

Utveckling av analysmetod för mycket polära bekämpningsmedel i vatten

| | |
|--|--|
| <p>Rapportförfattare Ove Jonsson Rikard Tröger Elin Eriksson Mikaela Gönczi</p> | <p>Utgivare Sveriges lantbruksuniversitet SLU Centrum för kemiska bekämpningsmedel i miljön (CKB) Postadress SLU Box 7070 750 07 Uppsala Telefon 018-67 10 00</p> |
| <p>Rapporttitel och undertitel Utveckling av analysmetod för mycket polära bekämpningsmedel i vatten</p> | <p>Beställare Naturvårdsverket 106 48 Stockholm Finansiering Miljögiftsamordning/Giftfri miljö/Screening</p> |
| <p>Nyckelord för plats NA</p> | |
| <p>Nyckelord för ämne Bekämpningsmedel, växtskyddsmedel, tillväxtreglerare, miljöövervakning, ytvatten, aminopyralid, daminozid, klormekvatklorid, mepikvatklorid, cis-2,6-dimetylmorfolin</p> | |
| <p>Tidpunkt för insamling av underlagsdata NA</p> | |
| <p>Sammanfattning</p> <p>Vissa bekämpningsmedel och transformationsprodukter till bekämpningsmedel är för polära för att kunna hanteras med de ackrediterade analysmetoder som idag används inom den svenska miljöövervakningen. Syftet med detta projekt var att ta fram en ny analysmetod för denna typ av ämnen. Av de fem studerade ämnena var tre stycken tillväxtreglerare, klormekvatklorid, mepikvatklorid och daminozid, som används i växthusodling av prydnadsväxter och som stråförlängningsmedel i korn, vete, råg, rågvete, havre och raps. Övriga ämnen var herbiciden aminopyralid, samt cis-2,6-dimetylmorfolin som är en transformationsprodukt till fungiciden fenpropimorf.</p> <p>En ny extraktionsmetod, baserad på två olika jonbytarmaterial, har tagits fram och kombinerats med en ny vätskekromatografisk metod kopplad till masspektrometrisk detektion (LC-MS/MS). Metoden, benämnd OMK 64, utvärderades genom tillsatser till sparade ytvattenprover från miljöövervakningen och uppvisar acceptabel prestanda, främst för klormekvatklorid, cis-2,6-dimetylmorfolin, mepikvatklorid samt aminopyralid. Daminozid har både sämre extraktionseffektivitet och kromatografisk kvalitet än övriga ämnen och det är tveksamt om detta ämne kommer kunna inkluderas i en validerad metod.</p> <p>Framtida mål är dels att, inom ramen för den fortsatta valideringen av OMK 64, genomföra en mindre screening på relevanta miljöövervakningsvatten provtagna under appliceringssäsongen, samt att försöka anpassa den nya metoden till att kunna inkluderas i analyspaketet för den tidsintegrerade TIMFIE-provtagaren som tidigare utvecklats av SLU Centrum för kemiska bekämpningsmedel i miljön, CKB.</p> <p>Tanken är också att andra ämnen som i framtiden provas in i övriga analysmetoder, men som inte fungerar på grund av att det är för polära, även ska utvärderas i denna nya metod.</p> | |

Development of an analytical method for highly polar pesticides in water

English summary

Some pesticides and transformation products to pesticides are too polar to be handled with the accredited analysis methods that are currently used in Swedish environmental monitoring. The aim of this project was to develop a new analysis method for this type of substances. Of the five substances studied, three were growth regulators, chlormequat chloride, mepiquat chloride and daminozide, which are used in greenhouse cultivation of ornamental plants and as straw shortening agents in barley, wheat, rye, rye wheat, oats and rape. Other substances were the herbicide aminopyralid, and cis-2,6-dimethylmorpholine, which is a transformation product to the fungicide fenpropimorph.

A new extraction method, based on two different ion exchange materials, has been developed and combined with a new liquid chromatographic method and mass spectrometric detection (LC-MS/MS). The method, named OMK 64, was evaluated by spiking of surface water samples from environmental monitoring and shows acceptable performance, mainly for chlormequat chloride, cis-2,6-dimethylmorpholine, mepiquat chloride and aminopyralid. Daminozide has both poorer extraction efficiency and chromatographic quality than the other substances and it is doubtful whether this substance will be able to be included in a validated method.

