflächengewässer vorhanden sind, wurde während zwei größeren Niederschlagsereignissen Wasser aus Oberflächenabfluss beprobt. Um zudem untersuchen zu können, ob Pestizide am Blankenhornsberg auch ins Grundwasser ausgewaschen werden, wurden zu mehreren Zeitpunkten Grundwasserproben aus zwei Tiefbrunnen genommen.

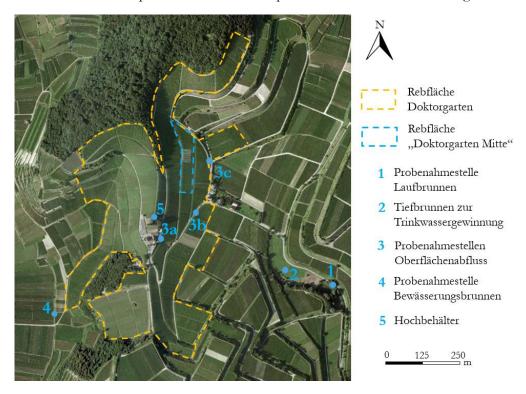


Abbildung 4: Rebflächen und Probennahmestellen am Blankenhornsberg. Lage der Rebfläche Doktorgarten nach LGRB-BW (2014); Basiskarte: Google Earth (2009).

Grundwasserproben

Ein Tiefbrunnen am Blankenhornsberg versorgt den Gutsbetrieb und die anliegenden Häuser mit Trinkwasser (Nr. 2 in Abbildung 4). Dazu wird das vom Tiefbrunnen geförderte Wasser in einen Hochbehälter mit 50 m³ Speichervolumen oberhalb des Staatsweingutes gepumpt (Kienzler, 2014). Die Entnahme im Normalbetrieb des 25 m tiefen Brunnes beträgt 0,6 Liter pro Sekunde. Der Tiefbrunnen durchteuft bis zu einer Tiefe von 15,3 m Lössablagerungen, bestehend aus Schluff und Feinsanden. Im Liegenden der quartären Lössablagerungen folgen die vulkanischen Gesteine des Tertiärs. Im Bereich des Brunnes handelt es sich dabei um Tephrite, die im oberen Bereich von ca. 3 m stark verwittert sind. Das Einzugsgebiet des Tiefbrunnes kann nicht abgegrenzt werden, da durch die Lössauflagen die Ausdehnung des klüftigen Tephritvorkommens, das durch den Brunnen erschlossen wird, nicht bekannt ist. Der Vergleich der Wasserspiegelganglinie mit den Niederschlagsereignissen in einer hydrogeologischen und hydrochemischen Untersuchung des Brunnes deutet darauf hin, dass kein direkter Einfluss erfolgt. Durch das relativ konstante Wasserspiegelniveau ist davon auszugehen, dass die Grundwasserneubildung durch die wasserspeichernden Eigenschaften der Lössabdeckung in Form einer kontinuierlichen Zusickerung erfolgt (Reinold and Michel, 2013). Im Einzugsgebiet des Tiefbrunnens sind neben den Rebflächen des Staatsweinguts auch Anbauflächen der angrenzenden Anbaugebiete "Fohrenberg" und "Winklerberg" gelegen. Für diese Flächen sind keine Informationen über Aufwandmengenund Zeitpunkte der eingesetzten Pestizide verfügbar.

Da ein Laufbrunnen durch diesen Trinkwasserbrunnen gespeist wird, wurden an diesem Grundwasserproben gezogen. Weitere Grundwasserproben stammen aus einem vom Staatsweingut betriebenen Brunnen (Abbildung 5), welcher zur Bewässerung der Reben eingesetzt wird. Die maximale Förderrate beträgt ca. 5,5 Liter pro Sekunde. Die Nitratkonzentration liegt bei 120-130 mg L⁻¹ und ist damit deutlich erhöht gegenüber dem Wasser aus dem Tiefbrunnen, welcher zur Trinkwassergewinnung genutzt wird (20-25 mg L⁻¹) (Huber, 2014).



Abbildung 5: Links und Mitte: Wasserentnahmestelle des Bewässerungsbrunnens. Rechts: Öffentlicher Laufbrunnen am Blankenhornsberg.

Oberflächenabfluss-Proben

Es konnte beobachtet werden, dass auf den skelettreichen Böden über Vulkanitzersatz, zu denen auch die Rebfläche "Doktorgarten Mitte" gehört, Niederschlagswasser schnell versickern konnte und nur bei großen Ereignissen Wasser oberflächlich abfloss. Dies wurde insbesondere während des Regenereignisses am 22.07.2014 deutlich, an dem am Blankenhornsberg innerhalb von sechs Stunden über 40 mm Niederschlag fielen (Agrarmeteorologie BW, 2014). Bedingt durch die bereits hohe Vorfeuchte aufgrund von Regenschauer an den beiden Vortagen, führte das Ereignis zu intensivem Oberflächenabfluss von den Rebflächen. Aufgrund der großen Hangneigungen von teils über 50% und den direkt an die Rebflächen angrenzende Wegen, konzentriert sich der Abfluss am Blankenhornsberg schnell in linienartigen Bahnen und Kleingerinnen (Abbildung 6 und Abbildung 7). Aus diesem Grund wurden am 22.07. und 13.08., während zwei Niederschlagsereignissen, oberflächlich abfließendes Wasser beprobt. Die Positionen der Probenahmestellen können Abbildung 4 entnommen werden. Die Zeitpunkte der Boscalidapplikation sowie die Termine an denen Grundwasserproben genommen wurden, sind in Abbildung 8 dargestellt.



Abbildung 6: Links: Unmittelbare Nähe der Rebflächen zum Wegenetz. Rechts: Erosionsrille auf einem Schotterweg nach einem Niederschlagsereignis.



Abbildung 7: Links: Oberflächenabfluss auf dem Hauptweg am Blankenhornsberg während des Starkregenereignisses am 22.07.2014. Rechts: Probenahme des oberflächlich abfließenden Wassers.

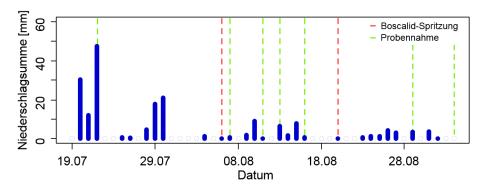


Abbildung 8: Zeitpunkte der Boscalid-Spritzung und Probenahme sowie tägliche Niederschlagssummen am Blankenhornsberg (Agrarmeteorologie BW, 2014)im Zeitraum 19.07-03.09.2014.

3.1.4 Tuniberg

Ergänzend zu den Proben am Blankenhornsberg wurden am 07.07.2014 Wasserproben aus drei Versickerungsbecken am Tuniberg genommen. Die Lagen der Probenahmestellen sind in Abbildung 9 eingezeichnet. Dabei handelt es sich um künstlich angelegte Becken, in die das Wasser aus der Straßenentwässerung, wahrscheinlich vom westlichen und südlichen Teil des Tuniberges, geleitet und anschließend in diesen versickert wird (Abbildung 10).

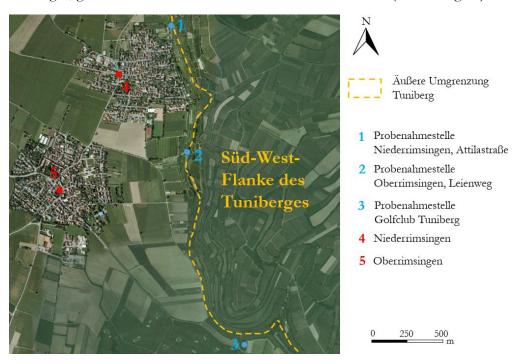


Abbildung 9: Probenahmestellen am Tuniberg. Basiskarte: Google Earth (2006).

Der Tuniberg liegt südöstlich des Kaiserstuhls und ist anders als dieser nicht vulkanischen Ursprungs, sondern eine von mehreren Bruchschollen, die aus der Freiburger Bucht herausragen. Die Gesteinsschichten des Alttertiärs im Nordteil des Tuniberges sind einige hundert Meter tiefer abgesunken und von einer mächtigen Lössdecke bedeckt, im südlichen Teil stehen dagegen die Gesteine des Mittleren Juras an (Weinzierl et al., 2010). Aufgrund des mit des ebenfalls günstigen Klimas ist auch der Tuniberg intensiv weinbaulich genutzt.



Abbildung 10: Links: Mit Wasser gefülltes Versickerungsbecken an der Probenahmestelle Oberrimsingen, Leienweg. Rechts: Wassereinlass des Versickerungsbeckens nahe des Golfclubs Tuniberg.

3.1.5 Lagerung der Wasserproben

Die Wasserproben wurden in 1 Liter Braunglasflaschen gelagert, wobei die herkömmlichen Deckeleinlagen aus LDPE durch flache Scheiben aus PTFE ausgetauscht wurden. Zur erleichterten Probenahme wurden in wenigen Fällen Flaschen aus HDPE genutzt, wobei diese Proben zur Lagerung ebenfalls in Braunglasflaschen überführt wurden. Jede Wasserprobe wurde direkt nach der Probenahme im Labor filtriert (siehe Kapitel 3.3) und bis zum Zeitpunkt der Extraktion bei 4°C gelagert. Da die Proben bereits zu Beginn der Arbeit gezogen wurden und zu diesem Zeitpunkt noch keine Messmethode zur Verfügung stand, betrug die Lagerungszeit in einigen Fällen über drei Monate, weshalb davon auszugehen ist, dass der Zustand der Proben nicht mehr dem zum Zeitpunkt der Probenahme entspricht. Dieser Punkt wird in der Diskussion in Kapitel 5.6 aufgegriffen.

3.2 Reagenzien, Kleingeräte und Standards

Die organischen Lösungsmittel Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan und Methanol (Rotisolv≥99.9% GC Ultra Grade) und das als Analyte Protectant eingesetzte D-Sorbit (≥98%) wurden von Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D), das Acetonitril (SupraSolv≥99.8% GC-MS) von Merck KGaA (Darmstadt, D) bezogen. Der Pestizidstandard von Boscalid und das Triphenylphosphat (99.6%) stammen von Sigma-Aldrich (Schnelldorf, D). Vom Anbieter Restek GmbH (Bad Homburg, D) wurde der PAK-Mix (Acenaphthen-d10, Phenanthren-d10, Chrysen-d12) und die Grob-Testflüssigkeit erworben. Zur Identifikation der Fungizide Cyprodinil, Fludioxonil, Fluopicolid, Fluopyram, Metrafenon, Myclobutanil, Penconazol, Proquinazid, Quinoxyfen, Tebucunazol und des Insektizids Indoxacarb wurden kleine Mengen der Pestizid-Präparate besorgt und die Wirkstoffe daraus extrahiert (siehe Kapitel 4.1). Die Handelsnamen und Zulassungsinhaber der jeweiligen Pestizidformulierungen können Tabelle 1 entnommen werden.

Reinstwasser (18,2 MΩ cm; 4 ppb TOC) wurde mit einer Purelab flex-Wasseraufbereitungsanlage der Firma ELGA LabWater (High Wycombe, Buckinghamshire, UK) erzeugt. Zum
Einsatz kamen zudem eine Analytikwaage (0,00000 g) und ein Glas-Vakuumfiltrationsgerät
von Sartorius (Göttingen, D), ein Inkubationsbad Model 1013 von GFL (Burgwedel, D), ein
Vortexmischer Vortex Genie 2 von Scientific Industries (Bohemia, NY, USA) sowie ein Ultraschallbad vom Modell Sonorex Super RK106 des Herstellers Bandelin electronic (Berlin,
D). Für die Festphasenextraktion fand ein Vakuum-Verteiler mit 12 Positionen von Phenomenex (Torrance, CA, USA) Verwendung, in der mit Hilfe einer Membranpumpe (KNF,
Modell: N 920 AP. 29.18; Freiburg, D) ein Unterdruck erzeugt wurde. Die Bestimmung von
pH, gelöstem Sauerstoff und elektrischer Leitfähigkeit der Wasserproben erfolgte mit einem
Multi 3420 Set G des Anbieters WTW (Weilheim, D).

Die Stammlösung von Boscalid (100 ng μL¹) wurde in Ethylacetat angefertigt. Die Lösung des Surrogate Standards Triphenylphosphat (TPP) (20 ng μL¹) und der internen Standards (20 ng μL¹) wurden jeweils mit Aceton hergestellt, wobei der PAK-Mix bereits als Lösung vorlag und lediglich weiter verdünnt wurde. Für die Analyte Protectant-Mixtur wurde Sorbit in einem 60:40 (v:v) Acetonitril:Wasser-Gemisch gelöst (5000 ng μL¹). Gemäß den Empfehlung von SANCO (2010) wurden zur Herstellung von Standards keine Stoffmengen kleiner als 10 mg abgewogen. Die Lösungen von Boscalid (1 ng μL¹) und TPP (2 ng μL¹) zum Spiken von Wasserproben wurden durch Verdünnung der jeweiligen Stammlösungen mit Methanol (Boscalid) bzw. Aceton (TPP) angefertigt. Die Stammlösungen von Boscalid, TPP und der deuterierten PAK wurden bei -20°C, die AP-Mixtur und die Spiking-Lösungen bei 4°C gelagert.

3.3 Abtrennung fester Störsubstanzen

Die Filtration dient der Abtrennung fester Verunreinigung, welche die Analyse stören oder die Messinstrumente kontaminieren können. Um ein schnelles Zusetzten der Filter zu vermeiden, wurden drei Filter mit abnehmenden Porengrößen eingesetzt. Die erste und zweite Filtration erfolgte über Mikroglasfaserfilter mit 2,7 μm und 1,2 μm Rückhaltebereich (Munktell Ahlstrom, Falun, Schweden), der letzte Schritt stellte ein Cellulosenitrat-Filter mit 0,45 μm Porengröße dar (Sartorius, Göttingen, D). Eine Porengröße von 0,45 μm entspricht definitionsgemäß der Grenze zwischen gelöstem (DOC) und partikulärem organischen Kohlenstoff (POC) (Guo and Macdonald, 2006). Eine weitere Funktion der Filtration ist die Abtrennung von Mikroorganismen, welche zum Abbau von Analyten beitragen (Sandstrom et al., 2001). Nach der Filtration wurde der pH, die elektrische Leitfähigkeit und der Gehalt an gelöstem Sauerstoff einer jeden Probe bestimmt. Die Messwerte sind in tabellarischer Form in Kapitel 14 im Anhang hinterlegt.

3.4 Abtrennung gelöster Störsubstanzen

Zur Extraktion der gefilterten Umweltproben wurden StrataTM-X SPE-Kartuschen mit 500 mg Sorbensmasse und 6 mL Säulenvolumen (Phenomenex, Torrance, CA, USA) verwendet. Zur Überprüfung der Extraktionsperformance wurden einige Proben zudem mit Kartuschen des Typs Oasis® HLB (200 mg, 6 mL; Waters Corporation, Milford, MA, USA) und Leox® plus (200 mg, 6 mL; Bekolut, Hauptstuhl, D) extrahiert. Da für die Eluierung der Strata-X-Kartuschen Acetonitril Verwendung fand, wurde der Sorbens zunächst mit 6 mL Acetonitril konditioniert und anschließend mit der gleichen Menge an Reinstwasser equilibriert. Um die Methodenperformance überwachen zu können, wurde jede Wasserprobe vor der Extraktion mit 100 µL der Surrogate Spiking-Lösung (2 ng·µL-1 TPP in Aceton) versetzt, was einer theoretischen Konzentration von 1ng μL⁻¹ in der finalen extrahierten Probe entspricht. Anschließend wurde die Wasserprobe (1L) mit einer Flussrate von 6 ml·min-1 durch die SPE-Kartusche geleitet, indem im Vakuum-Verteiler, mittels einer drehzahlgesteuerten Membranpumpe ein Unterdruck von -50 kPa eingestellt wurde (Bezugssystem: Atmosphärendruck = 0 hPa). Bei Testläufen des Versuchsaufbaus stellte sich heraus, dass die Flussrate neben dem angelegten Unterdruck auch von der Wassersäule in der Probeflasche maßgeblich gesteuert wird. Um gleichbleibende Flussraten zu erzeugen, wurden daher die Probeflaschen auf einen Falttisch gestellt, um den Wasserspiegel in den Flaschen über den gesamten Extraktionszeitraums auf derselben Höhe halten zu können.

Zur Trocknung der Kartusche wurde für 5 Minuten Raumluft durch die Kartusche gezogen, indem ein Unterdruck von ca. -50 kPa an die Unterseite der SPE-Kartusche angelegt wurde. In einem zweiten Schritt wurde schließlich für weitere 30 Minuten Stickstoff (Reinheit: 99.996 %) mit einem positiven Druck durch die Kartusche geleitet.

Die Eluierung erfolgte mit 6 mL Acetonitril in zwei Schritten (2x3 mL). Um den trockenen Sorbens zu befeuchten, wurde für ca. 5 Sekunden die Vakuumpumpe angeschaltet. Daraufhin wurde die Pumpe direkt wieder abgeschaltet, wodurch das Lösungsmittel lediglich aufgrund der Schwerkraft mit einer geringen Flussrate durch den Sorbens perkolieren konnte. Sobald kein Lösungsmittel mehr aus der Kartusche austrat, wurde die Vakuumpumpe zugeschaltet, um das verbleibende Lösungsmittel aus der Kartusche zu ziehen. Das Eluat wurde in nach unten spitz zulaufenden Zentrifugengläsern (13 ml) aufgefangen, um das spätere Pipettieren kleiner Lösungsmittelmengen zu erleichtern.

Die Oasis® HLB-Kartuschen wurden gemäß der Methode nach Hladik et al. (2008) mit 10 mL Ethylacetat und 10 mL Methanol konditioniert und mit 5 mL Reinstwasser equilibriert. Nach dem Lade- und Trocknungsvorgang, welcher dem der Strata-X-Kartuschen entsprach, erfolgte die Eluierung mit 6 mL Ethylacetat. Die Leox® plus wurden gemäß der Herstellerempfehlung mit 12 mL Methanol konditioniert und mit 12 mL Reinstwasser equilibriert. Die Analyten wurden schließlich mit 6 mL einer Acetonitril:Methanol-Mischung (1:1, v:v) in zwei Schritten eluiert. Weitere Informationen zum gewählten Geräteaufbau und den angewandten Extraktionsschritten sind in Kapitel 8 im Anhang zu finden.

Materialien und Methoden 23

3.5 Eindampfung und Lösungsmitteltransfer

Zur weiteren Konzentrierung wurde das Eluat mittels eines sanften Stickstoffstroms zur Trockene eingedampft. Dazu wurde das Zentrifugenglas in einem auf 35°C temperierten Inkubationsbad gestellt und die Lösungsmitteloberfläche mit Stickstoff begast, wodurch innerhalb von ca. 40 min das gesamte Lösungsmittel in die Gasphase überführt werden konnten. Anschließend wurden die nach der Eindampfung im Zentrifugenglas zurückbleibenden Analyten in 200 μL Lösungsmittel aufgenommen, in dem die internen Standards (PAK) in einer Konzentration von jeweils 1ng μL⁻¹ vorlagen und das identische Volumenverhältnis von Ethylacetat zu Aceton wie in den Kalibrierlösungen eingestellt war (vgl. 4.3.2). Die Lösung im Zentrifugenglas wurde in einem Vortexmischer durchmischt und schließlich in Mikroeinsätze (350 μL) überführt.

3.6 GC-MS-Parameter

Zur GC-MS-Analyse kam ein Shimadzu GCMS QP2010 Ultra zum Einsatz, welcher mit einem AOC-20i+s Autosampler/-injektor ausgerüstet war (Shimadzu, Kyoto, Japan). Die chromatographischen Auftrennung erfolgte mit Hilfe einer Zebron ZB5-MS Kapillarsäule (L:30 m; ID: 0,25 mm; Filmdicke: 0,25 μm) von Phenomenex (Torrance, CA, USA). Als Trägergas wurde Helium (Reinheit: 99.999%) mit einer konstanten Flussrate von 1 ml min⁻¹ eingesetzt. Die initiale Ofentemperatur betrug 80°C, welche für 1 Minute gehalten wurde. Anschließend wurde die Temperatur mit einer Rate von 9°C min⁻¹ auf 300°C erhöht und auf dieser Endtemperatur für weitere 10 Minuten gehalten.

Der Split-/Splitlos-Injektor wurde auf einer konstanten Temperatur von 250°C und einem initialen Kopfdruck von 345 kPa (1 Minute Haltezeit) eingestellt und im Splitlos-Modus betrieben, wobei der Splitausgang für eine Minute geschlossen gehalten wurde. Das Injektionsvolumen betrug 1 µL. Bei dem verwendeten Liner handelte es sich um einen Sky® Single Taper Inlet Liner ohne Glaswolleeinsatz mit 3,5 mm Innendurchmesser (Restek, Bellefonte, PA, USA).

Der Massenspektrometer wurde im Elektronenstoßionisations-Modus mit einer Ionisationsenergie von 70eV, einer Interfacetemperatur von 280°C und einer Ionenquellentemperatur von 230°C betrieben, wobei das Filament und der Detektor nach 5 Minuten Laufzeit angeschaltet wurden. Die Datenaufnahme erfolgte im massenselektiven Modus (SIM) bei einer Eventzeit von 0,15 s.

Zusätzlich zur Messung im reinen SIM-Modus wurde jede Probe mit einer längeren Methode im FASST-Modus gemessen, wobei der Scan-Modus ein Massebereich von m/z 40-450 umfasste. Die Eventzeit im Scan-Modus lag bei 0,3 s und im SIM-Modus bei 0,2 s. Folgendes Temperaturprogramm wurde angewandt: 80°C (1 Minute Haltezeit), Erhöhung mit 10°C·min⁻¹ auf 120°C, Erhöhung mit 3°C·min⁻¹ auf 200°C (5 Minuten Haltezeit), Erhöhung mit 3°C·min⁻¹ auf 220°C, finale Erhöhung mit 10°C·min⁻¹ auf 300°C (10 Minuten Haltezeit). Alle anderen GC-MS-Parameter entsprachen denen der reinen SIM-Methode.

4 Ergebnisse

4.1 Auswahl der Analyten und Messung mittels GC-MS

Da detaillierte Informationen über die im Untersuchungsgebiet Blankenhornsberg eingesetzten Pestizide besorgt werden konnten, habe ich mich dazu entschlossen, neben Boscalid weitere Pestizide in die Analyse mit aufzunehmen. Als erster Schritt wurde geprüft, welche der am Blankenhornsberg ausgebrachten Wirkstoffe mit dem vorhandenen Messaufbau in Wasserproben nachgewiesen werden konnten.

Die anorganische Verbindung Fosetyl-aluminium ist nur nach Derivatisierung mittels GC messbar (Hernández et al., 2005). Auch das Dithiocarbamat Metiram kann nicht auf direktem Wege im Gaschromatographen gemessen werden (EURL, 2014). Der Wirkstoff Folpet wurde ebenfalls nicht in die Methode aufgenommen, da sich die Substanz bereits bei 184°C zersetzt und sich damit nicht zerstörungsfrei verdampfen lässt (PPDB, 2014).

Da es sich bei den verbleibenden Wirkstoffen überwiegend um ungeladene, sowie mittel- bis unpolare Substanzen handelt, konnte von einer guten Extrahierbarkeit der Substanzen aus wässrigen Matrices mittels der vorhandenen Umkehrphasen-SPE-Kartuschen ausgegangen werden. Die Fungizide Boscalid, Cyprodinil, Fludioxonil, Fluopicolid, Fluopyram, Metrafenon, Myclobutanil, Penconazol, Proquinazid, Quinoxyfen, Tebucunazol sowie den als Insektizid eingesetzten Wirkstoff Indoxacarb wurden schließlich in die SPE-GC-MS-Methode aufgenommen.

Aus Aufwands- und Kostengründen konnte nur für Boscalid die Reinsubstanz als analytischer Standard beschaffen werden und demnach nur dieser Analyt in Umweltproben quantifiziert werden. Für die anderen Pestizide waren lediglich qualitative Aussagen möglich. Um die Retentionszeiten und Signalverhältnisse der ausgewählten Target- und Referenzionen unter der gewählten Messmethode ermitteln zu können, wurden kleine Mengen der kommerziell erwerbbaren Pestizide besorgt und die Wirkstoffe daraus extrahiert. Pestizidformulierungen enthalten neben den Wirkstoffen eine Vielzahl von Beistoffen. Die Besitoffe verleihen der Formulierung eine gute Haft- und Netzfähigkeit auf der pflanzlichen Cuticula, optimieren die Wirkung aktiver Substanzen im Zielorganismus oder fungieren als Suspensionsmittel, Emulgatoren, Antioxidantien, Warnstoffe oder Schutzkolloide (Börner et al., 2009).

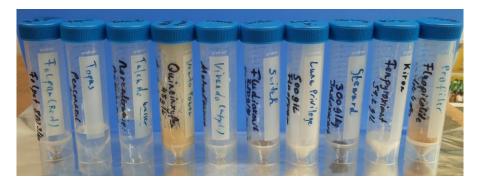


Abbildung 11: Diverse Pestizidformulierungen, aus denen die Wirkstoffe extrahiert wurden.

Um die Wirkstoffe von den zugesetzten Beistoffen zu trennen, wurde ein Liter entionisierten Wassers mit jeweils einer kleinen Menge der Formulierung versetzt (Abbildung 11). Anschließend wurden die Pestizide auf gleichem Weg wie eine Wasserprobe mit Hilfe einer SPE-Kartusche extrahiert, in Ethylacetat überführt und schließlich im GC-MS im SIM- und FASST-Modus mehrfach gemessen, um die Retentionszeiten und Ionen-Verhältnisse für die jeweiligen Methoden zu ermitteln.

Die häufig hohe Komplexität einer Wasserprobe bei gleichzeitig geringen Konzentration der Analyten lässt die Identifizierung der Substanzen durch Vergleich der in einem "Fullscan" aufgenommen Massenspektren mit Spektrenbibliotheken häufig nicht zu. Die Aufnahme eines Vollspektrums bietet zwar eine maximale qualitative Information, da jedoch bei einem Quadrupol-Massenspektrometer eine Masse nach der anderen in zeitlich kurzer Abfolge registriert wird, verringert sich die Verweilzeit pro Massenzahl (engl.: dwell time), was mit einer verminderten Messempfindlichkeit einhergeht.

Beim "Selected Ion Monitoring" (SIM) erfasst der Detektor dagegen nur wenige ausgewählte Massenzahlen und verbleibt damit länger auf einer Massenzahl, wodurch die Empfindlichkeit angehoben werden kann. Nachteilig ist dabei jedoch der Verlust molekülspezifischer Informationen: Andere als die für eine Analyse ausgewählten Stoffe werden nicht erfasst, mit der Folge, dass neben der Matrix auch möglicherweise in der Probe vorhandene, relevante Analyten ausgeblendet werden, da deren Auftreten nicht erwartet wird (Hübschmann, 2008; Kromidas and Kuss, 2008). Da bei einem SIM-Lauf keine kompletten Massenspektren vorhanden sind, werden pro Zielanalyt bzw. Standard die Intensitäten von jeweils drei charakteristischen Ionen registriert. Aufgrund der höheren Sensitivität wurde die Quantifizierung von Boscalid und der zugesetzten Standards im SIM-Modus vorgenommen.

Als SIM-Ionen eines Analyten wurden Ionen mit großer Intensität im Spektrum und gleichzeitig möglichst großer Masse gewählt. Die Auswahl beruhte auf den EI-Massenspektren der von der US-Bundesbehörde "*National Institute of Standards and Technology*" herausgebrachten Datenbank NIST 11, sowie der Pestiziddatenbank von Chromaleont (Mondello, 2011). Die Massenspektren für Fluopyram und Proquinazid stammen von der CVUA Stuttgart.

Für Analyten, welche sehr nah eluieren wurde sichergestellt, dass deren Target- und Referenzionen nicht im Massenspektrum des anderen Analyten auftraten. Ferner wurde darauf geachtet, dass keine Molekül-Ionen verwendet wurden, welche typisch für diverse Kontaminationsquellen sind (z.B. Phthalate: m/z 149; siehe Kapitel 11.1). Das intensivste Ion wurde zur Quantifizierung (engl.: quantifier/target ion) herangezogen, die beiden anderen Ionen fungierten als Identifikationskriterium (engl.: qualifier ions).

Abbildung 12 zeigt exemplarisch das Elektronenstoßionisation-Massenspektrum von Boscalid in der NIST 11. Die Quantifizierung von Boscalid erfolgte über dessen Basispeak mit m/z 140, die Massen 342 und 344 fungierten als Referenzionen.

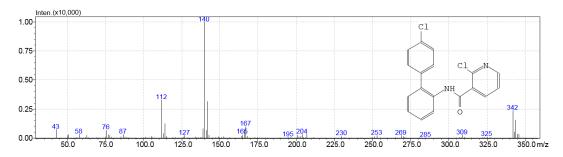


Abbildung 12: EI-Massenspektrum von Boscalid in der NIST 11.

Für eine erfolgreiche Identifikation einer Substanz durfte die in der Probe gemessene Retentionszeit um 5% von der des Kalibrierstandards abweichen. Für die Intensitätsverhältnisse der ausgewählten SIM-Ionen wurde die maximal zulässige Abweichung zum Kalibrierstandard auf 20% festgelegt. Bei der Analyse der Umweltproben wurden nur Peaks mit einem Signal-Rausch-Verhältnis (S/N-Verhältnis) größer als 3 integriert und ausgewertet. Ein S/N-Verhältnis von 3 ist häufig als die Nachweisgrenze definiert, d.h. die niedrigste Konzentration des Analyten in der Probenmatrix, bei der das Signal-Rausch-Verhältnis mindestens 3:1 beträgt. Im Falle einer Detektion im SIM-Modus gilt dies sowohl für die Target- als auch für die Referenzionen (Peters et al., 2009). Das S/N-Verhältnis wurde dabei über die ASTM-Methode, welche in der Shimadzu Labsolutions Software implementiert ist, berechnet. Bei diesem Rechenverfahren wird die Basislinie zunächst in 30-sekündige Abschnitte zerteilt und daraufhin für alle Datenpunkte innerhalb eines Abschnittes die Steigung der einfachen linearen Ausgleichsgeraden über die Methode der kleinsten Quadrate ermittelt. Anschließend werden zwei Geraden mit dieser Steigung ins Chromatogramm gelegt und so zueinander parallel verschoben, dass alle Datenpunkte innerhalb dieser Geraden liegen. Die Distanz in v-Richtung (Intensität) zwischen diesen Geraden entspricht der Weite des Rauschens im jeweiligen Abschnitt. Im finalen Schritt wird das Rauschen aller Abschnitte gemittelt und über die Signalhöhe das S/N-Verhältnis abgeleitet (Shimadzu Corporation, 2013a).

