

Identifizierung und Charakterisierung von Pestizidmetaboliten in pflanzlichen Matrices mittels Quadrupol-Flugzeit- und Tandem- Massenspektrometrie

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
Fachbereich Chemie der Universität Hamburg
aus GALAB Laboratories GmbH, Hamburg

vorgelegt von
Anna Bauer

Hamburg 2017

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 2013 bis August 2017 bei GALAB Laboratories GmbH unter der wissenschaftlichen Betreuung von Herrn Dr. Jens Lütjohann, Herrn Dr. Jürgen Kuballa, Herrn Dr. Eckard Jantzen und Herrn Prof. Dr. Sascha Rohn angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Sascha Rohn
2. Gutachter: Prof. Dr. José A.C. Broekaert

Tag der Disputation: 16.02.2018

Publikationsliste

Beiträge zur kumulativen Dissertation

Peer-reviewed Artikel

Anna Bauer, Juergen Kuballa, Sascha Rohn, Eckard Jantzen, Jens Luetjohann. Evaluation and validation of an ion mobility quadrupole time-of-flight mass spectrometry pesticide screening approach. *Journal of Separation Science*, **2018**, DOI: 10.1002/jssc.201701059.

Anna Bauer, Jens Luetjohann, Franziska S. Hanschen, Monika Schreiner, Jürgen Kuballa, Eckard Jantzen, Sascha Rohn. Identification and characterization of pesticide metabolites in *Brassica* species by liquid chromatography travelling wave ion mobility quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-TWIMS-QToF-MS). *Food Chemistry*, **2018**, 244, 292-303. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.09.131.

Anna Bauer, Jens Luetjohann, Sascha Rohn, Eckard Jantzen, Jürgen Kuballa. Development of a suspect screening strategy for pesticide metabolites in fruit and vegetables by UPLC-QToF-MS. *Food Analytical Methods*, **2018**, DOI: 10.1007/s12161-017-1143-4.

Anna Bauer, Jens Luetjohann, Sascha Rohn, Juergen Kuballa, Eckard Jantzen. Determination of fosetyl and phosphonic acid at 0.010 mg/kg level by ion chromatography tandem mass spectrometry (IC-MS/MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2018**, 66, 346-350. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b03464.

Anna Bauer, Jens Luetjohann, Sascha Rohn, Juergen Kuballa, Eckard Jantzen. Ion chromatography tandem mass spectrometry (IC-MS/MS) multimethod for the determination of highly polar pesticides in plant-derived commodities. *Food Control*, **2018**, 86, 71-76. DOI: 10.1016/j.foodcont.2017.11.007.

Anna Bauer, Jens Luetjohann, Sascha Rohn, Juergen Kuballa, Eckard Jantzen. Development of an LC-MS/MS method for the simultaneous determination of the quaternary ammonium herbicides paraquat, diquat, chlormequat, and mepiquat in plant-derived commodities. *Food Analytical Methods*, **2018**, DOI: 10.1007/s12161-018-1201-6.

Weitere Publikationen

Franziska S. Hanschen, **Anna Bauer**, Inga Mewis, Claudia Keil, Monika Schreiner, Sascha Rohn, Lothar W. Kroh. Thermally induced degradation of aliphatic glucosinolates: Identification of intermediary breakdown products and proposed degradation pathways. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2012**; 60, 9890-9899.

Vorträge

Anna Bauer. Anwendung von UNIFI *Screening* Methoden im Bereich Lebensmittel. *Waters MS Technology Days*, **2014**, Berlin.

Anna Bauer, Jens Luetjohann, Stefan Neubauer, Franziska S. Hanschen, Monika Schreiner, Sascha Rohn, Jürgen Kuballa. Untersuchung zur Identifizierung von Pestiziden und Pestizidmetaboliten in Kreuzblütlern mittels UPLC-HR-QToF-MS. 44. *Deutscher Lebensmittelchemikertag*, **2015**, Karlsruhe.

Anna Bauer, Jens Luetjohann, Jürgen Kuballa. Metabolite screening in plant-derived commodities using HR MS. *Waters Nordic Technology and User Meeting*. **2015**, Halmstad (Sweden).

Anna Bauer, Jens Luetjohann, Jürgen Kuballa, Eckard Jantzen. Screening application using high resolution technique, *Waters Food Safety Days*, **2016**, Hamburg.

Jens Luetjohann, **Anna Bauer**, Franziska S. Hanschen, Eckard Jantzen, Jürgen Kuballa, Monika Schreiner, Sascha Rohn. Pesticide metabolomics: screening of plant-derived commodities for pesticide metabolites by UPLC-HR-QToF-MS. *Analytica Conference*, **2016**, München.

Jens Luetjohann, **Anna Bauer**, Franziska S. Hanschen, Jürgen Sigler, Eckard Jantzen, Jürgen Kuballa, Monika Schreiner, Sascha Rohn. Pesticide metabolomics: screening of plant-derived commodities and processed food for pesticide metabolites by UPLC-HR-QToF-MS. *11th European Pesticide Residue Workshop (EPRW 2016), Waters Vendor Session*, **2016**, Limassol, Cyprus.

Jens Luetjohann, **Anna Bauer**, Jürgen Kuballa. Differentiation of organic and conventional farming of tomatoes by non-targeted metabolomic profiling using travelling wave ion mobility high resolution mass spectrometry. *50. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS)*, 2017, Kiel.

Posterbeiträge

Jens Luetjohann, **Anna Bauer**, Jens Jacobsen, Frank Schreiber, Stefan Neubauer, Stefan Bammann, Jürgen Kuballa, Eckard Jantzen. Non-Target Screening in Food and Animal Feed by UHPLC-HR-QToF-MS as Alternative for the Conventional Target Screening Approach. *European Pesticide Residue Workshop (EPRW)*. **2014**, Dublin, Ireland.

Anna Bauer, Jens Luetjohann, Stefan Neubauer, Eckard Jantzen, Jürgen Kuballa. Anwendung der UNIFI Screening Solution im Bereich Lebensmittel und Bedarfsgegenstände. *Regionalverbandstagung Nord der Lebensmittelchemischen Gesellschaft*, **2015**, Oldenburg.

Jens Lütjohann, **Anna Bauer**, Stefan Neubauer, Franziska S. Hanschen, Eckard Jantzen, Jürgen Kuballa, Monika Schreiner, Sascha Rohn. Screening of plant-derived commodities for pesticide metabolites by UPLC-QToF-MS. *Joint EURL/NRL-Workshop*, **2015**, Stuttgart.

Jens Luetjohann, Tran Huetgens, Frank Schreiber, **Anna Bauer**, Jürgen Kuballa, Eckard Jantzen. Development and validation of a single residue method for the determination of guazatine in citrus fruit. *Joint EURL/NRL-Workshop*, **2015**, Stuttgart.

Jens Luetjohann, **Anna Bauer**, Eckard Jantzen, Jürgen Kuballa. Non-targeted metabolomic profiling analysis by HR-QToF-MS analysis for food authenticity detection. *Food Integrity*, **2016**, Prague, Czech Republic.

Jens Luetjohann, **Anna Bauer**, Franziska S. Hanschen, Jürgen Sigler, Eckard Jantzen, Jürgen Kuballa, Monika Schreiner, Sascha Rohn. Pesticide metabolomics: screening of plant-derived commodities and processed food for pesticide metabolites by UPLC-HR-QToF-MS. *European Pesticide Residue Workshop*, **2016**, Limassol, Cyprus.

Anna Bauer, Jens Luetjohann, Jürgen Sigler, Jürgen Kuballa, Eckard Jantzen, Sascha Rohn. Identification of pesticide metabolites during winemaking by travelling wave ion mobility quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *ISEAC39*, **2016**, Hamburg.

Anna Bauer, Jens Luetjohann, Jürgen Sigler, Jürgen Kuballa, Eckard Jantzen, Sascha Rohn. Identifizierung von Pestizidmetaboliten mittels hochauflösendem Ionenmobilitäts-Quadrupole-Flugzeitmassenspektrometer (IMS-HR-QToF-MS) in der Weinherstellung, 45. *Lebensmittelchemiker Tag*, **2016**, Freising-Stephan.

Jens Luetjohann, Christin Claassen, Jasmin Wrage, **Anna Bauer**, Jürgen Kuballa. Establishment of methods for food authenticity detection by non-targeted metabolomic profiling analysis by UPLC-IMS-HR-QToF-MS. *Max Rubner Conference*, **2016**, Karlsruhe.

Jens Luetjohann, **Anna Bauer**, Jürgen Kuballa. Differentiation of organic and conventional farming of tomatoes by non-targeted metabolomic profiling via travelling wave ion mobility high resolution mass spectrometry. *Food Integrity*, **2017**, Parma, Italy.

Jens Luetjohann, **Anna Bauer**, Sascha Rohn, Jürgen Kuballa, Eckard Jantzen.
Multimethod for highly polar pesticides and metabolites by IC-MS/MS - facing the
requirements for baby food at 0.010 mg/kg reporting level. *RAFA*, **2017**, Prague,
Czech Republic.

Inhaltsverzeichnis

Publikationsliste	V
Abkürzungsverzeichnis	XIII
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	XVI
Zusammenfassung	1
Abstract	4
1. Einleitung	6
2.Theoretischer Hintergrund	7
2.1 Pestizide, Metabolite und rechtliche Grundlagen zur Wirkstoffzulassung	7
2.1.1 Zulassungsverfahren	7
2.1.2 Rückstandshöchstgehalt	9
2.1.3 Pestizidmetabolite und Pestizid-Rückstandsdefinitionen	12
2.1.4 Untersuchung und Bewertung von Metaboliten-Studien	14
2.1.5 Monitoring von Metaboliten	16
2.2 Metabolismus von Pestiziden in der Pflanze	17
2.3 Analytik von Pestizidwirkstoffen und Pestizidmetaboliten mittels LC-MS	20
2.3.1 Extraktionsverfahren	21
2.3.2 QuEChERS-Extraktion	24
2.3.3 QuPPE-Extraktion	25
2.4 Flüssigchromatographie und MS-Kopplung	25
2.4.1 Elektrospray-Ionisation (ESI)	27
2.4.2 Fragmentierungsreaktionen	29
2.4.3 Matrixeffekte	30
2.5 HRMS	31
2.5.1 Hybrid-Quadrupol-Flugzeit-Massenspektrometrie (QToF-MS)	32
2.5.2 Lockspray (Interne Korrektur der Massenachsenkalibration)	35
2.5.3 Ionenmobilitätspektrometrie (IMS) - Kopplung	36
2.6 Tandem-MS	39

2.7 Screening-Anwendungen für Pestizidwirkstoffe und -metabolite	41
2.7.1 MS-Identifizierung von Pestizidwirkstoffen und -metaboliten.....	47
3. Zielstellung	52
4. Kumulativer Teil der Dissertation.....	54
4.1 Pestizidscreening mittels IMS-Q-ToF-MS in pflanzlichen Lebensmitteln (Publikation I)	55
4.2 Identifizierung von Pestizidmetaboliten in Brassica-Pflanzen mittels TWIMS- QToF-MS (Publikation II).....	78
4.3 Multiscreening für suspect Pestizidmetabolite in pflanzlichen Lebensmitteln mittels TWIMS-QToF-MS (Publikation III)	112
4.4 Bestimmung von Fosetyl und Phosphonsäure in pflanzlichen Lebensmitteln mittels IC-MS/MS (Publikation IV).....	149
4.5 Multimethode für polare und anionische Pestizide mittels IC-MS/MS (Publikation V).....	164
4.6 Multimethode für polare und kationische Pestizide mittels LC-MS/MS (Publikation VI).....	181
5. Zusammenfassende Diskussion.....	196
5.1 Pestizidscreening mittels HRMS	196
5.1.1 IMS-Kopplung.....	202
5.2 Identifizierung von Pestizidmetaboliten mittels HRMS	205
5.2.1 Strukturverifizierung mittels HRMS.....	208
5.3 Entwicklung und Validierung einer Analysenmethode zur Bestimmung von polaren Pestiziden und Metaboliten mittels Tandem-MS	213
5.3.1 Polare Pestizide und Metabolite	214
5.3.2 Quartäre Ammoniumverbindungen.....	217
6. Schlussfolgerungen	218
7. Literaturverzeichnis.....	223
Anhang	XV
A Supplementary Material zu den Publikationen.....	XV

1. Supplementary Material: Pestizidscreening mittels IMS-Q-ToF-MS in pflanzlichen Lebensmitteln (Publikation I)	XV
2. Supplementary Material: Identifizierung von Pestizidmetaboliten in Brassica Pflanzen mittels TWIMS-QToF-MS (Publikation II).....	XXXVIII
3. Supplementary Material: Multiscreening für suspect Pestizidmetabolite in pflanzlichen Lebensmitteln mittels TWIMS-QToF-MS (Publikation III).....	XLVII
3. Supplementary Material: Multimethode für polare und anionische Pestizide mittels IC-MS/MS (Publikation V)	LI
B Auflistung der Gefahrenstoffe nach GHS.....	LVIII
Danksagung	LXXVII
CV	LXXVIII

Abkürzungsverzeichnis

2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
ACN	Acetonitril
AMPA	Aminomethylphosphonsäure
APCI	<i>atmospheric pressure chemical ionization</i>
APPI	<i>atmospheric pressure photoionization</i>
Ar	Argon
BCS	<i>biopharmaceutics classification system</i>
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung Berlin
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit Berlin
C18	<i>octadecyl bonded endcapped silica</i>
CCS	<i>collision cross section</i>
CE	<i>collision energy</i>
CH ₃ COO ⁻	Acetat
CID	<i>collision induced dissociation</i>
CS ₂	Kohlenstoffdisulfid
CVUA	Chemisches- und Veterinäruntersuchungsamt
CYP P450	Cytochrom P450-Monooxygenasen
Da	Dalton
DAR	<i>draft assessment report</i>
DCM	Dichlormethan
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DMSA	Dimethylsulfamid
dSPE	dispersive SPE
ECD	electron capture detector
EFSA	<i>European food and safety authority</i>
EG	Europäische Gemeinschaft
ESI	<i>electrospray ionisation</i>
EURL	<i>European reference laboratory</i>
FT-ICR	<i>Fourier-transform ion cyclotron resonance</i>
FWHM	<i>full-width at half maximum of peak</i>

GC	<i>gas chromatography</i>
GCB	<i>graphitized carbon black</i>
H	Proton
HCl	Salzsäure
HCOO ⁻	Formiat
He	Helium
HEPA	2-Hydroxyethhephon
HILIC	<i>hydrophilic interaction chromatography</i>
HLB	<i>hydrophilic/lipophilic balance</i>
HRMS	<i>high-resolution MS</i>
Hz	Hertz
IC	<i>ion chromatography</i>
iFit	<i>prediction algorithm for isotope fit</i>
ILIS	<i>isotope-labelled internal standard</i>
IMS	<i>ion mobility spectrometry</i>
K	Kalium
kV	kilo Voltage
LC	<i>liquid chromatography</i>
LLE	<i>liquid-liquid extraction</i>
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladungsverhältnis
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MRL	<i>maximum residue limit</i>
MRM	<i>multiple reaction monitoring</i>
MS	<i>mass spectrometry</i>
MS/MS	Tandem-MS
MS ^E	<i>MS elevated</i>
N ₂	Stickstoff
NP	Normalphasen
ODS	Octadecylsilane
OECD	<i>Organisation for economic co-operation and development</i>
PHI	<i>pre harvest interval</i>
ppm	<i>parts per million</i>
PSA	<i>primary secondary amine</i>

PSM	Pflanzenschutzmittel
Q, q	Quadrupol
QqQ	Triple quadrupol
QTof-MS	<i>quadrupol time of flight mass spectrometer</i>
QuEChERS	<i>quick easy cheap effective rugged safe</i>
QuPPE	<i>quick polar pesticides method</i>
RHG	Rückstandshöchstgehalte
RMS	<i>rapporteur member state</i>
RP	Umkehrphase
RL	<i>reporting level</i>
RT	<i>retention time</i>
SDL	<i>screening detection level</i>
SE	<i>solvent extraction</i>
SLE	<i>solid liquid extraction</i>
SPE	<i>solid phase extraction</i>
SRM	<i>single residue method</i>
TRR	<i>total radioactivity residue</i>
TTC	<i>threshold of toxicological concern</i>
TW	<i>travelling wave</i>
UDP	Uridindiphosphat
UPLC	<i>ultra-high-performance liquid chromatography</i>

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Monitoringstatus der Positivbefunde in pflanzlichen und tierischen Matrices, CVUA Stuttgart, 2017 (relativer Anteil an positiv getesteten Substanzen). 11	
Abbildung 2: Pestizidmetabolismus in einer Pflanzenzelle am Beispiel von 2,4-D. Das Herbizid wird in der Phase-I-Reaktion hydroxyliert. Im Anschluss finden eine Phase-II-Konjugation mit Glucose und eine Veresterung mit Malonsäure statt. Das lösliche Konjugat hat die Möglichkeit, in der Phase-III-Reaktion in der Vakuole kompartimentiert zu werden. Modifiziert nach [47].	20
Abbildung 3: Mechanismus der Elektrospray-Ionisation. [102]	29
Abbildung 4: Ionenquelle mit einem dualen Spraysystem (A). Ein Buffle schaltet innerhalb der Messanalyse zwischen dem Sample- und dem Referenzspray um, um den Massendrift auszugleichen. In einem Analysenlauf wird parallel ein LC-MS-Spektrum für die Referenzmasse und für die Probe erzeugt (B). [127]	36
Abbildung 5: Schematische Darstellung von IMS-QToF-MS (VION). Nach (1) Probenaufgabe und (2) Referenzspray folgt die Auftrennung mittels Ionenmobilitätsspektrometrie und anschließender MSE Datenaufnahme sowie Massenanalyse im ToF. [129]	37
Abbildung 6: Travelling Wave-IMS von verschiedenen Molekülen. Kleine Moleküle passieren die Zelle schneller mit einer kürzeren Driftzeit (1), während die größeren Moleküle zurückgehalten werden (2). Modifiziert nach [132].	38
Abbildung 7: Aufbau eines Tandem-MS im MRM-Modus. [138]	39
Abbildung 8: Workflow für ein systematisches Screening-Vorgehen bei Pestiziden, -konjugaten und relevanten Pestizidmetaboliten. [124]	43
Abbildung 9: Identifizierungs-Level in der HRMS-Analytik. [166]	51
Abbildung 10: Aufnahme vierdimensionaler Daten und Fragment-Spektren-Zuordnung mittels IMS-Kopplung. [176]	204
Tabelle 1: Wirkstoffbewertung auf EU- und nationaler Ebene. [11]	8
Tabelle 2: Literaturauswahl zur Entwicklung der bisherigen Anwendung von LC-HRMS im Screening von Pestiziden und Pestizidmetaboliten in pflanzlichen und tierischen Lebensmitteln.	44
Tabelle 3: Identifikationskriterien für Substanzidentifizierung gemäß Guidance Document SANTE/11945/2015. [66]	48
Tabelle 4: Beispiele für allgemeine Phase-I und -II-Reaktionen und die entsprechenden Änderungen der Molmasse der Muttersubstanz. [100]	50

Zusammenfassung

Pestizide werden in der Landwirtschaft zum Schutz der Pflanzen eingesetzt und dienen ihrem Erhalt und der Ertragssteigerung. Dabei handelt es sich um eine Vielzahl von verschiedenen Substanzklassen, die unterschiedliche chemische und physikalische Eigenschaften aufweisen. Des Weiteren werden die Pestizidwirkstoffe nach ihrem Wirkungsmechanismus unterteilt. Viele verschiedene Substanzklassen beugen Pilzbefall vor, schützen vor Insekten oder wirken auf den Hormonhaushalt der Pflanze ein. Der Einsatz von Pflanzenschutzmitteln findet in der ganzen Welt in großen Mengen statt. Da diese Wirkstoffe ein Gesundheitsrisiko für Mensch und Tier darstellen sowie die Umwelt negativ beeinflussen können, unterliegen sie rechtlichen Regulierungen, in denen die Zulassung, Anwendung und Rückstandshöchstgehalte auf bzw. in den Lebensmitteln definiert werden. Nach der Anwendung der Pestizide auf das Pflanzengut werden diese von der Pflanze abgebaut bzw. metabolisiert. Bei den bekannten und unbekannten Metaboliten, die ebenfalls noch eine Pestizidwirkung aufweisen oder aufgrund der vorliegenden Konzentration und toxikologischen Eigenschaften eine Gefahr darstellen können, sollten diese ebenso erfasst werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Multianalyseverfahren für eine Pestizidbestimmung mittels hochauflösender Massenspektrometrie, gekoppelt mit Ionenmobilitätspektrometrie entwickelt und validiert. Des Weiteren wurde in einer Modellstudie eine Methode zur Bestimmung von Pestizidmetaboliten mittels Strukturaufklärungswerkzeugen in der hochauflösenden Massenspektrometrie entwickelt. Referenzstandards für die untersuchten Pestizidmetaboliten waren hierbei kommerziell nicht verfügbar. Anhand der entwickelten Methode erfolgte der Aufbau eines Pestizidmetaboliten-Screenings basierend auf dem entwickelten Multianalysenverfahren für Pestizide für unterschiedliche pflanzliche Lebensmittel.

Für Wirkstoffe, die aufgrund ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften in einem Multirückstandsverfahren nicht erfasst werden können, wurde ein alternatives Multianalysenverfahren für sehr polare Pestizide mittels Tandem-Massenspektrometrie evaluiert und validiert. Hierbei wurden die Analyseverfahren separat für kationische und anionische Pestizidwirkstoffe und deren Metabolite entwickelt.

Die vorliegende Arbeit umfasst ein *Pestizidscreening*-Verfahren für einen Parameterumfang von 280 Substanzen mit relevanten Metaboliten für eine Erfassung in einem Konzentrationsbereich von 0,100 bis 0,001 mg/kg in 20 verschiedenen pflanzlichen Lebensmitteln, repräsentativ für alle sechs pflanzen-basierten Matrixgruppen nach dem SANTE *Guidance Document* 11945/2015 der Europäischen Kommission. Hierbei sollte die Kopplung und Anwendung von Ionenmobilität als ein zusätzliches Kriterium für die Substanzidentifizierung mittels hochaufgelöster Massenspektrometrie (*High-Resolution MS*, HRMS) evaluiert werden.

Anhand der drei Modellwirkstoffe Thiacloprid, Azoxystrobin und Difenconazol wurde in einer Feldstudie eine Methode zur Identifizierung und Charakterisierung von 22 Metaboliten in unterschiedlichen Metabolisierungsstufen in Brokkoli und Pak Choi entwickelt. Dabei wurden eine Analyse der Pflanzenkompartimente sowie eine Metabolisierungskinetik für den Abbau der Wirkstoffe sowie die Bildung der Metabolite durchgeführt. Die Studie ermöglichte den Aufbau einer Metaboliten Datenbank als ein neues Werkzeug zum Anwendungsnachweis von Pestizidwirkstoffen über ihre entsprechenden Metabolite. Ausschlaggebend war der Nachweis eines Pestizidmetaboliten in Brokkoli, ohne dass die Muttersubstanz in dem jeweiligen Kompartiment nachgewiesen werden konnte.

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit lag in der Entwicklung eines *Screening*-Verfahrens für Pestizidmetaboliten in pflanzlichen Lebensmitteln. Die Basis dafür lieferten die Verfahrensschritte, die in der *Pestizidscreening*-Methode und der Identifizierungsmethode für Pestizidmetabolite etabliert wurden. Im Rahmen dieses *Screenings* wurde für 58 Pestizidmuttersubstanzen eine theoretische spektrale Datenbank von 648 Metaboliten-Einträgen aufgebaut. Anhand von 96 Proben konnten 47 Metabolite identifiziert und charakterisiert werden. Als Endresultat wurde damit ein kombiniertes *Screening* für Pestizide und Pestizidmetabolite etabliert.

In der vorliegenden Arbeit wurde darüber hinaus zum ersten Mal ein Multirückstandsverfahren zur Bestimmung anionischer Pestizide entwickelt, wobei die Analyten Fosetyl und sein Metabolit Phosphonsäure erstmalig mit dem sehr niedrigen *reporting level* von 0,010 mg/kg in pflanzlichen Lebensmitteln sensitiv ermittelt werden konnte. Dieser *reporting level* ist insbesondere für die Überprüfung von Kindernahrung und ökologischen Lebensmitteln äußerst wichtig und wurde erst mit dieser Methode möglich gemacht. Weiterhin wurde diese Methode zur Bestimmung der Analyten Ethephon, seinem Metaboliten 2-Hydroxyethephon und

den anionischen Pestiziden Chlorat und Perchlorat ausgebaut. Das sensitive und robuste Verfahren wurde für sechs repräsentative Lebensmittel aus fünf pflanzlichen Lebensmittelgruppen nach dem *SANTE Guidance Document 11945/2015* der Europäischen Kommission für die Verwendung in der Pestizidroutineanalytik evaluiert und validiert.

In einem weiteren Teil der Arbeit wurde ein Analysenverfahren zur Bestimmung der quartären Ammoniumverbindungen Chlormequat, Mepiquat, Paraquat und Diquat in pflanzenbasierten Lebensmitteln entwickelt. Hierbei wurde eine bestehende Referenzmethode optimiert und vereinfacht, so dass mit Hilfe der resultierenden robusten Methode ebenfalls eine Bestimmungsgrenze von 0,010 mg/kg erreicht werden konnte. Die Methode für quartäre Ammoniumverbindungen wurde ebenfalls für sechs repräsentative Lebensmittel aus fünf pflanzlichen Lebensmittelgruppen evaluiert und validiert.

Abstract

Pesticides are used in agriculture to protect plants and thus to maintain and increase plant yields. Many different substance classes prevent fungal infections, protect against insects, or affect the plant's hormonal balance. The use of plant protection products takes place all over the world in large quantities. As those active substances provide a health risk to humans and animals as well as adversely affect the environment, the approval, application, and residue levels in foodstuffs are subject to legal regulations. After the application of the pesticides to the plant material, they are significantly metabolized by the plant to identified and also unidentified metabolites. Due to their residual pesticidal effects or an elevated concentration in the plant material in combination with toxicological effects they may pose a risk to consumers and therefore should be monitored, too.

In the present work, a multi analysis method for pesticide determination using high-resolution mass spectrometry coupled with ion mobility has been developed and validated. In addition, a method for the determination of metabolites in a model study was developed by means of structure elucidation tools by high-resolution mass spectrometry. Reference standards for the investigated pesticide metabolites were not commercially available. Based on this method, a pesticide metabolite screening was developed. For active substances that cannot be detected in a multi residue method, due to their chemical and physical properties, another multi analysis method for highly polar pesticides was evaluated and validated using tandem mass spectrometry. In this case, the analytical procedures were split apart for cationic and anionic analytes and their metabolites.

The present work includes a pesticide screening method for a parameter scope of 280 active substances and corresponding relevant metabolites comprising screening detection levels ranging from 0.100 to 0.001 mg/kg in 20 different plant-derived commodities representative for all six commodity groups according to document SANTE 11945/2015. On the basis of the three model substances thiacloprid, azoxystrobin and difenoconazole, a method for the identification and characterization of 22 metabolites at different metabolization levels in broccoli and pak choi were demonstrated in a field study. In addition, the application of a plant protection product was verified via the detection of a metabolite in broccoli even in absence of the corresponding parent substance.

Another project basing on the identification method for pesticides and pesticide metabolites focused on the development of a pesticide metabolite screening approach. For 58 active compounds, a theoretical database of 648 metabolite entries was established and 47 metabolites were identified and characterized in 96 fruit and vegetables samples. A combined screening method for the identification of pesticides and their corresponding metabolites was established.

Furthermore, in the present work a multiresidue method for the determination of anionic pesticides was also developed, where the active compound fosetyl and its metabolite phosphonic acid was determined in a very sensitive way for the first time with a reporting level of 0.010 mg/kg in several plant commodities. Furthermore, the method was optimized for the determination of the analytes ethephone and its metabolite 2-hydroxyethephon, and the compounds chlorate, and perchlorate. The sensitive and robust method has been evaluated and validated for five matrices representative for five different commodity groups according to document SANTE 11945/2015.

In another project an analytical method for the development of the cationic quaternary ammonium compounds chlormequat, mepiquat, paraquat and diquat was developed. The method was optimized and simplified using a reference method so that a robust method with a limit of quantification of 0.010 mg/kg could also be achieved. The method for quaternary ammonium compounds has also been evaluated and validated for 5 matrices representative for five different commodity groups according to document SANTE 11945/2015.

1. Einleitung

Pestizide sind Pflanzenschutzmittel (PSM), die eingesetzt werden, um Kulturpflanzen zu erhalten, Krankheiten und den Befall von Schädlingen vorzubeugen. Zur Gruppe der Pestizide zählen Fungizide (gegen Pilzbefall), Insektizide (gegen Insekten), Herbizide (gegen Unkräuter), Akarizide (gegen Spinnmilben), Nematizide (gegen Nematoden), Molluskizide (gegen Schnecken), Rodentizide (gegen Nagetiere), Pflanzenwachstumsregulatoren sowie Repellentien (Abwehr- oder Vergrämungsmittel). Daneben umfassen Pestizide auch Biozide, die nicht zur direkten Anwendung an Pflanzen, sondern zur Bekämpfung von Schädlingen und Krankheitsüberträgern wie Insekten, Ratten und Mäusen bestimmt sind. [1]

Pflanzenschutzmittel werden im Land- und Weinbau für eine Ertragsoptimierung verwendet und um eine wirtschaftliche Produktion zu ermöglichen, da es ohne Pflanzenschutzmittel nicht möglich ist, auf der zur Verfügung stehenden Nutzfläche Lebensmittel in der benötigten Menge zu erzeugen. Bei allen Maßnahmen ist die Anwendung von PSM jedoch auf das notwendige Maß nach dem sogenannten Schadensschwellenprinzip beschränkt. PSM werden erst dann eingesetzt, wenn ein Schwellenwert überschritten wird und ein Schädlingsbefall vorliegt und sich so entwickelt, dass größerer Schaden zu erwarten ist. [2]

In Deutschland werden jährlich an die 50000 Tonnen an Wirkstoffen eingesetzt. [3]

Aufgrund gesundheitlicher Folgen für Tier und Mensch sowie einer schädlichen Beeinträchtigung der Umwelt werden die PSM und die darin enthaltenen Wirkstoffe rechtlich geregelt. Das Pflanzenschutzrecht enthält umfangreiche Bestimmungen zum Verkehr und zur Anwendung von Pflanzenschutzmitteln. [4] Die Rückstände aus einer PSM-Anwendung oder deren Abbauprodukte (Metabolite) können in Lebensmitteln und Futtermitteln verbleiben. Überwachungsämter prüfen, ob die gesetzlichen Rückstandshöchstgehalte von Pflanzenschutzmittelwirkstoffen in Lebens- und Futtermitteln eingehalten werden und ziehen zu hoch belastete Lebensmittel aus dem Verkehr. [5]

Die gesetzlich festgesetzten Rückstandshöchstgehalte stellen die für Lebensmittel maximal zulässigen Wirkstoffmengen dar. Neben zugelassenen Wirkstoffen gilt es auch, verbotene Substanzen sowie unbekannte Metabolite zu identifizieren.

Hierfür werden in der Pestizidanalytik massenspektrometrische Systeme gekoppelt an Flüssig- oder Gaschromatographie eingesetzt, um eine sichere

Substanzidentifizierung und -quantifizierung in Lebens- und Futtermitteln zu gewährleisten.

2.Theoretischer Hintergrund

2.1 Pestizide, Metabolite und rechtliche Grundlagen zur Wirkstoffzulassung

Aktuell sind über 490 Wirkstoffe in der EU zugelassen, wobei jährlich ca. 10 neue Wirkstoffe auf den Markt kommen. [6] Über 70% davon stellen konventionelle chemische Wirkstoffe dar, neben Mikroorganismen, Pflanzenextrakten oder Pheromonen. Nicht von der Gesetzgebung erfasst sind ausschließlich physikalische Methoden wie Fliegenleim, Makroorganismen oder tierische Nützlinge. Es gibt verschiedene Pflanzenschutzmittelkategorien. Die mengenmäßig am relevantesten stellen die drei Gruppen Insektizide, Herbizide und Fungizide dar.

Pestizidwirkstoffe werden definiert als „*Stoffe oder Mikroorganismen einschließlich Viren mit allgemeiner oder spezifischer Wirkung gegen Schadorganismen oder auf Pflanzen, Pflanzenteile oder Pflanzenerzeugnisse*“ i.S.v. Artikel 2 Nummer 1 der Richtlinie 91/414/EWG in Verbindung mit Artikel 2 Buchstabe c der Verordnung (EG) Nr. 396/2005.

Für die Wirkstoffe selbst gilt das Prinzip der doppelten Zulassung, da erst eine EU-weite Genehmigung eines Wirkstoffs für die Verwendung in Pflanzenschutzmitteln (Positivliste) durch die *Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit* (EFSA) für die Zulassung erfolgt und anschließend die Zulassung von Pflanzenschutzmitteln, die die genehmigten Wirkstoffe enthalten, auf nationaler Ebene durch die EU-Mitgliedsstaaten erfolgt. [7] Zulassungsstelle in Deutschland ist das *Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* (BVL). Mit der Zulassung legt das BVL das Anwendungsgebiet fest, also für welche Kulturen das Pflanzenschutzmittel angewandt werden darf und gegen welche Schadorganismen das Pflanzenschutzmittel wirken soll. [8] Des Weiteren bestimmt das BVL die Wartezeit, engl. *pre harvest interval* (PHI), zwischen letzter Anwendung und der Ernte. [9, 10]

2.1.1 Zulassungsverfahren

Die Bewertung von Wirkstoffen in Pestiziden erfolgt im Rahmen eines mehrstufigen Verfahrens. Das Zulassungsverfahren besteht aus einer 3 Monate dauernden

Vorprüfung durch das BVL und einer 12-monatigen Hauptprüfung durch die EFSA, wobei die eingereichten Unterlagen der Antragsteller geprüft werden. Die Zulassung eines PSM erfolgt auf Grundlage der Verordnung (EG) Nr. 1107/2009. [10] Auch die Anforderungen und die Bedingungen für die Genehmigung eines PSM-Wirkstoffs werden durch die Verordnung (EG) Nr. 1107/2009 bestimmt. [10] In der Regel enthalten PSM mindestens einen Wirkstoff (*active substance*). Eine Übersicht zum Zulassungsverfahren enthält Tabelle 1.

Tabelle 1: Wirkstoffbewertung auf EU- und nationaler Ebene. [11]

	EU	Mitgliedsstaat
Wirkstoffbewertung		X
Wirkstoffentscheidung	X	
PSM-Zulassung		X
PSM-Kontrolle		X
Rückstandshöchstwerte	X	
Kontrolle der Rückstände		X

Für jeden Stoff wird laut der EFSA ein Bericht von dem bewertenden Mitgliedstaat (*Rapporteur Member State – RMS*) ein vorläufiger Bewertungsbericht (*Draft Assessment Report – DAR*) bzw. ein Bewertungsbericht zur Neubewertung (*Renewal Assessment Report – RAR*) erstellt.

Gemäß der Verordnung (EU) Nr. 1107/2009 veröffentlicht die EFSA auf ihrer Internetseite die DAR. [10] Diese können ab 2005 bei der EFSA angefordert werden. Frühere Berichte sind bei den zuständigen Behörden des berichterstattenden Mitgliedsstaates erhältlich. [12, 10]

Der DAR umfasst unter anderem Informationen zu der Identität des Wirkstoffs und des PSM wie Zusammensetzung, Reinheit sowie physikalisch-chemische Eigenschaften. Die Wirksamkeit des Wirkstoffs im Zielorganismus und auf weiteren Pflanzen soll dabei gezeigt werden. Umfangreiche Studien zu toxikologischen Eigenschaften und zum Metabolismus in Pflanzen, Säugetieren und Umwelt werden überprüft, woraus die Einstufung und Kennzeichnung sowie die Rückstandshöchstgehalte (RHG) des Wirkstoffs abgeleitet werden. Weiterhin wird zur Risikobewertung eine Expositionsabschätzung für Verbraucher, Tier und für die Umwelt ermittelt. Darüber hinaus werden Feldstudien mit

Rückstandsgehaltsbestimmung durchgeführt, die zur Risikoabschätzung beitragen. [13]

Der Antragsteller hat umfangreiche Informationen (Dossier) für die Überprüfung des Wirkstoffs einzureichen gemäß Verordnung (EU) 283/2003. [14] Die anschließende Risikobewertung des RMS wird wie oben beschrieben von der EFSA zusammen mit allen Mitgliedsstaaten einem Peer-Review unterzogen. Anschließend wird ein Abschlussbericht der EU-Kommission vorgelegt, der wiederum in das Genehmigungsverfahren und in die Bewertung von PSM und RHG in Lebensmitteln einfließt. Die EU-Kommission entscheidet dann, ob die Substanz in die EU-Liste der genehmigten Wirkstoffe aufgenommen wird und in der EU verwendet werden darf. Die EU-Kommission trifft die endgültige Entscheidung über den Wirkstoff.

Die Zuständigkeit für die Zulassung vom PSM, der den zugelassenen Wirkstoff enthält, befindet sich auf nationaler Ebene (bzw. nach europäischen Zonen). Die Anforderungen an die von den Antragstellern vorzulegenden Daten, wie auch die Bewertungskriterien sind rechtlich festgesetzt. Da diese Anforderungen dem Stand der Wissenschaft und der Technik ebenfalls einem Wandel unterliegen, gelten die Zulassungen von PSM für 10 Jahre und erfordern anschließend eine erneute Zulassung. [15]

Zurzeit sind auf dem deutschen Markt laut BVL 1440 PSM mit 285 Wirkstoffen zugelassen (BVL, Stand April 2017). [8]

2.1.2 Rückstandshöchstgehalt

Artikel 3 Abs. 2 lit. d) der Verordnung (EG) Nr. 396/2005 definiert RHG als *„die höchste zulässige Menge eines Pestizidrückstands in oder auf Lebens- oder Futtermitteln, die gemäß dieser Verordnung auf der Grundlage der guten Agrarpraxis und der geringsten Exposition der Verbraucher, die zum Schutz gefährdeter Verbraucher notwendig ist, festgesetzt wird“*. [16]

Nach Anwendung von Pflanzenschutzmitteln sind Rückstände in den behandelten Kulturen nahezu unvermeidlich. Die umfassende Regulierung innerhalb der EU befasst sich damit, dass diese Rückstände kein Risiko für Verbraucher darstellen. Das Inverkehrbringen erfolgt, wie oben schon erwähnt, auf Grundlage der Verordnung (EG) Nr. 1107/2009, [10] die Verwendung nach Rahmenrichtlinie 128/2009/EG zur nachhaltigen Nutzung von Pestiziden sowie der Verbleib gemäß

Rückstandshöchstmengenverordnung für Pestizide Verordnung (EG) Nr. 396/2005. [16]

Während des Zulassungsverfahrens für das Pflanzenschutzmittel, bei praxisgemäßer Anwendung auf verschiedenen Erzeugnissen, wird die Höhe der Rückstände in Feldstudien ermittelt. In Deutschland beurteilt in dem Fall dann das *Bundesinstitut für Risikobewertung* (BfR) im Einvernehmen mit dem *Umweltbundesamt* (UBA), ob aufgrund der festgestellten Rückstandsgehalte und unter Berücksichtigung der toxikologischen Eigenschaften des Wirkstoffs ein Gesundheitsrisiko besteht. [17]

Die RHG sind Grenzwerte für Rückstände in Lebensmitteln, die beim BVL für jeden Wirkstoff aufgeschlüsselt nach Produkten festgelegt werden. Die Festlegung dieser Werte erfolgt, wie oben erwähnt, in einem europäischen Gemeinschaftsverfahren. Grundlage hierbei sind die Versuche, die der praxisüblichen Anwendung entsprechen. Nach der Anwendung werden Proben in regelmäßigen Abständen entnommen und analysiert. Liegen die Rückstände in dem untersuchten Erzeugnis immer unter einem bestimmten Wert, dann wird dieser als Höchstgehalt festgelegt unter der Voraussetzung, dass dieser gesundheitlich unbedenklich ist. Liegt kein Höchstgehalt für das Wirkstoff-Erzeugnis-Paar vor, gilt ein Ersatzgrenzwert von 0,010 mg/kg.

Artikel 18 Abs. 1 lit. b) der Verordnung (EG) Nr. 396/2005 sieht für Pestizidrückstände *„einen Auffangwert von 0,01 mg/kg vor, soweit kein spezifischer Rückstandshöchstgehalt oder unter Berücksichtigung der verfügbaren routinemäßigen Analysemethoden unterschiedliche Standardwerte für einen Wirkstoff festgelegt wurden.“*. [16]

Die Höchstgehalte können sich aufgrund von z.B. toxikologischer Neubewertung des Wirkstoffs oder aufgrund einer Änderung bei der Verwendung bzw. einer Neuzulassung für ein zusätzliches Erzeugnis verändern, da die Ersatzgrenzwerte von 0,01 mg/kg durch spezifische Höchstgehalte ersetzt werden müssen. [18]

Die ausgewählte Restkomponente sollte die Anwendungsbedingung des Pestizids (Dosierungsrate, PHI) widerspiegeln und nach Möglichkeit durch ein Mehrrückstandsverfahren quantifiziert werden. [19]

Die privaten Handelslabore und die staatliche Lebensmittelüberwachung innerhalb der Bundesländer überprüfen, ob die RHG für Pflanzenschutzmittelwirkstoffe eingehalten werden.

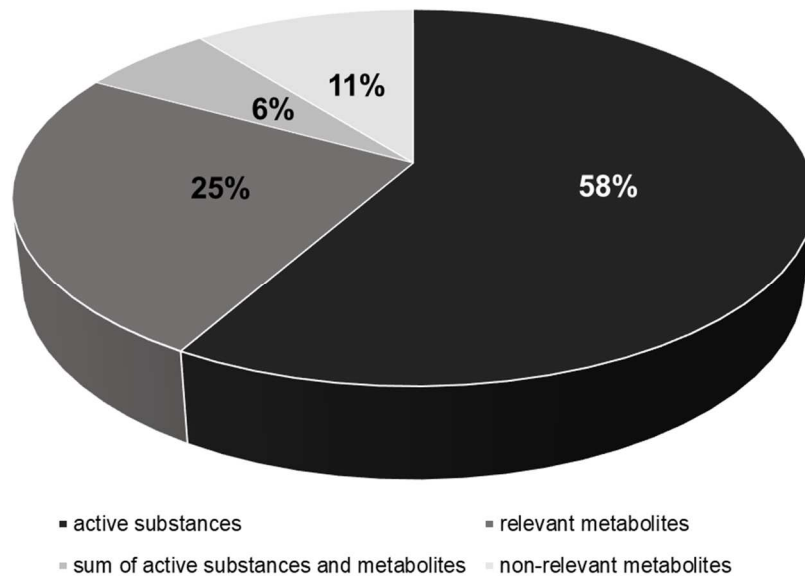


Abbildung 1: Monitoringstatus der Positivbefunde in pflanzlichen und tierischen Matrices, CVUA Stuttgart, 2017 (relativer Anteil an positiv getesteten Substanzen).

Die Definition von Rückständen für RHG sollte so praktisch wie möglich sein und vorzugsweise eine einzige Restkomponente (Ausgangswirkstoff oder Metabolit) als Indikator für den im Produkt befindlichen Rückstand beinhalten. Dies hat den Vorteil eines einzigen analytischen Verfahrens, verringert die analytische Unsicherheit für den RHG und erleichtert die Rückstandsüberwachung. [6, 19] In vielen Fällen stellt der verwendete Wirkstoff auch den mengenmäßig wesentlichen Teil im Gesamtrückstand dar und wird zur Einhaltung des RHG analysiert. Jedoch gibt es einige Ausnahmen, in denen Metabolite in die RHG mit einbezogen werden. Zum Beispiel, wenn mehrere Pestizide zu einer Verbindung metabolisiert werden, die selbst als Pestizid verwendet wird, wie im Fall von Benomyl, das zu Carbendazim metabolisiert wird und die Rückstandsdefinition als Summe Carbendazim definiert ist. [20] In einigen Fällen haben Pestizidmetabolite im Vergleich zur Muttersubstanz eine höhere toxikologische Relevanz. Ein Beispiel dafür ist Dimethoat, obwohl sein Metabolit Omethoat die aktive und toxischere Form ist, wird der RHG als Summenparameter Dimethoat ausgedrückt. [21] Auf der anderen Seite ist es ein Problem, wenn der Metabolit aus einem Pestizid auch aus anderen Quellen als der Verwendung des Pestizids stammen kann. Im Fall von Melamin kann der Rückstand des in einer Probe vorhandenen Metaboliten nicht eindeutig auf seinen Ursprung zurückgeführt werden, denn sowohl Cyromazin als auch Prometryne können zu

Melamin abgebaut werden. Daher wird der Metabolit nicht in die Rückstandsdefinition für die RHG einbezogen. [22]

Die Definition von Rückständen für tierische und pflanzliche Waren kann sich aufgrund des Stoffwechsels zwischen Tier und Pflanze ebenfalls unterscheiden. Bei der Rückstandsdefinition von Bendiocarb (in der EU seit 2014 nicht mehr zugelassen) gilt für Pflanzenprodukte: unkonjugiertes Bendiocarb und bei tierischen Erzeugnissen: Summe aus konjugiertem und unkonjugiertem Bendiocarb, 2,2-Dimethyl-1,3-benzodioxol-4-yl / N-Hydroxymethyl-bendiocarb, ausgedrückt als Bendiocarb. [6, 19] Als Beispiel für weitere Summenparameter können 2,4 D (Ester und Salze) oder verschiedene Oxidationsstufen bei Methiocarb mit -Sulfoxid und -Sulfon, ausgedrückt als Methiocarb, genannt werden. [23, 24]

Die Entscheidung über die Einbeziehung von Metaboliten in die Rückstandsdefinition ist oft komplex. Weiterhin gibt es auch Fälle, in denen Metabolite, Abbauprodukte und andere Transformationsprodukte in die Definition von Pestizidrückständen für Risikobewertungszwecke einbezogen werden. Dies bedeutet dabei nicht zwangsläufig, dass diese Metaboliten, Abbauprodukte oder andere Transformationsprodukte immer in den RHG einbezogen werden sollten. Nichtsdestotrotz werden viele gebildete Metabolite von der Überwachung miterfasst wie z.B. im Fall von Aminomethylphosphonsäure (AMPA), das Bestandteil der Risikobewertung von Glyphosat ist aber nicht der RHG. [25]

2.1.3 Pestizidmetabolite und Pestizid-Rückstandsdefinitionen

Ein Pestizidmetabolit wird definiert als *„ein Metabolit oder jedes Abbauprodukt eines Wirkstoffs, (...) der entweder in Organismen oder in der Umwelt entsteht“* im Sinne von Artikel 3 Abs. 32 der Verordnung (EG) Nr. 1107/2009. Weiterhin gilt *„ein Metabolit wird als relevant eingestuft, wenn Grund zur Annahme besteht, dass er in Bezug auf seine gewünschte biologische Wirksamkeit mit dem Ausgangsstoff vergleichbare inhärente Eigenschaften aufweist oder für Organismen ein höheres oder vergleichbares Risiko wie der Ausgangsstoff darstellt oder über bestimmte toxikologische Eigenschaften verfügt, die als nicht annehmbar erachtet werden.“*. [10]

Ein Rückstand wird definiert als *„ein oder mehrere Stoffe, die in oder auf Pflanzen oder Pflanzenerzeugnissen, essbaren Erzeugnissen tierischer Herkunft, im Trinkwasser oder anderweitig in der Umwelt vorhanden sind und deren Vorhandensein von der Verwendung von Pflanzenschutzmitteln herrührt,*

einschließlich ihrer Metaboliten und Abbau- oder Reaktionsprodukte“ gemäß Artikel 3 Nr. 1 der Verordnung (EG) Nr. 1107/2009. [10] Die Rückstandsdefinition beinhaltet somit Wirkstoff, Metaboliten, Abbau- und Reaktionsprodukte, die für die Risikobewertung relevant sind. Dies gilt insbesondere, falls bekannt ist, dass ein Wirkstoff seine Wirkung nach der Anwendung von Pflanzenschutzmitteln erst nach der Umwandlung in einen Metaboliten oder ein Abbauprodukt entfaltet. Welche Verbindungen in die Rückstandsdefinitionen aufgenommen werden sollen, entscheidet sich nach toxikologischer Relevanz der Verbindung, der wahrscheinlich vorhandenen Menge und den Möglichkeiten der Analytik (Abschnitt 5, 6.7.1 Anhang der Verordnung (EG) Nr. 213/2008). In diesem Zusammenhang fordert die rechtliche Regelung bei der Zulassung von Wirkstoffen gemäß Teil A Abschnitt 6 Punkt 6.2 im Anhang der Verordnung (EU) Nr. 213/2008 das Vorlegen von *„(...) Angaben zum Metabolismus, die repräsentativ sind für die aktuelle oder geplante gute landwirtschaftliche Praxis (GLP), sowie eine schematische Darstellung der Stoffwechselwege in Pflanzen und Tieren mit kurzer Erläuterung der Verteilung und der chemischen Reaktionen. Diese Untersuchungen sind mit einer oder mehreren radioaktiv markierten Formen des Wirkstoffs...“*. Enthält der Endrückstand dann bei Abschluss der Zulassungsstudie als Ergebnis vom Metabolismus oder anderen Prozessen auf der Pflanze, Nutztier, Boden, Grundwasser oder Luft sowie nach Lebensmittelverarbeitung einen Stoff, bei dem es sich nicht um den Wirkstoff handelt, sollen in dem Fall dann *„(...) falls technisch machbar, Untersuchungen zur Toxizität dieses Stoffs durchgeführt werden (...)“*, um die Relevanz beurteilen zu können. Diese Untersuchungen sind allerdings nur dann notwendig, wenn anhand der Daten zum Wirkstoff keine Toxizitätsbewertung abgeleitet werden kann gemäß Anhang Abschnitt 5 Nr. 7 der Verordnung (EG) Nr. 213/2008. Weiterhin wird festgelegt, dass nach Abschnitt 5 Nr. 5.8.1 Anhang der Verordnung (EG) Nr. 213/2008 in der Regel zusätzliche Untersuchungen zur Toxizität von Metaboliten nicht routinemäßig verlangt werden.

Um diese Lücke zu füllen, hatte die EFSA das Gremium für Pflanzenschutzmittel und ihre Rückstände aufgefordert, eine Leitlinie für die Festlegung der Rückstandsdefinitionen für den (I) Part der Ernährungsrisikobewertung zu entwickeln: *„Guidance on the establishment of the residue definition for dietary risk assessment“*. [26] Hierbei soll die Identifizierung der relevanten Rückstandskomponenten für die diätetische Risikobewertung erfasst werden. Anhand von verschiedenen

Modellstudien wie z.B. das *Threshold of Toxicological Concern* (TTC)-Konzept sollen die verfügbaren Daten genutzt und das Gefährdungsrisiko abgeleitet werden. Bei diesen wissenschaftlichen Modellansätzen handelt es sich um eine qualitative Risikoabschätzung, wobei bekannte Strukturanaloga mit einer umfassenden toxikologischen Beurteilung in Relation gesetzt werden. Hierbei dienen die Modellstudien vor allem der Priorisierung von chemischen Stoffen mit geringer Exposition, die kein nennenswertes Risiko für die menschliche Gesundheit darstellen oder von denen, für die eine umfassende Risikobewertung erforderlich ist. [27]

2.1.4 Untersuchung und Bewertung von Metaboliten-Studien

Für die Zulassung von Wirkstoffen müssen wie oben beschrieben (Abschnitt 1.1.4) detaillierte Metabolitenstudien vorgelegt werden. Diese Studien umfassen dabei die Abbauprodukte von Pestiziden, damit sind Metabolite in Tier, Pflanze und Boden sowie Degradationsprodukte und Transformationsprodukte in der Umwelt eingeschlossen. Die Summe der Abbauprodukte wird im Allgemeinen als Metabolite zusammengefasst, die ein potenzielles Ernährungsrisiko aufweisen und die in der Risikoexposition berücksichtigt werden. Mit der Risikoexposition ist generell die Exposition aufgrund der Ernährung und die relative Toxizität zur Muttersubstanz eingeschlossen.

Dementsprechend erfolgen für die Zulassung von Pestizidwirkstoffen Studien gezielt in (Ziel-) Pflanzen, Tieren und Umwelt. Hierbei sollen vor allem auch die *crossover*-Effekte durch Wirkstoffe in Futtermitteln für tierische Produkte wie Milch und Fleisch aber auch in der Umwelt wie Versickerung in Boden und Kontamination von Grund- und Trinkwasser erfasst werden. [28–33] Untersuchungen von Metabolismuskulturen werden verwendet, um den Abbaupfad des Wirkstoffs zu ermitteln und die Stoffwechselwege und / oder die Abbauprodukte zu identifizieren, wenn ein Pestizid direkt oder indirekt auf ein Erntegut angewendet wird. Hierfür werden radioaktiv markierte Wirkstoff-Analoga eingesetzt. Die Identifizierung bezieht sich auf die genaue Strukturaufklärung von Komponenten der gesamten radioaktiven Rückstände (TRR). Radiomarkierte Wirkstoffe sind erforderlich, um die Quantifizierung der gesamten, extrahierbaren und nicht extrahierbaren radioaktiven Reste zu ermöglichen. Dabei gilt der Grundsatz, dass 95% des TRR identifiziert werden sollen. [34] Die Zielpflanzen werden mit radioaktiv markiertem Wirkstoff behandelt, wobei dabei vorzugsweise bereits Formulierungsbestandteile eingesetzt

werden, die typisch für ein Endverwendungsprodukt sind, wie es auf dem Gebiet angewendet wird. Die höchste Aufwandmenge und die kürzesten PHI sollten verwendet werden. Anschließend werden die Proben mit einer Reihe von Lösungsmitteln oder Lösungsmittelgemischen mit verschiedenen Polaritäten und anderen Eigenschaften in Abhängigkeit von der Art der erwarteten Rückstände extrahiert. Die resultierenden Extrakte sind als extrahierbare Rückstände definiert. Der nicht-extrahierbare Rückstand liegt vor, wenn ein Abbau vom Wirkstoff zu Kohlenstoffeinheiten von C1-C2 Molekülen erfolgte und der Wirkstoff innerhalb des Pflanzenstoffwechsels zu Biomolekülen metabolisiert wurde. Darüber hinaus kann der nicht-extrahierbare Rückstand kovalent gebunden an Zellpolymere wie Cellulose oder Lignin vorliegen. [34, 35] Es kann auch zu einer sogenannten physikalischen Verkapselung (Integration in Lignin und Zellulose-Hohlräume) von radioaktiven Resten in behandeltem Pflanzengut kommen. Bei der erforderlichen Charakterisierung und / oder Identifizierung von extrahierbaren Rückständen und von nicht extrahierbaren radioaktiven markierten Substanzen gelten folgende Maßnahmen bei Signal < 10% TRR (< 0,01 mg/kg) kein Handlungsbedarf, wenn keine toxikologische Relevanz vorliegt. Bei > 10% TRR (> 0,050 mg/kg) in der Probe muss eine Identifizierung der Substanz im Stoffwechselweg vorliegen. Hierbei erfolgt die Strukturaufklärung und Quantifizierung. [34] Als Hauptmetaboliten (*major metabolite*) werden Metaboliten bezeichnet, die mehr als 10% des TRR bei den in Stoffwechselstudien gelabelten Strukturanaloga des Wirkstoffs in den Pflanzen, Tieren und Umwelt wiedergefunden werden. Diese fließen mit in die Risikobewertung ein. [19] Alle Substanzen unter < 10% TRR werden als minor metabolites bezeichnet und werden üblicherweise nicht in die Rückstandsdefinition aufgenommen. Des Weiteren existiert noch eine dritte Kategorie, die theoretische Metaboliten: Metaboliten / Abbauprodukte, die in der Natur des Rückstands und / oder der Umweltstudien nicht gefunden wurden, aber theoretisch möglich sind, können ebenfalls in Betracht gezogen werden. Solche „theoretische Metabolite“ ergeben sich, wenn die Stammverbindung einen Rest aufweist, der von bekannter Toxizität ist, aber in den Stoffwechselstudien nicht identifiziert wurde, z.B. ein Anilinrest, der nicht markiert vorlag. [19] Die Identifizierung erfolgt entweder durch Co-Chromatographie des Metaboliten mit Referenzstandards unter Verwendung von zwei verschiedenen chromatographischen Systemen oder durch Techniken, die in der Lage sind, eine strukturelle Identifizierung vorzunehmen unter anderem mit MS-

und NMR-Techniken. [34, 19] Gemäß des *Guidance Documents* (OECD, 2009a) erfolgt eine Empfehlung, die Metabolite als relevant einzustufen (im Sinne von rechtlich relevant in der Rückstandsdefinition), die ein potenziell höheres oder vergleichbares toxikologisches Risiko aufweisen im Vergleich zu der Muttersubstanz. Die OECD empfiehlt hierbei im Speziellen die Aufnahme von Metaboliten in die Rückstandsdefinition aufgrund des Ernährungsrisikos für den Verbraucher, wenn die Muttersubstanz als hoch toxisch eingestuft ist und der Metabolit in vielen Agrarrohstoffen (Grundnahrungsmittel) detektiert wird. Ein weiteres Kriterium für die Aufnahmeempfehlung ist, wenn bei den Rückstandsstudien (Feldstudien zur Bestimmung des Rückstands nach PHI) höhere Konzentrationslevel des Metaboliten detektiert werden als bei den Metabolismus-Studien. Des Weiteren gilt die Empfehlung für die Aufnahme, wenn die Mutterkomponente nicht mehr detektierbar ist und nur noch der betreffende Metabolit in höheren Konzentrationen gefunden wird. Analog gilt z.B. für Trinkwasser, wenn Metabolite persistent sind oder ein hohes Versickerungspotential haben. [19] Die Wirkstoffe und ihre Metabolite unterliegen darüber hinaus im Rahmen der regulatorischen Zulassungs-, Genehmigungs- und Bewertungsverfahren hinsichtlich u.a. Toxikokinetik, Metabolismus und Toxizität von Metaboliten einer regelmäßigen Neubewertung durch das BfR nach dem aktuellen Stand der Technik. [36]

2.1.5 Monitoring von Metaboliten

Die Wirkstoffmetabolite werden nun schon seit einigen Jahren im routinemäßigen Monitoring mit einbezogen. Dies geschieht vor allem dann, wenn die Metabolite ohne weiteren analytischen Aufwand von den Routinemethoden für Wirkstoffanalysen miterfasst werden. [15]

Ein Beispiel hierfür ist das Atrazin im Trinkwasser. Seit Anfang der Neunziger ist das Herbizid verboten, gleichzeitig ist der Metabolit Desethylatrazin einer der am häufigsten in Trinkwasser detektierten Metabolite. [37, 38] Ähnlich verhält es sich bei den Klassen der Triazine wie die Hydroxytriazine oder das Desethylterbutylazin (Muttersubstanz Terbutylazin). [39] Das 2,6-Dichlorbenzamid, ein Dichlorbenil-Metabolit, hat ein hohes Versickerungspotenzial (Mobilität im Boden) und wurde häufig im Grundwasser nachgewiesen und aufgrund dessen schließlich 2004 verboten. [15, 40] Ähnlich verhält es sich mit AMPA, ein Metabolit des Breitbandherbizids Glyphosat, welche aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften

nicht nur häufig in Grund- und Oberflächengewässern nachgewiesen wird, sondern in verschiedenen Lebensmitteln und Genussgetränken. [15, 41]

Eine systematische Kenntnis über die Pestizidmetabolite liegt im Rahmen der Zulassungsverfahren für PSM-Wirkstoffe der Zulassungsbehörde BVL seitens der Hersteller vor. Diese systematischen Kenntnisse sowie Referenzstandards und Analysemethoden liegen den Überwachungsbehörden oft nicht vor.. Die Analytik von Metaboliten durch Überwachungslabore hat ihren Ursprung vor allem in der Untersuchung von Grund-und Oberflächengewässern. Vor allem die Identifizierung von Desphenyl-Chloridazon „Metabolit B“ und des Dimethylsulfamids (DMSA), ein Tolyfluanid-Metabolit, rückten die Metabolite-Analytik in den Mittelpunkt des Interesses von staatlichen Überwachungsbehörden. [15] Hierbei war vor allem im Jahr 2007 das DMSA aus Tolyfluanid von besonderer Bedeutung, da es sich bei der Wasseraufbereitung mit Ozon zu toxischen Nitrosaminen umwandelte, welche im Grundwasser wiedergefunden wurden. Aufgrund lückenhafter Metabolitenstudien war diese Nitrosamin-Vorstufe unerkannt geblieben. [42] Im Trinkwasser sind zurzeit 44 relevante Pestizidmetabolite i.S.d. TrinkwasserV gelistet. [15, 43, 44]

In Abbildung 1 ist eine Gesamtübersicht an Positivbefunden aus der amtlichen Überwachung in Deutschland dargestellt. Wirkstoffmetaboliten machen demnach insgesamt 36% der Befunde aus, wobei 25% rechtlich geregelte Metabolite und 11% nicht-rechtlich geregelte Pestizidmetabolite (CVUA Stuttgart, Stand Juli 2017) umfassen. Aufgrund der nachgewiesenen Wirkstoffrückstände und deren Metabolite in Abhängigkeit der Konzentration und toxikologischer Relevanz wird der RHG festgesetzt. Für jedes Pestizid wird innerhalb der Regulierungsbehörden ein Rückstand gewählt, der für (I) die Ernährungsrisikobewertung verwendet werden soll und damit (II) die Festlegung von Toleranzen und Höchstmengen für die Rückstandsklassen (RGH) ermittelt. [26]

2.2 Metabolismus von Pestiziden in der Pflanze

Die Anwendung von Pflanzenschutzmitteln erfolgt direkt auf den Pflanzen, Früchten und über eine Bodenbehandlung. Gelangen die Pestizidwirkstoffe auf die Pflanzen, sind diese für die Pflanzen Xenobiotika, die einem Fremdstoffwechsel der „grünen Leber“ unterliegen. [45] Einige Ausnahmen sind dabei nicht-enzymatische Reaktionen, Reaktionen mit sekundären Pflanzenstoffen oder die Photodegradation. [46] Der Hauptmetabolismus von Pestiziden in der Pflanze verläuft überwiegend

analog dem der Säugetiere und wird in der Literatur ebenfalls wie bei diesen in drei Phasen eingeteilt (Siehe Abbildung 2). [47, 48] Bei der Phase-I-Reaktion handelt es sich um eine Aktivierung des Moleküls, dabei wird die Löslichkeit des Pestizids erhöht. Die Phase-I-Reaktion umfasst u.a. Oxidationen, Reduktionen, Hydrolysen, wobei es durch Einführung einer funktionellen Gruppe (-OH, -NH₂ oder -COOH) sowie durch Dealkylierungsmechanismen zur Aktivierung des Wirkstoffs kommt. [46] Generell sollen durch die Aktivierung die Metabolite eine höhere Polarität und eine geringere Phytotoxizität aufweisen. [48] Die Phase-I-Enzyme umfassen die P450-Monooxygenasen, Esterasen, Amidasen, Peroxygenasen, Reduktasen sowie Phosphatasen. [47] Ähnlich wie in der Leber der Säugetiere, haben die P450-Monooxygenasen eine Schlüsselrolle bei der Entgiftung der Pestizide. Die Cytochrom P450-Monooxygenasen (CYP oder P450) sind membrangebundene Oxidasen, die Hydroxylierungen, Epoxydierungen sowie *N*-, *S*-, *O*-Desalkylierungen und Desaminierungen katalysieren. [49] Die meisten der identifizierten pflanzlichen P450-Enzyme haben jedoch im Vergleich zu Säuger-CYPs eine endogene Funktion in der Biosynthese von z.B. Fettsäuren, Alkaloiden, Steroiden und Jasmonsäure und somit eine geringere Aktivität im Vergleich zu Säugerenzymen. Im Vergleich wurden nur wenige als spezifisch für den Pestizidmetabolismus identifiziert. [50] Nach der Phase-I-Reaktion erfolgen eine oder mehrere Konjugationsreaktionen an der eingeführten funktionellen Gruppe. Bei der Phase-II-Reaktion bildet der Phase-I-Metabolit mit einer endogenen Verbindung wie Glutathion, Kohlenhydraten, Sulfat oder Aminosäure ein Konjugat, wobei die Löslichkeit des Pestizids weiterhin erhöht und die Phytotoxizität verringert wird. [48, 51] Die Entgiftung von Herbiziden, die aufgrund ihres reaktiven elektrophilen Zentrums cyto- sowie potentiell genotoxisch sind, erfolgt irreversibel durch die nucleophile Substitution von Glutathion mittels Glutathion-S-Transferase. [51] Die Glycosylierung als eine Konjugation für endogene und exogene Substanzen erfolgt nach einer vorangegangenen Phase-I-Aktivierung. [52] Diese am weitesten verbreitete Konjugation in den Pflanzen wird unter Verwendung von UDP-Glucose durch membrangebundene und cytosolisch vorliegende *O*-, *N*- und *S*-Glucosyltransferasen katalysiert. [52] Die Glycosylierung stellt analog der Glucuronidierung des Säuger-Fremdstoffmetabolismus eine reversible Speicherform dar. [47] *O*- β -Glucoside stellen Halbacetale aus D-Glucose und dem korrespondierenden Aglycon dar. Diese sind eine häufig vorkommende Substanzklasse im endogenen Stoffwechsel, zum Beispiel dienen sie als reversible

Speicherform von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen wie Flavonoiden in den Vakuolen und folglich auch als eine Form der schnellen reversiblen Entgiftung beim Metabolismus von Pestiziden. [50, 53] Die Glycosylierung und die Hydrolyse der Glycosylate liegt in einem dynamischen Gleichgewicht, so dass sekundäre Pflanzenstoffe bzw. Pestizidmetabolite als Aglycone wieder freigesetzt werden können. [52] Neben der Monoglycoside sind auch Di- und Oligoglycoside bekannt, wobei die Bildung von Gentiobiose in der Literatur beschrieben wird. [48] Im Anschluß können die glycosylierten Verbindungen mittels O-Malonyltransferase mit der Dicarbonsäure Malonsäure verestert werden, hierbei bildet sich ein sekundäres Phase-II-Konjugat in Form einer O-Malonylglycosylierung. [54] Diese Konjugate sind instabil und dienen in der Pflanzenzelle als Signal-Markierung für die Einlagerung in die Vakuole oder den Transport in den extrazellulären Raum. [47]

Anschließend finden bei der Phase-III-Reaktion die Kompartimentierungs- oder Speicherungsprozesse in den Zielpflanzen statt. [51] Phase-III unterscheidet sich grundlegend von dem Metabolismus bei den Säugern, da bei den Pflanzen keine Exkretion stattfindet, sondern die Pflanze lediglich als „Senke“ für Umweltchemikalien angesehen werden kann, hierbei spricht man von einer lokalen Ausscheidung. [47] Die Phase-II-Metabolite können aber auch wie oben beschrieben durch den Tonoplasten in den Vakuolen gespeichert werden oder durch das Plasmalemma transportiert und in die Zellwände eingebaut werden. [50] Bei der Kompartimentierung in den Vakuolen kann es sich hierbei um eine Kurzzeitspeicherung oder eine Langzeit- bzw. Endspeicherung von Stoffwechselprodukten handeln. [50] Während der Einlagerung in die Zellwand kommt es zu einer kovalenten Bindung an Lignin, Pektin, Cellulose, Hemicellulose oder Proteine und damit zu unlöslichen, gebundenen Rückständen. [55] Dieser wird bei der Zulassung von Pestiziden als der nicht-extrahierbare Rückstand definiert. [34]

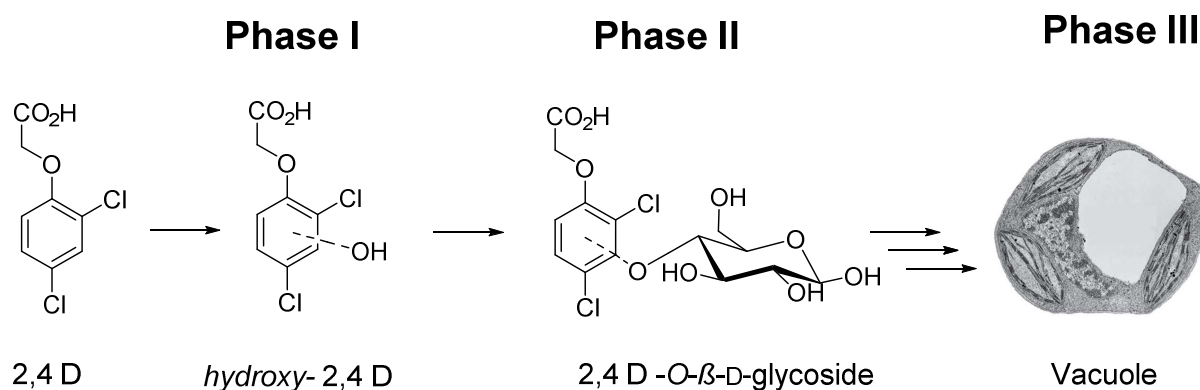


Abbildung 2: Pestizidmetabolismus in einer Pflanzenzelle am Beispiel von 2,4-D. Das Herbizid wird in der Phase-I-Reaktion hydroxyliert. Im Anschluss finden eine Phase-II-Konjugation mit Glucose und eine Veresterung mit Malonsäure statt. Das lösliche Konjugat hat die Möglichkeit, in der Phase-III-Reaktion in der Vakuole kompartmentiert zu werden. Modifiziert nach [47].