Future goals are partly to, as part of the continued validation of OMK 64, carry out a small screening of relevant environmental monitoring waters sampled during the application season, as well as to try to adapt the new method to be included in the analysis package for the time-integrated TIMFIE sampler previously developed by SLU Center for chemical pesticides in the environment, CKB.

The idea is also that other substances which in the future are tested in other analysis methods, but which do not work because they are too polar, should also be evaluated in this new method.

Utveckling av analysmetod för mycket polära bekämpningsmedel i vatten

Bakgrund och syfte

Det finns vissa växtskyddsmedel (bekämpningsmedel, pesticider) godkända i Sverige som är mycket polära (hydrofila), t.ex. flera av medlen som används som tillväxtreglerare (TR). Dessa kan inte analyseras med de analysmetoder som används idag inom den nationella miljöövervakningen, eftersom dessa metoder främst bygger på ämnens lipofila egenskaper. Det finns därför ett behov av att utveckla ny metodik för att kunna analysera även dessa mycket polära substanser i ytvatten och grundvatten.

Användningen av tillväxtregleringsmedel är stor bl.a. i prydnadsväxtodling i växthus. I screeningen av växtskyddsmedel i vattendrag som avvattnar växthusområden i södra Sverige 2017-2018 (finansierad av Naturvårdsverket, CKB rapport 2019:1) visade användarundersökningen att de två medel som användes oftast var daminozid och klormekvatklorid, båda tillväxtreglerare som inte ingår i analysmetoderna som används inom den svenska miljöövervakningen. Växtskyddsmedel läcker ut från växthus och det pågår diskussioner (bl.a. i gruppen ”Undvika växthusläckage” instiftad av Växtskyddsrådet) om hur vi i Sverige kan bli bättre på att följa halterna i vattendrag utanför växthus som ett led i åtgärdsarbetet. För att kunna följa läckaget behöver vi kunna analysera de ämnen som oftast används, inklusive tillväxtreglerare.

Tillväxtreglerare används även inom jordbruket på t.ex. stråsäd och användningen har ökat under senare år. Innan 2011 var de bara godkända för användning i korn, men sedan dess har flera medel blivit godkända även i andra grödor som vete, råg, rågvete, havre och raps. Troligt är att denna ökning kan komma att fortsätta med tanke på framtida klimatförändringar med ett förändrat nederbördsmonster. Tre av fyra tillväxtreglerare som används i typområdena ingår inte i dagens kemiska analysmetoder (trinexapak-etyl analyseras, medan klormekvatklorid, mepikvatklorid och etefon inte analyseras).

Mycket polära ämnen kan även finnas inom andra grupper av växtskyddsmedel, exempelvis herbiciden (H) aminopyralid. Vidare kan vissa transformationsprodukter (TP) vara små och polära vilket gör att utvecklandet av en metod för att kunna analysera denna typ av ämnen kan användas i flera olika sammanhang.

Syftet med projektet var att utveckla en ny metod för dessa extremt polära ämnen i vatten, inkluderande provupparbetning, vätskekromatografisk separation samt masspektrometrisk detektion. Metoden har internt nummer OMK 64 i serien av metoder utvecklade av OMK-laboratoriet på SLU.

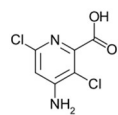
Metod

Substanser

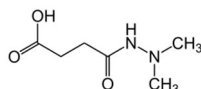
Ett flertal ämnen utvärderades avseende masspektrometrisk detektion, möjlighet att få tillräcklig retention på det kromatografiska systemet samt att extrahera ämnet från vatten med hjälp av fastfasextraktion. Av de undersökta ämnena kunde *aminopyralid (H)*, *daminozid (TR)*, *klormekvatklorid (TR)*, *mepikvatklorid (TR)* och *cis-2,6-dimetylmorfolin* (transformationsprodukt till fungiciden (F) fenpropimorf) inkluderas i metoden.