Wie bereits erwähnt, wurden alle Proben zusätzlich mit einer zweiten Methode im FASST-Aufnahmemodus (*Fast Automated Scan/SIM Mode*) gemessen, bei dem der Detektor alternierend im Scan- und SIM-Modus hin- und herschaltet wird. Diese Messung wurde gewählt, um mögliche Kontaminationen und weitere Probenbestanteile erfassen, sowie die Performanz beider Aufnahmemodi miteinander vergleichen zu können. Für eine verbesserte chromatographische Auftrennung wurden in der FASST-Methode mehrere Temperaturrampen mit langsamen Aufheizraten implementiert, wodurch sich die Laufzeit von 35.44 auf 61.33 Minuten erhöhte. Alle anderen Geräteeinstellungen entsprachen denen der reinen SIM-Methode.

In Tabelle 2 sind die Target- und Referenzionen, Retentionszeiten (t_R) und SIM-Gruppen der Pestizide, der internen Standards und des Surrogate Standards der SIM- und FASST-Methode aufgeführt. Abbildung 13 stellt das Chromatogramm einer mit Pestiziden und Standards versetzen und anschließend extrahierten Leerprobe dar, welche mit der in Kapitel 3.6 beschriebenen SIM-Methode gemessen wurde.

Tabelle 2: Retentionszeiten (t_R), Target- und Referenzionen, SIM-Gruppen der mit der SIM- und FASST-Methode gemessenen Pestizide und Standards. IS: Interner Standard; SUR: Surrogate Standard.

Peak Nr.	Analyt	t _{R(SIM)} [min]	t _{R(FASST)} [min]	Targetion [m/z]	Referen- zion 1 [m/z]	Referen- zion 2 [m/z]	SIM Gruppe
1	Acenaphthen-d10 (IS 1)	10,975	13,42	162	164	160	1
2	Phenanthren-d10 (IS 2)	14,9	22,83	188	189	184	2
3	Cyprodinil	17,742	31,2	224	225	210	3
4	Penconazol	17,85	31,497	248	161	250	3
5	Fluopyram	17,95	32,15	223	195	396	3
6	Fludioxonil	18,958	35,423	248	154	182	4
7	Myclobutanil	19,258	36,533	179	150	181	4
8	Quinoxyfen	20,742	42,103	237	272	307	5
9	Fluopicolid	20,867	43,22	209	347	349	5
10	Tebucunazol	21,15	43,7	125	250	252	5
11	Proquinazid	21,233	43,977	288	272	330	5
12	TPP (SUR)	21,233	44,213	326	325	215	5
13	Chrysen-d10 (IS 3)	21,967	45,363	240	236	241	6
14	Metrafenon	23,3	48,403	393	395	377	7
15	Boscalid	24,875	50,443	140	342	344	8
16	Indoxacarb	26,517	52,39	218	203	264	9
3000000			3				
Intensität 0 1000000 10	1	15	5	7 9 11+ 6 8 10 20	13 14	15 7 25	16

Abbildung 13: SIM-Chromatogramm einer mit Pestiziden und Standards versetzen Wasserprobe.

Retentionszeit [min]

4.2 Prüfung der GC-MS-Performance

Um die Reproduzierbarkeit von Messergebnissen bei mehrfacher Injektion einer identischen Probe zu prüfen, wurden drei Lösungen mit unterschiedlichen Boscalidkonzentrationen (0,012 ng μ L⁻¹|0,5 ng μ L⁻¹|4 ng μ L⁻¹) hergestellt, denen jeweils die gleichen Mengen der Triphenyphosphat- (TPP) und PAK-Lösung (jeweils 1 ng μ L⁻¹) zugesetzt wurden. Jede Lösung wurde anschließend auf je fünf Vials verteilt, im GC-MS gemessen und anschließend für alle Analyten als Streuungsmaß die relative Standardabweichung %RSD (engl.: *relative standard deviation*) der Peakflächen berechnet. Zudem wurde für jede Lösung der Korrelationskoeffizient zwischen den Peakflächen von Boscalid und TPP sowie zwischen Boscalid und Chrysen-d10 als Maß für den linearen Zusammenhang der Datenreihen ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Relative Standardabweichungen der Peakflächen von Boscalid, TPP und der PAK bei Mehrfachinjektion dreier Lösungen mit unterschiedlichen Boscalidkonzentrationen.

	Lösung 1 (0,012 ng μL ⁻¹)	Lösung 2 (0,5 ng μL ⁻¹)	Lösung 3 (4 ng µL-1)
	%RSD	%RSD	%RSD
Acenaphthen-d10	4,7	2,9	3,8
Phenanthren-d10	4,6	4,1	6,8
ТРР	9,3	11,2	15,2
Chrysen-d10	9,4	10,7	14,7
Boscalid	10,8	13,7	18,4
Boscalid normalisiert mit TPP	2,9	4,3	4,6
Boscalid normalisiert mit Chrysen-d10	3,6	4,3	5,0
Korrelationskoeffizient (TPP und Boscalid)	0,967	0,997	0,991
Korrelationskoeffizient (Chrysen-d10 und Boscalid)	0,944	0,997	0,991

Betrachtet man die relativen Standardabweichungen innerhalb einer Lösung, so lässt sich eine generelle Zunahme der Schwankung mit größer werdenden Retentionszeit erkennen. Vergleicht man die relativen Standardabweichungen aller Analyten zwischen den Lösungen, so scheint für TPP, Chrysen-d10 und Boscalid ebenfalls eine Tendenz zu höheren relativen Standardabweichungen vorhanden sein, je höher die Konzentration von Boscalid in der jeweiligen Lösung ist. Die hohen Korrelationskoeffizienten verdeutlichen einen stark positiven linearen Zusammenhang zwischen den Datenreihen. Die Normalisierung der Boscalid-Peakflächen mit den Peakflächen von TPP bzw. Chrysen-d10 reduzierte die relative Standardabweichung auf weniger als ein Drittel des ursprünglichen Wertes. In Kapitel 5.2 wird der Einsatz von TPP und Chrysen-d10 als interne Standards diskutiert.

4.3 Kalibrierung zur quantitativen Analyse

4.3.1 Interne Kalibrierung

Die Quantifizierung von Boscalid in Umweltproben erfolgte über eine interne Kalibrierung. Dazu wurden jeder Kalibrierlösung konstante Konzentrationen an Standards zugesetzt und im GC-MS gemessen. Die Verhältnisse der Peakflächen von Analyt und internem Standard wurden gegen die Konzentration aufgetragen und eine Regressionsanalyse durchgeführt. Bei der Messung einer extrahierten Probe unbekannter Analytkonzentration wurde dieser in gleicher Weise ein interner Standard zugesetzt und aus dem Verhältnis der Peakflächen mit Hilfe der abgeleiteten Kalibrierfunktion die Analytkonzentration berechnet. Vorteil dieser Methode ist, dass systematische Fehler (z.B. Analytverlust bei der Proben-Aufbereitung) oder Schwankungen, welche dem Analysegerät innewohnen (Injektion, Säulentransfer, Detektor), mit diesem Verfahren in gewissen Maße kompensiert werden können, da der Standard im Idealfall auf gleicher Weise wie der Analyt diesen Schwankungen ausgesetzt ist. Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass die physikalischen (z.B. Volatilität, Molekülgewicht) und chemi-

schen Eigenschaften (z.B. Molekülstruktur, funktionelle Gruppen, Polarität) möglichst ähnlich dem des Analyten sein sollten. Ferner darf ein Standard keinen ursprünglichen Probenbestandteil darstellen oder zumindest in vernachlässigbar kleinen Konzentrationen vorkommen und muss zudem mit der gleichen Methode bestimmbar sein wie der Analyt. Der ideale Standard stellt das mit stabilen Isotopen (häufig ²H oder ¹³C) markierte Molekül des Analyten dar, da dieses praktisch identische Eigenschaften aufweist, jedoch in natürlichen Systemen nicht vorkommt.

In Abbildung 14 und Abbildung 15 sind die deutlichen Unterschiede in den EI-Massenspektren zwischen dem natürlich vorkommenden Chrysen und dem Isotopen-markierten Chrysen-d12 erkennbar, wodurch eine klare Unterscheidung der Signale im Massenspektrum möglich ist.

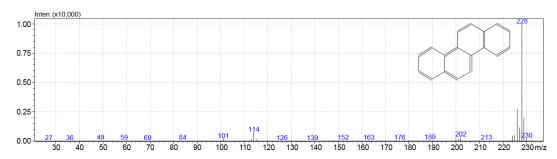


Abbildung 14: EI-Massenspektrum des natürlich vorkommenden Chrysen in der NIST 11.

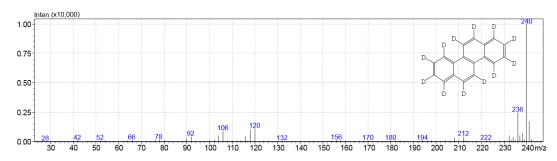


Abbildung 15: EI-Massenspektrum des Chrysen-d12 in der NIST 11.

Da die Beschaffung eines jeden Analyten in seiner Isotopen-markierten Form sehr kostenintensiv ist, bedient man sich in der Regel eines Ersatzstoffes, welcher dennoch vergleichbare Eigenschaften wie der Analyt aufweist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden den Umweltproben zu zwei Zeitpunkten während der Analyse Standards zugesetzt. Kurz vor der Extraktion wurde jede Probe mit einer definierten Menge an Triphenylphosphat versetzt ("Surrogate Standard"), um die Methodenperformance für jeden Messlauf überwachen zu können. Diese Funktion änderte sich im Verlauf der Arbeit, worauf in den folgenden Kapiteln näher eingegangen werden soll.

Als interne Standards, die kurz vor der Injektion der Probe hinzugegeben wurden, wurden die Deuteriumderivate dreier polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK) eingesetzt, welche in der GC-Pestizidanalytik bereits eine häufige Verwendung fanden (z.B. Aslan-Sungur et al., 2014; Clifton et al., 2013; Hladik et al., 2008; Moreno-González et al., 2013; Nguyen et al., 2009; Price et al., 2005; Sandstrom et al., 2001; Tran et al., 2012).

4.3.2 Zusammensetzung der Kalibrierlösungen

Die Zusammensetzungen der Kalibrierlösungen sind in Tabelle 4 aufgeführt. Der Kalibrierbereich reicht von 0,012 - 10 ng μL⁻¹, was einer Analytkonzentration von 0,0024 - 2 μg L⁻¹ in der Wasserprobe entspricht. Da während der Methodenentwicklung der Effekt von D-Sorbit als Analyte Protectant untersucht wurde, ist zudem das zugesetzte Volumen der Analyte Protectant-Mixtur angegeben. Den finalen Kalibrierlösungen und Umweltproben wurde jedoch letztendlich kein D-Sorbit hinzugegeben (vgl. Kapitel 5.5.2). Um Pipettierfehler zu minimieren, wurden zur Anfertigung der Kalibrierlösungen Direktverdrängerpipetten ausgeliehen, welche gegenüber Luftpolsterpipetten deutlich unabhängiger vom Dampfdruck, aber auch von der Dichte, Viskosität und dem Benetzungsverhalten der Flüssigkeiten sind. Dies ist insbesondere beim Pipettieren von sehr flüchtigen organischen Lösungsmittel, wie Aceton oder Dichlormethan, von größerer Relevanz.

Tabelle 4: Zusammensetzungen der Kalibierlösungen.

Konzentration des Analyten in Kalibrierlösung,									
in ng μL-1	0,012	0,04	0,12	0,25	0,5	1	2	4	10
Volumen der Analyt-Stammlösung									
(100 ng μL ⁻¹), in μL	3	10	30	25	50	100	200	400	1000
Volumen der Interner Standard-Lösung (PAK)									
(20 ng μL ⁻¹), in μL	1250	1250	1250	500	500	500	500	500	500
Volumen der Surrogate Standard-Lösung (TPP)									
(20 ng μL-1), in μL	1250	1250	1250	500	500	500	500	500	500
Volumen der Analyte Protectant-Mixtur									
(5000 ng μL ⁻¹), in μL	750	750	750	300	300	300	300	300	300
Finales Volumen des Kalibrierstandards,									
in mL	25	25	25	10	10	10	10	10	10
Äquivalente Analytkonzentration in Wasserprobe,									
in µg L-1	0,0024	0,008	0,024	0,05	0,1	0,2	0,4	0,8	2

4.3.3 Ermittlung der Kalibrierfunktion

Jede Kalibrierlösung wurde zweifach gemessen, wobei von jeder Lösung eine Teilmenge in jeweils zwei Vials gegeben und injiziert wurde. Aus den Verhältnissen der Peakflächen von Analyt und internem Standard wurde schließlich die Kalibrierfunktion über die Methode der kleinsten Quadrate abgeleitet. Die Regressionsanalysen sowie alle weiteren statistischen Berechnungen in dieser Arbeit, wurden mit der Programmiersprache R (R Development Core Team, 2008) durchgeführt.

Abbildung 16 zeigt die ermittelte Kalibriergerade einer linearen Kalibrierfunktion, wobei TPP als interner Standard eingesetzt wurde. Man erkennt, dass die Kalibriergerade in der logarithmischen Darstellung für geringe Konzentrationen (<0,5 ng µL⁻¹) stets unterhalb der Messwerte verläuft (Überschätzung), während größere Konzentrationen unterschätzt werden, was sich in einem niedrigen Bestimmtheitsmaß von R²=0.989662 niederschlägt.

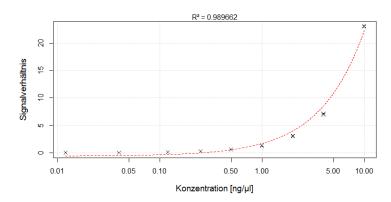


Abbildung 16: Gemessene Datenpunkte der Kalibrierlösungen und Kalibriergerade der abgeleiteten linearen Kalibrierfunktion bei Verwendung von TPP als internen Standard.

Dividiert man die Signalverhältnisse durch die jeweils entsprechenden Konzentrationen und plottet die dabei erhaltenen Quotienten erneut gegen die Konzentration, die wiederum auf einer logarithmischen Skala aufgetragen ist, kann die Linearität des Zusammenhanges zwischen Detektorsignal und Konzentration bewertet werden. Bei Linearität liegen die Messwerte im Schaubild über den gesamten Kalibrierbereich auf einer gedachten horizontalen Linie. Abbildung 17 zeigt jedoch einen praktisch kontinuierlichen Anstieg des Quotienten mit zunehmender Konzentration und damit eine Nicht-Linearität des Zusammenhangs.

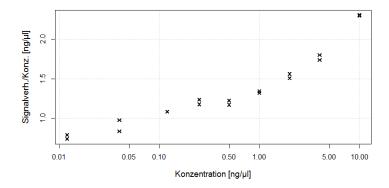


Abbildung 17: Plot zur Bewertung der Linearität des Zusammenhanges zwischen Signal bzw. Signalverhältnis und Konzentration mit TPP als internen Standard.

Schließlich wurde eine quadratische Regression durchgeführt, deren Regressionsparabel in Abbildung 18 dargestellt ist. Das Bestimmtheitsmaß erhöhte sich auf R²=0,999888.

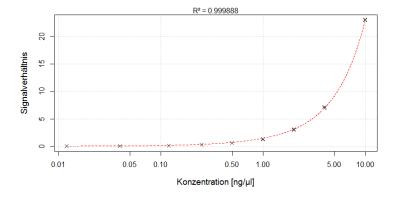


Abbildung 18: Gemessene Datenpunkte der Kalibrierlösungen und Kalibriergerade der abgeleiteten quadratischen Kalibrierfunktion bei Verwendung von TPP als internen Standard.

Die gleichen Rechenoperationen wurden anschließend mit Chrysen-d10 als internen Standard wiederholt, wobei vergleichbare Ergebnisse wie mit TPP erzielt wurden (siehe Abbildung 19-Abbildung 21).

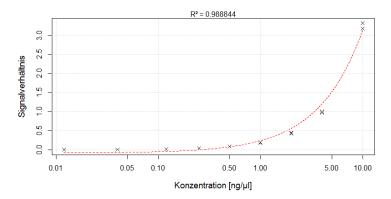


Abbildung 19: Gemessene Datenpunkte der Kalibrierlösungen und Kalibriergerade der abgeleiteten linearen Kalibrierfunktion bei Verwendung von Chrysen-d10 als internen Standard.

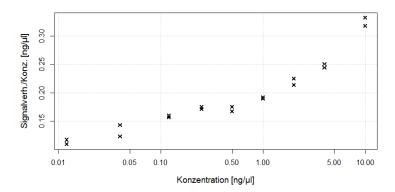


Abbildung 20: Plot zur Bewertung der Linearität des Zusammenhanges zwischen Signal bzw. Signalverhältnis und Konzentration mit Chrysen-d10 als internen Standard.

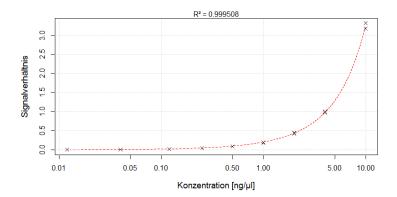


Abbildung 21: Gemessene Datenpunkte der Kalibrierlösungen und Kalibriergerade der abgeleiteten quadratischen Kalibrierfunktion bei Verwendung von Chrysen-d10 als internen Standard.

4.4 Vergleich der Aufnahmemodi

Da jede Umweltprobe mit zwei Methoden gemessen wurde (vgl. Kapitel 3.6), konnte deren Messperformance miteinander verglichen werden. Dabei stellte sich heraus, dass für Analytkonzentrationen nahe der Nachweisgrenze mit der FASST-Methode tendenziell größere S/N-Verhältnisse und zudem mehr Positivfunde erzielt werden konnten, d.h. in der FASST-Methode erfüllten mehr Peaks die in Kapitel 4.1 definierten Identifikationskriterien.

In den SIM-Messungen der insgesamt 29 untersuchten Wasserproben betrug die Anzahl der Positivfunde an Analyten (eingeschlossen Standards) 270, für die Analyse der identischen Proben mit der FASST-Methode 279. Dennoch wurden für alle Peaks, die in der SIM-Methode positiv als Analyten identifiziert wurden, auch in der FASST-Methode die Identifikationskriterien erfüllt.

In Abbildung 22 sind die SIM-Chromatogramme von Myclobutanil und Tebucunazol in zwei mit der SIM-Methode gemessenen Umweltproben dargestellt. Aufgrund des Doppelpeaks in jeweils einem der SIM-Chromatogramme, hervorgerufen durch eine andere Substanz, lagen die Intensitätsverhältnisse der ausgewählten SIM-Ionen nicht im definierten Toleranzbereich. In der FASST-Methode traten bei allen Messungen keine Störungen der Analyten durch andere in der Probe vorhandenen Komponenten auf.

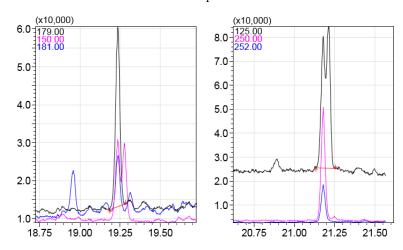


Abbildung 22: SIM-Chromatogramme von Myclobutanil (links) und Tebucunazol (rechts) in zwei Umweltproben, welche aufgrund eines Doppelpeaks nicht integriert werden können.

Die FASST-Methode erlaubte für einige Proben aus Oberflächenabfluss zudem die Identifikation vier weiterer Fungizide (Dimethomorph, Fenhexamid, Iprovalicarb, Pyrimethanil) durch den Abgleich der gemessenen Spektren mit den Spektrenbibliotheken.

4.5 Festphasenextraktion

4.5.1 Versuche zur Überprüfung des Einflusses der Probenmatrix auf die Analyse

Parallel zu den Versuchen am GC-MS wurde an der Erstellung einer SPE-Methode gearbeitet. Die in Kapitel 3.4 aufgeführten und in Kapitel 8 detaillierter beschriebenen Schritte zur Extraktion von Wasserproben mit Strata-X-Kartuschen wurden dabei gemäß den in Phenomenex (2011) gegebenen Empfehlungen durchgeführt.

Bedingt durch die Anzahl der vorhandenen PTFE-Schläuche und der Anzahl der Positionen des Glasrechens, welcher zur Eindampfung des Eluats verwendet wurde, konnten vier Wasserproben parallel extrahiert und aufbereitet werden. Da bei der Extraktion der mit Pestizidpräparaten versetzten Wasserprobe (vgl. Kapitel 4.1) und weiteren Vorversuchen der Versuchsaufbau bereits eine zufriedenstellende Praktikabilität zeigte, wurde anschließend die Extraktionsperformance geprüft. Dazu wurde Reinstwasser mit bekannten Mengen an Boscalid versetzt und anschließend mit Hilfe der Strata-X-Kartuschen extrahiert. Da sowohl Strata-X-Kartuschen mit 200 mg als auch mit 500 mg Sorbentmasse vorhanden waren, wurden für die Vorversuche die Kartuschen mit 200 mg gewählt, da die Proben der Vorversuche überwiegend eine deutlich geringere Komplexität als die Umweltproben aufwiesen.

Da die Wasserproben Boscalid in einer bekannten Konzentration enthielten, konnten anhand der aufgestellten Kalibrierfunktion die Wiedererhalte berechnet werden. Bei diesen Versuchen wurden für Boscalid stets ca. doppelt so große Konzentrationen gemessen, als die Probe theoretisch enthalten sollte. Der Vergleich der Peakflächen der Proben aus der SPE mit denen der Kalibrierlösungen offenbarte ebenfalls ca. doppelt so große Peakflächen der mittels SPE extrahierten Proben. Aufgrund dieser deutlichen Signalerhöhung wurden weitere Versuche unternommen, um die Ursache für dieses Phänomen ausfindig zu machen. Nachfolgend werden diese Versuchsreihen und deren Messergebnisse dargestellt und beschrieben.

Versuchsreihe 1: 500 mL Reinstwasser (Strata-X, Pre-SPE-Spiking)

Um die Anzahl der Einflussgrößen (z.B. Bias, welcher durch die Kalibrierfunktion gegeben ist) zu minimieren, wurde fortan die Signalerhöhung direkt über den Vergleich von Peakflächen bewertet. Dazu wurden drei Proben an Reinstwasser (500 mL) mit je 100 μL der Spiking-Lösungen von Boscalid (1 ngμL⁻¹) und TPP (2 ngμL⁻¹) versetzt und mit der in Kapitel 4.1 beschriebenen Methode extrahiert. Das in Zentrifugenröhrchen aufgefangene Eluat wurde zur Trockene eingedampft und anschließend die Analyten in 200 μL Injektionslösungsmittel, welches die PAK als interne Standards enthielt, aufgenommen und mit der SIM-Methode gemessen. Parallel dazu wurden in 9 frischen Zentrifugenröhrchen erneut je 100 μL der identischen Spiking-Lösungen von Boscalid und TPP gegeben. Diese Spiking-Lösungen wurden mit der gleichen Prozedur wie das Eluat aus der SPE zur Trockene eingedampft und anschließend ebenfalls im Injektionsmittel aufgenommen und gemessen. Um möglichst stets

die gleichen Volumina der Spiking-Lösungen hinzugeben zu können, wurde eine Direktverdrängerpipette eingesetzt, wodurch die Flüssigkeit in 100 µL Teilschritten in die einzelnen Probengefäße ohne Unterbrechung abgegeben werden konnte.

Die Messergebnisse sind in Abbildung 23 dargestellt. Alle Proben, die mittels SPE extrahiert wurden, sind mit dem "S" vor der Nummerierung gekennzeichnet. Die Messpunkte sind in der Reihenfolge ihrer Messung im GC-MS von links nach rechts im Schaubild angeordnet: Zunächst wurden die Proben ohne SPE-Extraktion (1-9) und anschließend die extrahierten Proben (S1-S3) gemessen. Um das Ausmaß der Signalerhöhung besser sichtbar zu machen, wurde jeder Messwert (Peakfläche) durch den Mittelwert der Peakflächen der Proben ohne SPE-Extraktion geteilt und mit 100 multipliziert. Liegt beispielsweise für die dritte SPE-Messung (S3) für Boscalid das "relative Signal" bei 200% bedeutet dies, dass in dieser Probe eine gegenüber dem Mittelwert der nicht-extrahierten Proben doppelt so große Peakfläche gemessen wurde. Für jeden Peak wurde die automatische Integration durch die Auswertesoftware überprüft. Um Schwankungen der GC-MS-Analyse auszugleichen, wurden die Peakflächen von Boscalid und TPP über die Peakflächen von Chrysen-d10 normalisiert. Die Normalisierung wurde dabei für die Gruppen (nicht-extrahierte und extrahierte Proben) getrennt durchgeführt.

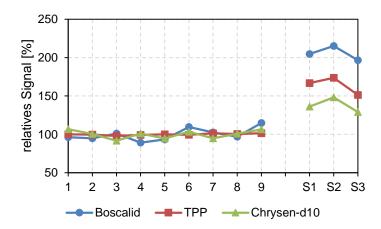


Abbildung 23: Relatives Signal der Pre-gespikten Wasserproben (500 ml Reinstwasser extrahiert mit Strata-X) gegenüber direkt eingedampfter Spiking-Lösungen.

Gegenüber den direkt eingedampften Spiking-Lösungen sind die extrahierten Proben deutlich überhöht. Für Boscalid beträgt das relative Signal im Mittel 206% und für TPP 164%. Auch das Signal von Chrysen-d10, welches erst kurz vor der Injektion in das Zentrifugenröhrchen gegeben wurde, liegt knapp 40 % höher als die Peakflächen der nicht-extrahierten Proben. Um Verschleppungen auszuschließen, wurden Leerproben gemessen (Extrakt ohne Hinzugabe der Analyten) und auch die reinen Lösungsmittel injiziert. Lediglich in einem dieser Extrakte wurde TPP gemessen, die Peakfläche betrug jedoch weniger als 1% der durchschnittlichen Peakfläche des hinzugegeben Standards, weshalb eine Verschleppung nicht als Ursache für das erhöhte Signal gesehen werden kann.

Versuchsreihe 2: 500 mL Reinstwasser (Strata-X, Post-SPE-Spiking)

Um die Bedingungen zwischen extrahierten und nicht-extrahierten Proben noch vergleichbarer zu machen, wurde im nächsten Schritt je drei mal 500 mL Reinstwasser ohne Zugabe der Spiking-Lösungen extrahiert und das Eluat im Zentrifugengläschen zur Trockene eingedampft und erst danach jeweils 100 µL der Spiking-Lösungen von Boscalid und TPP hinzugegeben ("Post-SPE-Spiking"). Anschließend wurden diese erneut eingedampft und die Analyten im Injektionslösungsmittel aufgenommen. Parallel dazu wurden 6 frische Zentrifugengläschen direkt mit den gleichen Mengen der Spiking-Lösungen versetzt, auf identischem Wege eingedampft und die Analyten im Injektionslösungsmittel aufgenommen. In Tabelle 5 sind die einzelnen Schritte zum besseren Verständnis nochmals aufgeführt.

Tabelle 5: Arbeitsschritte beim Vergleich der Signalintensitäten extrahierter Proben und nicht-extrahierter Proben.

Schritt Nr.	Extrahierte Proben	Nicht-extrahierte Proben			
1	Extraktion der Wasserprobe (keine Zugabe von Analyten)	-			
2	Auffangen des Eluats in Zentrifugengläschen	-			
3	Eindampfen des Eluats zur Trockene	-			
4	Hinzugabe von je 100 μL der Spiking-Lösungen von Boscalid und TPP	Hinzugabe von je 100 µL der Spiking-Lösungen von Boscalid und TPP			
5	Eindampfen der Spiking-Lösung zur Trockene	Eindampfen der Spiking-Lösung zur Trockene			
6	Aufnahme der Analyten in 200 μL Injektionslösungsmittel	Aufnahme der Analyten in 200 μL Injektionslösungsmittel			

In Abbildung 24 sind die Messergebnisse dargestellt. Für diesen und für alle nachfolgenden Versuche wurde folgende Vorgehensweise gewählt: Die Reihenfolge der Messung beider Probentypen wurde geändert: Zunächst wurden drei nicht-extrahierte Proben (1, 2, 3), anschließend die drei SPE-Proben (S1, S2, S3) und schließlich drei weitere nicht extrahierte Proben (4, 5, 6) im GC-MS gemessen. Die Peakflächen der Messungen (S1, S2, S3, 4, 5, 6) sind durch den Mittelwert der ersten drei Peakflächen der Proben ohne SPE-Extraktion (1, 2, 3) geteilt und mit 100 multipliziert. Die ersten drei Messungen eines Laufes stellen demnach die Referenz dar, mit denen die folgenden Messungen verglichen werden. Um den Anund Abstieg des relativen Signals besser erkenntlich zu machen, sind die Datenpunkte in den Schaubildern miteinander verbunden.

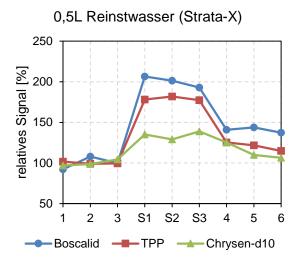


Abbildung 24: Relatives Signal der Post-SPE-gespikten Wasserproben (500 mL Reinstwasser extrahiert mit Strata-X) gegenüber direkt eingedampfter Spiking-Lösungen.

Ähnlich wie bei den Proben, welche vor der SPE-Extraktion mit den Spiking-Substanzen versetzt wurden, sind die Post-SPE-gespikten Wasserproben deutlich überhöht. Für Boscalid beträgt das relative Signal im Mittel 200%, für TPP 179% und für Chrysen-d10 134%. Die Signalerhöhung gegenüber den nicht-extrahierten Proben ist demnach ähnlich, unabhängig davon ob die Spikinglösungen vor (Abbildung 23) oder nach der Festphasenextraktion (Abbildung 24) der Probe hinzugegeben wurde. Des Weiteren fällt auf, dass die drei nicht-extrahierten Proben (4-6), welche nach den extrahierten Proben (S1-S3) im GC-MS gemessen wurden, ebenfalls leicht erhöht sind.

Versuchsreihe 3: 1L Reinstwasser (Strata-X, Post-SPE-Spiking)

In einem weiteren Versuch wurde schließlich die Menge an extrahiertem Reinstwasser von 500 mL auf 1L erhöht – alle anderen Schritte blieben unverändert (Abbildung 25).

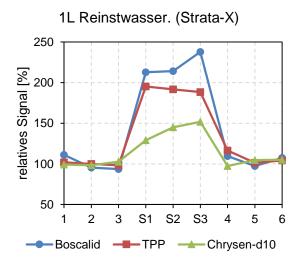


Abbildung 25: Relatives Signal der Post-SPE-gespikten Wasserproben (1 L Reinstwasser extrahiert mit Strata-X) gegenüber direkt eingedampfter Spiking-Lösungen.

Vergleicht man die Werte in Abbildung 24 mit denen in Abbildung 25, so kann man eine Zunahme der relativen Signale der Post-SPE-gespikten Wasserproben erkennen. Für Boscalid beträgt das relative Signal im Mittel nun 222%, für TPP 192% und für Chrysen-d10 142%. Anders als in Abbildung 24 ist für die drei nicht-extrahierten Proben (4-6) dieses Mal kein erhöhtes Signal erkennbar.