2.3 Analytik von Pestizidwirkstoffen und Pestizidmetaboliten mittels LC-MS

Die Pestizidanalytik umfasst im Allgemeinen *Multiscreening*- und Einzelmethode[n]. [56, 57] Die Analyse zielt dabei darauf ab, möglichst viele verschiedene Wirkstoffe in einem Analysengang in der Probe zu bestimmen. Durch den ständigen Fortschritt ist es mittlerweile möglich, in *Multiscreeningmethoden* eine Untersuchung von bis zu 600 Pestiziden inklusive ihrer rechtlich geregelten Metabolite in pflanzlichen und tierischen Lebensmitteln und Trinkwasser zu gewährleisten. [58–62] Üblicherweise wird eine Extraktion nach QuEChERS (*Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe*) sowie eine modifizierte DFG-S-19-Methode (für tierische Lebensmittel) in einer Kombination mit LC- und GC-MS/MS durchgeführt. [56, 63, 64] Einige Pestizidparameter sind aufgrund ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften von der Extraktions- und Messmethode in *Multiscreeningmethoden* nicht erfassbar. Diese erfordern daher eine Zusatzuntersuchung wie die Untersuchung auf Dithiocarbamate, die nach einer Derivatisierungsreaktion zu dem gemeinsamen Markermolekül CS₂ als Summe CS₂ mittels Headspace-GC-ECD (BCS-Methode 01099/M003) bestimmt werden oder Bromid als anorganischer Einzelparameter, der mittels der Propylenoxid-Methode analysiert wird (DFG S18). [65]

Eine weitere Gruppe Pestizide, die mittels Einzelmethode[n] üblicherweise bestimmt werden, sind die sogenannten Polaren Pestizide. Die Bestimmung polarer Verbindungen wie Chlorat/Perchlorat oder Diquat/Paraquat, Fosetyl und sein

Metabolit Phosphonsäure oder Maleinsäurehydrazid folgt dem Protokoll der QuPPE (Quick Polar Pesticides) Methode, die Detektion erfolgt mittels LC-MS/MS. [57]

Die Proben werden gemäß amtlicher Untersuchungsverfahren aus den Lebensmitteln extrahiert und ggf. aufgereinigt. Die Bestimmung mit der jeweiligen zugänglichen Analytik kann mittels Tandem- Massenspektrometern oder hochauflösenden Massenspektrometern wie ToF-, Ionenfallen- oder Orbitrap-MS erfolgen.

Die Identifizierung sowie Quantifizierung erfolgt dabei gemäß des *Guidance Documents* SANTE/11945/2015. Dieser Leitfaden wurde von der EU-Kommission zur analytischen Qualitätskontrolle und Methodvalidierung für Pestizidrückstände in der Analyse in Lebensmitteln und Futtermitteln verfasst, der die Identifizierung, Validierung und Qualitätsicherheitsmaßnahmen definiert.

Die Kriterien für die Substanzidentifizierung für Massenspektrometer mit Nominalmassen- und exakter Massenauflösung sind in Tabelle 3 aufgeführt. Zusätzlich ist eine Retentionszeitschwankung von $< 0,1$ min gefordert. Zur Identifizierung der Substanzen zum Beispiel über Tandem-MS werden für das Analytmolekül Massenübergänge von *precursor*- zu Fragment-Ionen (Product) gefordert. Die Fragment-Ionen entstehen durch gezielte Fragmentierung des *precursor*-Moleküls, zwischen den Massenübergängen besteht eine substanzspezifische Ionenratio. Dies ermöglicht eine sichere Identifizierung der unterschiedlichen Wirkstoffe. [66]

Für eine effiziente Pestizidanalytik ist es grundsätzlich wichtig, dass der Extrakt sowohl für eine GC- als auch LC-Bestimmung geeignet sein sollte. Die Matrixeinflüsse in der Chromatographie sollten möglichst gering sein und es sollte eine ausreichende Sensitivität erreicht werden, damit ein *reporting level* von mindestens 0,010 mg/kg entsprechend der Diätverordnung sowie der Verordnung (EG) Nr. 396/2005 für jeden Analyten gewährleistet ist. [16, 67]

Im Folgenden werden die analytischen und technischen Schritte, die bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, erläutert.

2.3.1 Extraktionsverfahren

Die Problematik bei der Analyse von Pestizidrückständen liegt vor allem im Nachweis geringer Analytkonzentrationen, üblicherweise im ppb-Bereich. Weiterhin wird die Analyse beeinträchtigt durch hohe Konzentrationen an störenden Substanzen, die

mit den Analytmolekülen aus der Matrix co-extrahiert werden können. Diese führen oft zu experimentellen Fehlern wie falsch positive oder negative Nachweise der Analytmoleküle. Weiterhin stellen co-extrahierte Matrixbestandteile vielfach eine hohe Belastung für die analytischen Instrumente dar.

Ziel der Probenvorbereitung ist es, die Spuren Mengen von Analyten quantitativ aus dem Untersuchungsmaterial zu extrahieren und möglichst von störenden chemischen Interferenzen aus der Lebensmittelmatrix so weit wie möglich zu trennen. Typische Probenvorbereitungsschritte umfassen die Probenahme / Homogenisierung, Extraktion, pH-Einstellung und Aufreinigung. [68] Die limitierenden Schritte sind hierbei die Extraktion und die Aufreinigungsschritte, aufgrund einer möglichen Anreicherung (Aufkonzentrierung) oder Abreicherung (Verdünnung bzw. Verlust von Analyten in Extraktionslösungen sowie Adsorbensmaterialien) bei der Detektion von Pestiziden und deren Metaboliten. [69]

Die Probenvorbereitung dient einer Verbesserung der Sensitivität und Spezifität für die nachfolgende Analytik über die LC-MS und GC-MS Methoden.

Im Allgemeinen wird zwischen zwei Extraktionsarten unterschieden, der Festphasenextraktion (*solid-phase extraction*, SPE) und der Flüssigextraktion (*solvent extraction*, SE), wobei diese unterteilt wird in Fest-Flüssig (*solid liquid extraction*, SLE) und Flüssig-Flüssigextraktion (*liquid-liquid extraction*, LLE).

Die SE, an die sich eine SPE anschließen kann, ist nach wie vor die am weitesten verbreitete Technik, aufgrund ihrer leichten und breitgefächerten Anwendbarkeit auf Lebensmittel. Die Extraktion variiert, je nachdem, ob die Probe flüssig oder fest ist. Die Analyse von flüssigen Proben erfordert in der Regel weniger Vorbehandlungsschritte aufgrund ihres fein-homogenisierten Zustands. Während feste Probe üblicherweise wiederholt mit einem nicht mischbaren organischen Lösungsmittel extrahiert werden, benötigen Flüssigkeiten oft nur eine Filtration oder einen Verdünnungsschritt mit Wasser. [70] Die LLE basiert auf der Grundlage der selektiven Trennung der nichtflüchtigen Analyten zwischen zwei nicht mischbaren flüssigen Phasen. Die Analyten werden aus der wässrigen Proben durch ein nicht mischbares organisches Lösungsmittel, z.B. Dichlormethan, 1-Chlorbutan, Ether, Ethylacetat, Methyl-*tert.*-butylether, Chloroform oder Hexan oder Mischungen dieser Lösungsmittel extrahiert. Die Anreicherung der Analyten erfolgt durch anschließende Verdampfung der Lösungsmittel. [71] Die Selektivität der Extraktion kann durch eine

Auswahl der Lösungsmittel und des pH-Wertes der wässrigen Phase erhöht werden. [72]

Feste Proben werden üblicherweise zerkleinert und vor der Extraktion durch mechanisches Mahlen, Mischen, Walzen, Rühren, Hacken, Pressen oder Pulverisieren homogenisiert. Als Verhältnis von Proben- zur Extraktionslösemittelmenge verwendet die häufigste SE-Konfiguration etwa 50 mL Lösungsmittel mit 5-50 g Probe. [70, 73] Die SE wird gelegentlich unter Ultraschall-Behandlung durchgeführt, um die Extraktionsausbeute und die Geschwindigkeit des Verfahrens zu erhöhen. [74] Die Lösungsmittelpolarität in Bezug auf die Löslichkeit des Analyten ist entscheidend. Als besonders geeignet für mittelpolare Analytmoleküle hat sich Acetonitril (ACN) und Ethylacetat erwiesen. ACN ist ein mittelpolares Lösungsmittel, mischbar mit Wasser bei gleichzeitig dispersiver (hydrophoben) Eigenschaften, um sowohl polare als auch unpolare Pestizidrückstände aus nicht fetthaltigen Lebensmitteln effektiv zu extrahieren. Vergleichsweise zeigen die ACN-Extrakte geringere Anteile an co-extrahierten Matrixbestandteilen im Vergleich z.B. zu Dichlormethan (DCM) für lipophile Substanzen. [75] Des Weiteren eignet sich die ACN Extraktion zur direkten Analyse für LC-MS/MS. Ethylacetat oder DCM eignen sich hierbei besonders für Substanzen mit geringer Polarität, wobei diese, um die LC-Analyse durch Peakverbreiterung oder Retentionszeitshifts nicht negativ zu beeinträchtigen, eingedampft und in Lösungsmitteln wie ACN wiederaufgenommen werden müssen. [76]

Bei säure- und alkalilabilen Substanzen muss vor der Extraktion eine Einstellung auf einen geeigneten pH-Wert erfolgen. Anschließend erfolgt die Extraktaufreinigung mit Festphasenextraktion (SPE) oder Gelpermetations-Chromatographie. [75]

Im Vergleich zur LLE wird die SPE aufgrund der geringeren Lösungsmittelvolumina als Probenvorbereitungstechnik für die LC-MS-Analyse bei festen Proben bevorzugt. [77] Mittels der SPE erfolgt eine Anreicherung oder Aufreinigung der Analyten aus einem LLE/SLE-Probenextrakt. Bei der SPE sind die gängigsten Formate gepackte Säulen, die mit Adsorbensmaterialien gefüllt sind. Die Selektivität des Verfahrens basiert auf dem Adsorbens, welches je nach Polarität als Anionen- (Aminopropyl, Diethylaminopropyl), Kationen- (Polystyrensulfonat)-Austauschersäule oder *mixed-mode* Säulen (Oasis HLB, ODS oder C18), verwendet werden können. [78]

Die SPE-Säulen werden vorab mit Elutions- und Extraktionsmittel konditioniert. Der Probenextrakt wird mit dem Adsorbens auf die SPE-Säule geladen, auf der entweder

die Analyten (Anreicherung) oder die Matrixbestandteile (*clean-up*) retenieren (retentive oder nicht retentive SPE). Bei der retentiven SPE werden die Analyten an der Festphase absorbiert, anschließend werden die Analyten mit Lösungsmittel von Matrixbestandteilen gewaschen und mit einem möglichst selektiven Elutionsmittel von der Säule eluiert. Bei der nicht retentiven SPE wird der Probenextrakt auf die SPE-Säule aufgegeben, wobei der Extrakt wieder direkt aufgefangen wird und die Matrixbestandteile an das Adsorbens adsorbiert in der SPE-Kartusche zurückbleiben. Die SPE-Methode kann manuell mit Feinjustierung der Fließgeschwindigkeit erfolgen oder als alternativer Ansatz verbindet eine on-line SPE-Extraktion die traditionelle *offline*-Probenvorbereitung direkt mit dem LC-MS-System. Diese Systeme können voll automatisch ablaufen. [70]

2.3.2 QuEChERS-Extraktion

Um die SE für die Extraktion von Pestizidwirkstoffen aus den Untersuchungsgütern zu optimieren und um Zeit und Kosten zu sparen, wurde das QuEChERS-Protokoll mit ausgewählten Modifikationen entwickelt, das in etwa bei der Selektivität von SPE und der einfachen Handhabung der SE angesiedelt ist. [79] Mittlerweile zählt die 2003 publizierte Methode zum Standardverfahren (DIN EN 15662, L 00.00-115) für die Pestizidrückstandsanalytik in pflanzlichen Lebensmitteln. [80] Das Protokoll schreibt eine Extraktion von wasserhaltigen homogenisierten Proben mit dem gleichen Volumen an ACN vor, auf Eindampf- und Aufkonzentrierungsschritte wurde verzichtet. Anschließend erfolgt eine Salzzugabe (4 g MgSO_4 und 1 g NaCl) zur Phasentrennung und ein Aussalzen der Analyten in die organische Phase. Eine Zugabe von Citratsalzen ermöglicht die Pufferung des Extraktionsgemisches auf einen schwach sauren pH-Wert von 5,5, um eine Zersetzung von säure- oder baseempfindlichen Analyten zu verhindern. Nach einem mechanischen Schüttelschritt und der Zentrifugation, nachdem die Phasen physikalisch getrennt vorliegen, erfolgt die Aufreinigung der oberen ACN-Phase mittels dispersiver Festphasenextraktion (dSPE). Um den Konditionierungsschritt zu umgehen, erfolgt die Adsorption störender Matrixmoleküle an das dispers vorliegende Adsorbens direkt im Extrakt. Hierbei wird ein Adsorbens verwendet, bei dem primäre und sekundäre Amine kovalent an einen Kieselgelgrundkörper gekoppelt vorliegen (PSA). MgSO_4 dient bei der dSPE zur Entfernung wässriger Rückstände. PSA ist ein schwacher Anionenaustauscher, der u.a. anionische Matrixbestandteile wie Fettsäuren aus dem

Extrakt entfernt. Weitere dSPE-Phasen sind C₁₈-Adsorbens für unpolare Matrixbestandteile und Graphit-Adsorbens GCB (Graphitized Carbon Black), um große planare Moleküle (Pigmente) wie Chlorophyll, Carotinoide und Flavonoide zu beseitigen. Im Allgemeinen ermöglicht es die QuEChERS-Methode, Substanzen über einen sehr großen Polaritätsbereich mit dem log P zwischen -1,5 bis 7 (von polar bis unpolar) effektiv aus vielen verschiedenen Matrices zu extrahieren und der nachfolgenden Bestimmung über LC-MS oder GC-MS zugänglich zu machen. [81]

2.3.3 QuPPE-Extraktion

Eine weitere Standardmethode hat sich für sehr polare und/oder ionische Analyten etabliert, die nicht mit Hilfe des QuEChERS-Verfahren extrahiert werden können. Die QuPPE-Methode (*Quick Method for Analysis of Residues of numerous Highly Polar Pesticides in Foods of Plant Origin*) beinhaltet eine Extraktion der wasserhaltigen Probe mit angesäuertem Methanol und direkter Analyse mittels LC-MS/MS ohne weitere *clean-up*-Schritte. [57] Dabei wird die Probe je nach Probeneinwaage und Wassergehalt 2:1 verdünnt und kann noch ggf. vor der Injektion zusätzlich 1:10 verdünnt werden, um Matrix-Effekte zu verringern. Dieses Protokoll wurde von dem europäischen Referenzlabor für Einzelmethode entwickelt (*European Reference Laboratory for Single Residue Methods*, EURL-SRM). [57, 82]

Wie oben erwähnt, benötigen die ausgewählten Parameter aufgrund ihrer unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften separate analytische Zusatzbehandlungen (*Single Residue Methods*, SRM), da diese oft als Zwitterionen (Glyphosat), permanent doppelt geladene Kationen (Paraquat) aus komplexen Matrices eine geringe Extraktionseffizienz und geringe chromatographische Performance aufweisen. [83, 84]

2.4 Flüssigchromatographie und MS-Kopplung

Die Flüssigchromatographie erfolgt mittels geeigneter Eluenten, die sowohl eine chromatographische Trennung als auch die Ionisierung in der massenspektrometrischen Detektion gewährleisten.

Bei der Auswahl der Säulen sind die wichtigsten Parameter die Säulenchemie, -länge und Partikelgröße. Eine wichtige Entwicklung im Bereich der Partikelgrößen stellt die Verkleinerung von den in der HPLC üblichen 5 µm auf 1,7 µm Partikelgröße dar. Diese Entwicklung ermöglichte die *Ultra-High Performance Liquid Chromatography*

(UPLC) mit Drücken von bis zu 18 000 PSI (1200 bar). [85] Die Partikelgröße ist eine Variable in der empirischen VAN DEEMTER-Gleichung, welche die Beziehung zwischen linearer Geschwindigkeit der mobilen Phase und der Höhe der theoretischen Trennböden beschreibt. Die Trennleistung erhöht sich dabei, wenn die Partikelgröße sich auf unter 2.5 μm verringert. So können kürzere Säulen mit kleinerer Partikelgröße eingesetzt werden, wobei sich die Anzahl der theoretischen Trennböden nicht verringert, da ausreichend Partikel zur Adsorption für die Analytbestandteile verfügbar sind. Zusätzlich wird die Trenneffizienz nicht mit steigenden Flussraten oder Lineargeschwindigkeiten beeinflusst, da kleinere Partikel verwendet werden und ein geringerer Widerstand bei gleichbleibender Flussrate entsteht. [86]

Da der erzeugte Gegendruck aufgrund der geringen Partikelgröße erheblich ist, müssen die verwendeten UPLC Systeme einem höheren Druck im Vergleich zur herkömmlichen HPLC bis zu 600 bar standhalten. Deshalb ist eine Pumpe erforderlich, die die Beförderung der mobilen Phase reibungslos und reproduzierbar bei sehr hohen Drücken inklusive Ausgleich der Lösungsmittel-Kompressibilität sowohl in der Gradienten- als auch in der isokratischen Elution bewerkstelligt. [87]

Die typischen Peakbreiten auf halber Peakhöhe, die von dem UPLC System generiert werden, liegen im Bereich von < 1 s. Die Verringerung der Peakbreite erhöht die Signalintensität auf das Drei- bis Fünffache. Die erhöhte Effizienz ergibt eine Reduzierung der Laufzeit der Analyse um den Faktor 2-3 bei gleicher chromatographischer Auflösung. [86]

In Abhängigkeit von dem Trennsystem UPLC oder HPLC ist die Auswahl der stationären Trennphase ausschlaggebend für die Wahl der Eluenten.

In der Pestizidanalytik wird im *Multiscreeningbereich* (für QuEChERS-gängige Pestizide) üblicherweise Umkehrphasen-Chromatographie (*reverse phase*, RP-Chromatographie) eingesetzt und C18- und Phenylphasen genutzt. [88–91] Bei QuPPE-Anwendungen werden unter anderem HILIC (Hydrophilic interaction chromatography) Phasen eingesetzt, welche Normalphasen (NP)-Charakter in ihrer Trennung aufweisen. Weiterhin finden sich Beispiele zur Anwendung von Anionen- und Kationenaustauscher-Säulen, die nur eine eingeschränkte Anwendung auf SRM und hydrophile Analyten finden. [92]

Der Gradient der mobilen Phase gestaltet sich im Allgemeinen für RP-Chromatographie von annähernd 100% wässrig zu 100% organisch mit einer

modifizierten Äquilibrierungszeit der Säule abhängig von der Säulenlänge. Die Chromatographie mit Normalphase verläuft umgekehrt zur RP, wobei die Startbedingungen einen höheren organischen Anteil enthalten. [73, 93]

Den in der LC-MS verwendeten Eluenten werden sogenannte *modifier*, schwache flüchtige Säuren oder Basen oder Salze schwacher flüchtiger Säuren und Basen zugesetzt. *Modifier* dienen dazu, die Ionenausbeute der Analyten zu erhöhen. Hierbei liefern Säuren Protonen für den Positiven Ionisationsmodus und Basen deprotonieren im negativen Ionisationsmodus die Analyten. In Abhängigkeit, bei welchem Ionisationsmodus und pH-Wert die Analytik erfolgt, wird oft eine schwache organische Säure wie Essigsäure oder Ameisensäure (0,1 – 1%) zugesetzt. Bei Ionisation im negativen und im basischen Bereich wird oft Ammoniak zugegeben. Bei den organischen Eluenten wird oft Methanol oder ACN eingesetzt, wobei hier üblich ist, neben einem *modifier*, dem Lösungsmittel auch Wasser zuzusetzen. [94] Der Zusatz von Salzen wie Ammoniumacetat oder -formiat (2-20 mM bei pH 4-5) als *modifier* ermöglichen die Ionisation in beiden Modi [95], während die *modifier* bei der Ionenchromatographie die Elution der Anionen bzw. Kationen durch Austauschreaktion der Analyten mit der stationären Phase bewirken.

2.4.1 Elektrospray-Ionisation (ESI)

Die häufigste Ionisationstechnik der LC-MS in der Pestizidanalytik ist die *Electrospray Ionisation* (ESI), seltener werden chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI) und Photo-Ionisation (PPI) eingesetzt. Bei allen drei Ionenquellen erfolgt die Ionisation bei Atmosphärendruck (API).

In den 1980er Jahren wurde die Kopplung zwischen ESI-Interface und MS etabliert. [96] Die erfolgreiche Anwendung der LC-MS erfolgt erst seit den 1990er Jahren mit dem ESI-Interface. [97] ESI-MS wird am häufigsten für nichtflüchtige, thermolabile Moleküle von kleinen Verbindungen (*small molecules*) bis zu 1000 Da angewendet. [98] In der ESI wird der Probenextrakt in einem Eluenten aufgelöst, der leicht flüchtig und polar ist und durch eine Edelstahlkapillare geleitet wird. An der Kapillare ist je nach Polarität in der ESI ein hohes positives oder negatives Potential angelegt. Aufgrund der hohen elektrischen Spannung (1 - 4,5 kV) zwischen Kapillare und einer Gegenelektrode bildet die Flüssigkeit am Ende der Kapillare einen TAYLOR-Kegel, der mit Ionen angereichert ist. Durch das elektrische Feld wird ein feines Tröpfchen-Spray emittiert. In der Quelle fließt ein warmer Stickstoffstrom parallel zum Spray und

lässt die Tröpfchen durch Verdampfung kleiner werden. Hierbei kommt es zu einer steigenden Abstoßung aufgrund gleicher Ladung auf der Oberfläche des Tropfens, bis die RAYLEIGH-Stabilitätsgrenze erreicht wird [99]:

$$Q_{\text{crit}} = 8\pi \sqrt{\epsilon_0 \gamma r^3}$$

dabei gilt:

Q_{crit} = kritische Ladung

ϵ_0 = elektrische Feldkonstante

r = Tropfenradius

γ = Oberflächenspannung

Der Tropfen wird instabil, wenn näherungsweise der Quotient aus Ladung q und Tropfenradius $r > 1$ wird. Übersteigt die Ladung des Tropfens das RAYLEIGH-Kriterium ($x = 1$) für kritische Oberflächenspannung zwischen Ladung q und Tropfenradius R , entspricht die COULOMB-Energie der Oberflächenspannung und der Tropfen wird instabil. [100] Beim Erreichen der kritischen Ladung bildet sich ein feiner Meniskus aus, von dessen Spitze wiederum feine Tropfen emittiert werden (COULOMB-Explosion). Dieses Modell der kaskadenartigen Verkleinerung wiederholt sich, um immer kleinere Mikrotröpfchen zu generieren. [100, 101]

Für eine optimale Ionisation muss der Probenextrakt in der Probenaufarbeitung in einem Gemisch aus wässrigen und organischen Lösungsmittel (höherer Dampfdruck) wie Methanol hergestellt werden, um eine optimale Verdampfung zu gewährleisten. Weiterhin sollte die Lösungsmittelzusammensetzung im Probenextrakt mit dem Startlaufmittel kompatibel bzw. mischbar sein, um unerwünschte Effekte wie Peakverbreiterung zu vermeiden. Zusätzlich erfolgt noch der Zusatz wie oben beschrieben von flüchtigen *modifiern*, um eine Ladungsübertragung auf den Analyten zu begünstigen und somit die Ionenausbeute in der ESI zu erhöhen. [94] Die Modellvorstellung besagt, dass am Ende der COULOMB-Kaskade nur ein Analyt-Molekül übrigbleibt, bzw. das desolvatisierte Ion von der Oberfläche des hoch geladenen Mikrotropfens verdampft, wobei die im Tropfen enthaltenen Ionen (z.B. Protonen) auf das Molekül übertragen werden. Der geladene Analyt gelangt so durch eine kegelförmige Öffnung (*Cone*) in die intermediäre Vakuumregion und anschließend in die Hochvakuumregion des Massenspektrometers. [100, 101]

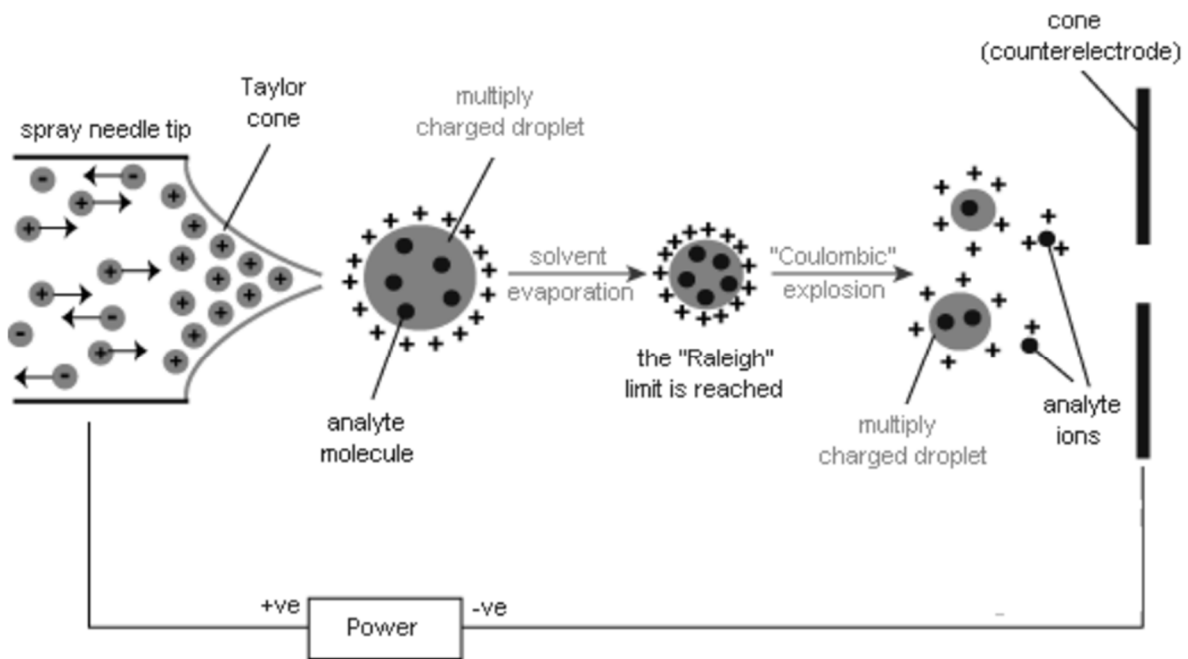


Abbildung 3: Mechanismus der Elektrospray-Ionisation. [102]

Bei der Ionisation werden die Spektren im positiven ESI-Modus von $[M+H]^+$ dominiert und im negativen Modus von $[M-H]^-$. Weitere detektierbare Ionen können je nach *modifier* $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M+NH_4]^+$ oder $[M+HCOO]^-$ sein. Permanente Ionen wie quartäre Ammoniumsalze werden als Kation M^+ detektiert. Des Weiteren kann es auch zur Bildung von Dimeren wie $[2M+H]^+$ oder mit $[2M+Na]^+$ bei höheren Konzentrationen kommen. Bei höheren Molekulargewichten wie Polypeptid-Verbindungen kann es wiederum zur Bildung von mehrfach geladenen Ionen $[M+nH]^{n+}$, $[M+nNa]^{n+}$ oder $[M-nH]^{n-}$ kommen. Die Art der detektierbaren Ionen hängt dabei sowohl von der mobilen Phase also auch von den gewählten Ionen-Quellenparametern ab. [100, 103]

2.4.2 Fragmentierungsreaktionen

Die ESI-Ionisation ist eine milde Ionisationstechnik, das bedeutet, sie führt in der Regel selten zu Fragment-Ionen, da eine relativ geringe innere Energie übertragen wird.

Nichtsdestotrotz kann es zu einer Fragmentierung in der Quelle kommen. Die „*in-source collision induced dissociation*“ (*in-source-CID*) ist eine nicht gezielte Fragmentierung in der Ionenquelle. Die Potentiale im Vakuum-Interface der Ionenquelle sollen die solvatisierten Ionen beschleunigen, dabei soll bei milden

Bedingungen ein Lösungsmittel-*declustering* und der Desolvatisierungsprozess erfolgen. Aufgrund höherer kinetischer Energien kann hierbei eine Ionenfragmentierung induziert werden, wobei sich die Ionenkonzentration und Kollisionsenergie aufgrund der Interface-Spannung dabei auf den Grad der Fragmentierung auswirken. Die *in-source*-CID findet in der Ionenquelle statt. Aufgrund der Lokalisation erfolgt keine Selektion wie in der Tandem-MS, da bei dieser Art der Fragmentierung keine Präselektion der Mutter-Ionen erfolgt. [104]

Neben der *in-source*-CID gibt es noch die so genannte „echte“ also gezielte Fragmentierung in der MS/MS „*collision induced dissociation*“ (CID). Bei der CID handelt es sich um die struktur- und massenspezifische Fragmentierung von Molekülen zur Substanzidentifizierung. Die Fragmentierung erfolgt hierbei in einer Kollisionszelle, die den Ionenstrahl passiert. In der Kollisionszelle wird über ein Nadelventil ein Kollisionsgas (He, N₂ oder Ar) bei einem Druck über das umgebende Hochvakuum eingeführt. Die *precursor ions* kollidieren mit Gasatomen oder Molekülen (N₂) und werden dabei fragmentiert. Ein Teil der kinetischen Energie wird bei der Kollision in Schwingungs- und Rotationsenergie umgewandelt, wobei es in der Folge zu Bindungsspaltungen kommt. Hierbei gilt die Grundregel, dass aufgrund ihrer Mesomeriestruktur und Ladungsverteilung möglichst stabile Produkte bei der Spaltung schwacher Bindungen entstehen. Die CID dient sowohl der Substanzidentifizierung als auch der Strukturaufklärung und ist Grundlage für das Identifizierungskriterium des Massenüberganges bei der Identifizierung von Pestiziden. [105]

2.4.3 Matrixeffekte

Die Nachweisbarkeit von Substanzen mit LC-MS(/MS) kann durch Matrixeffekte eingeschränkt werden. Als Matrixeffekte werden die Auswirkungen co-eluierender Substanzen auf die Ionisierung des Analyten bezeichnet. Dabei werden zwei Effekte beobachtet, zum einen die Ionensuppression und zum anderen kann es auch zu einer Erhöhung des Analytsignal kommen. [106] Beides hat negative Auswirkungen auf die Präzision und Genauigkeit der Messmethode. Matrixeffekte können somit die Anwendung der LC-MS zum Teil im qualitativen Nachweis (Matrixlöschung) und in der Quantifizierung von Substanzen limitieren. Eine Ionensuppression wird häufiger bei der Verwendung einer ESI- als einer APCI-Ionenquelle beobachtet, da ein höherer Anteil an Matrices hierbei ionisiert wird. [107, 108] Salze oder andere

ionische Substanzen, die die Oberflächenspannung der geladenen Tröpfchen beeinträchtigen, können so entweder einen Ladungstransfer-Prozess in der Gasphase beeinflussen oder sind in den Elektrospray-Prozess involviert und führen folglich zur Suppression der Analyten. [109, 108] Bei der Reduktion der Matrixeffekte hat die Probenvorbereitung eine wesentliche Funktion. Dabei kommt es zur Reduktion der Matrixeffekte durch ein Aufreinigen (*clean-up*) der Probe. Durch eine Aufkonzentrierung der Probenextrakte kann es jedoch wiederum auch zur Verstärkung der Matrixeffekte kommen. [108]

Die chemischen Eigenschaften der Analyten bestimmen dabei den Grad der Suppression, wobei apolare Analyten weniger gestört werden als polare Analyten. Hierbei denkbar sind Komplexbildungen von geladenen Teilchen sowie Adsorptionen an Oberflächen. [110] Injektionsvolumen, Verdampfungstemperatur und Ionisations-Modus sind ausschlaggebende Variablen.

Die Matrixeffekte sind dabei sowohl vom Analyten als auch von der jeweiligen Matrix abhängig. Die Stärke der Interferenz ist abhängig von der chromatographischen Trennung. Diese Interferenzen erfordern in der Regel ein Verdünnen der Matrix oder eine Reduzierung von Injektionsvolumina, um die Konzentration der Störsubstanzen in der Ionenquelle und damit die Matrixeffekte zu verringern. Aufgrund der Signallöschung von Analyten in der Probe ist eine Kalibrierung (Quantifizierung) auf Basis einer Matrix-Kalibrierung (*matrix-matched-calibration*, MMC), Standardaddition oder über interne isotoopenmarkierte Standards (*stable isotope-labelled internal standard*, ILIS) notwendig. [111]

2.5 HRMS

Die Hochauflösungs-Massenspektrometrie (High-Resolution MS) hat gemäß der Definition nach SANTE/11945/2015 bei Messungen exakter Massen eine Mindestauflösung von $> 20\text{ k FWHM}$ (*full-width at half maximum of peak* – Halbwertsbreite des Peaks). Typische Instrumente bei der HRMS sind Flugzeitmassenspektrometer (*time-of flight*, ToF) oder Orbitrap, die als Hybrid-Geräte mit einem Quadrupol an LC oder GC gekoppelt werden, aber auch Sektorfeld-Geräte mit GC Kopplung. [112, 113]

In der Pestizidanalytik wird die HRMS vor allem für qualitative *Screeninganalysen* eingesetzt, wobei auch quantitative Anwendungen als komplementäre Techniken zur klassischen Tandem-MS Analyse für ein breites Spektrum an Analyten

(unterschiedliche Substanzklassen an Pestizid-Wirkstoffen) möglich sind,. [113] HRMS Techniken bei ungerichteter Datenaquisition dienen aber auch für retrospektive *Screenings* nach Auffälligkeiten in der Probe, Suche nach bestimmten Verdachtsanalyten (*suspects*), sowie der Suche nach unbekannten Substanzen (*unknowns* oder *non-targeted*) mittels Datenbanken und Strukturaufklärungswerkzeugen. Bei einem *suspect screening* liegen Vorabinformationen über die Probe vor, so dass ein mögliches Spektrum an Analyten sowie die Fragestellung eingegrenzt werden kann, wogegen bei einem *unknown screening* auf Auffälligkeiten in der Probe untersucht wird, worauf Massen bis zu einem gewissen Grad (Kandidatenliste an Summenformeln) identifiziert werden können. [114]

2.5.1 Hybrid-Quadrupol-Flugzeit-Massenspektrometrie (QTof-MS)

Das Grundprinzip der Trennung von Ionen durch Flugzeit-Massenspektrometrie wurde 1946 von E.W. Stephens vorgestellt. [115] Der MS-Analysator, bestehend aus einem langen evakuierten (unter Vakuum stehenden) Flugrohr, dient der Auftrennung von Ionen auf der Grundlage ihrer Geschwindigkeitsunterscheide. Dabei wird die Flugzeit der Ionen durch das Flugrohr ermittelt, um somit das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) zu bestimmen. [116]

Ein Impuls von Ionen mit gleicher definierter kinetischer Energie wird dabei aufgrund unterschiedlicher Flugzeit des jeweiligen Ions aufgetrennt. Die Geschwindigkeit v der Ionen, beschleunigt durch das Potential U , ist eine inverse Funktion der Quadratwurzel ihres Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses (m/z) [100]:

$$v = \sqrt{\frac{2qU}{m}}$$

dabei gilt:

v = Geschwindigkeit

m = Masse

q = Ladung

U = Spannungspotenzial

Folglich durchqueren Ionen kleinerer Masse schneller die Flugstrecke und erreichen den Detektor früher als schwerere Ionen. Die gemessene Flugzeit aller Ionen bildet ein Zeitspektrum ab, das nach Kalibrierung des Instruments zu einem Massenspektrum umgewandelt wird. Die Ankunftszeit eines Ions lässt sich dabei anhand des Quotienten aus der Länge des Flugrohrs und der Geschwindigkeit v der Ionen ermitteln. [117]

Die Massenauflösung wird durch die Breite des Zeitfensters bestimmt, in dem die Ionen mit gleicher Masse den Detektor erreichen ($R = t/\Delta t$). [100] Die beschleunigten Ionen werden von unterschiedlichen Stellen bzw. unterschiedlichen Startpositionen der Ionen zum Zeitpunkt des Beschleunigungsimpulses sowie mit leicht unterschiedlichen Ausgangsgeschwindigkeiten aufgrund der jeweiligen initialen kinetischen Energie der Ionen inhomogen beschleunigt. Beide Faktoren limitieren die Auflösung des ToF-MS, da die Ionen nicht zur gleichen Zeit beschleunigt werden. Die räumliche Verteilung sowie die initiale kinetische Energiedifferenz von den Ionen kann durch verzögerte Extraktion, bei der die Beschleunigung mit einigen Nanosekunden verzögert eingesetzt wird, bei linearer ToF-MS korrigiert werden. [100, 117]

Die Inhomogenität von Ionen kann weiterhin durch einen Reflektor korrigiert werden. Hierbei handelt es sich um einen elektrostatischen Spiegel, der aus einem Gitter und einer Reihe von Ring-Elektroden besteht. Der Reflektor befindet sich dabei am Ende des Flugrohrs und ist der Wendepunkt für die Ionen. Jede Ring-Elektrode hat ein stärker abstoßendes Potential im Vergleich zum Vorgänger und verlangsamt die Ionen nach dem Eintreten in den Reflektor-Bereich. Eine Verbesserung der Massenauflösung durch Verlängerung der Flugzeit und Energiekorrektur der Ionen kann so erreicht werden. [100, 118]

Bei einem orthogonal beschleunigten (*orthogonal acceleration*, oa) ToF-MS kann eine kontinuierlich arbeitende Ionenquelle verwendet werden. Dabei tritt der Ionenstrahl aus der Quelle senkrecht zur Hauptachse des ToF-Instruments in den Beschleunigungsbereich der Ionen. Ein kurzer elektrischer Impuls auf den oa-Bereich wird angelegt, um die Ionen effizient von einem Abschnitt des Strahls der Massentrennung zuzuführen. Die Kopplung zwischen der externen kontinuierlichen Ionenquelle mit dem Beschleunigungsbereich der Ionen des oa-ToF-MS erfolgt über eine ionenoptische Fokussierung (Ion-Guide). [119, 100]

Seit den 1990er Jahren werden die oa-Tof-Analysatoren mit kontinuierlichen Ionenquellen für hybride Instrumente genutzt, in denen Analysatoren als zweite Massenanalysatoren installiert werden. [119]

Die effektivsten hybriden Instrumente stellt eine Kombination aus oa-Tof mit einem Quadrupol-Analysator in einer QTof-Konfiguration dar. [100, 117]

Die HRMS mittels QTof ermöglicht die Bestimmung von Summenformeln anhand von Unterschieden molarer Massen in der vierten Nachkommastelle, sodass isobare Verbindungen mit identischer Nominalmasse nebeneinander nachgewiesen werden können.

Die Summenformel der jeweiligen Verbindung kann, da sich die exakten monoisotopischen Molmassen, bedingt durch den unterschiedlichen Massendefekt der Atome je nach deren elementarer Zusammensetzung, unterschiedlich stark von den ganzzahligen Werten unterscheiden, bei der HRMS abgeleitet werden. Für das Isotopenmuster werden zusätzlich die Isotopenpeaks, die durch Anwesenheit von Deuterium, ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{37}Cl oder ^{81}Br hervorgerufen werden, bei der Auswertung berücksichtigt, wobei sowohl das Intensitätsverhältnis (*abundance match*) als auch der m/z -Abstand (*spacing match*) als ein Einflusskriterium für die Richtigkeit einer Summenformel angewendet werden. Auf der Basis dieser Messdaten ermöglicht die Auswertesoftware der Tof-MS eine automatische Berechnung der Summenformel. [100, 120]

Des Weiteren ist bei den QTof-Instrumenten eine hohe *Scangeschwindigkeit* (bis zu 15 Spektren/sec (Hz)), bei der Datenaufnahme mit hoher Empfindlichkeit und Massengenauigkeit im MS- und im MS/MS- Modus möglich. [121]

Im MS-Modus sind die beiden Quadrupole (Q1) und (q2) im RF-Modus (keine Massenfilter) geschaltet und dienen als Ionenleiter. Der Tof dient als Massen-Analysator, alle Ionen, die durch die Ionenleiter kommen, werden orthogonal beschleunigt und erfasst. Daraus resultieren Spektren, die mit einer hohen Massenauflösung in einem großen Massenfenster (*full scan*) im Bereich von bis zu 2000 Da aufgenommen werden. Im MS/MS-Modus kann der Q1 zur Selektion von Vorläufer-Ionen genutzt werden. Diese Ionen werden durch eine Potenzialdifferenz zwischen 10 und 60 eV i.d.R. in die Kollisionszelle (q2) beschleunigt. In der Kollisionszelle werden die Ionen (Analyten) mit neutralen Gasmolekülen oder -atomen (N_2 oder Ar) fragmentiert. Die Fragment-Ionen werden dann als hochaufgelöste Massenspektren im Tof-Analysator detektiert. [100, 122]

Eine Kombination aus beiden Messmodi ermöglicht die Datenaufnahme sowohl der Addukte von Analyt-Molekülen als auch korrespondierender Fragment-Ionen in einem Analysenlauf. Hierbei wird ein Zyklus gesplittet, im ersten Halbzyklus, im MS-Modus, werden die Ionen durchgelassen und somit die Muttersubstanz detektiert. Im zweiten Halbzyklus erfolgt eine Beschleunigung mit einer Rampe von bis zu 60 V, somit erfolgt eine Alle-Ionen-Fragmentierung, die im Detektor analog des MS/MS-Modus erfasst wird. Anschließend erfolgt eine Dekonvolution der Ionen-Spektren, wobei die Fragment-Ionen zurückgerechnet (zugeordnet) werden auf die Muttersubstanzen. Dieser Modus wird als MS^E (*elevated* = eine Erhöhung der Spannung) bezeichnet. [123]

Die Datenaufnahme von Quasimolekülonen und zugehöriger Fragment-Ionen ermöglicht im *full-scan*-Modus die Übersicht über die gesamte Probe, d.h. in jedem chromatographischen Peak werden Moleküle mit Massenspektrum und Fragmentierungsmuster innerhalb des gewählten Massenbereichs detektiert. Diese Datenaufnahme ermöglicht die retrospektive Analyse von Proben, die gezielt auf verschiedene Substanzen und in Abhängigkeit von der jeweiligen Fragestellung jederzeit reproduziert werden können. [124]

2.5.2 Lockspray (Interne Korrektur der Massenachsenkalibration)

Die ToF-Instrumente sind anfällig für geringe Temperaturschwankungen, wodurch sich das Flugrohr im Mikrometerbereich ausdehnen oder schrumpfen kann. Dies beeinträchtigt die Messgenauigkeit von m/z und damit die Auflösung. Der Massendrift ist schon innerhalb des Zeitfensters eines chromatographischen Laufs messbar, daher benötigen diese Instrumente für die exakte Massengenauigkeit neben der externen Kalibrierung der Massenzuordnung eine interne Kalibrierung. Dabei wird kontinuierlich eine bekannte Massenkalkulationssubstanz (Lockmasse, z. B. Leucine Enkephalin) bei der Messung zugeführt.

In der Ionenquelle befindet sich eine Revolverblende (*baffle*), die kontinuierlich eine Massenkalkulationslösung als sogenanntes *Lockspray* einsprüht. Bei der Auswertung erfolgt dann ein Abgleich der m/z -Verhältnisse von LC-MS-Chromatogrammen mit den gemessenen m/z der Lock-Masse. [125]

Neben dem dualen Spraysystem besteht alternativ die Möglichkeit von einem T-Stück nach der Trennsäule, wobei die Lockmasse dem Eluenten beigemischt wird.

Bei dem in dieser Arbeit genutzten HRMS-System liegt eine Z-SprayTM-Quelle (bezogen auf die Verlaufsform des Sprays) vor, ein duales Spraysystem mit einer Referenzlösung als Ein-Punkt-Korrektur für die Massengenauigkeit. Dieses ist in Abbildung 4 dargestellt. [126]

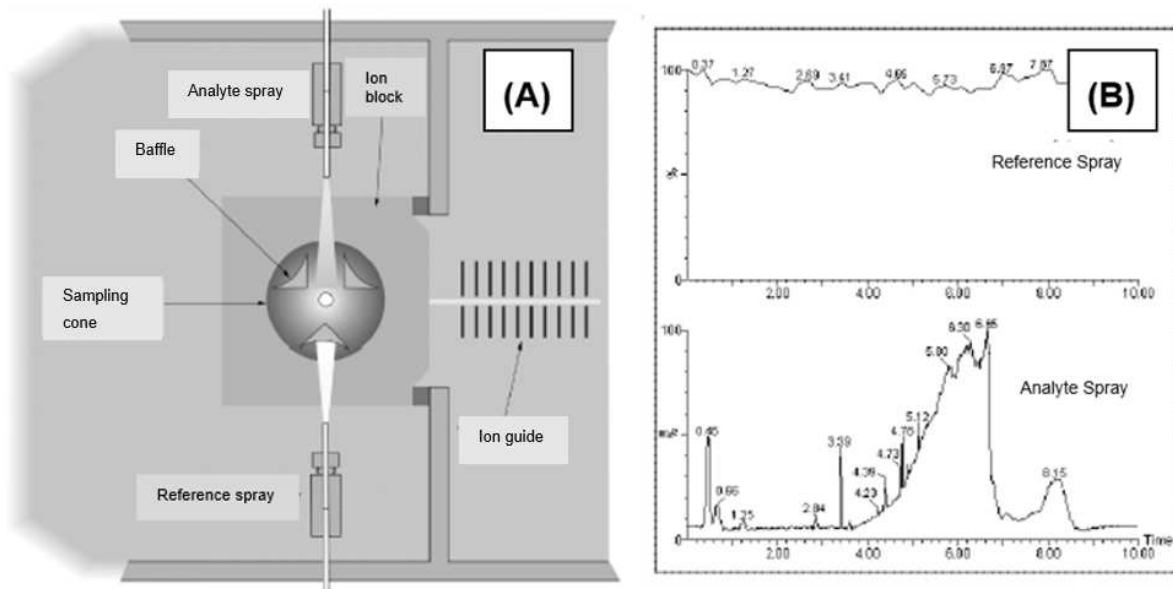


Abbildung 4: Ionenquelle mit einem dualen Spraysystem (A). Ein Baffle schaltet innerhalb der Messanalyse zwischen dem Sample- und dem Referenzspray um, um den Massendrift auszugleichen. In einem Analysenlauf wird parallel ein LC-MS-Spektrum für die Referenzmasse und für die Probe erzeugt (B). [127]

2.5.3 Ionenmobilitätspektrometrie (IMS) - Kopplung

Bei der IMS driften Ionen in einem elektrischen Feld gegen die Strömungsrichtung eines Gases. Diese Driftzelle befindet sich im Ionenpfad im Hochvakuum des Massenspektrometers (Siehe Abbildung 5). Ionen unterschiedlicher Ladung, Masse und / oder Struktur erreichen unterschiedliche Driftgeschwindigkeiten und werden voneinander getrennt. [128]

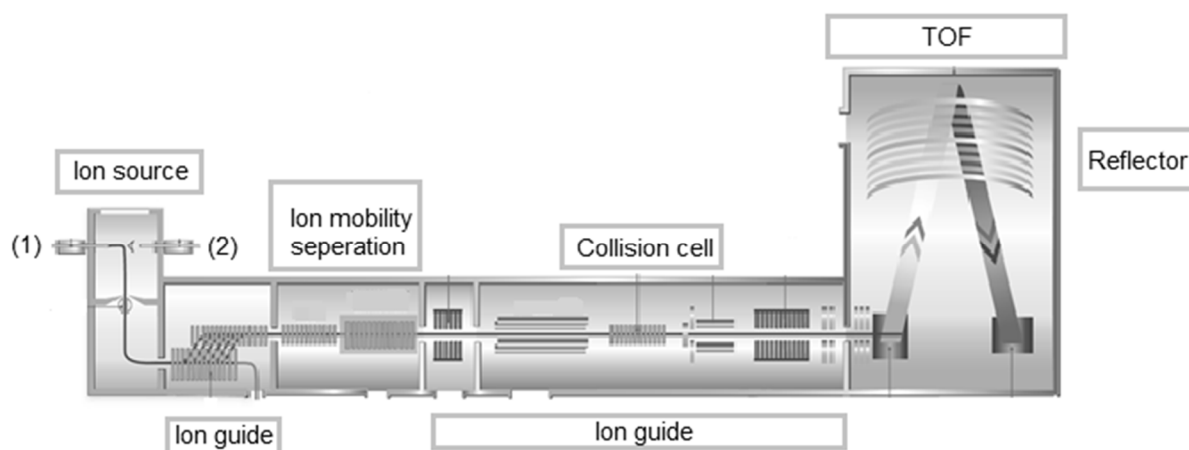


Abbildung 5: Schematische Darstellung von IMS-QToF-MS (VION). Nach (1) Probenaufgabe und (2) Referenzspray folgt die Auftrennung mittels Ionenmobilitätsspektrometrie und anschließender MSE Datenaufnahme sowie Massenanalyse im ToF. [129]

Zur Erzeugung eines konstanten elektrischen Feldes besteht die gesamte Driftröhre aus Metallringen, die durch Isolatoren getrennt werden. Eine Hochspannung wird angelegt, wodurch Feldgradienten mit mehreren V/cm erzeugt werden können (Siehe Abbildung 6). [130] Bei der IMS sind verschiedene Modelle bekannt, die beiden gängigsten sind die *drift tube* und *travelling wave* (TW) -IMS. Bei der klassischen Form der IMS in einer *drift tube* werden die Ionen entsprechend ihrer rotationsgemittelten Querschnittsfläche aufgetrennt. Die TWIMS Trennung erfolgt zusätzlich mit einer an die Ringelektroden angelegten Wanderspannungswelle (Siehe Abbildung 6). Dabei werden die Ionen, die eine höhere Mobilität aufweisen, auf der Spannungswelle zusätzlich „getragen“. [130]

Um die Auflösung in der IMS zu erhöhen, können verschiedene Gase wie Helium, Stickstoff oder Kohlenstoffdioxid genutzt werden, um somit eine höhere Polarisation und Wechselwirkung zwischen Analyt-Ionen und dem Driftgas zu erzeugen und die Reibungskraft zu steigern. Die Theorie der Impulsübertragung besagt, dass die *collision cross sections* (CCS-Werte), die in einem Ionenmobilitätsspektrometrie-Experiment erhalten wurden, eine Funktion der induzierten Dipolwechselwirkungen sowie kurzstreckenreaktive Wechselwirkungen zwischen Analyt-Ionen und Driftgasmolekülen sind. In Studien wurde jedoch gezeigt, dass verschiedene Driftgase, wie hochpolarisierbare Gase nicht notwendigerweise die Trennung chemisch ähnlicher Ionen verbessern. Dies lässt sich durch die starke Wechselwirkung zwischen den Analyt-Ionen und den Drift-Gas-Molekülen erklären.

Hierbei zeigen Stickstoff, Kohlenstoffdioxid und Stickstoffmonoxid ähnliche Auflösungen, wobei Helium die geringste Auflösung aufwies. [131]

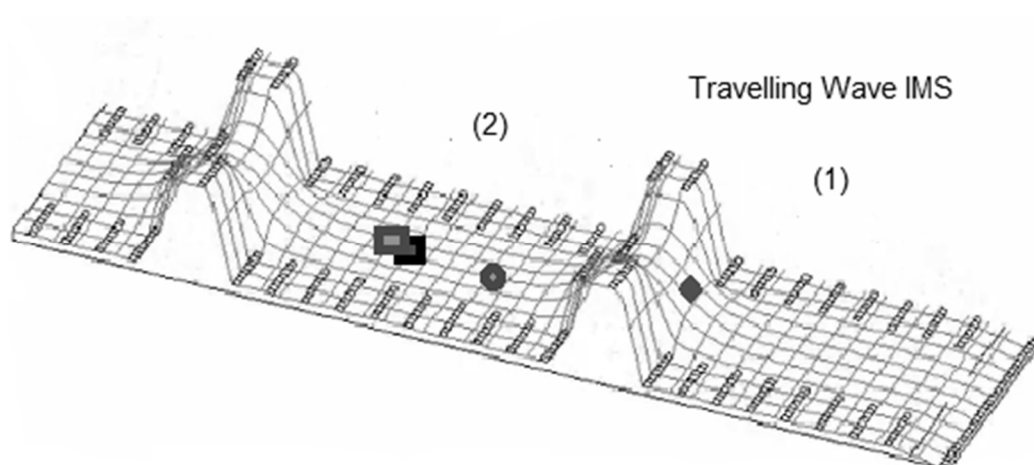


Abbildung 6: Travelling Wave-IMS von verschiedenen Molekülen. Kleine Moleküle passieren die Zelle schneller mit einer kürzeren Driftzeit (1), während die größeren Moleküle zurückgehalten werden (2). Modifiziert nach [132].

Das Prinzip bei der IMS ist, dass bei konstanter Temperatur und konstantem Druck die Mobilität der Ionen durch die Anzahl der Ladungen, die reduzierte Masse und den Stoßquerschnitt der Ionen bestimmt wird. Für kleine atomare Ionen wird die Mobilität von der Masse bestimmt, bei schweren von dem Stoßquerschnitt, also von der (3-D) Struktur beeinflusst. Für alle Ionen dazwischen werden die Mobilität und damit die Driftzeit in der IMS-Zelle von beidem, also Masse und Struktur beeinflusst. [133, 134] Analog verhält es sich bei unterschiedlich geladenen Molekülen mit gleicher Masse, da sich die Geschwindigkeit im elektrischen Feld mit zunehmender Ladung erhöht.

Im elektrischen Feld nehmen die Ionen zwischen zwei Stößen Energie auf und geben diese wieder ab. Dies geschieht sehr schnell, hierbei erreichen die Teilchen eine charakteristische mittlere Geschwindigkeit (Driftgeschwindigkeit) in der IMS-Zelle. Daher werden die Ionen in einer IMS-Zelle nach ihrer Driftzeit aufgetrennt. [135] Da die Driftgeschwindigkeit aufgrund der Größe der Ionen unterschiedlich ist, lassen sich diese voneinander unterscheiden. Auf diese Weise sind auch Rückschlüsse auf die jeweilige Größe des entsprechenden Ions möglich.

[136]

Die IMS ermöglicht dadurch die Auftrennung von Konformeren oder isobarer Analyten, die identische chromatographische Eigenschaften aufweisen (co-eluierende Substanzen), in einer zusätzlichen Dimension in der Gasphase. Die IMS-

Zelle wird zusätzlich zu dem ToF-MS für die Stoßquerschnitte (*collision cross section*, CCS) kalibriert, so dass CCS für die Analyten in der Probe ermittelt werden können. Damit ist die Driftzeit und CCS eine stoffspezifische Größe und kann zur Identifizierung bzw. Verifizierung einer Substanz genutzt werden. [136]

Bei einer IMS-Kopplung erfolgt zunächst die Auftrennung der Probe über die UPLC, die getrennten Analyten werden mittels ESI ionisiert und als Ionenpakete in die Driftröhre eines IMS gebracht, wo eine Trennung aufgrund der dreidimensionalen Struktur und Ladung der Moleküle erfolgt. Anschließend gelangen die Ionenpakete nach anschließender Fragmentierung in q2 in den ToF-Detektor, wo die Auftrennung nach m/z -Verhältnissen erfolgt. Dadurch wird die Peakkapazität als ein multidimensionales Produkt aus der Auftrennung von der LC, IMS, MS und der orthogonalen Auftrennung berechnet. [137]

2.6 Tandem-MS

In der vorliegenden Arbeit wurde neben dem QToF weiterhin ein Tandem-Massenspektrometer (Tandem-MS) eingesetzt. Das Tandem-MS besteht aus einer ESI-Ionenquelle, mehreren Fokussierungslinsen und drei Quadrupolen (*triple quadrupole*, QqQ) (Siehe Abbildung 7).

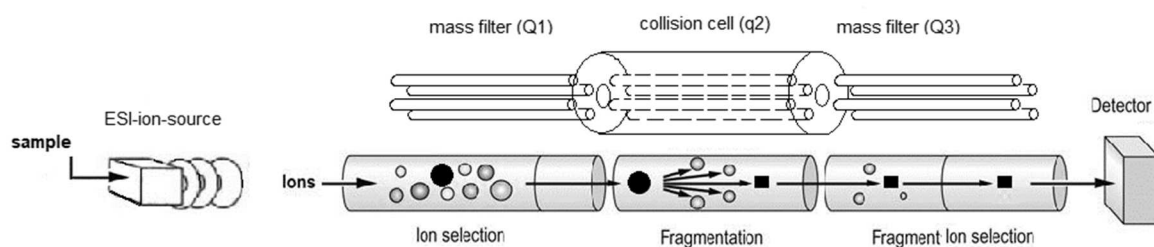


Abbildung 7: Aufbau eines Tandem-MS im MRM-Modus. [138]

Der erste Quadrupol (Q1) ist ein Massenfilter, in dem die Selektion der Vorläufer-Ionen erfolgt. Der Quadrupol q2, die Stoßzelle, dient der Fokussierung und als Kollisionszelle, in der die in Q1 selektierten Ionen durch Gasmoleküle (z.B. N₂) fragmentiert (CID) werden können. Der dritte Quadrupol (Q3) ist wiederum ein Massenfilter für die Fragment-Ionen (Produkt-Ionen). [139]

Ein Quadrupol setzt sich aus vier parallelen runden Metallstäben zusammen, die um eine zentrale Achse angeordnet sind (Siehe Abbildung 7). Ein Paar jeweils gegenüberliegender Stäbe hat das gleiche Potenzial und zwischen den

benachbarten Elektroden wird eine Gleich- und Wechselspannung angelegt. [115] Durch die Überlagerung von Gleich- und Wechselspannung beginnen die Ionen, in Abhängigkeit von der angelegten Spannung, Frequenz und Ionenmasse zu oszillieren. [140] Ebenfalls wie bei der QToF-Technik ist das m/z -Verhältnis entscheidend, aufgrund dessen die Ionen bei bestimmten Bedingungen für Gleich- und Wechselspannung einen Quadrupol passieren. Denn alle Ionen, die sich im Quadrupol befinden, beginnen zu oszillieren, werden jedoch, wenn sie in der Laufbahn nicht gehalten werden, durch die Stäbe neutralisiert. [141, 115]

Ein Tandem-MS hat durch die Selektion von bestimmten Ionen durch Q1 ein geringes Rauschen, wodurch eine hohe Empfindlichkeit für Analyten in Probenextrakten bei hohem Matrixbackground erreicht werden kann.

Die Konfiguration von QqQ kann für verschiedene Arten der Messung eingesetzt werden. Das Gerät kann als Single-Quadrupol zur Messung von Massenspektren (*full scan*) oder einer bestimmten Ionenspur (*selected ion monitoring*, SIM) eingesetzt werden. Im MS/MS-Modus können Vorläufer-Ionen-Spektren (*precursor scan* – ein bestimmtes Fragment wird einem Vorläufer-Ion zugeordnet) und Fragment-Ionen-Spektren (*product scan*) aufgenommen werden. Des Weiteren können Fragment-Ionen sich von Neutralteilchen abspalten, in den Neutralverlust-Spektren (*neutral loss scan*) wird die Massendifferenz von Q1 zu Q3 erfasst. [142, 115]

In der Pestizidanalytik im *targeted*-Modus wird überwiegend im *multiple reaction monitoring* (MRM) Modus gearbeitet. Beim MRM wird im Q1 ein Ion selektiert, im q2 fragmentiert und im Q3 wird ein bestimmtes Fragment-Ion selektiert. Das Produkt-Ion-Spektrum ausgehend von einem selektierten *precursor ions* stellt einen Massenübergang dar. Bei der Methodenentwicklung werden die Einstellungen für die Ionenoptik (Empfindlichkeit) für jeden Massenübergang optimiert, d.h. Ionisationsbedingungen in der Quelle, Spannungen im Ionenpfad und *collision*-Energien (CE) bei der Fragmentierung. Oft stellen die in Multiparametermethoden gewählten Ionisationsbedingungen einen Kompromiss über alle enthaltenen Parameter dar und entsprechen nicht dem jeweiligen Parameter-Optimum. [143]

Die MRM Methoden werden für die gezielte Pestizidanalytik eingesetzt. Die MS/MS-Messung bietet für die qualitative und quantitative Multiparameteranalyse bei sehr hoher Sensitivität eine hohe Selektivität und sicherere Identifizierung durch die Massenübergänge bei verringertem Hintergrundrauschen. Ein Detektorsignal im Chromatogramm wird nur erfasst, wenn ein Massenübergang von Q1 → Q3 erfasst

wird. Im Gegensatz zum MS-Modus werden höhere Messzeiten (*dwell time*) pro *m/z*-Verhältnis verwendet. MS/MS-Signale können eine geringere absolute Signalthöhe im Vergleich zum kontinuierlichen MS-Signal aufweisen, jedoch erreichen diese eine Erhöhung des Signal-Rausch-Verhältnisses (*S/N*) und damit die notwendigen niedrigen Nachweisgrenzen. Diese Messtechnik wird aufgrund ihrer Selektivität und Empfindlichkeit hauptsächlich zur quantitativen *targeted*-Analytik im Pestizidbereich eingesetzt. [144, 115]

2.7 Screening-Anwendungen für Pestizidwirkstoffe und -metabolite

Die Nutzung von Pflanzenschutzmitteln erfordert die Einführung von RHG (*maximum residue levels*, MRL's). [58] Generell wird in jedem Landes- und Handelslabor ein gezieltes *Multiscreening*, das sogenannte gezielte *Screening (targeted screening)* durchgeführt. Hierbei erfolgt die quantitative und qualitative Bestimmung für das Monitoring anhand von ausgewählten, nach Evaluierung und Validierung, etablierten (eingemessenen und optimierten) Parametern in einer Messmethode. [145] Die *targeted*-Methoden werden dabei überwiegend im MRM-Modus durchgeführt in einer Kombination aus GC- und LC-MS sowie MS/MS Kopplung. [63] Die robusten Methoden mit einem linearen Bereich von bis zu 10^5 Einheiten bieten eine hohe Sensitivität und Selektivität. [146] In den letzten Jahren geht die Tendenz überwiegend in Richtung LC-MS/MS Technik da hierbei bis auf wenige Ausnahmen wie DDT und Captan bis zu 90% der Parameter erfasst werden können. Die Methoden umfassen zwischen 200-400 Pestizide und werden je nach rechtlich gefordertem Monitoring und toxikologischer Relevanz stetig erweitert und optimiert. [58]

Die gezielte Analyse basiert auf dem *scan* von Nominalmassen der Analyten. Aufgrund der limitierten Analytenliste werden bei dem Ansatz keine weiteren Komponenten erfasst, die möglicherweise in der Probe enthalten sind. Folglich werden verbotene Substanzen, Pestizide und deren Metabolite, die nicht üblicherweise eingesetzt oder monitored werden, nicht detektiert. Die Einschränkung der Analytenanzahl bzw. MRM-Spuren innerhalb der Methode basiert auf der Limitierung der *dwell time* (Verweilzeit jedes MRM-Massenübergangs), um für die Definition eines Peaks die notwendige Anzahl an Datenpunkten zu erreichen (z.B. 10) und infolgedessen die Methodensensitivität, da dies zu einem geringeren Signal/Rausch-Verhältnis führt. [147] Fehlende Informationen zum Vorkommen von

Metaboliten oder verbotener Substanzen sowie die Verfügbarkeit von Standards sind weitere Limitierungen. Metaboliten Standards sind in der Regel kommerziell nur dann verfügbar, wenn sie Bestandteil der Rückstandsdefinition von Pestizidwirkstoffen sind. Die sogenannten (rechtlich und toxikologisch) relevanten Metabolite werden zusammengefasst als ein Summenparameter mit dem Wirkstoff (Siehe Abschnitt 1.6). Wie unter Abschnitt 2.1.3 beschrieben, ist die Differenzierung, ob ein Metabolit als relevant oder nicht-relevant eingestuft wird, ein komplexer Prozess. [58] Ausgehend von einer ähnlichen Toxizität sowie Persistenz-Eigenschaften des Mutterwirkstoffs, wird es zunehmend wichtiger, eine Methode zu entwickeln, in der Substanzen als nicht gezielt (*suspect screening*) oder auch ohne vorab Information über die Probe als unbekannt (*non-targeted* oder auch *unknown screening*) erfasst werden können. [148] Beide Methodenansätze dienen dazu, unbekannte Spezies zu erfassen und die Lücke zwischen dem analytischen Stand der Technik zum Zeitpunkt der Zulassung zu schließen. [149]

Mit einem relativen *mass error* < 3 ppm und einer Auflösung zwischen 20 k und 100 k bietet HRMS eine geeignete Plattform, um ein exaktes-Massen-Screening durchzuführen. Die Strukturaufklärungswerkzeuge der zurzeit verfügbaren Softwareprodukte ermöglichen die Suche nach *suspect* und *unknown*-Komponenten. Im qualitativen *Screening*-Ansatz stellt das *suspect screening* eine Kombination aus *targeted* und *non-targeted screening* dar. Hierbei können vorab Informationen für vermeintliche oder nachgewiesene Substanzen als Ausgangspunkt für ein *suspect Metabolitenscreening* gezielt eingesetzt werden. [148]

Währenddessen ermöglicht eine *full-scan*-Aufnahme von Daten ohne Limitierung (im Gegensatz zur Ionenpräselektion bei der LC-MS/MS) einen Überblick über die Komplexität der Probe. Eine retrospektive Datenanalyse kann neben einer Datenbankabfrage oder von in-House-Bibliotheken erfolgen. In der Literatur werden einige *Screening*-Ansätze als Modellstudien sowohl mit LC-MS/MS als auch LC-HRMS beschrieben, jedoch existieren wenige systematische Ansätze zum *Screening* von unbekannten Substanzen. In Abbildung 8 ist ein Workflow für einen systematischen *Screening*-Ansatz für Pestizide, -konjugate und relevante Pestizidmetabolite dargestellt. [124]

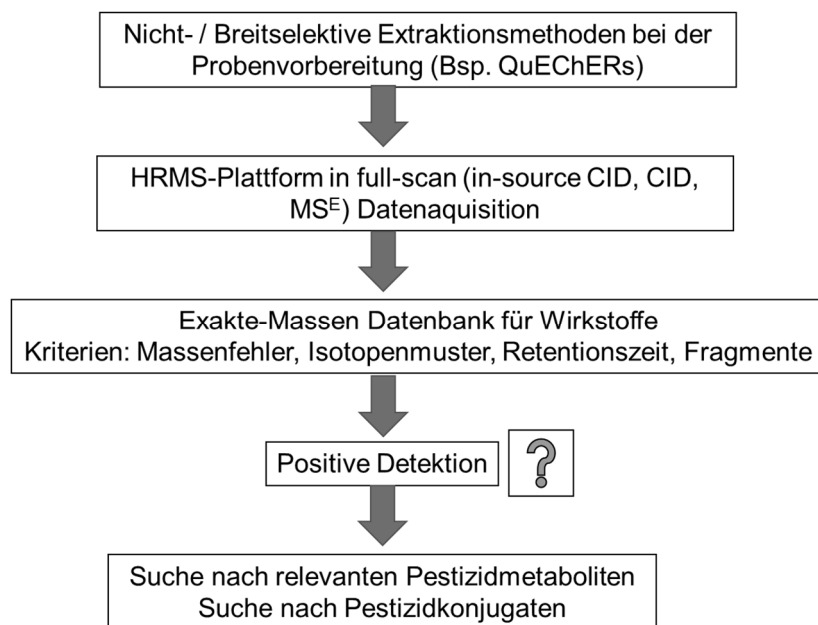


Abbildung 8: Workflow für ein systematisches Screening-Vorgehen bei Pestiziden, -konjugaten und relevanten Pestizidmetaboliten. [124]

Dabei wurde in der Literatur ein klassischer Ansatz von Extraktionen unter anderem mittels QuEChERS durchgeführt, die Datenaquisition erfolgte mittels eines HRMS Instruments. Die exakten Massen, Isotopenmuster sowie Fragmente dienten hierbei der Identifizierung von Substanzen, wobei üblicherweise am Ende eine Bestätigungsanalyse mittels eines Referenzstandards erfolgt. Beispiele für die Entwicklung von *Screening*-Ansätzen in der Pestizidanalytik sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Literaturauswahl zur Entwicklung der bisherigen Anwendung von LC-HRMS im Screening von Pestiziden und Pestizidmetaboliten in pflanzlichen und tierischen Lebensmitteln.