Klormekvatklorid och mepikvatklorid bestäms som sina respektive katjoner (klormekvat⁺ och mepikvat⁺). Ämnen som inte kunde inkluderas var etefon (TR), etefonhydroxy (TP till etefon), hymexazol (F) och trifluorättiksyra, TFA, (TP).

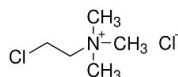
Strukturer



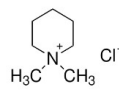
Aminopyralid



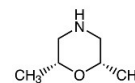
Daminozid



Klormekvatklorid



Mepikvatklorid



Cis-2,6-dimetylmorfolin

Provupparbetning

För att koncentrera de sökta ämnena, och i viss mån rena bort interfererande ämnen i provvattnet, används fastfasextraktion (solid phase extraction, SPE). Då ämnena utgörs av både anjoner och katjoner (vid naturligt förekommande pH) används både anjonbytarmaterial och katjonbytarmaterial. För att förenkla processen valdes samma format som tidigare använts för den, av CKB framtagna, tidsintegrerade TIMFIE-provtagaren. Där utnyttjas SPE-kolonner i kapselformat (Chromafix från Macherey-Nagel, Tyskland). Dessa har Luerkopplingar i båda ändarna, vilket gör att man lätt kan seriekoppla två eller flera kolonner med olika egenskaper för att bygga en så bred extraktionsmetod som möjligt. För denna metod, designad att extrahera små polära syror och baser, används en polymerbaserad, svag anjonbytare (WAX, Chromafix HR-XAW, small, Prod. No. 731771, Macherey-Nagel) seriekopplad med en, också polymerbaserad, svag katjonbytare (WCX, Chromafix HR-XCW, small, Prod. No. 731774, Macherey-Nagel). Observera att denna tillverkare benämner sina WAX och WCX kolonner XAW respektive XCW. Efter tillsats av internstandarder suges 50 ml provvatten genom de två SPE-kolonnerna där de sökta ämnena fastnar. Kolonnerna tvättas, torkas med kvävgas och elueras sedan med både sur metanol (myrsyra) och basisk metanol (ammoniak). Det poolade extraktet dunstas in till torrhet under kvävgasflöde i vattenbad (40 °C) och återlöses sedan i 0,25 ml buffertlösning. Detta ger således en teoretisk uppkoncentrering på 200 gånger, antagande 100% extraktionseffektivitet.

Tack vare SPE kolonnernas kapselformat kan de kopplas till en vätskehanteringspump med vars hjälp både konditioneringssteget (förbereda kolonnerna för extraktion) och elueringssteget, beskrivet ovan, kan automatiseras och batcher om sex prover hanteras parallellt. Detta spar tid och minimerar risken för manuella hanteringsfel.

Kromatografiskt system

Ser man till vetenskaplig litteratur har denna typ av mycket polära ämnen tidigare analyserats med hjälp av HILIC-kromatografi (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography). Inom ramen för detta projekt och i tidigare försök att hantera dessa

ämnen har ett flertal olika HILIC system, med kolonner från flera olika tillverkare, utvärderats med skiftande framgång. Dock har slutsatsen blivit att dessa system inte är generella nog avseende ämnens fysikaliskkemiska egenskaper och heller inte robusta nog att kunna användas som rutinmetod för naturliga vattenprover, som uppvisar stor variation i sammansättning mellan lokaler och tidpunkter.

Istället för HILIC utvärderades till slut en typ av kromatografikolonn (XSelect HSS T3, Waters, USA) som i stort sett fungerar som en klassisk C18-kolonn med hydrofob interaktion men som också har inslag av hydrofil interaktion, vilket även kan ge viss retention av extremt polära ämnen. Principen för hur man väljer mobilfaser, dvs. buffert och lösningsmedel som pumpas genom analyskolonnen, följer sedan de för vanliga LC-MS/MS metoder, exempelvis de som redan används inom dagens miljöövervakning av övriga bekämpningsmedel. Här användes en acetonitrilgradient i vatten, där båda faserna innehöll 10 mmol/l ammoniumformiat och 0,1% myrsyra.