Versuchsreihe 4: 1L Reinstwasser (Oasis HLB, Post-SPE-Spiking)

Um den Einfluss der Kartusche auf die Signalerhöhung zu untersuchen, wurden im nächsten Versuch drei Mal 1LReinstwasser mit einer Oasis HLB extrahiert (Abbildung 26). Die angewandten Extraktionsschritte für diese Kartuschen sind ebenfalls in Kapitel 3.4 aufgeführt. Wie in Abbildung 26 zu sehen, waren auch für diese Kartuschen die Signale der Post-SPEgespikten Wasserproben erhöht. Für Boscalid beträgt das relative Signal im Mittel 198%, für TPP 172% und für Chrysen-d10 142% und ist damit den Ergebnissen aus Strata-X-Extraktion von 500 mL ähnlicher als der Strata-X-Etraktion von 1 L an Reinstwasser. Für TPP wirken die Proben 4 und 5 leicht erhöht gegenüber den Proben 1-3.

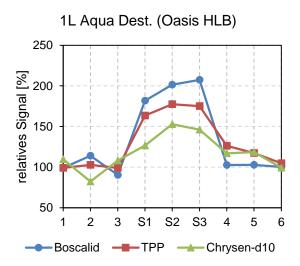


Abbildung 26: Relatives Signal der Post-SPE-gespikten Wasserproben (1 L Reinstwasser extrahiert mit Oasis HLB) gegenüber direkt eingedampfter Spiking-Lösungen.

Versuchsreihe 5: 1L Dreisamwasser (Strata-X, Post-SPE-Spiking)

Um den Einfluss der Probenmatrix auf die Signalerhöhung weiter untersuchen zu können, wurden anschließend je vier mal 1 Liter an Oberflächenwasser (Dreisam bei Freiburg), das zuvor durch einen Filter mit 0,45 µm Porengröße gefiltert wurde, erneut mit Hilfe von Strata-X-Kartuschen extrahiert. Eine zuvor gemessene Leerprobe bestätigte, dass in diesen Umweltproben keine messbaren Hintergrundkonzentrationen von Boscalid und TPP vorhanden waren.

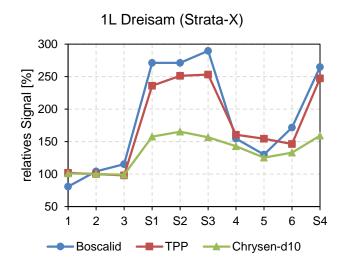


Abbildung 27: Relatives Signal der Post-SPE-gespikten Wasserproben (1 L Oberflächenwasser extrahiert mit Strata-X) gegenüber direkt eingedampfter Spiking-Lösungen.

Von allen extrahierten Wasserproben, konnte für die Proben aus Oberflächenwasser die größte Signalverstärkung gemessen werden. Für Boscalid beträgt das relative Signal im Mittel 274%, für TPP 247% und für Chrysen-d10 160%. Für diesen Messlauf wurden, anstelle von bisher drei, vier extrahierte Proben angefertigt. Die vierte Probe (S4) liegt auf einem vergleichbar hohen Niveau wie die die Proben S1-S3 (Abbildung 27). Ähnlich wie bei der Messung mit 500 mL Reinstwasser (vgl. Abbildung 24) sind die Signale von Boscalid, TPP und Chrysen-d10 in den nicht-extrahierten Proben 4-6 gegenüber den Proben 1-3 sichtbar erhöht. Bei allen Proben kann zudem gesehen werden, dass die Signalerhöhung für Boscalid stets größer ist als für TPP. Für Chrysen-d10, das erst kurz vor der Injektion als gelöster Bestandteil des Injektionslösungsmittels ins Zentrifugenröhrchen gegeben wurde, ist die Signalverstärkung deutlich geringer ausgeprägt (relatives Signal: 134-160%).

4.5.2 Maßnahmen zur Kompensierung von Matrix-induzierter Signalverstärkung

Der Einsatz von Analyte Protectants stellt eine Maßnahme dar, Matrix-induzierte Effekte auszugleichen (vgl. Kapitel 5.5.2 und 9.6). Mit den nachfolgenden Versuchen wurde geprüft, inwieweit die Peakflächen von TPP und Boscalid durch das Vorhandensein von D-Sorbit (nachfolgend nur: "Sorbit") in der Probe beeinflusst werden. Dazu wurden zwei Lösungen angefertigt: Beide enthielten die gleiche Konzentration an TPP (1 ng μL⁻¹) und Boscalid (0,5 ng μL⁻¹), jedoch wurde nur einer Lösung Sorbit (150 ng μL⁻¹) zugesetzt (beide Lösungen enthielten jedoch die identischen Anteile an Ethylacetat, Aceton, Acetonitril und Wasser). Die Lösungen wurden schließlich auf jeweils 10 Aliquote verteilt und nacheinander gemessen. Vergleicht man die Peakflächen in Abbildung 28 mit denen in Abbildung 29, so bewirkt die Zugabe von Sorbit für beide Analyten eine signifikante Zunahme der Peakflächen: Mit 187% (TPP) und 196% (Boscalid) wird für beide Substanzen durch die Zugabe von Sorbit

eine beinahe doppelt so große Peakfläche erreicht, wenngleich die Variabilität der Peakflächen ansteigt.

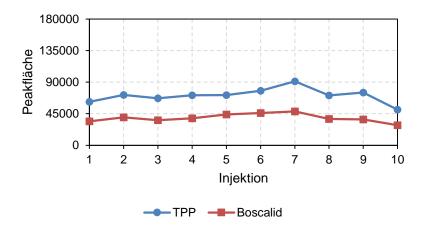


Abbildung 28: Peakflächen von TPP und Boscalid ohne Zusatz von Sorbit.

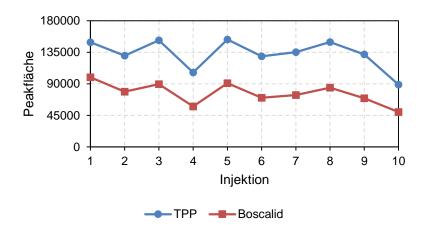


Abbildung 29: Peakflächen von TPP und Boscalid mit Zusatz von Sorbit (150 ng µL-1).

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde daher im letzten Versuch erneut ein Liter Reinstwasser mit Strata-X-Kartuschen extrahiert und sowohl den extrahierten als auch den direkt verdampften Proben die gleiche Menge an Sorbit als Analyte Protectant (vgl. Kapitel 9.6) zugesetzt (150 ng µL⁻¹).

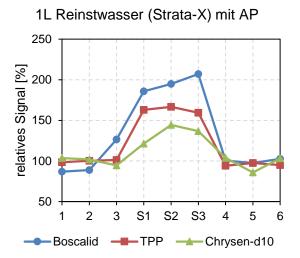


Abbildung 30: Relatives Signal der Post-SPE-gespikten Wasserproben (1 L Reinstwasser) gegenüber direkt eingedampfter Spiking-Lösungen mit Zusatz von Sorbit.

Für Boscalid beträgt das relative Signal der extrahierten Proben im Mittel 196%, für TPP 163% und für Chrysen-d10 134% (Abbildung 30). Die Zugabe von Sorbit führte damit lediglich zu einer schwachen Angleichung der Messsignale der Proben. Anders als in den Vorversuchen wurde keine vergleichbar große Signalverstärkung durch den Analyte Protectant erzielt.

4.6 Anwendung der SPE-GC-MS-Methode auf Umweltproben

Aufgrund der beschränkten Zeit habe ich mich dazu entschlossen, von weiteren Versuchen zur Kompensierung der beobachteten Matrixeffekte (siehe Diskussion in Kapitel 5.5.2) und zur allgemeinen Optimierung der Methode abzusehen und stattdessen die verbleibenden Ressourcen zur Analyse der Umweltproben einzusetzen. Insgesamt wurden 29 Wasserproben aus den Untersuchungsgebieten Blankenhornsberg und Tuniberg mit Hilfe der übrigen SPE-Kartuschen extrahiert und die aufbereiteten Proben jeweils mit der SIM- und FASST-Methode gemessen (Kapitel 3). Bei den 29 Wasserproben handelte es sich in 14 Fällen um Duplikate bzw. Triplikate, um prüfen zu können, wie ähnlich sich die Ergebnisse bei einer erneuten Analyse sind. Es wurden 12 Proben aus Oberflächenabfluss, 7 Proben aus dem Bewässerungsbrunnen und 10 Wasserproben aus dem Trinkwasserbrunnen untersucht. Die Proben aus den Versickerungsbecken vom Tuniberg wurden der Gruppe der Oberflächenabflussproben zugeordnet.

Wie bereits erwähnt, konnten für die Fungizide Cyprodinil, Fludioxonil, Fluopicolid, Fluopyram, Metrafenon, Myclobutanil, Penconazol, Proquinazid, Quinoxyfen, Tebucunazol und für das Insektizid Indoxacarb ausschließlich qualitative Aussagen getroffen werden. Die Interpretation der Daten beschränkt sich auf die Präsenz und die Magnituden der Stoffe in Umweltproben unterschiedlicher Herkunft (Oberflächenabfluss, Bewässerungsbrunnen, Trinkwasserbrunnen). In Abbildung 31 sind die Analytpeakflächen der mit der FASST-Methode untersuchten Umweltproben dargestellt.

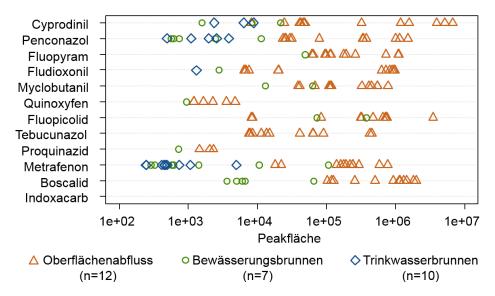


Abbildung 31: Peakflächen der mit der FASST-Methode in den Umweltproben identifizierten Analyten.

Betrachtet man die Peakflächen, so fällt zunächst auf, dass alle Wirkstoffe mit Ausnahme von Indoxacarb in mindestens einer Probe identifiziert wurden. Die vier häufigsten Pestizide waren Metrafenon (28 Positivfunde), Penconazol (22 Positivfunde), Cyprodinil (18 Positivfunde) und Boscalid (17 Positivfunde). Schließt man Du- und Triplikate aus, wurde Metrafenon in 14, Penconazol in 12, Cyprodinil in 9 und Boscalid in 8 der insgesamt 15 Proben gefunden. Vergleicht man die Anzahl der Positivfunde innerhalb der Probengruppen, so wurden in den Proben aus Oberflächenabfluss die meisten Pestizide gefunden, darauf folgen die Proben aus dem Bewässerungsbrunnen und schließlich die des Trinkwasserbrunnens. Für die Proben aus dem Trinkwasserbrunnen konnten lediglich die Wirkstoffe Cyprodinil, Penconazol, Fludioxonil und Metrafenon nachgewiesen werden. Tebucunazol wurde sogar in keiner der analysierten Grundwasserproben detektiert.

Die Abfolge in der Abundanz lässt sich auch in den Peakflächen erkennen: Die größten Peakflächen und damit die größten Analytkonzentrationen wurden tendenziell in den Oberflächenabflussproben gemessen, während die Konzentrationen in den Trinkwasserbrunnen in der Regel deutlich geringer waren. Die Proben aus dem Bewässerungsbrunnen nahmen erneut eine Zwischenstellung ein.

Zur Quantifizierung von Boscalid im SIM-Modus wurde die aus einer quadratischen Regression abgeleitete Kalibrierfunktion mit TPP als Interner Standard verwendet (vgl. Kapitel 5.3). In Tabelle 6 sind die Boscalidkonzentrationen in den gemessenen Umweltproben aufgeführt. Waren Duplikate oder sogar Triplikate einer Probe vorhanden, so wurde der Mittelwert der Konzentrationen gebildet. Probenahmestellen sind dadurch besser miteinander vergleichbar. Die Messergebnisse bei einer erneuten Analyse weisen in einigen Fällen eine stärkere Varianz auf. Insbesondere für die Messungen der Proben des Beregnungsbrunnens am 22.07. unterschieden sich die Messergebnisse ungewöhnlich stark. In der ersten Probe betrug die Boscalidkonzentration 0,032 µg L⁻¹, in der zweiten Probe dagegen lediglich 0,003 µg L⁻¹.

Tabelle 6: Boscalidkonzentrationen in den untersuchten Wasserproben vom Blankenhornsberg und Tuniberg.

Probenahmestelle	Proben- ahme- datum	Probe Nr.	Konz. in Wasserprobe	Mittlere Konz. in Wasser- probe [µg/L]
Tuniberg:	07.07.2014	1/2	0,785	0,71
Versickerungsbecken Oberrimsingen, Leienweg		2/2	0,630	
Tuniberg: Versickerungsbecken Niederrimsingen, Attilastraße	07.07.2014	1/1	0,224	0,22
Tuniberg:	07.07.201.4	1/2	0,487	0.46
Versickerungsbecken nahe Golfclub Tuniberg	07.07.2014	2/2	0,433	0,46
Blankenhornsberg: Oberflächenabfluss Probenahmestelle 3a	22.07.2014	1/1	0,120	0,12
TN 1 1 1		1/3	0,056	_
Blankenhornsberg: Oberflächenabfluss Probenahmestelle 3b	22.07.2014	2/3	0,065	0,06
Obernachenabhuss Probenannestene 30		3/3	0,055	
Blankenhornsberg:	22.07.2014	1/2	0,032	0.02
Beregnungsbrunnen	22.07.2014	2/2	0,003	0,02
DI I I I		1/3	0,689	
Blankenhornsberg: Oberflächenabfluss Probenahmestelle 3c	13.08.2014	2/3	0,547	0,63
Obernachenabhuss Probenanniestene 3c		3/3	0,665	
DI 1 1 1		1/3	0,003	
Blankenhornsberg:	03.09.2014	2/3	0,002	0,002
Beregnungsbrunnen		3/3	0,002	

Die größten Boscalidkonzentrationen wurden in den Versickerungsbecken am Tuniberg gemessen (0,22-0,71 μg L⁻¹). In allen Oberflächenabflussproben vom Blankenhornsberg (3a, 3b, 3c; siehe Probenahmestellen in Abbildung 4) trat Boscalid auf. Auch die Proben des Beregnungsbrunnens vom 22.07. und 03.09. enthielten den Wirkstoff, jedoch in viel geringeren Konzentrationen (0,002 und 0,02 μg L⁻¹). Dazu ist zu sagen, dass für diese beiden Proben zwar die Ionenverhältnisse und die Retentionszeit innerhalb der zulässigen Grenzen lagen, dagegen das S/N-Verhältnis unter 10 lag. Obwohl damit nicht die definierte Bestimmungsgrenze erreicht wurde, wurde dennoch die Konzentration mit Hilfe der Kalibrierfunktion ermittelt. In keiner der untersuchten Proben des Trinkwasserbrunnens konnte Boscalid nachgewiesen werden.

Wie bereits in Kapitel 4.4 erwähnt, wurden in einigen Proben des Oberflächenabflusses vier weitere Fungizide durch den Abgleich der Massenspektren identifiziert. Die Proben vom 13.08. am Blankenhornsberg enthielten die Wirkstoffe Dimethomorph, Fenhexamid, Iprovalicarb und Pyrimethanil. Auch in den Wasserproben aus den Versickerungsbecken am Tuniberg konnten diese Wirkstoffe teilweise nachgewiesen werden (Oberrimsingen: Dimethomorph, Fenhexamid, Iprovalicarb; Niederrimsingen: Iprovalicarb, Fenhexamid; Golfclub Tuniberg: Iprovalicarb).

5 Diskussion

5.1 Auswahl der Analyten und Identifizierung mittels GC-MS

Die Extraktion und Messung der mit Pestizidpräparaten versetzten Leerprobe bestätigte die vermutete GC-Zugänglichkeit und Extrahierbarkeit der zuvor ausgewählten Pestizide und Standards mit dem vorhandenen Messaufbau. Zwar wurde bei den Messungen zur Ermittlung der Retentionszeiten und Signalverhältnisse der ausgewählten Target- und Referenzionen unter der gewählten Messmethode versucht, von jedem Wirkstoff eine Konzentration von 1 ngµL-¹ in der Wasserprobe einzustellen, da die Präparate jedoch überwiegend adhäsive suspensions- oder wasserdispergierende Konzentrate darstellten und nur kleine Mengen vorhanden waren, war ein volumengenaues Abmessen der Präparate mit den vorhandenen Pipetten nicht realisierbar. Aus diesem Grund konnten den gemessenen Peakflächen der Wirkstoffe (mit Ausnahme von Boscalid) keine Konzentrationen zugeordnet werden. Soll in Zukunft die Quantifizierung auf weitere Analyten ausgeweitet werden, sind analytische Standards (Reinsubstanzen) notwendig.

Da sich die PAK Acenaphthen-d10, Phenanthren-d10 und Chrysen-d10 in der Anzahl der anellierten Benzolringe unterscheiden, weisen diese verschiedene molare Massen und voneinander abweichende Siedepunkte auf, mit der Folge, dass mehrere Elutionsbereiche abgedeckt werden können. Gewöhnlich wird für einen Analyten immer der interne Standard zur Quantifizierung herangezogen, welchem diesem am ähnlichsten ist. In der Regel wird der interne Standard verwendet, welcher eine vergleichbare Retentionszeit wie der jeweilige Analyt besitzt. Wie im Chromatogramm in Abbildung 13 erkennbar, eluiert keiner der untersuchten Analyten zwischen Acenaphten-d10 und Phenanthren-d10, da es sich bei den in dieser Arbeit untersuchten Pestiziden allesamt um überwiegend hochsiedende Stoffe handelt. Da lediglich für Boscalid quantitative Aussagen getroffen werden sollten, wurden in der Arbeit von den PAK lediglich Chrysen-d10 als Standard herangezogen. Generell ist der Einsatz multipler Standards bei Pestizid-Multimethoden jedoch sinnvoll, da Pestizide häufig eine weite Spanne an chemisch-physikalischen Eigenschaften umfassen, die mit einem Standard nicht ausreichend abgedeckt werden können.

Alle Analyten, mit Ausnahme von Proquinazid und Triphenylphosphat, eluierten unter den gewählten GC-Parametern basisliniengetrennt. Da die ausgewählten Referenz- und Targetionen von Proquinazid und Triphenylphosphat jedoch nicht als Fragmentionen im Massenspektrum des jeweils anderen Analyten auftauchen, war eine Trennung der Peaks für eine Identifikation und Quantifizierung nicht essentiell.

5.2 Prüfung der GC-MS-Performance

Für eine Shimadzu-Beispielanwendung zur Analytik von 66 Pestiziden (0,005 ng μL⁻¹) im SIM-Modus mit identischem GC-MS-Gerät, vergleichbarer Kapillarsäule (Rtx[®]-5MS; 30 m × 0.25 mm x 0.25 μm) und Liner (Restek Sky Liner, Splitless Single Taper Gooseneck) sowie ähnlichen Injektions- (2μL; Splitlos; 250 kPa) und MS-Parametern, jedoch abweichendem Trägergas (H₂), betrug die relative Standardabweichung bei 5 Wiederholungen im Mittel 5,3%, wobei für keinen Analyten der RSD über 10% lag (Shimadzu Corporation, 2013b). Verglichen dazu wirken die in dieser Arbeit erreichten Reproduzierbarkeiten für TPP, Chrysen-d10 und Boscalid ungewöhnlich hoch.

Die Auswertung von Totalionenstrom-Peakflächen der Substanzen eines Grob-Testgemisches (Grob and Grob, 1981, 1978), das zur Überprüfung der Säulenperformance zu Beginn der Arbeit eingesetzt wurde, zeigte eine deutlich bessere Wiederholbarkeit von Peakflächen bei fünf Injektionen (1,0-3,0 %RSD), wenngleich die Messungen zu diesem frühen Zeitpunkt noch mit einem Straight Inlet Liner mit 1:50 Split und einer initialen Ofentemperatur von 40°C durchgeführt wurden. Eine exakte Auflistung der verwendeten Methode und der Messergebnisse finden sich in Kapitel 12 im Anhang. Dazu ist anzumerken, dass die im Grob-Testgemisch enthaltenen Substanzen deutlich früher eluieren als Chrysen-d10, TPP und Boscalid. Die Substanz des Testgemisches, welche als letztes die Säule verließ, ist Methyllaurat, welcher auf der eingesetzten Kapillarsäule einen vergleichbaren berechneten linearen Retentionsindex wie Acenaphthen besitzt. Da Acenaphthen-d10 in der erarbeiteten Pestizidmethode ähnlich geringe relative Standardabweichungen von 2,9-4,7% aufwies (vgl. Tabelle 3), scheint die Reproduzierbarkeit stark von der Retentionszeit beeinflusst zu sein.

Da die Peakflächen leider erst gegen Ende der Arbeit ausgewertet wurden, konnte die Testflüssigkeit nicht erneut mit der finalen SIM-Methode gemessen werden. Um prüfen zu können, ob die Substanzen des Testgemisches auch mit der Pestizidmethoden ähnliche niedrige relative Standardabweichungen der Peakflächen aufweisen, sollten daher die Konzentrationen der Substanzen des Testgemisches durch Zugabe von Dichlormethan auf ebenfalls ca. 1 ng µL⁻¹ verdünnt und anschließend mit den Methodenparametern der erarbeiteten SIM-Methode gemessen werden.

Eine Ursache für die schlechte Reproduzierbarkeit könnten Schwankungen in der Probenaufbringung durch den Injektor darstellen. Dabei konnte beobachtet werden, dass der Stempel der Injektionsspritze nicht immer vollständig durch den Autoinjektor heruntergefahren wurde (sichtbarer Spalt von ca. 0,5 mm), selbst wenn dieser kurz zuvor neu zurückgesetzt wurde. Dieses Verhalten fiel zu Beginn der Arbeit nicht auf und sollte weiter verfolgt werden.

Da bei einem Injektionsvolumen von 1 µL nur 10% des maximalen Spritzenvolumens genutzt wurden und dies die untere vom Hersteller empfohlene Grenze darstellt, ist es denkbar dass, durch den Einbau einer Spritze mit geringerem Gesamtvolumen die Schwankungen minimiert werden können, da der Hub des Stempels verlängert wird.

Die durchweg hohen Korrelationskoeffizienten zwischen den Datenreihen von Boscalid und TPP bzw. von Boscalid und Chrysen-d10 verdeutlichen einen hohen linearen Zusammenhang zwischen den Peakflächen. Dies bedeutet, dass Boscalid, TPP und Chrysen-d10 auf sehr ähnlicher Weise Schwankungen unterliegen. Wurden die Peakflächen von Boscalid mit den Peakflächen von Triphenylphosphat normalisiert, reduzierte sich die relative Standardabweichung von 10,8% und 18.4% auf Werte zwischen 2,9% und 4,6%. Wurde Chrysend10 zur Normalisierung der Peakflächen von Boscalid herangezogen, verringerten sich diese um ein vergleichbares Maß auf Werte zwischen 3,6% und 5,0%. Beide Substanzen sind demnach gut dazu geeignet, Schwankungen, welche der GC-MS-Analyse innewohnen, über den Ansatz der internen Kalibrierung zu korrigieren. Generell sollten vor einer Messung nach längerer Standzeit des Analysegerätes mindestens eine Probe injiziert werden und das Ergebnis verworfen werden, da dadurch eine Equilibrierung des GC-MS erreicht wird, mit der Folge, dass die Reproduzierbarkeiten verbessert werden.

5.3 Kalibrierung zur quantitativen Analyse

Die durchgeführten linearen Regressionen offenbarten eine erkennbare Nicht-Linearität des Zusammenhangs zwischen dem Signal bzw. Signalverhältnis und der Analytkonzentration. Betrachtet man die Quotienten aus den Signalverhältnisse zu den jeweils entsprechenden Konzentrationen, ist ein praktisch kontinuierlicher Anstieg des Quotienten mit zunehmender Analytkonzentration in der Kalibrierlösung zu erkennen. Dabei konnte mit TPP als Standard zur internen Kalibrierung sehr ähnliche Ergebnisse erzielt werden als mit Chrysen-d10.

Möglicherweise sollte der Kalibrierbereich deutlich enger gewählt werden, bei gleicher Anzahl an Kalibrierpunkten. So geben Kouzayha et al. (2012) mit einer vergleichbaren GC-MS-Methode für Boscalid einen Bereich von 0,05-0,5 ng μL⁻¹ an, in der, bei Anwendung einer linearen Regression, ein Bestimmtheitsmaß von 0,999 erreicht wurde. In der Arbeit von Lagunas-Allué et al. (2012), die verschiedene Fungizide in Maische und Wein mittels GC-MS untersuchten, wird für Boscalid ein linearer Bereich von 0,003-0,112 ng μL⁻¹ angegeben. Der in dieser Arbeit verwendete Kalibrierbereich erstreckt sich dagegen über vier Zehnerpotenzen und ist damit vergleichsweise weit gefasst. Dies liegt insbesondere daran, dass die in Wasserproben potentiell zu erwartenden Boscalidkonzentrationen zunächst lediglich aus der Literatur abgeleitet werden konnten und zudem aufgrund der Verschiedenheit der Proben (Oberflächenabfluss - Grundwasser) eine größere Spannweite abgedeckt werden musste, was durch die in den Umweltproben gemessenen Boscalid-Konzentrationen bestätigt wurde (vgl. Kapitel 4.6).

Aufgrund des besseren Bestimmtheitsmaßes wurde für die Quantifizierung die aus einer quadratischen Regression abgeleitete Kalibrierfunktion mit TPP als internem Standard verwendet, wenngleich dies nicht ideal ist. Sollen in Zukunft Proben untersucht werden, in denen Boscalid in stark unterschiedlichen Konzentrationen enthalten ist, wäre es beispielsweise sinnvoller, zwei separate lineare Kalibrationen für unterschiedliche Konzentrationsbereiche

anzufertigen. Sollten die Konzentrationen oberhalb des linearen Bereiches des Detektors liegen, ist es zudem sinnvoll die Probe bzw. die Kalibierlösung zu verdünnen.

5.4 Vergleich der Aufnahmemodi

Die beobachtete höhere Sensitivität und Spezifität der FASST-Methode ist womöglich auf die verbesserte chromatographische Auftrennung zurückzuführen, welche durch das langsamere Aufheizen des Säulenofens erreicht wurde.

Insbesondere dann, wenn die Peaks aufgrund geringer Konzentrationen nur schwach aus dem Rauschen des Totalionenstrom-Chromatogramms (TIC) heraustraten, bat die Kombination aus Scan und SIM den Vorteil, dass durch die SIM-Einzelspuren die untersuchten Substanzen "sichtbar" gemacht werden konnten und anschließend nach Subtraktion der Hintergrundspektren in der näheren Umgebung der Peaks positive Datenbankabgleiche erzielt wurden (>70% Übereinstimmung mit Referenzspektrum). Als Beispiel hierfür ist in Abbildung 32 die FASST-Messung einer Probe des Trinkwasserbrunnens dargestellt: Im TIC (schwarze Kurve) ist der Peak von Metrafenon nicht erkennbar, wohingegen im SIM dessen Target- und Referenzionen (farbige Kurven) deutlich hervortreten.

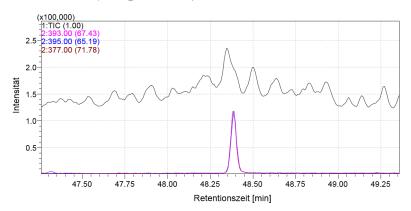


Abbildung 32: Gemessenes TIC und Chromatogramme der SIM-Ionen von Metrafenon einer analysierten Probe des Trinkwasserbrunnens am Blankenhornsberg.

Zwar ließe sich an dieser Stelle argumentieren, dass bereits bei Erfüllung der definierten Identifikationskriterien im SIM-Modus das Vorhandensein des Analyten in der Probe als gesichert gilt, jedoch kann ein positiver Datenbankabgleich zusätzliche Sicherheit liefern. Dazu ist zu sagen, dass Analyten über einen Datenbankabgleich praktisch nur in den Proben aus Oberflächenabfluss identifiziert werden konnten. Aufgrund der weitaus geringeren Analytkonzentrationen konnten lediglich für zwei Proben des Beregnungsbrunnens und für eine Probe des Trinkwasserbrunnens einige Analyten über die Datenbanken nachgewiesen werden.

Der FASST-Modus bietet zudem den Vorteil, dass Probenbestandteile erfasst werden können, welche im traditionellen SIM-Modus ausgeblendet werden. So konnten in einigen der Umweltproben durch den Abgleich der Vollspektren mit den Spektrendatenbanken vier weitere Fungizide identifiziert werden, welche nicht Bestandteil der Analyse waren. Da für diese

Stoffe nicht deren Retentionszeiten bekannt waren, kann von keiner gesicherten Identifizierung ausgegangen werden. Dennoch gilt es als wahrscheinlich, dass es sich bei den Peaks tatsächlich um die genannten Substanzen handelt. Zum einen sind Dimethomorph, Fenhexamid, Iprovalicarb und Pyrimethanil aktuell in Deutschland zugelassene Wirkstoffe, die auch im Weinbau Verwendung finden, zum anderen passen die gemessenen Retentionszeiten mit den berechneten linearen Retentionsindices überein, die mit einer ähnlichen GC-Methode aufgenommen wurden (SLB-5MS; 30 m × 0.25 mm x 0.25 µm; Ofenprogramm: 50°C auf 350°C bei 3°C min⁻¹; Fluss: Helium, 35 cm s⁻¹) (Mondello, 2011). Für Iprovalicarb und Dimethomorph wird die Vermutung zudem dahingehend unterstützt, dass beide Substanzen als Gemisch zweier Diastereomere vorliegen (European Food Safety Authority, 2011; USEPA, 1998). Da Diastereomere sich in der Regel in ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften unterscheiden, sind sie chromatographisch trennbar und weisen daher unterschiedliche Retentionszeiten auf. So besitzt beispielsweise das cis-Isomer von Dimethomorph einen Dampfdruck von 1.0 x 10⁻⁶ Pa bei 25°C, während der Dampfdruck des Isomers in der trans-Anordnung mit 9.7 x 10⁻⁷ Pa leicht geringer ist (USEPA, 1998). Tatsächlich konnten für Iprovalicarb und Dimethomorph beide Isomere in den Proben identifiziert werden, welche jeweils kurz nacheinander eluierten (Abbildung 33).

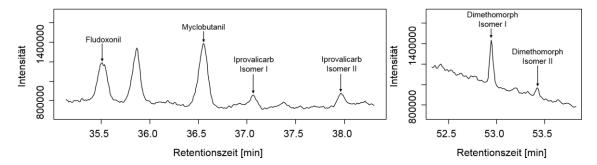


Abbildung 33: Peaks der beiden Diastereomere von Iprovalicarb und Dimethomorph im Totalionenstrom-Chromatogramm.