Autoren	HRMS-System	Screening Ansatz	Identifizierung	Probenaufarbeitung	Zielkompo- nenten
Ferrer et al. (2005) [150]	LC-Tof-MS	<i>targeted</i>	Standards	QuEChERS	Pestizid- Wirkstoffe
Grimalt et al (2007) [151]	LC-QTof-MS	<i>targeted</i>	Standards diagnostisch	Extraktion in Aceton	Pestizid- Wirkstoffe Metabolite
Thurman und Ferrer (2007) [152]	LC-Tof-MS	<i>targeted</i>	Standards	QuEChERS	Pestizide Metabolite
Picó et al. (2007) [153]	LC-QTof-MS LC-Iontrap-MS	<i>targeted</i>	Standards	Extraktion in Ethylacetat	Pesticid- Wirkstoffe Metabolite
García-Reyes et al. (2007) [114]	LC-Tof-MS	<i>suspect</i>	diagnostisch	QuEChERS MeOH	Metabolite
Mezcua et al. (2009) [154]	LC-Tof-MS	<i>targeted</i>	Standards	QuEChERS	Pestizid- Wirkstoffe
Grimalt et al. (2009) [113]	LC-Tof-MS LC-QTof-MS	<i>targeted</i>	Standards	QuEChERS	Pestizid- Wirkstoffe

Autoren	HRMS-System	Screening Ansatz	Identifi-zierung	Probenaufarbeitung	Zielkompone nten
Molina-Díaz et al. (2012) [124]	QToF-MS	<i>targeted suspect</i>	kommerzielle und synthetisierte Standards diagnostisch	QuEChERS	Pestizid- Wirkstoffe Metabolite
Thurman et al. (2013) [155]	LC-QToF-MS	<i>suspect</i>	diagnostisch	Extraktion in Wasser/MeOH	Metabolite
Sánchez-Hernández et al. (2016) [156]	LC-QToF-MS	<i>suspect</i>	Standards diagnostisch	Extraktion mit Wasser und SPE	Metabolite
Goscinnny et al. (2015) [133]	LC-TWIS-QToF- MS	<i>targeted</i>	Standards	QuEChERS	Pestizid- Wirkstoffe
He et al. (2016) [157]	LC-QToF-MS	<i>targeted unknown</i>	Standards	Direktinjektion	Pestizid- Wirkstoffe
Reguiero et al. (2016) [136]	LC-TWIMS- QToF	<i>targeted</i>	Standards	Extraktion in Wasser/ACN angesäuert	Pestizid- Wirkstoffe Metabolite
Gautam et al. (2017) [158]	LC-Q-Trap-MS	<i>suspect unknown</i>	diagnostisch	QuEChERS	Metabolite
Bijlsma et al. (2017) [159]	LC-TWIMS- QToF	<i>targeted</i>	Standards	QuEChERS	Pestizid- Wirkstoffe Metabolite

Mit den Anfängen des *Multiscreenings* für Pestizidrückstände etablierte sich die ToF-Technik in der Pestizidanalytik. Ferrer et al. (2005) beschrieben eine der ersten Multimethoden für die Pestizidanalytik mit 15 Parametern in Obst und Gemüse mittels LC-ToF-MS. [150] Danach wurden Multimethoden mit immer größeren Umfängen von Wirkstoffen und relevanten Metaboliten entwickelt. Parallel zur Entwicklung der Multimethoden folgte der Ausbau der QToF-MS Hybrid Technik. Grimalt et al. (2007) erläutern in ihrer Studie den Einsatz von LC-QToF-MS und die Identifizierungspunkte (Siehe nächster Abschnitt 3.5.1) bei der qualitativen und quantitativen Substanzbestimmung. [151] Diese Studie enthält auch eine der ersten publizierten Ansätze für die Identifizierung von Pestizidmetaboliten von Buprofezin auf Bananenschale. Thurman und Ferrer (2007) sowie Picó et al. (2007) begannen in ihren Studien zum *targeted Pestizidscreening* auch relevante Pestizidmetabolite zu implementieren. [153, 152] Im gleichen Jahr wurde von der Gruppe um García-Reyes et al. (2007) eine Methode zur Identifizierung von Pestizidmetaboliten anhand ihrer Fragmentierungsmuster mit diagnostischen Fragmenten, die sowohl bei der Muttersubstanz als auch beim Metaboliten vorkommen, entwickelt. [114] Weitere Beispiele zur Metabolitenidentifizierung unter Verwendung diagnostischer Fragmente folgten von Polgár et al. (2012) in Obst und Gemüse. Zweigenbaum et al. (2013) beschrieben in ihrer Publikation die Identifizierung von sieben Imidacloprid-Pestizidmetaboliten in Zwiebeln. [124, 155] In einem *suspect screening* Ansatz erfolgte eine exakte Massen-Messung, die Suche nach diagnostischen Fragmenten und Isotopenmusteranalysen.

In den letzten Jahren wandelte sich der Trend nicht nur dahin, die HRMS Plattform zur Identifizierung und Erfassung von nicht relevanten Metaboliten zu erschließen, sondern auch die Suche nach unbekannten Komponenten zu etablieren. He et al. (2016) beschrieb mit seiner Gruppe den Ansatz eines *unknown screenings*, in dem die Probe nach Halogenierungsmustern als Indiz eines anthropogenen Eintrags untersucht wurde (*Clusteranalyse*). [157]

Anfang 2015 wurde eine neue Kopplungstechnik, die IMS-QToF-MS für das *Screening* etabliert. Gosciny et al. (2015) publizierten eine erste Arbeit, die die IMS als eine neue Trenndimension nutzt und die Driftzeit als eine reproduzierbare und Matrix-unabhängige stoffspezifische Größe in der Pestizidrückstandsanalytik vorschlägt. [133] Fu et al. (2016) beschrieben einen Software-gestützten Ansatz, um den CCS-Wert vorherzusagen, um eine experimentelle Bestimmung mit einem

Standard zu umgehen. [160] Reguiero et al. (2016) veröffentlichten eine Evaluationsstudie zum CCS als zusätzlichen Identifizierungspunkt beim *targeted Pestizidscreening* in Fischfutter. [136]

Häufig wurde eine Kombination aus den unterschiedlichen *Screening*-Ansätzen verwendet: die Proben wurden im *targeted*-Modus auf Pestizide untersucht, dann im Fall eines Befundes mit *suspect screening* auf Metabolite und anschließend erfolgte eine Untersuchung auf mögliche neue Metaboliten, die es weitestgehend zu identifizieren galt. [158]

2.7.1 MS-Identifizierung von Pestizidwirkstoffen und -metaboliten

Die Kriterien für die Identifizierung von Pestiziden im qualitativen und quantitativen *Screening* sind in der SANTE/11945/2015 dokumentiert. In Tabelle 3 sind die Identifizierungskriterien für eine Substanz in der Pestizidrückstandsanalytik sowohl für Unit Mass Resolution Massenspektrometer als auch für HRMS Methoden aus dem *Guidance Document* zusammengefaßt.

Tabelle 3: Identifikationskriterien für Substanzidentifizierung gemäß *Guidance Document* SANTE/11945/2015. [66]

MS detector / characteristics	Typical systems (examples)	Acquisition	Requirements for identification	
			minimum number of ions	other
Unit mass resolution	quadrupole, ion trap, TOF	full scan, limited m/z range, SIM	3 ions	S/N $\geq 3^e)$ Analyte peaks in the extracted ion chromatograms must fully overlap. Ion ratio within $\pm 30\%$ (relative) of average of calibration standards from same sequence
MS/MS	triple quadrupole, ion trap, Q-trap, QTOF, Q-Orbitrap	selected or multiple reaction monitoring (SRM, MRM), mass resolution for precursor ion isolation equal to or better than unit mass resolution	2 product ions	
Accurate mass measurement	High resolution MS: (Q-)TOF (Q-)Orbitrap FT-ICR-MS sector MS	full scan, limited m/z range, SIM, fragmentation with or without precursor ion selection, or combinations thereof	2 ions with mass accuracy ≤ 5 ppm ^{a,b, c)}	
		combined single stage MS and MS/MS with mass resolution for precursor ion isolation equal to or better than unit mass resolution	2 ions: 1 molecular ion, (de)protonated molecule or adduct ion with mass acc. ≤ 5 ppm ^{a,c)} Plus 1 MS/MS product ion ^{d)}	

^{a)} preferably including the molecular ion, (de)protonated molecule or adduct ion

^{b)} including at least one fragment ion

^{c)} < 1 mDa for $m/z < 200$

^{d)} no specific requirement for mass accuracy

^{e)} in case noise is absent, a signal should be present in at least 5 subsequent scans

Seit HRMS auch in hoher Massenauflösung ($> 20\text{ k}$) arbeiten, erreichen diese Instrumente eine ausreichend hohe Massengenauigkeit ($<3\text{ ppm}$) zur Berechnung der elementaren Zusammensetzung der Pseudomolekül-/precursor ions und ihrer Fragment-Ionen. [161]

Die HRMS-Software-Produkte der großen Gerätehersteller wie Bruker, Waters oder Agilent bieten verschiedene Instrumente zur Strukturaufklärung. Eine Spektralbibliothek dient dazu, die Suche und Ergebnisvisualisierung (Review) der Daten zu ermöglichen. Wenn eine Strukturformel zu einem Substanzeintrag in die Bibliothek geladen wird, kann ein Fragmentmuster (*in-silico*) generiert und mit dem vorliegenden empirisch ermittelten MS-Spektrum abgeglichen werden. Hierbei können auch Strukturvorschläge für empirisch erhaltene Fragmente generiert werden. Liegt nur eine exakte Masse vor, ermöglicht ein Summenformelgenerator anhand der vorhandenen Isotope, wobei die Aussagekraft mit der Anzahl an Isotopen steigt, eine Summenformel oder eine Kandidatenliste an möglichen Summenformeln zu erstellen. [162, 163]

Eine Isotopen-Cluster-Analyse für Halogenverbindungen oder andere Funktionsgruppen ist ebenfalls in die Software integriert. Wenn die Mutterverbindung ein charakteristisches (stabiles) Isotopen-Muster enthält, zum Beispiel bei der Anwesenheit von einem oder mehreren Chlor- oder Bromatomen, können die Metaboliten durch Untersuchung dieses speziellen Isotopenmusters (*Cluster*) identifiziert werden. [100, 157]

Des Weiteren kann je nach Software ein *Biotransformationsscan* erfolgen. Hierbei erfolgt eine Vorhersage bzw. eine Zuordnung der möglichen Phase-I oder -II-Reaktion anhand der Massendifferenz ausgehend von der Muttersubstanz. Dies erfolgt über einen Algorithmus, der die exakte Masse der Muttersubstanz mit allen Massen im Spektrum und gegen mögliche Biotransformationsreaktionen abgleicht. In Tabelle 4 sind typische Metabolismusreaktionen aufgeführt, die auf der Grundlage der vorgegebenen Struktur und Molmasse Vorhersagen für mögliche Metaboliten erstellen kann. [100, 163, 124]

Tabelle 4: Beispiele für allgemeine Phase-I und -II-Reaktionen und die entsprechenden Änderungen der Molmasse der Muttersubstanz. [100]

Masseänderung	Art der Biotransformation
- 14,0157	Demethylierung (-CH ₂), Phase I
- 2,0157	Zwei-elektronische Oxidation (-H ₂), Phase I
+ 13,9792	Addition von einem Sauerstoffatom und zwei-elektronische Oxidation (+O,-H ₂), Phase I
+ 15,9949	Addition von einem Sauerstoffatom (+O), Hydroxylierung, Epoxidbildung, Phase I
+ 18,0106	Hydratation (+H ₂ O), Phase I
+ 29,9741	Addition von zwei Sauerstoffatomen u. zwei -elektronische Oxidation (+2O-H ₂), Phase I
+ 31,9898	Addition von zwei Sauerstoffatomen (+2O), Phase I
+ 162,0522	Glycosylierung (+C ₆ H ₁₀ O ₅), Phase II
+ 79,9568	Sulfatierung (+SO ₃), Phase II
+ 120,0114	Addition von Cystein (+SC ₃ H ₇ NO ₂)

In einem Ansatz können auch zwei Proben miteinander verglichen werden. Bei der Referenzanalyse wird das Massen-Chromatogramm mit einem Chromatogramm der Kontrolle (Blank-Probe) verglichen. Chromatographische Peaks, die in der Probe gefunden werden, aber nicht in der Kontroll-Probe präsent sind, sind in der Regel der Mutterverbindung und deren Metaboliten oder dem Vehikel zuzuordnen. Dieser Prozess führt zu Informationen über das Molekulargewicht (abgeleitet von den ermittelten [M+H]⁺ oder [M-H]⁻ Ionen), die man in einigen Fällen nutzen kann, um einen Stoffwechselprozess nachzuweisen. [164]

Neben der kommerziellen Software ist eine weitere Möglichkeit die Datenbanksuche mit *ChemSpider* oder *MassBank* nach bekannten Massenspektren. Die *METLIN* *XCMS* online Datenbank ermöglicht eine schrittweise Identifizierung von Massenspektren bis zum identifizierten Metabolit (MS und MS/MS). [165] Die Verifizierung einer vermeintlich identifizierten Substanz erfolgt im besten Fall immer mit einem analytischen Referenzstandard. Für die MRM-Methoden müssen diese vorliegen, da sie für die *targeted*-Methodenerstellung notwendig sind. Aufgrund fehlender Substanzen für potenziell detektierte Metabolite werden in der Literatur

mehrere Ansätze zur Identifizierung in verschiedenen Stufen beschrieben. In Abbildung 9 sind die unterschiedlichen Identifizierungs-Level skizziert. [161]

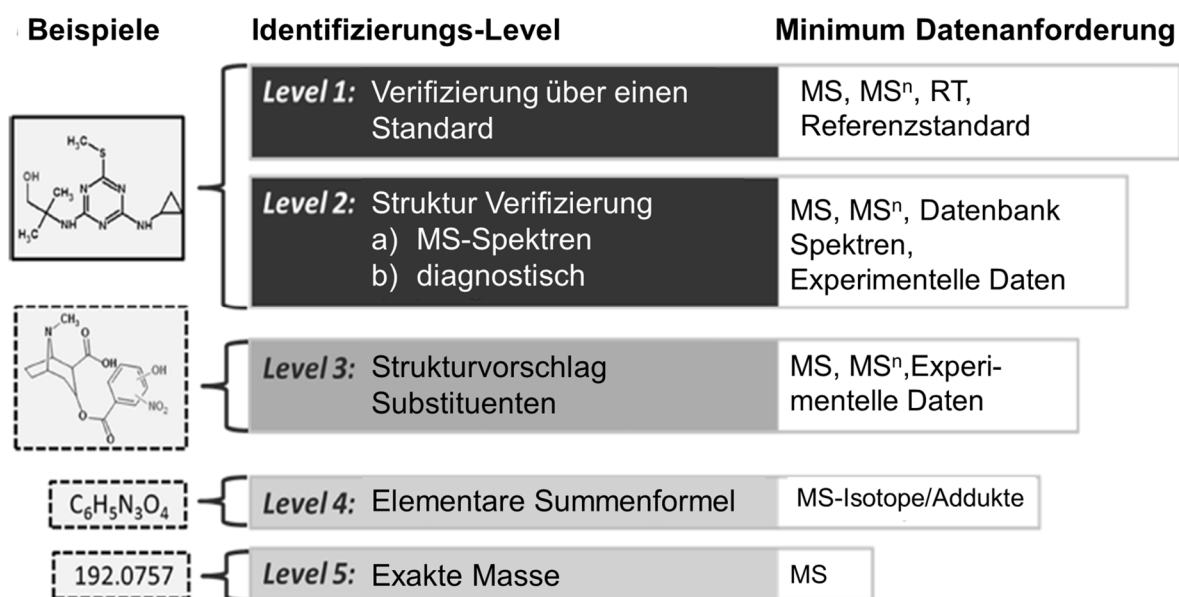


Abbildung 9: Identifizierungs-Level in der HRMS-Analytik. [166]

Level 1 und 2 erfordern eine Co-Analyse mit einer Referenzsubstanz in Aufstockungsexperimenten. Level 3 erfordert einen Datenabgleich mit Datenbanken, MS-Spektren und publizierten experimentellen Daten, um eine vermeintliche Substanz ohne eine vorliegende Referenzsubstanz gemäß Tabelle 3 mit den SANTE/11945/2015 Kriterien weitestgehend zu verifizieren. Bei Level 4 und 5 handelt es sich um unterschiedliche Stufen in der Dateninterpretation. Dabei liegt eine mögliche Kandidatenliste mit einer exakten Masse vor und ggf. Isotopenmuster mit Fragmentierungsmuster, die auf eine mögliche unbekannte Substanz hinweisen und ihre Strukturaufklärung ermöglichen. [166, 161]

3. Zielstellung

In der Pestizidanalytik ist es notwendig, Substanzen aus etwa 100 verschiedenen Substanzklassen möglichst in einem Analyselauf zu erfassen. Im Fokus des wissenschaftlichen Interesses steht ebenfalls die Erfassung von den Analyten für die keine Zulassung vorliegen oder die nicht im Analyseumfang etabliert wurden. Des Weiteren werden immer mehr Pestizidmetaboliten in die Routineanalytik aufgenommen, da eine breite Anzahl an Metaboliten bekanntermaßen eine schädliche Wirkung aufweisen und somit ebenfalls eine strenge Kontrolle erfordern.

Der Schritt von rechtlich nicht-relevanten zu relevanten Metaboliten ist ein stetiger Prozess der Neubewertung. Aufgrund dieser Neubewertungen der Wirkstoffe und deren Metabolite sowie der Neuzulassung von Pflanzenschutzmitteln und von Wirkstoffen können Metabolite rechtlich relevant und somit Teil der Rückstandsdefinition werden. Ein Metabolit kann aus toxikologischen Gründen oder seiner Anwesenheit in signifikanten Mengen in die Rückstandsdefinition einbezogen werden, da er (bislang) zufällig in einem *Monitoring* miterfasst wurde.

Die Zielanalysen (*targeted*-Methoden) werden typischerweise bei der Überprüfung der Rückstandshöchstmengen von Pestizidwirkstoffen sowie für rechtlich relevante Metabolite eingesetzt. Hier basiert die Analytik auf Multirückstandsmethoden mit einem definierten Zielprofil an Wirkstoffparametern.

In diesem Bereich bietet die LC-TWIMS-QToF-MS mit ihrer hohen Messempfindlichkeit und Massengenauigkeit ein großes Potential für qualitative Zwecke und ermöglicht die zuverlässige Identifizierung einer großen Anzahl an Analyten. Die QToF-Technologie ermöglicht die Datenaufnahme im *full-scan*-Erfassungsmodus, sodass eine retrospektive Analyse von Daten durchführbar ist. Diese erlaubt die gezielte Suche nach nicht erfassten Metaboliten in nur einem chromatographischen Lauf ohne die Notwendigkeit einer erneuten Analyse. Da Pestizidmetaboliten meist über eine im Vergleich zum korrespondierendem Ausgangswirkstoff vergleichbare oder höhere Polarität verfügen, werden sie gleichermaßen durch eine Kombination von LC mit QToF-MS erfasst, eine der am besten geeigneten Techniken für eine Nichtzielanalyse (*suspect* oder *unknown Screening*-Methoden). Eine Ausnahme bilden polare Pestizide. Diese sind aufgrund ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften in der Regel mit Multimethoden nicht erfassbar. Die polaren Pestizide und deren Metabolite werden derzeit in aufwendigen Einzelmethoden in Lebensmitteln analysiert. Hier fehlt oft ein

geeignetes Multikomponentenverfahren. Mittels LC-MS/MS sollen für die wichtigsten Pflanzenschutzmittelwirkstoffe und Metabolite ein geeignetes Aufarbeitungsverfahren und geeignete Messbedingungen für unterschiedliche Lebensmittel für eine sensitive Analyse entwickelt werden, die zeit- und kostengünstig sind. Dabei sollen die Analyten ohne Störung durch Matrixbestandteile quantitativ extrahiert werden, um die Analyten im Spurenbereich sicher erfassen zu können.

Im Rahmen der Arbeit soll sowohl die Zielanalyse als auch die Nichtzielanalyse (*non-targeted*) auf ihre Eignung für ein *Multiscreening* von Pestizidwirkstoffen und Metaboliten unter Verwendung der LC-TWIMS-QToF-MS Technik untersucht werden. Dabei soll in Modellstudien eine Methode entwickelt werden, die eine Identifizierung unbekannter Metaboliten ermöglicht. Des Weiteren soll eine *Screening* Multimethode von Pestizidmetaboliten mittels Nichtzielanalyse in verschiedenen Lebensmitteln entwickelt werden, um die IST-Situation an Metaboliten zu erfassen. Im weiteren Verlauf soll eine Charakterisierung von Metaboliten erfolgen, um somit den Nachweis einer illegalen Anwendung von Pestiziden möglich zu machen.

Zudem soll die Untersuchung und Optimierung einzelner Verfahrensschritte für polare Pestizide mittels LC-MS/MS durchgeführt werden, deren Resultate für die Erweiterung der Methode auf andere polare Wirkstoffe und zusätzliche Matrices anwendbar ist. Ziel ist es, hierbei eine Multimethode zu entwickeln, die die Erfassung unterschiedlicher Zielanalyten in unterschiedlichen Matrices gewährleistet. Hierbei ist das Ziel, dass alle Analyten sicher bei einem *reporting level* von 0,010 mg/kg zu quantifizieren sind. Insbesondere für den Metaboliten Phosphonsäure soll eine sensitive Analyse entwickelt werden, da die Bestimmungsgrenze nach dem jetzigen Stand der Technik bei 0,100 mg/kg liegt und folglich ist der Zielanalyt nicht entsprechend der Anforderungen der Diätverordnung für Kindernahrung bestimmbar. Die durch Matrixeffekte verursachten Verfälschungen des Analysenergebnisses sollen durch geeignete Analysen- und Kalibrationstechniken weitestgehend kompensiert werden, damit eine hohe Analysenqualität garantiert werden kann. Die entwickelte Methode wird schließlich an einer großen Bandbreite unterschiedlicher Nahrungspflanzen validiert.

4. Kumulativer Teil der Dissertation

Die Ergebnisse der Dissertation sind im Folgenden in Form von wissenschaftlichen Manuskripten dargestellt. Die wissenschaftlichen Arbeiten wurden in den Fachzeitschriften *Journal of Separation Science*, *Food Chemistry*, *Food Analytical Methods*, *Food Control* und *Journal of Agricultural and Food Chemistry* bereits publiziert.

Ergänzende Informationen zu den einzelnen Abschnitten befinden sich im Anhang A. Die Freigaben der Verlage zur Verwendung der Artikel in dieser Arbeit liegen vor.

Die Publikationen beschreiben die Entwicklung einer Multipestizidmethode sowie die analytischen Fragestellungen bezüglich der Ionenmobilität gekoppelt mit QToF-MS zur Eignung von Pestizid *Screening*-Methoden, der Evaluierung der IMS-Effekte sowie der Validierung gemäß des europäischen *Guidance Document* SANTE/11945/2015 in pflanzlichen Lebensmitteln. Weiterhin wird eine Methode zur Bestimmung von Pestizidmetaboliten anhand einer Modellstudie am Beispiel der Pestizide Thiacloprid, Azoxystrobin und Difenconazole in *Brassica* Pflanzen beschrieben, wobei der Fokus auf der Strukturaufklärung lag. Basierend auf der entwickelten Multipestizidmethode und der Evaluierungsstudie für Strukturaufklärung der Metabolite wurde eine Multipestizid- und Metabolitenmethode zur Erfassung unbekannter Metaboliten in behandeltem Obst und Gemüse entwickelt.

Für polare anionische und kationische Pestizide und Metabolite wurden separate, analytische Methoden gemäß SANTE/11945/2015 entwickelt und validiert. Für den Metaboliten Phosphonsäure des Wirkstoffs Fosetyl wurde vorrangig eine Bestimmungsmethode mittels IC-MS/MS mit einer hinreichenden Sensitivität entwickelt, mit der Bio- und Säuglingsnahrung gemäß der gesetzlichen Vorgaben untersucht werden konnte. Anschließend erfolgte die Entwicklung einer Anionen-Pestizidmultimethode für unterschiedliche pflanzliche Matrices.

4.1 *Pestizidscreening* mittels IMS-Q-ToF-MS in pflanzlichen Lebensmitteln (Publikation I)

Development and feasibility study of an ion mobility spectrometry quadrupole time-of-flight mass spectrometry pesticide screening methodology

Anna Bauer^a, Juergen Kuballa^a, Sascha Rohn^b, Eckard Jantzen^a, Jens Luetjohann^{a*}

^aResearch and Development Department, GALAB Laboratories GmbH, Am Schleusengraben 7, 21029 Hamburg, Germany

^bInstitute of Food Chemistry, Hamburg School of Food Science, University of Hamburg, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer *Pestizidscreening* Methode mittels LC-TWIMS-QToF-MS. Zunächst erfolgte der Aufbau einer Datenbank für den Umfang von 280 Pestizidwirkstoffen mit den Substanz-Einträgen zu exakter Masse, Retentionszeit, Fragmenten und CCS-Werten. Anschließend erfolgte eine Evaluierung und Validierungsstudie mit 20 Matrices mit der QuEChERS-Extraktion. Die unterschiedlichen Proben sollten einen repräsentativen Umfang für die unterschiedlichen, relevanten Warengruppen bei pflanzlichen Lebensmitteln abdecken. Entscheidend war hier der Aufbau einer *targeted screening*-Methode für die Analyse von Pestizidrückständen. Im Rahmen der Studie sollen die Vor- und Nachteile der IMS-Kopplung und die Eignung in Bezug auf das *Pestizidscreening* untersucht werden.

Für die Validierungsstudie wurden drei unterschiedliche Konzentrationsstufen ausgewählt, die eine große Relevanz in der Analytik haben: anhand der niedrigsten Konzentration von 0,001 mg/kg sollte die Eignung für die Analytik von Säuglingsnahrung evaluiert werden. Die zweite Stufe mit 0,010 mg/kg stellt das allgemeine Reporting Level dar, anhand dessen festgelegt wird, ob ein Lebensmittel als behandelt bzw. belastet gilt. Die dritte Konzentration von 0,100 mg/kg wurde nach Eignung als gesetzlich festgelegte Höchstmenge ausgewählt. Weiterhin sollten Sättigungseffekte durch eine höhere Ionenbelastung untersucht werden.

Der eigene Anteil an dieser Veröffentlichung wird mit 45% angegeben.

Evaluation and validation of an ion mobility quadrupole time-of-flight mass spectrometry pesticide screening approach

Anna Bauer¹, Juergen Kuballa¹, Sascha Rohn², Eckard Jantzen¹, Jens Luetjohann^{1*}

¹Research and Development Department, GALAB Laboratories GmbH, Am Schleusengraben 7, 21029 Hamburg, Germany

²Institute of Food Chemistry, Hamburg School of Food Science, University of Hamburg, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany

Corresponding author:

Dr. Jens Luetjohann, GALAB Laboratories GmbH, Am Schleusengraben 7, 21029 Hamburg

E-mail address: jens.luetjohann@galab.de

Tel.: +4940368077432; Fax: +4940368077401.

Keywords: collision cross section; ion mobility spectrometry; liquid chromatography; mass spectrometry; pesticides

Abstract

An ion mobility quadrupole time-of-flight mass spectrometry-based pesticide suspect screening methodology was developed and validated covering 20 plant-derived food matrices deriving from six commodity groups of different complexity according to the actual European Commission document SANTE/11945/2015 applying a QuEChERS sample preparation protocol. The method combines ultra-performance liquid chromatography travelling-wave ion mobility and quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Besides the determination of the physicochemical property *collision cross section* (CCS) and the establishment of a corresponding scientific suspect screening database comprising 280 pesticides, for several pesticides different protomers, sodium adducts, as well as dimers were identified in ion mobility spectrometry traces. Additionally, CCS values were included in the validation requirements regarding chromatography and mass spectrometry for the detection of

pesticides. A single CCS value window was analyzed within a tolerable error of $\pm 2\%$. For this cross-matrix validation the screening detection limits were determined at concentration levels of 0.100 mg/kg (84% of the original pesticide parameter scope), at 0.010 mg/kg (56%), and at 0.001 mg/kg (21%). By application of IMS the compound identification was improved due to independence of commodity of concern and concentration levels of analyte molecules, as the number of false assignments is reduced by application of a CCS range.

1. Introduction

High-resolution mass spectrometry (HRMS) pesticide suspect screening methods offer an alternative for targeted pesticide analysis typically accomplished by means of unit mass resolution MS-MS instruments in *multi reaction monitoring mode* (MRM) [1]. The limitations of targeted methods result from a predefined scope depending on the occurrence of pesticides in specific commodities typically relying as a basis for the pesticide selection of the targeted scope. Predefinition is usually accomplished according to databases (providing maximum residue level (MRL) data) and legislation requirements of the analyte molecules. Further limitations are caused by the maximal manageable parameter scope due to dwell time limitations of MRM methods [2, 3]. HRMS screening methods for small molecules such as pesticides address a mass range of approximately 50-1000 m/z in a non-targeted full scan acquisition mode. The evaluation of screening results can be carried out in two different ways: Either with regard to targeted scientific libraries or retrospectively by the means of mass spectral compound databases. [4, 5]

The use of HRMS platforms is suitable for many purposes: On the one hand, it allows the reliable confirmation of tentative assignments of pesticides and other legally regulated compounds obtained by unit mass-resolution mass spectrometers. On the other hand, it is possible to utilize such platforms for the application of target or suspect screening approaches in the routine work, and unknown screening of food and feed samples. Subsequently, the extension of the routine pesticide scope towards information about rare and exotic pesticides primarily detected by these screening trials is possible, as well.

Especially, hybrid analyzers such as quadrupole time-of-flight mass spectrometry (QToF-MS) allow a simultaneous recording of precursor and fragment ions in all-ion fragmentation methods e.g., by mass spectrometry collision energy elevated

experiment (MS^E) technology (Waters Corporation) using in parallel low collision energy conditions (e.g. 6 eV) for precursor ion acquisition and higher collision energy conditions (a ramp of elevated collision energy of e.g. 10 - 45 eV) for fragment ion acquisition [6]. Nevertheless, these all-ion-fragmentation approaches result in highly convoluted MS^E spectra, in particular caused by co-eluting matrix substances [7]. A false positive assignment entails further investigation by a confirmatory method like standard addition of a biological replicate sample. A specific spectral cleanup by ion mobility spectrometry (IMS) separation of molecules of interest from co-eluent coupled with HRMS comprises a recent innovation in the development of screening methods to avoid false positive assignments. High definition MS^E spectra ($HDMS^E$) provide a clear alignment of fragments and precursor ions at the same ion mobility spectrometry conditions.

IMS is based on a separation of charged molecules in the gas phase. Mobility of ions correlates with their size, shape, and charge [8]. Dependent on the differences in their molecular structure and the resolving power of IMS, a separation of isobaric ions and isomers is possible [9, 8, 10]. A comprehensive review about the utility of IMS in combination with LC-MS has been published recently [11]. For an IMS technology, developed recently, ions move on a travelling wave (TW) through a stacked-ring ion guide. TWIMS is based on a travelling voltage wave applied to the ring electrodes and a radial ion confinement achieved on opposite phases of a radio frequency voltage provides a high transmission efficiency [12]. The term collision cross section (CCS), a physicochemical parameter which is directly related to the charge of the molecule, shape, and size can be derived. It is proportional to the drift time of ions passing the ion mobility cell [7, 8]. CCS values offer an additional verification point besides the exact masses of precursor and, fragment ions, and retention time resulting in a higher selectivity in the process of compound identification. Goscinnny et al. demonstrated that drift time values are not influenced by co-extracted matrix compounds from any tested fruit and vegetable commodities within a tolerance of 2% for delta CCS [13]. Furthermore, Regueiro et al. suggested CCS as a possible identification point for pesticide screening in fish feed for avoiding false positive detects [14].

The actual guidance document for an analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed, SANTE/11945/2015 contains the requirements for identification criteria regarding mass spectrometry and

chromatography. [15] The retention time shift should be within a deviation of ± 0.1 min and is a requirement for chromatographic conditions. [15] The identification criteria when using HRMS comprise the detection of at least 2 diagnostic ions including at least one fragment ion. The mass error is set below ± 5 ppm at a mass resolution ≥ 20 k (FWHM) for HRMS instruments [15]. Qualitative screening methods require validation over the whole analytical workflow including extraction, data acquisition, and evaluation of the screening detection limits (SDLs) for each compound of interest. SDL is the lowest concentration for which it has been demonstrated that a certain analyte can be detected in at least 95% of 20 samples as a necessity for method validation [15]. Although there are no requirements specified in the SANTE document regarding the number of false assignments, it is important to avoid false assignments to reduce the time of data analysis and review in a posterior confirmatory analysis approach. Besides the minimum requirements of the guidance document for chromatography and mass spectrometry for the identification of a pesticide, the challenge is an optimal separation of matrix interferences to achieve an acceptable confidence in the screening results.

In the presented work, it was aimed to evaluate the capability of CCS as potential dimension to increase method selectivity by functioning as an additional identification criterion when using ultra performance liquid chromatography TWIMS-QToF-MS. A database covering a scope of 280 pesticide compounds including CCS values for the corresponding major adducts of the analyte compounds was created. The robustness of CCS values was evaluated as an additional identification criterion. Finally, a validation according to the requirements of SANTE/11945/2015 was performed at hand of 20 selected plant-derived matrices deriving from six different commodity groups at three different concentrations levels (0.100, 0.010, and 0.001 mg/kg).

2. Material and methods

2.1 Chemicals

Certified standards of pesticides were purchased from Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany) and Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH (Seelze, Germany). The stock solutions were prepared with a concentration of 1 mg/mL in acetonitrile and stored at -20 °C. Methanol, acetonitrile, and water were purchased from Lab Scan Ltd. (Dublin, Ireland) and Waters (Milford, MA). Ammonium acetate solution and leucine enkephalin were purchased from Waters (Milford, MA). For a

sample preparation, according to the QuEChERS protocol, magnesium sulfate, sodium chloride, disodium hydrogen citrate sesquihydrate, and trisodium citrate dihydrate were purchased from Sigma-Aldrich GmbH (Munich, Germany). Clean-up materials: primary secondary amine (PSA) and graphitized carbon black (GCB) were purchased from Sigma-Aldrich GmbH (Munich, Germany). Sample tubes were obtained from Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Germany).

A mechanical shaker AGIA 2000 was supplied by Collomix (Gaimersheim, Germany), a Multifuge X3 benchtop centrifuge from Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Germany) and regenerated cellulose CHROMAFIL® Xtra RC-20/25 disposable syringe filters (pore size: 0.20 µm, filter- Ø 25 mm) were obtained from Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren, Germany).

2.2 Sample preparation and validation study

For the validation study, twenty different plant-derived commodities from commodity groups 1 – 6 in Annex A of the actual guidance document SANTE/11945/2015 representing a typical variety of matrix complexity were included (for details Table S-1). Prior to the validation, the homogenized samples were screened for potential positive findings of the analyte compounds of interest of the spiking mixture of 280 pesticide parameters and spiked subsequently at 0.001, 0.010, and 0.100 mg/kg. Pure and spiked samples were extracted according to a QuEChERS-based approach (CEN method 15662) [16]. Where necessary, the water content of the sample was adjusted to 10 mL (details are given in Table S-1) and 10 mL of acetonitrile was added and the test preparation shaken mechanically for 1 min. A salt-mixture of 4 g MgSO₄, 1 g NaCl, 0.5 g of disodium hydrogen citrate sesquihydrate and 1 g of trisodium citrate dihydrate was added and the test preparation shaken for another minute. After a centrifugation step (at 3846 x g for 5 min), the supernatant was transferred to a clean-up tube with 150 mg MgSO₄, 25 mg PSA, and additionally 0, 2.5 or 7.5 mg GCB per mL of extract dependent to the depth of color of the extract. Following 1 min of shaking and another 5 min of centrifugation, the supernatant was filtered through a 0.2 µm syringe filter into an autosampler vial.

2.3 Instrumental equipment

The samples were subjected to an UPLC system (ACQUITY UPLC I-CLASS, Waters Milford, MA) coupled with a hybrid traveling wave ion mobility spectrometry

quadrupole time-of-flight mass spectrometer (VION IMS-QToF-MS, Waters, Milford, MA) equipped with an electrospray interface. The sample separation was performed on an ACQUITY UPLC-BEH C18 analytical column (2.1 mm x 100 mm, i.d. 1.7 μ m). The mobile phases consisted of 10 mM ammonium acetate pH 5 in water (solvent A) and 10 mM ammonium acetate pH 5 in methanol (solvent B). The chromatographic run had a total length of 17 minutes at a flow rate of 0.45 mL/min. Following the gradient mode: (i) 0.00 min (A:B, 98:2, v/v) (ii) 0.25 min (A:B, 98:2, v/v), (iii) 12.25 min (A:B, 1:99, v/v), (iv) 13.00 min (A:B, 1:99, v/v), (v) 13.01 (A:B, 98:2, v/v), (vi) 17.00 (A:B, 98:2, v/v). The injection volume was set at 3 μ L and the column temperature was held at 45 °C. The electrospray ionization source was operated in positive ionization mode and analyzer mode sensitivity, dependent on the highest sensitivity for the compounds with a capillary voltage set at 1.00 kV and sample cone voltage at 40 V. Nitrogen was used as nebulizer (flow rate at 50 l/h) and desolvation gas (flow rate at 1000 l/h). The desolvation temperature was set at 550 °C and source temperature at 120 °C. These method conditions were originally developed by Waters Corporation in the Pesticide Screening Application Solution workflow as a starting point to establish the scientific compound library including the CCS data in this study [6]. Mass spectral data were acquired in a mass range of mass/charge (m/z) 50-1000 using full scan and the high definition mass spectrometer elevated experiment (HDMS^E) mode with an acquisition speed of 5 scans/s. The MS^E method was configured to alternate between two collision energy conditions in order to obtain both the ions of molecule adducts (H⁺, Na⁺, K⁺, NH₄⁺) and fragments ions. The low energy (LE) spectrum was recorded at low collision energy (6 eV) to receive a spectrum containing the pseudo molecular-ions or adducts. The high energy (HE) spectrum was recorded with a collision energy ramp ranging from 10 to 45 eV to generate a spectrum containing averaged fragmentation patterns for each compound. The UNIFI 1.8.1 software (Waters Corporation) applied an automatic time-alignment of the LE and HE trace data to establish a correlation between the data obtained using low and high energy conditions [17]. Travelling wave ion mobility spectroscopy (nitrogen buffer gas 25 mL/min; wave velocity 300 m/s and pulse height 15 V) provides an additional, orthogonal mode of separation, separating ions by CCS on the basis of size, shape, and charge of the molecule and individual drift time for an assignment for fragments to precursor selection and thereby causes a clean-up of the mass spectrum. The resolving power full width at half maximum (FWHM) was

41,203 at m/z 556.2768. For a real time mass recalibration a lock mass (leucine enkephalin, 50 pg/ μ L in acetonitrile:water 1/1 (V/V) + 0.1% formic acid) was injected via a dual electrospray ion source. The reference spray at a flow rate of 10 μ L/min was introduced in predefined intervals of 10 s to the acquisition duty cycle with a scan time of 0.2 s. The lock mass was set to 556.2766 m/z in ESI + mode. Calibration of CCS values and QToF detector was carried out with a calibration mix (containing polyalanine for calibration of CCS values) obtained from Waters Corporation (Milford, MA, USA) and prepared in acetonitrile/water/formic acid (50:50:0.1, v/v/v). [18] The IMS resolution was determined by $CCS/\Delta CCS = 20.7 \pm 1.1$ for the separation of the tripeptide VYV ($CCS = 191.7 \text{ \AA}^2$, $m/z = 379.2107$) and the sulfonamide sulphadimethoxine ($CCS = 168.4 \text{ \AA}^2$, $m/z = 310.0736$) in ESI positive mode according to the manufacturer's protocol.

2.4 Data processing and analysis

Data analysis was performed with UNFI 1.8.1 Software (Waters, Milford, MA). The identification criteria were in accordance to SANTE 11945/2015 (implemented by 01.01.2016). Two individual filter conditions were defined for application in the final screening method. The SANTE filter was as follows: precision of the mass error ± 5 ppm for the molecular and fragment ions, retention time shift ± 0.1 min and two diagnostic ions (precursor and fragment ion). The second was the SANTE/CCS filter, including besides the mentioned requirements an additional CCS delta $\pm 2\%$ according to the literature [13, 14].

3. Results and discussion

An empirical scientific compound database including CCS values for 280 pesticides was established. For that purpose, for each compound entry the exact monoisotopic mass, the molecular structure, the empirical retention time, fragments and adducts with corresponding CCS values for 170 analytes as $[M + H]^+$, 101 analytes as $[M + Na]^+$ and 9 analytes $[M + K]^+$ were introduced into the database. The drift times observed for the pesticide parameters of interest varied in the range of 3.12 to 9.70 ms corresponding to CCS values between 131.5 to 309.6 $\text{\AA}^2$. Repetitive measurements of CCS values were accomplished ($n = 5$) within three weeks and after calibration to monitor the stability during the validation study. The results obtained in this comparison trial revealed, that the variation of CCS delta was mainly

in the range of $\pm 1\%$. The CCS data of all of the compounds met the requirements for $\Delta \text{CCS} (\%) \leq 2$. In **Figure S-1**, the performance of the stability of CCS values displayed an independency of retention time and molecular size. The adduct profiles obtained were characteristic for each compound and equal in different matrices, solvents and throughout inter-day analysis.

3.1 Travelling-wave ion mobility spectrometry-derived collision cross section values: benefits and pitfalls for pesticides identification

Principal difficulties in the HRMS technique, often performed in full scan acquisition mode, consist of a loss in sensitivity and selectivity, especially for complex commodities due to coeluting matrix interferences, as compared to triple quadrupole mass spectrometry. [19, 20] Co-elution and false-positive detects are typical phenomena linked to matrix effects of targeted analytes [21, 7]. Therefore, the combination of an ion mobility spectrometry cell and LC-HRMS may provide an additional dimension of separation and confidence in screening platforms.

The extent of interferences depends on the impact of the particular commodity and is related to features like amount and the complexity of coextracted plant ingredients [22]. In **Figure 1A**, a full scan HDMS^E chromatogram of a tomato extract is depicted (a chromatogram of a solvent standard is shown in **Figure S-2**). It is obvious that there is a high load of matrix interferences deriving from the tomato extract starting at a retention time of 6.5 minutes. More than 80% of the pesticides of the study eluted in a retention time window of 7.0-12.3 minutes. TWIMS clearly provides a separation of co-eluting matrix compounds displayed for the example of spinetoram (minor component; CAS No. 187166-40-1) at the retention time of 11.74 min (**Figure 1B** and **1C**). As the TWIMS separation occurs prior to the fragmentation in the collision cell, one major advantage of the IMS technique is the separation of interferences and a clear assignment of fragments to an analyte molecule and a reduction of non-related fragments giving the risk of false-positive assignments.

Additionally, the CCS values provide a reliable verification point of a stable value as mentioned above. Goscinnny et al. and Regueiro et al. demonstrated that the CCS values typically vary in a range below $\pm 2\%$, a fact that has been verified in the present study as shown in **Figure S-1** [14, 13]. In the present measurements, the variation from the mean was mainly below $\pm 1\%$ and only a few ΔCCS values were close to $\pm 2\%$. In routine screening of pesticides, CCS values can be used as

an additional point to identify analyte molecules and to exclude false-positives pretended by co-eluting matrix analogues.

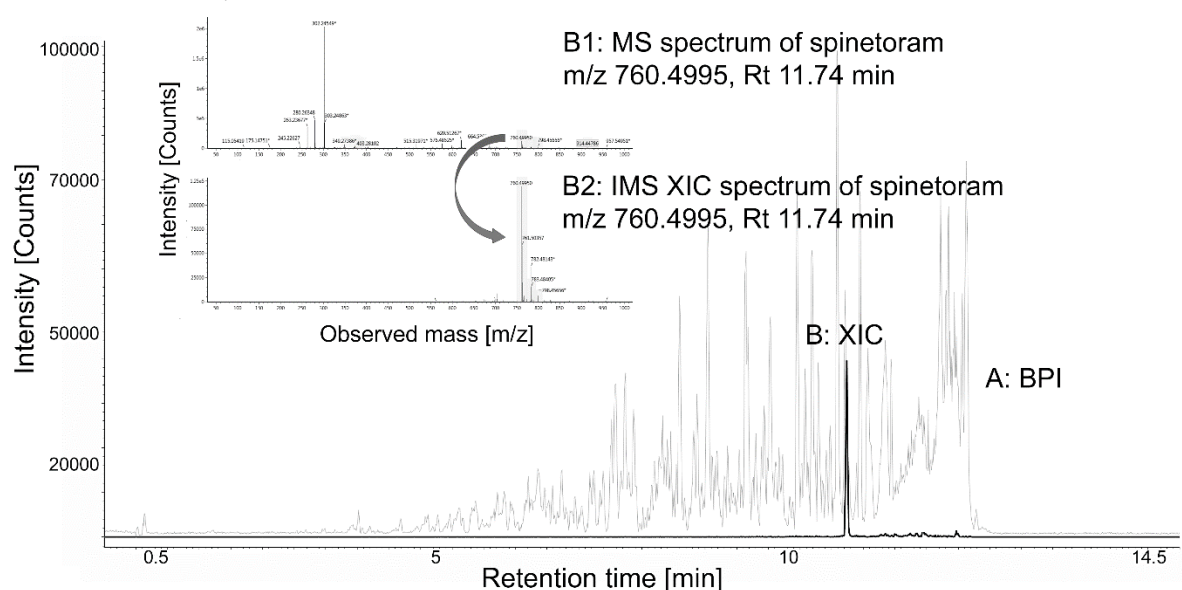


Figure 1. Principle of TWIMS cleanup of full scan mass spectra from base peak intensity (BPI, A) to extracted ion chromatography (XIC, B) to ion mobility mass spectra (IMS-XIC, C) combined to a HDMS^E of spinetoram ($[H]^+$ adduct with 759.4922 m/z at Rt 11.74 min).

Furthermore, Goscinnny et al. described a linear correlation between drift times and corresponding m/z values, while Regueiro et al. detected a linear dependence of CCS values to m/z particularly from 125 to 250 Å² for a mass range of 150 to 400 m/z [14, 13]. This linear correlation also described by Goscinnny et al. may further be used for structure elucidation [10].

Moreover, IMS allows a closer look in the ionization source to monitor events of the ionization process in the mobility trace (ion mobilogram). For a few compounds such as brodifacoum, a peak splitting was observed (**Figure 2A**). In **Figure 2A**, $[M + H]^+$ of brodifacoum displayed a signal with two apexes. Lalli et al and McCullagh described the detection of protomers, the formation of protonated adducts with different protonation positions of the molecule with disparate three-dimensional structures of the molecules finally leading to different drift times of protomers separated by IMS [23, 24].

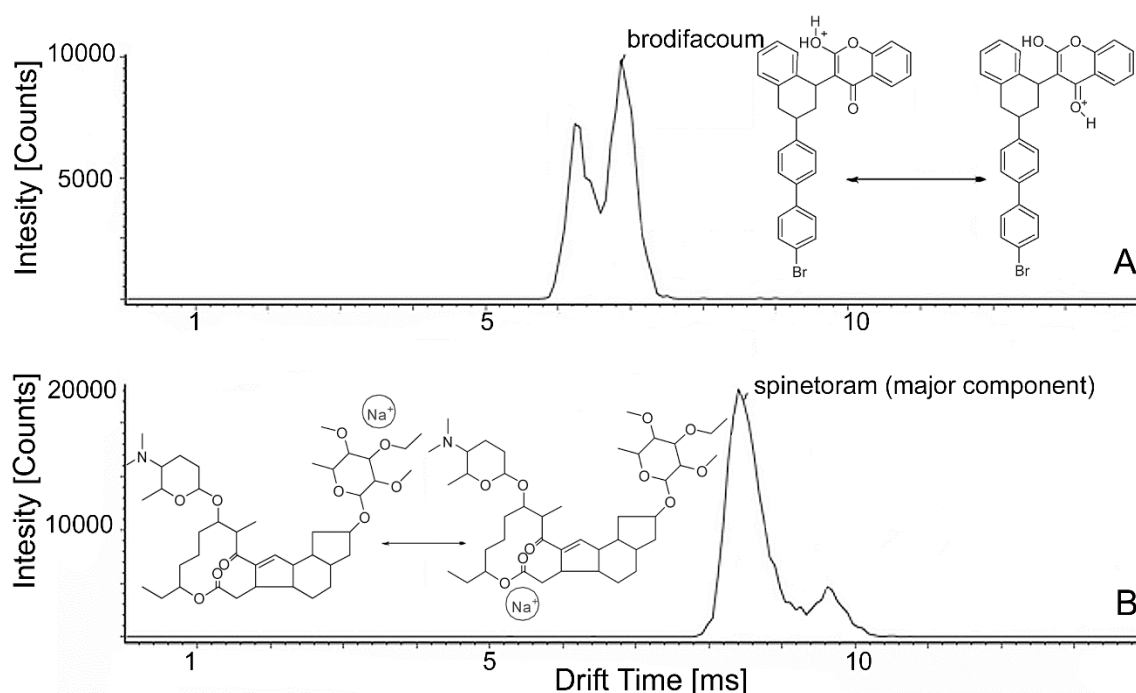


Figure 2. Ion mobility trace (A) of brodifacoum protomers (CCS 207.17 and 224.39 Å²). and spinetoram (B) as $[M + Na]^+$ with two sodium adducts (CCS 309.458 and 275.670 Å²).

In **Figure 2B**, in the ion mobility trace of spinetoram as $[M + Na]^+$ adduct a double peak was detected. Kanie et al. described a separation of sodium adducts in IMS for diastereomeric dipeptides and Dwivedi et al. for chiral peptides [25]. So far, no literature has been identified describing the formation of different sodium adducts of a pesticide compound. Subsequently, the IMS separation of these adducts is possible due to the different three-dimensional structures giving different CCS values caused by the attachment of sodium ions at different positions in a same way as observed for protomers. Furthermore, for both individual sodium adducts different fragment spectra were observed in this study (**Figure S-3**). McCullagh et al. observed that for individual protomers different fragment spectra are formed resulting from different proton positions of the protonated compound. Additionally, they proposed this as a possible reason for a non-detect of compounds in the course of a targeted analysis workflow using unit mass resolution tandem mass spectrometers because of a missing quantifier/qualifier or the alteration of the corresponding ion ratios. This may finally lead to non-compliance with the identification criteria [24].

Both, peak splitting phenomena and the formation of protomers or different sodium adducts can lead to non-detects during the screening process because of wrong data alignment. The formation of different protomers of one molecule can be influenced by cone voltage settings as observed by Kaufmann et al [26]. In the present study, the

phenomenon of a wrong data alignment was overcome by forcing the margins of IMS delta to 5% tolerance within a re-processing step for the data set to avoid missing detects. Another possibility for solving this problem may consist in the necessity of the selection of another sensitive adduct for compound identification.

Another notable phenomenon is outlined in **Figure 3**, where two peaks can be observed in the ion mobility traces for the pesticide compound metalaxyl. TWIMS accomplished a resolution of a monomer and dimer peak in the IMS cell [12, 27]. Both peaks provided different low energy mass spectra. A second peak with 581.2837 m/z was additionally detected. This measured mass complies with the dimer of metalaxyl $[2M + Na]^+$. In a validation and pesticide screening process, the separation of the $[M + Na]^+$ monomer and the $[2M + Na]^+$ dimer may cause non-detects in the filtering steps, in case a filter error is set on CCS delta of $\pm 2\%$. The metalaxyl dimer displayed a higher drift time of 7.4 ms in comparison to the monomer with 4.7 ms, as shown in **Figure 3**. This effect is independent of the commodity type and only specific for the analyte molecules of interest and may be the reason for a false assignment in the screening approach caused by a sensitivity loss due to peak splitting.

Similarly, for a few compounds such as fenamiphos and its metabolites, bifentazate and norflurazon at the spiking level of 0.100 mg/kg, the separation of the monomer and the dimer based on TWIMS resulted in lower detector sensitivities. Obviously, analyte molecules are affected, preferably forming sodium adducts particularly for organophosphate pesticides. Generation and separation of dimers were observed for protonated adducts for the pesticides imazalil and imidacloprid. However, the tendency of double peak formation in the mobility trace was predominantly observed at higher concentrations of analyte molecules (0.100 mg/kg) decreasing at lower spiking concentration (0.010 and 0.001 mg/kg). Dimer formation in ESI process may also be a reason for detector saturation phenomena observed at higher compound concentrations. For routine suspect screening purposes, the alignment of CCS values in the compound database should be linked to both, the drift time of the monomeric and dimeric state and each protomer and sodium adduct of the corresponding analyte compound.

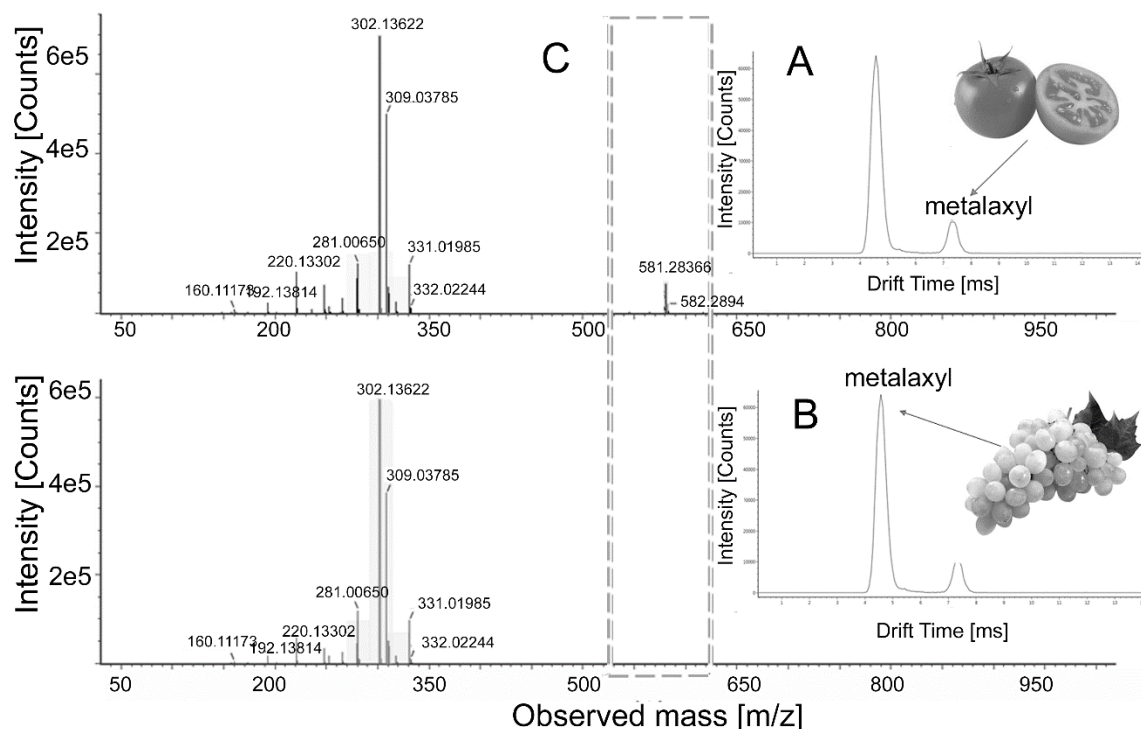


Figure 3. Ion mobility traces of metalaxyl giving two peaks with two different CCS values (CCS 164.05 and 241.72 Å²) with the monomer $[M+Na]^+$ and $[2M + Na]^+$ dimer of the analyte.

In the preceding data processing step with assignment of CCS values a tolerance level of 5% may be applied to avoid false alignments leading to false compounds assignments.

For the separation of isobaric compounds which are almost co-eluting in liquid chromatography, the difference of CCS values should exceed 2% to effectively resolve the compounds by IMS. The range for the variation of CCS values was set to $\pm 2\%$. In **Figure 4** an XIC of the four triazine isomers propazine, sebuthylazine, terbuthylazine, and triazine is shown. Sebuthylazine and propazine gave a coelution as a result of a poor chromatographic separation and non-sufficient difference in their CCS values. Both, propazine and sebuthylazine were separated with a retention time delta of 0.10 min at peak apex, but displayed an identical drift time. These compounds are isomers and consequently isobaric with a similar chromatographic behavior. The differences between their molecular structure is solely based on a methyl group at different positions giving similar CCS values in IMS. Requeiro et al. demonstrated that especially in mass range of 200-400 m/z the CCS values are similar [14]. In that special case, a peak containing more than one isomeric compound must be additionally resolved chromatographically. Especially for small molecules, the differences in the 3D structure for differently methylated isomers may

not be significant enough for an appropriate resolution when using TWIMS. Alternatively, another adduct with sodium or potassium has to be selected potentially giving a satisfactory separation in IMS. However, for the triazine compounds of the present study, solely protonated adducts were observed.

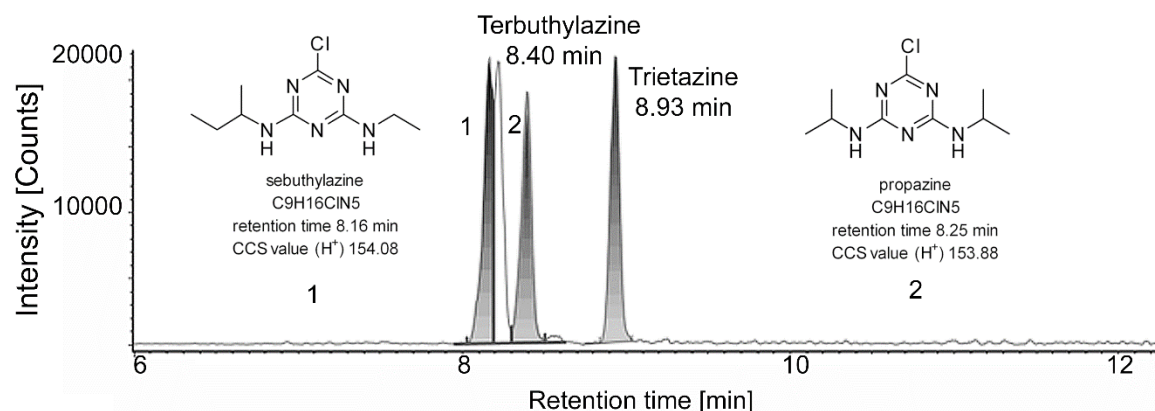


Figure 4. XIC of triazine analytes: Sebuthylazine ($R_t = 8.14$ min and CCS $154.08 \text{ \AA}^2$) and propazine ($R_t = 8.24$ min and CCS $155.54 \text{ \AA}^2$), two of four triazine isomers (229.1094 m/z) are not resolved by the workflow of UPLC-QToF-MS including IMS due to the co-elution in liquid chromatography and similar drift times of 4.09 and 4.14 m/s .

Despite the additional separation dimension by IMS matrix effects emerging in electrospray ionization still exert the most substantial influence on the proper detection of analyte molecules [28]. Matrix effects are based on diverse mechanism like the design of the source interface, charge-transfer competition processes of analyte molecules and co-eluting matrix substances, leading to ion suppression potentially resulting in a severe compromise of compound detection and method reproducibility [29–33]. To avoid non-detects and to simultaneously reduce matrix effects a proper sample preparation is still indispensable.

3.2 Validation of travelling-wave ion mobility-assisted pesticide screening

The method validation was performed applying two different filter types described above (SANTE/CCS and SANTE filter) to compare the influence on meeting the criteria for delta CCS values on the detection rates including shifts for retention time, exact mass, ion-ratios, and fragments. The second filter was selected for detection rates and included the general requirements of the actual guidance document SANTE 11945/2015 excluding CCS values.

For the validation of the scope of 280 pesticide parameters at the three different spiking levels 0.001, 0.010, and 0.100 mg/kg 20 typical plant-derived commodities like fruit and vegetables, cereals, and nuts representative for the commodity groups 1 – 6 of Annex A of the guidance document were selected. Level 0.001 mg/kg was predominantly selected to address the detection requirements for baby food and the trend to lower MRLs. This has happened for e.g., carbofuran in pome fruits including 3 metabolites at MRL of 0.001 mg/kg. Level 0.010 mg/kg comprises the typical reporting level (RL) for pesticide parameters.

In **Figure 5** the individual detection rates obtained for all 20 matrices at the three selected spiking levels are displayed. The detection rates at different spiking levels applying both filters the CCS-derived screening detection limits and the filter according to SANTE requirements for identification are compared.

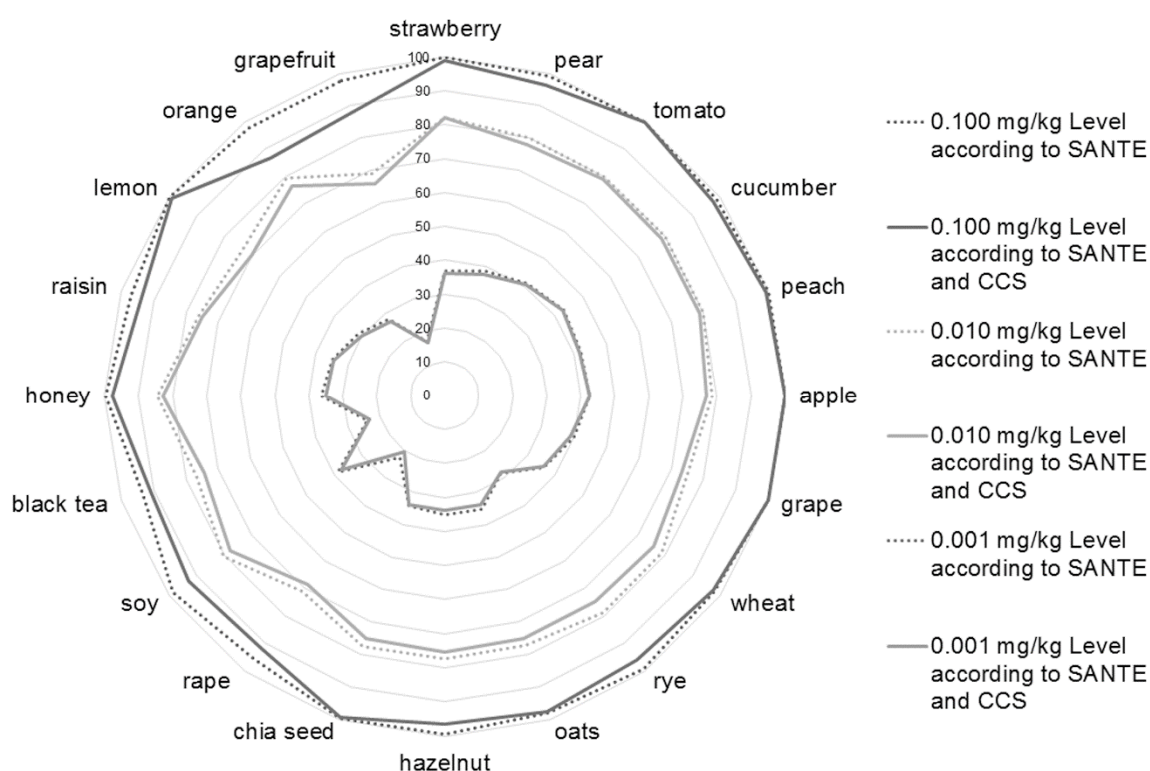


Figure 5. Detection rates over all matrices of the present study applying the two filters selected (SANTE and SANTE/CCS) at concentration levels 0.100, 0.010, and 0.001 mg/kg.