Masspektrometrisk detektion

Ämnens förmåga att bilda detekterbara molekylioner och dotterfragment (kvantifieringsjon och kvalificeringsjoner), både som positiva och negativa joner, utvärderades på ett trippelkvadrupol-instrument (MS/MS) från Agilent (QQQ 6460, Agilent Technologies, USA) med elektroprayjonisering (ES+ respektive ES-). Trots att två av ämnena, aminopyralid och daminozid, är syror bestäms alla ämnen som positiva joner i det aktuella systemet. För studerade joner, retentionstider, val av internstandard, och uppskattade detektionsgränser se Tabell 1.

Tabell 1. Ämnen inkluderade i metod OMK 64 (mars 2024), deras CAS nummer, studerade jonövergångar i massdetektorn (kvantifieringsjon och 1-2 kvalificeringsjoner), retentionstider, valda internstandarder, samt metodens preliminära detektionsgränser (LOD) angivna i mikrogram per liter ($\mu\text{g/l}$).

| Ämne | CAS Nr | Jonövergång 1 | Jonövergång 2 | Jonövergång 3 | Retentions-tid (min) | Intern-standard | LOD ($\mu\text{g/l}$) |
|-------------------------|-------------|---------------|---------------|---------------|----------------------|-----------------|-------------------------|
| Aminopyralid | 150114-71-9 | 207,0 > 160,9 | 207,0 > 83,0 | 207,0 > 133,9 | 2,9 | Mepikvat-D3 | 0,2 |
| Daminozid* | 1596-84-5 | 161,0 > 143,0 | 161,0 > 44,0 | - | 2,5 | Daminozid-D6 | NA |
| Klormekvat (anjon) | 7003-89-6 | 122,1 > 58,0 | 122,1 > 59,0 | 122,1 > 63,0 | 1,9 | Klormekvat-D4 | 0,002 |
| Mepikvat (anjon) | 15302-91-7 | 114,0 > 58,0 | 114,0 > 98,0 | 114,0 > 42,0 | 2,2 | Mepikvat-D3 | 0,02 |
| Cis-2,6-dimetylmorfolin | 6485-55-8 | 116,1 > 98,1 | 116,1 > 68,2 | 116,1 > 70,2 | 2,4 | Klormekvat-D4 | 0,005 |

* Daminozid: tveksamt om detta ämne kan inkluderas i final metod.

Resultat och diskussion

Som framgår av Tabell 1 är detektionsgränserna mycket varierande för de studerade ämnena. Sämst fungerar *daminozid*, tillväxtreglerare som i Sverige endast är godkänd för växthusanvändning, med både lågt och varierande extraktionsutbyte och otillfredsställande kromatografi. Resultaten för *daminozid* har varierat stort mellan olika delförsök och det är tveksamt om ämnet kommer kunna inkluderas i den finala metoden. Positivt är tillgången till en isotopinmärkt internstandard, *daminozid-D6*, vilket delvis kan kompensera för osäkerheter i bestämningen. Detektionsgränsen går att förbättra något om man placerar de två SPE-kolonnerna i omvänd ordning, $WCX > WAX$ istället för $WAX > WCX$. Denna förbättring kan även ses för *aminopyralid* medan övriga tre ämnen uppför sig likartat för de båda sätten att montera SPE-kolonnerna.

Att valet ändå föll på *monteringsordningen* för *SPE-kolonnerna* $WAX > WCX$ beror dels på att det visade sig påverka indunstning av extrakten med betydligt längre indunstningstid om kolonnerna sattes i ordningen $WCX > WAX$. Orsaken till detta kunde inte klarläggas. Ett annat starkt skäl att montera kolonnerna i ordningen $WAX > WCX$ är att i TIMFIE metoderna OMK 60 och OMK 61 (motsvarande OMK 57 och OMK 58 inom miljöövervakningen) ingår redan *WAX*-kolonnen, sist i serie med två andra *SPE*-kolonner, varför det blir enklare att i framtiden modifiera denna tidsintegrerade provtagnings teknik till att även kunna inkludera ämnena studerade i OMK 64.