Die Bewertung der Sensitivität und Spezifität verschiedener GC-MS-Methoden für Analyten nahe der Nachweisgrenze anhand von Umweltproben ist nicht ideal, da die tatsächliche Probenzusammensetzung nicht bekannt ist. Für zukünftige Untersuchungen bezüglich der Messsensitivität und –spezifität unterschiedlicher Aufnahmemodi oder im Zuge einer Methodenvalidierung, sollten Leerproben unterschiedlicher Komplexität mit bekannten Konzentrationen eines oder mehrerer Analyten versetzt und mit Methoden untersucht werden, welche sich zudem lediglich im Aufnahmemodus unterscheiden. Bei der Methodenentwicklung sollten generell immer nur einzelne Parameter auf einmal variiert werden, da sonst Ursache-Wirkungsbeziehungen praktisch nicht erkennbar sind.

5.5 Festphasenextraktion

5.5.1 Versuche zur Überprüfung des Einflusses der Probenmatrix auf die Analyse

Die in Kapitel 4.5 durchgeführten Versuche offenbarten alle eine Verstärkung des Detektorsignals der Analyten (Boscalid, TPP, Chrysen-d10) sobald diese zusammen mit extrahierten Wassermatrices im GC-MS gemessen wurden.

Vergleicht man die relativen Signale in Abbildung 23 mit denen in Abbildung 24, so scheint es keine Rolle zu spielen, ob die Analyten vor oder nach der Extraktion der Probe hinzugegeben wurden. Es scheint jedoch ein Zusammenhang zu geben zwischen dem Ausmaß der Signalerhöhung und a) der Menge (dem Volumen) der extrahierten Probe und b) der Komplexität der extrahierten Probe: Ein Liter an Reinstwasser erzeugte gegenüber einem halben Liter ein ca. 20% größeres relatives Signal und das gleiche Volumen einer komplexeren Probe aus einem Oberflächengewässer offenbarte mit mittleren relativen Signalen von 160% (Chrysen-d10), 247% (TPP) und 274% (Boscalid) die größte Signalerhöhung gegenüber der identischen Analytmenge, die direkt verdampft und ins Injektionslösungsmittel transferiert wurde.

In ihrer Arbeit über das Vorkommen von Fungiziden in Flüssen der USA stellten Battaglin et al. (2011) für mehrere mittels GC-MS gemessene Analyten ebenfalls starke positive Bias bei den berechneten Wiedererhalten von Pestiziden in gespikten Proben aus Flusswasser und "reagent water" fest. Als "reagent water" wird in den USA Wasser bezeichnet, welches definierte quantifizierende Spezifikationen zur Beschreibung der Reinheit erfüllt, wobei die Spezifikationen der Standardisierungsorganisation ASTM International am gebräuchlichsten sind. Zwar wird von den Autoren nicht der genaue Typus des "reagent water" angegeben, jedoch handelt es sich dabei im Allgemeinen um Wasser mit geringer elektrischer Leitfähigkeit bzw. hohem spezifischen elektrischen Widerstand sowie geringem TOC-Gehalt, und ist vergleichbar mit dem in dieser Arbeit verwendeten Reinstwasser. Die berechneten Wiedererhalte der im Feld gepikten Flusswasserproben (Konzentration von 0,1 µg L⁻¹ je Pestizid) wiesen ausgeprägte und zudem variable Bias auf: Für Azoxystrobin lag der Median der Bias-Werte der Proben bei 268%, für Boscalid bei 310% und für Pyraclostrobin bei sogar 399%. Die Autoren gingen davon aus, dass die wahre Konzentration für diese Fungizide zwischen 2-5 Mal kleiner war als der gemessene Wert. Da der Bias der Flusswasserproben größer war als der für das "reagent water", wurde die Ursache in der Probenmatrix gesehen.

Das Phänomen der Matrix-induzierten Verstärkung des chromatographischen Signals (engl.: *matrix induced chromatographic response enhancement*) ist bereits seit einigen Jahren bekannt. Das Phänomen äußert sich darin, dass eine definierte Analyt-Menge in einer komplexen Matrix ein größeres Detektorsignal hervorruft, als die identische Konzentration in Proben geringer Komplexität. Werden Kalibrierstandards in purem Lösungsmittel angesetzt, führt dies daher zu einer Überschätzung der Konzentration in Umweltproben mit komplexen Matrices (Anastassiades et al., 2003b; Hajšlová et al., 1998; Mastovská et al., 2005; Poole, 2007).

Eine mögliche Erklärung des Phänomens lieferten erstmals Erney et al. (1993), welche Organophosphat-Pestizide in Milch und Milchfett untersuchten. Ihre Vermutung bestand darin, dass Matrixkomponenten den Analyten vor thermischen Beanspruchung und Adsorption schützen und dadurch größere Mengen des Analyten den Detektor erreichen können. Die heute allgemein akzeptierte Erklärung besteht darin, dass Matrixkomponenten aktive Stellen im Gaschromatographen (überwiegend freie Silanol-Gruppen und Metallionen in Liner und Kapillarsäule) maskieren, wodurch die Interaktionsmöglichkeit mit dem Analyten vermindert wird, was wiederum zu einem geringeren Verlust anfälliger Analyten durch Adsorption und Degradation an den aktiven Stellen und damit einen verbesserten Transfer der Analyten zum Detektor ermöglicht. Ein thermolabiler oder zur Adsorption neigender Analyt, welcher dagegen in reinem Lösungsmittel bei hohen Temperaturen injiziert wird, interagiert unter Umständen stark mit aktiven Stellen im Gaschromatographen, was zu einem unvollständigen Transfer des Analyten zum Detektor führt und eine veränderte, breite oder tailende Peakform im Chromatogramm hervorruft (Rahman et al., 2013). In Abbildung 34 ist der Effekt der Matrix-induzierten Signalverstärkung schematisch dargestellt.

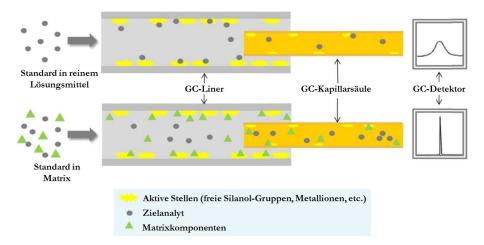


Abbildung 34: Schematische Darstellung des Effektes der Matrix-induzierten Signalverstärkung (verändert nach Rahman et al. (2013)).

Viele Stoffe sind nicht von Matrix-induzierter Signalverstärkung betroffen, entweder weil sie thermisch stabil sind, ein limitiertes Potential zur Adsorption besitzen, oder da für diese Stoffe die Matrix keine ausreichende Schutzfunktion ausüben kann. Bei der Interaktion von Substanzen mit aktiven Stellen nimmt die Ausbildung von Wasserstoffbrücken eine Schlüsselrolle ein. Tatsächlich gehören Pestizide mit Hydroxy- (–OH) und Aminogruppen (R–NH–), Imidazole und Benzimidazole (–N=), Harnstoffderivate (–NH–CO–NH–) und einige Phosphorsäureester (–P=O) zu den anfälligsten Analyten (Anastassiades et al., 2003b; Poole, 2007).

Für Boscalid, ein Carbonsäureamid, ist davon auszugehen, dass es aufgrund seiner Molekülstruktur ebenfalls empfänglich für Adsorption und Degradation an aktiven Stellen ist. Carbonsäureamide sind Verbindungen, in der die namensgebende Carbonsäureamid-Gruppe (CO–NH₂, CO–NHR, CO–NR₂) vorkommt (Mortimer et al., 2014). Sie sind in der Lage

Wasserstoffbrücken auszubilden, weshalb diese verhältnismäßig hohe Siede- und Schmelzpunkte besitzen. Battaglin et al. (2010) führten die hohen gemessenen positiven Bias der Wiedererhalte für Azoxystrobin, Pyraclostrobin und Boscalid ebenfalls auf die chemischen Strukturen dieser Stoffe zurück. Die Peaks von Boscalid wiesen bei den in dieser Arbeit durchgeführten Messungen stets ein leichtes Tailing auf, was laut Hübschmann (2008) und Mastovská et al. (2005) auch durch die Interaktion des Analyten mit aktiven Stellen hervorgerufen werden kann. Im Chromatogramm einer Beispielanwendung der ZebronTM ZB-5MS-Kapillarsäule zur Trennung halogenierter Pestizide (Phenomenex Inc., 2013), wie sie auch in dieser Arbeit eingesetzt wurde, ist dieses Tailing für Boscalid ebenfalls sichtbar, obwohl es sich in diesem Fall sogar um eine On-Column-Injektion handelt, wodurch thermolabile Stoffe vor hohen Temperaturen und verstärkter Degradation während der Injektion geschützt werden können (siehe Kapitel 9.3).

Da bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen ebenfalls beobachtet werden konnte, dass das Ausmaß der Signalerhöhung von der Menge und Komplexität der Probenmatrix abhing und in der Literatur für die GC-MS-Analyse von Boscalid in Wasserproben bereits starke matrix-induzierende Effekt beobachtet werden konnten, ist es denkbar, dass die gemessenen erhöhten Signale von Boscalid, TPP und Chrysen-d10 ebenfalls durch die Probenmatrix hervorgerufen wurden.

Wie in Kapitel 3.4 beschrieben, wurde vor der Extraktion jeder Umweltprobe 100 µL der Spiking-Substanz von TPP hinzugegeben. Nutzt man die Peakfläche von TPP als Indikator für das Maß der Matrix-induzierten Signalverstärkung, müsste ein Zusammenhang zwischen der Komplexität der Matrix der untersuchten Probe und der Größe der gemessenen Peakfläche von TPP bestehen. Betrachtet man die Mediane der Peakflächen in Abbildung 35, so lässt sich tatsächlich eine gewisse Abfolge zu erkennen: Während der Median der Proben aus dem Oberflächenabfluss am größtes ist, liegt der Median aus dem Trinkwasserbrunnen am tiefsten. Die Proben des Beregnungsbrunnens nehmen dagegen eine intermediäre Position ein.

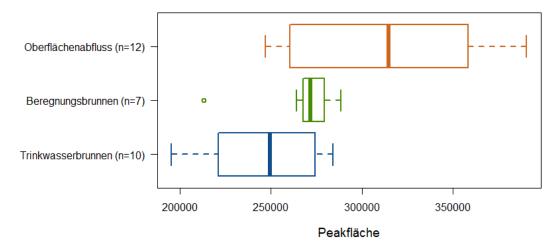


Abbildung 35: Boxplots zur visuellen Darstellung der Lage und Streuung der Peakflächen (FASST-Methode) von TPP in Proben unterschiedlicher Herkunft.

Es ist anzunehmen, dass der Gehalt an gelöster organischer Substanz für die Proben aus Oberflächenabfluss gegenüber den Proben des Tiefbrunnens deutlich größer war. Abbildung 36 zeigt den ersten der drei Filtrationsschritte einer Probe aus einem der Versickerungsbecken am Tuniberg. Die Probe weist eine sichtliche Färbung auf, was durch den hohen Gehalt an Huminstoffen, insbesondere diejenigen mit höheren Molmassen, verursacht wird. Häufige funktionale Gruppen der Huminstoffe sind die Hydroxygruppe am Benzolring (Phenol) sowie die Carboxylgruppe, die deren sauren Charakter bedingen (Kretzschmar, 2010). Da diese Gruppen in einem weiten pH-Bereich zumindest teilweise dissoziiert vorliegen, sind Huminstoffe polar und besitzen möglicherweise ein hohes Potential zur Matrix-induzierten Signalverstärkung. Trotz der in Abbildung 24 erkennbaren Tendenz muss darauf hingewiesen werden, dass, bedingt durch die geringe Anzahl an Messungen, Schwankungen in der GC-MS-Analyse (vgl. 5.2) und in der Extraktion sowie aufgrund unterschiedlicher Festphasenkartuschen, die Verwendung von TPP als Zeiger für die Signalverstärkung in einer Probe jedoch eingeschränkt ist.



Abbildung 36: Erster Filtrationsschritt einer Wasserprobe aus einem Versickerungsbecken am Tuniberg. Die gelblich-braune Färbung wird durch chromophore Strukturen der Huminstoffe verursacht.

In diesem Kontext ist es verwunderlich, dass selbst für das extrahierte Reinstwasser deutlich erhöhte Signale gemessen werden konnten, obwohl für dieses Proben keine komplexen Matrices zu erwarten sind (geringe Anzahl freibeweglicher Ionen, geringer DOC-Gehalt). Denkbar wäre, dass, bei nicht ausreichender Trocknung der SPE-Kartusche, mit dem Elutionsmittel (Acetonitril) auch Wasser aus den Poren des Sorbens mitgeschleppt wurde, wodurch Ionen in das Eluat gelangten. Möglicherweise reicht eine Trocknung der Kartuschen mit Stickstoff von 30 Minuten nicht aus. Bei Elution mit Ethylacetat wäre es alternativ möglich, die SPE-Kartusche mit einer Trocknungskartusche aus wasserfreiem Natriumsulfat zu kombinieren, um sämtliches Wasser aus dem Eluat zu entfernen.

Um mögliche Kontaminationen der Proben durch die Extraktion überprüfen zu können, wurden für einige der in Kapitel 4.5.1 beschriebenen Versuchsreihen komplette Massenspektren aufgenommen und die Chromatogramme der extrahierten Proben mit denen der nicht-

extrahierten verglichen. Vier Peaks, die ähnliche Intensitäten wie die Standards aufwiesen, erschienen nur in den extrahierten Proben. Der Datenbankabgleich ergab folgende Substanzen: Benzoesäure (t_R=6,072 min), Palmitinsäure (t_R=16,732 min), Stearinsäure (t_R=18,862 min) und Squalen (t_R=24,695 min). Ob es sich tatsächlich um diese Stoffe handelt, woher diese stammen und ob diese das Analysesignal beeinflussen können, konnte zu diesem Zeitpunkt nicht gesagt werden. Da die Glaswaren im Labor für eine Vielzahl von weiterer Anwendungen verwendet werden, wäre es zu empfehlen, im Labor eine Möglichkeit zum Tempern zu schaffen, um mögliche Kontaminationsquellen zu vermindern (Sandstrom et al., 2001).

5.5.2 Maßnahmen zur Kompensierung von Matrix-induzierter Signalverstärkung

Da davon ausgegangen werden konnte, dass auch für die Umweltproben die Messergebnisse massiv durch Matrixeffekte beeinflusst werden, wurde versucht, den Einfluss der Matrix in den Proben zu reduzieren bzw. zu kompensieren. An dieser Stelle sei auf Kapitel 9 im Anhang verwiesen, in dem weiterführende Informationen über diverse in der Praxis angewandte Maßnahmen gegeben wird.

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde der von Shimadzu standardmäßig mitgelieferte Liner durch einen Sky®-Liner ersetzt. Dieser ist mit einer Polymerbeschichtung ausgestattet, welche die Glasoberfläche abschirmt und so Störungen durch Wechselwirkungen der Substanzen mit aktiven Zentren vermindert. Um die Interaktionsmöglichkeit der Analytmoleküle mit aktiven Zentren im Liner oder am Säulenanfang zu reduzieren, wurde zudem eine Hochdruckinjektion mit 345 kPa angewandt.

Die durch die Versuche in Kapitel 4.5.2 gewonnen Erkenntnisse mit Sorbit verstärkten den Verdacht, dass sowohl TPP als auch Boscalid empfänglich für aktive Stellen im Analysesystem sind. Die Zugabe von Sorbit in einer Konzentration von 150 ngµL⁻¹ führte zwar zu einer größeren Schwankung der Peakflächen bei mehrfacher Injektion der Probe, jedoch auch zu einer beinahe doppelt so großen Peakfläche für beide Analyten. Die größere Varianz der Peakflächen bei den Aliquoten mit Sorbit-Zusatz ist möglicherweise dadurch zu erklären, dass, bedingt durch Schwankungen der Probenaufbringung, auch Sorbit in schwankenden Mengen in den Liner/auf die Säule gelangt, was zu einer unterschiedlich stark ausgeprägten Signalverstärkung führt.

Trotz dieser vielversprechenden Wirkung von Sorbit in der Probe, konnte durch dessen Zugabe zu extrahierten und nicht-extrahierten Proben nicht der erwünschte ausgleichende Effekt erreicht werden (Abbildung 30). Anders als bei dem in Kapitel 4.5.2 beschriebenen Vorversuch (Abbildung 28 und Abbildung 29) führte Sorbit zu keinem ähnlich starken Anstieg der Peakfläche der Analyten. Es ist möglich, dass bei den späteren Versuchen der Sorbit nicht vollständig im Injektionslösungsmittel gelöst war. In den Vorversuchen wurde dagegen die finale Lösung, vor der Anfertigung der Aliquote, im Ultraschallbecken gemischt.

Da Ethylacetat als Injektionslösungsmittel gewählt wurde, ist die maximale Konzentration und Löslichkeit von Sorbit in der Probe eingeschränkt. Die alkoholischen Hydroxygruppen des Zuckeralkohols verleihen dem Molekül polare Eigenschaften, was die gewünschte starke Interaktion mit aktiven Stellen im Gaschromatographen verursacht, jedoch bedingt die hohe Polarität im Gegenzug, dass größere Mengen an Sorbit nur in einem polaren Lösungsmittel vollständig lösbar sind. Zur Anfertigung der AP-Mixtur, die jeder Probe und Kalibrierlösung zugesetzt wird, wird Sorbit aus diesem Grund in einem Acetonitril:Wasser-Gemisch gelöst und als Injektionslösungsmittel ebenfalls Acetonitril verwendet (Anastassiades et al., 2003a, 2003b; González-Rodríguez et al., 2009; Kirchner et al., 2008; Li et al., 2012; Mastovská et al., 2005; Wang et al., 2011). Dem mittelpolaren Ethylacetat konnten dagegen keine größeren Volumina der angefertigten AP-Mixtur zugesetzt werden.

Dennoch wurde davon abgesehen, Acetonitril als Injektionslösungsmittel zu verwenden: Zum einen erzeugt es bei der Verdampfung eine großvolumige Gaswolke, zum anderen verhindert es, bedingt durch dessen hohen Polarität, die "Befeuchtung" der unpolaren stationären Phase, was sich negativ auf die Peakformen auswirkt (weitere Informationen dazu in Kapitel 8). Da zudem das in der AP-Mixtur enthaltene Wasser durch die Bildung aktiver Stellen und durch Hydrolyse der stationären Phase bei hohen Temperaturen einen negativen Einfluss auf die Lebensdauer der Kapillarsäule haben kann, wird daher von Kirchner et al. (2008) und González-Rodríguez et al. (2009) der Einsatz von PTV-Injektoren empfohlen, wodurch der Großteil des Wassers und des Acetonitrils aus der Probe entfernt wird und damit nicht auf die Säule gelangt.

Da die Matrix-induzierte Signalerhöhung nicht mit dem AP-Ansatz ausreichend korrigiert werden konnte, wurde zur Messung der Umweltproben von der Verwendung von Sorbit letztendlich abgesehen.

Um starke positive Bias in den Wiedererhalten und damit eine Überschätzung der Messergebnisse von Boscalid in den Umweltproben zu vermeiden, habe ich mich dazu entschlossen, die Messergebnisse über das Signal des Standards TPP, welcher jeder Probe vor der Extraktion hinzugegeben wurde, zu korrigieren. Ursprünglich war geplant, TPP lediglich zur Kontrolle der Methodenperformance einzusetzen und die Messwerte von Boscalid mit Hilfe des kurz vor der Injektion hinzugegeben Standards Chrysen-d10 zu korrigieren, um Schwankungen des GC-MS auszugleichen. In Kapitel 4.2 konnte gezeigt werden, dass TPP sehr gut dazu geeignet ist, Schwankungen, die dem GC-MS innewohnen, für den Stoff Boscalid zu korrigieren. Die in Kapitel 4.5.1 durchgeführten Versuche deuten darauf hin, dass TPP eine leicht schwächere Signalverstärkung gegenüber Boscalid erfährt. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass das Ausmaß der Signalverstärkung auch von dem Konzentrationsverhältnis der Matrix und des Analyten abhängig sein kann (Poole, 2007). So konnte beispielsweise für Extrakte aus Tomaten, Paprika und Gurken für geringere Pestizidkonzentrationen nahe der Bestimmungsgrenze (<0,02 mg kg⁻¹) eine stärker ausgeprägte Signalverstärkung gemessen werden, als für höhere Konzentrationen (0,21-2 mg kg⁻¹) in der gleichen Matrix (Menkissoglu-

Spiroudi and Fotopoulou, 2004). Wird eine fixe Konzentration des Standards (in diesem Fall 1 ng µL⁻¹) verwendet, muss geprüft werden, ob die Matrix-induzierte Signalverstärkung über den verwendeten Konzentrationsbereich konstant ist.

Mit dem bisherigen Erkenntnisstand kann keine Aussage getroffen werden, wie ähnlich sich der Stoff zu Boscalid in der Probenvorbereitung verhält. Um die Eignung von TPP als Standard für die Boscalid-Analyse in Wasserproben ausreichend bewerten zu können, sind daher weitere Versuche notwendig. Generell bessere Ergebnisse sind zu erwarten, wenn, anstelle von TPP, die Isotopen-gelabelte Variante von Boscalid als Standard eingesetzt wird. Weitere zu testende Methoden wären die Anwendung einer sogenannten Matrix-angepassten Kalibrierung (engl.: matrix-matched calibration) oder die Korrektur über das Standardadditionsverfahren (vgl. Kapitel 9.5). Aufgrund der beschränkten Zeit war es nicht möglich, die Eignung dieser Maßnahmen für die explizite Anwendung zu testen. Ferner konnte keine weitere Optimierung und ausreichende Validierung der Methode durchgeführt werden. Aus diesem Grund sind die Messergebnisse der Umweltproben, die im nachfolgenden Kapitel diskutiert werden, mit einer größeren Unsicherheit behaftet.

5.6 Anwendung der SPE-GC-MS-Methode auf Umweltproben

Die Messergebnisse in Kapitel 4.6 zeigen, dass mit Ausnahme von Indoxacarb jedes der am Blankenhornsberg im Jahr 2014 ausgebrachten Pestizide in mindesteins einer der untersuchten Wasserproben nachgewiesen werden konnte. Ursachen für den fehlenden Nachweis von Indoxacarb sind möglicherweise auf dessen chemischen Eigenschaften zurückzuführen. Verglichen mit den anderen untersuchten Wirkstoffen besitzt Indoxacarb mit 527,8 g mol⁻¹ eine große molare Masse, ein Grund weshalb das Molekül mit 2,5E-08 Pa (25°C) einen relativ kleinen Dampfdruck aufweist (siehe Tabelle 11 im Anhang). Vermutlich befindet sich daher bei der verwendeten Injektionstemperatur nur ein geringer Anteil der Moleküle in der Gasphase, weshalb ein geringeres Messsignal erzeugt wird ist. Mit einem K_{OC} von 6450 (PPDB, 2014) ist ferner davon auszugehen, dass Indoxacarb eine sehr geringe Mobilität aufweist. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Bereswill et al. (2012), die Indoxacarb überwiegend in der Sedimentphase und kaum in der wässrigen Phase von Flüssen in der Pfalz nachweisen konnten.

Da die in dieser Arbeit untersuchten Umweltproben in einigen Fällen viel partikuläre organische Substanz enthielten, wurden die Proben filtriert, um eine gute Perkolation durch die SPE-Kartusche zu gewährleisten und um eine Verunreinigung des GC-MS zu verhindern. Eine vorangehende Filtration ist insbesondere bei Anwendung einer Festphasenextraktion notwendig. Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass diese Technik für die Extraktion von Analyten, die in hohem Maße an suspendierten Feststoffe adsorbiert sind, nicht optimal ist (Robles-Molina et al., 2013). Adsorbierte Pestizide wurden durch den Filtrationsschritt abgetrennt und durchliefen somit nicht die Analyse. Damit schließt die erarbeitete SPE-GC-MS-Methode lediglich Pestizide in der gelösten Phase ein.

Eine weitere Beobachtung war, dass in den Proben aus dem Oberflächenabfluss die meisten aktiven Substanzen identifiziert werden konnten und die Stoffe in höheren Konzentrationen als im Grundwasser auftraten. In den Proben aus den Versickerungsbecken am Tuniberg, welche durch die Straßenentwässerung gespeist werden, wurden die höchsten Pestizidkonzentrationen gemessen. Mit Werten von 0,22 µg L-1 (Niederrimsingen) bis 0,71 µg L-1 (Oberrimsingen) liegen die ermittelten mittleren Boscalidkonzentrationen über dem in der EG-Trinkwasserrichtlinie 98/83/EG festgelegten Grenzwert von 0,1 µg L-1 für einzelnen Pestizide (EC, 1998). In den Proben aus Oberflächenabfluss am Blankenhornsberg betrug die Boscalidkonzentration im Mittel zwischen 0,06 und 0,63 µgL⁻¹. Diese teilweise hohen Konzentrationen verdeutlichen die Relevanz des Exports von Pestizid-beladenem Wasser über das Wegenetz. Untersuchungen an der SLFA Neustadt ergaben, dass in den untersuchten Weinbauregionen etwa 80-90% aller Einträge von Pestiziden in Gewässer aus Pestizidablagerungen auf befestigten Wirtschaftswegen und Hofabläufe sowie Kläranlagen stammten. Gegenüber Ackerflächen sind Rebflächen in der Regel sehr kleinparzellig strukturiert und werden daher durch viele Wirtschaftswege erschlossen. Bei der Pestizidapplikation entstehen auf diesen Wegen durch Abtrift, Abtropfen, Leckagen und Mitbespritzung der Wege leicht mobilisierbare Wirkstoffdepots, die durch Niederschläge mobilisiert werden (Altmayer et al., 2003). Aufgrund des linienhaften Transportes auf Wegen und Erosionsrillen ist die Kontaktfläche zwischen dem abfließenden Wasser und dem Boden sowie der Vegetation zudem verringert, wodurch das Potential zur Retention von Pestiziden vermindert wird (Bereswill et al., 2012).

Die meisten der in dieser Arbeit untersuchten Fungizide verfügen sowohl überwiegend über eine protektive als auch eine kurative Wirkung. Boscalid stellt dagegen ein Fungizid mit rein protektiver Wirkung dar. Für ein rein protektiv wirkendes Fungizid besteht das Problem, dass es keinen Schutz für neue Blattmasse bieten kann, die sich erst nach der Applikation entwickelt. Dieser Nachteil kann nur durch Nachbehandlung innerhalb der Wachstumsphase ausgeglichen werden (Henningsen, 2003). Da Fungizide häufig eine protektive Wirkung besitzen, werden sie, vergleichen mit anderen Pestiziden, zwar in geringeren Mengen jedoch häufiger in Saison ausgebracht. Durch die größere Applikationsrate wird die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass aquatische Ökosysteme geringen Konzentrationen chronisch ausgesetzt werden (Reilly et al., 2012). Da nur für Boscalid die Konzentration ermittelt werden konnte, können keine Aussagen bezüglich des potentiellen negativen Einflusses der Fungizide auf Nichtzielorganismen gegeben werden. Werden sämtliche in einem Untersuchungsgebiet eingesetzten Pestizide in ein Screening aufgenommen, bietet dies die Möglichkeit zur Bewertung der Toxizität einer komplexen Mixtur von mehreren Wirkstoff in einem Wasserkörper, z.B. nach dem Ansatz der Toxizitäts-Einheiten (engl.: Toxic Units (TU)), wie er unter anderem in Bereswill et al. (2012), Elsaesser et al. (2011) und Schäfer et al. (2007) verwendet wird.

Interessant ist, dass Boscalid in den beiden Oberflächenabflussproben vom 22.07. nachgewiesen werden konnte, obwohl die Applikation auf der Rebfläche "Doktorgarten Mitte" erst

am 06.08. erfolgte. Da Boscalid seit mehreren Jahren nicht mehr am Blankenhornsberg eingesetzt wurde, ist es denkbar, dass der Wirkstoff von nahegelegenen Anbauflächen durch Drift, atmosphärischer Deposition nach Verflüchtigung oder infolge äolischer Deposition erodierter Pestizid-beladener Bodenpartikel auf die Rebflächen des Staatsweingutes verfrachtet wurde. Diese Umverteilung nach der Applikation ist auch für Boscalid durchaus realistisch. So konnten in der Studie von Vialle et al. (2013) eine Vielzahl von Pestiziden, darunter auch Boscalid, im Abfluss einer Hausdaches in einer ländlich geprägten Gegend in Südwestfrankreich nachgewiesen werden. Selbst in einer untersuchten Wasserprobe, die am Kopf des Berges oberhalb der Reben genommen wurde (siehe Probenahmestelle 3a in Abbildung 4), konnten mit Ausnahme von Quinoxyfen, Tebucunazol, Proquinazid und Indoxacarb alle untersuchten Substanzen identifiziert werden. Die primäre Quelle hierfür stellt wahrscheinlich die Abschwemmung von den Hofflächen des Betriebes dar, wo die Pestizide unter anderem angemischt und in die Spritzgeräte gefüllt werden.

Obwohl die Wirkstoffe Dimethomorph, Fenhexamid, Iprovalicarb und Pyrimethanil im Jahr 2014 nicht zur Bekämpfung von Schadorganismen am Blankenhornsberg appliziert wurden, konnten diese in allen Oberflächenabflussproben an der Probenahmestelle 3c (vgl. Abbildung 4) nachgewiesen werden. Dies ist durch einen Botrytisversuch des Staatsweingutes am Osthang des Blankenhornsbergs zu erklären, in dem tatsächlich all diese Fungizide eingesetzt wurden (Fischer, 2014b).

In einigen Proben des Beregnungsbrunnens konnte Boscalid zwar identifiziert, jedoch aufgrund des geringen S/N-Verhältnisses nicht sicher quantifiziert werden. Setzt man ein S/N-Verhältnis von 3 als Nachweisgrenze an, so liegt diese bei etwa bei 0,002 µg L⁻¹ und im Falle der Bestimmungsgrenze (S/N=10) bei 0,02-0,05 µg L⁻¹. Aufgrund der ausgeprägten Matrixeffekte sind diese Zahlenwerte jedoch noch mit einer großen Unsicherheit behaftet. Für ihre SPE-GC-MS-Methode geben Kouzayha et al. (2012) für Boscalid ebenfalls eine Bestimmungsgrenze von 0,02 µg L⁻¹ an.