The detection rates are presented in Table S-2, comparing detection rates obtained with three individual settings for identification criteria: 1. with regard to the SANTE identification criteria, 2. SANTE criteria with additional CCS values, and 3. by application of SANTE criteria including CCS values but without the identification of a

fragment ion. By application of the latter identification criteria, the detection rates increased for all commodities and at all spiking levels. At levels 0.100 mg/kg and 0.010 mg/kg, quite similar detection rates were obtained independent of the filter settings applied, with exception of the commodity soy. Here, an increase of about 12% was detected in the detection rates at 0.010 mg/kg, when applying the identification criteria of a missing fragment with additional delta CCS margins. The highest influence of the type of screening criteria on the detection rates was observed at the lowest spiking level 0.001 mg/kg. At this spiking concentration, the presence or absence of the detection of a fragment ion displayed the highest limitation of a positive assignment. At this lowest concentration level, mainly similar detection rates were obtained applying the SANTE identification criteria with or without delta CCS margins. But by a change to the identification criteria missing one fragment ion in combination with meeting the delta CCS criterion a strong rise in the detection rates was observed except of citrus fruit, rye, and rape seed. In oat, wheat, and pear, the detection rates increased by around 15%.

In Table S-3, the numbers of false assignments are listed for the basic blank commodities in dependence of the identification criteria applied: SANTE criteria with and without delta CCS. In addition, the filter criteria SANTE without fragment ion and additional delta CCS were included. Over all tested matrices, the application of delta CCS margins gave a reduction of the number of false positive assignments.

At a spiking level of 0.100 mg/kg, almost 100% of the original scope were achieved for the high-water commodity group and 95% for high starch commodities. The lowest detection rates were observed in orange with 243 compounds (detection of 87%) including CCS and without 274 compounds (98%). Citrus fruits like orange and grapefruit seemed to be challenging commodities for a proper pesticide detection in the present study. However, in lemon 278 (98%) were detected with CCS and without 280 (100%). In comparison to the other matrices the lowest detection rates within three validation levels (level 0.010 mg/kg: 65% and level 0.001 mg/kg: 16%) were observed for these two matrices irrespectively of the identification criteria applied.

Particularly and in comparison to the complex commodity black tea, which is known to be difficult based on matrix compounds, detection rates decreased distinctly only at the lowest spiking level [21].

In a comparison between sample extracts deriving from commodities of high water (commodity group 1 according to Annex A [15]) and high water and high water and

high acid (commodity group 2 according to Annex [15]), a high abundance of polar matrix compounds was observed for commodities deriving from group 2 (retention time range between 3 and 9 minutes outlined in **Figure S-4B**). As shown in **Figure S-4A** for high water group commodities, co-extracted matrix compounds were detected predominantly in a retention time window between 11 and 17 min. In this region, only 76 pesticide compounds from the relevant parameter scope eluted thus, suggesting a low influence of co-eluting matrix compounds on the remaining pesticide parameters. In contrast, for rape extracts a higher extent of matrix interferences was observed (**Figure S-5**).

Over all of the 20 selected matrices representative for the six commodity groups according to the document SANTE/11945/2015, a validation at three spiking levels was performed. Relevant information like chemical formula, exact monoisotopic mass, experimental data for CCS and retention time, the predominant adducts and the overall detection rates of the 280 pesticides selected for the validation study are presented in Table S-4. Applying the SANTE identification criteria with additional delta CCS at an SDL of 0.100 mg/ kg, 236 compounds met the validation requirements corresponding to 84% of the compounds. These compounds were detected at least in 95% of the samples. Similar detection rates were obtained by application of the SANTE identification criteria: 254 compounds were validated at an SDL of 0.100 mg/kg corresponding to 91% of the original scope. By application of the SANTE identification criteria additionally including delta CCS at an SDL of 0.010 mg/kg, 157 analytes were obtained, representative for 56% of the initial parameter scope. Applying the SANTE criteria at an SDL of 0.010 mg/ kg, 163 pesticides were validated (58%). And at level 0.001 mg/kg 58 analytes met the SDL validation criteria with the SANTE identification margins with additional delta CCS, corresponding to 21% of the scope. Applying the SANTE identification criteria an SDL at 0.001 mg/kg level was met by 60 analytes corresponding to 21% of the original scope.

4. Conclusions

TWIMS offers an additional chromatographic dimension and a separation of coeluting matrix compounds due to posterior spectral cleanup by the application of ion mobility spectrometry. Moreover, the IMS technique provides a robust additional verification point in suspect pesticide screening approaches. By giving a CCS value, robustness in compound identification was improved due to independence of retention time, commodity of concern and concentration levels of analyte molecules, as the number of false assignments is reduced by application of delta CCS margins. With this technique, an unambiguous alignment of fragments is possible due to preceding TWIMS separation and posterior fragmentation of compounds. Ion mobility separation prior to the all-ion fragmentation step helps to avoid the recording of false positive precursor and fragment ions from co-eluted compounds and improves confidence in all-ion fragmentation methods like MS^E.

The validation study was performed over a large variety of commodities with representative matrices covering difficult matrices like orange or tea displaying an average SDL. The validation was accomplished applying identification criteria of delta CCS margins in addition to the original SANTE identification criteria at the three spiking concentrations 0.100, 0.010, and 0.001 mg/kg. 84% of the initial scope of pesticides were validated for the spiking level at 0.100 mg/kg. For the spiking level at 0.010 mg/kg 56% of the scope were validated. At 0.001 mg/kg, 21% of the compounds met the requirements of an SDL validation. The main reason for non-detects over the samples due to the filtering steps were caused in a limitation of the compounds missing the SANTE requirements regarding the detection of at least one fragment ion. A variation of the ranges for the identification criteria such as exact mass, retention time, and CCS-values did not include more analytes for the validation. In case of low detection rates at low concentration levels as alternative to the actual SANTE requirements for HRMS screening methods of the detection of at least one fragment ion may be replaced by the requirement for the proper compliance with the CCS values of the analyte molecules of interest. In our suspect screening approach, this resulted in an increase in detection rates of up to 25%.

Additionally, IMS traces also allow a closer look at the ionization mechanism in electrospray ionization giving evidence for the formation of different protomers, different sodium adducts, and dimers of analyte compounds to gain more

understanding of the phenomena occurring in the electrospray ionization process.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical Approval This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

Appendix

Supplementary Material

Figure S-1: CCS inter-day precision of the tested pesticide parameter scope.

Figure S-2: UPLC-TWIMS-QToF-MS base peak chromatogram of a solvent injection for a full view of the system impact.

Figure S-3: IMS-spectra of spinetoram of peaks two different sodium adduct after ion mobility spectrometry separation. Main peak $[M + H, Na, K]^+$ and fragments (142.1226, 629.3650 and 517.2783 m/z) (A1-2) and secondary peak $[M + Na]^+$ resulted in a different fragment spectrum (630.4127 and 481.3255 m/z) (B1-2).

Figure S-4: UPLC-TWIMS-QToF-MS full scan chromatograms in comparison of high acid (top) and high water (bottom) commodity in relation to the abundance of matrix interferences.

Figure S-5: UPLC-TWIMS-QToF-MS full scan chromatograms of rape (top) in comparison with soy (bottom) of the same commodity group and different matrix impact on pesticide detection.

Table S-1: Commodity groups according to Annex A SANTE/11945/2015 [14].

Table S-2: Detection rates applying different detection criterion according to SANTE/11945/2015, in combination with CCS and with CCS without one fragment ion.

Table S-3: Number of false detects in non-spiked blank samples.

Table S-4: Method validation data for application of SANTE/CCS filter including the exact monoisotopic mass, retention time, CCS value for the corresponding main adduct and number of detects at an SDL.

5. References

- [1] Lehotay S. J., Kok A. de, Hiemstra M., van Bodegraven P., Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection. *J AOAC Int* 2005, 88, 595–614.
- [2] Alder L., Greulich K., Kempe G., Vieth B., Residue analysis of 500 high priority pesticides: Better by gc-ms or lc-ms/ms? *Mass Spectrom Rev* 2006, 25, 838–865.
- [3] Hernandez F., Pozo O. J., Sancho J. V., Bijlsma L., Barreda M., Pitarch E., Multiresidue liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of 52 non gas chromatography-amenable pesticides and metabolites in different food commodities. *J Chromatogr A* 2006, 1109, 242–252.
- [4] Pérez-Ortega P., Lara-Ortega F. J., Gilbert-López B., Moreno-González D., García-Reyes J. F., Molina-Díaz A., Screening of over 600 pesticides, veterinary drugs, food-packaging contaminants, mycotoxins, and other chemicals in food by ultra-high performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry (uhplc-qtofms). *Food Anal Methods* 2017, 10, 1216–1244.
- [5] León N., Pastor A., Yusà V., Target analysis and retrospective screening of veterinary drugs, ergot alkaloids, plant toxins and other undesirable substances in feed using liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. *Talanta* 2016, 149, 43–52.
- [6] Lopez M. G., Fussell R. J., Stead S. L., Roberts D., McCullagh M., Rao R., Evaluation and validation of an accurate mass screening method for the analysis of pesticides in fruits and vegetables using liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometry with automated detection. *J Chromatogr A* 2014, 1373, 40–50.
- [7] Cajka T., Fiehn O., Toward merging untargeted and targeted methods in mass spectrometry-based metabolomics and lipidomics. *Anal Chem* 2016, 88, 524–545.
- [8] Lapthorn C., Pullen F., Chowdhry B. Z., Ion mobility spectrometry-mass spectrometry (ims-ms) of small molecules: Separating and assigning structures to ions. *Mass Spectrom Rev* 2013, 32, 43–71.
- [9] Kafle G. K., Khot L. R., Sankaran S., Bahlol H. Y., Tufariello J. A., Hill H. H., State of ion mobility spectrometry and applications in agriculture: A review. *Eng Agric Environ Food* 2016, 9, 346–357.

- [10] Stephan S., Hippler J., Kohler T., Deeb A. A., Schmidt T. C., Schmitz O. J., Contaminant screening of wastewater with hplc-im-qtof-ms and lc+lc-im-qtof-ms using a ccs database. *Anal Bioanal Chem* 2016, 408, 6545–6555.
- [11] D'Atri V., Causon T., Hernandez-Alba O., Mutabazi A., Veuthey J.-L., Cianferani S., Guillarme D., Adding a new separation dimension to ms and lc-ms: What is the utility of ion mobility spectrometry? *J Sep Sci* 2017.
- [12] Cumeras R., Figueras E., Davis C. E., Baumbach J. I., Gracia I., Review on ion mobility spectrometry. Part 1: Current instrumentation. *Analyst* 2015, 140, 1376–1390.
- [13] Goscinny S., Joly L., Pauw E. de, Hanot V., Eppe G., Travelling-wave ion mobility time-of-flight mass spectrometry as an alternative strategy for screening of multi-class pesticides in fruits and vegetables. *J Chromatogr A* 2015, 1405, 85–93.
- [14] Regueiro J., Negreira N., Berntssen M. H. G., Ion-mobility-derived collision cross section as an additional identification point for multiresidue screening of pesticides in fish feed. *Anal Chem* 2016.
- [15] European Commission, Document no. Santé/11945/2015 -analytical quality control and method validation procedures for pesticide residue analysis in food and feed. *Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residue Analysis in Food and Feed* 2016.
- [16] DIN EN 15662:2009-02, Foods of plant origin - Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE - QuEChERS-method; German version EN 15662:2008, 2008.
- [17] Lopez A., Yusa V., Millet M., Coscolla C., Retrospective screening of pesticide metabolites in ambient air using liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. *Talanta* 2016, 150, 27–36.
- [18]http://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186008113&locale=de_DE (last time accessed: 28.072017).
- [19] Stolker A. L. A. M., Niesing W., Fuchs R., Vreeken R. J., Niessen W. M. A., Brinkman U. A. T., Liquid chromatography with triple-quadrupole and quadrupole-time-of-flight mass spectrometry for the determination of micro-constituents - a comparison. *Anal Bioanal Chem* 2004, 378, 1754–1761.

- [20] Lacorte S., Fernandez-Alba A. R., Time of flight mass spectrometry applied to the liquid chromatographic analysis of pesticides in water and food. *Mass Spectrom Rev* 2006, 25, 866–880.
- [21] Gómez-Ramos M. d. M., Rajski Ł., Lozano A., Fernández-Alba A. R., The evaluation of matrix effects in pesticide multi-residue methods via matrix fingerprinting using liquid chromatography electrospray high-resolution mass spectrometry. *Anal Methods* 2016, 8, 4664–4673.
- [22] Oellig C., Schwack W., Planar solid phase extraction clean-up for pesticide residue analysis in tea by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2012, 1260, 42–53.
- [23] Lalli P. M., Iglesias B. A., Toma H. E., Sa G. F. de, Daroda R. J., Silva Filho J. C., Szulejko J. E., Araki K., Eberlin M. N., Protomers: Formation, separation and characterization via travelling wave ion mobility mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2012, 47, 712–719.
- [24] McCullagh, M., Eatough, D., Hanot, V., Goscinny, S., Discovery of pesticide protomers using routine ion mobility screening. *Waters Application Note No. 720004720en* 2014.
- [25] Kanie O., Shioiri Y., Ogata K., Uchida W., Daikoku S., Suzuki K., Nakamura S., Ito Y., Diastereomeric resolution directed towards chirality determination focussing on gas-phase energetics of coordinated sodium dissociation. *Sci Rep* 2016, 6, 24005.
- [26] Kaufmann A., Butcher P., Maden K., Widmer M., Giles K., Uria D., Are liquid chromatography/electrospray tandem quadrupole fragmentation ratios unequivocal confirmation criteria? *Rapid Commun Mass Spectrom* 2009, 23, 985–998.
- [27] Davis E. J., Grows K. F., Siems W. F., Hill H. H., JR, Improved ion mobility resolving power with increased buffer gas pressure. *Anal Chem* 2012, 84, 4858–4865.
- [28] Taylor P. J., Matrix effects: The achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clin Biochem* 2005, 38, 328–334.
- [29] Ferrer C., Lozano A., Agüera A., Girón A. J., Fernández-Alba A. R., Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables. *J Chromatogr A* 2011, 1218, 7634–7639.

- [30] Matuszewski B. K., Standard line slopes as a measure of a relative matrix effect in quantitative hplc-ms bioanalysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2006, 830, 293–300.
- [31] Matuszewski B. K., Constanzer M. L., Chavez-Eng C. M., Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on hplc–ms/ms. *Anal Chem* 2003, 75, 3019–3030.
- [32] Mei H., Hsieh Y., Nardo C., Xu X., Wang S., Ng K., Korfmacher W. A., Investigation of matrix effects in bioanalytical high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric assays: Application to drug discovery. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2003, 17, 97–103.
- [33] Silvestro L., Tarcomnicu I., Savu S. R., in: Tandem Mass Spectrometry-Molecular Characterization. Intech, 2013.

4.2 Identifizierung von Pestizidmetaboliten in *Brassica*-Pflanzen mittels TWIMS-QToF-MS (Publikation II)

Identification and characterization of pesticide metabolites in *Brassica* species by liquid chromatography travelling wave ion mobility quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-TWIMS-QToF-MS)

Anna Bauer^a, Jens Luetjohann^{a*}, Franziska S. Hanschen^b, Monika Schreiner^b, Jürgen Kuballa^a, Eckard Jantzen^a, Sascha Rohn^c

^a*Research and Development Department, GALAB Laboratories GmbH, Am Schleusengraben 7, 21029 Hamburg, Germany*

^b*Leibniz Institute of Vegetable and Ornamental Crops, Theodor-Echtermeyer-Weg 1, 14979 Grossbeeren, Germany*

^c*Institute of Food Chemistry, Hamburg School of Food Science, University of Hamburg, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany*

Ziel der Arbeit war die Entwicklung einer Methode zur Identifizierung und Charakterisierung von Metaboliten der aktiven Wirkstoffe Thiacloprid, Azoxystrobin und Difenconazol in einer Modellstudie mittels LC-TWIMS-QToF-MS. Hierfür wurden zwei Pflanzenspezies aus der Familie der *Brassicaceae*, Pak Choi als Blattgemüse und Brokkoli als blütentragendes Gemüse ausgewählt. Dabei sollte sowohl die Verteilung möglicher Metaboliten in einzelnen Pflanzenorganen als auch ihre Bildungs- und Abbau-Kinetik untersucht werden.

Die Studie wurde innerhalb von drei Jahren am Leibniz-Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau (IGZ) in Großbeeren durchgeführt. Dabei wurden im ersten Jahr Pak Choi-Pflanzen behandelt, im zweiten Jahr Brokkoli-Pflanzen. Anschließend wurde im dritten Jahr Pak Choi für eine Abbau- bzw. Bildungskinetik der Wirkstoffe und der Metabolite durchgeführt. Die Studie wurde so angelegt, dass eine Identifizierung von Metaboliten ermöglicht werden sollte mit einem Abgleich von Blankmaterial und einer gezielten Anwendung von zwei unterschiedlichen Pflanzenschutzmitteln, die die drei aktiven Wirkstoffe enthielten. Die Evaluierung der Nachweismethode sollte in die im Rahmen der ersten Teilstudie beschriebenen *Pestizidscreening*-Methode

eingegliedert werden, so dass ein kombiniertes *Screening* für Wirkstoffe und Metabolite entwickelt werden kann.

Der eigene Anteil an dieser Veröffentlichung wird mit 30% angegeben.

Identification and characterization of pesticide metabolites in *Brassica* species by liquid chromatography travelling wave ion mobility quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-TWIMS-QTOF-MS)

Anna Bauer^a, Jens Luetjohann^{a*}, Franziska S. Hanschen^b, Monika Schreiner^b, Jürgen Kuballa^a, Eckard Jantzen^a, Sascha Rohn^c

^a*Research and Development Department, GALAB Laboratories GmbH, Am Schleusengraben 7, 21029 Hamburg, Germany*

^b*Leibniz Institute of Vegetable and Ornamental Crops, Theodor-Echtermeyer-Weg 1, 14979 Grossbeeren, Germany*

^c*Institute of Food Chemistry, Hamburg School of Food Science, University of Hamburg, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany*

Corresponding author:

Dr. Jens Luetjohann, GALAB Laboratories GmbH, Am Schleusengraben 7, 21029 Hamburg

E-mail address: jens.luetjohann@galab.de

Tel.: +4940368077432; Fax: +4940368077401.

Keywords: pesticide metabolites, suspect screening, degradation, *Brassica* crops, UPLC-TWIMS-QTOF-MS

Abstract

A new mass spectrometric method for evaluating metabolite formation of the pesticides thiacloprid, azoxystrobin, and difenoconazole was developed for the *Brassica* species pak choi and broccoli. Both, distribution and transformation kinetics of the active compounds and their metabolites were analyzed by UPLC-TWIMS-QTOF-MS. Additionally, HRMS analysis and structure elucidation tools such as diagnostic ions, isotopic matches, and collision cross sections were applied for metabolites identification. Following the application of two plant protection products (containing the above-mentioned active compounds) in a greenhouse study plant

material was cryo-milled and extracted with water/methanol. The residual levels of active compounds were identified at certain timepoints during pre-harvest intervals and in the final products. Different phase I and phase II metabolites of the pesticides were identified in different plant organs such as leaves, stems, (broccoli) heads, and roots. Three individual degradation pathways and distribution profiles are suggested including eight thiacloprid, eleven azoxystrobin and three difenoconazole metabolites.

1. Introduction

Each year over 100.000 t of pesticide formulations are applied in Germany [1]. The active compounds decompose in the plants by biotransformation, chemical decay and microbial degradation before plants are consumed. By virtue of continuously positive detections of pesticide metabolites in plants and the environment [2] and the toxicological re-evaluation of pesticide metabolites, a continuous renewal of the residue definitions in accordance with European regulation (EC) No. 396/2005 is the consequence. Thus, more and more attention is set to the identification of pesticide metabolites and the corresponding metabolic pathways [3, 4]. Pesticide metabolites can be classified into two groups: (i) legally relevant, with a remaining pesticide activity, and (ii) yet legally non-relevant, without ascertained pesticide activity and any toxicity [5].

The main goal of the analysis of pesticide metabolites is to provide proof of the application of plant protection products and the compliance with maximum residue levels (MRL). An additional challenge of setting of MRLs is to estimate the actual pesticide load of a treated sample due to the lack of knowledge about metabolite formation. In this context, high-resolution mass spectrometry (HRMS) has become one of the most suitable platforms for the detection and structure elucidation of pesticide metabolites [4, 6]. The resolving power of TWIMS-QTOF-MS achieves mass accuracies of ions with full width at half maximum (FWHM) > 20 k in full-scan MS, resolving characteristic isotopic patterns in particular of halogen-containing species, adduct profiles, amenable to structure elucidation tools [7]. Thus, these instrument properties offer a range of possibilities for compound identification. Additionally, HRMS coupled to ion mobility spectrometry (IMS) provides a simultaneous measurement of mass-to-charge ratios (m/z) and drift properties of ions in a buffer gas medium (e.g., helium or nitrogen) [8, 9]. The screening capability of

IMS-HRMS relies on the additional separation of the molecules according to their specific mass, charge, and shape in a calculated *collision cross section* (CCS) of the analytes without additional analysis time. Isobaric compound ions with different 3D structures have different drift properties in a buffer gas medium. In that way, IMS enables measurement and resolution of isobaric compounds (equal m/z). Furthermore, when the fragmentation of precursor ions is performed after a travelling-wave ion mobility (TWIM) separation, the resulting MS/MS product ion spectra are so-called “cleaned-up” leading to a reduction of false-positive assignments [10].

In the context of pesticide metabolite identification, HRMS instruments can be further used to identify metabolites in a *suspect screening approach* [11]. In case the confirmation of the analyte molecules with a reference standard is not possible due to a lack of its availability, this seems to be a promising strategy for the identification of metabolites, as species can be also predicted [2]. Storck et al. described the workflow of a screening approach in three principal steps: (i) development of a scientific in-house compound-specific metabolite library based on literature data; (ii) use of a non-targeted quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (QTOF-MS) screening towards suspects, followed by targeted MS/MS, and finally (iii) the categorization of detected species using *in silico* evaluation [12]. Overall, an identification process of a compound in screening approaches is defined by several stages to confirm the identity of a molecule. Schymanski, Jeon, Gulde, Fenner, Ruff, Singer & Hollender (2014) and [13] describe five confidence steps to confirm a compound by (i) a reference standard, (ii) library spectra matching or diagnostic evidence, (iii) tentative structure and theoretical matching, (iv) unequivocal molecular formula, and (v) exact mass. With regard to pesticide analysis, [14] studied different metabolites of the neonicotinoid insecticides thiamethoxam, clothianidin, and imidacloprid in pollen from sunflower and maize seeds using UPLC-QTOF-MS. Applying a combination of accurate mass tools, the presence of corresponding metabolites was confirmed and the main degradation products were identified in the matrices mentioned above. In another study [15] investigated the distribution of imidacloprid and its main metabolites imidacloprid-olefin and imidacloprid-urea in rapeseed grown on contaminated potting soil. They detected increasing amounts of the metabolites in the green plant tissues in comparison to roots and soil.

However, sometimes metabolites become legally relevant following a re-evaluation of their toxicity resulting in the lowering of the *acute reference dose* (ARfD). A recent

example for this is carbofuran and its metabolite 3-hydroxy-carbofuran [16]. Some few examples exist for pesticide metabolite screening approaches, but there is still a lack of knowledge about the nature of metabolites present in food commodities. Particularly, there is a deficiency in the availability of analytical reference standards being a prerequisite for the implementation of targeted methods including metabolites quantification [17].

Thus, in the present study, the development of a powerful method for pesticide metabolite identification is described. In a model approach, two *Brassica* species pak choi (*B. rapa* ssp. *chinensis*) and broccoli (*B. oleracea* var. *italica*) – varying in morphology and formed plant parts – were treated with the active compounds thiacloprid (an insecticidal neonicotinoid), azoxystrobin (a fungicidal strobilurine-methoxyacrylate), and difenoconazole (a triazole fungicide). Pesticide distribution in the different plant organs as well as their respective degradation and biotransformation kinetics were studied. The plant protection products were selected depending on their approval for *Brassica* species and economic implementation with a domestic sale of 100 - 250 t a⁻¹ in Germany [1]. HRMS tools were used to identify and characterize the degradation pathway of the active compounds to enable a clear assignment of the corresponding metabolites in both crops.

2. Material and methods

2.1 Chemicals

Reference standards for the pesticides thiacloprid (purity 98%), azoxystrobin (purity 99.9%), and difenoconazole (purity 97%) were purchased from Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany). Triphenyl phosphate (purity 99%) was a kind gift from Bayer Pharma AG (Leverkusen, Germany). Reference standards for the thiacloprid metabolites thiacloprid-amide (purity 97.5%), 4-hydroxy-KKO 2254 (purity 99%), and thiacloprid O-analogue (purity 97.5%)) were a kind gift from the Federal Office of Consumer Protection and Food Safety (BVL, Berlin, Germany). Stock solutions were prepared in acetonitrile and stored at -20 °C. Formic acid (purity 98%) was purchased from Sigma-Aldrich GmbH (Taufkirchen, Germany). HPLC-grade methanol, acetonitrile, and water were purchased from Lab Scan Ltd. (Dublin, Ireland) and Waters Corp. (Milford, MA, USA). Ammonium acetate solution, used as eluent modifier for the UPLC step, and leucine enkephalin were purchased from Waters Corp. (Milford, MA).

The commercially available plant protection products Askon® suspension concentrate (Syngenta Agro GmbH, Maintal, Germany) containing 200 g L⁻¹ (18.2% by weight) azoxystrobin and 125 g L⁻¹ (11.4% by weight) difenoconazole, and Calypso® suspension concentrate (Bayer CropScience Deutschland GmbH, Langenfelde, Germany) with 480 g L⁻¹ thiacloprid were used [18, 19].

2.2 Plant material and experimental design

Brassica plant material was provided by the Leibniz Institute of Vegetable and Ornamental Crops (IGZ) in Großbeeren, Germany from 2014 to 2016. All experiments were conducted in a controlled greenhouse environment. Plants were grown at a daily mean temperature ranging between 14 and 15 °C with a radiation span between 6 and 10 mol m⁻² d⁻¹ and were regularly irrigated with tap water. Two *Brassica* species were selected for the experiments: pak choi (*Brassica rapa* ssp. *chinensis*) cultivar (cv.) Black Behi as leafy vegetable and broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) cv. Marathon as inflorescence vegetable.

For the distribution study of active compounds and pesticide metabolites organs of both *Brassica* species (leaves, stems, roots, and broccoli heads) were sampled. A total of 300 pak choi plants were cultivated in 2014 and a total of 450 broccoli plants in 2015 within these two distribution studies. Kinetic studies of the plant protection products Askon® and Calypso® were conducted with pak choi leaves. For this purpose, a total of 300 pak choi plants were grown in 2016.

2.2.1 Distribution study of pesticide metabolites for pak choi

Pak choi: After germination, 7-days-old pak choi seedlings were transplanted and each plant was grown in a soil-filled (Einheitserde TT, medium structure, pH value 5.9, Einheitserde Werkverband e.V., Germany) pot (ø 12 cm) in a distance of 0.25 × 0.25 m, resulting in a density of 16 plants/m², for additional 38 days (11.08.-17.09.2014). Fifteen days after transplanting in the pot, when the pak choi plants reached a five-leaf stage and had established an adequate root system, 100 randomized plants were treated on a separate desk with a single application of the plant protection products Calypso® and in parallel 100 plants with Askon® which was performed according to the manufacturer's instruction [18, 19] with a pressure diffuser. The remaining 100 untreated pak choi plants were used as controls.

Of 100 plants for each treatment condition 30 randomized pak choi plants per application were harvested (17.09.2014) at the ten-leaf stage, respectively. Samples were taken of different plant organs (leaves, stems, and roots).

2.2.2 Kinetic study on pak choi leaves

The same experimental design with pak choi was repeated in 2016 for conducting degradation and biotransformation kinetic studies of thiacloprid, azoxystrobin and difenoconazole. 10 individual harvest dates after application of plant protection products were scheduled. Respectively, leaf samples at the day of application (day 1) and the following days 2, 3, 6, 8, 10, 13, 17, 19, and 25 were sampled. On each harvest day leaves of 10 randomized plants were collected and afterwards homogenized and analyzed in triplicate. Samples were collected in parallel to non-treated (control) samples that were grown under the same growth conditions.

2.2.3 Distribution study of pesticide metabolites for broccoli

Broccoli: After germination, 7-days-old broccoli seedlings were transplanted and temporarily grown (21 days) in a pot ($\varnothing$ 12 cm), filled with soil (Einheitserde TT, medium structure, pH value 5.9, Einheitserde Werkverband e.V., Germany) before being finally transferred in nine soil-filled plots in a greenhouse (08.04. to 08.07.2015). Each plot comprised 50 broccoli plants (spaced 0.40 x 0.45 m, density of 9 plants/m²). Broccoli plants at the 15-leaf stage prior to head formation were treated twice with an interval of one month (01.05.2015 and 02.06.2015) with Calypso® (150 plants in total, 50 plants x 3 plots) or with Askon® (150 plants in total, 50 plants x 3 plots), respectively. Untreated broccoli plants (150 plants in total, 50 plants x 3 plots) were used as control. Randomly 15 representative broccoli plants of each plot were harvested (08.07.2015) when the broccoli head was fully developed and samples of the different plant parts (leaves, stems, roots, and heads) were taken, homogenized and analyzed in triplicate.

2.2.4 Application of plant protection products

Treatments were performed according to the manufacturers' instructions with a pressure diffuser [18, 19]. According to the instructions for use of Calypso® (0.2 L ha⁻¹ in 400-600 L water) and Askon® (1 L ha⁻¹ in 600 L water) applied quantities of plant protection products were downscaled for Calypso® for 15 m² (100 plants) and Askon®

for 10 m² (100 plants) and calculated for an average weight of 15 g of plant at the time of application. The Pre-harvest interval (PHI) according to Article 34 (4) (d) of Regulation (EC) No 1107/2009 is defined as the period between the last application of the plant protection product and the harvest. PHI for Calypso® was 7 days and for Askon® 14 days. The parameters of application of the plant protection products used in this study were as close as possible to the treatment applied in real production. The same application conditions were applied for conducting the kinetic study and distribution study of pak choi as described above.

2.3 Sample preparation

After dissection of the plant parts of both plant species and removal of adherent soil from the root by shaking off, samples were frozen at -20 °C for 60 minutes and afterwards homogenized in a cryomill (Grindomix GM 200, Retsch GmbH, Haan, Germany) using dry ice. Extraction of the target analytes was performed with 10 mL extraction solvent (methanol and water, 50:50, v/v) for 10 g of the homogenized plant tissue in a polypropylene centrifuge tube. Samples were shaken thoroughly for 5 min using a mechanical shaker (AGIA 2000, Collomix Rühr- und Mischgeräte GmbH, Gaimersheim, Germany). Subsequently, a centrifugation step (3846 × g for 5 minutes; Multifuge X3 benchtop centrifuge; Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Germany) was accomplished. Then 980 µL of the supernatant was mixed with 20 µL of triphenyl phosphate solution (5 µg/mL in methanol/water, 50/50, v/v) as an internal standard giving a final concentration of 100 ng/mL. This solution was passed through a syringe filter (regenerated cellulose CHROMAFIL® Xtra RC-20/25, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany).

2.4 Instrumentation and conditions

2.4.1 UPLC-ESI-IMS-QTOF-MS

An UPLC system (ACQUITY UPLC I-CLASS, Waters Corp., Milford, MA, USA) coupled with a hybrid travelling-wave ion mobility quadrupole time-of-flight mass spectrometer (VION TWIMS QTOF, Waters, Milford, MA, USA) equipped with a StepWave off-axis ion source (Waters, Milford, MA, USA) through an electrospray interface was used for the study.

Sample separation was performed using an ACQUITY UPLC-BEH C18 analytical column (2.1 mm (i.d.) x 100 mm (length), particle size 1.7 µm) connected to an

ACQUITY UPLC BEH C18 VanGuard Pre-column, 130Å, 1.7 µm, 2.1 mm X 5 mm. A gradient of solvent A (10 mM ammonium acetate pH 5 in water) and solvent B (10 mM ammonium acetate pH 5 in methanol) as follows: (i) 0.00 min (A:B, 98:2, v/v) (ii) 0.25 min (A:B, 98:2, v/v), (iii) 12.25 min (A:B, 1:99, v/v), (iv) 13.00 min (A:B, 1:99, v/v), (v) 13.01 min (A:B, 98:2, v/v), (vi) 17.00 min (A:B, 98:2, v/v), and a flow rate of 0.45 mL/min. The injection volume was set to 3 µL and the column temperature was held at 45 °C.

The electrospray ionization (ESI) source was operated in positive ionization mode and analyzer mode sensitivity (detector specific analyzer mode). Depending on the highest sensitivity for the compounds of interest, capillary voltage was set to 1.0 kV and sample cone voltage to 40 V. Nitrogen was used as nebulizer (flow rate at 50 L h⁻¹) and desolvation gas (flow rate at 1000 L h⁻¹). The desolvation temperature was set to 550 °C and source temperature to 120 °C. Method conditions were according to Waters Corp. (Milford, MA, USA) for pesticide screening to establish the scientific compound library in this study [20]. Spectral data were acquired in a mass range of *m/z* 50-1000 using full scan and the *high definition mass spectrometer elevated* experiment mode (*HDMS^E*) with an acquisition speed of 5 scans s⁻¹. The *MS^E* method was configured to alternate between two collision energy conditions in order to obtain both molecular ions (H⁺, Na⁺, K⁺, NH₄⁺) and fragment ions. *MS^E* is mass spectrometry elevated, which allows data acquisition with low collision energy (LE) and high collision energy (HE) in parallel, whereby the HE mode is including a ramp of collision energy. The LE spectrum was recorded at low collision energy (6.0 eV) to receive a spectrum containing pseudo molecular-ions or adducts. The HE spectrum was recorded with a collision energy ramp ranging from 6 to 45 eV to create a spectrum containing fragmentation patterns for each compound. The software UNIFI™ 1.8.1 (Waters Corp., Milford, MA, USA) performed an automatic time-alignment of the LE and HE trace data to establish a correlation between both energy conditions [3]. Travelling-wave ion mobility spectrometry (nitrogen buffer gas 25 mL min⁻¹; wave velocity 300 m/s and pulse height 15 V) separated ions by CCS on the basis of size, shape, and charge of the molecule and individual drift time. Thereby, the mass spectrum is cleaned-up for a certain assignment of fragments to precursor selection.

The resolving power was FWHM > 40 k (41,203 at 556.2768 *m/z*). For a real time re-calibration a lock mass (leucine enkephalin, 50 pg/µL in acetonitrile:water with 0.1%

formic acid (49,95:49,95:0,1 (v/v/v))) was injected via a dual electrospray ion source. The reference spray at a flow rate of 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ was introduced in pre-defined intervals of 10 s to the acquisition duty cycle with a scan time of 0.2 s. A cone voltage of 40 V and a capillary voltage of 1.0 kV were set. Lock mass was set to 556.2766 m/z .

2.4.2 Data analysis

Data analysis was performed with the software UNFI 1.8.1 (Waters, Milford, MA, USA). Data was processed with a scientific library created in-house containing a suspect database for thiacloprid metabolites (47 library entities), azoxystrobin metabolites (37 library entities), and difenoconazole metabolites (12 library entities) containing information about monoisotopic masses, molecular structures, observed detection results with the individually elucidated parameters retention time, exact masses of pseudo molecular ions, adducts and fragments, and CCS added to each entry in the database. The identification criteria were adopted from the *SANTE* 11945/2015 document [21]. These were as follows: precision of the mass error ± 5 ppm for compound and isotopes, retention time shift ± 0.1 min, two diagnostic ions (precursor and fragment ion), and additionally a CCS delta $\pm 2\%$. Furthermore, the prediction algorithm for isotope fit (iFit) $< 30\%$ which is a theoretical isotope match (zero for a perfect match to a model isotope distribution and ratio) based on the UNIFI algorithm (Waters, Milford, MA, USA) was performed according to [22].

Quantification was performed with commercially available reference standards in a matrix matched calibration.

For quantification of the active compounds thiacloprid, azoxystrobin and difenoconazole treated and non-treated sample extracts (blanks) were diluted 1/500 and afterwards blank sample extracts were spiked with available standards at three different levels corresponding to 1.00, 10.0 and 100 mg/kg for quantification purpose. For quantification of the thiacloprid metabolites TM02, TM16 and TM37 non-diluted treated and non-treated sample extracts (blanks) were used and blank sample extracts were spiked with available standards at three different levels corresponding to 0.001, 0.010, and 0.100 mg/kg for quantification purpose.

The identification and quantification of the parent compounds thiacloprid, azoxystrobin, and difenoconazole and three thiacloprid metabolites TM02, TM16 and TM37 were validated according to the actual *SANTE* 11945/2015 document [21]. The

validation was performed in the linear working range starting from the limit of quantification of 0.001, 0.010 and 0.100 mg/kg in plant-derived-samples meeting recovery rates between 80 – 120% and < 20% RSD (Table S-2).

3. Results and discussion

3.1 Identification of active compounds and their metabolites

For this suspect screening approach, firstly a database for metabolite suspects for different plant species was created in order to detect and identify the pesticide metabolites. For this purpose, treated samples of pak choi and broccoli were studied for pesticide metabolites by UPLC-IMS-QTOF-MS in full scan *HDMSE* mode. Data sets were subjected to both, the suspect screening approach using a customized scientific library and a screening approach for identification of tentative thiacloprid, azoxystrobin, and difenoconazole metabolites based on exact mass and structure.

Identification and further confirmation by available reference standards was performed for thiacloprid, azoxystrobin, difenoconazole and the thiacloprid metabolites thiacloprid-amide (TM02), 4-hydroxy-KKO 2254 (TM37), and thiacloprid-*O*-analogue (TM16). As reference substances for most of the metabolites were not commercially available, identification or a diagnostic proposal was performed in accordance with the following criteria: (i) accurate mass analysis of precursor ion(s) < 2 ppm mass error, (ii) unique peak(s) in the treated sample in comparison to blank samples, (iii) isotope match (iFit) < 15%, (iv) at least ≥ 1 characteristic *in-silico* fragment by UNIFI™. Positive detections from the suspect screening were evaluated and metabolite libraries were reprocessed to approve (v) CCS values with delta < 2%. (vi) The retention time error should be < 0.1 min in all samples. (vii) An additional step for verification was the criterion of mass error of the detected isotopes < 5 ppm.

In **Figure 1** *HMDSE* data of thiacloprid amide is displayed: low collision energy channel data with thiacloprid-amide adducts (A, marked grey bar) and high collision energy channel data with the fragments (B) in pak choi. The most abundant fragment is 126.0105 *m/z* with a characteristic chlorine isotopic pattern. It was detected in all thiacloprid metabolites as the characteristic main fragment, which is diagnostic and common for thiacloprid metabolites [23–25]. Diagnostic fragments were also reported by [26]. They described a fragmentation-degradation relationship between parent compounds and metabolites leading to diagnostic fragments. Based on the

fragmentation-degradation principle an identification and structural elucidation for pesticide metabolites is possible.

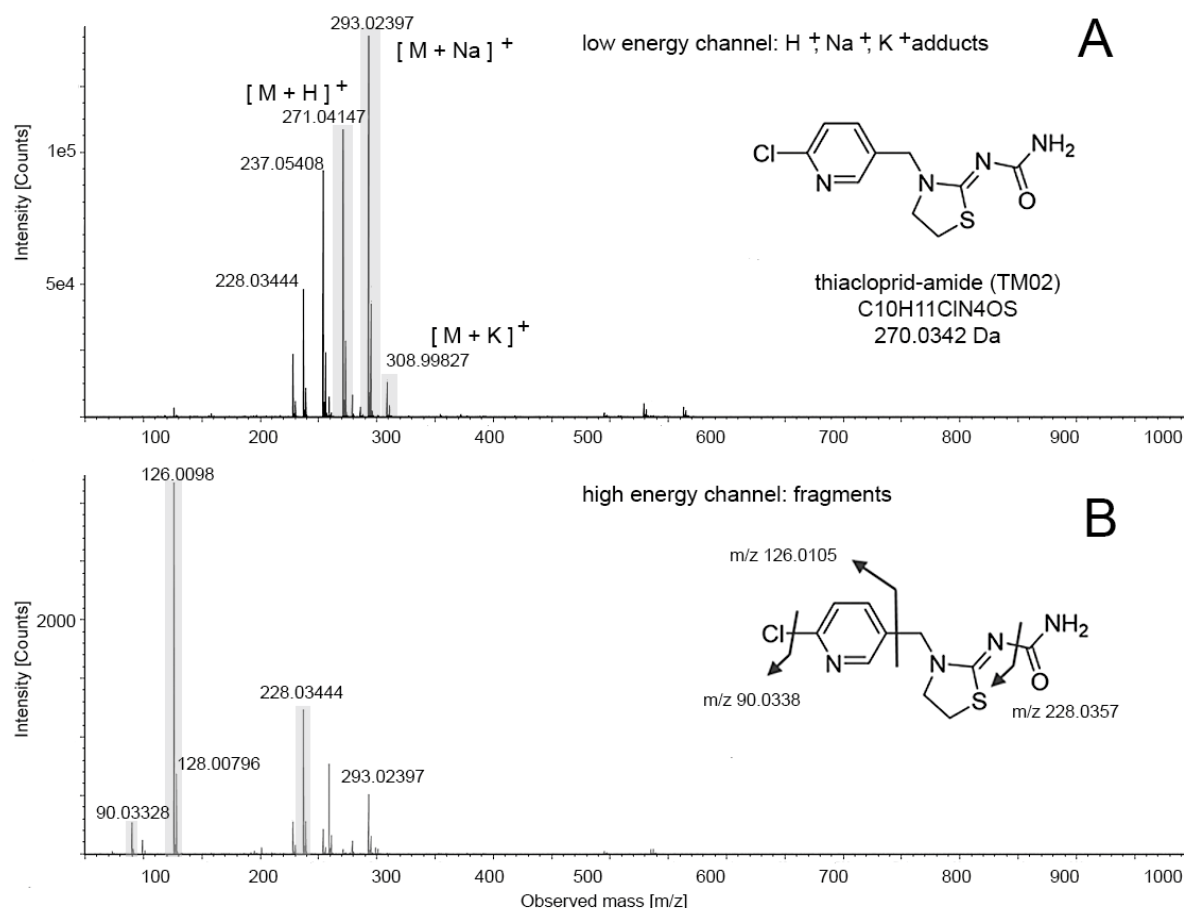


Figure 1. HDMS^E spectra and fragmentation pattern of thiacloprid amide: (A) low CE adducts of H^+ , Na^+ , K^+ thiacloprid amide, and (B) high CE fragments from a pak choi leaf sample.

In addition to the mass spectral data, CCS values obtained can act as identification indicator. The CCS integral is defined as the approximated rotationally averaged collision cross sectional area depending on the 3D structure and expressed as CCS value in square Angstrom units ($\text{\AA}^2$) [8, 27]. Goscinnny et al. (2015) reported that drift time values are independent from matrix, concentration, and working range of target molecules [9]. Therefore, CCS values are giving an additional confidence level, as a statistical value of 2% variation of the CCS value associated with drift time provides an acceptable criterion for an identification tool in a screening approach. Furthermore, HDMS^E measurement obtained from ion mobility separation of the fragments can be specifically assigned to the parent molecules via their corresponding drift times [9]. **Table 1** summarizes the molecular formulas and

supplementary confirmation factors. Here, also the corresponding identification status is included according to [28, 13]. Further, data of the active compounds and the corresponding metabolites are consistent with data reported in the approval documents for the selected active compounds and in literature concerning thiacloprid, azoxystrobin, and difenoconazole and the targeted plants of concern [29–31, 17, 32].

3.2 Distribution and characterization of pesticide metabolites in pak choi

In a first approach for studying the distribution pattern of pesticide metabolites in the plant, leaf, stem, and root tissue of pesticide-treated plants were analyzed. For thiacloprid and azoxystrobin complex metabolite profiles were detected in comparison to difenoconazole, where only few metabolites were formed (**Table 1**). Metabolites detected during the distribution study can be classified into two phases: Phase I metabolites are activated molecules with increased polarity by a dealkylation reaction or by introducing polar functional groups. Phase II metabolites are conjugated with endogenous molecules such as glucose or carboxylic or amino acids [33]. In plant leaves the highest concentrations and variations were detected for all three active compounds. The leaf is also the location of application and predominant site of plant metabolism [34]. Similarly, a decreasing concentration gradient was also detected from leaves to roots. The stem as a vascular tissue is mainly responsible for transporting nutrients and water. Therefore, a low concentration of residues of active compounds and metabolites is very likely, while the roots act as storage compartments containing comparatively a wider range of metabolites in higher concentration [34].

Table 1. Metabolites of thiacloprid, azoxystrobin, and difenoconazole in pak choi and broccoli samples. Screening was performed with mass filter error of ± 5 ppm, retention time error of ± 0.1 min, two diagnostic ions (precursor and fragment), iFit < 15% and CCS < 2%. Additionally International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) denominations for compounds are given in Table S-1.

Compound ¹	acronym ²	Retention time (min)	CCS (Å ²)	Formula	Exact mass (Da)	iFit (%) ³	IMZ RSD (ppm) ⁴	Fragment s	Confirmation	Sample containing metabolites
thiacloprid		5.21	156.78	C ₁₀ H ₉ ClN ₄ S	252.02364	1.57	0.6	226.0200 126.0105 90.0338	confirmed	pak choi broccoli
4-hydroxy-KKO 2254	TM37	3.90	158.96	C ₁₀ H ₁₁ ClN ₄ O ₂ S	286.02912	4.38	0.09	242.0149 226.0200 126.0105 90.0338	confirmed	pak choi
thiacloprid-amide	TM02	4.43	156.94	C ₁₀ H ₁₁ ClN ₄ OS	270.03421	3.55	0.08	228.0357 126.0105 90.03383	confirmed	pak choi broccoli
4-hydroxy-thiacloprid	TM01	4.98	158.5	C ₁₀ H ₉ ClN ₄ OS	268.01856	3.5	1.25	126.0105	tentative	pak choi broccoli
thiacloprid-olefin	TM38	5.11	152.62	C ₁₀ H ₇ ClN ₄ S	250.00799	4.89	35.11	126.0105	tentative	pak choi
thiacloprid thiazolidinimine	TM29	3.09	147.46	C ₉ H ₁₀ ClN ₃ S	227.0284	3.29	0.25	126.0105	tentative	pak choi

thiacloprid O-analogue	TM16	4.41	156.31	C ₁₀ H ₁₁ ClN ₄ OS	270.03421	3.15	1.14	210.0429 126.0105 90.0338	confirmed	pak choi
6-CPA-glucoside	TM04	3.07	161.84	C ₁₂ H ₁₆ ClNO ₆	305.06661	8.35	0.48	126.0105 144.0211	tentative	pak choi broccoli
6-CP-biuret sulfoxide	TM10	3.55	174.21	C ₁₁ H ₁₅ ClN ₄ O ₃ S	318.05534	2.07	0.75	126.0105 192.0437	tentative	pak choi broccoli
azoxystrobin		8.37	196.15	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅	403.11682	2.33	0.12	372.0979 344.1030 329.0795	confirmed	pak choi broccoli
R400753 Compound 24	AMC24	7.36	182.87	C ₂₀ H ₁₅ N ₃ O ₅	377.10117	2.42	0.69	360.0973 241.0603 171.0550	tentative	pak choi broccoli
Compound U5	AMU5	7.66	186.47	C ₂₁ H ₁₇ N ₃ O ₅	391.11682	8.95	1.84	314.0918 342.0869 360.0974	tentative	pak choi
R40051 Compound 21	AMC21	8.28	179.92	C ₂₀ H ₁₅ N ₃ O ₄	361.10626	3.74	0.84	302.0920 330.0870	tentative	pak choi
Compound N1	AMN1	7.26	220.56	C ₂₇ H ₂₇ N ₃ O ₁₀	553.16964	7.39	0.5	314.0922 479.1880 414.1046 392.1244	tentative	pak choi

Compound O2	AMO2	6.75	233.27	$C_{30}H_{29}N_3O_{13}$	639.17004	5.67	0.62	314.0922 342.0871 392.1424	tentative	pak choi broccoli
Compound O1	AMO1	6.63	235.96	$C_{30}H_{27}N_3O_{13}$	637.15439	7.78	0.61	390.1084 358.0822 330.0872	tentative	pak choi broccoli
Compound M2	AMMO 2	6.53	229.79	$C_{29}H_{27}N_3O_{13}$	625.15439	10.74	0.77	360.0972 378.1079 374.0499	tentative	pak choi
Compound M3	AMMO 3	7.12	221.65	$C_{27}H_{25}N_3O_{10}$	551.15399	1.97	0.62	390.1085 372.0979 344.1030	tentative	pak choi broccoli
Compound M1	AMMO 1	6.64	212.81	$C_{24}H_{21}N_3O_9$	495.12778	6.66	0.41	379.0993 390.1082 356.0638 360.0971	tentative	pak choi
Compound 35/U3	AMC35 /U3	4.95	214.07	$C_{19}H_{13}N_3O_5$	363.08552	3.35	1.24	346.017 318.0877	tentative	pak choi
Compound U6	AMU6	6.96	189.19	$C_{21}H_{17}N_3O_6$	407.11174	6.14	0.52	390.1080 302.0914	tentative	pak choi
difenoconazole		10.14	198.03	$C_{19}H_{17}Cl_2N_3O_3$	405.0647	0.81	0.29	337.0393 323.0236	confirmed	pak choi

hydroxyl- difenoconazole	DM08	9.64	208.11	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₄	421.05961	0.79	4.69	251.0020	tentative	pak choi
CGA 205374	DM02	9.20	185.09	C ₁₆ H ₁₁ Cl ₂ N ₃ O ₂	347.02283	1.76	0.37	278.9956	tentative	pak choi
CGA 205375	DM03	9.35	185.95	C ₁₆ H ₁₃ Cl ₂ N ₃ O ₂	349.03848	8.95	0.85	314.0691 296.0585	tentative	pak choi broccoli

¹References compound names according to [29, 30, 31].

²Acronyms and abbreviations used in this study.

³Based of UNIFI™ algorithm (Waters Corp., Milford, MA, USA) as a theoretical isotope match (zero for a perfect match to a theoretical model isotope distribution and ratio) [22].

⁴Mass error of the detected isotopes and/or adducts in ppm.

Two weeks after the treatment with the systemic neonicotinoid **thiacloprid**, residue levels of thiacloprid were 3.0 mg/kg in the leaves, 1.3 mg/kg in the stem, and 1.0 mg/kg in the roots (**Figure 2A**). Predominantly phase-I-metabolites were formed from thiacloprid. The main metabolites were thiacloprid amide (TM02), thiacloprid olefin (TM38), and thiacloprid thiazolidinimine (TM29). The thiacloprid metabolite 6-CP-biuret sulfoxide (TM10) is an oxidized metabolite and was found in leaves, stem, and roots and is also found in mammalian metabolism [31]. The degradation mechanism of thiacloprid is outlined in **Figure 4**.

The distribution of **azoxystrobin** and its metabolites in pak choi is depicted in **Figure 2B**. Almost similar concentrations of azoxystrobin were determined in the leaves (0.30 mg/kg), in the stem (0.25 mg/kg), and in the roots (0.20 mg/kg). Key metabolite in the leaves and the stems was Compound M3 (AMM03) a glucose conjugate of azoxystrobin. However, compared to thiacloprid, for azoxystrobin preferentially phase II metabolites were identified. In prevalence, azoxystrobin was glucosylated and esterified with malonic acid. The esterified form of metabolites is typical for reversible storage in vacuoles described by [33] and these compounds were primarily localized in leaves (**Figure 2B**). In the roots, the major metabolites identified were Compound 24 (AMC24) a dealkylated and hydrolyzed azoxystrobin metabolite and non-conjugated metabolites such as dealkylated Compound 21 (AMC21). It is reported, that AMC21 is a photolysis transformation product [29]. The degradation mechanism of thiacloprid is shown in **Figure 4**.

In the plant protection product Askon[®], **difenoconazole** was the second active compound next to azoxystrobin. Difenoconazole residues were 0.12 mg/kg in the leaves, 0.10 mg/kg in the stem, and 0.22 mg/kg in the roots. In spite of a high sensitivity of this compound compared to the previous substances, the same tendency of increasing residual levels from leaves to roots was observed. In contrast to azoxystrobin, for difenoconazole only a low degree of biotransformation was observed in pak choi and broccoli plants, as shown in **Figure. 2C**. Just two metabolites were detected. The main metabolite was the oxidized CGA-205374 (DM02) detected in leaves. Further, a small amount of hydroxylated difenoconazole (CGA-20575/DM03) was found in the stems and the roots. The degradation mechanism of difenoconazole is depicted in **Figure S-1**.

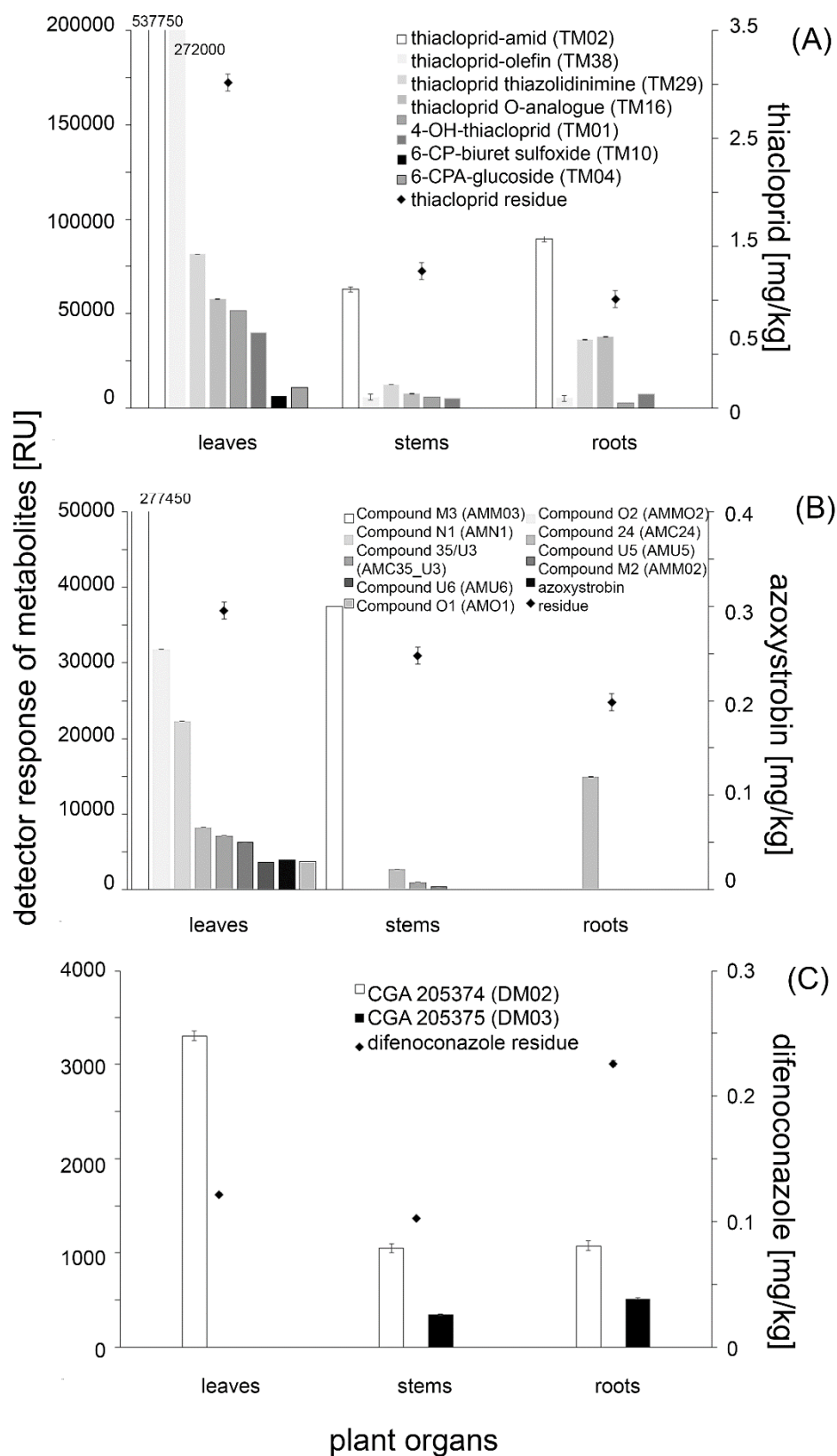


Figure 2. Distribution of thiocloprid metabolites (A), azoxystrobin metabolites (B) and difenoconazole metabolites (C) in pak choi organs. The error bars indicate the standard deviation ($n = 3$).

3.3 Kinetics of the metabolism of thiacloprid, azoxystrobin, and difenoconazole in pak choi leaves

As shown in the distribution study, the largest variety and the highest concentrations of pesticide metabolites were determined in the leaves. Furthermore, the leaves are regarded to be the target organ of the first contact with the plant protection product and the main plant organ of biotransformation [33]. In a second greenhouse study, the degradation of active compounds and the formation of metabolites were monitored to evaluate the development of additional emerging metabolites. In this kinetic study, the acquisition started after six hours of incubation till the final harvest after 25 days.

In **Figure 3A**, the degradation of **thiacloprid** and the kinetics of emerging representative metabolites during the study are presented. The first sampling 6 hours after application resulted in a residual level of 91.5 mg/kg thiacloprid in the leaves that further decreased, approximately in a logarithmic way, to 3.8 mg/kg at the final harvest at day 25 after application. Likewise, a decrease of over 90% from the initial concentration was also reported by Abdel-Ghany et al. for cucumber fruits [32]. During the kinetic study, seven phase I and one phase II metabolites were detected. Main metabolite of thiacloprid was identified to be the olefin TM38, which had an apex two weeks after treatment. Further principal metabolites were the acetamide TM02 and oxazolidine TM16.

The hydroxylated metabolite TM01 is a precursor of the main metabolite TM38, which results from TM01 by elimination of a water molecule. The transformation kinetics of thiacloprid thiazolidinimine (TM29) were similar to the degradation of the precursor thiacloprid. After 10 days, the concentration of TM29 fell below the detection limit. For thiacloprid-amide (TM02), a small increase after one week from 0.017 mg/kg to 0.045 mg/kg and a decrease to 0.027 mg/kg at the final harvest were observed. In the degradation pathway of thiacloprid shown in **Figure 4**, it is depicted that the hydroxylated acetamide metabolite TM37 is a metabolite of acetamide TM02. This metabolite as a product of this degradation reaction was detected only few days before final harvest of pak choi, while simultaneously the concentration of TM02 was decreasing as shown in **Figure 3A**.

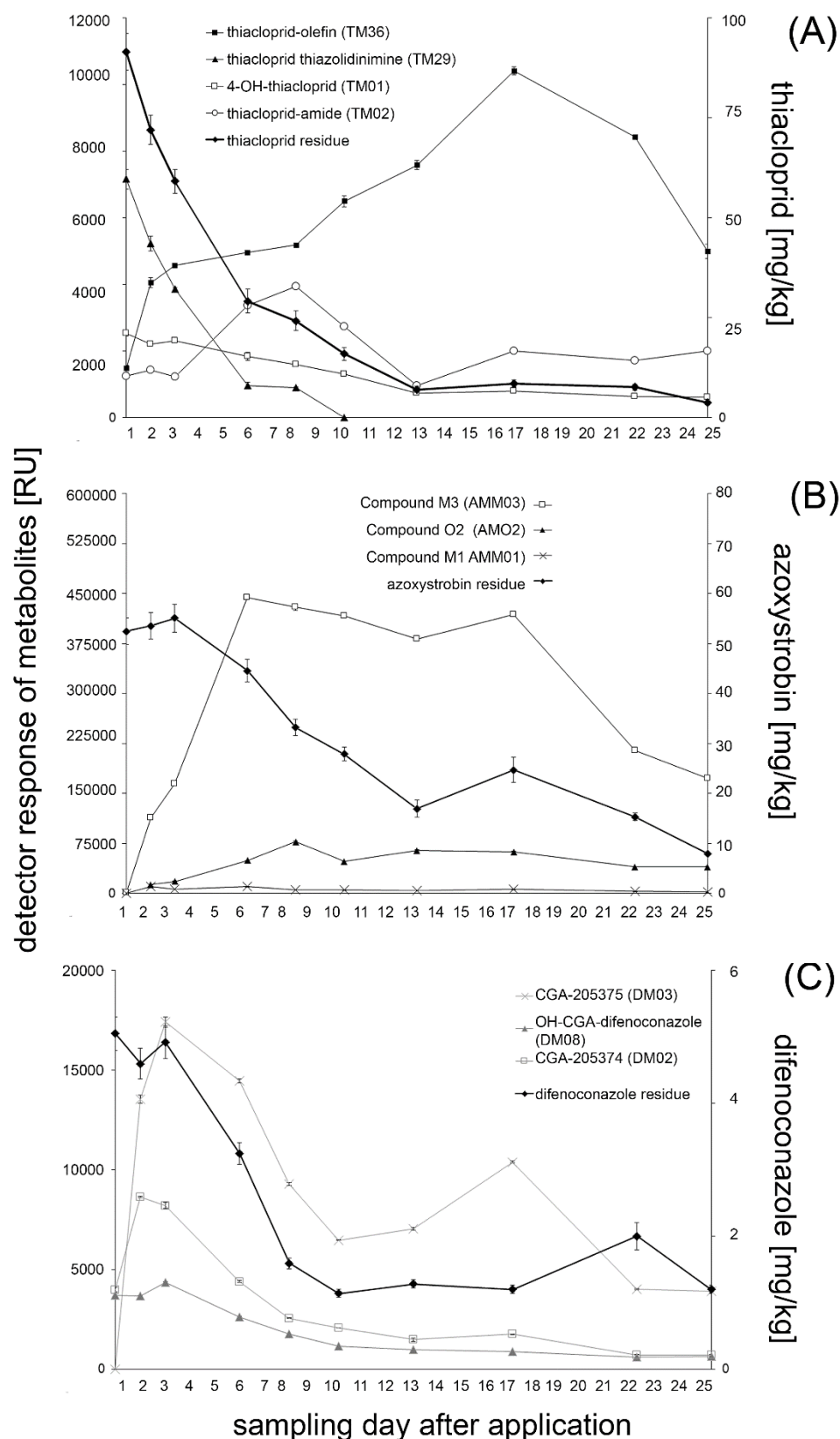


Figure 3. Degradation and biotransformation kinetics of thiacloprid (A), azoxystrobin (B), difenoconazole (C) and their corresponding metabolites (representative) in pak choi leaves. The error bars indicate the standard deviation ($n = 3$).

A thiacloprid-*O*-analogue (oxazolidine) (TM16) was also detected at a concentration of 0.006 mg/kg at the beginning and 0.003 mg/kg after 25 days. TM16 is a metabolite of TM26, and its formation is dependent on a ring scission reaction. Therefore, these metabolites are in an equilibrium state between the cyclization step but were not observed during this study. In contrast to the distribution study, the metabolites 6-CP-glucoside (TM04) and thiacloprid thiazolidinimine (TM29) were not detected in the kinetics study. The variability of metabolite fingerprints in the two different trials may result from the fact, that the experiments of the individual trials were conducted from August to September in two different years 2014 and 2016. So, it cannot be excluded, that even under greenhouse conditions, differences in temperature and radiation potentially exerted an influence on the metabolism speed in pak choi plants since the same harmonized protocols for the application of plant protection products, the harvest intervals, the dissection of the plants, the sample homogenization, the measurement of extracts and the data evaluation were applied for both individual studies. The metabolites determined in this study were consistent with the results published by Simon-Delso et al. for the common thiacloprid metabolites, the hydroxylated acetamide TM37 and the thiazole derivative TM38 in spinach, where metabolic reactions included cyano group hydrolysis, thiazolidine hydroxylation, olefin formation and ring scission [35, 36].

In summary in pak choi leaves at final harvest date (relating to the marketable product) the thiacloprid metabolites TM02 and TM16 were quantified with 0.027 and 0.003 mg/kg, respectively. The actual maximum residue level (MRL) for thiacloprid in pak choi according to REGULATION (EC) NO 396/2005 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL, amended by COMMISSION REGULATION (EU) No 752/2014 is set to 1 mg/kg just for the active compound according to residue definition. The amount of the active compound thiacloprid was quantified in pak choi leaves with 3.8 mg/kg at final harvest date.

In case, metabolites TM02 and TM16 would be included in a future residue definition for thiacloprid, the theoretically calculated value would be 3.8 mg/kg + 0.029 mg/kg + 0.003 mg/kg expressed as thiacloprid. TM37 was observed in the course of the kinetic study but was not detected at final harvest and therefore not included in this calculation.