Klormekvatklorid var det ämne som bedömdes ha högst prioritet vid framtagandet av denna nya metod, baserat på användningen i typområdena. *Klormekvatklorid* har i Sverige inte längre något godkännande för användning i växthus men får användas i stråsäd som vete, korn råg, rågvete och havre. Detta ämne har lägst detektionsgräns i metoden och har tack vare sin isotopinmärkta internstandard, *klormekvat-D4*, alla förutsättningar att kunna bestämmas med god precision och vid relevanta nivåer.

Också *fenpropimorfs* transformationsprodukt *cis-2,6-dimetylmorfolin* har låg detektionsgräns i metoden. Här finns ingen isotopinmärkt internstandard att tillgå, men data så lång visar att denna förening inte verkar vara så känslig för matriseffekter från olika vattentyper vare sig vad gäller extraktionseffektivitet eller kromatografi.

Mepikvat uppvisar något sämre signal på instrumentet än *klormekvat* och därmed högre detektionsgräns. Den isotopinmärkta internstandarderna ger dock goda förutsättningar för stabila bestämningar av ämnet.

Aminopyralid är som nämnts ovan känslig för i vilken ordning *SPE*-kolonnerna sitter och med den nu valda uppställningen är extraktionsutbytet cirka hälften av det vid omvänd kolonnordning. Detta i kombination med att det inte finns någon isotopinmärkt internstandard gör att risken för stor spridning i data ökar. Vid framtida fortlöpande valideringsarbete bör därför resultat utvärderas med både *mepikvat-D3* och *klormekvat-D4* som internstandarder för att kunna välja den som ger mest robust bestämning med lägst spridning.

Selektiviteten för metoden ser generellt sett bra ut och det finns i de testade ytvattenproverna inga interferenser som stör de valda jonövergångarna. Detta gäller dock med viss reservation för daminozid vars kromatografi är matriskänslig och uppvisar splittade toppar, varför extra försiktighet måste iakttas vid utvärderingen av detta ämne.

Matris effekter i extraktionssteget och i LC-MS/MS-bestämningen tycks vara störst för syrorna daminozid och aminopyralid. Båda dessa effekter inkluderas i precisionsbestämningen som görs i det fortlöpande kvalitetsarbetet då metoden kommer i bruk, genom tillsatser till ett större antal (>10) relevanta vatten som kommer in till laboratoriet för analys. Generellt tycks både extraktionen med jonbytarmaterial och kromatografen som bygger på polära interaktioner med analyskolonnens stationärfas vara mer matriskänslig än motsvarande för lipofilt baserad extraktion och kromatografi.

Framtida arbete kommer att inkludera en utökad valideringsanalys med tillsatser på olika koncentrationsnivåer till cirka 10 relevanta vatten, insamlade i typområdena under den period då främst klormekvatklorid och mepikvatklorid förväntas användas. Genom att invänta dessa vattenprover, istället för att använda sparat vatten eller vatten insamlat under tidig vår, kommer detta valideringsarbete även ge relevant information om förekomst av dessa ämnen i ytvatten från typområdena. Detta kommer då fungera som en mindre pilotstudie som kan ligga till grund för beslut om framtida mer omfattande screeningstudier, alternativt kontinuerlig miljöövervakning i typområden.

En ytterligare framtida ambition är att *anpassa TIMFIE-metoden* till att även kunna extrahera och bestämma de ämnen som testats in i OMK 64-metoden. Detta skulle innebära att en WCX-kolonn monteras i serie med de i TIMFIE-metoden befintliga hydrofoba kolonnerna HR-P och HLB (Macherey-Nagel) och anjonbytarkolonnen WAX (samma som nu även används i OMK 64). Efter extraktion sätts internstandarder för alla metoderna (OMK 60/61/64) till kolonnpaketet varefter HR-P, HLB och WAX-kolonnerna elueras tillsammans enligt OMK 60/61 och XCW kolonnen elueras separat. För bestämning motsvarande OMK 64 skulle sedan en fraktion av OMK 60/61-extraktet poolas med XCW-extraktet och analyseras med LC-MS/MS metoden för OMK 64.

Tanken är också att andra ämnen som i framtiden prövas in i övriga analysmetoder, men som inte fungerar på grund av att det är för polära, också ska kunna utvärderas i metod OMK 64.