Die niedrigeren Pestizid-Konzentrationen in den Grundwasserproben sind auf mehrere Ursachen zurückzuführen. Während des Flusses in der ungesättigten und gesättigten Zone finden natürliche physikalische, chemische und biologische Prozesse statt, wodurch infolge von Sorption und Degradation die Pestizidfracht reduziert wird (vgl. 2.1.1). Wie in Kapitel 3.1.3 angesprochen, deutete der Vergleich der Wasserspiegelganglinie mit den Niederschlagsereignissen in einer hydrogeologischen und hydrochemischen Untersuchung des Trinkwasserbrunnens am Blankenhornsberg darauf hin, dass kein direkter Einfluss des Niederschlagswassers erfolgt. Die mächtigen Lössablagerungen im Einzugsgebiet des Brunnens sind befähigt große Mengen an Wasser zu speichern, weshalb davon auszugehen ist, dass die Grundwasserneubildung in Form einer kontinuierlichen Zusickerung erfolgt (Reinold and Michel, 2013). Aus diesem Grund kann dies zu einer gewissen Verdünnung des stärker kontaminierten Wassers in der Vegetationsperiode mit dem Niederschlagswasser im Winterhalbjahr füh-

ren. Des Weiteren ist davon auszugehen, dass die Lössablagerungen ein Potential zur Sorption von Pestiziden besitzen. Die Sorption von Schadstoffen im Untergrund verursacht eine Verzögerung des Stofftransports (Retardation). Interessant wäre es deshalb, das Grundwasser zu einem späteren Zeitpunkt im Winterhalbjahr auf Pestizide hin zu untersuchen. Einen Zusammenhang zwischen dem Potential zur Auswaschung bzw. zur Adsorption eines Wirkstoffes und dessen Vorkommen in den Grundwasserproben ist nicht erkennbar, was jedoch auch aufgrund des geringen Probenumfangs geschuldet sein kann. So wurden beispielsweise Fluopyram und Proquinazid jeweils in nur einer Grundwasserprobe detektiert, obwohl diese eine deutlich voneinander abweichende Auswaschbarkeit ins Grundwasser besitzen (vgl. GUS-Indices in Tabelle 12 im Anhang).

Zu zwei Probenahmeterminen konnte Boscalid im Wasser des Beregnungsbrunnens nachgewiesen werden, wenngleich das Kriterium zur Quantifizierung (S/N-Verhältnis > 10) jeweils nicht erreicht wurde. Mit einem K_{foc} von 772 ist Boscalid zwar nur gering mobil, aufgrund dessen Persistenz (DT₅₀ im Feld: 118 Tage) besteht jedoch ein gewisses Potential zur Auswaschung ins Grundwasser (vgl. Tabelle 12). In der Studie von Reilly et al. (2012), die Oberflächengewässer und Grundwässer in drei intensiv landwirtschaftlich genutzten Gebieten der USA auf Pestizidrückstände untersuchten, stellte Boscalid das in Proben aus Oberflächengewässer am häufigsten identifizierte Pestizid dar (in 72% der Proben), wobei die höchste Konzentration bei 0,11μg L⁻¹ und der Median bei 0,0225 μg L⁻¹ lag. Boscalid wurde jedoch auch in 62% der Proben aus 13 "flachen" Grundwasserbrunnen detektiert, mit Konzentrationen bis über 2μg L⁻¹, wodurch bestätigt wird, dass Boscalid durchaus auch Grundwasserköper kontaminieren kann.

Da die Proben erst gegen Ende der Arbeit extrahiert und analysiert werden konnten, betrug die Zeitspanne von der Probenahme bis zur Extraktion und Messung zwischen 56 und 123 Tage. Sandstrom et al. (2001) ermittelten für die untersuchten Pestizide in Reinstwasser eine maximale Haltezeit (engl.: holding time) von 4 Tagen (bei 4°C) und für extrahierte Analyten auf einer getrockneten SPE-Kartusche von 7 Tagen (bei 25°C). Dabei handelt es sich um die maximale Zeitspanne in der keine nennenswerte Degradation erfolgt. Das Vorgehen zur Bestimmung der Haltezeit eines Pestizid und die exakte Definition können der Arbeit von Sandstrom et al. (2001) entnommen werden. Es ist anzunehmen, dass sich die maximale Haltezeit in komplexen Umweltproben von der in Reinstwasser zudem unterscheidet. Aufgrund der langen Lagerungszeit der Wasserproben in dieser Arbeit ist davon auszugehen, dass die Analyten mehr oder weniger stark durch chemische oder mikrobielle Prozesse verändert wurden. Daher kann angenommen werden, dass die Konzentrationen zum Zeitpunkt der Probenahme höher waren als die gemessen Konzentrationen. Typische Kennwerte für die Degradation von den untersuchten Pestiziden sind in Tabelle 12 hinterlegt. Können Wasserproben nicht direkt nach der Extraktion gemessen werden, sollte das Eluat bzw. die fertig aufgearbeitete Probe bis zur Analyse bei -20°C gelagert werden. Neben der maximalen Lagerungszeit von Wasserproben, sollten auch die Langzeitstabilität von Standards und anderer in der Analyse verwendeter Substanzen ermittelt werden.

6 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die erarbeitete SPE-GC-MS-Methode ermöglichte die Identifizierung von 11 Fungiziden (Boscalid, Cyprodinil, Fludioxonil, Fluopicolid, Fluopyram, Metrafenon, Myclobutanil, Penconazol, Proquinazid, Quinoxyfen, Tebucunazol) sowie dem Insektizid Indoxacarb in Wasserproben. Dabei handelt es sich um rezent und praktisch global eingesetzte Wirkstoffe zur Bekämpfung diverser Schadorganismen in unterschiedlichen landwirtschaftlichen Sektoren. Da nur für das Fungizid Boscalid der analytische Standard vorhanden war, konnten nur für diesen quantitative Aussagen getroffen werden.

Der gewählte Geräteaufbau zur Probenvorbereitung (Filtration, Festphasenextraktion, Konzentrierung und Lösungsmitteltransfer) offenbarte eine gute Praktikabilität und ermöglichte die einfache Überführung der untersuchten Wirkstoffe in eine für die Analyse geeignete Form. Bei der anschließenden GC-MS-Analyse zeigte sich jedoch für Boscalid und den als Standard eingesetzten Stoff Triphenylphosphat eine starke Beeinflussung des Messsignals durch die Probenmatrix, welche sich in einer Überschätzung der gemessenen Analytkonzentration äußerte. Als Ursache hierfür wurde das Phänomen der Matrix-induzierten Signalverstärkung gesehen, welche eine große Relevanz bei der gaschromatographischen Analyse von Pestiziden in unterschiedlichen Matrices besitzen kann.

Um eine Verfälschung der Messergebnisse durch Matrixeffekte zu vermeiden, wurden Veränderungen an den Injektionsparametern vorgenommen und der Einsatz von Sorbit als Analyte Protectant getestet. Da dadurch leider nicht der erwünschte nivellierende Effekt und damit eine Korrektur der überhöhten Signale erzeugt werden konnte, wurde entschieden, die Messergebnisse von Boscalid über die Intensität des vor der Extraktion einer jeder Probe zugesetzten Standards TPP zu korrigieren, wodurch Schwankungen in der Analyse sowie Matrixeffekte in einem gewissen Umfang ausgeglichen werden konnten. TPP zeigte eine gute Eignung als Interner Standard zur Korrektur von Schwankungen, welche der GC-MS-Analyse innewohnen, jedoch deuteten die Ergebnisse weiterer Versuche darauf hin, dass dieser eine geringere Matrix-induzierte Signalverstärkung als Boscalid erfährt. Aufgrund der beschränkten Zeit konnte die Eignung von TPP als Surrogate Standard zur Korrektur von Matrixeffekten und Schwankungen in der gesamten Analyse nicht ausreichend überprüft werden. Daher sind die Ergebnisse der analysierten Umweltproben mit einer größeren Unsicherheit behaftet. Die entwickelte Methode kann somit nicht den Anspruch auf Vollständigkeit erheben.

Mit Ausnahme von Indoxacarb konnten alle der in die Methode mit aufgenommenen Pestizide in den untersuchten Umweltproben vom Blankenhornsberg und Tuniberg identifiziert werden. Mit Hilfe der FASST-Methode wurden für einige Proben zudem vier weitere Fungizide durch einen Abgleich der Massenspektren mit Massenspektrenbibliotheken gefunden. In den Proben aus Oberflächenabfluss, zu denen auch die Proben der Versickerungsbecken

gezählt wurden, konnten gegenüber den Grundwasserproben eine größere Anzahl an Pestiziden nachgewiesen werden, wobei die Pestizidkonzentrationen zudem weitaus höher lagen. Diese Beobachtung spiegelt die große Rolle des Exports von Pestiziden aus einem weinbaulich genutzten Gebiet durch das Wegenetz wider. Die geringere Abundanz der Wirkstoffe in den Proben des Beregnungs- sowie Trinkwasserbrunnens ist überwiegend auf Abbau- und Sorptionsprozesse aktiver Substanzen beim Fluss durch die gesättigte und ungesättigte Zone zurückzuführen. Für die Proben aus den Versickerungsbecken lag die ermittelte Boscalidkonzentration zwischen 0,22 und 0,71 µg L⁻¹ und damit über dem Pestizidgrenzwert der EG-Trinkwasserrichtlinie. In dem beprobten Oberflächenabfluss am Blankenhornsberg betrug die Boscalidkonzentration zwischen 0,06 und 0,63 µg L⁻¹. Da lediglich Boscalid quantifiziert wurde, konnten keine Aussagen über die toxikologische Relevanz der gemessenen Pestizide in der Umwelt getroffen werden. In einigen Proben des Beregnungsbrunnens konnte Boscalid zwar identifiziert, jedoch aufgrund des geringen S/N-Verhältnisses nicht sicher quantifiziert werden.

In zukünftigen Versuchen sollte die Eignung weiterer Methoden zur Korrektur der Messergebnisse, wie der Einsatz Isotopen-gelabelter Pestizidstandards, die Verwendung Matrix-angepasster Kalibrierstandards oder das Standardadditionsverfahren getestet werden. In Kapitel 9.5 werden weiterführende Informationen über diese Techniken gegeben. Ferner war es nicht mehr möglich, weitere Optimierungs- und Validierungsschritte der GC-MS-Analyse und der Probenaufbereitung durchzuführen. Dazu gehören beispielsweise Versuche zur Ermittlung des Lösungsmittels (oder der Lösungsmittelkombination), das am besten zur Elution der Analyten vom gewählten Sorbens geeignet ist, die Findung einer effizienteren Maßnahme zur Trocknung des Sorbens (z.B. durch zusätzliche Zentrifugation der Kartuschen) oder die Bestimmung des Durchbruchvolumens beim Ladevorgang in der SPE.

Um sichere qualitative und quantitative Aussagen treffen zu können, muss die Methode im Zuge weiterer Versuche validiert werden. Die Validierung analytischer Methoden ist die Grundvoraussetzung für die Qualität und Vergleichbarkeit von Analyseergebnissen, in dem bestätigt wird, dass alle Voraussetzungen für eine beabsichtigte Anwendung erfüllt sind. Für die Methodenvalidierung in der Umweltanalytik gebräuchliche Validierungsparameter, wie die Spezifität, Linearität, Genauigkeit, Präzision sowie die Nachweis- und Bestimmungsgrenze, sind beispielsweise in der von der "International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use" (ICH) herausgebrachten Leitlinie zur Validierung analytischer Verfahren aufgeführt (ICH, 2005). Für die praktische Erhebung der Validierungsparameter sei auf die Richtlinie zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen der "Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh)" verwiesen (Peters et al., 2009).

Ferner sollte für die Methode eine Unsicherheitsanalyse durchgeführt werden. Diese dient dazu, die Qualität und damit die Brauchbarkeit der Resultate quantitativer chemischer Analysen aufzuzeigen, indem ein Maß für das Vertrauen, dass in das Ergebnis gesetzt werden

kann, quantifiziert und zusammen mit dem Messergebnis angegeben wird. In der aktuellen Version des "International Vocabulary of Basic and General Terms in Metrology" ist Unsicherheit definiert als "Parameter, welcher mit dem Ergebnis einer Messung assoziiert wird, der die Streuung der Werte charakterisiert, die treffenderweise der Messgröße zugeordnet werden können" (ISO, 1993). An dieser Stelle sei auf den EURACHEM/CITAC-Leitfaden hingewiesen, in dem beschrieben wird, wie die Konzepte der ISO-Richtlinie im chemischen Messwesen angewendet werden können (EURACHEM/CITAC, 2012). Er wird für eine breite Spanne an Anwendungen eingesetzt, wie der Qualitätskontrolle und Qualitätssicherung in Produktionsstätten, beim Test auf Einhaltung gesetzlich vorgeschriebener Kriterien oder in Forschung und Entwicklung. Auch in zahlreichen wissenschaftlichen Publikation zur Unsicherheitsanalyse bei der Quantifizierung von Pestizidkonzentrationen in verschiedenen Medien fand er bereits in unterschiedlichen Fassungen Verwendung (z.B.: Aslan-Sungur et al., 2014; Carneiro et al., 2013; Christensen et al., 2003; da Silva Sousa et al., 2013; Kanrar et al., 2010; Lagunas-Allué et al., 2010; Madureira et al., 2012; Passeport et al., 2010).

Trotz weiterer Versuche und Maßnahmen, die zur Optimierung und Validierung notwendig sind, bestätigen die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse, die Eignung der SPE-GC-MS-Methode zur Analytik von diversen Pestiziden in Wasserproben. Die Fähigkeit zur Identifizierung und Quantifizierung von Pestiziden ermöglicht es, das Verhalten dieser Stoffe in der Umwelt zu beschreiben und erlaubt die Entwicklung und Implementierung von Maßnahmen und Mitigationsstrategien, welche zur Reduktion der Pestizidfracht in aquatischen Systemen beitragen können.

7 Literaturangaben

- Abb, M.J., 2011. Entwicklung und Anwendung neuer analytischer Methoden zur Bestimmung von Innenraumchemikalien im Hausstaub. Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Abeysena, I., Darrington, R., 2013. Understanding Concentration and Evaporation Technology: Part 1: Basic Principles of Commonly Used Evaporation Techniques | American Laboratory [WWW Document]. URL http://www.americanlaboratory.com/914-Application-Notes/130187-Understanding-Concentration-and-Evaporation-Technology-Part-1-Basic-Principles-of-Commonly-Used-Evaporation-Techniques/ (accessed 6.15.14).
- Agrarmeteorologie BW, 2014. Station Blankenhornsberg (WBI) (270 m) [WWW Document]. URL http://www.wetter-bw.de/ (accessed 10.9.14).
- Altmayer, B., Twertek, M., Paetzold, M., Laronche, J.S., 2003. Einträge von Pflanzenschutzmitteln in Gewässer Situation im Weinbau und Gegenmaßnahmen (Pesticide loss to surface waters situation in the vine growing regions and measures to avoid pesticide input). Gesunde Pflanz. 55, 161–168.
- Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Stajnbaher, D., Schenck, F.J., 2003a. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. J. AOAC Int. 86, 412–31.
- Anastassiades, M., Maštovská, K., Lehotay, S.J., 2003b. Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides. J. Chromatogr. A 1015, 163–184. doi:10.1016/S0021-9673(03)01208-1
- Arora, K., Mickelson, S.K., Helmers, M.J., Baker, J.L., 2010. Review of Pesticide Retention Processes Occurring in Buffer Strips Receiving Agricultural Runoff. JAWRA J. Am. Water Resour. Assoc. 46. doi:10.1111/j.1752-1688.2010.00438.x
- Aslan-Sungur, G., Gaga, E.O., Yenisoy-Karakaş, S., 2014. Estimation of measurement uncertainty of polychlorinated biphenyls, polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in the atmosphere using gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-electron capture detector. J. Chromatogr. A 1325, 40–8. doi:10.1016/j.chroma.2013.12.005
- Badach, H., Nazimek, T., Kamińska, I.A., 2007. Pesticide content in drinking water samples collected from orchard areas in central Poland. Ann. Agric. Environ. Med. 14, 109–14.
- Barrek, S., Cren-Olivé, C., Wiest, L., Baudot, R., Arnaudguilhem, C., Grenier-Loustalot, M.-F., 2009. Multi-residue analysis and ultra-trace quantification of 36 priority substances from the European Water Framework Directive by GC-MS and LC-FLD-MS/MS in surface waters. Talanta 79, 712–22. doi:10.1016/j.talanta.2009.04.058
- Battaglin, W. a., Sandstrom, M.W., Kuivila, K.M., Kolpin, D.W., Meyer, M.T., 2010. Occurrence of Azoxystrobin, Propiconazole, and Selected Other Fungicides in US

- Streams, 2005–2006. Water, Air, Soil Pollut. 218, 307–322. doi:10.1007/s11270-010-0643-2
- Bereswill, R., Golla, B., Streloke, M., Schulz, R., 2012. Entry and toxicity of organic pesticides and copper in vineyard streams: Erosion rills jeopardise the efficiency of riparian buffer strips. Agric. Ecosyst. Environ. 146, 81–92. doi:10.1016/j.agee.2011.10.010
- Bielicka-Daszkiewicz, K., Voelkel, A., 2009. Theoretical and experimental methods of determination of the breakthrough volume of SPE sorbents. Talanta 80, 614–21. doi:10.1016/j.talanta.2009.07.037
- Bonansea, R.I., Amé, M.V., Wunderlin, D.A., 2013. Determination of priority pesticides in water samples combining SPE and SPME coupled to GC-MS. A case study: Suquía River basin (Argentina). Chemosphere 90, 1860–9. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.10.007
- Börner, H., Schlüter, K., Aumann, J., 2009. Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, Springer-Lehrbuch. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. doi:10.1007/978-3-540-49068-5
- BVL, 2011. PSM-Zulassungsbericht (Registration Report) Topas 033590-00/00. Bundesamt für Verbraucherschutz und Leb. Dienststelle Braunschweig.
- BVL, 2013. Absatz an Pflanzenschutzmitteln in der Bundesrepublik Deutschland Ergebnisse der Meldungen gemäß § 64 Pflanzenschutzgesetz für die Jahre 2004-2013. Bundesamt für Verbraucherschutz und Leb. Dienstsitz Braunschweig.
- Carneiro, R.P., Oliveira, F.A.S., Madureira, F.D., Silva, G., de Souza, W.R., Lopes, R.P., 2013. Development and method validation for determination of 128 pesticides in bananas by modified QuEChERS and UHPLC–MS/MS analysis. Food Control 33, 413–423. doi:10.1016/j.foodcont.2013.02.027
- Carter, A., 2000. Herbicide movement in soils: principles, pathways and processes. Weed Res. 40, 113–122. doi:10.1046/j.1365-3180.2000.00157.x
- Chen, L., Zhang, S., 2010. Dissipation and residues of boscalid in strawberries and soils. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 84, 301–4. doi:10.1007/s00128-010-9934-y
- Christensen, H.B., Poulsen, M.E., Pedersen, M., 2003. Estimation of the uncertainty in a multiresidue method for the determination of pesticide residues in fruit and vegetables. Food Addit. Contam. 20, 764–75. doi:10.1080/0265203031000138259
- Clifton, M.S., Wargo, J.P., Weathers, W.S., Colón, M., Bennett, D.H., Tulve, N.S., 2013. Quantitative analysis of organophosphate and pyrethroid insecticides, pyrethroid transformation products, polybrominated diphenyl ethers and bisphenol A in residential surface wipe samples. J. Chromatogr. A 1273, 1–11. doi:10.1016/j.chroma.2012.11.003
- Coquery, M., Morin, A., Bécue, A., Lepot, B., 2005. Priority substances of the European Water Framework Directive: analytical challenges in monitoring water quality. TrAC Trends Anal. Chem. 24, 117–127. doi:10.1016/j.trac.2004.11.004

Cserháti, T., Szogyi, M., 2012. Chromatographic determination of fungicides in biological and environmental matrices. New achievements. Biomed. Chromatogr. 26, 276–82. doi:10.1002/bmc.1656

- Cuadros-Rodríguez, L., Bagur-González, M.G., Sánchez-Viñas, M., González-Casado, A., Gómez-Sáez, A.M., 2007. Principles of analytical calibration/quantification for the separation sciences. J. Chromatogr. A 1158, 33–46. doi:10.1016/j.chroma.2007.03.030
- Čuš, F., Česnik, H.B., Bolta, Š.V., Gregorčič, A., 2010. Pesticide residues in grapes and during vinification process. Food Control 21, 1512–1518. doi:10.1016/j.foodcont.2010.04.024
- CVUA, 2013. Use of Analyte Protectants in GC-Analysis a way to improve peak shape and reduce decomposition of susceptible compounds. EU Ref. Lab. Pestic. Requiring Single Residue Methods, CVUA Stuttgart.
- D'Archivio, A.A., Fanelli, M., Mazzeo, P., Ruggieri, F., 2007. Comparison of different sorbents for multiresidue solid-phase extraction of 16 pesticides from groundwater coupled with high-performance liquid chromatography. Talanta 71, 25–30. doi:10.1016/j.talanta.2006.03.016
- Da Silva Sousa, J., de Castro, R.C., de Albuquerque Andrade, G., Lima, C.G., Lima, L.K., Milhome, M.A.L., do Nascimento, R.F., 2013. Evaluation of an analytical methodology using QuEChERS and GC-SQ/MS for the investigation of the level of pesticide residues in Brazilian melons. Food Chem. 141, 2675–81. doi:10.1016/j.foodchem.2013.05.027
- De Gerónimo, E., Aparicio, V.C., Bárbaro, S., Portocarrero, R., Jaime, S., Costa, J.L., 2014. Presence of pesticides in surface water from four sub-basins in Argentina. Chemosphere 107, 423–31. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.01.039
- EC, 1998. Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption. Off. J. Eur. Communities L 330, 32–54.
- EC, 2000. DIRECTIVE 2000/60/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. Off. J. Eur. Communities L 327, 1–72.
- Elsaesser, D., Blankenberg, A.-G.B., Geist, A., Mæhlum, T., Schulz, R., 2011. Assessing the influence of vegetation on reduction of pesticide concentration in experimental surface flow constructed wetlands: Application of the toxic units approach. Ecol. Eng. 37, 955–962. doi:10.1016/j.ecoleng.2011.02.003
- English, C., 2013. Column Bleed & Septa Bleed Same Old Thing! [WWW Document]. Chromablography Restek Corp. URL http://blog.restek.com/?p=10706 (accessed 9.30.14).
- Erickson, M.D., Giguere, M.T., Whitaker, D.A., 1981. Comparison of Common Solvent Evaporation Techniques in Organic Analysis. Anal. Lett. 14, 841–857. doi:10.1080/00032718108081439

Erney, D.R., Gillespie, A.M., Gilvydis, D.M., Poole, C.F., 1993. Explanation of the matrix-induced chromatographic response enhancement of organophosphorus pesticides during open tubular column gas chromatography with splitless or hot on-column injection and flame photometric detection. J. Chromatogr. A 638, 57–63. doi:10.1016/0021-9673(93)85007-T

- EURACHEM/CITAC, 2012. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, 3rd ed. Laboratory of the Government Chemist, London, UK.
- EURL, 2014. EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides Online Database [WWW Document]. URL http://www.eurl-pesticides-datapool.eu/ (accessed 8.8.14).
- European Food Safety Authority, 2011. Review of the existing maximum residue levels (MRLs) for iprovalicarb according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005. EFSA J. 9, 30 pp. doi:10.2903/j.efsa.2011.2338
- FAO, 2009. FAO Specifications and Evaluations for Agricultural Pesticides CYPRODINIL. Food Agric. Organ. United Nations.
- Felton, M.J., 2004. Evaporators. Am. Chem. Soc. Today's Chem. Work May, 47–50.
- Filho, A.M., dos Santos, F.N., Pereira, P. a D.P., 2010. Development, validation and application of a method based on DI-SPME and GC-MS for determination of pesticides of different chemical groups in surface and groundwater samples. Microchem. J. 96, 139–145. doi:10.1016/j.microc.2010.02.018
- Fischer, F., 2014a. Persönliche Mitteilung vom 06.08.2014. Außenbetriebsleiter Staatliches Weinbauinstitut Freiburg.
- Fischer, F., 2014b. Persönliche Mitteilung vom 25.11.2014. Außenbetriebsleiter Staatliches Weinbauinstitut Freiburg.
- Flury, M., 1996. Experimental Evidence of Transport of Pesticides through Field Soils—A Review. J. Environ. Qual. 25, 25. doi:10.2134/jeq1996.00472425002500010005x
- Gey, M.H., 2008. Instrumentelle Analytik und Bioanalytik, Springer-Lehrbuch. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. doi:10.1007/978-3-540-73804-6
- Gimeno, P., Thomas, S., Bousquet, C., Maggio, A.-F., Civade, C., Brenier, C., Bonnet, P.-A., 2014. Identification and quantification of 14 phthalates and 5 non-phthalate plasticizers in PVC medical devices by GC-MS. J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 949-950, 99–108. doi:10.1016/j.jchromb.2013.12.037
- Godula, M., Hajšlová, J., Alterová, K., 1999. Pulsed Splitless Injection and the Extent of Matrix Effects in the Analysis of Pesticides. J. High Resolut. Chromatogr. 22, 395–402. doi:10.1002/(SICI)1521-4168(19990701)22:7<395::AID-JHRC395>3.0.CO;2-O
- Godula, M., Hajšlová, J., Maštouska, K., Křivánková, J., 2001. Optimization and application of the PTV injector for the analysis of pesticide residues. J. Sep. Sci. 24, 355–366. doi:10.1002/1615-9314(20010501)24:5<355::AID-JSSC355>3.0.CO;2-5

González-Rodríguez, R.M., Cancho-Grande, B., Simal-Gándara, J., 2009. Multiresidue determination of 11 new fungicides in grapes and wines by liquid-liquid extraction/clean-up and programmable temperature vaporization injection with analyte protectants/gas chromatography/ion trap mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1216, 6033–42. doi:10.1016/j.chroma.2009.06.046

- Google Earth, 2006. Tuniberg: 47°58'29.67"N, 7°40'45.56"E. Bildaufnahmedatum: 06.09.2006 und 01.01.2009. Abgerufen am: 20.11.2014.
- Google Earth, 2009. Blankenhornsberg: 48° 3'9.01"N, 7°37'23.95"E. Bildaufnahmedatum: 01.01.2009. Abgerufen am: 20.11.2014.
- Gregoire, C., Elsaesser, D., Huguenot, D., Lange, J., Lebeau, T., Merli, A., Mose, R., Passeport, E., Payraudeau, S., Schütz, T., Schulz, R., Tapia-Padilla, G., Tournebize, J., Trevisan, M., Wanko, A., 2008. Mitigation of agricultural nonpoint-source pesticide pollution in artificial wetland ecosystems. Environ. Chem. Lett. 7, 205–231. doi:10.1007/s10311-008-0167-9
- Grob, K. (Ed.), 2001. Split and Splitless Injection for Quantitative Gas Chromatography: Concepts, Processes, Practical Guidelines, Sources of Error, 4th, Compl. ed. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany. doi:10.1002/9783527612871
- Grob, K., Grob, G., 1978. Comprehensive, standardized quality test for glass capillary columns. J. Chromatogr. A 156, 1–20. doi:10.1016/S0021-9673(00)83120-9
- Grob, K., Grob, G., 1981. Testing capillary gas chromatographic columns. J. Chromatogr. A 219, 13–20. doi:10.1016/S0021-9673(00)80568-3
- Guo, L., Macdonald, R.W., 2006. Source and transport of terrigenous organic matter in the upper Yukon River: Evidence from isotope (δ 13 C, Δ 14 C, and δ 15 N) composition of dissolved, colloidal, and particulate phases. Global Biogeochem. Cycles 20, 1–12. doi:10.1029/2005GB002593
- Gustafson, D.I., 1989. Groundwater ubiquity score: A simple method for assessing pesticide leachability. Environ. Toxicol. Chem. 8, 339–357. doi:10.1002/etc.5620080411
- Hajšlová, J., Holadová, K., Kocourek, V., Poustka, J., Godula, M., Cuhra, P., Kempný, M., 1998. Matrix-induced effects: a critical point in the gas chromatographic analysis of pesticide residues. J. Chromatogr. A 800, 283–295. doi:10.1016/S0021-9673(97)01145-X
- Hanafi, A., Garau, V.L., Caboni, P., Sarais, G., Cabras, P., 2010. Minor crops for export: a case study of boscalid, pyraclostrobin, lufenuron and lambda-cyhalothrin residue levels on green beans and spring onions in Egypt. J. Environ. Sci. Health. B. 45, 493–500. doi:10.1080/03601234.2010.493466
- Henningsen, M., 2003. Moderne Fungizide: Pilzbekämpfung in der Landwirtschaft. Chemie unserer Zeit 37, 98–111. doi:10.1002/ciuz.200300283
- Herrero-Hernández, E., Andrades, M.S., Álvarez-Martín, A., Pose-Juan, E., Rodríguez-Cruz, M.S., Sánchez-Martín, M.J., 2013. Occurrence of pesticides and some of their

- degradation products in waters in a Spanish wine region. J. Hydrol. 486, 234–245. doi:10.1016/j.jhydrol.2013.01.025
- Hladik, M.L., Smalling, K.L., Kuivila, K.M., 2008. A multi-residue method for the analysis of pesticides and pesticide degradates in water using HLB solid-phase extraction and gas chromatography-ion trap mass spectrometry. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 80, 139–144. doi:10.1007/s00128-007-9332-2
- Huber, B., 2014. Persönliche Mitteilung vom 23.10.2014. Staatliches Weinbauinstitut Freiburg.
- Hübschmann, H.-J., 2008. Handbook of GC/MS. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany. doi:10.1002/9783527625215
- ICH, 2005. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). Int. Conf. Harmon. Food Drug Adm. USA.
- ISO, 1993. Guide To The Expression Of Uncertainty In Measurement. ISO, Geneva. (ISBN 92-67-10188-9) (Nachgedruckt 1995, neu aufgelegt als ISO Guide 98-3 (2008), auch verfügbar unter: http://www.bipm.org als JCGM 100:2008).
- JKI, 2014. Datenbank über den Pflanzenschutzmitteleinsatz in Deutschland. PAPA-Projekt (Panel Pflanzenschutzmittel-Anwendungen) des Julius Kühn-Institut Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI) [WWW Document]. URL http://papa.jki.bund.de/ (accessed 12.3.14).
- Jordan, T.B., Nichols, D.S., Kerr, N.I., 2009. Selection of SPE cartridge for automated solid-phase extraction of pesticides from water followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Anal. Bioanal. Chem. 394, 2257–66. doi:10.1007/s00216-009-2924-4
- Kanrar, B., Mandal, S., Bhattacharyya, A., 2010. Validation and uncertainty analysis of a multiresidue method for 42 pesticides in made tea, tea infusion and spent leaves using ethyl acetate extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1217, 1926–33. doi:10.1016/j.chroma.2010.01.062
- Kerle, E.A., Jenkins, J.J., Vogue, P.A., 1996. Understanding pesticide persistence and mobility for groundwater and surface water protection. Oregon State Univ. Ext. Serv.
- Kienzler, C., 2014. Persönliche Mitteilung vom 23.10.2014. Landesbetrieb Vermögen und Bau Baden-Württemberg. Amt Freiburg.
- Kirchner, M., Húsková, R., Matisová, E., Mocák, J., 2008. Fast gas chromatography for pesticide residues analysis using analyte protectants. J. Chromatogr. A 1186, 271–80. doi:10.1016/j.chroma.2007.08.089
- Kmellár, B., Abrankó, L., Fodor, P., Lehotay, S.J., 2010. Routine approach to qualitatively screening 300 pesticides and quantification of those frequently detected in fruit and vegetables using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Food Addit. Contam. Part A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess. 27, 1415–30. doi:10.1080/19440049.2010.490791