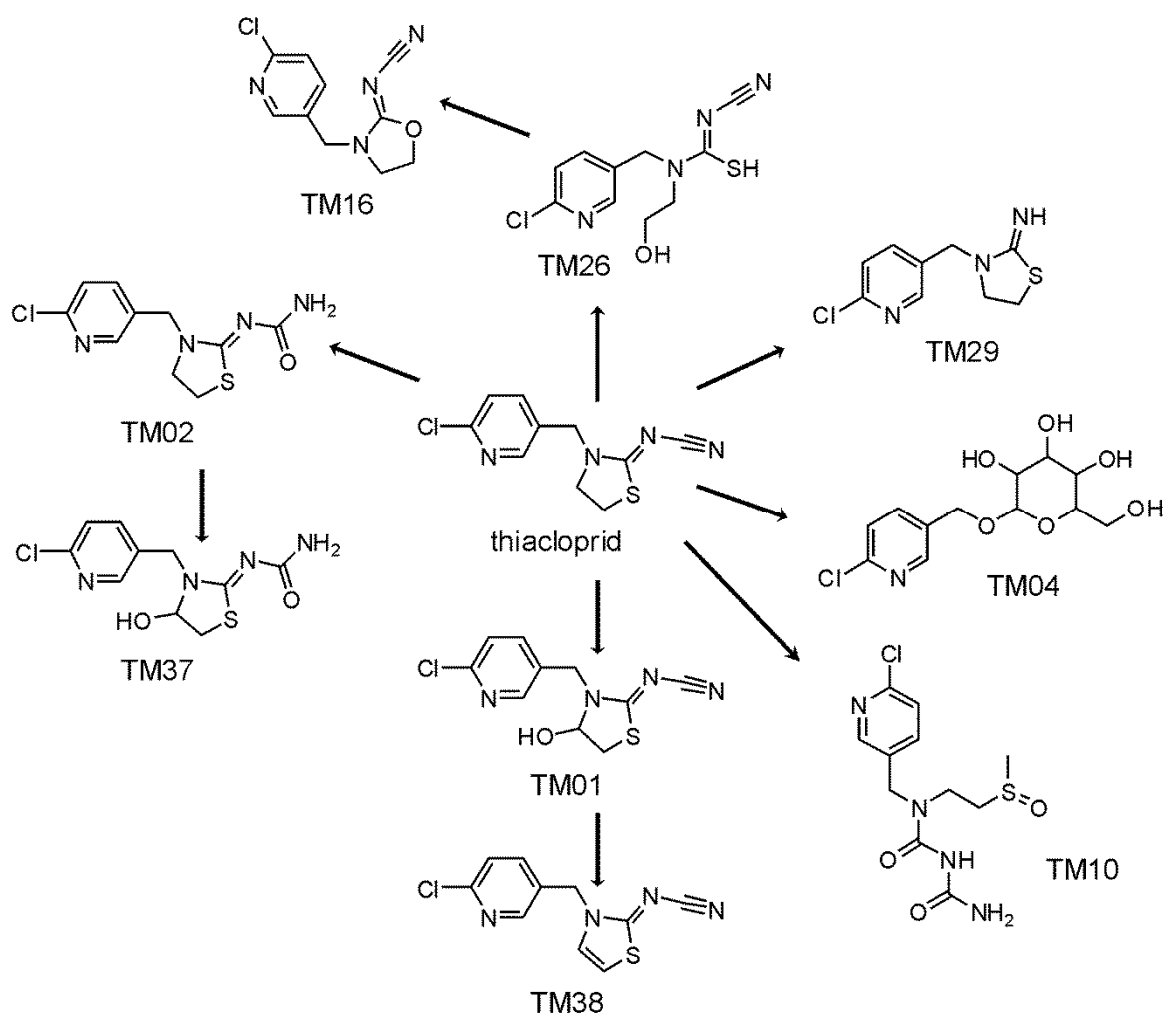


Figure 4. Schematic metabolic pathways for thiacloprid in broccoli and pak choi samples modified according to [31].

Example chromatograms recorded in the course of the quantification process of the active compound thiacloprid and its metabolite TM16 are given in **Figure S-4** and **S-5**, respectively. In **Table S-2** validation data for the determination of the active compounds thiacloprid, azoxystrobin, difenoconazole and the thiacloprid metabolites TM02, TM16 and TM37 are given.

The schematic metabolic pathway for thiacloprid hypothesized from the results of the distribution and kinetics studies is shown in **Figure 4**. As mentioned above, thiacloprid is metabolized by a hydration step at the thiazolidine ring resulting in metabolites TM01 and TM16, or by a substitution of the nitrile group (TM02), followed by a hydroxylation (TM37) and an elimination (TM38) step. The 6-chloropyridine ring moiety (the exact mass of monoisotopic 6-CP is 126.0105 m/z) of thiacloprid was not metabolized, which is the common fragment in a degradation-fragmentation relationship as 126.0105 m/z [23].

In the present study for **azoxystrobin** mainly phase II metabolites were detected. Six metabolites were glycosylated and two additionally esterified with malonic acid: Five identified metabolites of azoxystrobin were phase I metabolites. The degradation kinetics of azoxystrobin and formation of representative metabolites is shown in **Figure 3B**. The residue level after 6 h after the application was 52.4 mg/kg azoxystrobin in pak choi leaves. In total, it was reduced by 85% to 8.0 mg/kg within the next 25 days.

Similar to the distribution study, the main metabolite was AMM03, a glucose conjugate of azoxystrobin. The concentration of AMM03 increased, reached a certain plateau and declined till the final harvest after 25 days. The azoxystrobin metabolites detected were in agreement with the distribution study.

The more simple, minor conjugates with glucose AMM01 and AMN1 as well as the esterified metabolites AMO1, AMM02 and AMO2 were present only in low concentrations and exerted a similar kinetics behaviour with a small increase in the first two days, reaching a plateau, and a continuous decrease till the final harvest at day 25 (**Figure 3B**). The levels of non-conjugated phase I metabolites AMU6, AMMU3/35, AMC24, and AMC21 decreased continuously like AMM01.

The biotransformation pathway of azoxystrobin presented in **Figure 5** summarizes two main groups separated in conjugated phase II metabolites and initially activated phase I metabolites, mostly formed by dealkylation reactions.

Characteristic for the glucosylated compounds of azoxystrobin was a neutral loss of a glucose molecule (-162.0528 Da) [37] in *HDMS^E* spectra. Compared to the study done by [38], in the present study a similarly high abundance of conjugated and esterified azoxystrobin metabolites was detected. *O*-(Malonyl)- β -D-glucoside conjugates often formed in plants can be regarded as equivalents to the mammalian β -D-glucuronides [39]. The *O*-(malonyl)glucosides are difficult to isolate due to their chemical lability. Thus, it could also be possible that the β -D-glucosides reported here may actually exist in a malonylated form as reported previously [33].

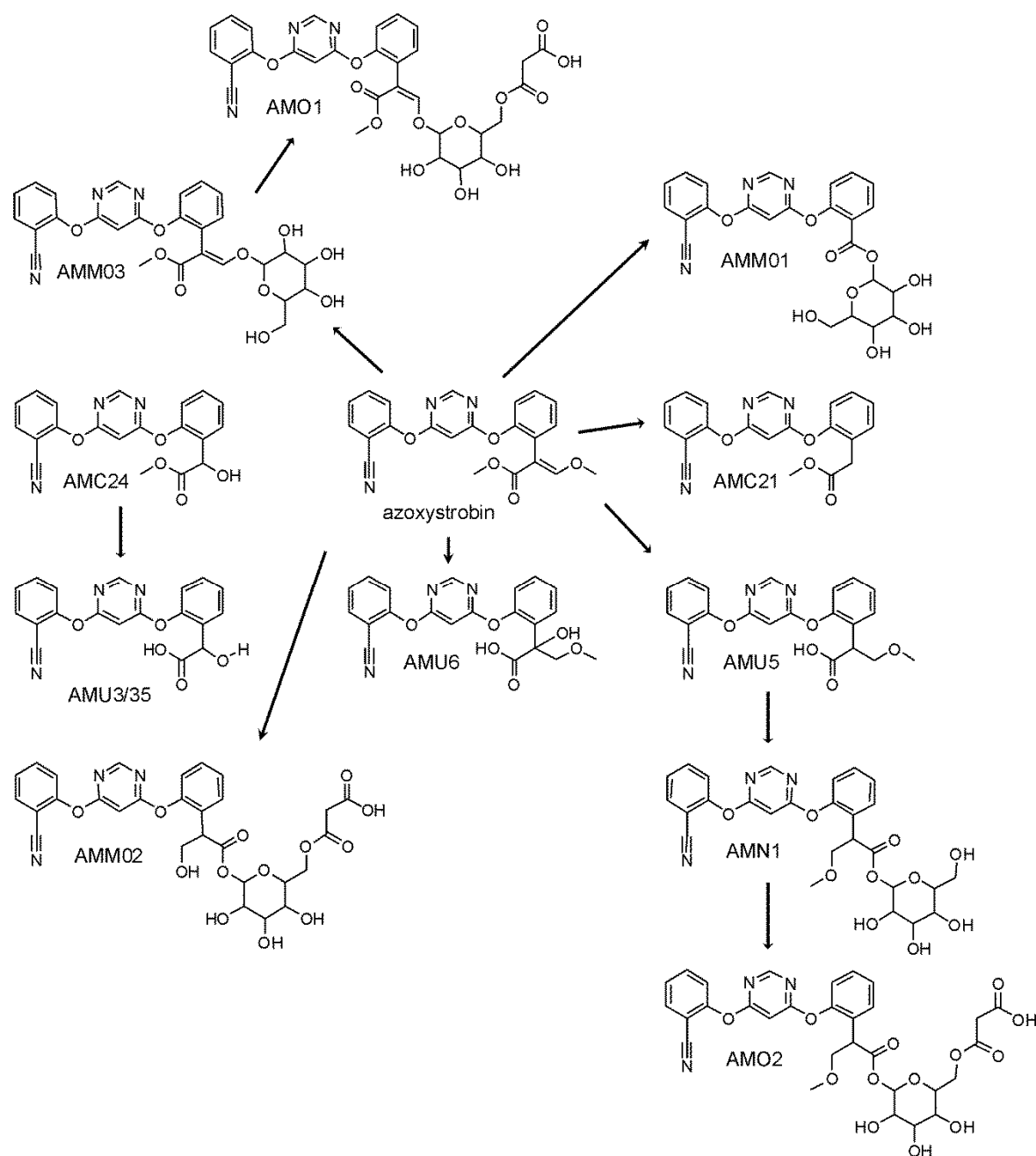


Figure 5. Biotransformation reactions of azoxystrobin in pak choi and broccoli samples, modified according to [29].

The degradation kinetics of difenoconazole revealed a decrease from initially 5.0 mg/kg to 1.2 mg/kg active compound after 25 days in pak choi leaves (**Figure. 3C**). After six hours of incubation, the three detected metabolites showed a nearly logarithmic decreasing behavior in analogy to their precursor difenoconazole. In the degradation pathway (**Figure S-1**) a transformation at the dioxolan ring of difenoconazole, which is hydrolyzed (MD03) and oxidized (MD02) is illustrated. Compared to the distribution study, in the kinetics study a new metabolite, the

hydroxy-CGA-difenoconazole (DM08), was detected. [40]) described for cucumber and tomato fruits CGA-205375 (DM03) as a major metabolite, which was consistent with the results in pak choi obtained in the present study.

Overall, for all three active pesticide compounds a very rapid metabolism was observed in the leaves. Metabolites of thiacloprid, azoxystrobin, and difenoconazole were detectable 6 hours after the application of the plant protection product. The concentrations of the thiacloprid metabolite TM38 in **Figure 3A** and the azoxystrobin metabolite AMM03 in **Figure 3B** were highly increased and displayed maxima after nearly two weeks before continuously decreasing until the final harvest after 25 days. In general, after two weeks the metabolites reached a plateau and decreased comparably with the parent compounds. For a few compounds like TM02 of thiacloprid in **Figure 3A** or DM02 of difenoconazole in **Figure 3C** stable concentration levels till final harvest were obtained, thus revealing suitability as marker compounds for a monitoring purpose in metabolite screening approaches.

As opposed to thiacloprid, the active compound azoxystrobin was transformed to a wide spectrum of phase II metabolites with high proportion of glycosylated and esterified species. In comparison to azoxystrobin thiacloprid was mainly degraded to a spectrum of different phase I metabolites. In contrast to other pesticides, difenoconazole was transformed to a few phase I metabolites detected in the presented studies probably due to the lack of amenability of other difenoconazole metabolites to the detection technique applied or poor metabolism of the active compound in pak choi.

3.4 Distribution and characterization of pesticide metabolites in broccoli

The broccoli treatment was accomplished in the growth period, prior to formation of the edible part (broccoli head) in order to detect possible relocation of metabolites. Distribution of azoxystrobin metabolites for broccoli is shown in **Figure S-2**. Azoxystrobin was detected in the broccoli head below RL < 0.010 mg/kg (0.001 mg/kg). The highest residue level of the active compound was found in leaves with 0.07 mg/kg and roots with 0.04 mg/kg and 0.01 mg/kg in stem. The main metabolite the glucosylated Compound M3 (AMM03) was detected in all plant organs and predominantly in broccoli heads. The presented results may indicate that the formation of AMM03 occurred in the leaves and then AMM03 probably was distributed into the whole plant. Although treatment on broccoli was applied prior to

broccoli head formation, a glucosylated metabolite was found after harvest in the head. Likely, the deposition into the roots serves for reasons of storage or withdrawal of the compounds [38]. Besides AMM03, compound O1 and O2 (AMMO1 and AMMO2) were detected, both glucosides comprising an additional esterification with malonic acid, which has been reported to be the storage form in plants [33]. Furthermore, Compound 24 (AMC24), a non-conjugated metabolite formed by ether cleavage, was observed in broccoli leaves.

In **Figure S-3A** the distribution of thiacloprid in the broccoli plant organs is presented. In the head, the residue were < 0.010 mg/kg reporting level (RL). In leaves 0.003 mg/kg, in stems 0.001 mg/kg and roots 0.001 mg/kg of thiacloprid were detected. Metabolites were only observed in leaves, namely the conjugated TM04, TMO02 and the main metabolite, the carbamoyl urea TM10.

In comparison to pak choi, the distinctly higher biomass production of broccoli plants resulted in a two-week longer pre-harvest interval (PHI). On this occasion, the residue levels and metabolite variety in broccoli decreased supposedly in relation to plant biomass and growing phase. Although the broccoli head formation occurred after the treatment, still traces of thiacloprid were found, but no thiacloprid metabolite was detected in the broccoli head.

No residue of difenoconazole was detected in broccoli heads. In leaves 0.02 mg/kg, in the stem under RL (0.002 mg/kg) and in roots 0.02 mg/kg of difenoconazole were present. Again, in stems the lowest residue level was quantified as for all pesticides reported here in pak choi and broccoli. Nevertheless, CGA 20575 (DM03) a hydrolyzed difenoconazole metabolite was observed in leaves and a fivefold smaller amount in roots (as shown in **Figure S-3B**).

In sum, the detected variety of metabolites was smaller in broccoli than in pak choi. Due to the more developed wax layer on the cuticle of broccoli leaves than in pak choi leaves [41], the active compounds in the applied amount of formulation on broccoli probably did not enter the plant tissue as effectively as compared to pak choi, thus, leading to smaller amounts of the active compound as well as metabolites. The detected phase II glucoside conjugate AMM03 metabolite in broccoli head is a masked storage form which is recommended to be monitored in the marketed product next to the active compound. For this metabolite, a delocalization event inside the plant to the eatable part of broccoli can be assumed. Furthermore, AMM03 was found to be a potential marker proving a pesticide application.

4. Conclusions

The HRMS tools combined with the TWIMS analytical technique enabled the detection of the occurrence of pesticide metabolites in a study with the *Brassica* crops pak choi and broccoli.

The metabolite screening approach revealed individual metabolite formation and degradation pathways of all three pesticides during the kinetic study besides the degradation of the parent compounds. Especially thiacloprid and azoxystrobin were transformed to a high variety of metabolites in all three studies. Finally, almost each of the pesticides formed a high diversity of phase I and II metabolites, which can be detected by the means of complementary TWIMS and HRMS techniques. All of the data obtained from this study of the nature and amount of the metabolic products in the three pesticides provide valuable and new information on the presence and distribution of their residues and their related compounds in pak choi and broccoli during the pre-harvest intervals to harvest. This is particularly important, as it permits an evaluation of the potential risk associated with the consumption of agricultural products.

The presented screening method applied in this study provides a suspect screening approach for monitoring of the real impact of applied pesticides in plant and food samples. These metabolites are usually not detected in routine analysis, as the targeted approaches applied exclusively include predefined legally-relevant pesticide metabolites besides active compounds. The metabolite suspect screening approach may give a potent tool for the disclosure of illegal pesticide use, especially in organic food as the positive finding of pesticide metabolites can be used as indirect evidence for the use of plant protection products even if the active compound is not detectable any more. Furthermore, the suspect screening approach will enable to provide a targeted approach for previously screened metabolites by the means of reference standard compounds.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge Federal Office of Consumer Protection and Food Safety (BVL), Berlin for providing the metabolite reference standards. Further, the excellent technical help of Mrs. Elke Büsch is gratefully acknowledged.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical Approval This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

Appendix

Supplementary material

Table S-1: IUPAC names for detected pesticides and metabolites.

Table S-2: Validation data for the quantification of active compounds and thiacloprid metabolites in pak choi.

Figure S-1: Mechanistic biotransformation reactions of difenoconazole in the *Brassica* crops of the present study, modified according to (EFSA, 2007).

Figure S-2: Distribution of azoxystrobin metabolites in broccoli plant compartments.

Figure S-3: Distribution of thiacloprid metabolites (A) and difenoconazole metabolites (B) in broccoli plant compartments.

Figure S-4: Quantification of thiacloprid in Pak choi. A) blank sample, B) blank sample spiked with 10 mg/kg thiacloprid, C) blank sample spiked with 100 mg/kg thiacloprid, D) treated sample of day 2 from the kinetic study.

Figure S-5: Quantification of thiacloprid metabolite TM16 in Pak choi. A) treated sample of day 1 from the kinetic study, B) blank sample spiked with 0.100 mg/kg TM16, C) solvent standard of TM16 with 0.001 mg/mL

5. References

- [1] www.bvl.bund.de/psmstatistiken (last time accessed: January 23, 2017).
- [2] Bletsou A. A., Jeon J., Hollender J., Archontaki E., Thomaidis N. S., Targeted and non-targeted liquid chromatography-mass spectrometric workflows for

identification of transformation products of emerging pollutants in the aquatic environment. *TrAC* 2015, 66, 32–44.

[3] López A., Yusa V., Millet M., Coscolla C., Retrospective screening of pesticide metabolites in ambient air using liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. *Talanta* 2016, 150, 27–36.

[4] Hernández F., Sancho J. V., Ibáñez M., Grimalt S., Investigation of pesticide metabolites in food and water by lc-tof-ms. *TrAC* 2008, 27, 862–872.

[5] Dekant W., Melching-Kollmuss S., Kalberlah F., Toxicity assessment strategies, data requirements, and risk assessment approaches to derive health based guidance values for non-relevant metabolites of plant protection products. *Regul Toxicol Pharmacol* 2010, 56, 135–142.

[6] Botitsi H. V., Garbis S. D., Economou A., Tsipi D. F., Current mass spectrometry strategies for the analysis of pesticides and their metabolites in food and water matrices. *Mass Spectrom Rev* 2011, 30, 907–939.

[7] Thurman E. M., Ferrer I., Zavitsanos P., Zweigenbaum J. A., Identification of imidacloprid metabolites in onion (*allium cepa* L.) using high-resolution mass spectrometry and accurate mass tools. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2013, 27, 1891–1903.

[8] Ujma J., Giles K., Morris M., Barran P. E., New high resolution ion mobility mass spectrometer capable of measurements of collision cross sections from 150 to 520 k. *Anal Chem* 2016, 88, 9469–9478.

[9] Goscinny S., Joly L., Pauw E. de, Hanot V., Eppe G., Travelling-wave ion mobility time-of-flight mass spectrometry as an alternative strategy for screening of multi-class pesticides in fruits and vegetables. *J Chromatogr A* 2015, 1405, 85–93.

[10] Paglia G., Kliman M., Claude E., Geromanos S., Astarita G., Applications of ion-mobility mass spectrometry for lipid analysis. *Anal Bioanal Chem* 2015, 407, 4995–5007.

[11] Aceña J., Heuett N., Gardinali P., Pérez S., Suspect screening of pharmaceuticals and related bioactive compounds, their metabolites and their transformation products in the aquatic environment, biota and humans using lc-hr-ms techniques. 2016, 71, 357–378.

[12] Storck V., Lucini L., Mamy L., Ferrari F., Papadopoulou E. S., Nikolaki S., Karas P. A., Servien R., Karpouzas D. G., Trevisan M., Benoit P., Martin-Laurent F., Identification and characterization of tebuconazole transformation products in soil by

combining suspect screening and molecular typology. *Environ Pollut* 2016, 208, 537–545.

[13] Milman B. L., General principles of identification by mass spectrometry. *TrAC* 2015, 69, 24–33.

[14] Sánchez-Hernández L., Hernández-Domínguez D., Martín M. T., Nozal M. J., Higes M., Bernal Yagüe J. L., Residues of neonicotinoids and their metabolites in honey and pollen from sunflower and maize seed dressing crops. *J Chromatogr A* 2016, 1428, 220–227.

[15] Seifrtova M., Halesova T., Sulcova K., Riddellova K., Erban T., Distributions of imidacloprid, imidacloprid-olefin and imidacloprid-urea in green plant tissues and roots of rapeseed (*brassica napus*) from artificially contaminated potting soil. *Pest Manag Sci* 2016.

[16] http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Report09/Carbofuran.pdf (last time accessed: January 23, 2017).

[17] Jabot C., Daniele G., Giroud B., Tchamitchian S., Belzunces L. P., Casabianca H., Vulliet E., Detection and quantification of boscalid and its metabolites in honeybees. *Chemosphere* 2016, 156, 245–251.

[18] <https://www.syngenta.de/pflanzenschutz/fungizid/askon> (last time accessed: January 23, 2017).

[19] <https://agrar.bayer.de/de-DE/Produkte/Pflanzenschutzmittel/Produkte%20A-/Calypso/Schnellinformation.aspx> (last time accessed: January 23, 2017).

[20] López M. G., Fussell R. J., Stead S. L., Roberts D., McCullagh M., Rao R., Evaluation and validation of an accurate mass screening method for the analysis of pesticides in fruits and vegetables using liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometry with automated detection. *J Chromatogr A* 2014, 1373, 40–50.

[21] European Commission, Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. 2015.

[22] Pramanik B. N., Chen G., Lee M. S., Characterization of impurities and degradants using mass spectrometry. 2011.

[23] Ferrer I., García-Reyes J. F., Mezcua M., Thurman E. M., Fernández-Alba A. R., Multi-residue pesticide analysis in fruits and vegetables by liquid

chromatography–time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2005, 1082, 81–90.

[24] Ferrer I., Thurman E. M., Fernández-Alba A. R., Quantitation and accurate mass analysis of pesticides in vegetables by lc/tof-ms. *Anal Chem* 2005, 77, 2818–2825.

[25] Obana H., Okihashi M., Akutsu K., Kitagawa Y., Hori S., Determination of neonicotinoid pesticide residues in vegetables and fruits with solid phase extraction and liquid chromatography mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 2003, 51, 2501–2505.

[26] García-Reyes J. F., Molina-Díaz A., Fernández-Alba A. R., Identification of pesticide transformation products in food by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry via "fragmentation-degradation" relationships. *Anal Chem* 2007, 79, 307–321.

[27] Stephan S., Hippler J., Kohler T., Deeb A. A., Schmidt T. C., Schmitz O. J., Contaminant screening of wastewater with hplc-im-qtof-ms and lc+lc-im-qtof-ms using a ccs database. *Anal Bioanal Chem* 2016, 408, 6545–6555.

[28] Schymanski E. L., Jeon J., Gulde R., Fenner K., Ruff M., Singer H. P., Hollender J., Identifying small molecules via high resolution mass spectrometry: Communicating confidence. *Environ Sci Technol* 2014, 48, 2097–2098.

[29] EFSA, European food safety authority - provision of documents (07/08/2009) assessment report azoxystrobin, UK. 2009.

[30] <http://dar.efsa.europa.eu/dar-web/provision> (last time accessed: January 23, 2017).

[31] http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/valuation06/Thiacloprid06.pdf (last time accessed: January 23, 2017).

[32] Abdel-Ghany M. F., Hussein L. A., El Azab N. F., El-Khatib A. H., Linscheid M. W., Simultaneous determination of eight neonicotinoid insecticide residues and two primary metabolites in cucumbers and soil by liquid chromatography–tandem mass spectrometry coupled with quechers. *J Chromatogr B* 2016, 1031, 15–28.

[33] Sandermann H., Higher plant metabolism of xenobiotics: The 'green liver' concept. *Pharmacogenetics* 1994, 4, 225–241.

[34] McCutcheon S. C., Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants. Wiley-Interscience, S.I. 2003.

- [35] Simon-Delso N., Amaral-Rogers V., Belzunces L. P., Bonmatin J. M., Chagnon M., Downs C., Furlan L., Gibbons D. W., Giorio C., Girolami V., Goulson D., Kreutzweiser D. P., Krupke C. H., Liess M., Long E., McField M., Mineau P., Mitchell E. A. D., Morrissey C. A., Noome D. A., Pisa L., Settele J., Stark J. D., Tapparo A., van Dyck H., van Praagh J., Van der Sluijs, J P, Whitehorn P. R., Wiemers M., Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): Trends, uses, mode of action and metabolites. *Environ Sci Pollut Res Int* 2015, 22, 5–34.
- [36] Casida J. E., Neonicotinoid metabolism: Compounds, substituents, pathways, enzymes, organisms, and relevance. *J Agric Food Chem* 2011, 59, 2923–2931.
- [37] Levsen K., Schiebel H.-M., Behnke B., Dötzer R., Dreher W., Elend M., Thiele H., Structure elucidation of phase-ii metabolites by tandem mass spectrometry: An overview. *J Chromatogr A* 2005, 1067, 55–72.
- [38] Brooks G. T., Roberts T. R., Pesticide chemistry and bioscience: The food-environment challenge ; [the proceedings of the 9th international congress on pesticide chemistry: The food-environment challenge held at the queen elizabeth ii conference centre, westminster, London on 2 - 7 august 1998]. 1999.
- [39] Sandermann H., Musick T. J., Aschbacher P. W., Animal bioavailability of a 3,4-dichloroaniline-lignin metabolite fraction from wheat. *J Agric Food Chem* 1992, 40, 2001–2007.
- [40] Li J., Dong F., Cheng Y., Liu X., Xu J., Li Y., Chen X., Kong Z., Zheng Y., Simultaneous enantioselective determination of triazole fungicide difenoconazole and its main chiral metabolite in vegetables and soil by normal-phase high-performance liquid chromatography. *Anal Bioanal Chem* 2012, 404, 2017–2031.
- [41] Ripley B. D., Ritcey G. M., Harris C. R., Denommé M. A., Lissemore L. I., Comparative persistence of pesticides on selected cultivars of specialty vegetables. *J Agric Food Chem* 2003, 51, 1328–1335.

4.3 Multiscreening für suspect Pestizidmetabolite in pflanzlichen Lebensmitteln mittels TWIMS-QToF-MS (Publikation III)

Development of a suspect screening strategy for pesticide metabolites in fruit and vegetables by UPLC-QToF-MS

Anna Bauer^a, Jens Luetjohann^{a*}, Sascha Rohn^c, Eckard Jantzen^a, Jürgen Kuballa^a

^a*Research and Development Department, GALAB Laboratories GmbH, Am Schleusengraben 7, 21029 Hamburg, Germany*

^b*Institute of Food Chemistry, Hamburg School of Food Science, University of Hamburg, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany*

Ziel der Arbeit war es, eine Methode für ein kombiniertes *Metaboliten-* und *Pestizidscreening* zu entwickeln. Hierfür wurde die vorab entwickelte Methode zur Metabolitenidentifizierung (3.2 Publikation II) angewendet und eine Datenbank mit möglichen Metaboliten aufgebaut.

Die Studie wurde bei GALAB Laboratories GmbH im Zeitraum von April bis September 2016 durchgeführt. Hierzu wurden saisonale, kommerzielle Proben ausgewählt, die einen hohen Anteil am Gesamtprobenumfang aufweisen (z.B. über 30%). Dazu wurden Daten erhoben, die ein individuelles Profil an Pestizidwirkstoffen für das jeweilige Obst und Gemüse aus den Jahren 2008-2014 beinhalteten. Anhand des Matrix-Pestizid-Profiles wurde eine Bibliothek an potenziellen Metaboliten hergestellt. Die in der Routine Pestiziduntersuchung mittels QuEChERS-Extraktion positiv getesteten Proben wurden auf mögliche Metabolite untersucht.

Der eigene Anteil an dieser Veröffentlichung wird mit 40% angegeben.

Development of a suspect screening strategy for pesticide metabolites in fruit and vegetables by UPLC-QToF-MS

Anna Bauer^a, Jens Luetjohann^{a*}, Sascha Rohn^b, Eckard Jantzen^a, Jürgen Kuballa^a

^a*Research and Development Department, GALAB Laboratories GmbH, Am Schleusengraben 7, 21029 Hamburg, Germany*

^b*Institute of Food Chemistry, Hamburg School of Food Science, University of Hamburg, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany*

Corresponding author:

Dr. Jens Luetjohann, GALAB Laboratories GmbH, Am Schleusengraben 7, 21029 Hamburg

E-mail address: jens.luetjohann@galab.de

Tel.: +4940368077432; Fax: +4940368077401.

Keywords: Pesticides, metabolites, suspect screening, LC-QTOF-MS

Abstract

A multi-pesticide metabolite screening method using liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-QToF-MS) was developed for the detection of pesticide metabolites in fruit and vegetable samples. Based on a retrospectively created accurate-mass compound database a suspect screening approach was established for pesticides of high concern applied to a wide scope of plant-derived commodities. For each matrix, an individual scope of characteristic pesticides was selected and a scientific library of corresponding metabolites generated. The metabolite database contained a total of 648 pesticide metabolites originating from 58 active compounds. In 500 samples from daily routine analysis, 96 samples with positive detects for a total of 26 pesticides were re-analyzed for the occurrence of corresponding metabolites. 47 different phase-I and phase-II metabolites were identified, respectively. The developed metabolite database can be applied for a suspect screening approach for pesticide metabolites identification in all kinds of fruits and vegetables. By the means of the results of the suspect screening

workflow a targeted screening method by UHPLC-MS/MS was established for individual pesticide metabolites. Positive detects for metabolites may give an unequivocal evidence for an illegal application of plant protection products, even if the active compound is not detectable anymore.

1. Introduction

Pesticides are applied in agricultural practice to ensure high crop yields and crop quality. They represent a large spectrum of categories of xenobiotics and are routinely determined by official food control. Once released into the environment, a pesticide may be metabolized, subsequently leading to the parallel presence of the parent compound and its metabolites with potential toxicological relevance. [1] Most of the analytical studies from literature focus on a limited number of molecules with a predefined scope including legally-relevant metabolites in a targeted mode and the compounds of interest were calibrated by the means of analytical standards. [2] Monitoring-driven metabolite screening approaches, re-evaluation of the environmental risk assessment by official authorities such as the *European Food Safety Authority for Europe* (EFSA) with regard to plant protection products, and the actual residue situation of pesticides lead to the inclusion of more and more pesticide metabolites into the respective residue definitions and setting of maximum residue-levels (MRLs). [3, 1] Also the lack of knowledge about the type of pesticide metabolites generated in particular plants and the environment, and their physicochemical properties lead to limitations in covering the full extent of the impact of pesticides and corresponding metabolites. As metabolites have not been considered comprehensively so far, an inclusion of the metabolites into the residue definition of a precursor pesticide has not taken place, consequently. [1]

Liquid chromatography (LC) coupled with high resolution mass spectrometry (e.g., quadrupole time-of-flight mass spectrometry) enables the acquisition of an unlimited number of pesticides species and their metabolites by means of accurate mass measurements (< 5 ppm mass error) combined with high resolving power (> 20 k FWHM). [4] There are major advantages of HRMS with data acquisition in MS^E mode using electrospray ionization (ESI). With this mode, acquisition is carried out via two channels by application of different collision energy levels in parallel: in the first channel, a low collision energy is applied in the range of 4 to 6 eV. With these conditions, compound adducts or precursor ions are obtained, exclusively. In the

second channel, the recording is accomplished at elevated collision energy levels in the range of e.g. 10 – 45 eV by ramping leading to an effective formation of fragment ions. In MS^E mode, the recording of parent molecules and fragments is conducted in one run. In case of a suspect screening, no optimization of mass spectrometric parameters is required applying MS^E mode. For a retrospective analysis of the measurement data, the posterior detection of any ionizable compound in a sample is theoretically manageable. [4, 1] Lopez et al. presented a suspect screening approach of pesticide metabolites in ambient air samples using an identification workflow without reference standard compounds. [5] Moschet et al. described an approach for solving the dilemma of missing reference standards, especially for the identification of metabolites and transformation products in a suspect screening. [6] Only few exemplary model studies based on selected plants and pesticides investigating a potential metabolite formation have been conducted [4, 7, 8] Principally, it can be stated that there is a need for a global overview of pesticide metabolites in fruits and vegetables.

The degradation of pesticides in plants has been widely described in literature, and similarly to the degradation pathways in mammals, it can be subclassified into different phases of metabolism. In brief, a phase-I reaction implies an activation of the molecule and in a second reaction (phase-II) compounds are conjugated with endogenous molecules to increase their polarity for decreasing their toxicity. In contrast to mammals, an additional phase-III reaction aims at compartmentalization, e.g., into the vacuole or by covalent binding to structural molecules, whereas in mammals, metabolites are eliminated by excretion. [9, 10] Likewise, in a recent paper, we described a model study with focus on the characterization of metabolite formation of the insecticide thiacloprid and the fungicides azoxystrobin and difenoconazole in the model plants pak choi and broccoli accomplished by the means of a LC-HRMS methodology. [11]

In the present study, an application strategy for retrospective screening analysis of pesticide metabolites in different plant-derived commodities was introduced. For this purpose, a suspect screening approach has been developed for pesticide residues and possible metabolites for verifying the application of a plant protection product (ppp). Fifty-eight pesticides with 648 metabolites (suspects) were monitored at hand of a scientific compound database. For proving applicability of this approach, a total of 500 selected fruit and vegetable samples has been taken into account and

extracted according to a QuEChERS protocol. Samples with positive pesticide detects were used to be re-extracted with methanol due to the presumed higher polarity of potential pesticide metabolites and re-analyzed by UPLC-QToF-MS according to the protocol earlier established in our group. [11]

2. Material and methods

2.1 Chemicals

Reference standards of pesticides and pesticide metabolites were purchased from Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany). Triphenyl phosphate (purity 99%) was a kind gift from Bayer Pharma AG (Leverkusen, Germany). Stock solutions were prepared in acetonitrile and stored at -20 °C. Methanol (MeOH), acetonitrile, and water were purchased from Lab Scan Ltd. (Dublin, Ireland) and Waters Corp. (Milford, MA, USA). Ammonium acetate solution used as eluent modifier in the UPLC step, and leucine enkephalin were purchased from Waters Corp. (Milford, MA).

2.2 Sample selection

A representative overview of the commodities of interest and the respective pesticide-matrix-scope are presented in **Tables S-1 and S-2** in the supplementary section. 500 samples comprising selected matrices, as part of a daily routine pesticide analysis, were seasonal fruits and vegetables collected in the period from April till August 2016. In total, 96 samples giving positive detects for active compounds were analyzed for further investigation. The sample commodities consisted of 13 grapes, 10 tomato, 13 apple, 9 red and green pepper, 8 banana, 14 strawberry, 3 cherry, 7 grapefruit, 4 raspberry, 5 orange, 4 apricot, 5 pear, and 1 vine leaves samples. Primarily, each sample was analyzed in a targeted routine pesticide analysis. In case of a positive detect, including pesticides at trace residue levels of < 0.010 mg/kg, the extraction of the sample was repeated and measured in comparison to a blank commodity extract for pesticides and their metabolites by UPLC-ESI-QToF-MS.

2.3 Sample preparation for suspect screening of pesticide metabolites

The 96 samples with positive findings of pesticides were re-extracted according to the following protocol. The sample homogenates were cryomilled (Grindomix GM 200, Retsch GmbH, Haan, Germany) with dry ice. Extraction of the pesticides and

their corresponding metabolites was performed with 10 g of a homogenized sample and 10 mL extraction solvent (methanol and water, 50:50, v/v) in a polypropylene centrifuge tube. Samples were shaken thoroughly for 5 min using a mechanical shaker (AGIA 2000, Collomix Rühr- und Mischgeräte GmbH, Gaimersheim, Germany), followed by a subsequent centrifugation step (3846 x g for 5 min; Multifuge X3 benchtop centrifuge; Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Germany). Afterwards, a 1 mL aliquot of the supernatant was diluted to 10 mL with LC-grade water. Then, the pesticides and metabolites were enriched by solid phase extraction of the diluted sample extract. Oasis® HLB 3cc (60 mg) SPE cartridges were pre-conditioned with 5 mL of MeOH and 5 mL water. After loading with the samples, the cartridge was dried with a gentle stream of nitrogen for approximately 10 min and eluted with 3 mL of MeOH under vacuum (400 mbar). Then the supernatant was mixed with 20 µL of a triphenyl phosphate solution (5 µg/mL in methanol/water, 50/50, v/v) as an internal standard. The extract was evaporated under a gentle stream of nitrogen at 40 °C to 0.5 mL and adjusted to a final volume of 1 mL with MeOH:H₂O (1:1, v/v) and passed through a 0.2 µm syringe filter (regenerated cellulose CHROMAFIL® Xtra RC-20/25, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany). The final concentration of the internal standard was 100 ng/mL.

2.4 UPLC-ESI-QToF mass spectrometry for the suspect screening of pesticide metabolites

A UPLC system (ACQUITY UPLC I-CLASS, Waters Corporation., Milford, MA, USA) connected to a quadrupole time-of-flight mass spectrometer equipped with a StepWave off-axis ion source through an electron spray interface (VION QToF, Waters Corp., Milford, MA, USA) was used for the study. Sample separation was performed using an ACQUITY UPLC BEH C18 Column, 130Å, 1.7 µm, 2.1 mm x 100 mm, a gradient consisting of solvent A (10 mM ammonium acetate pH 5 in water) and solvent B (10 mM ammonium acetate pH 5 in methanol) as follows: (i) 0.00 min (A:B, 98:2, v/v) (ii) 0.25 min (A:B, 98:2, v/v), (iii) 12.25 min (A:B, 1:99, v/v), (iv) 13.00 min (A:B, 1:99, v/v), (v) 13.01 (A:B, 98:2, v/v), (vi) 17.00 (A:B, 98-2, v/v), and a flow rate of 0.45 mL/min. The injection volume was set to 3 µL and the column temperature was held at 45 °C. The electrospray ionization (ESI) source was operated in positive ionization and sensitivity analyzer mode. Depending on the optimal sensitivity of the

compounds, the capillary voltage was set to 1.0 kV and sample cone voltage to 40 V. Nitrogen was used as nebulizer (flow rate at 50 L/h) and desolvation gas (flow rate at 1000 L/h). The desolvation temperature was set to 550 °C and source temperature to 120 °C. Method conditions were according to the corresponding application note (Waters Corp., Milford, MA, USA) for developing a specific compound library in the present study [2]. Spectral data were acquired in a mass range of m/z 50-1000 using full scan and high definition mass spectrometer elevated experiment mode ($HDMS^E$) with an acquisition speed of 5 scans/s. The MS^E method was configured to alternate between two collision energy conditions in order to obtain molecular (H^+ , Na^+ , K^+ , NH_4^+ adducts) and fragment ions. The low energy (LE) spectrum was recorded at low collision energy (6.0 eV) to receive a spectrum containing pseudo molecular ions or adducts. The high energy (HE) spectrum was recorded with a collision energy ramp ranging from 10 to 45 eV to create a spectrum with optimal fragmentation patterns for each compound. By using the software UNIFI 1.8.1 (Waters Corp., Milford, MA, USA), an automatic time alignment of the LE and HE trace data to establish a correlation between both energy conditions was performed [5]. The resolving power was $FWHM > 40\text{ k}$ (41,203 at 556.2768 m/z). For a real time re-calibration of the mass axis, a lock mass (leucine enkephalin, 50 pg/ μ L in acetonitrile:water with 0.1% formic acid) was injected via a dual electrospray ion source interface. The reference spray at a flow rate of 10 μ L/min was introduced in pre-defined intervals of 10 s to the acquisition duty cycle with a scan time of 0.2 s. The lock mass was set to 556.2766 m/z .

2.5 UHPLC-MS/MS for the targeted analysis of pesticides and metabolites

The chromatographic system consisted of a 1290 Infinity N ultra-high performance liquid chromatography coupled to a 6495 triple quadrupole mass spectrometer (both Agilent Technologies Inc., Waldbronn, Germany). Chromatographic separation was carried out using an ACQUITY UPLC BEH Phenyl Column, 130Å, 1.7 μ m, 2.1 mm x 100 mm, kept constant at 45 °C. Sample separation was performed using an analytical ACQUITY UPLC-BEH BEH phenyl column (2.1 mm x 100 mm, i.d. 1.7 μ m), a gradient of solvent A (25 mM ammonium formate and 0.1% formic acid in water) and solvent B (0.1% formic acid in methanol) as follows: (i) 0.00 min (A:B, 98:2, v/v) (ii) 0.25 min (A:B, 98:2, v/v), (iii) 12.25 min (A:B, 1:99, v/v), (iv) 13.00 min (A:B, 1:99, v/v), (v) 13.01 (A:B, 98:2, v/v), (vi) 17.00 (A:B, 98:2, v/v), and a flow rate of 0.45

mL/min. The injection volume was set to 5 μ L. The electrospray ionization source was operated in positive ionization mode with a capillary voltage set at 3000 V and nozzle voltage of 300 V. Nitrogen was used as nebulizer (flow rate at 12 L/min) and desolvation gas (flow rate at 17 L/min). The desolvation temperature was set to 350 °C and a source temperature of 120 °C. Two multiple reaction monitoring (MRM) transitions per analyte were monitored as shown in **Table 1**.

2.6 Data analysis for the suspect screening of pesticide metabolites

Data analysis was performed with the software UNFI 1.8.1 (Waters Corp., Milford, MA, USA). Data was processed with an established scientific library containing a suspect database for a scope of 58 pesticides with 684 corresponding metabolites. The established in-house library contained information about monoisotopic masses, molecular structures, observed detection results with individually evaluated parameters such as retention time, exact masses of pseudo molecular ions, adducts, and fragments. The identification criteria were defined in accordance to the European commission document *SANTE* 11945/2015 [12]. These criteria were as follows: precision of the mass error $\pm$ 5 ppm for compound and isotopes, retention time shift $\pm$ 0.1 min, two diagnostic ions (precursor and fragment ion), delta of ion ratio $\pm$ 30%. Furthermore, the margins of the isotope match iFit were set to < 30%, which is a theoretical isotope match (zero for a perfect match to a model isotope distribution and ratio) based on the UNIFI algorithm (Waters Corp., Milford, MA, USA) [13]. Quantification of pesticides was performed by means of reference standards via matrix-matched calibration.

Data acquisition and analysis of UPLC-MS/MS measurements were performed with Mass Hunter Workstation Software V B.08.00 Build 8.0.8023.0, Agilent Technologies Inc. (Waldbronn, Germany).

The chemical structure of each metabolite was designed with ChemDraw (version 15.0.0.106, PerkinElmer Inc., Waltham USA).

3. Results and Discussion

3.1 Analytical workflow for the identification of pesticide metabolites in the suspect screening approach

Ninety-six representative fruit and vegetable samples were selected from a daily routine pesticide analysis and analyzed for a post-run targeted screening with regard

to pesticides and a suspect screening with regard to corresponding pesticide metabolites, following the analytical strategy developed in a previous study. [11]

Prior to the metabolites screening approach, a stability study focusing on pesticide degradation during sample preparation and instrumental analysis was conducted. No hints for pesticide degradation and metabolite formation during sample preparation and instrumental analysis were obtained in this study. Validation data for the identification of the initial pesticides in a wide range of plant-derived commodities at multiple concentration levels with identified metabolites were according to a previous study. [11]

A customized database was established containing 684 pesticide metabolites resulting from 58 active compounds described in different matrices such as water, plants, and mammals. Samples were collected during the spring and summer season 2016. Each entity included an elemental composition with exact (monoisotopic) mass, fragments, and retention time. Information about fragments were included for the metabolites based on means of an *in-silico* fragmentation algorithm in MS^E mode and MS/MS spectra. A method using HRMS tools for pesticide metabolites' identification was described in a previous model study with pak choi and broccoli. [11]

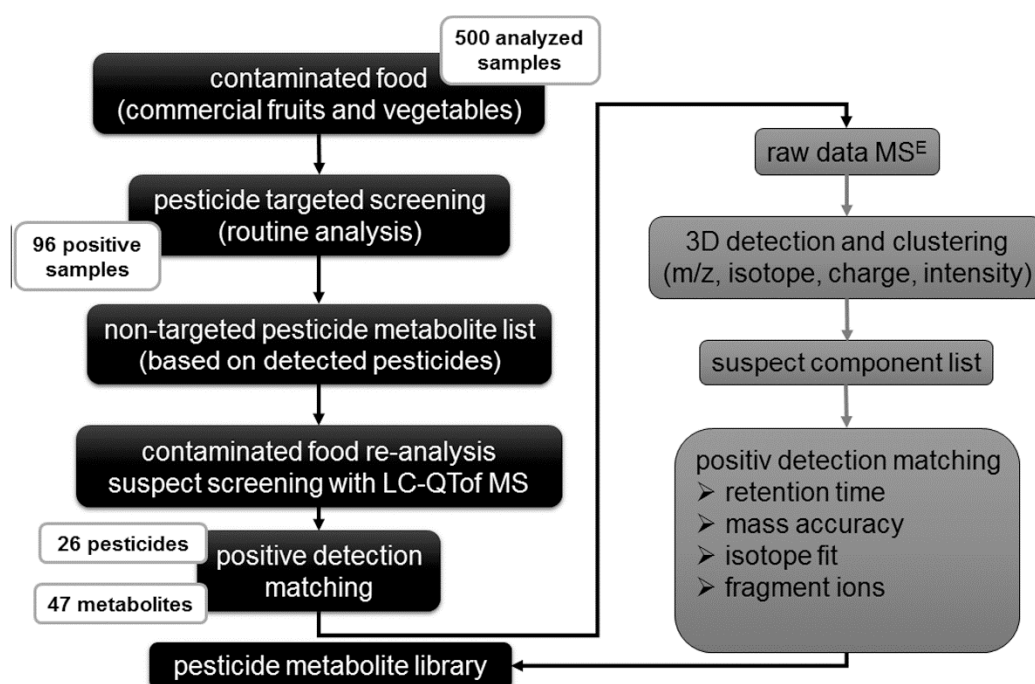


Figure 1. Pesticide metabolite screening and identification workflow.

A database search concerning the molecular and structural formulas of metabolites of relevant pesticides occurring in plants and mammals was performed on the basis of the scientific literature and approval documents. Finally, this database was used to characterize the selected samples with regard to pesticides and metabolites. An overview of the analytical workflow applied in this study is presented in **Figure 1**.

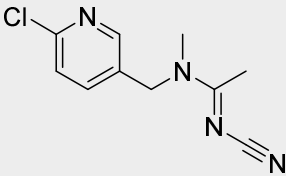
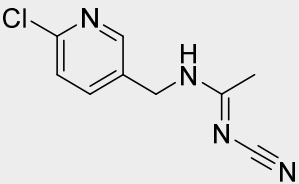
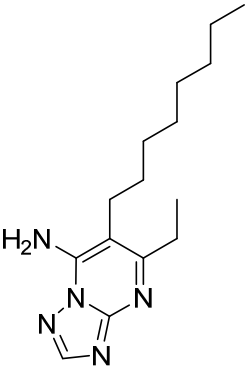
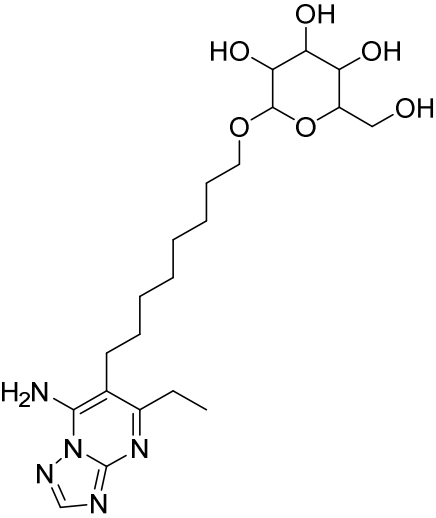
Fragments and so-called diagnostic ion searches (fragments of metabolite molecules in common with parent molecules) were performed with MS^E and MS/MS data. The identified fragments can be extracted from the total ion chromatogram of the analyzed extract. Furthermore, halogen filters for compounds containing chlorine such as fenhexamid or acetamiprid, can be used for verification of chlorine-containing compounds. In addition, glucosylated metabolites can be analyzed with a neutral loss filter, on the basis of a fragmentation reaction with the release of glucose as a neutral molecule (a loss of -162.0528 Da). [14] Furthermore, software parameters like iFit for isotope intensity and ratio (iFit < 30%) and mass error of isotope adducts were applied in the metabolite identification workflow. Retention time entries in the database for pesticide metabolites were defined as empirically observed retention times. More polar pesticide metabolites would elute significantly earlier compared to their parent molecules due to a (metabolic) polarity shift. For both, the initial pesticides and the corresponding metabolites, log *P* values (partition coefficient for *n*-octanol/water) with a measurement error of ± 0.47 as a dimension for hydrophilicity and solubility were calculated with ChemDraw as presented in **Table 1**.

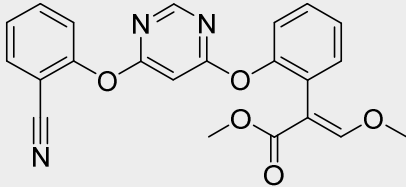
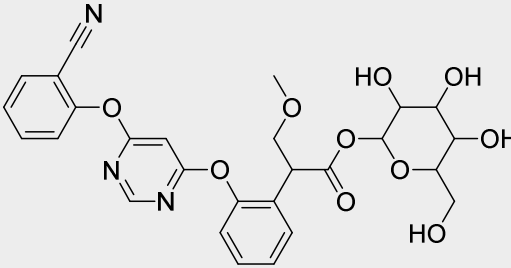
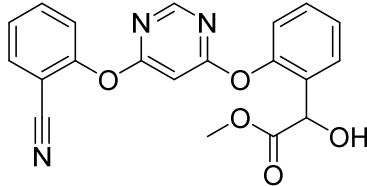
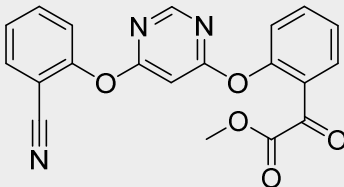
Mainly lower log *P* values were calculated for the metabolites in comparison to the parent pesticides due to the principal metabolic increase of the solubility by means of so-called phase-I reactions such as the introduction of polar functional groups, dealkylation or hydrolytic reactions. In contrast, an exception was observed for metabolite M8 of bupirimate (5-butyl-2-(ethylamino)-6-methylpyrimidin-4-ol) with a log *P* of 3.21, which was higher than the corresponding active compound bupirimate with a log *P* 3.08 as illustrated in **Table 1**. Due to a loss of the highly polar functional group of the dimethylsulfamic acid moiety, the metabolite seems to be more hydrophobic. Fenhexamid (log *P* 4.35) is another example for an increase of hydrophobicity due to metabolization reactions: its metabolite M17 (N-(2,3-dichloro-4-(3,4-dichloro-5-hydroxy-2-(1-methylcyclohexane-1-carboxamido)phenoxy)phenyl)-1-methylcyclohexane-1-carboxamide) was detected which is a dimeric molecule. For

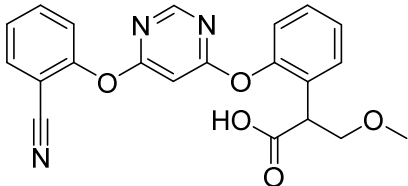
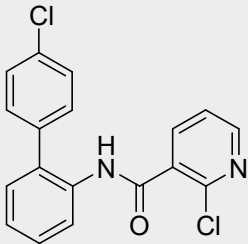
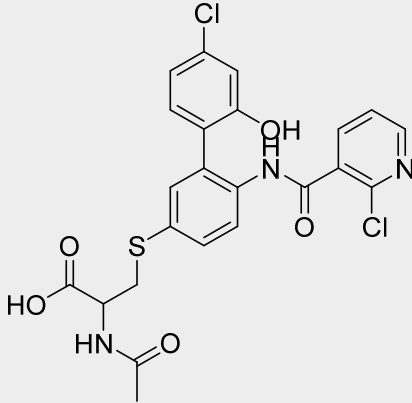
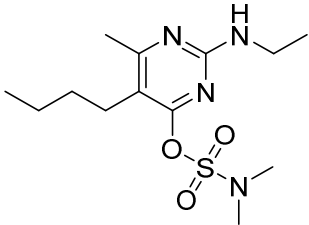
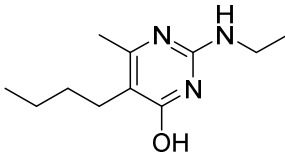
metabolite M17, a higher retention time (10.27 min vs. 9.04 min for fenhexamid) was determined and calculations gave a four magnitudes higher log *P* of 8.6.

In total, 47 metabolites were tentatively identified in the retrospective analysis of the acquired data using the pesticide metabolites database. All detected substances meet the criteria described in section 2.4.2 and are summarized in **Table 1**.

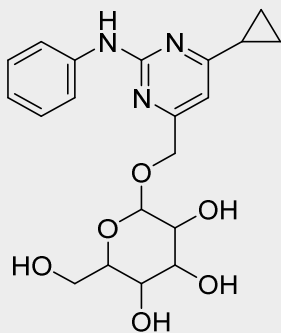
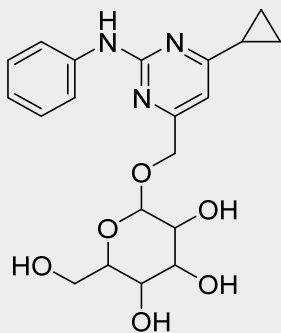
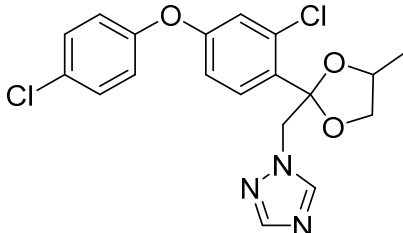
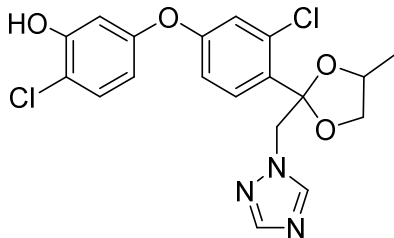
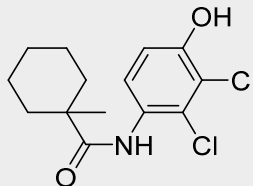
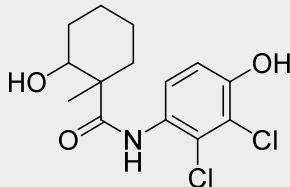
Table 1. Pesticide and metabolites including retention times, Log *P* values, formulas and chemical structures of the active compounds and corresponding metabolites detected by UPLC-QToF-MS in suspect screening of fruit and vegetable samples.

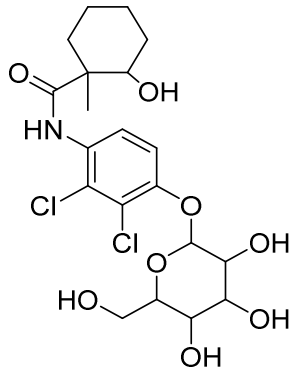
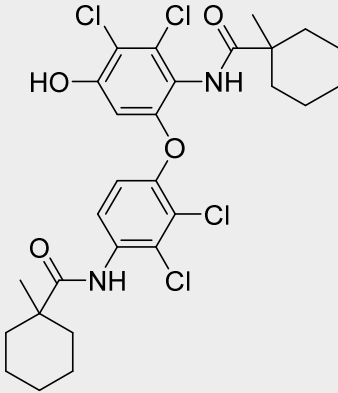
pesticide	RT (min)	Log <i>P</i> pesticide	Structural formula of pesticide	metabolite IUPAC	Structural and molecular formula and phase of metabolite	Neutral mass (Da)	RT (min)	Exact masses of fragments (Da)	Log <i>P</i> ¹ metabolite	commodities with positive detects
acetamiprid	4.69	1.9		M1 (E)-N-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)-N'-cyanoacetimidamide	 C ₉ H ₉ ClN ₄ phase-I	208.05157	4.58	126.0105	1.66	grapefruit
ametoctradin	10.18	4.4		M2 2-((8-(7-amino-5-ethyl-1,2,4-triazolo[1,5-a]pyrimidin-6-yl)octyl)oxy)-(6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triol	 C ₂₁ H ₃₅ N ₅ O ₆ phase-II	453.25873	6.81	292.2131 274.202	-	grape

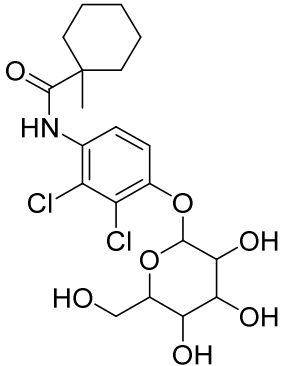
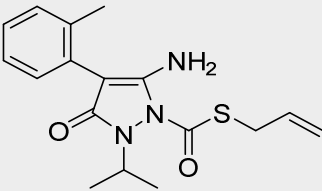
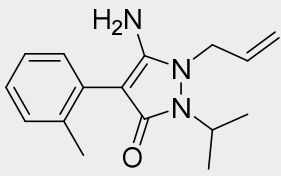
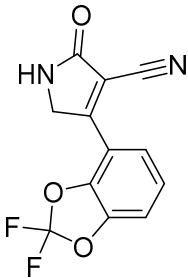
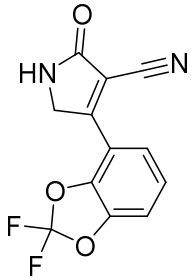
azoxystrobin	8.38	4.34		M3 3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydropyran-2-yl 2-(2-((6-(2-cyanophenoxy)pyrimidin-4-yl)oxy)phenyl)-3-methoxypropanoate	 $C_{27}H_{27}N_3O_{10}$ phase-II	553.16964	7.23	314.092 342.087	2.17	grape
				M4 methyl 2-(2-((6-(2-cyanophenoxy)pyrimidin-4-yl)oxy)phenyl)-2-hydroxyacetate	 $C_{20}H_{15}N_3O_5$ phase-I	377.10117	7.35	360.0976	3.75	grape strawberry
				M5 methyl 2-(2-((6-(2-cyanophenoxy)pyrimidin-4-yl)oxy)phenyl)-2-oxoacetate	 $C_{20}H_{13}N_3O_5$ phase-I	375.08552	7.95	376.093	3.99	grape

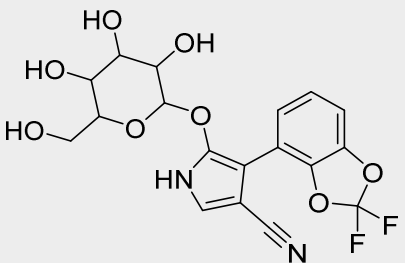
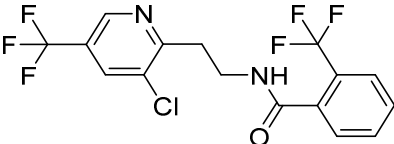
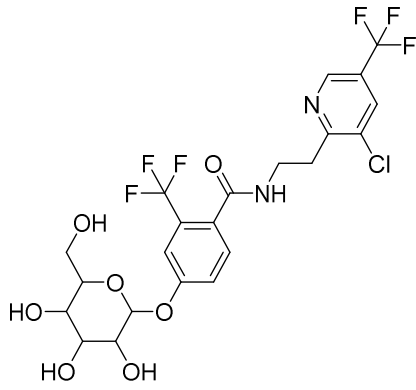
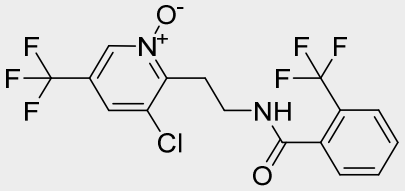
				M6 2-(2-((6-(2-cyanophenoxy)pyrimidin-4-yl)oxy)phenyl)-3-methoxypropanoic acid	 $C_{21}H_{17}N_3O_5$ phase-I	391.11682	7.62	314.0924 342.0873	4.01	banana
boscalid	8.56	4.64		M7 N-acetyl-S-(4'-chloro-6-(2-chloronicotinamido)-2'-hydroxy-[1,1'-biphenyl]-3-yl)cysteine	 $C_{23}H_{19}Cl_2N_3O_5S$ phase-I	519.04225	7.99	111.9949 95.0491	3.14	grape pear
bupirimate	9.38	3.08		M8 5-butyl-2-(ethylamino)-6-methylpyrimidin-4-ol	 $C_{11}H_{19}N_3O$ phase-I	209.15281	7.49	182.1288 140.1070	3.21	vine leaves straw- berry pepper

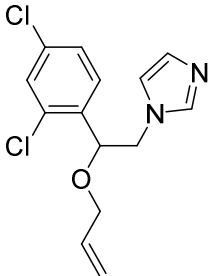
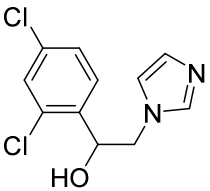
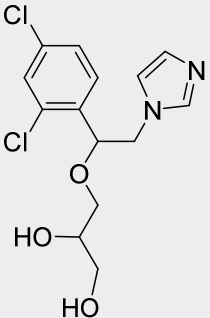
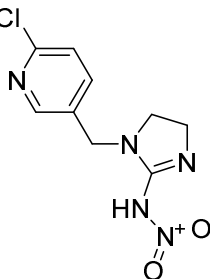
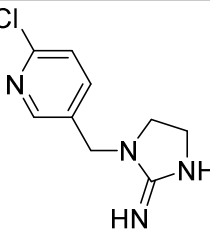
buprofezin	10.68	4.21		M9 (Z)-2-(tert-butylimino)-3-isopropyl-5-(4-methoxyphenyl)-1,3,5-thiadiazine-4-one		335.16675	8.85	169.1335 288.1707	4.08	grape
carbendazim	4.88	1.29		M10 methyl (5-hydroxy-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)carbamate		207.06439	3.35	176.0452 148.0504	0.9	grape
cyprodinil	9.52	3.86		M11 (6-cyclopropyl-2-(phenylamino)pyrimidin-4-yl)methanol		241.12151	7.72	224.1182 212.1182	3.01	grape strawberry pear raspberry cherry
				M12 1-(6-methyl-2-(phenylamino)pyrimidin-4-yl)propan-2-ol		243.13716	7.62	226.1335 200.1180	3.05	strawberry

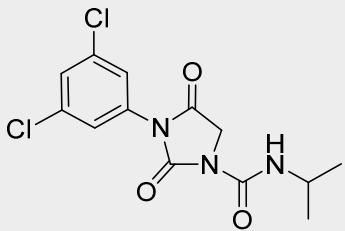
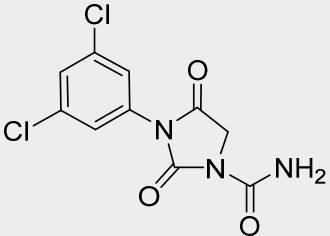
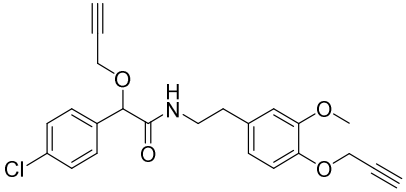
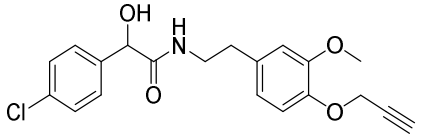
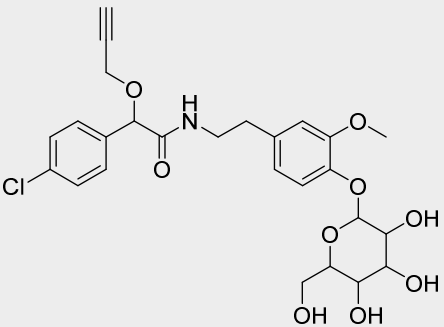
				M13 (2R,3S,4S,5R,6R)-2-((6-cyclopropyl-2-(phenylamino)pyrimidin-4-yl)methoxy)-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triol		C ₂₀ H ₂₅ N ₃ O ₆ phase-II	403.17434	7.59	242.1288 209.0950	1.27	grape straw- berry cherry
difenoconazole	10.17	4.79		M14 5-(4-(2-((1H-1,2,4-triazol-1-yl)methyl)-4-methyl-1,3-dioxolan-2-yl)-3-chlorophenoxy)-2-chlorophenol		C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₄ phase-I	421.05961	9.13	294.065 251.0020	4.4	grape
fenhexamid	9.04	4.35		M15 N-(2,3-dichloro-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-1-methylcyclohexane-1-carboxamide		C ₁₄ H ₁₇ Cl ₂ NO ₃ phase-I	317.05855	7.68	175.9662 95.0855	3.26	grape

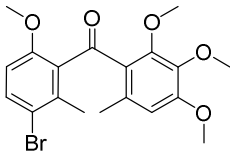
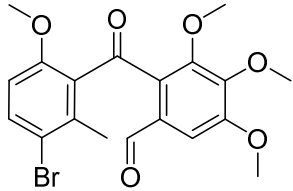
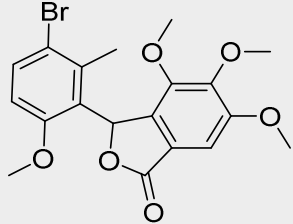
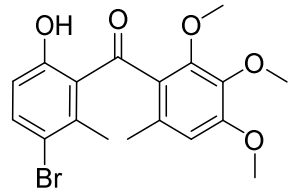
				M16 N-(2,3-dichloro-4-((3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)phenyl)-2-hydroxy-1-methylcyclohexane-1-carboxamide  $C_{20}H_{27}Cl_2NO_8$ phase-II	479.11137	6.6	175.9662 300.0533	1.42	grape apple grapefruit strawberry
				M17 N-(2,3-dichloro-4-(3,4-dichloro-5-hydroxy-2-(1-methylcyclohexane-1-carboxamido)phenoxy)-1-methylcyclohexane-1-carboxamide)  $C_{28}H_{32}Cl_4N_2O_4$ phase-I	600.11162	10.27	441.0535 109.0647	8.6	grape

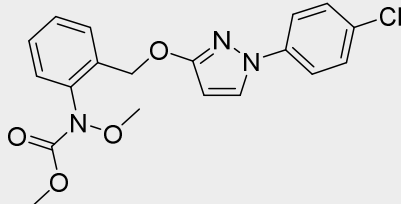
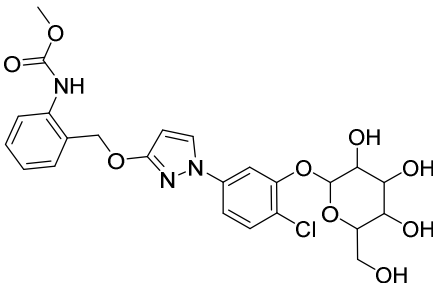
				M18 N-(2,3-dichloro-4-((3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)phenyl)-1-methylcyclohexane-1-carboxamide	 $C_{20}H_{27}Cl_2NO_7$ phase-II	463.11646	8.11	302.0706 431.1282	2.51	grape straw- berry
fenpyrazamine	8.82	2.73		M19 S-allyl 5-amino-2-isopropyl-3-oxo-4-(o-tolyl)-2,3-dihydro-1H-pyrazole-1-carbothioate	 $C_{16}H_{21}N_3O$ phase-I	271.16846	6.53	258.1601 217.1335	-	straw- berry
fludioxonil	8.49	3.42		M20 4-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-4-yl)-5-hydroxy-2-oxo-2,5-dihydro-1H-pyrrole-3-carbonitrile	 $C_{12}H_6F_2N_2O_4$ phase-I	280.02956	5.8	252.0114	1.91	straw- berry

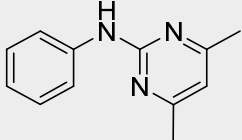
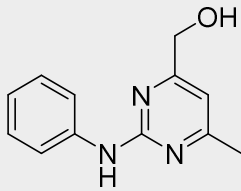
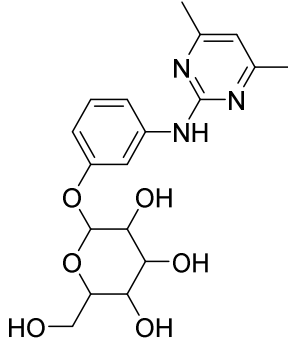
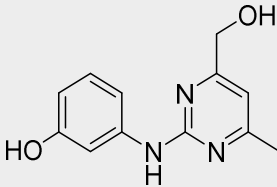
				M21 4-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-4-yl)-5-((3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-1H-pyrrole-3-carbonitrile	 C ₁₈ H ₁₆ F ₂ N ₂ O ₈ phase-I	426.08747	6.27	263.0275 197.0357	1.38	grape cherry pepper
fluopyram	8.96	4.50		M22 N-(2-(3-chloro-5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl)ethyl)-2-(trifluoromethyl)-4-(((2S,3S,5R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)benzamide	 C ₂₂ H ₂₁ ClF ₆ N ₂ O ₇ phase-II	574.09415	7.47	435.2913	2.27	straw- berry cherry
				M23 3-chloro-5-(trifluoromethyl)-2-(2-(2-(trifluoromethyl)benzamido)ethyl)pyridine 1-oxide	 C ₁₆ H ₁₁ ClF ₆ N ₂ O ₂ phase-I	412.04132	8.1	173.0209 395.038	2.12	straw- berry tomato pear

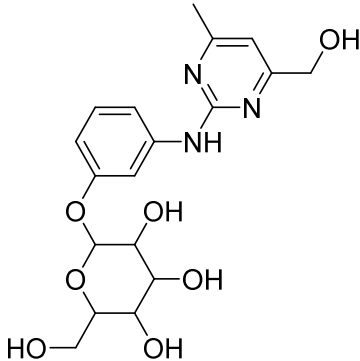
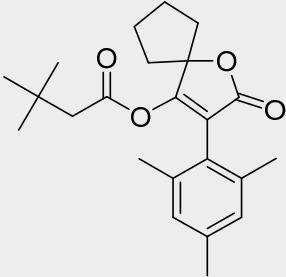
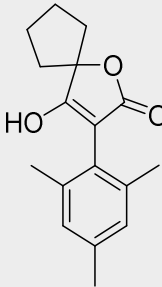
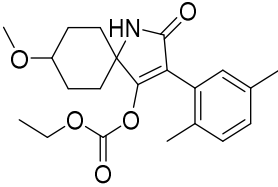
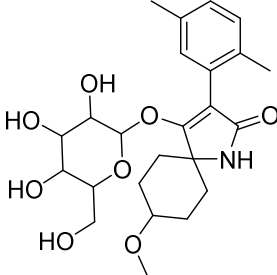
imazalil	9.32	2.94		M24 1-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1H-imidazol-1-yl)ethan-1-ol  $C_{11}H_{10}Cl_2N_2O$ phase-I	256.01702	6.58	221.0476 170.976	1.88	pear grapefruit banana orange
				M25 3-(1-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1H-imidazol-1-yl)ethoxy)propane-1,2-diol  $C_{14}H_{16}Cl_2N_2O_3$ phase-I	330.0538	8.59	201.0194	1.19	lemon
imidacloprid	4.21	1.28		M26 1-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)imidazolidin-2-imine  $C_9H_{11}ClN_4$ phase-I	210.06722	2.81	126.0105	1.44	orange apple strawberry

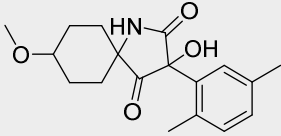
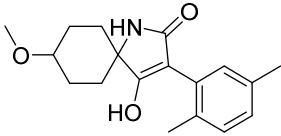
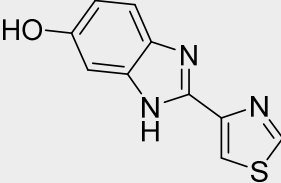
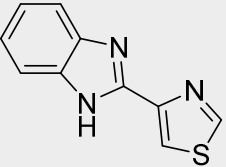
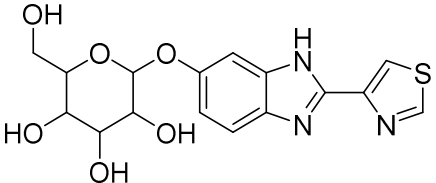
iprodion	9.32	2.00		M27 3-(3,5-dichlorophenyl)-2,4-dioximidazolidine-1-carboxamide		C ₁₀ H ₇ Cl ₂ N ₃ O ₃ phase-I	286.98645	8.58	141.0169	1.11	strawberry
mandipropamid	8.65	3.58		M28 2-(4-chlorophenyl)-2-hydroxy-N-(3-methoxy-4-(prop-2-yn-1-yloxy)phenethyl)acetamide		C ₂₀ H ₂₀ ClNO ₄ phase-I	373.10809	7.92	161.0596 188.0832	3	grape tomato
				M29 2-(4-chlorophenyl)-N-(3-methoxy-4-((3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)phenethyl)-2-(prop-2-yn-1-yloxy)acetamide		C ₂₆ H ₃₀ ClNO ₉ phase-II	535.16091	7.19	374.1154 396.0967	1.26	grape apple grapefruit strawberry

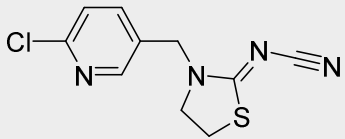
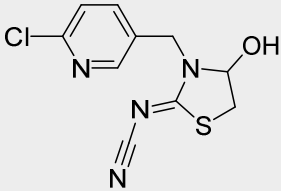
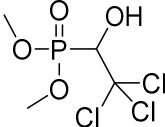
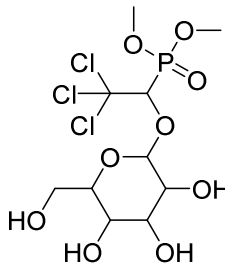
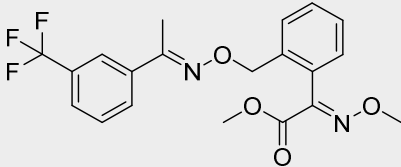
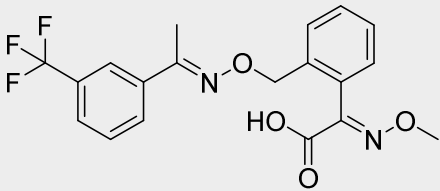
metrafenone	9.98	4.54		M30 2-(3-bromo-6-methoxy-2-methylbenzoyl)-3,4,5-trimethoxybenzaldehyde  $C_{19}H_{19}BrO_6$ phase-I	422.0365	9.46	225.0757 195.0653	3.8	vine leaves
				M31 3-(3-bromo-6-methoxy-2-methylphenyl)-4,5,6-trimethoxyisobenzofuran-1(3H)-one  $C_{19}H_{19}BrO_6$ phase-I	422.0365	8.36	240.9501	4.08	vine leaves
				M32 (3-bromo-6-hydroxy-2-methylphenyl)(2,3,4-trimethoxy-6-methylphenyl)methanone  $C_{18}H_{19}BrO_5$ phase-I	394.04159	9.33	362.9874 378.0108	4.28	vine leaves

pyraclostrobin	9.85	4.84		M033 methyl (2-(((1-(4-chlorophenyl)-5-((3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-1H-pyrazol-3-yl)oxy)methyl)-5-methoxyphenyl)carbamate 	$C_{25}H_{28}ClN_3O_{10}$ phase-II	565.14632	8.24	404.1008 417.1622	2.24	grape raspberry
			M34 methyl (2-(((1-(4-chloro-3-((3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)-tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)phenyl)-1H-pyrazol-3-yl)oxy)methyl)phenyl)carbamate	$C_{24}H_{26}ClN_3O_9$ phase-II	535.13576	8.37	371.1004 221.0112	2.18	grape apple grapefruit strawberry pear apricot	

pyrimethanil	8.20	3.48		M35 (6-methyl-2-(phenylamino)pyrimidin-4-yl)-methanol	 $C_{12}H_{13}N_3O$ phase-I	215.10586	6.62	198.1025 183.0789	2.63	apple pear raspberry
				M36 2-(3-((4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)amino)phenoxy)-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triol	 $C_{18}H_{23}N_3O_6$ phase-II	377.15869	5.93	216.1131 198.1026	1.25	grape straw- berry pear raspberry pepper
				M37 3-((4-(hydroxymethyl)-6-methylpyrimidin-2-yl)amino)phenol	 $C_{12}H_{13}N_3O_2$ phase-I	231.10078	5.3	196.0869 184.0865	2.24	pear banana

				M38 2-(hydroxymethyl)-6-(3-((4-(hydroxymethyl)-6-methylpyrimidin-2-yl)amino)phenoxy)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triol	 $C_{18}H_{23}N_3O_7$ phase-II	393.1536	4.91	232.1081	0.40	pear banana
spiromesifen	11.03	4.99		M39 4-hydroxy-3-mesityl-1-oxaspiro[4.4]non-3-en-2-one	 $C_{17}H_{20}O_3$ phase-I	272.14124	6.16	227.0714 159.0815	2.89	straw- berry tomato
spirotetramat	9.05	2.43		M40 3-(2,5-dimethylphenyl)-8-methoxy-4-((3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-1-azaspiro[4.5]dec-3-en-2-one	 $C_{24}H_{33}NO_8$ phase-II	463.22062	4.3	302.1751 324.1566	-0.47	grape straw- berry apple grapefruit

				M41 3-(2,5-dimethylphenyl)-3-hydroxy-8-methoxy-1-azaspiro[4.5]decane-2,4-dione	 $C_{18}H_{23}NO_4$ phase-I	317.16271	7.57	301.1434 107.0855	1.44	pear
				M42 3-(2,5-dimethylphenyl)-4-hydroxy-8-methoxy-1-azaspiro[4.5]dec-3-en-2-one	 $C_{18}H_{23}NO_3$ phase-I	301.16779	6.7	216.1014 270.1484	1.28	grape apple grapefruit strawberry
				M43 2-(thiazol-4-yl)-1H-benzo[d]imidazol-6-ol	 $C_{10}H_7N_3OS$ phase-I	217.03098	4.13	191.0291 119.0604	1.64	banana orange
thiabendazol	5.61	2.03		M44 2-(hydroxymethyl)-6-((2-(thiazol-4-yl)-1H-benzo[d]imidazol-6-yl)oxy)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triol	 $C_{16}H_{17}N_3O_6S$ phase-II	379.08381	3.82	218.0383 119.0604	-0.2	orange

thiacloprid	5.19	2.8		M45 (N-(3-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)-4-hydroxythiazolidin-2-ylidene)cyanamide		C ₁₀ H ₉ ClN ₄ OS phase-I	268.01856	4.96	239.0686 126.0105	2.73	cherry apple
trichlorfon	4.44	1.4		M46 dimethyl (2,2,2-trichloro-1-((3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)ethyl)phosphonate		C ₁₀ H ₁₈ Cl ₃ O ₉ P phase-II	417.9754	4.34	289.0683	0.19	raspberry
trifloxystrobin	10.26	4.66		M47 2-((methoxymino)-2-(2-(((1-(3-(trifluoromethyl)phenyl)ethylidene)amino)oxy)methyl)phenyl)acetic acid		C ₁₉ H ₁₇ F ₃ N ₂ O ₄ phase-I	394.11404	8.84	186.0525 105.0699	4.39	straw- berry

¹Log *P* (partition coefficient for n-octanol/water) calculations by ChemDraw is associated with a standard deviation of 0.47 log(p) units. [22]

3.2 Characterization of pesticide metabolites

Two types of pesticide metabolites (phase-I and -II metabolites) were detected in the presented study. Typically, phase-I metabolites were formed mainly by hydroxylation and hydrolysis. For phase-II metabolites, almost exclusively glucosylated metabolites were observed. Only for boscalid in grape and pear, a metabolite M7 was observed containing a cysteine conjugation (**Table 1**).

In the following section, a few prominent examples are described more in detail:

Cyprodinil

Cyprodinil is a broad-range fungicide and is widely used in fruit orchards and viniculture. Three metabolites of cyprodinil were found in different fruits such as grape, strawberry, cherry, and pear (**Table 1**). In **Figure 2**, the metabolic transformation of cyprodinil is displayed. Phase-I reactions in principle comprise an activation of the parent compound by e.g., demethylation or hydroxylation reactions to increase the reactivity and polarity of the molecule. [9, 10] Two of such phase-I metabolites were observed: Metabolite M13 was hydroxylated at the 4-cyclopropyl group resulting in a 2-hydroxypropyl substituent. A second hydroxylation was introduced at the 6-methyl group of the initial cyprodinil molecule resulting in metabolite M12. The phase-II reaction as shown in **Figure 2** covers a conjugation reaction with further plant-endogenous molecules such as amino acids or carbohydrates increasing the polarity of the molecule and thus, its final detoxification. Metabolite M11 is a cyprodinil conjugate with glucose (**Figure 2**). A phase-I reaction must be precedent to provide a hydroxyl group that is finally glucosylated. [15] Such a conjugation reaction is often followed by an esterification with malonic acid for compartmentalization in plant cells. Generally, glycosides are a reversible form of storage in the plant organelle vacuole (**Figure 2**). [9]

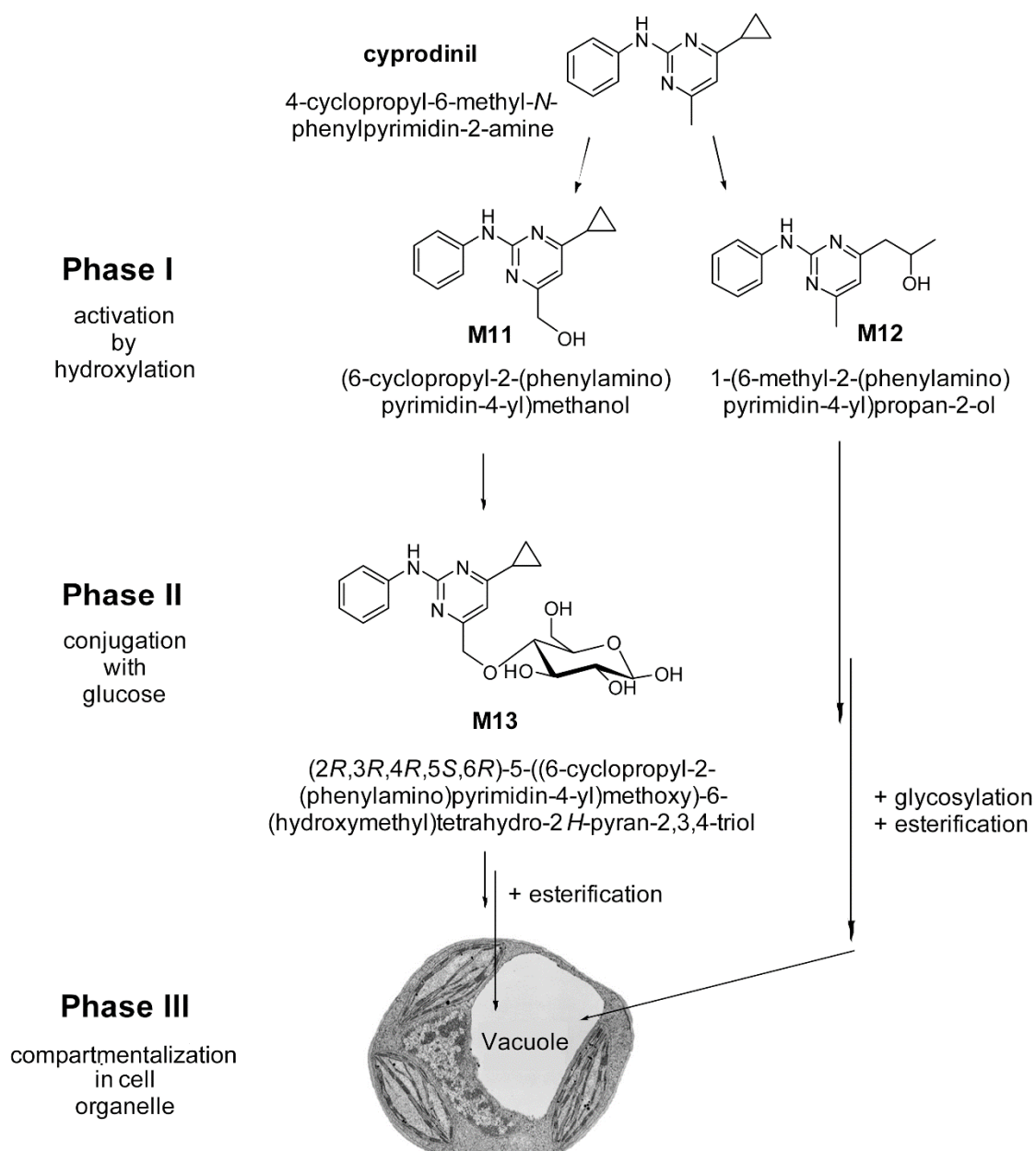


Figure 2. Metabolism of cyprodinil with its corresponding metabolites M11, M12, and M13 detected in strawberry. Phase-I reaction were an activation by hydroxylation on two alkyl groups. Phase-II reaction was detected as a conjugation with endogenous glucose for the M1 metabolite. Modified after [15, 22].

Metrafenone

In vine leaves residual metrafenone was determined with 23 mg/kg. The phase-I metabolite M6 was also identified, which results from a demethylation at the 6-methoxy group of metrafenone (**Table 1**). The second detected phase-I metabolite M30 is an oxidized metrafenone with an aldehyde function at the methyl group and is the precursor of M31. An intermediate metabolite between M30 and M31 was a

further oxidation product of the aldehyde to a carboxylic acid group. Metabolite M31 emerges from a ring closing reaction between the carboxylic acid and the alcohol group as an intramolecular esterification to a lactone. [16]

Bupirimate

Bupirimate, a systemic fungicide, is approved as pesticide in the EU but banned as plant protection product in some countries such as Germany. [17] However, it was included in the metabolite screening and one metabolite M8 was detected in vine leaves, strawberry, and pepper. In presence of a low residue concentration of 0.006 mg/kg (< 0.010 mg/kg reporting level) of bupirimate in vine leaves, one dealkylated metabolite was detected. Metabolite M8 is a dealkylation product of the dimethylsulfamic acid moiety, which is a good leaving group during hydrolysis. The metabolite was basically more polar in comparison to the precursor pesticide due to phase-I and II reactions as mentioned above.

Fenhexamid

In grapes, the fungicide fenhexamid is a typical pesticide, widely used in the vineyard for treatment of *botrytis bunch rot* which can cause a great damage to the grapes. [18]. Fenhexamid was detected in 10 of 36 different grape samples and displaying also a high grade of metabolism. In sum, four metabolites were detected with a metabolite M17 which is a dimeric fenhexamid, a hydrolyzed phase-I metabolite M15, and the glucosylated phase-II metabolites M16 and M18.

Spirotetramate

Spirotetramate, a widely used typical insecticide for pome fruits, was found in different matrices such as grapes, grapefruits, pears, and strawberries with three different metabolites. These were already included in the targeted screening workflow, because of the specific residue definition of the spirotetramate MRL. [3] Thus, metabolites identified in the target screening perfectly matched with the compounds observed and identified in the suspect screening approach. Three spirotetramate metabolites were confirmed following the confirmation criteria according to SANTÉ 2015/11945. Moreover, there are already reference standards solutions of BYI08330-enol (M42), BYI08330-ketohydroxy (M41) and BYI08330-enol-glucoside (M40) commercially available. [12]

Azoxystrobin

Azoxystrobin is a systemic, broad-spectrum strobilurin fungicide that inhibits mitochondrial respiration in fungi and is one of the most prevalent pesticide residues in foods in Europe [19]. Two azoxystrobin metabolites (M3 and M4) were detected in grapes, strawberries, and bananas [20]. Both were already detected in the previous work concerning the metabolism of azoxystrobin in pak choi and broccoli. [11]

In that study, detection of respective metabolites was feasible at hand of a previously developed metabolites database for azoxystrobin concerning retention time and fragments. Additionally, two additional metabolites (M5 and M6) were detected in grapes in the present study (**Table 1**).

Neonicotinoids

Small amounts of the neonicotinoids acetamiprid and thiacloprid were detected in cherry and strawberry. For both pesticides, phase-I metabolites were identified: the demethylated acetamiprid metabolite M1 ((E)-N-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)-N'-cyanoacetimidamide) and the hydroxylated thiacloprid M45 ((N-(3-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)-4-hydroxythiazolidin-2-ylidene)cyanamide), which was also found in pak choi and broccoli study described above (**Table 1**).

Post-harvest treatment agents

For citrus fruits, pyrimethanil, imazalil, and thiabendazole are typical agents approved for post-harvest peel treatment. [21] Independently from the commodity analyzed, pyrimethanil and thiabendazole led to similar metabolite profiles in orange, lemon, and grapefruits. For imazalil, two phase-I metabolites were found. The imazalil metabolite M6 is a hydrolysis product of the double bond of imazalil. For thiabendazole, phase-I and II metabolites were detected. Metabolite M24 is a hydroxylated phase-I metabolite (**Table 1**). The metabolite M44 is a glucosidic metabolite resulting from metabolite M43 (**Table 1**). For the third post-harvest treatment agent in this study pyrimethanil, three metabolites were detected: two phase-I metabolites were identified: M35, the hydroxylation product at the 4-methyl group and metabolite M37, twice hydroxylated at the 4-methyl group and the phenyl ring of pyrimethanil. Metabolite M36 is a glucose conjugate after the hydroxylation of the phenyl ring. Metabolite M38 is the corresponding glucosylated conjugate of M36 at the hydroxylated phenyl ring (**Table 1**).

3.3 Application in targeted screenings

The suspect database offers the possibility for including metabolites in targeted methods to monitor pesticide metabolites in commercial routine samples for both, HRMS and LC-MS/MS analysis. The HRMS suspect screening approach developed in this study was adapted to an MS/MS system to implement the metabolites detected in a targeted approach. Therefore, positively tested samples were measured by LC-MS/MS with targeted pesticide screening conditions and generated metabolite database. The metabolites database containing monoisotopic mass, retention time and at least one fragment was used for data acquisition. Several extracts were re-analyzed for a confirmatory analysis by LC-MS/MS like orange which is frequently positively tested with the post-harvest treatment agent imazalil. However, imazalil and its metabolite M24 were analyzed with both approaches (suspect screening and targeted analysis) to show exemplarily the feasibility of the implementation for routine analysis conditions (**Figure 3**).

HRMS data and the re-analysis with the targeted approach enables an additional confidence criterion in an overall identification workflow. The transferability of the methods allows the development of a targeted metabolite screening method for a routine analysis workflow.

HRMS techniques offer the possibility of the detection of potential metabolites by exact mass, retention time and fragment without any reference substance. Data acquisition was performed in MS^E mode, a ramping of the collision energy allows to work without an optimization of collision energy for an effective fragmentation of precursor ions as mentioned above. A disadvantage of the targeted MS/MS technique is that a reference standard compound is necessary to determine specific method conditions necessary for establishing fragmentation conditions. Furthermore, due to the lack of reference standards a quantitation of pesticide metabolites is often not yet possible.

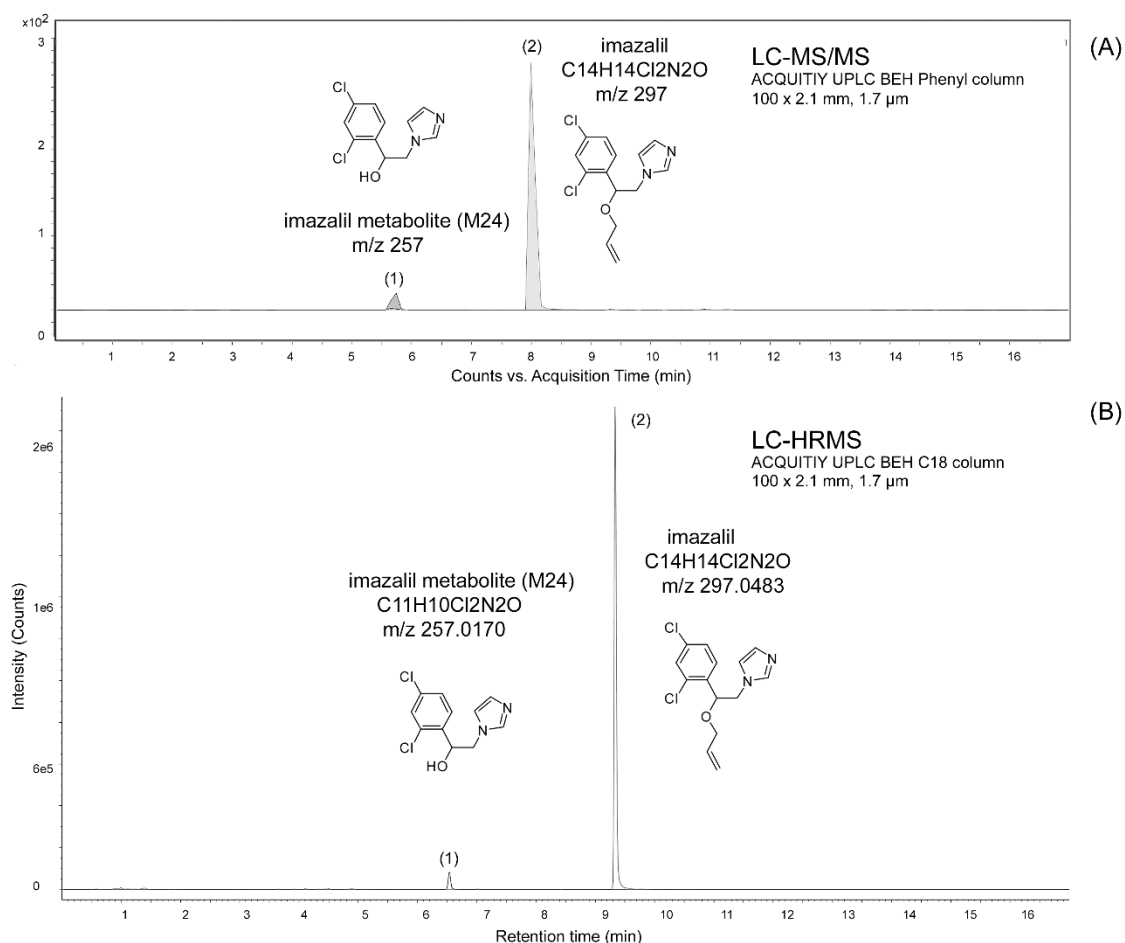


Figure 3. Transferring a suspect screening approach from a UPLC-HR-QToF-MS system to a UPLC-MS-MS system for the example of imazalil (m/z) and its metabolite M24 (m/z) 1.1 mg/kg in orange (A) in targeted screening mode by LC-MS/MS with a BEH phenyl column and suspect screening mode by UPLC-QToF-MS XIC (B) with a BEH C18 column.

Nonetheless, a metabolite screening using HRMS in MS^E mode enables a qualitative estimate of the total pesticide impact, in contrast to the limited scope in targeted metabolite screenings.

4. Conclusions

96 fruit and vegetable samples with pesticide residues identified in a targeted routine pesticide analysis were re-analyzed for possible corresponding pesticide metabolites by UPLC-HR-QToF-MS by suspect screening and subsequently by targeted UHPLC-MS-MS approaches. 47 metabolites were detected by the developed metabolite screening method.

In general, hydroxylation was the main phase I reaction in pesticide metabolism. 32 different phase-I metabolites were detected in the present study. Additionally, 14

phase-II metabolites were identified, mainly glucose conjugates and one with the amino acid cysteine. The metabolites were included in a targeted screening workflow with inclusion of empirically determined identification parameters such as retention time, exact mass, and fragments.

Suspect screening approaches using HRMS tools offer an overview of both, parent molecules and their corresponding metabolites. Sample sets with positively detected pesticide residues were re-analyzed to identify and characterize possible pesticide metabolites. The detected metabolites are stable and still present after harvesting in daily food. A screening methodology covering the metabolites evaluated in this study offers the possibility for the public and food safety authorities to obtain the whole impact of pesticide contamination. Moreover, the detection of metabolites in absence of the parent compounds may also give a strong evidence of an illegal application of plant protection products. The suspect screening workflow presented here offers an application for monitoring metabolites for estimating the whole impact of pesticide residues. Consequently, data about metabolites may accelerate the renewal of individual pesticide residue definitions.

HRMS tools offer the possibility not only to detect a compound, retrospectively, but also to verify compounds without an available standard by means of identification points such as retention time, fragments, isotope ratio, mass error for parent compounds, isotopes, adducts, and fragments.

So far, a possible proposal to initiate a renewal of the residue definition should be in accordance to the frequency of the occurrence and toxicity of the metabolites. The European and national reference laboratories should therefore use suspect screening approaches as presented in this study to monitor the impact of pesticides metabolites. Moreover, authorities could make metabolite standards accessible in order to allow a proper identification and quantification of relevant pesticide metabolites.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical Approval This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

Appendix

Supplementray Material

Table S-1. Relevant commodities analyzed for pesticides in daily routine from April to August 2016 used for the study.

Table S-2. Top five residue detects for the individual most relevant commodities, evaluated in the years 2008 – 2014.

5. References

- [1] Storck V., Lucini L., Mamy L., Ferrari F., Papadopoulou E. S., Nikolaki S., Karas P. A., Servien R., Karpouzas D. G., Trevisan M., Benoit P., Martin-Laurent F., Identification and characterization of tebuconazole transformation products in soil by combining suspect screening and molecular typology. *Environ Pollut* 2016, 208, 537–545.
- [2] López M. G., Fussell R. J., Stead S. L., Roberts D., McCullagh M., Rao R., Evaluation and validation of an accurate mass screening method for the analysis of pesticides in fruits and vegetables using liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometry with automated detection. *J Chromatogr A* 2014, 1373, 40–50.
- [3] [Der Titel "#60" kann nicht dargestellt werden – Die Vorlage "Literaturverzeichnis - Internetdokument - (Standardvorlage)" beinhaltet nur Felder, welche bei diesem Titel leer sind.]
- [4] Thurman E. M., Ferrer I., Zavitsanos P., Zweigenbaum J. A., Identification of imidacloprid metabolites in onion (*allium cepa* L.) using high-resolution mass spectrometry and accurate mass tools. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2013, 27, 1891–1903.

- [5] López A., Yusa V., Millet M., Coscolla C., Retrospective screening of pesticide metabolites in ambient air using liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. *Talanta* 2016, *150*, 27–36.
- [6] Moschet C., Piazzoli A., Singer H., Hollender J., Alleviating the reference standard dilemma using a systematic exact mass suspect screening approach with liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. *Anal Chem* 2013, *85*, 10312–10320.
- [7] Kiljanek T., Niewiadowska A., Semeniuk S., Gawel M., Borzecka M., Posyniak A., Multi-residue method for the determination of pesticides and pesticide metabolites in honeybees by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry--honeybee poisoning incidents. *J Chromatogr A* 2016, *1435*, 100–114.
- [8] Jabot C., Daniele G., Giroud B., Tchamitchian S., Belzunces L. P., Casabianca H., Vulliet E., Detection and quantification of boscalid and its metabolites in honeybees. *Chemosphere* 2016, *156*, 245–251.
- [9] Sandermann H., Higher plant metabolism of xenobiotics: The 'green liver' concept. *Pharmacogenetics* 1994, *4*, 225–241.
- [10] Sandermann H., Musick T. J., Aschbacher P. W., Animal bioavailability of a 3,4-dichloroaniline-lignin metabolite fraction from wheat. *J Agric Food Chem* 1992, *40*, 2001–2007.
- [11] Bauer A., Luetjohann J., Hanschen F. S., Schreiner M., Kuballa J., Jantzen E., Rohn S., Identification and characterization of pesticide metabolites in brassica species by liquid chromatography travelling wave ion mobility quadrupole time-of-flight mass spectrometry (uplc-twims-qtof-ms). *Food Chem* 2017.
- [12] European Commission, Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. 2015.
- [13] Pramanik B. N., Chen G., Lee M. S., Characterization of impurities and degradants using mass spectrometry. 2011.
- [14] Levsen K., Schiebel H.-M., Behnke B., Dötzer R., Dreher W., Elend M., Thiele H., Structure elucidation of phase-ii metabolites by tandem mass spectrometry: An overview. *J Chromatogr A* 2005, *1067*, 55–72.
- [15] EFSA European Food Safety Authority, Cyprodinil existing (2nd stage). *Draft Assessment Report* 02/08/2005.
- [16] EFSA European Food Safety Authority, Metrafenon_dar_05. *Draft Report Assessment* 2003, 239.

- [17] <https://apps2.bvl.bund.de/psm/jsp/index.jsp> (last time accessed: August 25, 2017).
- [18] Reglinski T., Elmer P. A. G., Taylor J. T., Parry F. J., Marsden R., Wood P. N., Suppression of botrytis bunch rot in chardonnay grapevines by induction of host resistance and fungal antagonism. *Austra. Plant Pathol* 2005, 34, 481.
- [19] Gautam M., Etzerodt T., Fomsgaard I. S., Quantification of azoxystrobin and identification of two novel metabolites in lettuce via liquid chromatography–quadrupole-linear ion trap (qtrap) mass spectrometry. *Int J Environl Anal Chem* 2017, 97, 419–430.
- [20] EFSA, European food safety authority - provision of documents (07/08/2009) assessment report azoxystrobin, UK. 2009.
- [21] Ismail M., Zhang J., Post-harvest citrus diseases and their control. *Outlooks on Pest Management* 2004, 15, 29.
- [22] <http://iws.collin.edu/biopage/faculty/mcculloch/1406/notes/cell/images/cenvac2.jpg> (last time accessed: September 16, 2017).

4.4 Bestimmung von Fosetyl und Phosphonsäure in pflanzlichen Lebensmitteln mittels IC-MS/MS (Publikation IV)

Determination of fosetyl and phosphonic acid at 0.010 mg/kg level by ion chromatography tandem mass spectrometry (IC-MS/MS)

Anna Bauer^a, Jens Luetjohann^{a*}, Sascha Rohn^b, Juergen Kuballa^a, Eckard Jantzen^a

^aResearch and Development Department, GALAB Laboratories GmbH, Am Schleusengraben 7, 21029 Hamburg, Germany

^bInstitute of Food Chemistry, Hamburg School of Food Science, University of Hamburg, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany

Ziel der Arbeit war es, für den Wirkstoff Fosetyl und dessen Abbauprodukt Phosphonsäure eine robuste und sensitive Methode zu entwickeln, die eine Bestimmung von Phosphonsäure mit 0,010 mg/kg in unterschiedlichen pflanzlichen Lebensmitteln ermöglicht. Die beiden Zielsubstanzen können aufgrund ihrer polaren Eigenschaften nicht von der Pestizidmultimethode miterfasst werden. Des Weiteren konnte der Metabolit Phosphonsäure bislang nur mit einer Bestimmungsgrenze von 0,100 mg/kg erfasst werden, daher war eine sichere Bestimmung dieser Substanz mit der für Lebensmittel für Säuglinge und Kindernahrung vorgeschriebenen Bestimmungsgrenze von 0,010 mg/kg nicht möglich.

Zunächst wurde ein geeignetes, chromatographisches System mittels IC-MS/MS entwickelt. Anschließend erfolgte eine Evaluierungsstudie an unterschiedlichen pflanzlichen Lebensmitteln sowie die Durchführung einer Validierungsstudie entsprechend des Dokumentes SANTE/11945/2015.

Der eigene Anteil an dieser Veröffentlichung wird mit 40% angegeben.

Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2018**, 66, 346-350. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b03464

Determination of fosetyl and phosphonic acid at 0.010 mg/kg level by ion chromatography tandem mass spectrometry (IC-MS/MS)

Anna Bauer^a, Jens Luetjohann^{a*}, Sascha Rohn^b, Juergen Kuballa^a, Eckard Jantzen^a

^aResearch and Development Department, GALAB Laboratories GmbH, Am Schleusengraben 7, 21029 Hamburg, Germany

^bInstitute of Food Chemistry, Hamburg School of Food Science, University of Hamburg, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany

Corresponding author:

Dr. Jens Luetjohann, GALAB Laboratories GmbH, Am Schleusengraben 7, 21029 Hamburg

E-mail address: jens.luetjohann@galab.de

Tel.: +4940368077432; Fax: +4940368077401.

Keywords phosphonic acid, fosetyl, ion chromatography, liquid chromatography, mass spectrometry, organic food

Abstract

A new sensitive, fast and robust method using ion chromatography tandem mass spectrometry (IC-MS/MS) for the determination of fosetyl and phosphonic acid in plant-derived matrices was developed. For compensation of matrix effects and differences in recovery rates the isotopically-labelled internal standard (ILIS) ¹⁸O₃-labelled phosphonic acid was added to the samples prior to the extraction of the target compounds. The validation of the method for the matrices tomato, apple, lemon, raisin, avocado, and wheat was performed according to the actual EU guidance document SANTE/11945/2015. The precision and accuracy were determined in five replicates at spiking levels of 0.010 mg/kg and 0.100 mg/kg with recovery rates between 76-105% and RSDs between 1.2 – 17.8%. In this paper, it was achieved for the first time to detect both fosetyl and phosphonic acid at the reporting level of 0.010 mg/kg most relevant for organic plant food commodities.

1. Introduction

Phosphonic acid is widely used either as fungicide or fertilizer in food crop production. Foliar phosphorus fertilizers and some preparations approved for organic farming can be a source of phosphonic acid.[1] Furthermore, residues in crops can occur as well resulting from the application of plant protection products containing phosphonic acid as metabolite.[2, 3]

Phosphonic acid can accumulate and be stored for years and re-mobilized by the plant, suggesting a long-term persistence and non-predictable residual effects in fruits and vegetables.[3, 4] In case of a treatment with the phosphonate fungicide fosetyl aluminum, phosphonic acid is the main metabolite.[5] The application of fosetyl aluminum is allowed for a quite large number of commodities. Maximum residue levels (MRLs) are specified in Annex III of European Commissions (EC) Regulation No 396/2005. On the other side, phosphonic acid is not listed anymore in Annex II of the regulation 889/2008/EC for organic farming since October 1st 2013.

The residue definition of fosetyl aluminum according to Regulation (EC) No 396/2005 is specified as “sum of fosetyl, phosphonic acid and their salts, expressed as fosetyl”. Including phosphonic acid in the residue definition of fosetyl initiated the analysis of phosphonic acid.[6] Due to improved analytics for the detection of the comparatively polar compounds fosetyl and phosphonic acid, monitoring of plant food commodities was intensified.

The requirement of lower reporting limits for phosphonic acid is very important for baby food products according to the Regulation (EC) No. 609/2013 in compliance with the maximum residue level of 0.01 mg/kg specified in the German Ordinance on Dietetic Foodstuffs, ‘Diätverordnung’.

According to Bundesverband Naturkost Naturprodukte e.V. (BNN), phosphonic acid is generally analyzed with a limit of quantification (LOQ) between 0.010 and 0.050 mg/kg (and fosetyl with 0.010 mg/kg (10 ppb) due to the actual analytical feasibility for determination of this analyte.[7] Although their guidelines are not legally binding, BNN is an important association of organic processors, wholesalers and retailers which adopts special quality guidelines for the organic food trade in and around Germany.

State of art in the routine analytical methods are based on the official method published by the EURL-SRM “Quick Method for the Analysis of numerous Highly Polar Pesticides in Foods of Plant Origin via LC-MS/MS involving Simultaneous

Extraction with Methanol (QuPPE-Method)" version 9.2 (V 9.2) with liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry.[8] In the actual version 9.2 of the QuPPE method, the interference of the negative ion mass transition between phosphonic acid and the related, but ubiquitously present phosphoric acid (m/z 81 $\rightarrow$ 63; precursor ion $\rightarrow$ product ion) is described and a revision of the mass transition for phosphonic acid (m/z 81 $\rightarrow$ 79) has been published.[8] This is even more relevant in case of a poor chromatographic resolution of phosphoric and phosphonic acid to avoid the false-positive detection of phosphonic acid due to the presence of phosphoric acid. Adams et al. recently presented an ion chromatography tandem MS-based method using electrolytic post column eluent suppression achieving reporting levels for fosetyl and phosphonic acid in a range of 0.1 - 0.2 mg/kg in two commodities grapes and oat flour.[9] That method only meets the maximum residue levels (MRL) criteria for conventional food with regard to fosetyl and phosphonic acid.[10] The facts that phosphonic acid originates from many agrochemical sources and is forbidden in organic food underline the requirement of a highly sensitive and selective method to detect even traces in many more plant food commodities. As this topic is affecting food safety issues, it is more or less of relevance for every consumer and has to be validated for all relevant commodity groups described in the EU guidance document SANTE/11945/2015. Besides a high sensitivity for the analysis of organic food and plant-derived produce dedicated for baby food production, such a method has also to be applicable ubiquitously for using it in daily routine analysis.

Aim of this work was therefore the development of a novel highly sensitive method for evaluating fosetyl and phosphonic acid residues with regard to be accurate at the very important reporting limit of 0.010 mg/kg in fruit and vegetables. It was further aimed at using an IC-MS/MS methodology to determine phosphonic acid and fosetyl besides interferences from e.g., phosphoric acid in commodities that exemplarily cover all products that listed in the SANTE/11945/2015 document. A usual LC-MS/MS system (without the need of complex additional devices such as a post column electrolytic eluent suppressor) should be used that can be easily implemented in future routine analysis. A characterization and validation is performed according to the guidance document SANTE/11945/2015.[6]

2. Material and methods

2.1 Chemicals

Certified standards of pesticides were purchased from Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany) and Sigma-Aldrich GmbH (Taufkirchen, Germany). The stock solutions of analyte molecules were prepared at a concentration of 1 mg/mL in methanol and stored in polypropylene vials and working solutions (1 µg/mL) were prepared in water and methanol (1:1, v/v and 0.5% formic acid) in polypropylene vials and stored at -8°C in the freezer for two months. Stock solution of ¹⁸O₃-phosphonic acid (isotope labeled internal standard, ILIS) were purchased from the EU Reference Laboratory (Stuttgart, Germany). Methanol, acetonitrile, formic acid and water were supplied by Sigma-Aldrich GmbH (Taufkirchen, Germany). Ammonium bicarbonate was purchased from Sigma-Aldrich GmbH (Taufkirchen, Germany).

2.2 Sample preparation and validation study

Sample preparation was performed according to the QuPPE protocol.[8]. Samples were cryo-milled with dry ice and the homogenate was weighed in a 50 mL centrifuge tube. For commodities with a high water content (according to Annex A: Commodity groups 1 and 2 in literature[6]) such as tomato, apple, and lemon, 10 g of the homogenized fresh sample were subjected to the extraction step. In case of commodities like sultana and wheat with a low water content[6] and avocado[6], 5 g were taken and adjusted to a total weight of 10 g of water. Afterwards, 10 mL acidified methanol (containing 1% formic acid) and 0.05 mL of the ILIS (stock solution 20 µg/mL ¹⁸O₃-phosphonic acid) were added. Sample preparation was accomplished by mechanical shaking as a deviation to QuPPE protocol in an AGIA 2000 shaker (Collomix GmbH, Gaimersheim, Germany) for 5 min with a subsequent centrifugation step at 3,846 x g with a Multifuge X3 benchtop centrifuge from Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Germany). Wheat samples were additionally centrifuged at 20,813 x g for 5 min at 5 °C with an Eppendorf 5417R centrifuge from Eppendorf AG (Hamburg, Germany). Supernatants were filtered through a syringe filter (regenerated cellulose CHROMAFIL® Xtra RC-20/25, 0.20 µm, Ø 25 mm, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany) into a polypropylene vial.

To verify the absence of fosetyl and phosphonic acid in the samples of the validation study, the samples were screened for the analyte molecules. According to the method validation protocol of the actual guidance document SANTÉ/11945/2015 the

different sample commodities were spiked with the analyte compounds subsequently at the two different target concentrations 0.010 and 0.10 mg/kg in five independent biological replicates.[6] Non-spiked and spiked samples were extracted in parallel and analyzed by IC-MS-MS. For evaluating matrix effects and recovery rates, the quantification was performed with available standards in a matrix matched calibration and additional ILIS. The linearity range of the method was evaluated in the range of 5 – 250 ng/mL of calibration solvent standards and 0.01 – 0.5 mg/kg in matrix matched calibration. The accuracy (trueness and precision) of the method was evaluated in recovery experiments by spiking the blank material with analytes in concentrations of the important levels of 0.010 and 0.100 mg/kg prior to the sample extraction (each concentration n=5).

2.3 Instrumental equipment

The chromatographic system consisted of a 1290 Infinity N ultra-high performance liquid chromatography coupled to a 6495 Triple Quadrupole mass spectrometer (both Agilent Technologies Inc., Waldbronn, Germany).

Table 1: MRM transitions, CE, CAV and retention times (Rt) of the developed method.

Chromatographic separations were carried out using a Metrohm IC-column Metrosep A Supp 5 2.0/1500 (5 μ m, 2 x 150 mm), maintained at 30 °C. The mobile phases consisted of water and acetonitrile (80:20, v/v) (solvent A) and water and acetonitrile (60:40, v/v) containing 90 mM ammonium bicarbonate at pH 8 (solvent B). The following gradient elution at 0.2 mL/min flow rate was performed: (i) 0.00 min (A:B, 85:15, v/v) (ii) 17.00 min (A:B 40:60, v/v) (iii) 18.00 min (A:B, 0:100, v/v) (iv) 22:00 min (A:B, 85:15, v/v) (v) 25 min (A:B, 85:15 min, v/v). The injection volume was set at 5 μ L. The electrospray ionization source was operated in negative ionization mode with a capillary voltage set at 3000 V and nozzle voltage 300 V. Nitrogen was used as nebulizer (flow rate at 12 L/min) and desolvation gas (flow rate at 17 L/min. The desolvation temperature was set at 350 °C and source temperature at 120 °C. Two multiple reaction monitoring (MRM) transitions per analyte were monitored as shown in **Table 1** giving the settings for cell accelerated voltage (CAV), collision energy (CE) and retention time. In order to establish the optimal detection conditions primary tuning experiments were carried out via direct infusion of diluted standard solutions

(100 ng/mL) into the mass spectrometer. This process was performed for both, labeled and unlabeled standards.

Table 1. MRM transitions, CE, CAV and retention times (Rt) of the developed method.

compound	MRM ¹ [m/z]	transitions	CAV ² [V]	CE ³ [eV]	Rt [min]
phosphonic acid	81 → 79	quantifier	2	16	15.6
	81 → 63	qualifier	1	38	
¹⁸ O ₃ -phosphonic acid	87 → 85	quantifier	1	23	15.6
	87 → 67	qualifier	1	43	
phosphoric acid	97 → 79	quantifier	2	16	14.0
	97 → 63	qualifier	1	30	
fosetyl	109 → 81	quantifier	1	12	5.0
	109 → 79	qualifier	5	56	
	109 → 63	qualifier	5	77	

¹MRM: multiple reaction monitoring

²CAV: cell accelerator voltage

³CE: collision energy

2. 4 Data processing and analysis

Data acquisition and analysis was performed with Mass Hunter Workstation Software V B.08.00 Build 8.0.8023.0, Agilent Technologies Inc. (Waldbronn, Germany).

3. Results and Discussion

Instrumental analysis was conducted with a triple quadrupole mass spectrometer using ion chromatography and a stable isotopically-labelled analogue of phosphonic acid as internal standard to correct for losses in detector response and retention time shifts of the analytes. Chromatographic retention parameters, the precursor and product quantitation and qualifier ions and mass spectrometric parameters adopted for phosphonic acid, phosphoric acid, and fosetyl are summarized in **Table 1**.

The most abundant mass transition in the IC-MS/MS spectra of phosphonic acid was at *m/z* 81 to 79 in ESI negative mode. This ion can be assigned as characteristic for phosphonic acid. The second transition at *m/z* 81 to 63 showed interferences with fosetyl and phosphoric acid, with the latter occurring naturally in high amounts in

plants.[11] To achieve a highly selective chromatography and to avoid interferences with fosetyl and endogenous matrix components like phosphoric acid, a suitable gradient was developed. For a concentration of 5 ng/mL in solvent standard signal-to-noise ratios (S/N) of 27 for phosphonic acid and 75 for fosetyl were obtained. In **Figure 1**, a chromatogram of an extract of an apple sample spiked with 0.5 mg/kg of fosetyl and phosphonic acid, respectively is given. It displays the interfering mass transition at MRM m/z 81 to 63 (phosphonic acid). There are no significant interferences in the chromatography, even at high concentrations of phosphoric acid in the range of 100 – 500 mg/kg.

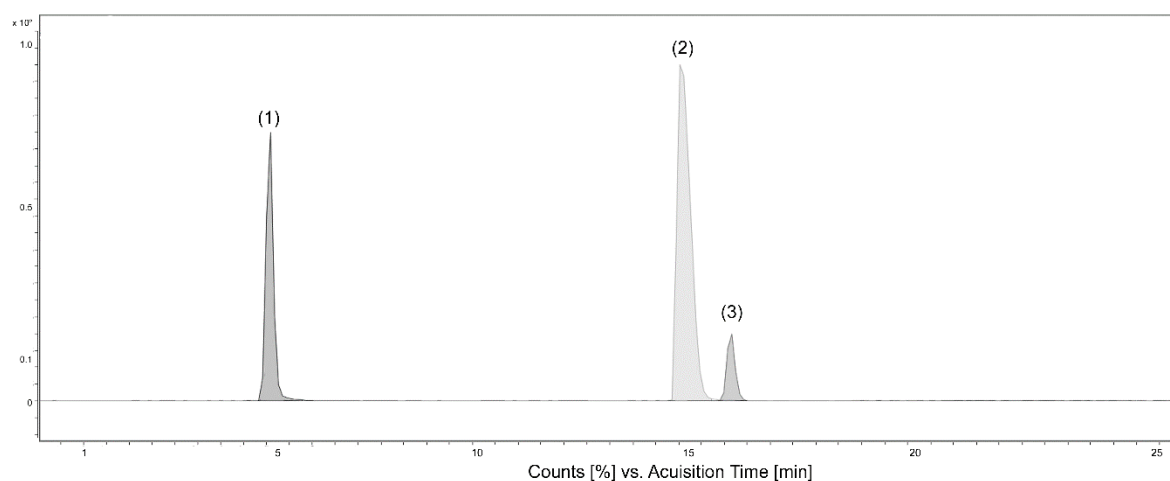


Figure 1. XIC chromatogram of 0.500 mg/kg in apple with (1) fosetyl (m/z 109 $\rightarrow$ 81), (2) phosphoric acid (m/z 97 $\rightarrow$ 63) and (3) phosphonic acid (m/z 81 $\rightarrow$ 63).

In **Figure 2** the mass transition at m/z 81 to 63 of phosphonic acid showed two peaks, one is the transition of phosphonic acid and the other one is an interfering signal of phosphoric acid. That interference signal of phosphoric acid accounted for nearly 0.5% of the area of the selective transition of m/z 97 $\rightarrow$ 63 of phosphoric acid leading to the risk of a false positive detect of phosphonic acid as published in the actual version 9.2 of the QuPPE method.[8] Thus, a main issue of this study was the establishment of a base-line separation of phosphoric and phosphonic acid to avoid false positive detections for phosphonic acid. A typical chromatogram for a separation of phosphonic and phosphoric acid is shown in **Figure 2**.

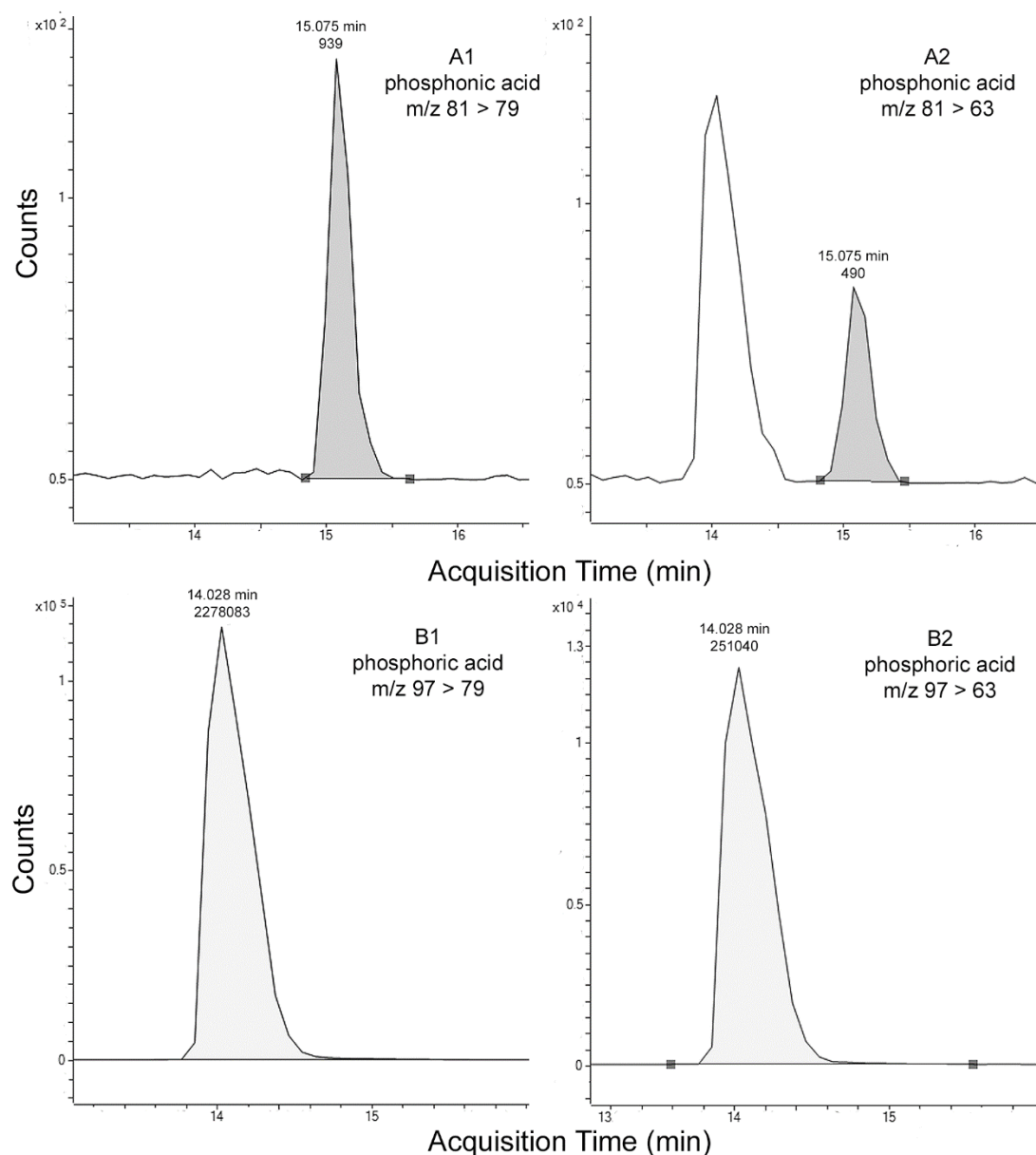


Figure 2. Chromatographically separated interferences at transitions of phosphonic acid ($m/z\ 81 \rightarrow 79$) (A1-2) and phosphoric acid ($m/z\ 97 \rightarrow 79$) (B1-2) in an apple sample at spiking level 0.010 mg/kg.

Representative matrices known to be potentially susceptible to phosphonic acid residues were screened prior to the validation study. Small amounts of naturally incurred residual phosphonic acid in the range of 0.003 mg/kg far below the reporting level of 0.010 mg/kg were identified only in apple, which was set as offset for further spiking experiments as shown in **Figure 3**. The chromatography optimized to reduce interferences and matrix effects was used for the validation study.

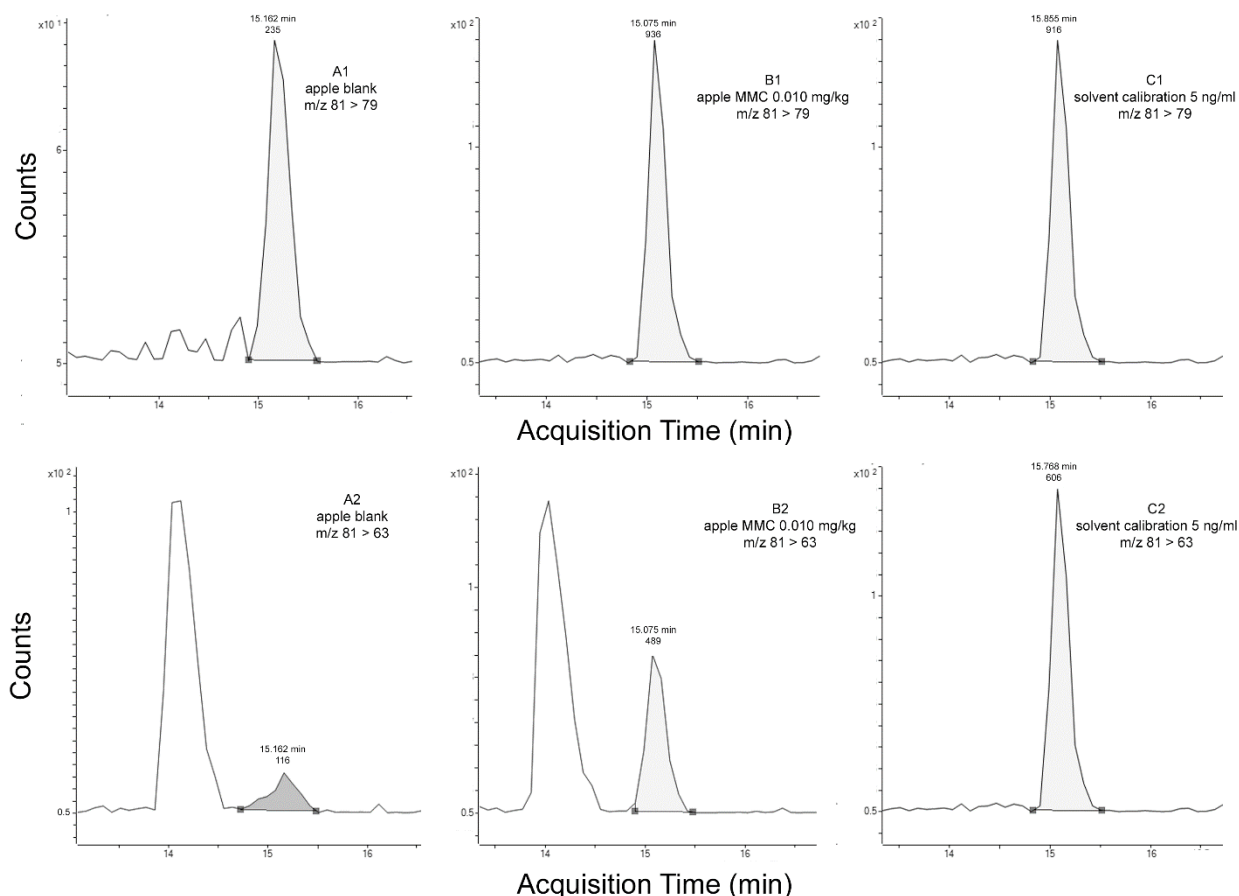


Figure 3. Incurred residues of phosphonic acid in an apple sample (A1-2), spiked procedural matrix calibration (PMC) at a spiking level of 0.010 mg/kg (B1-2) and solvent standard 5 ng/mL (C1-C2).

3.1 Validation study

The final analytical method was validated for the commodities apple, tomato, lemon, wheat, sultana, and avocado. The expanded measurement uncertainty (U) for phosphonic acid was determined with $\pm 5.75\%$ and for fosetyl $\pm 12.8\%$. Both analyte molecules displayed a linear correlation in the evaluated concentration range of 2.5 – 500 ng/mL corresponding to an analyte concentration of 0.005 – 1.000 mg/kg e.g. in commodities with a high-water content. The coefficient of correlation (R^2) was in the range of 0.9971-0.9999 for phosphonic acid and 0.9988 – 1 for fosetyl. The limit of quantification (LOQ) was estimated as the lowest concentration corresponding to 0.010 mg/kg of injected analyte that yielded a reproducible precision $\leq 20\%$ and accuracy in the range of 70 – 120% meeting the criteria according to Table 5 in guidance document SANTÉ/11945/2015.

The evaluation of matrix effects of the analyzed commodities was accomplished by comparing the slopes of regression curves obtained from the respective matrix-

matched calibration and from solvent calibration standards (**Figure 4**). Both, phosphonic acid and fosetyl displayed negative matrix effects in a range of -1% (apple) to -80% (wheat) for fosetyl and -7% (tomato) and - 58% (lemon) for phosphonic acid, respectively. These matrix interferences originate from unwanted co-extracted compounds co-eluting with the targeted analytes, resulting in ion suppression and a reduced analyte detector signal.[12, 13] The analytical method aimed at minimizing the potential matrix effects. The evaluated matrix effects were substantial; therefore, the quantification was accomplished via matrix matched calibration besides the use of an ILIS for phosphonic acid.

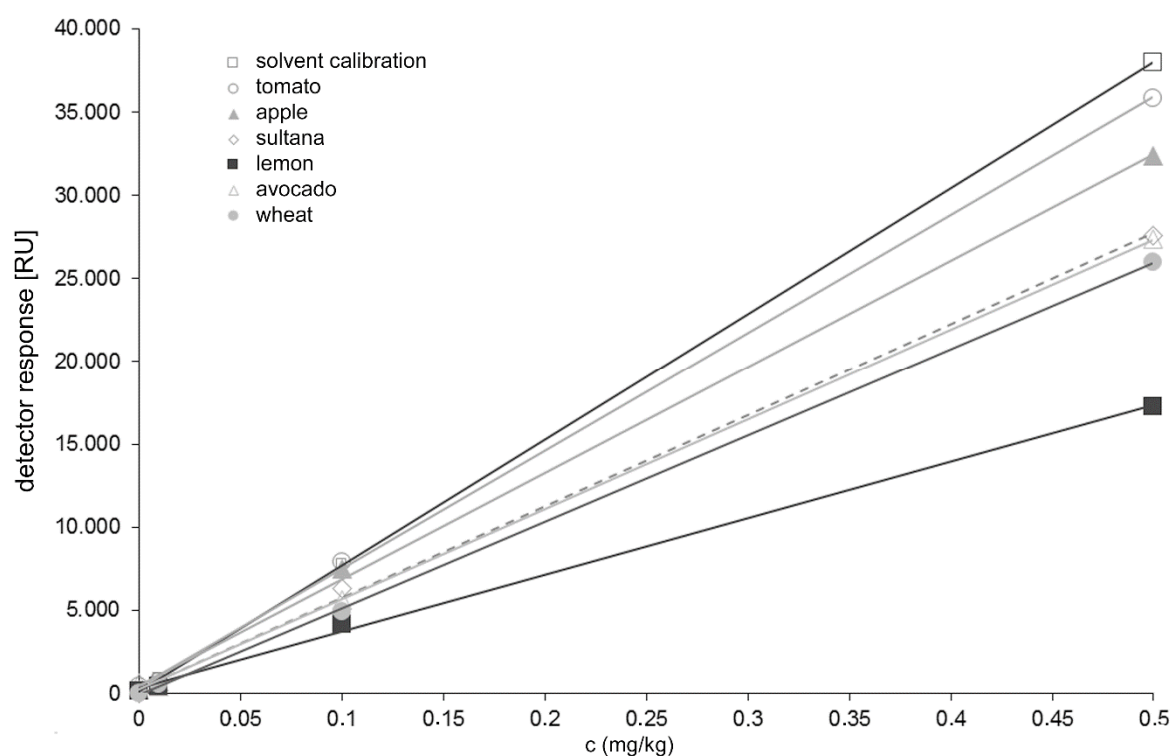


Figure 4. Phosphonic acid matrix matched calibration (MMC) curves for the analyzed commodities and solvent calibration.

The analytical method for determination of phosphonic acid and fosetyl in plant-derived commodities resulted in average absolute recovery rates in the range of 76 – 105% for the two spiking concentrations (0.010 mg/kg and 0.100 mg/kg) with a precision of RSD < 18% for both analytes (**Table 2**).

Table 2. Average recovery rates, RSDs, matrix effects and reporting limits (RLs) at two different spiking levels in six matrices for phosphonic acid and fosetyl.

commodity	compound	RL ¹ [mg/kg]	0.010 mg/kg		0.100 mg/kg		ME ³ [%]
			recovery rate [%]	RSD ² [%]	recovery rate [%]	RSD [%]	
tomato	phosphonic acid	0.010	88	7.2	92	6.8	-7
	fosetyl	0.010	106	16.1	110	7.2	-42
apple	phosphonic acid	0.010	92	8.6	97	1.5	-16
	fosetyl	0.010	98	3.9	97	1.5	-1
lemon	phosphonic acid	0.010	95	6.5	99	4.8	-58
	fosetyl	0.010	76	12.5	98	8.9	-76
avocado	phosphonic acid	0.010	93	8.9	106	5.1	-29
	fosetyl	0.010	112	10.8	113	3.9	-19
wheat	phosphonic acid	0.010	101	15.7	87	5.6	-28
	fosetyl	0.010	105	3.4	85	1.2	-80
sultana	phosphonic acid	0.010	82	3.7	80	8.5	-42
	fosetyl	0.010	92	17.8	81	8.4	-75

¹RL: reporting limit according to guidance document SANTÉ/11945/2015 RSD ≤ 20% and mean recovery 70 - 120%

²RSD: relative standard deviation

³ME: matrix effects obtained

Achieving a reporting limit of 0.010 mg/kg is quite essential, not only in the field of baby food processing, but also to identify and determine potential sources of contaminations. So far, the analysis of phosphonic acid is mainly done on carbon-based, anion exchange or HILIC columns.[8] In-house, by using HILIC columns in LC-MS/MS merely reporting levels of 0.100 mg/kg with high matrix interferences for phosphonic acid were achieved. Separation on carbon-based columns (Hypercarb, Thermo Fisher Scientific) displayed high interference effects on phosphonic acid

even after a good chromatographic separation from phosphoric acid. Besides the QuPPE Method version 9.2, there are only a few examples published based on HILIC-type columns such as Obelisc N (Sielc) or Acclaim™ Trinity Q1 (Thermo Fisher Scientific). However, those methods exhibited low sensitivity for highly polar compounds.[8, 9, 14] As mentioned above Adams et al. published recently also an ion chromatographic approach for highly polar pesticides requiring an additional instrumental equipment.[9] However, they only achieved reporting limits at 0.1 and 0.2 mg/kg for fosetyl and phosphonic acid in commodities like grapes and oat flour.[10]

The method developed in the present study enables a sensitive determination of phosphonic acid even in presence of high amounts of phosphoric acid at low trace levels for a wide spectrum of plant-derived commodities.