Kouzayha, A., Al Iskandarani, M., Mokh, S., Rabaa, A.R., Budzinski, H., Jaber, F., 2011. Optimization of a solid-phase extraction method using centrifugation for the determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in water. J. Agric. Food Chem. 59, 7592–600. doi:10.1021/jf200123v

- Kouzayha, A., Rabaa, A.R., Al Iskandarani, M., Beh, D., Budzinski, H., Jaber, F., 2012. Multiresidue Method for Determination of 67 Pesticides in Water Samples Using Solid-Phase Extraction with Centrifugation and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. Am. J. Anal. Chem. 03, 257–265. doi:10.4236/ajac.2012.33034
- Kretzschmar, R., 2010. Kapitel Chemische Eigenschaften und Prozesse, in: Brümmer, G.W., Horn, R., Kandeler, E., Kögel-Knabner, I., Kretzschmar, R., Stahr, K., Wilk, B.-M. (Eds.), Scheffer/Schachtschabel: Lehrbuch Der Bodenkunde. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, p. 570.
- Kromidas, S., Kuss, H.-J. (Eds.), 2008. Chromatogramme richtig integrieren und bewerten. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany. doi:10.1002/9783527622221
- Kuivila, K.M., Foe, C.G., 1995. Concentrations, transport and biological effects of dormant spray pesticides in the San Francisco Estuary, California. Environ. Toxicol. Chem. 14, 1141–1150. doi:10.1002/etc.5620140704
- Lacorte, S., Guiffard, I., Fraisse, D., Barcelo, D., 2000. Broad spectrum analysis of 109 priority compounds listed in the 76/464/CEE Council Directive using solid-phase extraction and GC/EI/MS. Anal. Chem. 72, 1430–40.
- Lagunas-Allué, L., Sanz-Asensio, J., Martínez-Soria, M.T., 2010. Response surface optimization for determination of pesticide residues in grapes using MSPD and GC-MS: assessment of global uncertainty. Anal. Bioanal. Chem. 398, 1509–23. doi:10.1007/s00216-010-4046-4
- Lagunas-Allué, L., Sanz-Asensio, J., Martínez-Soria, M.-T., 2012. Optimization and Validation of a Simple and Fast Method for the Determination of Fungicides in Must and Wine Samples by SPE and GC/MS. J. AOAC Int. 95, 1511–1519. doi:10.5740/jaoacint.11-402
- LGRB-BW, 2014. WMS LGRB-BW Weinbauatlas von Baden-Württemberg [WWW Document]. Landesamt für Geol. Rohstoffe und Bergbau BW. URL http://maps.lgrb-bw.de/ (accessed 10.24.14).
- Li, Y., Chen, X., Fan, C., Pang, G., 2012. Compensation for matrix effects in the gas chromatography-mass spectrometry analysis of 186 pesticides in tea matrices using analyte protectants. J. Chromatogr. A 1266, 131–42. doi:10.1016/j.chroma.2012.10.008
- Lide, D.R., 2005. CRC Handbook of Chemistry and Physics, Internet Version 2005. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Łozowicka, B., Jankowska, M., Rutkowska, E., Kaczyński, P., Hrynko, I., 2012. Comparison of Extraction Techniques by Matrix Solid Phase Dispersion and Liquid-

- Liquid for Screening 150 Pesticides from Soil, and Determination by Gas Chromatography. Polish J. Environ. Stud. 21, 973–992.
- Madureira, F.D., da Silva Oliveira, F.A., de Souza, W.R., Pontelo, A.P., de Oliveira, M.L.G., Silva, G., 2012. A multi-residue method for the determination of 90 pesticides in matrices with a high water content by LC-MS/MS without clean-up. Food Addit. Contam. Part A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess. 29, 665–78. doi:10.1080/19440049.2011.623837
- Maštovská, K., Lehotay, S.J., 2004. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. J. Chromatogr. A 1040, 259–272. doi:10.1016/j.chroma.2004.04.017
- Mastovská, K., Lehotay, S.J., Anastassiades, M., 2005. Combination of analyte protectants to overcome matrix effects in routine GC analysis of pesticide residues in food matrixes. Anal. Chem. 77, 8129–37. doi:10.1021/ac0515576
- McMaster, M.C., 2008. GC/MS, 2nd ed, Materials Research Bulletin. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. doi:10.1002/9780470228357
- Meier, U., 2001. Entwicklungsstadien mono- und dikotyler Pflanzen BBCH Monografie. Biol. Bundesanstalt für L. und Forstwirtschaft.
- Menkissoglu-Spiroudi, U., Fotopoulou, A., 2004. Matrix effect in gas chromatographic determination of insecticides and fungicides in vegetables. Int. J. Environ. Anal. Chem. 84, 15–27. doi:10.1080/03067310310001593684
- Mezcua, M., Martínez-Uroz, M.A., Wylie, P.L., Fernández-Alba, A.R., 2009. Simultaneous screening and target analytical approach by gas chromatography-quadrupole-mass spectrometry for pesticide residues in fruits and vegetables. J. AOAC Int. 92, 1790–806.
- Momplaisir, G.-M., Rosal, C.G., Heithmar, E.M., Varner, K.E., Riddick, L. a., Bradford, D.F., Tallent-Halsell, N.G., 2010. Development of a solid phase extraction method for agricultural pesticides in large-volume water samples. Talanta 81, 1380–6. doi:10.1016/j.talanta.2010.02.038
- Mondello, L., 2011. Pesticides GC-MS Library for GCMS solution. Chromaleont.
- Moreno-González, R., Campillo, J. a., León, V.M., 2013. Influence of an intensive agricultural drainage basin on the seasonal distribution of organic pollutants in seawater from a Mediterranean coastal lagoon (Mar Menor, SE Spain). Mar. Pollut. Bull. 77, 400–11. doi:10.1016/j.marpolbul.2013.09.040
- Morgan, P., 2012. Gas Chromatography Liner Selection Guide. Tech. Note 20551 Thermo Fish. Sci. Runcorn, Cheshire, UK.
- Mortimer, C.E., Müller, U., Beck, J. (Eds.), 2014. Chemie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. doi:10.1055/b-002-94102
- Munitz, M.S., Resnik, S.L., Montti, M.I.T., 2013. Method development and validation for boscalid in blueberries by solid-phase microextraction gas chromatography, and their

- degradation kinetics. Food Chem. 136, 1399–404. doi:10.1016/j.foodchem.2012.09.079
- Muñoz, E., Muñoz, G., Pineda, L., Serrahima, E., Centrich, F., 2012. Multiresidue Method for Pesticide Residue Analysis in Food of Animal and Plant Origin Based on GC or LC and MS or MS/MS. J. AOAC Int. 95, 1777–1796. doi:10.5740/jaoacint.11-036
- Nguyen, T.D., Yun, M.Y., Lee, G.-H., 2009. A multiresidue method for the determination of 118 pesticides in vegetable juice by gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Agric. Food Chem. 57, 10095–101. doi:10.1021/jf902712v
- Pang, G.-F., Fan, C.-L., Liu, Y.-M., Cao, Y.-Z., Zhang, J.-J., Fu, B.-L., Li, X.-M., Li, Z.-Y., Wu, Y.-P., 2006. Multi-residue method for the determination of 450 pesticide residues in honey, fruit juice and wine by double-cartridge solid-phase extraction/gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Food Addit. Contam. 23, 777–810. doi:10.1080/02652030600657997
- Panseri, S., Catalano, A., Giorgi, A., Arioli, F., Procopio, A., Britti, D., Chiesa, L.M., 2014. Occurrence of pesticide residues in Italian honey from different areas in relation to its potential contamination sources. Food Control 38, 150–156. doi:10.1016/j.foodcont.2013.10.024
- Passeport, E., Benoit, P., Bergheaud, V., Coquet, Y., Tournebize, J., 2011. Selected pesticides adsorption and desorption in substrates from artificial wetland and forest buffer. Environ. Toxicol. Chem. 30, 1669–76. doi:10.1002/etc.554
- Passeport, E., Guenne, A., Culhaoglu, T., Moreau, S., Bouyé, J.-M., Tournebize, J., 2010. Design of experiments and detailed uncertainty analysis to develop and validate a solid-phase microextraction/gas chromatography-mass spectrometry method for the simultaneous analysis of 16 pesticides in water. J. Chromatogr. A 1217, 5317–27. doi:10.1016/j.chroma.2010.06.042
- Passeport, E., Tournebize, J., Chaumont, C., Guenne, A., Coquet, Y., 2013. Pesticide contamination interception strategy and removal efficiency in forest buffer and artificial wetland in a tile-drained agricultural watershed. Chemosphere 91, 1289–96. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.02.053
- Peters, F.T., Hartung, M., Herbold, M., Schmitt, G., Daldrup, T., Mußhoff, F., Paul, L.D., Aebi, B., Auwärter, V., Kraemer, T., Skopp, G., 2009. Anhang B. Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen Anforderungen an die Validierung von Analysenmethoden. Toxichem Krimtech 76, 185 208.
- Phenomenex Inc., 2011. SPE Reference Manual & Users Guide.
- Phenomenex Inc., 2013. Halogenated Pesticides Mix # 3 on ZB-5ms. GC Appl. ID No. 17628.
- Poole, C.F., 2007. Matrix-induced response enhancement in pesticide residue analysis by gas chromatography. J. Chromatogr. A 1158, 241–50. doi:10.1016/j.chroma.2007.01.018

Portolés, T., Mol, J.G.J., Sancho, J. V, Hernández, F., 2014. Use of electron ionization and atmospheric pressure chemical ionization in gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry for screening and identification of organic pollutants in waters. J. Chromatogr. A 1339, 145–53. doi:10.1016/j.chroma.2014.03.001

- PPDB, 2014. Pesticide Properties Database developed by the Agriculture & Environment Research Unit (AERU) at the University of Hertfordshire [WWW Document]. URL http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/index.htm (accessed 8.8.14).
- Price, E.K., Prakash, B., Domino, M.M., Pepich, Barry, V., Munch, D.J., 2005. Method 527: Determination of Selected Pesticides and Flame Retardants in Drinking Water By Solid Phase Extraction and Capillary Column Gas Chromatography/ Mass Spectrometry (GC/MS). U.S. Environ. Prot. Agency, Off. Gr. Water Drink. Water, Tech. Support Center, Cincinnati, OH 45268 1–43.
- Przybylski, C., Bonnet, V., 2009. Use of spermine and thiabendazole as analyte protectants to improve direct analysis of 16 carbamates by gas chromatography-mass spectrometry in green vegetable matrices. Anal. Bioanal. Chem. 394, 1147–59. doi:10.1007/s00216-009-2773-1
- Quintana, J., Martí, I., Ventura, F., 2001. Monitoring of pesticides in drinking and related waters in NE Spain with a multiresidue SPE-GC–MS method including an estimation of the uncertainty of the analytical results. J. Chromatogr. A 938, 3–13. doi:10.1016/S0021-9673(01)01168-2
- R Development Core Team, 2008. R: A language and environment for statistical computing.
- Rahman, M.M., Abd El-Aty, a M., Shim, J.-H., 2013. Matrix enhancement effect: a blessing or a curse for gas chromatography?--A review. Anal. Chim. Acta 801, 14–21. doi:10.1016/j.aca.2013.09.005
- Reichenberger, S., Bach, M., Skitschak, A., Frede, H.-G., 2007. Mitigation strategies to reduce pesticide inputs into ground- and surface water and their effectiveness; a review. Sci. Total Environ. 384, 1–35. doi:10.1016/j.scitotenv.2007.04.046
- Reilly, T.J., Smalling, K.L., Orlando, J.L., Kuivila, K.M., 2012. Occurrence of boscalid and other selected fungicides in surface water and groundwater in three targeted use areas in the United States. Chemosphere 89, 228–34. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.04.023
- Reinold, M., Michel, W., 2013. Hydrogeologische und hydrochemische Untersuchungen Brunnen Blankenhornsberg Versuchs- und Lehrgut Blankenhornsberg Ihringen. Bericht Hydro-Data Radolfszell im Auftrag des Amtes für Vermögen und Bau BW.
- Restek, 2002. Operating Hints for Using Split/Splitless Injectors Injectors. Tech. Guid. 36.
- Robles-Molina, J., Gilbert-López, B., García-Reyes, J.F., Molina-Díaz, A., 2013.

 Comparative evaluation of liquid-liquid extraction, solid-phase extraction and solid-phase microextraction for the gas chromatography-mass spectrometry determination of multiclass priority organic contaminants in wastewater. Talanta 117, 382–91. doi:10.1016/j.talanta.2013.09.040

Ruiz-Gil, L., Romero-González, R., Garrido Frenich, A., Martínez Vidal, J.L., 2008. Determination of pesticides in water samples by solid phase extraction and gas chromatography tandem mass spectrometry. J. Sep. Sci. 31, 151–61. doi:10.1002/jssc.200700299

- Rummel, M., 2012. The Partition Coefficient (log P), Distribution Coefficient (log D) and Acid Dissociation Constant (pKa): Knowing Your Compound for Solid-Phase Extraction Method Development in Reversed-Phase Mode. The Column 8, 2–7.
- Sabik, H., Jeannot, R., Rondeau, B., 2000. Multiresidue methods using solid-phase extraction techniques for monitoring priority pesticides, including triazines and degradation products, in ground and surface waters. J. Chromatogr. A 885, 217–36.
- Sakamoto, Y., Nakagawa, K., Miyagawa, H., 2010. Analysis of Phthalate Esters in Children's Toys Using GC-MS. GC/MS Tech. Rep. No.4 Shimadzu Corp.
- Sánchez-Brunete, C., Albero, B., Martín, G., Tadeo, J.L., 2005. Determination of pesticide residues by GC-MS using analyte protectants to counteract the matrix effect. Anal. Sci. 21, 1291–6. doi:10.2116/analsci.21.1291
- SANCO, 2010. Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed. Doc. No. SANCO/10684/2009.
- Sandstrom, M.W., Stroppel, M.E., Foreman, W.T., Schroeder, M.P., 2001. Methods of Analysis by the U.S. Geological Survey National Water Quality Laboratory—Determination of Moderate-Use Pesticides and Selected Degradates in Water by C-18 Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Water-Resources Investig. Rep. 01-4098 70.
- Schäfer, R.B., Caquet, T., Siimes, K., Mueller, R., Lagadic, L., Liess, M., 2007. Effects of pesticides on community structure and ecosystem functions in agricultural streams of three biogeographical regions in Europe. Sci. Total Environ. 382, 272–85. doi:10.1016/j.scitotenv.2007.04.040
- Schenck, F.J., Lehotay, S.J., 2000. Does further clean-up reduce the matrix enhancement effect in gas chromatographic analysis of pesticide residues in food? J. Chromatogr. A 868, 51–61. doi:10.1016/S0021-9673(99)01137-1
- Schmidt, T., 2011. Chromatographische und elektrophoretische Trennverfahren Kapitel 4: Gaschromatographie (GC). Vor. Anal. Chemie, ETH Zürich 93–116.
- Schummer, C., Mothiron, E., Appenzeller, B.M.R., Rizet, A.-L., Wennig, R., Millet, M., 2010. Temporal variations of concentrations of currently used pesticides in the atmosphere of Strasbourg, France. Environ. Pollut. 158, 576–84. doi:10.1016/j.envpol.2009.08.019
- Seo, Y.-H., Cho, T.-H., Hong, C.-K., Kim, M.-S., Cho, S.-J., Park, W.-H., Hwang, I.-S., Kim, M.-S., 2013. Monitoring and risk assessment of pesticide residues in commercially dried vegetables. Prev. Nutr. food Sci. 18, 145–9. doi:10.3746/pnf.2013.18.2.145
- Shimadzu Corporation, 2013a. Software-internes Handbuch GCMS solutions Version 4.11.

Shimadzu Corporation, 2013b. Simultaneous Analysis of 66 Pesticides by GC-MS Using Hydrogen Carrier Gas. Application Data Sheet No. 83.

- Smalling, K.L., Orlando, J.L., 2008. Occurrence of pesticides in water and sediment from three central California coastal watersheds, 2008–2009. Data Ser. Rep. 600, US Geol. Surv. Reston, Virginia.
- Smalling, K.L., Reilly, T.J., Sandstrom, M.W., Kuivila, K.M., 2013. Occurrence and persistence of fungicides in bed sediments and suspended solids from three targeted use areas in the United States. Sci. Total Environ. 447, 179–85. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.01.021
- Steinhoff, W., 2014. Persönliche Mitteiliung vom 30.09.2014. Technischer Support Dupont Deutschland.
- Tadeo, J.L., 2008. Analysis of Pesticides in Food and Environmental Samples. CRC Press. doi:10.1201/9781420007756
- Thiele-Bruhn, S., 2010. Kapitel Gefährdung der Bodenfunktionen, in: Brümmer, G.W., Horn, R., Kandeler, E., Kögel-Knabner, I., Kretzschmar, R., Stahr, K., Wilk, B.-M. (Eds.), Scheffer/Schachtschabel: Lehrbuch Der Bodenkunde. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, p. 570.
- Tournebize, J., Passeport, E., Chaumont, C., Fesneau, C., Guenne, A., Vincent, B., 2013. Pesticide de-contamination of surface waters as a wetland ecosystem service in agricultural landscapes. Ecol. Eng. 56, 51–59. doi:10.1016/j.ecoleng.2012.06.001
- Tran, K., Eide, D., Nickols, S.M., Cromer, M.R., Sabaa-Srur, A., Smith, R.E., 2012. Finding of pesticides in fashionable fruit juices by LC-MS/MS and GC-MS/MS. Food Chem. 134, 2398–405. doi:10.1016/j.foodchem.2012.04.034
- USEPA, 1998. Pesticide Fact Sheet, Dimethomorph. US Environ. Prot. Agency Off. Prev. Pestic. Toxic Subst. 13 pp.
- USEPA, 2003. Pesticide Fact Sheet, Boscalid. US Environ. Prot. Agency Off. Prev. Pestic. Toxic Subst. 18 pp.
- Van der Werf, H.M.G., 1996. Assessing the impact of pesticides on the environment. Agric. Ecosyst. Environ. 60, 81–96. doi:10.1016/S0167-8809(96)01096-1
- Vialle, C., Sablayrolles, C., Silvestre, J., Monier, L., Jacob, S., Huau, M.-C., Montrejaud-Vignoles, M., 2013. Pesticides in roof runoff: study of a rural site and a suburban site. J. Environ. Manage. 120, 48–54. doi:10.1016/j.jenvman.2013.02.023
- Vincenti, M., Minero, C., Sega, M., Rovida, C., 1995. Optimized splitless injection of hydroxylated PCBs by pressure pulse programming. J. High Resolut. Chromatogr. 18, 490–494. doi:10.1002/jhrc.1240180806
- Walorczyk, S., Drożdżyński, D., Kowalska, J., Remlein-Starosta, D., Ziółkowski, A., Przewoźniak, M., Gnusowski, B., 2013. Pesticide residues determination in Polish organic crops in 2007-2010 applying gas chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry. Food Chem. 139, 482–7. doi:10.1016/j.foodchem.2013.01.013

Wang, Y., Jin, H.-Y., Ma, S.-C., Lu, J., Lin, R.-C., 2011. Determination of 195 pesticide residues in Chinese herbs by gas chromatography-mass spectrometry using analyte protectants. J. Chromatogr. A 1218, 334–42. doi:10.1016/j.chroma.2010.11.036

- Weinzierl, W., Nigmann, U., Riedel, M., Bärmann, E., 2010. Kaiserstuhl und Tuniberg Böden, Rebsorten und Ökologie. Landinfo. Landesanstalt für Entwicklung der Landwirtschaft und der ländlichen Räume (LEL).
- Wylie, P.L., 1996. Improved gas chromatographic analysis of organophosphorus pesticides with pulsed splitless injection. J. AOAC Int. 79, 571–7.
- Wylie, P.L., Klein, K.J., Thompson, M.Q., Hermann, B.W., 1992. Using electronic pressure programming to reduce the decomposition of labile compounds during splitless injection. J. High Resolut. Chromatogr. 15, 763–768. doi:10.1002/jhrc.1240151112
- Xu, X., Li, L., Zhong, W., He, Y., 2009. Rapid GC-MS Analysis of Pesticide Residues Using Analyte Protectants. Anal. Lett. 42, 2578–2591. doi:10.1080/00032710903243646
- Zhang, W., Jiang, F., Ou, J., 2011. Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus. Proc. Int. Acad. Ecol. Environ. Sci. 1, 125–144.

8 Anhang A: Auswahl des Injektionslösungsmittels

Zur Analyse geringer Analytkonzentrationen in der Gaschromatographie bietet sich die Injektion großer Probenvolumina an. Das maximal einsetzbare Probenvolumen ist jedoch begrenzt und abhängig von den Injektionsparametern sowie vom verwendeten Injektions-Lösungsmittel. Sind diese Größen nicht aufeinander abgestimmt, besteht die Gefahr eines sogenannten Backflashes. Von einem Backflash spricht man, wenn die bei der Verdampfung des Lösungsmittels im Liner entstehende Gaswolke das effektive Innenvolumen des Liners übersteigt und die überschüssige Gaswolke daraufhin in die Leitungen der Trägergasversorgung und Septum-Spülung gelangt. Aufgrund des Temperaturabfalls kommt es zu einer Kondensation des Lösungsmitteldampfes und damit zu Ablagerung der Analytmoleküle an den Innenwänden der Gasleitungen. Bei der nächsten "überladenen" Injektion können diese Moleküle durch die Lösungsmittelwolke wieder remobilisiert und erneut in den Liner gelangen (Restek, 2002). Typische Symptome eines Backflashes sind tailende Peaks, Verschleppungen sowie eine schlechte Reproduzierbarkeit von Peakflächen. Für eine präzise Quantifizierung in der Gaschromatographie ist aus diesem Grund das Auftreten eines Backflashes unbedingt zu vermeiden.

Zunächst sollte das Volumen des eingesetzten Liners ermittelt werden. Dabei ist darauf zu achten, dass es sich bei dem vom Hersteller angegebenen Volumen meist um ein theoretisches Innenvolumen handelt. So verfügen viele Liner über Einlagen aus Glaswolle oder anderen Glasstrukturen (z.B. Helix), die das Innenvolumen reduzieren. Des Weiteren ist zu beachten, dass bei der Injektion bereits ca. 50% des Liner-Volumens vom Trägergas eingenommen wird (Grob, 2001). Das effektiv für die Gaswolke zur Verfügung stehende Volumen beträgt demnach nur etwa die Hälfte des theoretischen Volumens. Grundsätzlich sollte aber auch dieses effektive Volumen nicht komplett ausgereizt werden.

Das Volumen der Gaswolke wird vom injizierten Probenvolumen, der molaren Masse und Dichte des Lösungsmittels, dem initialen Kopfdruck, dem Umgebungs- bzw. Atmosphärendruck, sowie der Injektionstemperatur gesteuert und kann durch Gleichung (3) beschrieben werden (Maštovská and Lehotay, 2004):

$$V_{Gas} = V_{ideal} \frac{\rho}{M} \left(\frac{T_{inj} + 273}{273} \right) \left(\frac{P_{atm}}{P_{inj} + P_a} \right) V_{inj}$$
 (3)

V_{Gas} Volumen der Gaswolke [μl]

 V_{ideal} 22.400 mL

(Volumen eines Mols eines idealen Gases unter Normbedingungen)

Dichte des Lösungsmittels [g ml⁻¹]

M Molare Masse des Lösungsmittels [g mol⁻¹]

T_{inj} Injektionstemperatur [°C] P_{atm} Atmosphärendruck [kPa] P_{inj} Kopfdruck bei initialer Ofentemperatur [kPa]

P_a Außendruck (entspricht üblicherweise Atmosphärendruck) [kPa]

 V_{inj} Injektionsvolumen [μ L]

Gleichung (3) zeigt, dass bei gleichbleibender Injektionsmenge das Volumen der Gaswolke durch einen Wechsel des Lösungsmittels mit großer molarer Masse und kleiner Dichte, sowie durch Anhebung des initialen Kopfdruckes reduziert werden kann. Da die Injektionstemperatur primär durch die Höhe der Siedepunkte der Zielanalyten festgelegt wird und der Atmosphärendruck nicht veränderbar ist, bieten diese Größen keine wirkliche Möglichkeit zur Reduktion des Volumens der Gaswolke.

Für die GC-MS-Messungen in dieser Arbeit wurde zunächst Aceton als Injektionsmittel eingesetzt, später jedoch dann auf Ethylacetat umgeschwenkt. Aceton ist ausgesprochen flüchtig, was bei der Probeentnahme und -Aufbringung durch den Autoinjektor zu fehlerhaften Volumina führen kann (Anastassiades, 2014). Für den Einsatz von Ethylacetat spricht zudem die geringe Expansion bei der Verdampfung: Aufgrund des kleineren Verhältnisses aus molarer Masse und Dichte erzeugt Ethylacetat gegenüber Aceton bei sonst identischen Injektionsbedingungen eine ca. 10% kleinere Gaswolke im Liner.

Als Keton ist Aceton aufgrund der Carbonylgruppe vergleichsweise polar, was sich in einem höheren Polaritätsindex (P' = 5.4) gegenüber Ethylacetat (P' = 4.3) widerspiegelt (Snyder, 1974). Da in dieser Arbeit eine vorwiegend unpolare stationäre Phase (5% Phenyl-arylene - 95% Dimethylpolysiloxan) verwendet wurde, ist auch hier Ethylacetat gegenüber Aceton vorzuziehen. Aufgrund des hohen Dimethylpolysiloxan-Anteils haben Phasen dieses Typs überwiegend unpolare Eigenschaften. Insbesondere bei Splitless-Injektionen und bei Anwendung der sogenannten "solvent focusing"-Technik, sollten sich die Polaritäten der Säule nicht übermäßig von der des Injektionslösungsmittel unterscheiden, da sich sonst das Lösungsmittel nicht als gleichmäßigen Film, sondern eher tropfenförmig in der Säule ablegt.

Für Boscalid ist zudem bestätigt, dass dieses bis zu einem Jahr in Ethylacetat stabil ist (Hladik, 2014).

9 Anhang B: Maßnahmen gegen Matrix-induzierte Signalverstärkung

9.1 Beweggründe und Einflussfaktoren

Da bei den in Kapitel 4.5 durchgeführten Messungen sehr ausgeprägte signalverstärkende Effekte bei Anwesenheit von Matrix beobachtet werden konnten und die ergriffenen Maßnahmen nicht den erwünschten Erfolg brachten, soll das nachfolgende Kapitel Informationen und Empfehlungen über weitere mögliche Maßnahmen geben. Werden die Signal-verstärkende Effekte nicht eliminiert oder kompensiert, ist eine sichere Quantifizierung von Analyten in Umweltproben nicht möglich.

Folgende Faktoren spielen beim Matrix-induzierten Effekt eine Rolle: (1) Anzahl und Typ der aktiven Stellen in Liner und Säule; (2) Chemische Struktur des Analyten; (3) Analytkonzentration; (4) Injektionstemperatur; (5) Interaktionszeit (Funktion aus Flussrate, Druck, Injektionsvolumen, Volumen der Gaswolke, Säulendurchmesser und Retentionszeit) sowie (6) Typ und Konzentration der Matrixkomponenten. Da die Konzentration und chemische Struktur des Analyten nicht veränderbar sind (Derivatisierungen ausgenommen), müssen Maßnahmen zur Verbesserung der Messperformance auf die übrigen Faktoren abzielen (Anastassiades et al., 2003b).

9.2 Schaffung möglichst hoher Inertheit des Analysegerätes

Die ideale Lösung besteht in der Eliminierung sämtlicher aktiver Stellen im Gaschromatographen, was jedoch praktisch nicht realisierbar ist, da selbst stabilste stationäre Phasen oder desaktivierte Liner durch den Einfluss hoher Temperaturen mit der Zeit aktive Stellen bilden. Bei jeder Injektion legen sich zudem nicht-volatile Matrixbestandteile auf den potentiell inerten Oberflächen ab, wodurch neue aktive Stellen gebildet werden, welche wiederum zu einer graduellen Abnahme des Analysesignals führen. Dieser Effekt, bekannt als matrix-induzierte Verminderung (engl.: matrix-induced diminishment), verschlechtert die Robustheit von GC-Analysen, z.B. die Langzeit-Wiederholbarkeit von Peakintenistäten, Peakformen und Retentionszeiten der Analyten (Mastovská et al., 2005). Dennoch kann die richtige Wahl des Liners, insbesondere für die Analyse aktiver Substanzen, entscheidend bessere Resultate mit sich bringen. Um einen möglichst stabilen, reproduzierbaren und inerten Flussweg der Substanzen zu erreichen, müssen die auf dem Markt erhältlichen Deaktivierungen und Liner-Geometrien in Abhängigkeit zu den Messanforderungen und den Analyt-Eigenschaften ausgewählt werden.

Für diese Arbeit wurde der standardmäßig mit dem Shimadzu GC-MS mitgelieferte Liner durch einen Sky[®]-Liner der Firma Restek ersetzt. Dieser Liner ist mit einer Polymerbeschichtung versehen, welche die Glas-Oberfläche abschirmt und so Störungen durch Wechselwirkungen der Substanzen mit aktiven Zentren vermindert.

Die in Linern häufig eingebrachte Glaswolle fördert die vollständige Verdampfung der Probe (erhöhte Oberfläche und thermische Masse, Steigerung der Verdampfungszeit), ermöglicht eine gleichmäßige Vermischung der Gaswolke mit dem Trägergas und schützt zudem die Säule vor Verunreinigungen. Da jedoch auch diese Glasfasern mit der Zeit brechen und ebenfalls aktive Zentren bilden, werden alternativ dazu Liner mit geometrischen Modifikationen wie Einkerbungen, Fritten oder Cups verwendet. In dieser Arbeit wurde vom Einsatz von Glaswolle im Liner abgesehen, da damit für aktive und thermisch labile Analyten bessere Ergebnisse zu erwarten sind.

Als Geometrietyp wurde ein "Single Taper" ausgewählt. Die Verjüngung (engl.: *taper*) am unteren Teil des Liners fördert die Überführung der Gaswolke auf die Säule und bewirkt zudem, dass der Kontakt mit Metallkomponenten des Inlets minimiert wird, was für aktive Substanzen und der langen Verweilzeit der Analyten im Liner bei Splitless-Injektionen von Vorteil ist (Morgan, 2012). Nachteilig an dieser Konstruktionsform ist die größere Anfälligkeit hinsichtlich der Diskriminierung von Niedrigsiedern, was für die Anforderung in dieser Arbeit jedoch weniger relevant war, da überwiegend hoch siedende Substanzen analysiert wurden.