4. Conclusions

The method developed and validated in the present study has proven to be appropriate for purpose of monitoring fosetyl and phosphonic acid residues in plant-derived commodities at a reporting limit of 0.010 mg/kg. It is a IC-MS/MS method using isotopically labelled analogues and matrix matched calibration. In-house validation studies using tomato, apple, lemon, raisin, avocado, and wheat samples revealed that the method developed is highly robust and suitable for a cost effective and simple routine analysis of phosphonic acid as metabolite of fosetyl at trace levels following the QuPPE extraction protocol.

Furthermore, the presented analytical method is suitable for LC-MS/MS systems without the need for extra devices such as ion electrochemical suppressor systems. So, the method can be run on usual LC-MS/MS systems for easily implementing it in routine food analysis. Still, high matrix effects may require an isotopically-labelled internal standard for fosetyl as proposed in the QuPPE method version 9.2 for compensation of matrix effects with less calibration efforts necessary by using an extra matrix-matched calibration.

Nevertheless, the presented method enables a confident determination of both, fosetyl and phosphonic acid as fosetyl metabolite, but also as a single residue of further contamination and monitoring especially for organic food and plant-derived produce dedicated for baby food production.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge Simon Wald for the excellent technical assistance.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical Approval This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

5. References

- [1] Thao H. T. B., Yamakawa T., Phosphite (phosphorous acid): Fungicide, fertilizer or bio-stimulator? *J Soil Sci Plant Nutri* 2009, 55, 228–234.
- [2] Marc Wieland, Phosphonic acid: Pesticide or “foliar fertilizier”? Residues in organic and conventional samples from the german market. *Phosphonic Acid: Pesticide or “Foliar Fertilizier”? Residues in Organic and Conventional Samples from the German Market* 2014.
- [3] Malusa E., Tosi L., Phosphorous acid residues in apples after foliar fertilization: Results of field trials. *Food Addit Contam* 2005, 22, 541–548.
- [4] Lantz S. R., Casida J. E., Characterization of the transient oxaphosphetane bche inhibitor formed from spontaneously activated ethephon. *Chem Res Toxicol* 2013, 26, 1320–1322.
- [5] Commission Regulation (EU) No 991/2014 of 19 September 2014, Amending annex iii to regulation (ec) no 396/2005 of the european parliament and of the council as regards maximum residue levels for fosetyl in or on certain products. *amending Annex III to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for fosetyl in or on certain products* 2014.
- [6] SANTE/11945/2015, Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. *EUROPEAN COMMISSION* 2016.
- [7] http://www.n-bnn.de/sites/default/dateien/bilder/Downloads/FactSheet_Phosphonsaeure_phosphonic_acid_en_April_2015.pdf (last time accessed: March 5, 2017).

- [8] Anastassiades M., Kolberg D. I., Benkenstein A., Eichhorn E., Zechmann S., Mack D., Wildgrube C., Sigalov I., Dörk D., Barth A., Quick method for the analysis of numerous highly polar pesticides in foods of plant origin via lc-ms/ms involving simultaneous extraction with methanol (quppe-method): Eu reference laboratory for pesticides requiring single residue methods (eurl-srm). *QuPPE-Method* 2016.
- [9] Adams S., Guest J., Dickinson M., Fussell R. J., Beck J., Schoutsen F., Development and validation of ion chromatography-tandem mass spectrometry-based method for the multiresidue determination of polar ionic pesticides in food. *J Agric Food Chem* 2017.
- [10] EU Pesticides database. <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-data-base/public/?event=pesticide.residue.CurrentMRL&language=EN&pestResidueId=317> 22.05.2015.
- [11] Schachtman, Daniel P., Robert J. Reid, and S. M. Ayling, Phosphorus uptake by plants: From soil to cell. *Plant Physiol* 1998, 447–453.
- [12] Tang L., Kebarle P., Effect of the conductivity of the electrosprayed solution on the electrospray current. Factors determining analyte sensitivity in electrospray mass spectrometry. *Anal Chem* 1991, 63, 2709–2715.
- [13] Pizzutti I. R., Vela G. M. E., Kok A. de, Scholten J. M., Dias J. V., Cardoso C. D., Concenco G., Vivian R., Determination of paraquat and diquat: Lc-ms method optimization and validation. *Food Chem* 2016, 209, 248–255.
- [14] Schreiber A., Jin W., Lc-ms/ms quantitation of underivatized glyphosate and other polar pesticides. https://sciex.com/Documents/tech%20notes/glyphosate_analysis.pdf 13.03.2017, *LC-MS/MS Quantitation of Underivatized Glyphosate and Other Polar Pesticides*.

4.5 Multimethode für polare und anionische Pestizide mittels IC-MS/MS (Publikation V)

Ion chromatography tandem mass spectrometry (IC-MS/MS) multimethod for the determination of highly polar pesticides in plant-derived commodities

Anna Bauer^a, Jens Luetjohann^{a*}, Sascha Rohn^b, Jürgen Kuballa^a, Eckard Jantzen^a

^a*Research and Development Department, GALAB Laboratories GmbH, Am Schleusengraben 7, 21029 Hamburg, Germany*

^b*Institute of Food Chemistry, Hamburg School of Food Science, University of Hamburg, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany*

Die Analyse der anionischen polaren Pestizide und ihrer Metaboliten wird in der Regel in sogenannten Einzelbestimmungen durchgeführt, daher sollte eine gemeinsame Bestimmungsmethode für die Analyten Chlorat und Perchlorat, Ethephon und dessen Metaboliten 2-Hydroxyethephon entwickelt werden.

Anhand der im Rahmen der vorangehenden Arbeiten entwickelten Methode für Fosetyl und Phosphonsäure wurde die Entwicklung einer Multimethode für hochpolare anionische Pestizidwirkstoffe durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Evaluierungsstudie an unterschiedlichen pflanzlichen Lebensmitteln und eine Validierungsstudie entsprechend des Dokumentes SANTE/11945/2015 wurde durchgeführt.

Der eigene Anteil an dieser Veröffentlichung wird mit 40% angegeben.

Ion chromatography tandem mass spectrometry (IC-MS/MS) multimethod for the determination of highly polar pesticides in plant-derived commodities

Anna Bauer^a, Jens Luetjohann^{a*}, Sascha Rohn^b, Jürgen Kuballa^a, Eckard Jantzen^a

^a*Research and Development Department, GALAB Laboratories GmbH, Am Schleusengraben 7, 21029 Hamburg, Germany*

^b*Institute of Food Chemistry, Hamburg School of Food Science, University of Hamburg, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany*

Corresponding author:

Dr. Jens Luetjohann, GALAB Laboratories GmbH, Am Schleusengraben 7, 21029 Hamburg

E-mail address: jens.luetjohann@galab.de

Tel.: +4940368077432; Fax: +4940368077401.

Keywords: Pesticides, UHPLC-MS/MS, ion chromatography, IC-MS/MS, ethephon, 2-hydroxyethylphosphonic acid, HEPA, chlorate, perchlorate

Abstract

A new sensitive, fast, and robust analytical method based on a QuPPE (Quick Polar Pesticides) extraction procedure coupled to ion chromatography-tandem mass spectrometry (IC-MS/MS) was developed. The study aimed at the determination of the highly polar pesticides chlorate, perchlorate, ethephon, and 2-hydroxyethylphosphonic acid (HEPA) in different plant food commodities. For achieving an acceptable dynamic range for chlorate and perchlorate and to compensate for matrix effects, the isotopically-labelled internal standards ¹⁸O₃-chlorate and ¹⁸O₄-perchlorate and ethephon D₄ were applied for calibration. The optimized method was fully validated at levels of 0.010 and 0.100 mg/kg for all compounds in the matrices tomato, apple, lemon, sultana, avocado, and wheat according to the actual EU guidance document SANTE/11945/2015. For HEPA and the commodity sultana levels for validation were chosen at 0.050 mg/kg and 0.100

mg/kg. The precision and accuracy of the validation results were determined at hand of five replicates with recovery rates between 93 – 119% and RSDs between 1 – 14%. The use of internal standards for chlorate, perchlorate and ethephon allows the determination in a wide working range between 0.01 and 1 mg/kg without interference by matrix effects. The developed analytical methodology is able to meet the strict requirements for the analysis of baby food.

1. Introduction

Many pesticides and their corresponding metabolites, especially compounds of highly polar and/or ionic nature are often non extractable when applying multiresidue methods based on the traditional QuEChERS extraction. [1] Such highly polar pesticides require alternative (extraction) conditions for achieving sufficient recovery rates as well as individual chromatographic conditions to accomplish a separation of the analyte molecules from unwanted co-extractives. [2]

Highly polar pesticides amenable to the Quick Polar Pesticides (QuPPE) Method are mainly determined by means of selective single residue method (SRM) measurement modules. [3] The SRM modules are directed to the individual properties of the pesticides of interest, leading to specific requirements with regard to chromatographic and mass spectrometric conditions. Thereby, acceptable detector sensitivity and sufficient chromatographic peak capacity for elimination of negative matrix effects by matrix co-extractives including acceptable peak shapes are obtained. Though, for the acquisition of specific sets of polar pesticides in a sample, the extract has to be analyzed multiple times using different chromatographic conditions and columns leading to an extended demand in analysis time and costs. [3, 4] In this context, especially compounds such as chlorate and perchlorate are very interesting, as they are used for treating water which is afterwards used for irrigating in agriculture and or as drinking water during food production. Consequently, the risk of residues in fruits and vegetables is unavoidable. [5] The use of ethephon bears some similarities. Due to its intensive field of applications in the production of fruit and vegetables, residues are more or less ubiquitously distributed [6, 7] The need to intensify the controls for these compounds in food is apparent, especially for infant and baby food, where short-term exposure e.g. with perchlorate is critical. [5]

As mentioned above, perchlorate and chlorate mainly emerge as contaminations of fertilizers and disinfectants in drinking water systems. [8] They are highly soluble and

persistent in nature, and therefore, also found in groundwater, drinking water and beverages thereof, as well as baby formulas. [9] In some regions, they are even endogenous environmental contaminants. As a result, it is difficult to grow fruits and vegetables not contaminated by these compounds. [10]

Ethephon, a systemic growth regulator, (2-chloroethylphosphonic acid) is an organophosphorus compound and a precursor molecule for the ripening hormone ethylene. [6] The liberated ethylene is absorbed by the plant and affects the growth process. Consequently, it is used for accelerating and controlling maturation process of fruits and vegetables during storage, transport, and further processing steps until marketing. [11] However, ethephon is predominantly metabolized to 2-hydroxyethylphosphonic acid (HEPA), which is itself converted to numerous metabolites in the leaves of plants.[8] Currently, HEPA is not yet legally regulated, but is included in monitoring programs of the *German Federal Office of Consumer Protection and Food Safety* (BVL) and consequently listed in the QuPPE method V9.2. [12, 3]

According to the Regulation (EC) No. 609/2013, the MRL for ethephon, chlorate, and perchlorate have been set to 0.01 mg/kg, as also specified in the German Ordinance on Dietetic Foodstuffs ('Diätverordnung') with special regard to baby food. For this reason, achieving a reporting level of 0.010 mg/kg is quite essential, not only in the field of baby food processing, but also to identify and determine potential sources of contaminations with chlorate and perchlorate. These MRLs are independent of food origin. Furthermore, the need to intensify the controls for these compounds in food seems to be obvious, not only to prove MRL compliance, but also to assess the risk of the corresponding food intake. [6] To evaluate the compliance with MRLs, there is a need for establishing of valid analytical methods for the analytes of interest. According to the actual version 9.2 of the QuPPE method compendium, the analysis of chlorate, perchlorate, ethephon, and HEPA is accomplished according to the modules 1.3 or 1.4.

The aim of the present study was therefore the development of a novel, highly sensitive, and robust multiresidue method for the determination of anionic pesticides including ethephon, HEPA, chlorate, and perchlorate at the reporting level of 0.010 mg/kg. It should be applicable to multiple plant-derived commodities and meet most of the requirements for baby food. It was further aimed to include the compounds of interest in a single chromatographic run. Moreover, the ion chromatography approach

to be developed should be amenable for common LC-MS/MS systems without the need of additional devices such as post column electrolytic eluent suppressor units. It should be easily implemented in future routine analysis applications and characterized and validated according to the EU guidance document SANTÉ/11945/2015. [13]

2. Material and methods

2.1 Chemicals

Certified reference standards of pesticides were purchased from Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany) and Sigma-Aldrich GmbH (Taufkirchen, Germany). The stock solutions were prepared at a concentration of 1 mg mL⁻¹ using a mixture of water and methanol (1:1, v/v containing 0.5% formic acid). Final solutions were stored at 8 °C. A stock solution of ¹⁸O₃-chlorate and ¹⁸O₄-perchlorate as isotopically labelled internal standards (ILIS; 95.0 atom% ¹⁸O) were purchased from the EU Reference Laboratory SRM (Stuttgart, Germany). A stock solution of ethephon D₄ 100 µg/mL in acetone was purchased from LGC Promochem. Ammonium bicarbonate, methanol, acetonitrile, formic acid, and water were purchased from Sigma-Aldrich GmbH (Taufkirchen, Germany).

2.2 Sample preparation and validation

Sample preparation was performed according to the QuPPE protocol. [3] Samples were cryo-milled with dry ice and the homogenate was weighed in a 50 mL centrifuge tube. For commodities with a high water content such as tomato, apple, and lemon (according to Annex A: Commodity groups 1 and 2 [13]), 10 g of the homogenized fresh sample were subjected to the extraction step. In case of commodities such as sultana and wheat with a low water content and the high-oil commodity avocado, 5 g of sample material were adjusted with water to a total water weight of 10 g. Afterwards, 10 mL of acidified methanol (containing 1% formic acid) and 0.02 mL of the ILIS (stock solution 5 µg mL⁻¹ ¹⁸O₄-perchlorate and 20 µg mL⁻¹ ¹⁸O₃-chlorate) and 0.05 mL of the ILIS working solution ethephon D₄ 10 µg/mL were added. Sample preparation was accomplished by mechanical shaking in an AGIA 2000 shaker (Collomix GmbH, Gaimersheim, Germany) for 5 min and a subsequent centrifugation step at 3,846 x g with a Multifuge X3 benchtop centrifuge from Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Germany). Wheat samples were additionally centrifuged

afterwards at 20,813 x g for 5 min at 4 °C with an Eppendorf 5417R centrifuge (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). Supernatants were filtered through a syringe filter (regenerated cellulose CHROMAFIL® Xtra RC-20/25, 0.20 µm, Ø 25 mm, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany) and subjected to IC-MS-MS measurement.

To verify the absence of the target molecules at a concentration above 30% of the lowest validation level of 0.01 mg/kg in the samples of the validation study, the samples were screened for the analyte molecules. According to the method validation protocol of the actual guidance document SANTÉ/11945/2015 [13], the different sample commodities were spiked with the analyte compounds subsequently at the two different target concentrations 0.010 and 0.100 mg/kg in five independent biological replicates, with the exception of HEPA in sultana. This commodity was spiked at the validation levels of 0.050 mg/kg and 0.100 mg/kg. Non-spiked and spiked samples were extracted in parallel and analyzed by UPLC-MS/MS. For evaluating matrix effects and recovery rates, the quantification was performed with commercially available standards via matrix-matched calibration using additionally ILIS for chlorate and perchlorate. The linearity range of the method was evaluated in the range of 2.5 – 500 ng mL⁻¹ of calibration standards and 0.01 – 1.0 mg/kg in matrix matched calibration. The accuracy (trueness and precision) of the method was evaluated in recovery experiments by spiking the blank material with analytes in concentrations of the important levels of 0.010 and 0.100 mg/kg prior to the sample extraction (each concentration n=5).

2.3 Instrumental analysis

The chromatographic system consisted of a 1290 Infinity N ultra-high-performance liquid chromatography coupled to a 6495 triple quadrupole mass spectrometer (both Agilent Technologies Inc., Waldbronn, Germany). Chromatographic separations were carried out using an IC-column Metrosep A Supp 5 2.0/1500 (5 µm, 2 x 150 mm; Metrohm AG, Herisau Switzerland), kept at 30 °C. The mobile phases consisted of water and acetonitrile (80:20, v/v) (solvent A) and water and acetonitrile (60:40, v/v) containing 90 mM ammonium bicarbonate at pH 8 (solvent B). The following gradient elution at 0.2 mL min⁻¹ flow rate was performed: (i) 0.00 min (A:B, 85:15, v/v) (ii) 17.00 min (A:B 40:60, v/v) (iii) 18.00 min (A:B, 0:100, v/v) (iv) 22:00 min (A:B, 85:15, v/v) (v) 25 min (A:B, 85:15 min, v/v). The injection volume was 5 µL. The electrospray

ionization source was operated in negative ionization mode with a capillary voltage set at 3000 V and nozzle voltage at 300 V. Nitrogen was used as nebulizer (flow rate at 12 L/min) and desolvation gas (flow rate at 17 L/min). The desolvation temperature was 350 °C and source temperature 120 °C. Two multiple reaction monitoring (MRM) transitions per analyte were monitored as shown in **Table 1** giving the settings for cell accelerated voltage (CAV), collision energy (CE), and retention time. In order to establish the optimal detection conditions, primary tuning experiments were carried out via flow injection analysis of diluted standard solutions (100 ng mL⁻¹). This process was performed for both, labeled and unlabeled standards. Data acquisition and analysis was performed with Mass Hunter Workstation Software V B.08.00 Build 8.0.8023.0, Agilent Technologies Inc. (Waldbronn, Germany).

Table 1. MRM transitions, CE, CAV and retention times (Rt) of the analytes of the developed method.

compounds	MRM ¹ [m/z]	CE ² [eV]	CAV ³ [V]	Rt [min]
HEPA	125 → 79	31	1	12.9
	125 → 77	35	1	
	125 → 63	59	1	
ethephon	143 → 107	5	5	15.3
	143 → 79	22	1	
	145 → 107	5	5	
ethephon D₄	147 → 111	8	1	15.3
	147 → 79	24	1	
	147 → 35	36	1	
chlorate	85 → 69	30	3	9.1
	83 → 67	30	3	
¹⁸O₃-chlorate	89 → 71	27	1	9.1
	89 → 53	43	1	
perchlorate	99 → 83	30	8	20.1
	101 → 85	30	3	
¹⁸O₄-perchlorate	107 → 89	35	8	20.1
	107 → 71	47	1	
	107 → 53	59	1	

¹MRM: multiple reaction monitoring ²CE: collision energy ³CAV: cell accelerator voltage

3. Results and discussion

Highly polar compounds such as chlorate and ethephon, which are not commonly included in multiresidue methods, have been selected for optimization in this study. Instrumental analysis was conducted with a triple quadrupole mass spectrometer using ion chromatography and stable isotope labelled analogues of chlorate, perchlorate and ethephon as internal standards to correct matrix effect-dependent losses in detector response and to expand the dynamic range. Chromatographic and MS/MS conditions were optimized to obtain high sensitivity, low matrix interferences, and shorter analysis time. The chromatographic method was developed and thoroughly optimized to meet the requirements regarding matrix suppression in the matrix extracts derived from the different commodities of matter. In the beginning of the method development process the detector response of ethephon in the QuPPE extracts of different commodities displayed a poor reproducibility. Especially in apple ethephon was strongly affected by matrix suppression even leading to a signal extinction by 99%. These initial matrix effects were by far reduced with the finally developed gradient. After method development matrix effects for the analyte molecules of concern were evaluated for all tested commodities at each spiking level with regard to detector response and reproducibility.

MS/MS parameters were evaluated and the deprotonated molecule ions $[M-H]^-$ were observed for all the analytes ionized in negative mode and used for the setup of the multiple reaction monitoring (MRM) method. Chromatographic retention parameters, the precursor and product ion quantitation and qualifier ions and mass spectrometric parameters adopted for chlorate, perchlorate, ethephon, and HEPA are summarized in **Table 1**. A sensitive and robust methodology for targeting a reporting level of 0.010 mg/kg in six plant-derived commodities of different complexity following a QuPPE extraction was achieved. A chromatogram of a tomato matrix-matched calibration (MMC) with the most abundant ion transitions in IC-ESI-MS/MS of the targeted analytes is depicted in **Figure 1**.

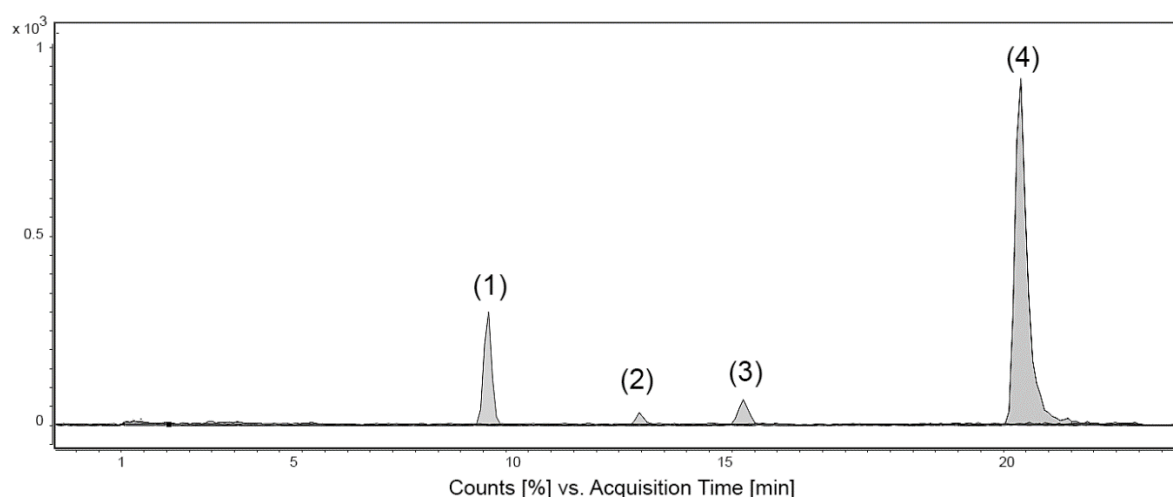


Figure 1. Extracted ion chromatogram (XIC) of a tomato MMC solution at spiking level of 0.010 mg/kg (corresponding to 5 ng mL⁻¹ final extract) with chlorate (1); HEPA (2), ethephon (3), and perchlorate (4).

Further, during the optimization of the IC-MS/MS measurement of the chlorate and perchlorate ions, two critical issues became obvious for both analytes: I) a detector saturation effect, and II) a poor reproducibility within a series of measurements, even of the same sample extract. Especially for perchlorate in challenging matrices like avocado, high matrix effects and inconsistent detector signals were observed (**Table 2**). In a series of six injections of an avocado extract at a concentration level of 0.100 mg/kg, an unacceptable variation coefficient of 70% was observed. In case of perchlorate, the use of an ILIS (¹⁸O₄-perchlorate) seems to be crucial for achieving an optimized signal for this analyte, as shown in **Figure 2**.

Furthermore, a limited dynamic range with a linearity between 1 - 50 ng mL⁻¹ corresponding to 0.002 – 0.10 mg/kg in high-water commodities was identified for chlorate and perchlorate, as shown in **Figure 3**. In the calibration curves of perchlorate and chlorate in apple extracts, a saturation plateau was observed. To exclude that the saturation effects were specific for the detector used, another IC-MS/MS system was tested with comparable results. Furthermore, a variation of the injection volume and dilution of the sample was not adequate for improving the dynamic range. ILIS analogues for both analytes displayed the same behavior concerning saturation effects in the detector systems mentioned above.

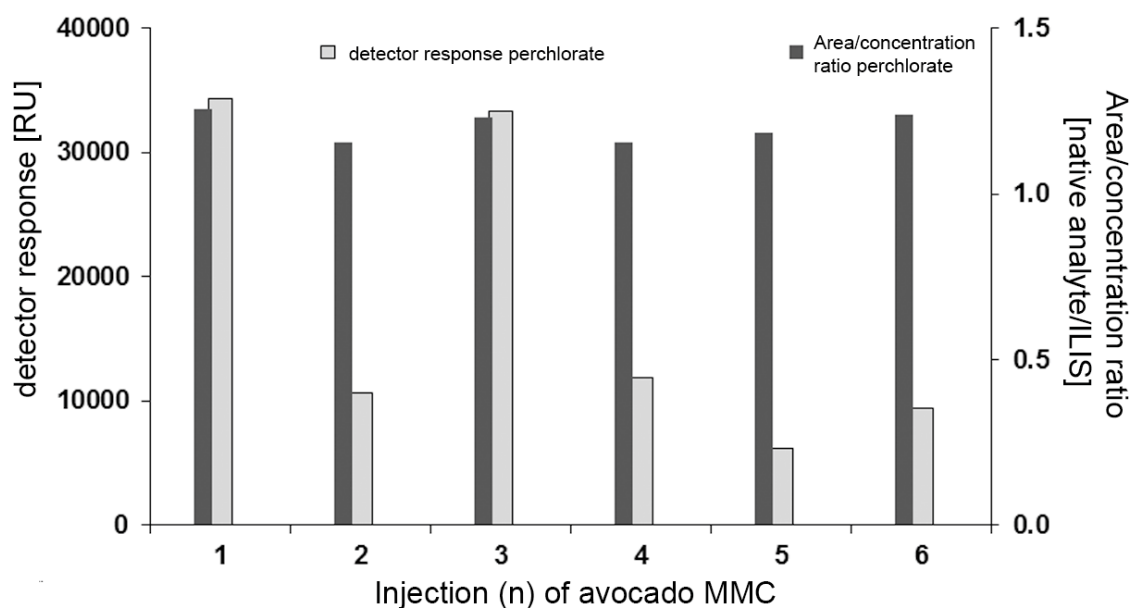


Figure 2: Detector response for six injections of the same avocado extract at a spiking level of 0.100 mg perchlorate kg⁻¹. Given are the results for detector response (blue bars) and area/concentration ratios for native analyte/ILIS (green bars) to be used for correcting the poor reproducibility.

To ensure a sufficient linearity range, it was essential to use ILIS enabling at least a dynamic range of 1 ng mL⁻¹ to 500 ng mL⁻¹ (corresponding to 0.002 to 1 mg/kg in high-water commodities) without the need of additional dilution steps and matrix-matched calibration, as shown in **Figure 3**. A simple workflow using solvent calibration via area/concentration ratios of native analyte molecules and ILIS was applied for calibration.

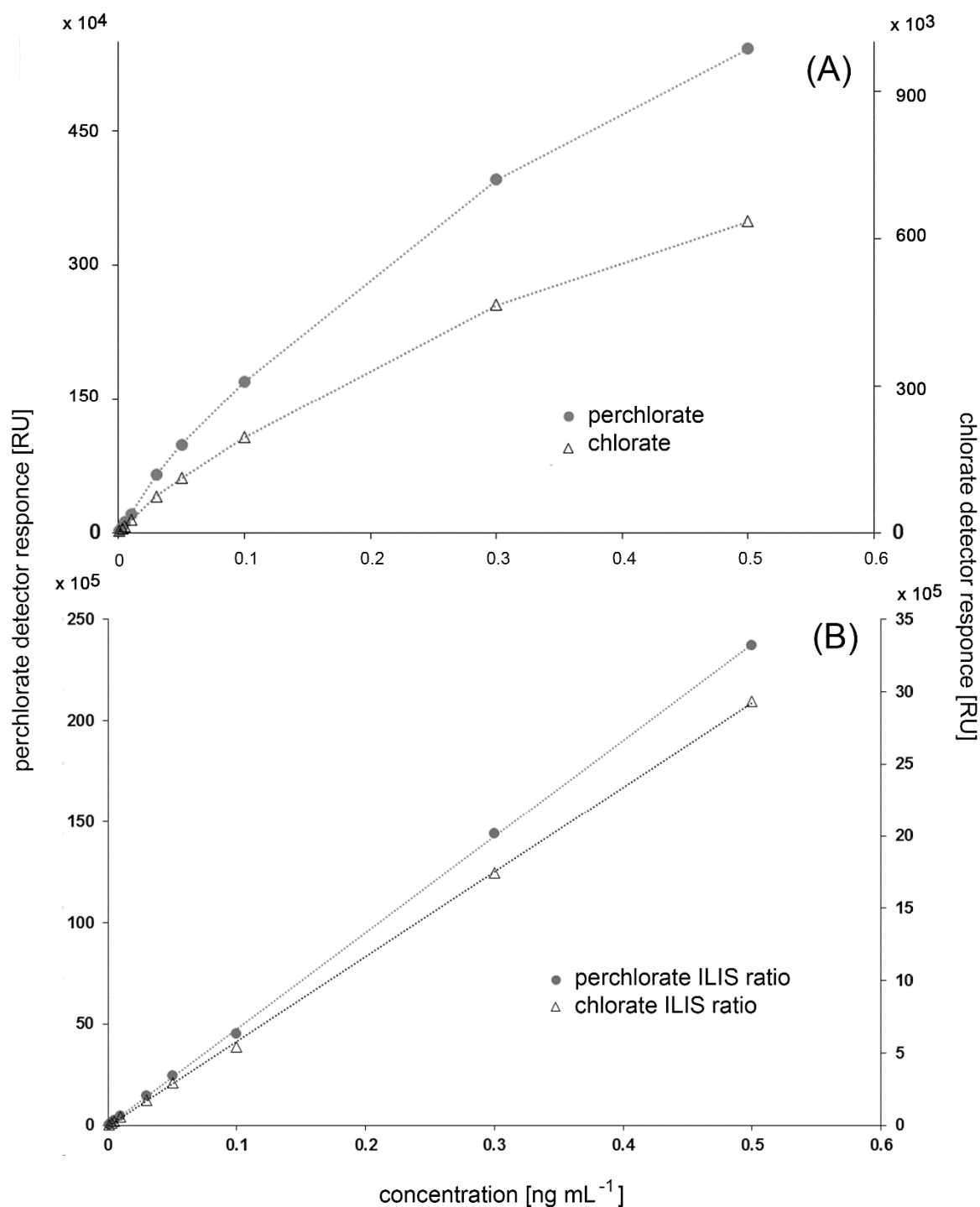


Figure 3: Calibration of chlorate and perchlorate from 0.001 mg/kg to 0.500 mg/kg in apple. (A) MMC and (B) the corresponding calibration using area/concentration ratios of native analyte molecules/ILIS.

3.1 Validation study

Validation of the method was accomplished with wheat, apple, avocado, sultana, lemon, and tomato as varying and important matrices. These matrices were screened prior to the validation for naturally occurring residues of the analyte molecules of interest. Any positive finding of analyte molecules was detected above 30% of the

lowest validation level. The expanded measurement uncertainty was $\pm 5.7\%$ for chlorate, $\pm 6.4\%$ for ethephon, $\pm 8.1\%$ for HEPA and $\pm 3.9\%$ for perchlorate at a spiking-level of 0.100 mg/kg.

All analytes displayed a linear correlation in the concentration range of 2.5 to 500 ng mL⁻¹. The coefficient of correlation (R^2) was in the range of 0.9964-0.9995 for all analytes, with the exception of HEPA in the commodity sultana where the reporting level (RL) was estimated as the lowest analyte concentration at 0.010 mg/kg. The precision was $\leq 20\%$ and accuracy was in the range of 70 – 120%. Both meeting the criteria according to Table 5 in guidance document SANTÉ/11945/2015. For HEPA, the RL was 0.050 mg/kg for sultana, due to a coeluting chemical interference of the sultana matrix observed for all three ion transitions for HEPA.

The recovery rates for the analyzed compounds were between 96 – 119% at the two spiking-levels (0.010 mg/kg and 0.100 mg/kg) with a precision of RSD < 13% (**Table 2**).

In this work, a MRM method for the determination of four analytes from different anion classes in one method was established achieving reporting levels of 0.010 mg/kg in multiple plant-derived commodities. In the actual version 9.2 of the QuPPE method compendium as outlined earlier in modules 1.3 and 1.4, respectively the analyte molecules chlorate, perchlorate, ethephon, HEPA are separated using a carbon-based column (e.g., porous graphite). [3] In-house analysis using modules 1.3 and 1.4 on a carbon-based column displayed poor sensitivity, significant and irreproducible retention time shifts and high matrix interferences for the investigated compounds (data not shown). Applying chromatographic separation on mixed-mode and HILIC columns gave a poor LOQ of 0.050 mg/kg for ethephon in different commodities. [14] Few studies exist using different HILIC and mixed-mode columns, but all displaying a poor sensitivity for the analyte molecules of interest lacking their determination in one analytical run. [15] Recently, Adams et al. presented an ion chromatography tandem MS-based method with an electrolytic post column eluent suppressor and the inclusion of perchlorate, chlorate, and ethephon in two matrices grape and oat flour achieving reporting levels at 0.010 mg/kg. The methodology presented in that publication required the use of additional instrumental equipment, an electrolytic eluent suppressor unit. However, they described that their method is not appropriate for a validation study for ethephon in the commodity creamy porridge which was chosen to be representative for baby food. Also HEPA, the major

ethephon metabolite was not included in that study. [16] In that study, oat flour and grapes were validated at a reporting level of 0.010 mg/kg for the analytes of interests, while ethephon was not possible to be validated in the commodity porridge (infant food). [16]

After the validation process, our newly developed method was implemented into routine analysis for the legally-relevant pesticides ethephon, chlorate and perchlorate in plant-derived commodities at GALAB Laboratories GmbH in the beginning of 2017. Since that time point 13.285 samples were analyzed for ethephon. In 1.451 samples (corresponding to 11% of total samples) ethephon residues > the reporting level of **Table 2**. Average recovery rates, RSD, matrix effects obtained (ME) and reporting limit (RL) at 2 different spiking levels for HEPA, ethephon, chlorate and perchlorate in the six matrices tested.

0.010 mg/kg were identified. The residue values for different commodities were in a range of 0.010 – 1.52 mg/kg. A more detailed information is given in **Table S-1**. For perchlorate 4.416 samples were analyzed with 787 samples > RL of 0.010 mg/kg corresponding to 18% of all samples. Detailed data can be taken from **Table S-2**. Chlorate was tested in 4147 samples with 1815 samples > RL of 0.010 mg/kg corresponding to 43.8% of all samples, detailed information is given in **Table S-3**.

The ethephon metabolite HEPA will be implemented into routine analysis for monitoring purposes in 2018. Recovery rates for ethephon, chlorate and perchlorate were between 80 – 120% in the samples investigated routine analysis as depicted in **Table S-4** in the supplementary information section. The RSD ranges for biological replicate determinations were < 20% as outlined in the supplementary information in **Table S-5**.

In the present study, the compounds ethephon, HEPA, chlorate, and perchlorate were validated for six plant-derived commodities of different complexity level. Except of HEPA in the commodity sultana, a reporting level of 0.010 mg/kg meeting the requirements for baby food was successfully established. With the IC methodology applied no extra electrolytic eluent suppressor devices are needed. The method developed in the present study enables a sensitive determination of ethephon, its metabolite HEPA, chlorate, and perchlorate at low trace levels for a wide spectrum of challenging plant-derived commodities in daily routine work.

Table 2. Average recovery rates, RSD, matrix effects obtained (ME) and reporting limit (RL) at 2 different spiking levels for HEPA, ethephon, chlorate and perchlorate in the six matrices tested.

commodity	compound	RL ¹ (mg/kg)	0.010 mg/kg		0.100 mg/kg		ME ³ (%)
			recovery rate (%)	RSD ² (%)	recovery rate (%)	RSD ² (%)	
tomato	HEPA	0.01	100	12	100	2	-8
	ethephon	0.01	100	5	100	4	17
	chlorate	0.01	112	2	104	1	-30
	perchlorate	0.01	117	1	102	1	-13
apple	HEPA	0.01	96	14	100	2	1
	ethephon	0.01	100		100		-26
	chlorate	0.01	104	1	102	1	27
	perchlorate	0.01	97	1	97	1	-2
lemon	HEPA	0.01	100	13	100	2	-14
	ethephon	0.01	100	6	100	3	-36
	chlorate	0.01	107	2	101	1	-44
	perchlorate	0.01	106	2	94	1	-56
avocado	HEPA	0.01	100	12	100	5	-13
	ethephon	0.01	100	12	100	2	-9
	chlorate	0.01	116	3	101	3	-72
	perchlorate	0.01	93	2	95	1	-63
wheat	HEPA	0.01	100	4	100	5	-35
	ethephon	0.01	100	9	100	3	-15
	chlorate	0.01	99	1	101	1	-61
	perchlorate	0.01	109	1	99	1	-54
sultana	HEPA	0.05	-	-	100	5	-55
	ethephon	0.01	100	11	100	4	-53
	chlorate	0.01	102	14	101	2	-17
	perchlorate	0.01	119	4	97	1	-53

¹RL: reporting limit according to guidance document SANTÉ/11945/2015 RSD ≤ 20% and mean recovery 70 - 120%

²RSD: relative standard deviation

³ME: matrix effects obtained

4. Conclusions

The method developed and validated in the presented study has proven to be appropriate for purpose of monitoring residual levels of chlorate, perchlorate, ethephon, and HEPA in several representative plant-derived commodities at a reporting level of 0.010 mg/kg. Only HEPA in the commodity sultana was validated at a reporting level of 0.050 mg/kg in a working range from 0.010/0.050 to 1.000 mg/kg. In this IC-MS/MS method, the use of ILIS analogues for chlorate, perchlorate and ethephon allows to use solvent calibration curves for quantification, besides matrix-matched calibration. In-house validation studies were accomplished using tomato, apple, lemon, sultana, avocado, and wheat. The method offers a high robustness and is suitable for a cost-effective and straightforward routine analysis starting with an SRM to a multi method of highly polar anionic pesticides at trace levels following the QuPPE extraction process in a single analytical run. Furthermore, the presented analytical method is suitable for LC-MS-MS systems without the need of extra devices such as ion electrolytic suppressor systems. So, the method can be run on common LC-MS/MS systems and easily implemented in routine food analysis applications. The validity and functionality of the developed method has already been successfully proven by field-testing in routine analysis for the pesticides ethephon, chlorate, and perchlorate.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge Simon Wald for the excellent technical help.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical Approval This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

Appendix

Supplementary material

Table S-1: Residue data for ethephon in non-spiked samples from routine analysis (a total of 13.285 samples with 1.451 samples > RL of 0.010 mg/kg corresponding to 11% of total samples).

Table S-2: Residue data for perchlorate in non-spiked samples from routine analysis (a total of 4.416 samples with 787 samples > RL of 0.010 mg/kg corresponding to 18% of total samples).

Table S-3: Residue data for chlorate in non-spiked samples from routine analysis (a total of 4147 samples with 1815 samples > RL of 0.010 mg/kg corresponding to 43.8% of total samples).

Table S-4: Recovery rates of the analyte compounds of this study in routine analysis.

Table S-5: Standard deviations within replicate determinations of the analyte compounds of this study in routine analysis in non-spiked samples.

5. References

- [1] Anastassiades M., Lehotay S. J., Stajnbaher D., Schenck F. J., 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* 2003, 86, 412–431.
- [2] Masiá A., Suarez-Varela M. M., Llopis-Gonzalez A., Picó Y., Determination of pesticides and veterinary drug residues in food by liquid chromatography-mass spectrometry: A review. *Anal Chim Acta* 2016, 936, 40–61.
- [3] Anastassiades M., Kolberg D. I., Benkenstein A., Eichhorn E., Zechmann S., Mack D., Wildgrube C., Sigalov I., Dörk D., Barth A., Quick method for the analysis of numerous highly polar pesticides in foods of plant origin via lc-ms/ms involving simultaneous extraction with methanol (quppe-method): Eu reference laboratory for pesticides requiring single residue methods (eurl-srm). *QuPPE-Method* 2016.
- [4] <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/AR-IC-MS-Food-Safety-Labs-LCGC-0716-EN.pdf> (last time accessed: June 8, 2017).
- [5] Federeal Office of Consumer Protection and Food Safety, (bvl) - report 11.3 berichte zur lebensmittelsicherheit monitoring. *BVL-Report 11.3 Berichte zur Lebensmittelsicherheit* 2015.

- [6] <http://cvuas.untersuchungsämter-bw.de/pdf/EthephonPM034.pdf> (last time accessed: June 11, 2017).
- [7] Rademacher W., Brahm L., in: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2000.
- [8] Audley B. G., Archer B. L., Carruthers I. B., Metabolism of ethephon (2-chloroethylphosphonic acid) and related compounds in *Hevea brasiliensis*. *Arch Environ Contam Toxicol*. 1976, 4, 183–200.
- [9] Sijimol M. R., Mohan M., Dineep D., Perchlorate contamination in bottled and other drinking water sources of Kerala, southwest coast of India. *Energ Ecol Environ* 2016, 1, 148–156.
- [10] Logan B. E., A review of chlorate- and perchlorate-respiring microorganisms. *Bioremediation Journal* 2010, 2, 69–79.
- [11] El-Okazy A. M., The effects of combination of gibberellic acid-3 (GA₃) and ethephon (2-chloroethyl phosphonic acid) (plant growth regulators) on some physiological parameters in mice. *J Egypt Public Health Assoc* 2008, 83, 67–86.
- [12] Federal Office of Consumer Protection and Food Safety, (BVL) - Berichte zur Lebensmittelsicherheit 2011. *Monitoring* 2011.
- [13] SANTE/11945/2015, Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. *EUROPEAN COMMISSION* 2016.
- [14] Hanot V., Joly L., Bonnechère A., van Loco J., Rapid determination of ethephon in grapes by hydrophilic interaction chromatography tandem mass spectrometry. *Food Anal Methods* 2015, 8, 524–530.
- [15] Vass A., Robles-Molina J., Perez-Ortega P., Gilbert-Lopez B., Dernovics M., Molina-Diaz A., Garcia-Reyes J. F., Study of different HILIC, mixed-mode, and other aqueous normal-phase approaches for the liquid chromatography/mass spectrometry-based determination of challenging polar pesticides. *Anal Bioanal Chem* 2016, 408, 4857–4869.
- [16] Adams S., Guest J., Dickinson M., Fussell R. J., Beck J., Schoutsen F., Development and validation of ion chromatography-tandem mass spectrometry-based method for the multiresidue determination of polar ionic pesticides in food. *J Agric Food Chem* 2017.

4.6 Multimethode für polare und kationische Pestizide mittels LC-MS/MS (Publikation VI)

Development of an LC-MS/MS method for the simultaneous determination of the quaternary ammonium herbicides paraquat, diquat, chlormequat, and mepiquat in plant-derived commodities

Anna Bauer^a, Jens Luetjohann^{a*}, Sascha Rohn^b, Jürgen Kuballa^a, Eckard Jantzen^a

^a*Research and Development Department, GALAB Laboratories GmbH, Am Schleusengraben 7, 21029 Hamburg, Germany*

^b*Institute of Food Chemistry, Hamburg School of Food Science, University of Hamburg, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany*

Für die kationischen, hochpolaren Wirkstoffe Chlormequat, Mepiquat, Paraquat und Diquat sollte eine Multimethode entwickelt werden. Diese Substanzen stellen im Hinblick auf die polaren Pestizide einen Sonderfall dar, da es sich hierbei um stets geladene Mono- und Dikationen-Analyten handelt.

Zunächst wurde eine LC-MS/MS Methode für die Bestimmung der quartären Ammoniumverbindungen entwickelt. Anschließend wurde ein Verfahren zur Extraktion dieser Komponenten aus pflanzlichen Basisprodukten entwickelt und optimiert. Danach erfolgte eine Evaluierungsstudie an unterschiedlichen pflanzlichen Lebensmitteln und die Durchführung einer Validierungsstudie entsprechend des Dokumentes SANTE/11945/2015.

Der eigene Anteil an dieser Veröffentlichung wird mit 40% angegeben.

Development of an LC-MS/MS method for simultaneous determination of the quaternary ammonium herbicides paraquat, diquat, chlormequat, and mepiquat in plant-derived commodities

Anna Bauer^a, Jens Luetjohann^{a*}, Sascha Rohn^b, Jürgen Kuballa^a, Eckard Jantzen^a

^a *Research and Development Department, GALAB Laboratories GmbH, Am Schleusengraben 7, 21029 Hamburg, Germany*

^b *Institute of Food Chemistry, Hamburg School of Food Science, University of Hamburg, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany*

Corresponding author:

Dr. Jens Luetjohann, GALAB Laboratories GmbH, Am Schleusengraben 7, 21029 Hamburg

E-mail address: jens.luetjohann@galab.de

Tel.: +4940368077432; Fax: +4940368077401.

Keywords: diquat, paraquat, chlormequat, mepiquat, chia seed, LC-MS/MS

Abstract

An optimized method for the determination of residues of the plant growth regulators chlormequat, mepiquat, paraquat, and diquat in plant-derived commodities using LC-MS/MS was developed. As an exemplary, but very challenging commodity, the focus was set on the oil seed chia and the coverage of incurred residues of these quaternary ammonium compounds. The study describes the evaluation of optimum extraction conditions, particularly of the extraction solvent and a potential thermal treatment. The final procedure was accomplished by the extraction solvent methanol/hydrochloric acid at room temperature without the application of an extra heating step. The LC-MS/MS measurement was performed on an Obelisc R column (SIELC) within 16 minutes of separation time. For compensating matrix effects and differences in recovery rates, the isotopically-labelled internal standards (ILIS) diquat d₄, paraquat d₆, mepiquat d₃, and chlormequat d₄ were added to the samples prior to

the extraction. The validation of the method for the matrices tomato, lemon, sultana, wheat, and chia seed was carried out according to the actual guidance document SANTE/11945/2015 by the European Commission. The precision and accuracy were determined in five replicates at residual levels of 0.010 mg/kg and 0.100 mg/kg obtaining recovery rates between 77-120% and RSDs between 1-13%. By means of the analytical method developed, it is possible to meet the strict requirements for the analysis of organic and baby food.

1. Introduction

Chlormequat (2-chloroethyltrimethylammonium ion, CQ), mepiquat (1,1-Dimethylpiperidinium ion, MQ), paraquat (1,10-dimethyl-4,4'-bipyridinium ion, PQ) and diquat (1,1'-ethylenedimethyl-4,4'-bipyridinium ion, DQ) belong to the group of quaternary ammonium salts ('quats'). [1] Their structural formulas are depicted in **Figure 1**. Paraquat and diquat are bipyridylium herbicides, widely used all over the world. Diquat is a non-selective herbicide, contact desiccant, and frequently used for weed control. [2] Paraquat is used as active agent for controlling weed, but has been banned in the EU since 2007 [2, 3] Chlormequat and mepiquat are quaternary ammonium salts used as plant growth regulators for reducing unwanted longitudinal shoot growth without lowering plant productivity. [4]

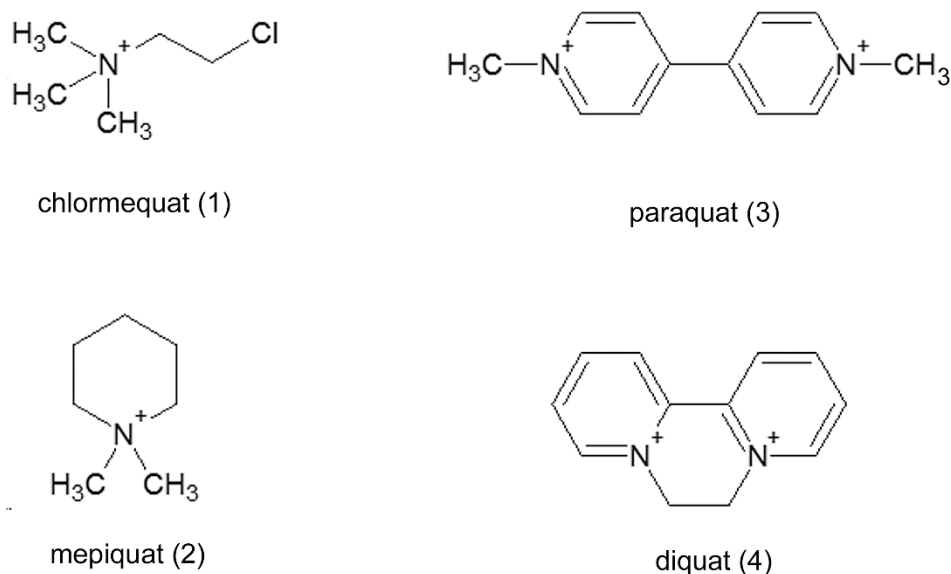


Figure 1 Chemical structures of the analyte molecules paraquat (1), diquat (2), chlormequat (3) and mepiquat (4) [11].

European Union (EU) maximum residue levels (MRLs) for the most types of fruits and vegetables are set at 0.05 mg/kg for chlormequat, and 0.02 mg/kg for mepiquat, diquat, and paraquat.

Due to their physiochemical properties quats require specific extraction and chromatography conditions and are not amenable to multi-residue methods. In order to their high polarity and a permanent cationic character they exhibit a strong tendency to interact significantly with various surfaces and matrices. [5, 4, 6, 2] Nonetheless, numerous analytical methods and techniques have been reported for the determination of quats using liquid chromatographic separation such as mixed-mode, HILIC, or ion pair chromatography. [7–11, 1] In the past, we often observed inconsistent results from different laboratories obtained for paraquat and diquat for the same sample, in particular for the commodity chia seed. This suggests problems with the chromatographic and mass spectrometric behavior resulting from the types of detected quasi-molecular ions as single $[M - H^+]$ or double charged $[M^{2+}]$ cations or radical cations $[M^{\bullet+}]$. [2, 12] Kolberg et al. (2012) developed a method for paraquat and diquat using isotopically labelled standards to improve the robustness and accuracy. [6] The current state of the art method for extraction and instrumental analysis of highly polar pesticide compounds is the Quick Polar Pesticides Method (QuPPE method, version V 9.2) developed by the European Union Reference Laboratory for Residues of Pesticides for Single Method Residue Methods (EURL-SRM). [13]

The aim of the presented study was the development of an optimized, but more simplified analysis method for the quaternary ammonium salts paraquat, diquat, mepiquat, and chlormequat. Besides their toxicology, they are one of the most challenging parameters due to their chromatographic behavior and their high adsorption to glass surfaces. [14–16] Based on the QuPPE method (V 9.2), especially the extraction of these four cationic pesticides should be optimized and simplified without the need of a heating step. [17] The final method should be applicable to a wide range of plant-derived commodities, in particular for the oil seed commodity chia seed being one of the most difficult matrices for the extraction of these pesticide parameters. [18] Finally, a validation for chia seed, wheat, tomato, lemon, and sultana was performed according to guidance document SANTE/11945/2015. [19]

2. Material and methods

2.1 Chemicals

Certified standards of chlormequat (purity: 99.0%), mepiquat (purity: 99.0%), paraquat dichloride hydrate (purity: 99.2%) purchased from Dr. Ehrensdorfer GmbH (Augsburg, Germany), Sigma-Aldrich GmbH (Taufkirchen, Germany) and diquat dibromide monohydrate (purity: 94.3%) were purchased from Honeywell Riedel-de Haën AG (Seelze, Germany) and Chem Service INC (West Chester, USA), respectively. Deuterated standards of diquat (d₄) dibromide (purity: 98%), mepiquat (d₃) iodide (purity: 99%), chlormequat (d₄) chloride (purity: 98%), and paraquat (d₆) diiodide (purity 98%) were purchased from Sigma-Aldrich GmbH (Taufkirchen, Germany), BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH (Eching, Germany), Dr. Ehrensdorfer GmbH (Augsburg, Germany), and Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada). The stock solutions were prepared at a concentration of 1 mg/mL in a solvent mixture containing water and methanol (1:1, v/v and 0.5% formic acid) and stored at +8 °C. Ammonium formate, acetonitrile, formic acid, methanol, and water were from Sigma-Aldrich GmbH (Taufkirchen, Germany).

2.2 LC-MS/MS experimental conditions

Separation of the compounds was accomplished with a 1290 Infinity N ultra-high performance liquid chromatography system coupled to a 6495 Triple Quadrupole mass spectrometer (MS/MS) (both Agilent Technologies Inc., Waldbronn, Germany). The chromatographic separation was carried out using an Obelisc R 150 x 2.1 mm, 5 µm particle size column from SIELC Technologies (Wheeling, USA) maintained at 40 °C. The mobile phases consisted of 20 mM ammonium formate in water acidified to a pH value of 3 using formic acid (solvent A) and acetonitrile (solvent B). The following gradient elution at 0.4 mL/min flow rate was performed: (i) 0.00 min (A:B, 30:70, v/v) (ii) 4.00 min (A:B 80:20, v/v) (iii) 7.50 min (A:B, 80:20, v/v) (iv) 7.60 min (A:B, 30:70, v/v) (v) 11 min (A:B, 95:5, v/v), (vi) 14.5 min (95:5, v/v) (vii) 14.6 min (30:70, v/v) (viii) 16.00 min (30:70, v/v). The injection volume was set to 1 µL. The electrospray ionization source was operated in positive ionization mode with a capillary voltage set at 3000 V and nozzle voltage 300 V. Nitrogen was used as nebulizer (flow rate at 12 L/min) and desolvation gas (flow rate at 17 L/min). The desolvation temperature was set to 350 °C and source temperature was 120 °C. Two or more multiple reaction monitoring (MRM) mass transitions per analyte molecule were monitored as shown in

Table 1, also giving the settings for cell accelerated voltage (CAV), collision energy (CE), and retention time (Rt) of the analyte molecules, and their corresponding isotopically labeled internal standards (ILIS). In order to establish the optimal detection conditions, primary tuning experiments were carried out via flow injection analysis (FIA) of diluted standard solutions (100 ng/mL). This process was performed for both, labeled and unlabeled standards. Data acquisition and analysis was performed with Mass Hunter Workstation Software V B.08.00 Build 8.0.8023.0, Agilent Technologies Inc. (Waldbronn, Germany).

Table 1. MRM transitions, CE, CAV and retention times (Rt) of the analyte and ILIS parameters of the developed method.

compound	MRM ¹ [m/z]	mass transitions	CAV ² [V]	CE ³ [eV]	Rt [min]
chlormequat	122 > 58	quantifier	3	30	2.00
	124 > 58	qualifier	3	30	
mepiquat	114 > 98	quantifier	3	30	2.29
	114 > 58	qualifier	3	30	
paraquat	186 > 171	quantifier	3	25	5.13
	186 > 77	qualifier	3	50	
	186 > 155	qualifier	3	48	
diquat	184 > 78	quantifier	3	60	5.29
	184 > 128	qualifier	3	60	
	183 > 157	qualifier	3	20	
	184 > 156	qualifier	3	30	
diquat d₄	188 > 155	quantifier	1	39	5.29
	188 > 128	qualifier	1	59	
chlormequat d₄	126 > 67	quantifier qualifier	1	27	2.00
	126 > 59		1	27	
mepiquat d₃	117 > 61	quantifier qualifier	1	31	2.29
	117 > 42		1	60	
paraquat d₆	192 > 77	quantifier qualifier	1	60	5.13
	192 > 174		1	31	

¹MRM: multiple reaction monitoring

²CAV: cell accelerator voltage

³CE: collision energy

2.3 Sample preparation and validation experiments

Samples were cryomilled with dry ice for the commodities lemon, tomato, and sultana. The homogenates were weighed in 50 mL centrifuge tubes. 5 g of tomato or lemon, and 2 g of chia seed, wheat, or sultana of the homogenized fresh sample were subjected to the extraction steps.

For primary extraction experiments sample preparation was accomplished according to the QuPPE method (Quick Polar Pesticides Method). [13] The results of a variation of analysis conditions were evaluated using different extraction solutions, and extraction temperatures. Extraction at room temperature and at elevated temperatures (80 °C for 15 minutes with an additional cooling step in a cold-water bath prior to centrifugation steps) were tested.

The final conditions for sample extraction after method development were as follows: 20 mL of the extraction solution containing demineralized water, methanol, hydrochloric acid (1 M) (50:25:25, v/v/v), and 0.05 mL of the ILIS solution (1 µg/mL diquat d₄, paraquat d₆, chlormequat d₄, and mepiquat d₃) were added. Sample preparation was further carried out by mechanical shaking (Collomix GmbH, Gaimersheim, Germany) for 5 min with a subsequent centrifugation step at 3,846 x g with a Multifuge X3 benchtop centrifuge from Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Germany). Subsequently, samples were additionally centrifuged at 20.813 x g for 5 min with an Eppendorf 5417R centrifuge (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). Supernatants were passed through a syringe filter (regenerated cellulose CHROMAFIL® A-45/25, 0.45 µm, Ø 25 mm, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany) into a vial.

To verify the absence of the target compounds in the samples for the validation study, samples were screened. According to the method validation protocol of the actual guidance document SANTÉ/11945/2015 [19], the different sample commodities were spiked with the analyte compounds for reaching the two different target concentrations 0.010 and 0.100 mg/kg in five independent biological replicates. Non-spiked and spiked samples were extracted in parallel and analyzed by LC-MS/MS. For evaluating matrix effects and recovery rates, the quantification was performed via commercially available reference standards in a matrix-matched calibration and use of an additional calibration via the ILIS compounds. The linearity of the method was evaluated in the range of 1 - 500 ng/mL of solvent calibration standards and 0.010 - 1.000 mg/kg in matrix-matched calibration, respectively. The

accuracy (trueness and precision) of the method was evaluated in recovery experiments by spiking the blank material with analytes at concentrations of the important levels of 0.010 and 0.100 mg/kg prior to the sample extraction (each concentration n=5).

3. Results and discussion

3.1 Method development and evaluation

Instrumental analysis was performed with a triple quadrupole mass spectrometer using multiple separation mechanisms (reverse-phase, hydrophilic-interaction, ion-exchange-chromatography) of an Obelisc R column and stable isotopically labelled analogues of chlormequat, mepiquat, paraquat, and diquat as internal standards to potentially correct for matrix effects, low recovery rates, and retention time shifts of the analyte molecules. Chromatographic retention parameters, the precursor and product quantitation and qualifier ions, as well as mass spectrometric parameters evaluated for chlormequat, mepiquat, paraquat, and diquat are summarized in **Table 1**. Paraquat and diquat cations were observed as molecular ion radicals $[M^{\bullet+}]$ with m/z 186 and 184. Diquat cation was detected as well as dehydrogenated molecular ion radicals $[M^{\bullet+} - H]$ at m/z 183. Chlormequat and mepiquat were detected as single charged cations $[M^+]$ as also described by Pizzutti et al. [2] Identical mass transitions were described by Kolberg et al and included in the actual version V 9.2 of the QuPPe method. [6, 13]

The chromatographic conditions were modified according to Kolberg et al. [6] for the analysis of diquat and paraquat and complemented by the analytes chlormequat and mepiquat. To resolve all four analyte molecules chromatographically and for avoiding memory effects in the case of paraquat, as observed during the method development, an optimized solvent gradient was developed. A second ramp increasing the aqueous phase A and a re-equilibration step were introduced after 7.5 minutes run time to give a total run time of 16 minutes. Particularly, the second ramp reduced carryover effects for paraquat from primarily 5% to an acceptable level of below 0.5%. The most abundant mass transitions in the LC-MS/MS spectra in ESI positive mode are displayed in **Figure 2** giving the example of an extract of a blank chia seed sample at a spiking level of 0.050 mg/kg corresponding to 5 ng/mL in the final extract.

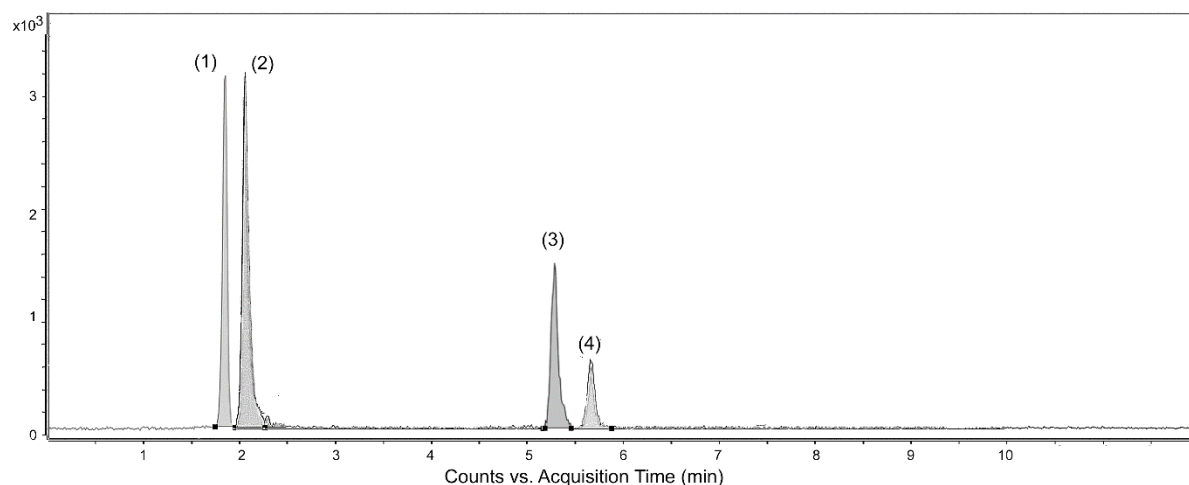


Figure 2 XIC chromatogram of a chia seed sample extract spiked with 0.050 mg/kg of (1) chlormequat (m/z 122), (2) mepiquat (m/z 114), (3) paraquat (m/z 186), and (4) diquat (m/z 184) using precursor ions for their respective quantifier mass transitions.

3.2 Method optimization

Sample extraction was evaluated starting from the basis of an extraction protocol published in the QuPPE method V 9.2 using MeOH and 0.1M HCl (1:1, v/v), as recommended especially for starchy matrices. After initial experiments with the prescribed extraction solvent, the conditions were modified in the present study to obtain an optimized total volume of 20 mL of water/MeOH/HCl (2:1:1, v/v/v) using a higher concentration of hydrochloric acid (1 M) to finally achieve recovery rates between 80-120% for starchy commodities like wheat or chia seed.

Furthermore, different extraction temperatures were tested in the present study: heat treatment at 80 °C as recommended by the QuPPE method V9.2 as well as extraction at room temperature for chia seed. Nine samples with incurred paraquat and/or diquat residues and a blank sample of chia seed were treated in parallel at 80 °C for 15 minutes and at room temperature. In conclusion, the extraction at elevated temperature resulted in nearly the same residue concentrations in case of paraquat and diquat, as shown in **Figure 3**.

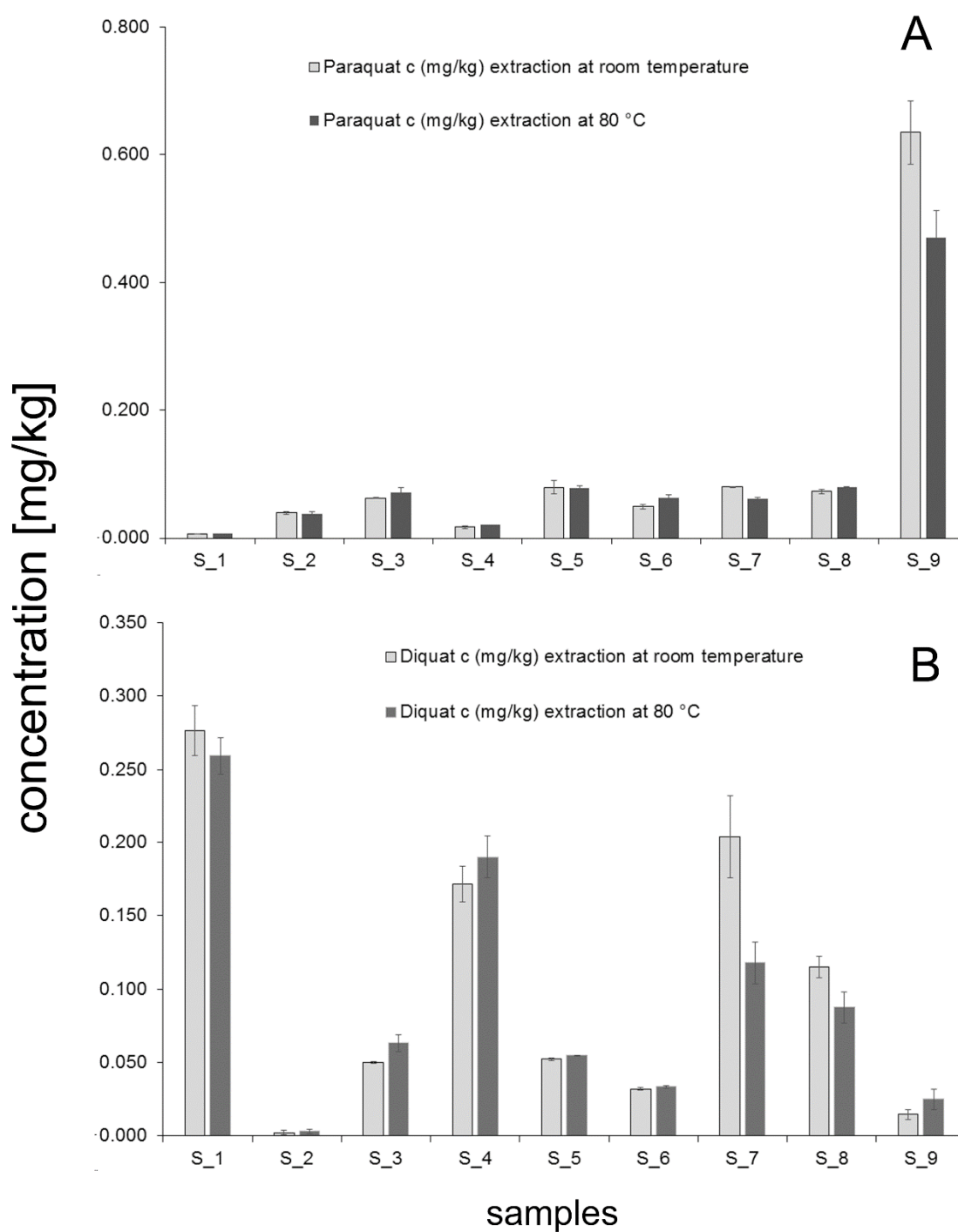


Figure 3. Comparison of paraquat (A) and diquat (B) incurred residue levels after sample extraction at room temperature and at 80 °C for 15 minutes.