Abbildung 37: Für die Pestizidanalytik ausgewählter Single Taper-Splitless-Liner mit Polymerbeschichtung.

9.3 Auswahl der geeigneten Injektionstechnik

Eine weitere Möglichkeit die Matrix induzierte Signalverstärkung zu reduzieren, besteht im Einsatz einer kalten Injektionstechnik (engl.: cold on-column), wodurch thermolabile Stoffe vor hohen Temperaturen und verstärkter Degradation geschützt werden können. Die Technik erfordert jedoch einen erhöhten Wartungsaufwand der Säule und ist für die routinemäßige Messung komplexer Matrizes nicht geeignet (Anastassiades et al., 2003b). Auch durch die Probenaufbringung mittels PTV-Injektionen können für thermisch anfällige Stoffe verbesserte Signale erreicht werden (Godula et al., 2001; Poole, 2007). Bei Anwendung sogenannter "pulsed-splitless" Injektionen wird während der Injektion der Kopfdruck im Liner erhöht. Dies hat zum einen den Vorteil, dass dadurch das Volumen der Gaswolke vermindert werden kann und somit größere Probenvolumina injiziert werden können. Zum anderen wird aufgrund der höheren Trägergasflussrate die verdampfte Probe schneller auf die Säule überführt. Die dadurch verkürzte Interaktionszeit der Analyten mit aktiven Stellen vermindert wiederum die Diskriminierung, Adsorption und/oder Degradation sensitiver Analyten im Liner, wodurch größere Signalstärken als mit herkömmlichen Splitless-Injektionen erreicht werden können (Godula et al., 1999; Vincenti et al., 1995; Wylie, 1996; Wylie et al., 1992). Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher ebenfalls eine Hochdruck-Injektion mit 345 kPa und einer Minute Haltezeit angewandt.

9.4 Aufreinigung der Probe

Auch eine extensive Aufreinigung der Extrakte ist eine theoretische Lösung, welche jedoch aufgrund der Uneinheitlichkeit der Stoffgruppe der Pestiziden und ihrer weiten Spanne an chemischen Eigenschaften und der häufig hohen Komplexität von Umweltproben nicht praktikabel ist (Poole, 2007; Schenck and Lehotay, 2000). Eine zu spezifische Aufreinigung der Probe geht praktisch immer mit einem Verlust anderer Analyten einher. Dieser Punkt wird in Kapitel 10.2.3 aufgegriffen, wo die Anwendung eines Waschschrittes in der Festphasenextraktion diskutiert wird.

Grundsätzlich ist das Vorhandensein von Matrixbestandteilen in einer Probe von Vorteil, da dadurch größere, qualitativ bessere Peakformen hervorgerufen werden können. Der allgemein sinnvollere Ansatz ist demnach, den Effekt der Matrix-induzierten Signalverstärkung zu nutzen, anstatt ihn zu eliminieren (Anastassiades et al., 2003b).

9.5 Kompensations-/Korrekturmaßnahmen

Da die Ursache für die Matrix-induzierte Signalverstärkung praktisch nicht zu vermeiden ist, wird in der Praxis stattdessen versucht, deren Einfluss durch die Anwendung des Standardadditionsverfahrens, durch Matrix angepasste Standards (engl.: *matrix-matched standards*), oder mit Hilfe isotopisch markierter interner Standards zu kompensieren (Cuadros-Rodríguez et al., 2007).

Die Standardaddition ist ein in der analytischen Chemie gebräuchliches Verfahren zur Korrektur des Einflusses der Probenmatrix. Dazu wird jede Probe in mehrere Aliquote aufgeteilt, zu denen unterschiedliche, aber bekannte Mengen des Analyten hinzugegeben werden. Einem Aliquot wird dabei kein Analyt zugesetzt. Alle Aliquoten werden schließlich auf dasselbe Volumen verdünnt und gemessen. Aus der in der Probe ermittelten Peakfläche und den größeren Peakflächen der Aliquote, denen eine bekannte Analytmenge zugesetzt wurde, kann die unbekannte Analytkonzentration in der Probe ermittelt werden. Demnach basiert die Kalibrierung nicht auf eigens dafür hergestellten Standardlösungen, sondern erfolgt vielmehr in der Probe selbst. Voraussetzungen zur Anwendung des Verfahrens sind, dass der Matrixeffekt entweder unabhängig oder proportional von der Analytkonzentration ist und zudem die abgeleitete Kalibrierfunktion für den angewandten Bereich Linearität aufweist. Da mehrere Messungen für einen Extrakt nötig sind, ist der Probendurchsatz vermindert, während sich der Instanthaltungsbedarf des Analysesystems erhöht (Poole, 2007)

Das Herstellen Matrix-angepasster Kalibrierlösungen ist die in der Praxis am häufigsten angewandte Methode. Dazu werden Kalibrierstandards in Analyt-freien Extrakten hergestellt, welche dieselbe Matrix-verstärkte Signalerhöhung wie die Probenextrakte erzeugen. Zwar liefet dieses Verfahren generell gute Ergebnisse, jedoch weist es mehrere Nachteile auf: Zum einen beansprucht die Anfertigung Matrix-angepasster Kalibrierlösungen zusätzlichen Zeitund Arbeitsaufwand, zum anderen sind geeignete Leerproben mit gleichen Eigenschaften wie die zu untersuchende Probe unter Umständen nicht oder nur schwierig beschaffbar. Dies

ist insbesondere dann problematisch, wenn verschiedene Typen von Matrixextrakten benötigt werden. Weitere potentielle Schwierigkeiten bei Injektionen von Matrix-versetzten Standards sind häufigere Wartungsarbeiten, welche durch die größeren Menge an zugeführten Matrixbestandteilen nötigt sind, sowie das größere Potential zur Degradation von Analyten in Matrix-Lösungen (Anastassiades et al., 2003b)

Zur Überwachung der Pestizidgrenzwerte in Lebensmittel in der Europäischen Union ist in EU-Referenzlaboratorien für Analyten, welche durch Matrixeffekte beeinflusst sind, der Einsatz von Matrix-angepassten Standards oder eines alternative Methode vergleichbarer Effizienz vorgeschrieben (SANCO, 2010). Dagegen ist in den bundesstaatlichen Aufsichtsbehörden in den USA, der US-Umweltschutzbehörde EPA sowie der US-Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelzulassungsbehörde FDA die Anwendung Matrix-angepasster Standards nicht gestattet (Mastovská et al., 2005). Die Ursache hierfür liegt in der Möglichkeit zur Manipulation von Analysen (Anastassiades et al., 2003b; Poole, 2007).

Eine weitere Korrekturmöglichkeit bietet der Einsatz isotopisch markierter interner Standards. Diese sollten auf sehr ähnliche Weise wie der jeweilige Analyt von der Matrix beeinflusst sein, wodurch das Verhältnis der Konzentrationen zwischen Analyt und Standard konstant bleibt. Der Konzentrationsunterschied zwischen dem Analyten und dem Surrogat (Isotopen-gelabelter Analyt) sollte gering sein, da die Möglichkeit besteht, dass die Matrix-induzierte Signalverstärkung vom Verhältnis des Analyten und der Konzentration abhängig ist. Nachteilig an diesem Verfahren ist die eingeschränkte Verfügbarkeit und die hohen Kosten Isotopen-gelabelter Analyten (Poole, 2007).

9.6 Analyte Protectants

9.6.1 Funktionsweise

Eine relativ neue Alternative zu matrix-angepassten Standards ist der Ansatz der "Analyte Protectants" (AP). Damit werden Substanzen bezeichnet, welche bewusst Probe- und Kalibrierlösungen hinzugegeben werden, um die Interaktion von Analyten mit aktiven Stellen zu unterbinden oder zumindest zu vermindern. Die Voraussetzung dabei ist, dass diese Additive selbst stark mit aktiven Stellen interagieren und damit für Zielanalyten maskiert/blockiert werden. Da die Analyte Protectants sowohl der Probe, als auch den Matrix-freien Kalibrierstandards hinzugegeben werden, wird die Intensität der Matrix-induzierten Signalverstärkung egalisiert, mit der Folge, dass die gleiche Konzentration in der Probe und der Matrix-freien Kalibrierlösung ein identisches Signal erzeugt (Mastovská et al., 2005). In zahlreichen Publikationen konnten gezeigt werden, dass der Einsatz von Analyte Protectants die gaschromatographische Messperformance selbst von hoch sensitiven Analyten massiv verbessern kann. Neben der Egalisierung des Einflusses unterschiedlich komplexer Probenmatrices können durch Analyte Potectants zudem größere, symmetrische Peaks, eine verbesserte Reproduzierbarkeit von Peakflächen und verkürzte Wartungsintervalle des Gaschromatographen erreicht werden (Anastassiades et al., 2003b; González-Rodríguez et al., 2009;

Kirchner et al., 2008; Li et al., 2012; Mastovská et al., 2005; Przybylski and Bonnet, 2009; Sánchez-Brunete et al., 2005; Wang et al., 2011; Xu et al., 2009).

Da bei der Interaktion von Substanzen mit aktiven Stellen die Ausbildung von Wasserstoffbrücken eine Schlüsselrolle einnimmt, ist bei der Suche nach geeigneten Substanzen die Fähigkeit zur Wasserstoffbrückenbildung von großer Relevanz. Die Untersuchungen von Anastassiades et al. (2003) und Mastovská et al. (2005) zeigten zudem, dass der Analyte Protectant die aktiven Stellen in Liner und Säule zur der Zeit maskieren muss, in der der jeweilige Analyt am empfänglichsten hinsichtlich Interaktionen mir aktiven Stellen ist. Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass die Volatilität des Analyte Protectants ähnlich dem des zu untersuchenden Stoffes sein sollte. Da die Probe häufig eine weite Spanne an Analyten unterschiedlicher Volatilitäten umfasst, wird in der Praxis meist ein Gemisch an Analyte Protectants eingesetzt. In den Studien von Anastassiades et al. (2003) und Mastovská et al. (2005) stellte sich eine Mixtur aus 3-Ethoxy-1,2-propanediol (CAS Nr.: 1874-62-0), D-Gluconolacton (CAS Nr.: 90-80-2) und D-Sorbit (CAS Nr. 50-70-4) als die effizienteste Kombination heraus, um sensitive Analyten zu schützen und deren Peakformen zu verbessern (geringeres Tailing). In Abbildung 38 sind die die optimalen Wirkungsbereiche dieser drei Analyte Protectants schematisch dargestellt: 3-Ethoxy-1,2-propanediol schützt überwiegend die früh eluierenden Analyten, während D-Gulonolacton den mittleren Volatilitätsbereich abdeckt. D-Sorbit besitzt für spät eluierende Analyten die größte Wirksamkeit zur Blockierung aktiver Stellen. Zur groben Orientierung sind zusätzlich die "Elutions-Zeitpunkte" einiger Pestizide eingetragen. Der Wert in Klammer ist der berechnete lineare Retentionsindex des jeweiligen Pestizids auf einer SLB-5MS Säule (30 m × 0.25 mm x 0.25 μm; Ofenprogramm: 50°C auf 350°C bei 3°C min⁻¹; Fluss: Helium, 35 cm s⁻¹) (Mondello, 2011).

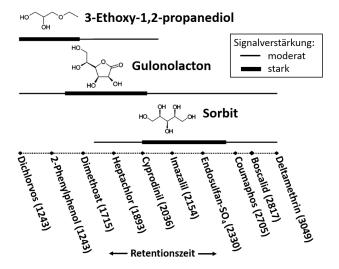


Abbildung 38: Schematische Darstellung der Wirkungsbereiche dreier Analyte Protectants mit den Elutionszeitpunkten diverser Pestizide, darunter Boscalid (verändert nach: Mastovská et al. (2005)).

Mit einem linearen Retentionsindex von 2817 eluiert Boscalid demnach auf dieser Säule erst zwischen einem n-Octacosan (C₂₈H₅₈) und einem n-Nonacosan (C₂₉H₆₀). Wie in Abbildung

38 zu sehen, eluiert Boscalid somit in einem Bereich, wo Sorbit lediglich eine moderate Signalverstärkung hervorruft. Es ist anzunehmen, dass ein später eluierender AP eine bessere Schutzfunktion für Boscalid liefern kann, was jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter geprüft werden konnte. An dieser Stelle sei auf die Arbeit von Przybylski and Bonnet (2009) hingewiesen, welche zu den Stoffen 3-Ethoxy-1,2-propanediol, Gulonolacton und Sorbit zusätzlich die später eluierenden Substanzen Spermin und Thiabendazol hinzugaben und dadurch die Messperformance für die GC-Analyse von Carbamaten weiter steigern konnten.

9.6.2 Anfertigen der AP-Mixtur

Zur Herstellung der AP-Lösung, wurde die Empfehlung der CVUA Stuttgart herangezogen (CVUA, 2013). Dazu wurden 250 mg Sorbit abgewogen, in einen 50 mL Messkolben überführt, 20 mL entionisiertes Wasser hinzugegeben und schließlich mit Acetonitril bis zur Graduierung aufgefüllt. Die Sorbit-Konzentration beträgt folglich 5000 ng µL-¹ bei einem Acetonitril: Wasser-Verhältnis von 60:40. Um den Lösungsvorgang zu beschleunigen und eine gute Durchmischung zu erzielen, wurde der Messkolben für eine Minute in ein Ultraschallbad gestellt. Das hinzugegebene Volumen der AP-Mixtur beträgt 30 µL pro 1 mL Probe oder Kalibrierlösung. Die CVUA Stuttgart verwendet eine Kombination aus 3-Ethoxy-1,2-propanediol, D-Gluconolacton und D-Sorbit um Analyten über eine weite Elutionsspannweite zu schützen. Zusätzlich wird Shikimisäure zur Stabilisierung basenlabiler Pestizide, wie Captan, Folpet, Tolylfluanid oder Dichlofluanid, hinzugeben. Wie bereits erwähnt, wurde lediglich die Wirkung von Sorbit getestet, da nur für Boscalid in Umweltproben quantifiziert werden sollte und zudem die Beschaffung weiterer Chemikalien mit einem größeren Kostenaufwand verbunden gewesen wäre.

9.6.3 Anpassung der Reinigung der Injektionsspritze

Die Verwendung von Analyte Protectants erfordert eine erhöhte Anforderung an die Reinigung der Spritze des Autoinjektors. Da Analyte Protectants häufig zuckerähnliche Stoffe sind, können diese bei den hohen Temperaturen im Injektorblock karamellisieren und die Spritze verstopfen. Um dies zu vermeiden, sollte nach jeder Injektion die Spritze mit einem wasserhaltigen polaren organischen Lösungsmittel gespült werden. In dieser Arbeit wurden drei Vials mit Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität angefertigt, mit denen die Spitze nacheinander durch den Autoinjektor mehrfach gespült wurden:

- 1. Acetonitril: Wasser (1:1, v/v)
- 2. Aceton
- 3. Ethylacetat (Injektionslösungsmittel)

Für den Reinigungsschritt wurde die Geschwindigkeit des Aufziehens und Entleerens der Spritze verringert, um mögliche AP-Rückstände vollständig aus der Spritz zu entfernen. Zusätzlich wurde in regelmäßigen Abständen die Spritze gemäß den Herstellerempfehlungen händisch gereinigt und auf Leichtgängigkeit geprüft.

10 Anhang C: Festphasenextraktion

10.1 Geräteaufbau

Wichtig bei der Festphasenphasenextraktion ist die Schaffung konstanter Versuchsbedingungen. Um die im nachfolgenden Abschnitt erläuterten Schritte möglichst bequem und reproduzierbar durchführen zu können, wurde zur Extraktion der Wasserproben ein sogenannter Vakuum-Verteiler (engl.: vacuum manifold) verwendet. Zentrales Bauteil ist dabei ein Glasbehälter, welcher nach oben hin durch eine Kunststoffplatte luftdicht abgeschlossen wird. In die Platte sind Löcher eingelassen, in die Kunststoffröhrchen eingesteckt werden. Der Durchmesser der Röhrchen ist so gewählt, dass auf diese die Kartuschen der Festphasenextraktion in senkrechter Position aufgesetzt werden können. Über eine externe Vakuum-Pumpe wird nun im Glasbehälter ein Unterdruck erzeugt. Bei geöffnetem Ventil liegt dieses Vakuum auch an der Unterseite der SPE-Kartusche an, wodurch die Wasserprobe oder andere Flüssigkeiten durch den Sorbens gezogen werden kann. Die Durchflussrate wird durch Änderung des Unterdrucks reguliert.

Um Pestizide im ng L⁻¹-Bereich in Wasserproben analysieren zu können, müssen große Probenvolumina extrahiert werden (Momplaisir et al., 2010). In dieser Arbeit wurden jeweils 1000 ml Wasserprobe extrahiert. Da diese Wassermenge vom Glasbehälter des Vakuum-Verteilers nicht aufgefangen werden kann, wurde das anfallende Wasser aus dem Glasbehälter entnommen. Dies wurde durch einen großvolumigen und aufgrund des angelegten Unterdrucks dickwandigen Erlenmeyerkolben realisiert, in dessen Stopfen zwei Schläuche eingebracht wurden, welche zum einen mit dem Vakuum-Verteiler und zum anderen mit der Vakuumpumpe verbunden wurden. Die Pumpe wurde damit vom Wasserfluss getrennt, da sämtliches Wasser im Erlenmeyerkolben aufgefangen wurde. Für die Konditionierung, Equilibrierung und Eluierung wurde die jeweilige Lösungsmittelmenge direkt mit einer Kolbenhubpipette in die SPE-Kartusche gefüllt. Aufgrund des großen Volumens der Wasserprobe wurde diese mit Hilfe eines Schlauches aus PTFE, welcher auf die Oberseite der Kartusche druckdicht aufgesetzt werden kann, aus der vorbereiteten Probeflasche gezogen. In Abbildung 39 ist der schematische Aufbau dargestellt.

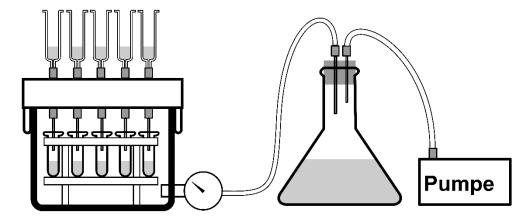


Abbildung 39: Schematischer Aufbau der Festphasenextraktion zur Probenvorbereitung.

Die Probenvorbereitung mit einer Festphasenextraktion besteht typischerweise aus 5 Schritten: Konditionierung und Equilibrierung (1), Beladung (2), Waschung (3), Trocknung (4) und Eluierung (5). Für eine effiziente Extraktion der Zielanalyten ist eine Optimierung dieser Schritte entscheidend. Nachfolgend sollen die Schritte erläutert werden, wie sie für eine Extraktion ungeladener und relativ unpolarer Analyten aus einer wässrigen Matrix mittels Umkehrphase typisch sind, da diese Form der Extraktion in der vorliegenden Arbeit angewandt wurde. Abbildung 40 zeigt den kompletten Geräteaufbau zur Festphasenextraktion.

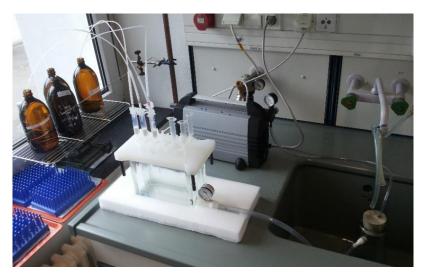


Abbildung 40: Geräteaufbau zur Festphasenextraktion.

10.2 Extraktionsschritte

10.2.1 Konditionierung und Equilibrierung

Bevor die eigentliche Probe durch die SPE-Kartusche geleitet wird, wird diese mit einem organischen Lösungsmittel mittlerer Polarität konditioniert. Dieser Schritt entfernt im Sorbens eingeschlossene Luft und aktiviert zudem die Liganden auf der chromatographischen Oberfläche des Sorbens, wodurch diese besser mit den Zielanalyten wechselwirken können. Um restliches Lösungsmittel zu entfernen, erfolgt direkt im Anschluss ein Equilibrierungsschritt mit Reinstwasser. Typischerweise wird zur Konditionierung dasselbe Lösungsmittel eingesetzt mit dem später auch eluiert wird. Das zur Konditionierung und zur Equilibrierung genutzte Lösungsmittel- bzw. Wasservolumen sollte näherungsweise dem Volumen des Reservoirs einer SPE-Kartusche (in diesem Fall 6 ml) entsprechen. Als Durchflussrate sind 3-6 ml min⁻¹ ausreichend (Phenomenex Inc., 2011).

10.2.2 Beladung

Der nächste Schritt ist die Beladung des Sorbens mit der Umweltprobe, indem das komplette Probenvolumen langsam durch die SPE-Kartusche perkoliert wird. Die Durchflussrate sollte langsamer sein als bei der Konditionierung, damit möglichst viele Analytmoleküle an die Festphase binden können. Für die Extraktion von 1000 ml wird in der Literatur meist eine Rate von 10 ml min⁻¹ eingestellt (Bonansea et al., 2013; D'Archivio et al., 2007; Hladik et al.,

2008; Reilly et al., 2012). Ferner ist darauf zu achten, dass das Adsorptionsvermögen der stationären Phase nicht überschritten wird. Ab einem bestimmten Probenvolumen (Durchbruchsvolumen; engl.: "breakthrough volume"), bei hohen Analytkonzentrationen oder zu geringer Sorbensmasse kann es dazu kommen, dass der Sorbens keine Analyten mehr zurückhalten kann und diese die SPE-Kartusche passieren (Barrek et al., 2009; Bielicka-Daszkiewicz and Voelkel, 2009).



Abbildung 41: Beladung der SPE-Kartuschen.

10.2.3 Waschung

Der Waschschritt dient dazu, Verunreinigungen, welche schwächer als die Zielanalyten gebunden sind, vom Sorbens zu entfernen. Idealerweise sollte der Schritt keine Desorption der Zielanalyten auslösen. Das dabei verwendete Lösungsmittel muss von seiner Elutionsstärke zwischen der Stärke von Wasser und des im Elutionsschritt verwendeten Lösungsmittels liegen. Üblicherweise wird dafür ein Gemisch aus Methanol und Wasser verwendet. Soll ein wasserunlösliches Lösungsmittel eingesetzt werden, muss vor dem Waschvorgang ein Trocknungsschritt vorgenommen werden. Die Durchflussrate beläuft sich auf 1-2 ml min⁻¹.

Der Waschvorgang wird bei der Extraktion von Pestiziden aus Wasserproben in der Praxis meist nicht angewandt (z.B.: Barrek et al., 2009; Bonansea et al., 2013; Herrero-Hernández et al., 2013; Hladik et al., 2008; Kouzayha et al., 2012; Reilly et al., 2012). Der Grund für den fehlenden Waschschritt liegt darin, dass Pestizide eine weite Spanne an chemischen Eigenschaften umfassen und ein zu intensiver Waschvorgang mit einem Verlust an schwächer gebundenen Analyten einhergeht. Soll dagegen die Festphasenextraktion für einen bestimmten Zielanalyten stärker spezifisch sein und sollen möglichst viele Störsubstanzen aus der Umweltprobe entfernt werden, ist ein Waschschritt in der Festphasenextraktion sinnvoll. Die Elutionsstärke des Waschlösungsmittels muss dabei an den jeweiligen Zielanalyten angepasst werden. Ein guter Anhaltspunkt ist der Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient (Kow) des Analyten, als Maß für dessen Hydrophilie/Hydrophobie. Je unpolarer der Analyt (je höher dessen log Kow), desto stärker wird dieser vom Sorbens der SPE-Kartusche gebunden und

desto höher muss die Elutionsstärke des Waschlösungsmittels ausfallen, um schwächer als der Zielanalyt gebundene Stoffe vom Sorbens zu lösen. Als Faustregel gilt, dass mit jeder weiteren Einheit des log K_{OW}-Wertes des Zielanalyten, der Methanolanteil um 10% angehoben werden sollte (Rummel, 2012).

Für Boscalid, als mittelpolarer Stoff mit einem log K_{OW} von ca. 3 (vgl. Tabelle 11), wäre demzufolge ein Wasser:Methanol-Verhältnis von 70:30 sinnvoll. Im Rahmen dieser Arbeit wurde kein Waschschritt durchgeführt.

10.2.4 Trocknung

Die Trocknung des Sorbens ist ein wichtiger Schritt bei der Festphasenextraktion. Bereits kleinere Restwassermengen beeinflussen die Elution der adsorbierten Analyten und damit die Wiedererhalte (Kouzayha et al., 2012). In der Praxis erfolgt die Trocknung des Sorbens häufig durch das Durchströmen mit Kohlendioxid (Hladik et al., 2008), Stickstoff (Bonansea et al., 2013; Ruiz-Gil et al., 2008), Luft (Barrek et al., 2009; D'Archivio et al., 2007; Herrero-Hernández et al., 2013; Lagunas-Allué et al., 2012) oder durch Zentrifugation (Kouzayha et al., 2012).

10.2.5 Eluierung

Der Einsatz eines Lösungsmittels mit großer Elutionsstärke bricht die Wechselwirkungen zwischen Zielanalyten und der stationären Phase auf, wodurch die Analyten ins Lösungsmittel überführt werden. Die Wahl des Lösungsmittels hängt stark von den chemischen Eigenschaften des/der Zielanalyten ab. Als erster Anhaltspunkt für ein geeignetes Lösungsmittelvolumen kann erneut das Volumen des Reservoirs der SPE-Kartusche verwendet werden, wobei dies eher die untere Grenze darstellen sollte. Auch die Eluierung sollte mit einer möglichst geringen Flussrate durchgeführt werden, um eine vollständige Desorption der Analyten zu unterstützen. Die Gewinnung des Eluats stellt den finalen Schritt einer Festphasenextraktion dar.

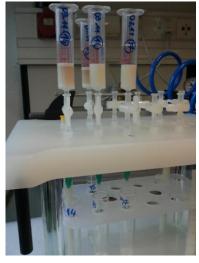




Abbildung 42: Eluierungsschritt der Festphasenkartuschen.

10.3 Eindampfung und Lösungsmitteltransfer

Da zur Eluierung der Analyten von der stationären Phase der SPE-Kartusche eine vergleichsweise große Menge Lösungsmittel verwendet werden muss, ist im Bereich der Spurenanalytik nach der Festphasenextraktion in der Regel ein zusätzlicher Konzentrierungsschritt notwendig, in dem das Lösungsmittelvolumen weiter reduziert wird. Ziel dabei ist es, die Moleküle des Lösungsmittels teilweise oder gar komplett, möglichst ohne Verlust der zu untersuchenden Analyten, von der flüssigen Phase in die Gasphase zu überführen. Für die Evaporation von Lösungsmitteln existieren unterschiedliche Anwendungen, bei der die Evaporation durch den Einsatz von Wärme oder Kälte, Vakuum, Zentrifugation oder Inertgasen beschleunigt wird. Die Wahl der Anwendung richtet sich dabei nach Art und Menge des zu verdampfenden Lösungsmittels und ist abhängig vom Probentyp (Abeysena and Darrington, 2013).

Zur beschleunigten Evaporation von Lösungsmittel in der Pestizidanalytik wird häufig die Begasung mit Stickstoff (engl.: nitrogen blowdown) angewandt (z.B. Bonansea et al., 2013; Jordan et al., 2009; Kouzayha et al., 2012; Reilly et al., 2012; Ruiz-Gil et al., 2008; Seo et al., 2013). Die Idee besteht darin, den Partialdruck des Lösungsmittels in unmittelbarer Nähe zur flüssigen Phase herabzusetzen. Die Begasung der Lösungsmitteloberfläche mit einem sanften Strom aus Stickstoff bewirkt, dass in der Gasphase befindlichen Lösungsmittelmoleküle abtransportiert werden, bevor diese wieder in die flüssige Phase zurückkehren können (Felton, 2004). Die Verdunstungstechnik kann bei kleinen zu verdampfenden Lösungsmittelvolumina eingesetzt werden und ist nur dann anwendbar, wenn die gelösten Analyten einen sehr niedrigen Dampfdruck besitzen (Erickson et al., 1981). Mit einem Dampfdruck von lediglich 7E-07 Pa bei 20°C (USEPA, 2003) ist für Boscalid von einem vernachlässigbar kleinen Verlust während des Evaporationsschrittes auszugehen.

11 Anhang D: Wartung und Fehlerbehebung

11.1 Beseitigung einer Kontamination des GC-MS

11.1.1 Ausgangslage

Nach einer zwei-wöchigen Standzeit des Gerätes im Energiesparmodus sollte eine neu ausgearbeitete GC-MS-Methode angewandt werden. Dabei wurde das Ofenprogramm, die Injektions- und Interfacetemperatur verändert, der initiale Kopfdruck angehoben und ein neuer Liner mit Single-Taper-Geometrie und Polymerbeschichtung eingebaut. Beim ersten Messlauf mit diesen Parametern zeigte das Chromatogramm einen Fremdpeak mit ungewöhnlich starker Intensität, welcher nach ca. 11 min (ca. 180°C) eluierte. Der Abgleich des Massenspektrums mit der NIST-Datenbank identifizierte die Substanz als Diethylphthalat. Das gemessene Signal war derartig stark, dass der Detektor eine Übersättigung anzeigte (Abbildung 43). Die Detektion von Verunreinigungen wie Phthalate, bei den ersten Analysen nach langen Standzeiten, Wartungsarbeiten und dem Wechsel von Verschleißmaterialen, ist nicht ungewöhnlich. Aus diesem Grund wurde zur Spülung mehrfach reines Ethylacetat injiziert, was jedoch die Intensität des Phthalatpeaks nicht reduzierte. Da ein derart starkes Signal eines Stoffes eine Analyse massiv stören kann, wurde versucht, die Ursache ausfindig zu machen. Nachfolgend soll die Vorgehensweise bei der Ursachenfindung und -beseitigung der Phthalatkontamination beschrieben werden.

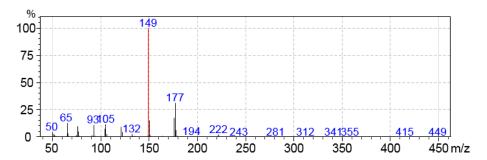


Abbildung 43: Massenspektrum des Kontaminationspeaks. Die rote Einfärbung des 149er Fragmentes zeigt die Übersättigung des Detektors an.

11.1.2 Identifikation der Kontamination

Für Phthalsäureester (kurz: Phthalate) mit gesättigten Alkylseitenketten ist der Basispeak des Massenspektrums bei m/z 149 charakteristisch (EI; 70 eV), was sich aus der Abspaltung der Seitenketten unter Ausbildung eines protonierten Phthalsäureanhydridkations ergibt (Abb, 2011) (Abbildung 44).

Abbildung 44: Protoniertes Phthalsäureanhydridkation.

In einer Shimadzu Applikation mit ähnlicher Säule, gleichem Trägergas und vergleichbarer linearer Flussgeschwindigkeit, jedoch anderem Temperaturprogramm, eluierte Dibutylphtalat bei ca. 8,5 min (ca. 275°C) (Sakamoto et al., 2010). Da bei unpolaren Säulen die Elution stark nach den Siedepunkten geordnet ist, müsste die gefundene Substanz deutlich flüchtiger sein als das Dibutylphtalat (Sdp.: 340°C (Lide, 2005)). Da dies für Diethylphthalat (Sdp.: 295°C (Lide, 2005)) zutrifft und das Massenspektrum ebenfalls sehr gut übereinstimmte, war es wahrscheinlich, dass es sich bei der Kontamination tatsächlich um Diethylphthalat handelte. Vertreter der Stoffgruppe der Phthalate werden überwiegend als Weichmacher bei der Herstellung von Kunstoffen, wie Polyvinylchlorid (PVC) eingesetzt, um diesen Stoffen eine höhere Flexibilität zu verleihen (Gimeno et al., 2014). Als potentielle Kontaminationsquellen sind demnach alle Kunststoffe zu sehen, die im gesamten Messaufbau eingesetzt werden (Rohrleitungen, Dichtungen, etc.).

11.1.3 Vorgehensweise

Als erste Ursache wurde das Septum des Injektorblocks gesehen, wenngleich die verwendeten Septen (Supelco Thermogreen LB-2) eine vergleichsweise hohe Temperaturbeständigkeit und geringes Septumbluten aufweisen. Da im Energiesparmodus die Temperatur des Injektorblocks nicht herabgesetzt wird und stets auf der Temperatur der zuletzt eingestellten Methode verbleibt, wird das Septum gleichbleibend hohen Temperaturen ausgesetzt. Aus diesem Grund wurde das Septum gewechselt, was jedoch keinen positiven Effekt mit sich brachte.

Da auch bei einem Messlauf ohne Injektion ein deutlicher Phthalatpeak im Chromatogramm erschien, konnte die Kontamination des Injektionslösungsmittels und der Spritze des Autoinjektors ausgeschlossen werden. Schließlich wurde der polymerbeschichtete Sky-Liner wieder durch einen gewöhnlichen Single-Taper Liner getauscht, wobei zunächst der identische O-Ring verwendet wurde. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass bei einer Fehlersuche nie mehrere potentielle Einflussgrößen gleichzeitig variiert werden sollten, da sonst Ursache-Wirkungsbeziehungen sehr schwer festzustellen sind. Der Wechsel des Liners führte lediglich zu einer leicht reduzierten Peakfläche und schien nicht die Ursache darzustellen. Um möglicherweise bestehende Verunreinigungen am Anfang der Kapillarsäule zu beseitigen, wurde diese auf Injektorseite um ca. 50 cm gekürzt, was jedoch ebenfalls keine Verbesserung mit sich brachte (Abbildung 45).



Abbildung 45: Kürzen der Kapillarsäule auf Injektorseite.

Im Handbuch des GC-MS-Herstellers war für die O-Ringe aus Viton® eine maximale Betriebstemperatur von 350 bzw. 400°C angegeben, wobei dies als unrealistisch hoch erachtet wurde. Die Nachfrage beim Herstellerkonzern Dupont ergab, dass der O-Ring keiner Temperatur über 250°C im längeren Betrieb ausgesetzt werden sollten, um die Freisetzung von Fluorwasserstoff zu verhindern. Zwar wurde der Injektor bei Vorversuchen bei 275°C betrieben, jedoch sind O-Ringe allgemein nicht als Ursache für die Phthalatkontamination zu sehen, da diese nach der Produktion getempert werden und keine Weichmacher mehr freisetzen sollten (Steinhoff, 2014).

Um den Einfluss der Injektor-Temperatur auf die Intensität der Kontamination zu überprüfen, wurde diese von 250 auf 45°C abgesenkt, das Ofenprogramm jedoch unverändert gelassen. Eine erneute Messung ohne Injektionsvorgang zeigte daraufhin eine deutlich geringere Intensität des Phtalatpeaks und damit eine direkte Abhängigkeit von der Injektortemperatur. Daraufhin wurde das Gerät heruntergefahren, die Kapillarsäule und der Liner aus dem Injektor ausgebaut und anschließend der Injektor bei 420°C für 30 Minuten ausgeheizt. Diese Maßnahme führte zu einer starken Abnahme des Phtalatpeaks, welcher sich in den nachfolgenden Messungen weiter reduzierte und nicht mehr die Messung störte. Um prüfen zu können, ob möglicherweise doch Phthalate aus dem O-Ring herausgelöst wurden, wurde ein O-Ring klein geschnitten und für sechs Tage in Ethylacetat eingelegt und anschließend gemessen, wobei keine Phthalate detektiert werden konnten. Auch die verwendeten Stoffhandschuhe wurden auf diese Weise geprüft.

Als der Sky-Liner nach 500 Injektionen durch einen neuen Liner getauscht wurde, trat mit dem neuen Liner das identische Phänomen auf: Wieder erschien der Diethylphthalat-Peak mit vergleichbar hoher Konzentration im Chromatogramm. Dies zeigte, dass die Kontamination durch den Wechselvorgang des Liners hervorgerufen wurde, wenngleich der genaue Ursprung, trotz Beseitigung der Kontamination, nicht endgültig geklärt werden konnte.

11.2 Septum- und Säulenbluten

11.2.1 Ausgangslage

Das Septum ermöglicht die Einbringung der Probespritze in den Liner des Gaschromatographen und garantiert die Injektion und Verdampfung der Probe ohne dabei einen Druckverlust im Liner hervorzurufen oder den Trägergasfluss zu verändern. Septumbluten tritt dann auf, wenn durch hohe Temperaturen im Injektor Bestandteile des Septums mobilisiert werden und in die Säule des Gaschromatographen gelangen.

Säulenbluten entsteht dagegen dann, wenn die Säule über längere Zeiträume auf zu hohen Temperaturen gehalten wird, wodurch das Polysiloxangerüst der stationären Phase teilweise zerfällt und volatile, zyklische Gruppen bildet, welche wiederum vom Detektor registriert werden. Sowohl für das Septen- als auch das Säulenbluten ist die Freisetzung von ringförmigen Siloxanen charakteristisch. Da bei Vorversuchen mit Aceton als Injektionsmittel zahlreiche Cyclosiloxane starker Intensität im Chromatogramms auftraten, wurde der Ursache für diese Fremdpeaks nachgegangen. Nachfolgend wird beschrieben, wie Septum- und Säulenbluten anhand der Abundanz zweier charakteristischen Molekülfragmente voneinander unterschieden werden kann.

11.2.2 Identifikation

Die Freisetzung von cyclischen Siloxanen mit großer molarer Masse (Dodecamethylcyclohexasiloxan (D6), Tetradecamethylcycloheptasiloxan (D7), Hexadecamethylcyclooctasiloxan (D8), Octadecamethylcyclononasiloxan (D9)) ist für ein Septumbluten typisch. Bei der Degradation der Polydimethylsiloxan-Phase der Kapillarsäule werden dagegen hauptsächlich die niedermolekularen Hexamethylcylcotrisiloxan (D3) und Octamethylyclotetrasiloxan (D4) gebildet. Die größeren Cyclosiloxane teilen dabei, mit Ausnahme des D10, alle das m/z 73 als Basispeak, bei gleichzeitig geringer Intensität des Molekülfragmentes m/z 207. Die niedermolekularen Cyclosiloxane zeigen dagegen ein inverses Verhalten: Hier weist das Fragment m/z 207 gegenüber m/z 73 größere Intensitäten auf (English, 2013) (vergleiche Abbildung 46 und Abbildung 47).

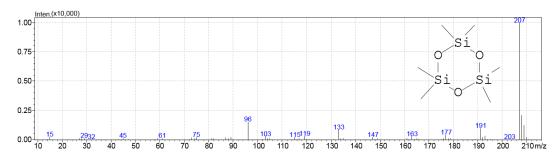


Abbildung 46: EI-Massenspektrum von Hexamethylcylcotrisiloxan (D3) mit ausgeprägtem Basispeak bei m/z 207.

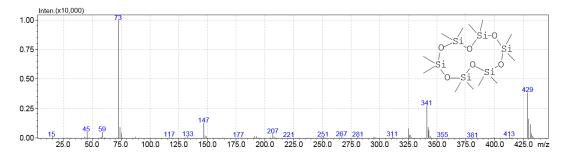


Abbildung 47: EI-Massenspektrum des Dodecamethylcyclohexasiloxans (D6) mit intensivem Basispeak bei m/z 73. Das 207er Fragment weist dagegen eine geringe Intensität auf.

Aus diesem Grund wurde ein SIM-Lauf mit diesen beiden Massen gestartet, um den Einfluss von Septum- und Säulenbluten besser sichtbar zu machen. Wie in Abbildung 48 erkennbar, zeigt das 73er-Chromatogramm intensive Peaks in regelmäßigen Abständen im vorderen Bereich des Chromatogramms. Im 207er-Chromatogramm (rote Kurve) sind diese Peaks, trotz 20-facher Überhöhung der Darstellung, dagegen schwächer ausgeprägt. Sichtbar ist hier jedoch ein kontinuierlicher Anstieg der Basislinie.

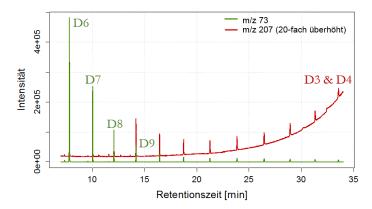


Abbildung 48: SIM-Chromatogramm von m/z 73 und m/z 207.

Diese massenselektive Darstellung zeigt demnach das Auftreten beider Phänomene: Intensive Peaks größerer Cyclosiloxane, möglicherweise verursacht durch ein Septumbluten, und ein schwaches Bluten der Kapillarsäule bei zunehmender Laufzeit der Methode, hervorgerufen durch einen zunehmendem Beitrag der stationären Phase zum Untergrundsignal.

Die während der Vorversuche detektierten Peaks sprachen daher zunächst für ein Bluten des Septums. Da jedoch das Septum gemäß den Herstellerangaben eingebaut und der Injektor unterhalb der maximal empfohlenen Temperatur der Septen betrieben wurde, wurde ein Methodenlauf ohne Injektion gestartet. Das Chromatogramm wies daraufhin eine äußerst niedrige und konstante Basislinie ohne Fremdpeaks, womit das Septum als Ursache für die Siloxanpeaks ausgeschlossen werden konnte.

Eine weitere Möglichkeit stellen die Silikonsepten des Probe- und der Spülfläschchen dar. Werden diese durch die Spritze des Autoinjektors durchstochen, können aus diesen ebenfalls Siloxane herausgelöst werden und die Probe- bzw. Spülflüssigkeiten kontaminieren. Um deren Einfluss zu untersuchen, wurden die Vials mit neuem Aceton befüllt und die Septen jeweils durch Aluminiumfolie ausgetauscht. Da auch dies keine Änderung mit sich brachte,

wurde eine Kontamination des Acetons in Betracht gezogen. Das Datum zur maximal empfohlenen Verwendung war bereits über 10 Jahre überschritten und der Deckel hatte zudem keinen Einsatz aus PTFE mehr. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde neues Aceton geordert, welches bei der Injektion keine nennenswerten Fremdpeaks aufwies (Abbildung 49).

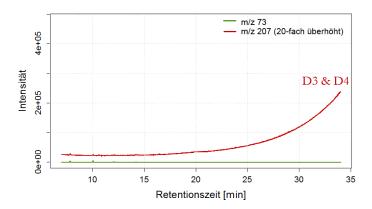


Abbildung 49: SIM-Chromatogramm von m/z 73 und m/z 207 mit neu erworbenem Aceton. Das Chromatogramm ist frei von Fremdpeaks und zeigt lediglich den zu erwarteten Anstieg der Basislinie.

Diese Beobachtung verdeutlicht die große Relevanz bei der Verwendung hochreiner Lösungsmittel sowie deren sachgemäßem Lagerung. Fremdpeaks, hervorgerufen durch Kontaminationen können dann problematisch werden, wenn diese zu ähnlichen Retentionszeiten eluieren wie die Zielanalyten. Bei einer Detektion im SIM-Modus sollten keine Ionen als Target- oder Referenzionen herangezogen werden, welche typisch für Verunreinigungen sind. In Tabelle 7 sind die Ionen einiger häufig anzutreffender Kontaminationen in der GC-MS-Analytik aufgeführt (McMaster, 2008).

Tabelle 7: Charakteristische Ionen häufiger Kontaminationen in der GC-MS.

Ionen (m/z)	Verbindung(en)	Herkunft
18, 28, 32, 44	H_2O , N_2 , O_2 , CO_2	Luft- und Wasserrückstände, Leckagen
31	Methanol	Lösungsmittel zu Reinigung
43, 58	Aceton	"
78	Benzol	"
91, 92	Toluol oder Xylole	"
105, 106	Xylole	"
69, 131, 219, 254, 414, 502	Perfluortributylamin	PFTBA (Tuning-Substanz)
69	Öl der Vorpumpe	Vorpumpe
73, 207 , 281, 327	Polysiloxane	Säulenbluten
73 , 207, 281, 149	Polysiloxane	Septumbluten
73, 147, 207, 221, 295, 355, 429	Dimethylpolysiloxane	Zerfall des Septums
149	Phtalate	Dichtungen, Vinyl-/Kunststoff-Handschuhe

12 Anhang E: Ergebnisse aus der Analyse des Grob-Testgemisches

Das Testgemisch wurde in unverdünnter Form injiziert – die jeweiligen Konzentrationen sind in Tabelle 8 aufgeführt. Abbildung 50 und Abbildung 51 zeigen das Totalionenstrom-Chromatogramm des Testgemisches. Die initiale Ofentemperatur betrug 40°C, welche für 2 Minuten gehalten wurde. Anschließend wurde die Temperatur mit einer Rate von 10°C min⁻¹ auf 300°C erhöht und auf dieser Endtemperatur für weitere 10 Minuten gehalten. Der Split-/Splitlos-Injektor wurde auf einer konstanten Temperatur von 250°C und mit einem 1:50 Split betrieben. Das Injektionsvolumen betrug 0,5 μL. Bei dem verwendeten Liner handelte es sich um einen Sky[®] Straight Inlet Liner mit Glaswolleeinsatz und 3,5 mm Innendurchmesser (Restek, Bellefonte, PA, USA). Der Trägergasfluss betrug 1,0 mL min⁻¹.

Die Retentionszeiten, Peakflächen und- höhen, sowie die relative Standardabweichungen der 12 Substanzen sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 8: Konzentrationen des Grob-Testgemisches. Die Analyten sind in Dichlormethan gelöst.

Peak Nr.	Analyt	CAS-Nr.	Konzentration [ng μL-1]	Peak Nr.	Analyt	CAS-Nr.	Konzentration [ng µL-1]
1	2,3-Butandiol	6982-25-8	529,2	7	2-Ethylhexansäure	149-57-5	381,2
2	n-Decan	124-18-5	282,0	8	2,6-Dimethylanilin	87-62-7	320,8
3	1-Octanol	111-87-5	360,0	9	Methyldecanoat	110-42-9	421,6
4	n-Undecan	1120-21-4	290,8	10	Methylundecanoat	1731-86-8	419,6
5	n-Nonanal	124-19-6	400,8	11	Dicyclohexylamin	101-83-7	410,0
6	2,6-Dimethylphenol	576-26-1	320,4	12	Methyllaurat	111-82-0	311,2

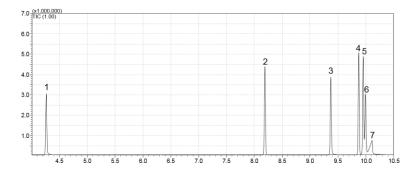


Abbildung 50: Totalionenstrom-Chromatogramms des Grob-Testgemisches (4,0 - 10,5 min).

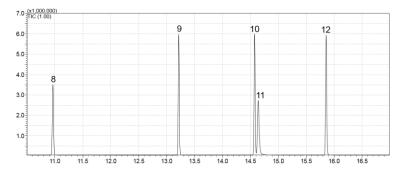


Abbildung 51: Totalionenstrom-Chromatogramms des Grob-Testgemisches (10,5 - 17,0 min).

Tabelle 9: Durch Mehrfachmessung ermittelte Retentionszeiten, Peakflächen und- höhen sowie relative Standardabweichungen von 12 Substanzen eines Grob-Testgemisches.

Peak 1: 2,3-Butandiol					
Nr.	t _R [min]	Peak- fläche	Peak- höhe		
1	4,265	4310496	2859134		
2	4,264	4457264	2974435		
3	4,265	4328593	2909837		
4	4,266	4440266	2844730		
5	4,263	4128896	2803924		
%RSD	0,027	3,0	2,3		

Peak 5: Nonanal				
Nr.	t _R [min]	Peak- fläche	Peak- höhe	
1	9,957	6539408	4620557	
2	9,955	6833722	4629056	
3	9,957	6679098	4660614	
4	9,955	6732018	4606269	
5	9,955	6636564	4624918	
%RSD	0,011	1,6	0,4	

Peak 9: Methyldecanoat					
Nr.	t _R [min]	Peak- fläche	Peak- höhe		
1	13,221	7837882	5559513		
2	13,22	8080851	5716475		
3	13,22	7892017	5726751		
4	13,222	7961990	5872344		
5	13,221	7870410	5495224		
%RSD	0,006	1,2	2,6		

Peak 2: n-Decan				
Nr,	t _R [min]	Peak- fläche	Peak- höhe	
1	8,192	5756827	4236878	
2	8,19	6071910	4469403	
3	8,191	5895551	4168378	
4	8,191	5980183	4338901	
5	8,19	5923573	4401606	
%RSD	0,010	2,0	2,8	

Peak 6: 2,6-Dimethylphenol				
Nr,	t _R [min]	Peak- fläche	Peak- höhe	
1	9,998	4110601	2869265	
2	9,998	4114928	2777637	
3	9,997	4038149	2852312	
4	9,997	4023752	2782659	
5	9,998	3899404	2712557	
%RSD	0,005	2,2	2,3	

Peak 10: Methylundecanoat				
Nr,	t _R [min]	Peak- fläche	Peak- höhe	
1	14,58	7961641	5567425	
2	14,58	8259603	5716057	
3	14,58	7935788	5781561	
4	14,579	8040953	5814242	
5	14,579	8032173	5740873	
%RSD	0,004	1,6	1,7	

	Peak 3: 1-Octanol					
Nr,	t _R [min]	Peak- fläche	Peak- höhe			
1	9,376	5344517	3659942			
2	9,374	5448227	3968950			
3	9,374	5348715	3765791			
4	9,375	5450487	3895096			
5	9,374	5385796	3923195			
%RSD	0,010	1,0	3,3			

Peak 7: 2-Ethylhexansäure				
Nr,	t _R [min]	Peak- fläche	Peak- höhe	
1	10,113	2406097	682417	
2	10,113	2502588	708811	
3	10,113	2497614	695114	
4	10,116	2416185	700580	
5	10,115	2578655	715853	
%RSD	0,014	2,9	1,8	

Peak 11: Dicyclohexylamin				
Nr,	t _R [min]	Peak- fläche	Peak- höhe	
1	14,651	5546098	2461815	
2	14,646	5895328	2563809	
3	14,645	5597416	2605649	
4	14,643	5581260	2566061	
5	14,651	5571992	2451999	
%RSD	0,025	2,6	2,7	

Peak 4: n-Undecan					
Nr,	t _R [min]	Peak- fläche	Peak- höhe		
1	9,878	6595981	4794431		
2	9,877	6851920	5024569		
3	9,876	6682796	4818984		
4	9,876	6732893	4868221		
5	9,876	6640615	4819268		
%RSD	0,009	1,5	1,9		

Peak 8: 2,6-Dimethylanilin									
Nr,	t _R [min]	Peak- fläche	Peak- höhe						
1	10,966	5217242	3239800						
2	10,965	5387545	3493849						
3	10,966	5236310	3329197						
4	10,965	5219503	3308558						
5	10,964	5108519	3289826						
%RSD	0,008	1,9	2,9						

Peak 12: Methyllaurat									
Nr,	t _R [min]	Peak- fläche	Peak- höhe						
1	15,861	8219534	5711356						
2	15,861	8651035	6023477						
3	15,862	8200154	5728329						
4	15,861	8292687	5713428						
5	15,861	8262679	5512456						
%RSD	0,003	2,2	3,2						

13 Anhang F: Stoffeigenschaften der Pestizide

Tabelle 10: Interpretation der Zahlenwerte chemischer und physikalischer Stoffeigenschaften von Pestiziden (PPDB, 2014).

Parameter	Schwellenwert	Interpretation
Wasser-	< 50	Niedrige Wasserlöslichkeit
löslichkeit	50 - 500	Moderate Wasserlöslichkeit
[mg L-1]	> 500	Hohe Wasserlöslichkeit
	< 2,7	Geringe Bioakkumulation
\logK_{ow}	2,7 – 3	Moderate Bioakkumulation
	> 3,0	Hohe Bioakkumulation
	< 1E-04	Nichtflüchtig
Dampfdruck [Pa]	1E-04 - 1E-02	Zwischenzustand
[- "]	> 1E-02	Flüchtig
Henry-Konstante bei 20°C	> 100	Flüchtig
in der Flüchtigkeitsform	0,1 - 100	Moderat flüchtig
[Pa m ³ mol ⁻¹]	< 0,1	Nichtflüchtig
	< 30	Nicht-persistent
DT50 (Boden, aerob) und	30 - 100	Moderart-persistent
DT50 (Wasser-Sediment) [d]	100 - 365	Persistent
.,	> 365	Sehr persistent
	< 1	Schnell
DT50 (Photolyse in	1 - 14	Moderat-schnell
wässriger Lösung, pH 7) [d]	14 - 30	Langsam
	> 30	Stabil
	< 30	Nicht-persistent
DT50	30 - 100	Moderart-persistent
(Hydrolyse) [d]	100 - 365	Persistent
	> 365	Sehr persistent
	< 15	Sehr mobil
	15 - 75	Mobil
$ m K_{oc}/ m ~K_{foc} \ [mL~g^{-1}]$	75 - 500	Moderat-mobil
լու ց յ	500 - 4000	Gering-mobil
	> 4000	Immobil
	> 2,8	Hohe Auswaschbarkeit ins Grundwasser
GUS-Index [-]	2,8 - 1,8	Zwischenzustand
נ־ז	< 1,8	Geringe Auswaschbarkeit ins Grundwasser

Tabelle 11: Allgemeine physikalisch-chemische Eigenschaften der untersuchten Pestizide. Werte, falls nicht anders vermerkt, aus PPDB (2014).

Wirkstoff	Wirkstoffgruppe (Börner et al., 2009)	CAS- Nummer	Molare Masse	Monoiso- topische (molare) Masse	Siedepunkt	Wasser- löslichkeit	log Kow (EURL, 2014)	Dampfdruck (EURL, 2014)	Henry- Konstante (20°C) (EURL, 2014)	pKa (25°C)
			[g mol ⁻¹]	[g mol-1]	[°C]	[mg L-1]	[-]	[Pa]	[Pa m³ mol-1]	[-]
Boscalid	Carboxamide	188425-85-6	343,2	342	300 (Zersetzung)	4,6 (20 °C)	2,96 (21°C; pH 7)	7E-07 (20°C)	5,18E-08	Keine Dissoziation
Cyprodinil	Anilinopyrimidine	121552-61-2	225,3	255,1	>360 (FAO, 2009)	13 (20°C, pH 7)	4 (25°C, pH 5 - 9)	5,1E-04 (25°C)	6,60E-03	4,44 / schwache Base
Fludioxonil	Phenylpyrrole	131341-86-1	248,2	248	306 (Zersetzung)	1,8 (25°C, pH-un- abh,)	4,12 (25°C, pH-unabh,)	3,9E-07 (25°C)	5,40E-05	0 / pKa(1) Base; pKa(2) 14,1 Säure
Fluopicolid	Acylpicolide	239110-15-7	383,6	382	320 (Zersetzung)	2,8 (20°C, pH 7)	2,9 (20°C; pH 7)	3,03E-07 (20°C)	4,15E-05	Keine Dissoziation
Fluopyram	Benzamide	658066-35-4	396,8	396	300 (Zersetzung)	16 (20°C)	3,3 (20°C; pH 7)	1,2E-06 (25 °C)	2,98E-05	-
Indoxacarb	Oxadiazine	144171-61-9	527,8	527,1	-	0,2 (25°C)	4,65 (20°C; pH 7)	2,5E-08 (25°C)	6,00E-05	Keine Dissoziation
Metrafenon	Benzophenone	220899-03-6	409,3	408,1	310 (Zersetzung)	0,492 (20°C)	4,3 (20°C; pH 7)	1,53E-04 (25°C)	1,32E-01	Keine Dissoziation
Myclobutanil	Triazole	88671-89-0	288,8	288,1	390,8	124 (20°C; pH 3-5)	2,89 (20°C; pH 7)	1,98E-04 (20°C)	4,33E-04	2,3 / starke Säure
Penconazol	Triazole	66246-88-6	284,2	283,1	>360 (BVL, 2011)	73 (20°C; pH 6,7)	3,72 (25°C; pH 5,7)	3,7E-04 (25°C)	6,60E-04	1,51 / sehr schwache Base
Proquinazid	Quinazolinone	189278-12-4	372,2	372	367 (Zersetzung)	0,97 (25°C, pH-un- abh,)	5,5 (25°C)	9E-05 (25°C)	3,00E-02	Keine Dissoziation
Quinoxyfen	Chinoline	124495-18-7	308,1	307	-	0,116 (20°C; pH 6,45)	4,66 (20°C; pH 6,6)	1,2E-05 (20°C)	3,19E-02	Keine Dissoziation
Tebuconazol	Triazole	107534-96-3	307,8	307,1	350 (Zersetzung)	36 (20°C; pH 7 - 9)	3,7 (20°C; pH 7)	1,3E-06 (20°C)	1,00E-05	5,0

Tabelle 12: Kenngrößen zur Degradation, Adsorption und Mobilität der untersuchten Pestizide. Werte aus PPDB (2014).

Wirkstoff	DT50 (Labor, 20°C)	DT50 (Feld)	DT90 (Labor, 20°C)	DT90 (Feld)	DT50 (Wasser- Sediment)	DT50 (Photolyse in wässriger Lösung, pH 7)	DT50 (Hydrolyse)	K_{sw}	\mathbf{K}_{oc}	\mathbf{K}_{f}	$\mathbf{K}_{\mathrm{foc}}$	1/n	GUS- Index
	[d]	[d]	[d]	[d]	[d]	[d]	[d]	Lin	near		Freundlic	h	[-]
Boscalid	246	118	442	365	-	30	Stabil von pH 4 - pH 9 bei 20°C	-	-	12,6	772	0,864	2,56
Cyprodinil	53	45	120	-	142	13,5	Stabil von pH 4 - pH 9 bei 20°C	-	-	21,27	2277	0,888	1,01
Fludioxonil	239	20.5	-	-	575	10	Stabil von pH 5 - pH 9 bei 20°C	-	145600	3312	132100	1	2,48
Fluopicolid	271	138.8	900	720	1117	64	Stabil, nicht pH-sensitiv	-	-	4,2	321,1	0,9	3,63
Fluopyram	309	118.8	723	833	1077	21	Stabil bei pH 5, 7 & 9 und 50°C	-	-	4,41	278,9	0,827	3,87
Indoxacarb	5	20	-	-	6	3	Stabil bei pH 5, 0,3 Tage bei pH 9 und 25°C	-	6450	-	-	-	0,23
Metrafenon	250.6	146	909	734	9,3	6,2	Stabil für 5 Tage bei pH 5 bis pH 9 bei 50°C	231	7061	55,5	3015	0,91	1,22
Myclobutanil	365	35	1175	365	626	15	Stabil für 5 Tage bei pH 5 bis pH 9 bei 50°C	-	=	5,03	517	0,88	3,54
Penconazol	117	90	-	-	853	4	Stabil von pH 4 - pH 9 bei 25 und 50°C	-	=	27,9	2205	0,816	1,36
Proquinazid	60	30.5	483	100	70,5	0,03	Stabil von pH 4 - pH 9 bei 20°C	-	-	194	12870	0,94	-0,18
Quinoxyfen	374	97	-	560	127	0,8	75 Tage bei pH 5 und 25°C, stabil bei pH 7 und pH 9	=	-	-	22929	=	-0,72
Tebuconazol	365	47.1	-	177	365	stabil	Stabil von pH 5 - pH 9 bei 25°C	-	-	12,69	769	0,84	2

14 Anhang G: Physikalische und chemische Wasserparameter der Proben

Tabelle 13: Probenahmestellen, Zeitpunkte der Probenahme und physikalisch-chemische Eigenschaften der untersuchten Wasserproben kurz vor der Extraktion.

Probenahmestelle	Anzahl der analysierten Proben	Datum Probenahme	Elektrische Leitfähigkeit	pН	gelöster Sauerstoff	Sauerstoff- sättigung	Wassertempe- ratur	
			[µS cm ⁻¹]	[-]	[mg L-1]	[%]	[°C]	
Versickerungsbecken Oberrimsingen	2	07.07.2014	188	7,3	8,4	86	14,8	
Versickerungsbecken Niederrimsingen	1	07.07.2014	165	7,2	5,8	59	14,5	
Versickerungsbecken Golfclub Tuniberg	2	07.07.2014	134	7,3	7,6	78	14,8	
Oberflächenabfluss Blankenhornsberg 3a	1	22.07.2014	109	7,3	6,1	61	13,8	
Oberflächenabfluss Blankenhornsberg 3b	3	22.07.2014	58	7,0	8,1	81	14,1	
Beregnungsbrunnen Staatsweingut	2	22.07.2014	963	7,9	7,7	79	15,1	
Leitungswasser Staatsweingut Blankenhornsberg	1	22.07.2014	814	7,7	8,7	89	14,5	
Beregnungsbrunnen Staatsweingut	2	07.08.2014	812	7,7	9,3	94	14,8	
Beregnungsbrunnen Staatsweingut	3	07.08.2014	1186	7,4	7,4	77	15,3	
Oberflächenabfluss Blankenhornsberg 3c	1	13.08.2014	46	6,6	5,3	55	15,2	
Laufbrunnen Blankenhornsberg	1	13.08.2014	810	7,6	9,5	97	15,0	
Laufbrunnen Blankenhornsberg	2	16.08.2014	808	7,8	8,4	86	14,6	
Laufbrunnen Blankenhornsberg	2	29.08.2014	808	7,8	10,2	101	13,5	
Beregnungsbrunnen Staatsweingut	3	03.09.2014	1186	7,6	10,8	108	13,6	
Laufbrunnen Blankenhornsberg	3	03.09.2014	805	7,8	10,6	105	13,6	

100 Erklärung

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Masterarbeit selbständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht.

Ort, Datum

Freiburg, 11.12.2014

Unterschrift

Finnian Freeling