3.3 Validation study

The analytical method finally developed was validated for the commodities chia seed, wheat, tomato, lemon, and sultana representative for the plant-derived commodity groups 1, 2, 3, 4a, and 5 listed in Annex A of document SANTE/11945/2015. The

expanded measurement uncertainty (U) for was determined for chlormequat: $\pm 16\%$, diquat: $\pm 3\%$, mepiquat: $\pm 12\%$, and paraquat: $\pm 2.5\%$. A dynamic range was found with a linear correlation in a concentration range of 1 - 500 ng/mL in solvent calibration and 0.010 – 1.000 mg/kg in matrix-matched calibration. The coefficients of correlation (R^2) were in the range of 0.9940 and 0.9999 for all four analytes and all matrices studied. The reporting levels (RL), a targeted limit of quantification (LOQ) were estimated as the lowest concentration at 0.010 mg/kg of spiked analytes that was determined with an acceptable precision $\leq 20\%$ and accuracy in the range of 70-120% meeting the criteria of the guidance document SANTÉ/11945/2015 (**Table 2**). The figures for recovery rates, method precision and matrix effects were calculated without the correction via the corresponding ILIS compounds.

The evaluation of matrix effects of the analyzed commodities was accomplished by comparing the slopes of regression curves obtained from respective matrix-matched calibrations and solvent calibrations. For all four target compounds negative matrix effects in a range of - 20 to - 89% were evaluated (**Table 2**). Respectively, for the compounds paraquat and diquat high matrix interferences in the range of -60 to -80% were determined, presumably due to different co-eluting matrix compounds resulting in ion suppression by reducing the detector signal of the compound of interest. [20, 2] The evaluated matrix effects were significant for each commodity type investigated. Therefore, the quantification was done via matrix-matched calibration and additionally by ILIS for all four target compounds.

The recovery rates without correction via the corresponding ILIS for the analytical method were in the range of 77-120% for the spiking levels 0.010 and 0.100 mg/kg with a precision of RSDs ranging between 1 and 13% for all four analyte molecules, respectively (**Table 2**).

Table 2. Averaged recovery rates, RSDs, matrix effects (ME), and reporting levels (RL) at two different spiking levels in five different plant-derived commodities for chlormequat, mepiquat, paraquat, and diquat.

commodity	compound	RL ¹ (mg/kg)	0.010 mg/kg		0.100 mg/kg		ME ³ (%)
			recovery rates (%)	RSD ² (%)	recovery rates (%)	RSD ² (%)	
chia seeds	chlormequat	0.01	103	1	101	1	-20
	mepiquat	0.01	101	1	100	1	-30
	paraquat	0.01	102	2	101	2	-79
	diquat	0.01	101	1	100	1	-78
lemon	chlormequat	0.01	100	1	100	1	-51
	mepiquat	0.01	100	1	99	1	-34
	paraquat	0.01	120	8	85	13	-80
	diquat	0.01	106	9	100	2	-89
sultana	chlormequat	0.01	101	2	100	1	-87
	mepiquat	0.01	99	1	100	1	-67
	paraquat	0.01	97	3	97	10	-65
	diquat	0.01	96	5	98	9	-63
wheat	chlormequat	0.01	108	1	97	1	-79
	mepiquat	0.01	99	2	93	1	-60
	paraquat	0.01	77	4	98	1	-78
	diquat	0.01	79	3	96	1	-76
tomato	chlormequat	0.01	108	1	93	1	-45
	mepiquat	0.01	108	1	95	1	-32
	paraquat	0.01	118	7	99	4	-60
	diquat	0.01	117	2	99	4	-62

¹RL: reporting limit according to guidance document SANTÉ/11945/2015 RSD ≤ 20% and mean recovery 70 - 120%

²RSD: relative standard deviation

³ME: matrix effects obtained

4. Conclusions

The method developed allows the determination of the important quaternary ammonium herbicides chlormequat, mepiquat, paraquat, and diquat at the reporting level of 0.010 mg/kg for plant-derived commodity groups such as oil seeds, cereals, fruits, and vegetables. Additionally, the analytical workflow for the extraction of presumably paraquat and diquat from starchy commodities was simplified in comparison to the published reference method QuPPE V9.2 to a quick extraction with methanol/hydrochloric acid without an additional heating step at 80°C giving comparable results for incurred residues of paraquat and diquat for the example of chia seed. Throughout the in-house validation approach, recovery rates in the range of 77-120% were obtained with the developed method, suitable for an even wider range of commodities. As so-called superfoods such as chia seed are becoming more and more important, the analytical method developed offers the possibility to reveal the actual incurred pesticide load with regard to quaternary ammonium herbicides.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical Approval This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

5. References

- [1] Aramendía M. A., Borau V., Lafont F., Marinas A., Marinas J. M., Moreno J. M., Porras J. M., Urbano F. J., Determination of diquat and paraquat in olive oil by ion-pair liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry (mrm). *Food Chem* 2006, 97, 181–188.
- [2] Pizzutti I. R., Vela G. M. E., Kok A. de, Scholten J. M., Dias J. V., Cardoso C. D., Concenco G., Vivian R., Determination of paraquat and diquat: LC-MS method optimization and validation. *Food Chem* 2016, 209, 248–255.
- [3] Commission of the European Communities, THE COURT OF FIRST INSTANCE ANNULS THE DIRECTIVE AUTHORISING PARAQUAT AS AN ACTIVE PLANT PROTECTION SUBSTANCE, Luxemburg 11 July 2007.

- [4] Esparza X., Moyano E., Galceran M. T., Analysis of chlormequat and mepiquat by hydrophilic interaction chromatography coupled to tandem mass spectrometry in food samples. *J Chromatogr A* 2009, *1216*, 4402–4406.
- [5] Alder L., Startin J. R., Determination of chlormequat and mepiquat in foods by liquid chromatography/mass spectrometry or liquid chromatography/tandem mass spectrometry: Interlaboratory study. *J AOAC Intl* 2005, *88*, S. 1762-1776.
- [6] Kolberg D. I. S., Mack D., Anastassiades M., Hetmanski M. T., Fussell R. J., Meijer T., Mol H. G. J., Development and independent laboratory validation of a simple method for the determination of paraquat and diquat in potato, cereals and pulses. *Anal Bioanal Chem* 2012, *404*, 2465–2474.
- [7] Zou T., He P., Cao J., Li Z., Determination of paraquat in vegetables using hplc-ms-ms. *J Chromatogr Sci* 2015, *53*, 204–209.
- [8] Vass A., Robles-Molina J., Perez-Ortega P., Gilbert-Lopez B., Dernovics M., Molina-Diaz A., Garcia-Reyes J. F., Study of different hilic, mixed-mode, and other aqueous normal-phase approaches for the liquid chromatography/mass spectrometry-based determination of challenging polar pesticides. *Anal Bioanal Chem* 2016, *408*, 4857–4869.
- [9] Tsao Y.-C., Lai Y.-C., Liu H.-C., Liu R. H., Lin D.-L., Simultaneous determination and quantitation of paraquat, diquat, glufosinate and glyphosate in postmortem blood and urine by lc-ms-ms. *J Anal Toxicol* 2016, *40*, 427–436.
- [10] Nagatomi Y., Yoshioka T., Yanagisawa M., Uyama A., Mochizuki N., Rapid analysis of paraquat and diquat in beer and malt using lc-ms/ms. *J Pestic Sci* 2013, *38*, 144–146.
- [11] Oh J.-A., Lee J.-B., Lee S.-H., Shin H.-S., Ultra-trace level determination of diquat and paraquat residues in surface and drinking water using ion-pair liquid chromatography with tandem mass spectrometry: A comparison of direct injection and solid-phase extraction methods. *J Sep Sci* 2014, *37*, 2900–2910.
- [12] Hao C., Zhao X., Morse D., Yang P., Taguchi V., Morra F., Optimized liquid chromatography tandem mass spectrometry approach for the determination of diquat and paraquat herbicides. *J Chromatogr A* 2013, *1304*, 169–176.
- [13] M. Anastassiades, D. I. Kolberg, A. Benkenstein, E. Eichhorn, S. Zechmann, D. Mack, C. Wildgrube, I. Sigalov, D. Dörk, A. Barth (Eds.), Quick Method for the Analysis of numerous Highly Polar Pesticides in Foods of Plant Origin via LC-MS/MS involving Simultaneous Extraction with Methanol (QuPPE-Method): EU Reference

Laboratory for pesticides requiring Single Residue Methods (EURL-SRM). 9th ed., EU Reference Laboratory for pesticides requiring Single Residue Methods (EURL-SRM), 2016.

[14] Manu S., in: Ramesh C. Gupta (Ed.), Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents. Elsevier, 2009, pp. 561–574.

[15] Conde-Cid M., Paradelo R., Fernández-Calviño D., Pérez-Novo C., Nóvoa-Muñoz J. C., Arias-Estévez M., Retention of quaternary ammonium herbicides by acid vineyard soils with different organic matter and cu contents. *Geoderma* 2017, 293, 26–33.

[16] Farahi A., Achak M., El Gaini L., El Mhammedi M. A., Bakasse M., Electrochemical determination of paraquat in tomato at ag/np-modified graphite electrode using square wave voltammetry. *Food Anal Methods* 2016, 9, 139–147.

[17] Ramesh C. Gupta (Ed.), Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents. Elsevier, 2009.

[18] https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_12745.pdf.

[19] https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_11945.pdf (last time accessed: August 28, 2017).

[20] Tang L., Kebarle P., Effect of the conductivity of the electrosprayed solution on the electrospray current. Factors determining analyte sensitivity in electrospray mass spectrometry. *Anal Chem* 1991, 63, 2709–2715.

5. Zusammenfassende Diskussion

Eine Evaluierungs- und Validierungsstudie zur Bestimmung von Pestiziden und Metaboliten mittels UPLC-TWIMS-QToF-MS wurde durchgeführt. Ziel war es, eine Methode für das *targeted Pestizidscreening* zu entwickeln. Hier war die Evaluierung der IMS-Kopplung als eine zusätzliche Trenndimension innerhalb des QToF-MS Systems von besonderem Interesse. Weiterhin wurde eine Methode zur Identifizierung von Pestizidmetaboliten entwickelt, die in Kombination mit dem *Pestizidscreening* eingesetzt werden kann.

Für polare Pestizide wurden zwei separate Multimethoden für die Bestimmung hochpolarer anionischer und kationischer Pestizide (*Quats*) entwickelt und validiert.

5.1 *Pestizidscreening* mittels HRMS

Bei einem *Pestizidscreening* handelt es sich um eine Multimethode, die es ermöglicht, mehrere hundert Pestizide in einer Analyse zu bestimmen. Die Analyse mit einem QToF-MS basiert auf exakten Massen, die während der gesamten Datenaufnahme über die Probe extrahiert werden können. Im Gegensatz zu Tandem-MS Systemen werden dabei alle ionisierbaren Moleküle aus einer Probe detektiert. Des Weiteren erfolgt bei Tandem-MS eine Nominalmassenauflösung, während HRMS eine exakte Massenauflösung bis zu vier Nachkommastellen ermöglicht, wobei mehr Identifikationspunkte erreicht werden können (Isotopenmuster). In einem Analysenlauf im MS^E Modus werden dabei sowohl Vorläufer-Ionen als auch deren Fragmente aufgenommen. Dies ermöglicht retrospektiv jederzeit eine Untersuchung der Daten für unterschiedliche Fragestellungen. Wird ein Analyt nicht gezielt gesucht, kann dieser nachträglich in eine Substanz-Bibliothek eingetragen und der Datensatz im Nachhinein mit der modifizierten Datenbank reprozessiert werden. Dies erlaubt, die Bibliothek auf eine beliebige Anzahl an Analyten auszuweiten. So können auch Substanzen untersucht werden, die vorab nicht eingemessen wurden. Zusätzlich können seltene Pestizidwirkstoffe in die Bibliothek integriert werden, ohne eine Limitierung der Methode im Vergleich zu den MS/MS-Methoden. Hierbei können neben klassisch analytischen Standards auch unterschiedliche Quellen dienen, wie z.B. Referenzmaterialien (ggf. mit Quellenangabe bzw. Vermerk auf die Herkunft des Eintrags in der Bibliothek).

In den meisten Fällen werden automatische *Screening*-Methoden im positiven Ionisationsmodus entwickelt. Hier lassen sich nahezu 90-95% der Wirkstoffe eines gewählten Parameterumfangs detektieren. Ausnahmen stellen die Phenoxycarbonsäuren, sowie einige spezielle Parameter wie Dithianon oder Dinocap-Phenolmetaboliten dar, die sich nur im negativen ESI-Modus detektieren lassen. [58, 167, 168]

LC-QToF-MS ermöglicht so eine sichere Identifizierung von Pestiziden und ihrer Metaboliten. Die Analyse ermöglicht eine Strukturbestätigung mit unterschiedlichen Verifizierungsstufen in der Routineanalyse mit einem Massenfehler üblicherweise unter 3 ppm. Darüber hinaus ermöglicht ein *full scan* auch eine Reanalyse für verschiedene Addukte, hier kann es instrumentenspezifisch eine Verschiebung in Bezug auf die gebildeten Addukte, wie protonierten Molekülen oder Ammoniumaddukten zu Gunsten von Natrium-Addukten auch aufgrund einer Kontamination von Eluenten, der Ionenquelle oder des jeweiligen MS-Systems, kommen. [169]

Weiterhin ist eine nachträgliche Suche nach Wirkstoff-Artefakten sowie nach potentiellen *in-source*-Fragmentierungen der Vorläufer-Ionen möglich, insbesondere dann, wenn der Wirkstoff nicht mehr nachweisbar sein sollte. Die Massengenauigkeit ist hierbei essentiell, da es die Anzahl der empirisch möglichen Summenformeln für eine richtige Zuordnung limitiert. Eine vollständige Identifizierung erfolgt anhand der Vorläufer-Ionen, zugehöriger Fragment-Ionen, des Isotopenmusters und der Retentionszeit. Dies ermöglicht die Identifizierung und Verifizierung hunderter Substanzen in verschiedenen Matrices bei Konzentrationen im niedrigen µg/kg-Level. Hierbei müssen entsprechend der EU-Anforderung (Tabelle 3) mindestens ein Vorläufer-Ion und ein Fragment gegeben sein um zweifelsfrei als nachgewiesen zu gelten. Ein auf exakten Massen basierendes *Screening* Konzept ermöglicht, im Laboralltag den Parameterumfang an Pestizidwirkstoffen zu erweitern mit theoretischen Einträgen ohne weitere Kosten und Methodenentwicklung.

Wie oben erwähnt, muss für ein *targeted screening* zuvor eine Bibliothek mit den Substanzen erstellt werden, hierbei werden die Analyten mit Summenformel, Strukturformel, exakter Masse, Fragmenten, Retentionszeit, CCS und ggf. Addukten eingemessen. Generell gilt, je mehr Verifizierungspunkte ein Analyt in der Bibliothek enthält, desto sicherer kann dieser identifiziert und verifiziert werden, auch ohne vorhandenen analytischen Standard zum Einmessen bzw. Abgleichen mittels Co-

Analyse. Das *Screening* muss optimiert werden, um bei minimaler Anzahl an falsch positiven und negativen Befunden möglichst zeiteffizient einen Review der Daten zu ermöglichen. [170] Hierfür erfolgt der Aufbau von Filter- und ID-Kriterien, die verschiedene Vertrauens-Levels enthalten (Siehe Abschnitt 4.2.1 Tabelle 5).

Bei der Evaluierungs- und Validierungsstudie (Publikation I im Abschnitt 4.1) wurden die Pestizide mit der QuEChERS-Methode aus den pflanzlichen Lebensmitteln extrahiert. Die Datenakquisition erfolgt mit vorangeschalteter IMS vor dem MS^E, dies ermöglicht die Aufnahme der CCS-Daten und eine zusätzliche Auftrennung in der IMS-Zelle neben der LC-Auftrennung. Die Analyten wurden überwiegend in Form von [M + H]⁺ oder [M + Na]⁺ detektiert. Die exakte Masse wurde anhand ihrer Summenformel errechnet. Die Korrektur der Massenachse erfolgte mittels Leucin-Enkephalin (*m/z* 556.6227 im ESI positive Mode).

Um eine geeignete Routineanwendung zu entwickeln, wurden hierfür die Vorteile und Einschränkungen untersucht. Sobald eine Datenbank eingerichtet ist, müssen Softwareparameter für die Analyt-Erkennung optimiert werden, um ein *Fit-for-Purpose*-Gleichgewicht zwischen falsch positiven und falsch negativen Nachweisen, die von der Software gemeldet werden, zu erhalten. Solche Parameter können Retentionszeittoleranzen, genaue Massentoleranzen, Anforderungen an das Vorhandensein mehrerer Addukte, Isotopenanpassungen, Fragmentierung, Ionenverhältnisse und Ansprechschwellen (*threshold*) umfassen. Die Filter werden beim *Screening* so gewählt, dass diese dem Dokument SANTE/11945/2015 entsprechen (Tabelle 3).

Eine Evaluierung und Validierung der Methode erfolgte anhand von 20 unterschiedlichen pflanzlichen Matrices, die repräsentativ für die sechs Warengruppen gemäß SANTE/11945/2015 sind.

Die Validierung von qualitativen Methoden in Fällen dieser Art konzentriert sich auf die sichere Identifizierung anhand bestimmter Identifikationspunkte. Der Leitfaden definiert die *Screening*-Erkennungsgrenze (*screening detection level*, SDL) eines qualitativen *Screening*-Verfahrens als die niedrigste Konzentration, für die nachgewiesen wurde, dass ein bestimmter Analyt nachgewiesen werden kann in mindestens 95% der Proben (d.h. eine falsch negative Rate von 5% wird akzeptiert). [66]

Dabei wurde für jede Gruppe Blankmaterial verglichen, um falsch positive Nachweise auszuschließen und die Filter für die Identifizierung zu optimieren. Die Validierung

erfolgte zwischen 0,100 und 0,001 mg/kg. Die größte Limitierung zeigte hierbei das Kriterium für den Nachweis mindestens eines Fragment-Ions bei kleineren Konzentrationslevels. Hierbei kann als Ersatzkriterium der Nachweis von zwei (*Precursor*-)Ionen gelten oder zusätzlich die Miteinbeziehung von CCS-Daten als akzeptabler Ersatz, um falsch negative Nachweise auszuschließen.

Nachteilig im Vergleich zum MS/MS sind quantitative Analysen sowie der dynamische Bereich. Hier ist eine MRM Methode wesentlich sensitiver. Beim Aufbau einer Methode in der QToF-MS gibt es keine Limitierung aufgrund nicht vorhandener Standards und die Anzahl der Parameter ist nicht eingeschränkt aufgrund einer *dwell time*-Limitierung wie bei der klassischen Tandem-MS.

Die instrumentellen Werteparameter beziehen sich stark auf die Analyseninstrumente und deren Eigenschaften. Während der HRMS Entwicklung wurde oft über die Bedeutung einer adäquaten Suchparameterauswahl für die Analyse von Pestiziden in der Literatur diskutiert. Mezcuca et al. zeigte in einer der ersten Studien unter Verwendung eines LC-ToF-MS-Systems mit einer Auflösung von 7500 FWHM den Einfluss von Peak-Filtern (minimale Anzahl chromatographischer Peak-Zählungen), Retentionszeitfenstern und Massenfensern. Die Peak-Filter-Schwelle muss niedrig genug sein, um Verbindungen in niedrigen Konzentrationen zu finden und hoch genug, um falsch positive Nachweise zu vermeiden. [171] Die Verwendung von großen RT-Fenstern kann zu falsch positiven Nachweisen führen, während ein kleines RT-Fenster zu falsch negativen führen kann. Da für das HRMS-Screening eine rechtliche Basis vorliegt und diese maßgeblich ist, zählen diese als ein Mindeststandard. Die aktuellen LC-HRMS Instrumente performen ohne Schwierigkeiten bezüglich der gewünschten Kriterien bei der Präzision und Reproduzierbarkeit von Retentionszeit und Massengenauigkeit. Um sowohl falsch positive als auch negative Nachweise zu vermeiden, wurde das RT-Fenster auf $\pm 0,1$ min definiert. Überwiegend war die RT-Präzision mit der in dieser Studie ausgewählten Säule und Gradienten sehr hoch, jedoch wurden früh eluierende Substanzen stärker durch die Matrix beeinflusst. Daher genügt bei der Betrachtung der Daten nicht nur der Focus ein RT-Fenster, sondern sollte zumindest in zwei RT-Fenster-Stufen *gescannt* werden. Die *m/z*-Toleranz ist auch ein wichtiger Parameter, da sie ein hohes Maß an Prozedurspezifität und Selektivität für eine eindeutige Bestätigung bietet. Um eine Abhängigkeit von den zusammengesetzten Massensuchkriterien zu vermeiden, ist anstelle eines Absolutwerts ein relativer

Massenfehler von 5 ppm im Dokument SANTE/11945/2015 festgelegt, obwohl in der realen Betrachtung der Daten ein relativerer Massenfehler oft zwischen 1-2 ppm liegt.

Ein Parameter, der nicht weiter definiert vorliegt, sondern oft dem Analytiker überlassen wird, ist der *threshold* bei den Ionen (*Detektorcounts*). Malato et al. spezifizierte in seiner LC-QToF-MS-Studie einen *threshold* bei 400 *counts*, um Hintergrundsignale oder chemisches Rauschen zu vermeiden. Dabei handelt es sich um eine Kompromissgröße, die je nach Zielsubstanz stark variieren kann. Vor allem wenn ein *Screening* im negativen Mode durchgeführt wird, sollte der *threshold* für ein *targeted screening* bei 100 *counts* festgelegt werden, da Ionen auch bei dieser Einstellung hinreichend identifiziert werden und die mindest-ID-Kriterien erfüllen können, jedoch eine zu geringe Anzahl an *Detektorcounts* diese bei einer stringenteren Einstellung für den *threshold* ausschließen würde. Im positiven Modus liefert ein *threshold* von 500 *Detektorcounts* oft eine hinreichende Sensitivität. [172]

Die Erhöhung des RT-Fensters hat den größten Einfluss auf die Anzahl der falsch positiven Nachweise in Kombination mit Addukten wie Kalium und Ammonium, vor allem in komplexen Matrices. So kann sich die Anzahl der falsch positiven Zuordnungen verdoppeln, ein Beispiel dafür zeigten Gómez-Ramos et al. in einer Lauchmatrix: die Anzahl an falsch positiven und negativen Zuordnungen stieg bei Erweiterung des RT-Fensters von 3 auf 7. Falsch positive Nachweise hängen stark von der Matrix ab - je höher die Komplexität der Probe, desto höher die Anzahl. [173] Obwohl mit einer Bestätigungsanalyse durch ein anderes System wie LC-MS/MS falsch positive Zuordnungen verworfen werden können, stellt sie eine zeitaufwändige Aufgabe dar, was daher einen entscheidenden Nachteil für einen effizienten Analysen-Workflow bringt.

HRMS ermöglicht eine Auftrennung von Isobaren und Matrix Interferenzen. Der Matrixeffekt tritt aufgrund der Wechselwirkung von co-eluierenden Verbindungen mit den Analyten im Ionisierungsprozess auf und erzeugt in einigen Fällen eine Signalunterdrückung. Kruve et al. vermuteten einen Wettbewerb zwischen verschiedenen Verbindungen auf der Oberfläche der ESI-Tröpfchen. [174] Eine Probenverdünnung könnte hier folglich die Anzahl dieser konkurrierenden Moleküle pro Mikrodroplet verringern, die Ionisationseffizienz stiege und damit der Analyt-Signalanstieg. Ein Verdünnungsfaktor von 10 würde ausreichen, um die meisten Probleme im Zusammenhang mit der Anwesenheit von Matrixkomponenten in den

Extrakten zu lösen, insbesondere Probleme der Ionisationseffizienz und Sättigung des Nachweissystems. [175] Die Hauptlimitierung bei der Durchführung von Verdünnungen wäre jedoch die Erreichung einer ausreichenden Detektorsensitivität des Zielmoleküls. Die Verdünnung von Extrakten impliziert eine Verringerung der Analytmenge. Folglich ist es wichtig, sehr empfindliche analytische Systeme zu verwenden, die eine Sub-ppb-Leveldetektion ermöglichen. Bei den QToF-MS Systemen ist die Sensitivität oft geringer als im Tandem-MS, daher wäre hier ein Verdünnungsschritt in der Regel nicht empfehlenswert.

Somit kann die Komplexität bestimmter Matrices zu Problemen mit der Ionisationseffizienz und den Detektionssystemen der analytischen Instrumente führen. Die Anzahl der co-extrahierten Matrixverbindungen variiert hierbei stark in Abhängigkeit von der Pflanzenmatrix. Ein Orangenextrakt weist mit rund 8000 Verbindungen deutlich mehr Matrixkomponenten auf als Lauch mit 6000 Verbindungen oder Paprika mit 3000 und Tomaten mit nur 2000 Verbindungen. [173] Aufgrund der hohen Menge an Zielverbindungen isobarer Komponenten muss die Identifizierung durch HRMS-Instrumente unter Verwendung von Retentionszeiten erfolgen.

Aber auch die Verteilung der Matrixverbindungen im Chromatogramm ist ein sehr wichtiger Faktor. Die Mehrheit der Datenbankkomponenten (750 Komponenten) eluierte im Bereich von 7-13 min, dort wo auch die meisten Zielanalyten eluieren. Zwar enthält die Orangenmatrix mehr Verbindungen als Lauchextrakt, jedoch finden sich die co-extrahierten Matrixverbindungen in Orange im ersten Teil des Chromatogramms verteilt, während sie für Lauch homogener entlang des gesamten Chromatogramms verteilt sind. Folglich liegt die Zeitspanne mit größtem Interesse im Bereich zwischen 7-13 min, die Anzahl der co-extrahierten Verbindungen in Orange (2743) ähnlich den in Lauch (3032) extrahierten Verbindungen, aber weit über den in Pfeffer (919) und Tomate (656). [173]

Neben der Matrixkomplexizität beeinflusst die Wirkung unterschiedlicher Konzentrationsstufen die Genauigkeit von Massenmessungen. [150] Hier wurden keine signifikanten Unterschiede in der Genauigkeit beobachtet, die aus den verschiedenen Matrix-abgestimmten Standards erhalten wurde, verglichen mit denen, die mit reinen Lösungsmitteln hergestellt wurden - mit durchschnittlichen Werten von etwa 1 ppm für alle Pestizide. Wesentliche Abweichungen bei genauen Massenmessungen (über 5 ppm) können durch die Sättigung des Detektors

verursacht werden, die durch die hohe Ionenanzahl bewirkt wird. Trotzdem könnte die Massengenauigkeit von anderen Parametern beeinflusst werden, von denen einige von ihnen betroffen sind, wie etwa die Analytkonzentration (sehr niedrig und sehr hoch), die Matrixkomplexität und die unzureichende Massenauflösungsstärke aufgrund von z.B. Verunreinigungen oder das *charging*-Phänomen an den Fokussierungslinsen.

Infolgedessen wird erwartet, dass eine hohe Menge an Ionen den Detektor sättigen kann und mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Überlappung zwischen co-extrahierten Verbindungen und den Zielpestiziden gibt. Daher beschreibt man diese Matrices als komplex für QToF-MS Systeme. Daneben stellt die Anwesenheit von isobaren Verbindungen, die ähnliche oder analoge Massen zu den Zielverbindungen haben und zusätzlich Co-Eluenten von Analyten sind, eine Herausforderung an das Instrument dar, das dann möglicherweise nicht in der Lage ist, diese beiden leicht unterschiedlichen Massen vollständig aufzulösen. Die Auflösung ist hier ein limitierender Faktor für die korrekte Identifizierung dieser Verbindungen, insbesondere in komplexen Matrices.

5.1.1 IMS-Kopplung

Für eine weitere Trenndimension kann bei dem QToF-MS System zusätzlich eine IMS-Kopplung genutzt werden. Hier werden die Moleküle nach der LC-Trennung, Ionisierung und vorangegangenen Fokussierungsschritt im Ionentunnel in eine IMS-Zelle geleitet. Durch die IMS-Zelle werden die Moleküle durch die mit Stickstoff gefüllte Kammer auf einer Spannungswelle getragen, dabei interagieren diese mit den Stickstoffmolekülen und werden aufgrund ihrer Größe (3D-Struktur) schneller oder langsamer durchgeleitet. Jedes Molekül hat dabei seine eigene Driftzeit. Isobare mit gleicher Summenformel können aufgrund ihrer unterschiedlichen Struktur unterschiedliche Driftzeiten haben. Dies wird zugrunde gelegt und jeweils ein eigener CCS-Wert aufgrund der jeweiligen Zeit, die das Molekül für das Passieren der IMS-Zelle braucht, zugeordnet.

Weiterhin ermöglicht die IMS eine Datenaufnahme angelehnt an das MS/MS Spektrum, da die Total-Ionen-Fragmentierung nach dem IMS-Auftrennungsschritt erfolgt, daher werden Co-Eluenten und Matrixbestandteile zusätzlich aufgetrennt, sodass Fragmente eindeutig zugeordnet werden können.

Der Einfluss der Struktur auf die Mobilität wurde von einigen Autoren anhand isomerer Verbindungen beschrieben. So ergeben z.B. die Isomeren Hexylamin, Di-n-Propylamin und Triethylamin sehr unterschiedliche Driftzeiten. Aufgrund des geringeren Stoßquerschnitts der sekundären und tertiären Amine nehmen die Driftzeiten in dieser Reihe ab. Diese Tatsache stellt ein entscheidendes Leistungskriterium der IMS heraus. [134]

Liegt eine Kopplung mit der IMS-Zelle vor, können vierdimensionale Daten aufgenommen werden. So kann zu einem Zielanalyten neben der Retentionszeit, exakten Masse und Fragment ebenfalls eine Driftzeit mit dem damit verbundenen Stoßquerschnitt (CCS-Wert) ermittelt und zugeordnet werden. Dieser liefert einen Hinweis darauf, wie groß das Molekül ist. Reguiero et al. und Goscinny et al. zeigten beide in ihren Arbeiten, dass sich ein annähernd linearer Zusammenhang zwischen Größe und Driftzeit bzw. CCS-Werts des Moleküls ergibt. [133, 136] Dies kann vor allem bei *suspect* und *unknown screening* ein zusätzlicher Hinweis bei der Strukturaufklärung sein. Die Sensitivität und der dynamische Bereich werden mit IMS-Kopplung um Faktor 2-3 reduziert, da die Zelle eine schnellere Ionen-Sättigung erreicht.

Beim Einmessen der CCS-Werte muss das IMS-Mobilogramm überprüft werden, denn in der IMS-Zelle werden beim jeweiligen Addukts sowohl Protomere, Natrium-Addukte als auch Dimere aufgetrennt. Beim *peak picking*-Prozess kann aufgrund dieser Auftrennung eine falsche Zuordnung erfolgen und folglich zu einem falsch negativen Nachweis. Die Auftrennung unterschiedlicher Addukte innerhalb einer Adduktgruppe führt zu einer Peakaufspaltung. Es zeigt sich dann ein Hauptpeak und ein kleiner Nebenpeak. Daher muss hier der richtige Peak ausgewählt werden, da der zweite Peak bei geringeren Konzentrationen nicht nachweisbar ist. Bei Dimerpeaks, die in der Regel bei Natrium-Addukten beobachtet wurden, wiesen diese einen kleineren Peak auf, der Basis-Linien-getrennt war und eine höhere Driftzeit im Vergleich zum Monomer hatte.

Ein weiterer Nachteil ist, dass bezüglich der Identifikationskriterien in der HRMS grundsätzlich ein fehlendes Fragment eine Limitierung darstellt, bei der IMS-Kopplung zeigt sich eine größere Limitierung, die Analyten haben eine geringere Sensitivität aufgrund der zusätzlichen Trenndimension, vor allem zeigt sich das aufgrund der fehlenden Fragmente.

Ein Vorteil bei der IMS-Kopplung ist die Auftrennung der Analyten nach ihrer Driftzeit und folglich werden damit co-eluierende Matrixsubstanzen abgetrennt. In Abbildung 10 wird verdeutlicht, wie Substanzen, die ein identisches chromatographisches Verhalten aufgrund ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften aufweisen, zur gleichen Zeit eluieren. Weiterer Vorteil ist, wie oben beschrieben, dass aufgrund der instrumentellen Anordnung diese Moleküle zuerst wegen ihrer Driftzeit aufgetrennt werden und anschließend im Quadrupol eine Alle-Ionen-Fragmentierung erfolgt. Dies bietet hier den Vorteil, dass die Fragmente, die entstehen, aus den vorangegangenen IMS aufgelösten Molekülen entstehen.

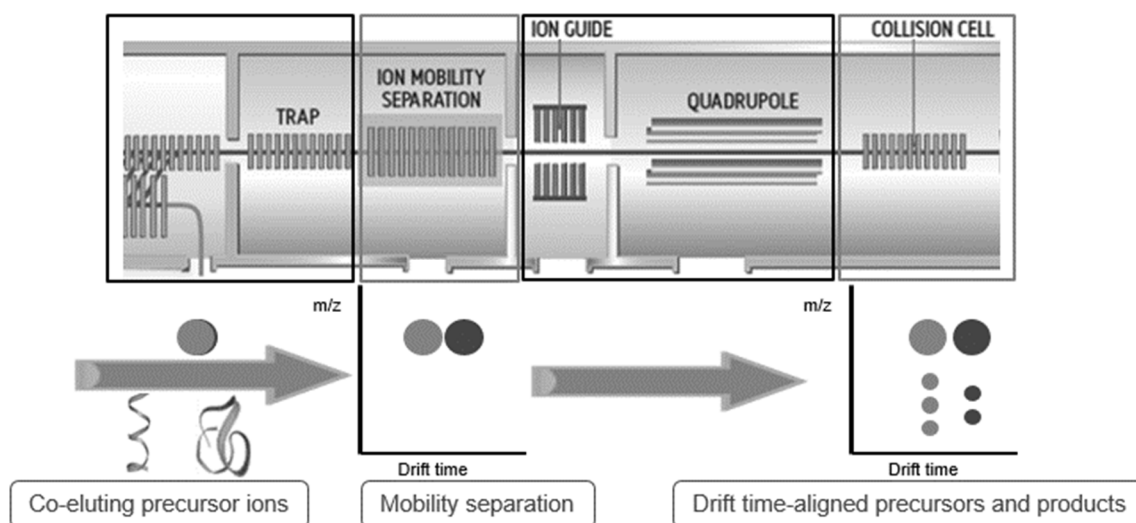


Abbildung 10: Aufnahme vierdimensionaler Daten und Fragment-Spektren-Zuordnung mittels IMS-Kopplung. [176]

Verfügen die co-eluierenden Substanzen über die gleiche Masse (isobar), können diese aufgrund ihrer 3D Unterschiede in der Molekülstruktur aufgetrennt werden. Handelt es sich bei den isobaren Strukturen um Isomere, besteht die Limitierung in ihren strukturellen Unterschieden. Ein definierter Unterschied in der Struktur bei Isomeren liegt vor allem in der Größe und Stellungsänderung innerhalb des Moleküls vor. Ein Stellungsisomer von Hydroxyl- oder Methylgruppe, ohne Veränderung der räumlichen Verteilung des Moleküls, wird in der vorliegenden IMS-Zelle nicht hinreichend aufgelöst. Innerhalb der Pestizidstudie zeigte sich am Beispiel isomerer Triazine, dass Isopropyl- und ein Butyl-Stellungsisomer einen gleichwertigen CCS-Wert erreichen und nicht getrennt voneinander identifizierbar sind. Hier zeigte sich, dass ein Unterschied von mindestens 2% im CCS-Wert erreicht werden muss, um

zwei co-eluierende, isobare und isomere Verbindungen nebeneinander zu detektieren.

5.2 Identifizierung von Pestizidmetaboliten mittels HRMS

Die Metaboliten, Abbauprodukte und andere Transformationsprodukte wurden im Allgemeinen in Metabolismus-Experimenten mit Methoden identifiziert und quantifiziert, die auf der Verwendung von Isotopen-markierten Verbindungen basieren. Die Mehrheit der Metaboliten wurde mit radioaktiv markierten Standards identifiziert, die entweder teuer oder nicht zugänglich sind aufgrund der Vorgaben beim Arbeitsumgang (Strahlenschutz). Die Pestizidmetaboliteidentifizierung gewinnt zunehmende Aufmerksamkeit aufgrund des Interesses an der potentiellen Metabolit-Toxizität. Somit sind alternative, nicht radioaktive Ansätze für die Metabolitenidentifizierung erforderlich.

Fortschritte bei analytischen Methoden und deren zunehmende Sensitivität führen zum Nachweis einer wachsenden Anzahl von Metaboliten in bereits geringen Konzentrationen. Die Verwendung von Datenbanken für die Zielanalyse bekannter Spezies ist in der Pestizidprüfung gut etabliert und es stehen geeignete Software-Werkzeuge für ein automatisiertes *Screening*, bei der Entwicklung systematischer Ansätze zur Erkennung von *suspect* oder *unknown* Pestizidmetaboliten zur Verfügung. Dies ist der wichtigste Engpass im Zusammenhang mit dem Nachweis von Metaboliten. Tatsächlich basiert der Großteil der bisherigen Arbeit in diesem Bereich auf manuellen *peak picking*-Strategien. [172] Die Suche nach Metaboliten in den LC-HRMS-Rohdaten aus komplexen Matrices kann in verschiedenen, manuellen Weisen durchgeführt werden, die jedoch zeitaufwändig sind. Moleküle mit niedrigem Molekulargewicht zeigen häufig analoge Fragmentierungswege. [114] Daher kann der Fragmentierungsmechanismus der Eltern-Spezies verwendet werden, um mögliche Abbauprodukte vorherzusagen. Somit kann eine Suche anhand der CID-Fragmentierung erfolgen. Vor allem, wenn ein Fragment mit dem des Elternteils übereinstimmt. Jedoch ist ein automatisches *suspect screening* notwendig, das eine systematische Analyse, ohne aufwendige Sichtung der Daten, nach Metaboliten ermöglicht.

Die Identifizierung mit HRMS-Instrumenten muss durch die Verwendung genauer Massen und Retentionszeiten erreicht werden. Anhand der exakten Masse lässt sich

die elementare Zusammensetzung von Pestiziden ableiten, was die Differenzierung isobarer Verbindungen ermöglicht.

In der Regel ist die Massengenauigkeit im *full-scan*-Modus für verschiedene Matrices und Konzentrationsstufen niedriger als < 3 ppm. Die meisten Pestizide und Fragment-Ionen, die in dem Bereich einer akzeptablen Massengenauigkeitsschwelle für die Bestätigung der Elementzusammensetzung und Molekülstruktur betrachtet werden, zeigen Massenabweichungen unterhalb des 3 ppm-Wertes. Anhand einer Modellstudie sollte hierzu die Methode entwickelt werden.

Die Studie wurde an ausgewählten Pflanzen durchgeführt, mit zwei Pflanzenschutzmitteln, die insgesamt die drei Wirkstoffe Thiacloprid, Azoxystrobin und Difenconazol enthielten und gemäß landwirtschaftlichem Gebrauch eingesetzt wurden. Das Azoxystrobin ist einer der häufigsten Pestizidrückstände in Lebensmitteln in Europa und als Insektizid wurde Thiacloprid ausgewählt. Die eine Spezies Pak Choi wird als ganze Pflanze oder nur die Blätter verzehrt. Die andere Spezies war Brokkoli, hier wächst der Brokkolikopf, welcher den essbaren Anteil darstellt, erst nach der Anwendung von Pflanzenschutzmitteln. Nach Einhaltung der Wartezeit wurden die Pflanzen nach Pflanzenorganen Blätter, Stiel und Wurzel sowie Brokkolikopf bei der Brokkolipflanze aufgeteilt und analysiert.

Die Proben wurden unselektiv mit Methanol und Wasser extrahiert. Für eine ausreichende Sensitivität mussten die Extrakte auf einer *mixed-mode* SPE Säule angereichert werden. Die Messmethode wurde ins *targeted Pestizidscreening* implementiert, so konnte ein umfangreiches *Screening* auf die Wirkstoffe erfolgen und anschließend sich eine retrospektive Analyse auf die Metaboliten anschließen. Basierend auf diesen Untersuchungen wurde eine Datenbank aufgebaut. So konnte in einem Schritt ein *Screening* auf Pestizide und Metabolite erfolgen.

Bei der Untersuchung war die Klärung der Verteilung der Metabolite in der gesamten Pflanze wichtig und ob unterschiedliche Metabolite in den unterschiedlichen Organen vorliegen. Für beide Modellpflanzen zeigte sich der höchste Grad der Metabolisierung in den Blättern, während nur eine geringe Anzahl an Metaboliten in den Stielen und Wurzeln gefunden wurde. Die Blätter sind der Anwendungsort und die ‚Grüne Leber‘ der Pflanzen, wo der Metabolismus der Pflanze stattfindet. [177] In dem Zusammenhang stellen die Blätter die größte Fläche, die mit dem Pflanzenschutzmittel benetzt wird und gleichzeitig das Zentrum von möglichen Entgiftungsreaktionen dar. Im Vergleich zwischen den Blättern von Pak Choi und

Brokkoli wurden in Brokkoli weniger Metabolite gefunden. Die Brokkoli-Pflanzen sind vergleichsweise wesentlich größer als Pak Choi und ihre Blätter weisen eine dicke Cuticula auf. Aufgrund dieser abweisenden Cuticula dringt weniger Wirkstoff ein, zusätzlich wird der Wirkstoff durch die höhere Stoffwechselrate der Brokkoli schneller metabolisiert und verteilt. [178]

Die beiden möglichen Speicherorte in einer Pflanze stellen ebenfalls die Blätter und zu einem geringen Anteil die Wurzeln dar. Die Funktion der Wurzeln beruht primär in der Wasser- und Nährstoffaufnahme, sekundär in der Ausscheidung (Exsudation) von sekundären Pflanzenstoffen an die Umgebung z.B. als Verteidigung und zum Selektionsvorteil gegenüber Konkurrenzpflanzen. [179] Zu einem geringen Teil können auch hier Metabolite in den Boden als eine mögliche Entgiftung ausgesondert werden. [180] In den Wurzeln wurden kaum Metabolite und der jeweilige Wirkstoff gefunden. Hier zeigte sich keine Einlagerung von den Pestiziden und Wirkstoff-Metaboliten. Ähnliches Verhalten zeigten auch die Stiele. Die Stiele dienen der Pflanze als Leitsysteme für Nährstoffe und Wasser, daher wurde auch hier nur ein geringer Anteil an Wirkstoff und Metaboliten lokalisiert. [181]

Bei der Brokkoli-Pflanze konnte zusätzlich der Brokkolikopf untersucht werden. Hier handelt es sich um ein Organ, welches wie oben erwähnt, erst nach der Behandlung mit Pflanzenschutzmitteln gebildet wird. Hier stellte sich die Frage, ob die Wirkstoffe in ein neu entstandenes Pflanzenorgan (Blüte und Frucht) transportiert werden und ob dort Wirkstoffe oder Metabolite gespeichert werden. Bei dem Brokkolikopf wurde ein Konjugat von Azoxystrobin detektiert. Das Auffinden eines solchen Metaboliten stellt einen Nachweis für die Anwendung mit dem Pflanzenschutzmittel dar, auch ohne dass ein Wirkstoff nachgewiesen werden konnte.

Da die höchste Vielfalt und der höchste Gehalt an Metaboliten in den Blättern zu finden war, wurde die Studie wiederholt, um die Bildung und den weiteren Abbau der Metabolite zu verfolgen. Das *Monitoring* beinhaltete 10 Probenahmen von direkt nach der Anwendung bis zur Ernte verteilt mit einem Abstand von 2-3 Tagen. Hier zeigte sich ein initialer hoher Abfall in der Wirkstoffkonzentration, die zweite Phase zeigte ein kleines Plateau und dann einen linearen Abfall in der Abklingzeit. Die Metabolite dagegen zeigten eine Entstehungsphase, ein Wachstumsplateau und einen schnellen Abbau. Die Studie präsentierte, dass eine Identifizierung von verschiedenen Metaboliten in unterschiedlichen Wachstumsstadien möglich ist. Da die Metabolite an sich eine entgiftete Form der Wirkstoffe darstellen und diese eine

hohe Löslichkeit aufweisen, werden diese entweder weiter metabolisiert, ausgeschieden, gebunden oder in den Speicherorganellen, den Vakuolen zwischengelagert. Keine der detektierten Metabolite zeigte hier eine persistente Form. Nach den Ergebnissen der Studie zeigte sich, dass die Metabolite weiterhin einer Verstoffwechselung unterliegen und abgebaut werden. Sodass mit einer gewissen Abklingzeit diese nicht mehr detektiert wurden.

Die Studie mit Modellpestiziden wurde zur Evaluierung von einer Identifizierungsmethode für Pestizidmetabolite durchgeführt. Anhand der Modellstudien wurde eine Methode erstellt, wie *suspect*-Metabolite identifiziert werden können. Obwohl die exakte Massenbestimmung bzw. -änderung ausreichend zur Bestimmung der Art einer Biotransformation ist, sind verschiedene Verifizierungsschritte für die Metabolite möglich. Unterschiedliche Obst- und Gemüsesorten wurden auf Metabolite untersucht, wobei eine Datenbank erstellt werden konnte, die exakte Massen, Retentionszeit und Fragmente für die jeweiligen identifizierten Metabolite beinhaltet. Des Weiteren konnte die entwickelte HRMS *suspect screening* Methode auf *targeted*-Systeme übertragen und so ein komplementäres *Screening* auf Pestizidwirkstoffe, relevante und nicht relevante Metaboliten ermöglicht werden. Dieses Monitoring dient vor allem einem möglichen Anwendungsnachweis im Fall von nicht mehr detektierbaren Pestizidwirkstoffen. Zusätzlich ermöglicht es die Erfassung von potenziellen Abbauprodukten, die eine Gesamtbelastung der Probe widerspiegeln. Bei häufigem Nachweis, hohen Konzentrationen oder toxikologisch neubewerteten Metaboliten könnten diese somit schneller als relevant erfasst werden.

5.2.1 Strukturverifizierung mittels HRMS

Das HRMS-System ermöglicht beim *Screening* eine vorläufige Identifizierung sowohl für *suspects* als auch für *targeted*-Pestizide. In einem Lauf können Pestizide und Metabolite als *precursor* mit Fragmentspektren aufgenommen werden. Die Software ermöglicht eine Verifizierung anhand der Strukturaufklärungswerkzeuge. Dies erlaubt die effektive Abschirmung und vorläufige Identifizierung einer großen Anzahl von Arten auch ohne die Notwendigkeit von Standards. Darüber hinaus sind, wie bereits erwähnt, *targeted* und *non-targeted screening*-Strategien, die auf Datenbanksuchen

basieren, zahlreichen falsch negativen und falsch positiven Nachweisen ausgesetzt, die im Bestätigungsschritt überprüft werden müssen.

Die wichtigste Verifizierungsmaßnahme ist, wenn kein Standard für eine Bestätigungsanalyse vorliegt, der Vergleich mit einem unbehandelten Material (Blank), um einen falsch positiven Nachweis auszuschließen, da dieses auch anthropogene Muster vortäuschen kann.

Das Potenzial von QToF-MS bei der Zuordnung der Struktur unbekannter Spezies wurde gezeigt. Die Anwendungen können zur Aufklärung von Metaboliten oder Pestizidabbauprodukten eingesetzt werden sowie zu einem anschließenden *Routinescreening* von Metaboliten. Die Analyse mit QToF-MS zeigte die Anwesenheit verschiedener Phase-I und -II-Metaboliten in Obst und Gemüse. UPLC-QToF-MS wurde angewendet, um die Anwesenheit von Pestizidmetaboliten des Elternpestizids in Wirkstoff-positiven Nahrungsmittelproben zu untersuchen. In all diesen Fällen wurde ein vollständiger *scan*-Modus für die strukturelle Aufklärung der Verbindungen verwendet, und QToF-MS wurde zur weiteren Identifizierung angewendet.

Die übliche Strategie ohne HRMS besteht in einem gezielten *Screening* einer großen Anzahl an Pestiziden und eines nicht-gezielten *Screening* von Analyten, die anschließend eine MS-*scan*-Analyse erfordern, gefolgt von einer MS/MS-Analyse zur Bestätigung der detektierten Verbindungen. In einer zweiten Analyse werden die Retentionszeiten sowie das Vorläufer-Ion für die Zielverbindungen in die Methode eingetragen und eine Bestätigung ihrer Identität kann durch einen Vergleich der Struktur der vorgeschlagenen Verbindung mit den erhaltenen Fragmenten erfolgen. Ohne vorhandenen Standard kann ein Fragmentmuster zur Erzielung einer maximalen Detektorsensitivität nicht erstellt und die Kollisionsenergien nicht optimiert werden.

Eine alternative Möglichkeit zur Fragmentierung von Analyten ohne vorherige Vorläufer-Ionen Selektion und ohne eine notwendige Optimierung der Kollisionsenergien bietet die QToF-MS Technologie. Da es aufgrund der Alle-Ionen-Fragmentierung zu einer falsch positiven Zuordnung von Fragmenten aus co-eluierenden Substanzen kommen kann, müssen potenzielle detektierte Fragmente auf ihre Plausibilität (Struktur, Summenformelvorschläge und Massenfehler) überprüft werden.

Eine empirische Bibliothek kann mittels Re-Analysen aufgebaut und so eine Datenbank für Substanzen gebildet werden. Eine Standardisierung aufgrund von

unterschiedlichen Ionisierungsprozessen, Spannungen und modifizierbaren Kenndaten ist zurzeit nur instrumentspezifisch möglich. Jedoch besteht die Möglichkeit, gewisse Daten wie Fragmente universell verfügbar zu machen, da diese Fragmentierungsregeln unabhängig vom LC- und MS-System sowie unabhängig von der Probenart reproduzierbar sind. Der Aufbau einer empirischen *in-house*-Bibliothek mit möglichst vielen Verbindungen und chromatographischen sowie massenspektrometrischen Kenndaten ist zurzeit die beste Option.

Unter Verwendung eines *score*-Systems können Substanzen bis zu einem hohen Grad bestätigt werden ohne eine verfügbare Referenzverbindung. Diese *score*-Werte umfassen Massengenauigkeit, Isotopenmatching, experimentelle Retentionszeit, Fragmente sowie Massengenauigkeit von Fragmenten und Ionen-Verhältnis. Ebenfalls entscheidend ist bei der Identifizierung das *peak picking*. Hierbei kann der *threshold*, gesetzt auf das Minimum, die insensitiven Ionen miteinfassen, wobei sich jedoch die Gesamtanzahl der Ionen in der Probe erhöht und die Prozessierungsdaten die Software stark verlangsamen.

Ein weiterer Identifizierungspunkt sind charakteristische Adduktspektren. Das häufigste Addukt bildet das protonierte bzw. deprotonierte Molekül $[M + H]^+$. Bei Verbindungen mit aciden Protonen wie bei Carbonyl- und Phenolverbindungen sowie glycosylierten Substanzen wird das Natrium-Addukt bevorzugt $[M + Na]^+$. Diese beiden Addukt-Ionen bilden die Hauptidentifizierungs-Ionen. Die Ammonium-Addukte $[M + NH_4]^+$ und Kalium-Addukte $[M + K]^+$ bilden jedoch eine Ausnahme und kommen in der Regel nur in Kombination mit Natrium oder protoniert vor, im ESI-positiv Modus bei höheren Konzentrationen bzw. hoher Empfindlichkeit. Im negativ Modus gilt dies analog für Formiat-Addukte $[M + HCOO]^-$ und Acetat-Addukte $[M + CH_3COO]^-$. Diese Addukt-Formen bilden oft falsch positiv identifizierte Analyten, die aufgrund von Massengenauigkeit oder Isotopenmuster durch weitere Bestätigungsschritte ausgeschlossen werden können. Oft treten diese als Folge von niedrig gesetzten *thresholds* aus dem hohen Hintergrund der Probe hervor.

Ist eine empirische Bibliothek aufgebaut, ist es für ein effizientes Arbeiten notwendig, bei *Screening* Ansätzen unterschiedliche Filter-Einstellungen zu verwenden. Hierbei können mehrere Stufen erzeugt werden, die mit verschiedenen Vertrauens-Level arbeiten um eine systematische Auswertung der Daten zu ermöglichen.

Tabelle 1: Identifizierungs-Levels beim QToF-MS Screening.

Vertrauens-Level	Identifizierungskriterium	Verifizierung
Level 1 (<i>targets</i> , Identifizierung)	Massengenauigkeit < 3 ppm	Exakte Masse
	mind. 1 Fragment-Ion	Strukturverifizierung
	3 Ionen low (H ⁺ , Na ⁺ -Addukte)	<i>precursor ions</i> (Addukt oder Isotop)
	iFit > 15% (UNIFI Algorithmus)	Ab 3 Ionen Isotopenverhältnis
	halogen match	Isotopenverhältnis
	neutral loss	Neutralverlust von Glucose
	CCS delta < 2%	Experimentelle CCS-Abgleich
	RT error < 0,1 min	Retentionszeit
Level 2 (<i>suspects</i>)	Massengenauigkeit < 3 ppm	Exakte Masse
	2 Ionen <i>low</i> (H ⁺ , Na ⁺ -Addukte)	<i>precursor ions</i>
	iFit > 50%	Isotopenverhältnis Ungenauigkeit steigt bei geringer Konzentration
	Rt error < 0,2 min	Retentionszeit
Level 3 (<i>unknown</i> , relevante Massen)	Massengenauigkeit < 5 ppm	Exakte Masse
	2 Ionen low (H ⁺ , Na ⁺ -Addukte)	<i>precursor ions</i>
	Peak intensity > 1000	Hinreichende Peakintensität
	iFit < 75%	Isotopenverhältnis Ungenauigkeit steigt bei geringer Konzentration

Diese Filter können stufenweise genutzt werden, um eine sichere Identifizierung zu ermöglichen. Ohne gezieltes *Screening* können auch alle Massen aus der Probe nach bestimmten Merkmalen wie Glycosylierungen oder halogenhaltigen Verbindungen ab einer bestimmten Signalintensität geprüft werden.

Metabolite, die halogenhaltig sind, liefern eine zusätzliche Absicherung als Verifizierungsmerkmal aufgrund der charakteristischen Isotopenmuster. Metabolite ohne ein signifikantes Isotopenmuster müssen immer im Vergleich zu einer analogen Blankprobe als falsch positiver Matrixbestandteil, wie oben erwähnt, mittels Referenz-Analyse ausgeschlossen werden.

Die Verwendung von Isotopenmustern zur Identifizierung ist ein weiteres Aufklärungs-Tool aufgrund der hohen Selektivität, die mit HRMS-Instrumenten erhalten werden kann, obwohl keine richtigen MS/MS-Experimente durchgeführt wurden. [182] Die Anwesenheit von hochauflösenden *Isotopenclustern* (d.h. aufgrund von Cl-Atomen) erleichtert die Identifizierung von Verbindungen, die diese Arten von Elementen enthalten und liefert den Nachweis der Gegenwart und der Anzahl solcher Atome. Da ein Chloratom im Pestizidmolekül ein charakteristisches Isotopenmuster bildet, verändert sich bei zwei oder drei Chlor-Atomen das Isotopenverhältnis und kann auch ein Brom-*Cluster* vortäuschen. In diesen Fällen sind die Algorithmen für das *isotope matching* entscheidend. Darüber hinaus liefern Fragmentspektren den entscheidenden Hinweis. Hierbei zeigen die Fragmente trotz Dehalogenierungsreaktionen weiterhin charakteristische Muster, sollten weitere Chlor-Atome vorliegen.

Nichtsdestotrotz dienen diese elementaren Kompositionen als Suchkriterium und können zur Identifizierung als Filterkriterium genutzt werden. Der Vorteil des Isotopenmusters liegt auch in einem Ausschluss von falsch positiver Identifizierung am Mangel der Übereinstimmung mit Matrixkomponenten. Ein identifizierter Peak kann auch den im *Guidance Document* SANTE/11945/2015 geforderten Bestätigungskriterien wie Retentionszeit und das Peakflächenverhältnis von zwei ausgewählten MS/MS-Massenübergängen entsprechen. [173] Dabei würde die Verwendung von LC-QToF-MS und den erhaltenen Analytenspektren nicht das charakteristische Isotopenverhältnis für halogenierte Verbindungen aufzeigen, womit eine Substanz ausgeschlossen werden kann. Eine Limitierung könnte hier jedoch eine geringe Analytkonzentration bzw. -sensitivität sein, da bei niedrigen

Konzentrationen ggf. nur ein ^{12}C -Molekülpeak nachgewiesen wird, womit die Substanz wiederum nicht eindeutig ausgeschlossen werden kann.

Die Massengenauigkeit von Fragment-Ionen im MS/MS-Erfassungsmodus der QToF-Instrumente ist oft geringer im Vergleich zum den erhaltenen Genauigkeiten im MS-Modus. Dies liegt vor allem an den Energiedifferenzen der Ionen, die aus dem Quadrupol in den ToF gelangen, da die kinetische Energie aller Ionen vor jedem Beschleunigungsimpuls ins Flugrohr oft nicht hinreichend fokussiert bzw. homogenisiert wird. [173] Der QToF-MS Analysator kann hier online die *precursor ions* mit der Lockmasse korrigieren. Hierbei kann das Lockmassenprofil auf MS/MS eingestellt werden, so dass auch Fragment-Ionen mit dem Fragment der Lockmasse korrigiert wird. Nichtsdestotrotz ist zur Bestimmung der Position im Molekül, in dem die strukturelle Änderung stattfand, ein Fragmentierungsspektrum entscheidend. Hier ist es jedoch oft eine unzureichende Information, um zwischen zwei Strukturisomeren genau zu differenzieren. An welcher Stelle z.B. eine Hydroxylierung oder Demethylierung stattfand, kann im LC-QToF-MS System nicht immer endgültig geklärt werden und die Strukturisomere bleiben undefiniert. Jedoch unterscheiden sich oft Strukturisomere in ihrer Toxizität, daher wäre hier ein wichtiger Schritt, zusätzliche Werkzeuge für eine eindeutige Metaboliten Verifizierung anzuschließen.

Die empirische und im Fall von *suspect screening* erzeugte Bibliothek basiert somit vor allem auf experimentell erzeugten Daten, die so auf weitere Proben anwendbar ist und durch weitere Analysen verifiziert werden kann.

5.3 Entwicklung und Validierung einer Analysenmethode zur Bestimmung von polaren Pestiziden und Metaboliten mittels Tandem-MS

Die polaren Pestizide umfassen verschiedene Gruppen von Analyten, die sich aufgrund ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften nicht mit den beschriebenen Multimethoden bei der Pestizidrückstandsanalytik erfassen lassen. [80]

Die polaren Pestizide können in eine anionische und kationische Gruppe eingeteilt werden. Die Schwierigkeit bei der Analyse von polaren Pestiziden beruht hauptsächlich aufgrund der individuellen Extraktionseffizienzen einzelner Zielanalyten sowie einer separaten, instrumentellen Analyse dieser Substanzen in ein und demselben Messextrakt. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, eine

eigene Multimethode für polare Pestizide und weitestgehend eine vereinfachte Methode zur Bestimmung zu entwickeln, die robust und geeignet für einen hohen Probendurchsatz ist. Hierbei sollte eine sensitive Messmethode aufgebaut werden, um verschiedene Arten von Analyten in einem Lauf zu analysieren.

5.3.1 Polare Pestizide und Metabolite

Eine Methode für anionische polare Pestizide und deren Metabolite wurde mittels Ionenchromatographie Tandem-MS (IC-MS/MS) entwickelt. Die Methode umfasst die Parameter Fosetyl und dessen Metabolit Phosphonsäure, Ethephon und 2-Hydroxyethephon (HEPA) sowie Chlorat und Perchlorat. Aufgrund ihrer polaren Eigenschaften werden diese Substanzen bei der QuEChERS-Methode nicht extrahiert. Des Weiteren können diese Analyten nicht in einer Pestizid Multimethode erfasst werden, da diese üblicherweise auf einer RP-Chromatographie basiert. Die Routineanalytik umfasste daher mehrere Einzelmethoden, wobei die Extrakte wiederholt gemessen werden mussten. Die Extraktionsmethode für die Analyten basiert auf der QuPPe-Methode, aufgrund der hohen Löslichkeit wird die homogenisierte Probe in Wasser und angesäuertem Methanol extrahiert. Da die Wiederfindungsraten für die Analyten zwischen 80% und 120% betrugen, wurde keine Modifizierung an der Extraktion vorgenommen und das QuPPe-Protokoll lediglich beim mechanischen Extraktionsschritt mittels Collomix modifiziert, da dieser bei komplexen Matrices eine gleichwertige Extraktionseffizienz aufweist mit einer verkürzten Extraktionszeit von 5 Minuten anstatt 15 Minuten mit einer herkömmlichen Schüttelmaschine.

Bei dem offiziellen QuPPe-Protokoll wie auch in der Literatur erfolgt die Analytik hauptsächlich auf HILIC- und Graphit-Phasen. [57] Die Graphitphase erwies sich bei der Entwicklung der Methode als ungeeignet, da die Ergebnisse nicht reproduzierbar waren und die Retentionszeiten der Zielanalyten im Verlauf der Nutzung keine stabilen Werte erreichten. Die HILIC-Phase war im Vergleich zu der Graphitsäule konstant sowohl beim Detektorresponse als auch bei der Chromatographie. Verschiedene HILIC-Phasen wurden getestet, jedoch zeigte keins der Systeme eine hinreichende Sensitivität von 0,010 mg/kg in pflanzlichen Lebensmitteln. Hierfür wurde versucht, unterschiedliche pH-Systeme und *modifier*-Salze zu testen. Die HILIC-Phasen arbeiten in einem pH-Bereich zwischen pH 3-7 und eignen sich somit für saure bis neutrale Chromatographie Systeme. [183] Für eine Chromatographie

mit basischen Eluenten stellte sich eine IC-Säule als geeignet heraus. Beide Eluenten sind wässrig, wobei Ammoniumhydrogencarbonat verwendet wurde, da dieses leichtflüchtig ist und somit keine hohe Belastung für die ESI-Ionenquelle darstellt und kein elektrolytisches Eluent-Suppressorsystem erfordert. Darüber hinaus wurde zusätzlich ein organischer *modifier* mit ACN verwendet, um sowohl die Ionisierung zu optimieren, als auch die Chromatographie der organischen Bestandteile der Probe zu ermöglichen und eine Präzipitation in der Säule vorzubeugen. Das Perchlorat konnte nur bei höheren organischem Anteil von ACN im Gradient schneller von der Säule eluiert werden.

Ein Gradient wurde mit Lösungsmittelstandards entwickelt. Erste Ergebnisse nach den Entwicklungsschritten mit einem MMC einer Apfelmatrix zeigten eine nahezu vollständige Matrixlöschung sowie nicht reproduzierbare Signale für Ethephon und Phosphorsäure. Aufgründessen wurde der Gradient direkt mittels MMCs weiter optimiert. Die Chromatographie musste so aufgebaut werden, dass die Analyten Fosetyl und Phosphorsäure aufgrund von Interferenzen bei den Massenübergängen hinsichtlich ihrer Retentionszeit getrennt werden. Des Weiteren wurde bei der Methodenentwicklung Phosphorsäure in die Methode implementiert, da Phosphorsäure eine Interferenz von Phosphorsäureübergängen darstellt und somit diese als falsch positiv nachgewiesen würde. Phosphorsäure war besonders entscheidend, da diese ein analoges chromatographisches Verhalten als Co-Eluent aufwies und ein natürlicher Bestandteil in hohen Mengen in pflanzlichen Matrices darstellt. Dies war eine besondere Herausforderung bei der Chromatographie, da es galt, Phosphorsäure bei 0,010 mg/kg als einen ungestörten Peak neben Phosphorsäure zweifelsfrei zu identifizieren. Zwar ist Phosphorsäure gemäß der Rückstandsdefinition als Metabolit von Fosetyl als Summe Fosetyl anzugeben, dieser Parameter wird jedoch oft als eigenständige Substanz aufgrund von anderen Quellen wie Dünger oder Chemikalienrückständen geprüft. Das Ziel war, Phosphorsäure erstmalig bei 0,010 mg/kg zu bestimmen, was mit der entwickelten Methode erreicht werden konnte.

Im Verlauf der Methodenentwicklung zeigte Ethephon oft eine Störung in verschiedenen Obstsorten wie Apfel, Erdbeere und Orange, bei denen wahrscheinlich organische Säuren als Co-Eluenten ein reproduzierbares Signal erschwerten und oft die direkt nachfolgende Analyse noch beeinträchtigten. Da ein zusätzlicher *clean-up*-Schritt die Probenaufarbeitung erschweren würde und ein

selektives *clean-up* bei analogen polaren und sauren Substanzen komplex ist, wurde auch hier eine chromatographische Anpassung im Gradienten vorgenommen, um die Störungen bei Ethephon zu entfernen. Zusätzlich wurde auch hier das Metabolit HEPA von Ethephon mit in die Methode aufgenommen. Zwar stellt dieses noch keinen rechtlich relevanten Metaboliten dar und ist somit nicht Bestandteil der Rückstandsdefinition, ist jedoch schon seit einiger Zeit in der Diskussion und fester Bestandteil der staatlichen Überwachungsprogramme. [184]

Die beiden Analyten Chlorat und Perchlorat sind Anionen starker Säuren, wobei Perchlorat ein permanentes Anion darstellt. [185] Beide Anionen zeigten einen sehr eingeschränkten dynamischen Bereich von 0,010 bis 0,100 mg/kg. Des Weiteren wurde festgestellt, dass eine eingeschränkte Reproduzierbarkeit des Signals in Mehrfachmessungen derselben Messlösung vorlag. Dies wurde nicht wie bei Ethephon durch Matrixeinflüsse hervorgerufen, sondern schien ein Detektorphänomen zu sein. Analoge Versuche wurden an Systemen zweier verschiedener Gerätehersteller mittels ESI Tandem-MS (Fa. Waters Xevo TQ-S und Agilent 6495 Triple Quadrupole) durchgeführt. Beide Systeme zeigten einen kleinen dynamischen Bereich und inhomogene Analytsignale bei Kalibrierlösungen. Eine Modifikation am Gradienten führte zu keiner Verbesserung. Des Weiteren wurden verschiedene Injektionsvolumina zwischen 0.3 bis 20 µL injiziert und die resultierenden Signale verglichen, um eine Detektorsättigung auszuschließen. Aufgrund des kleinen dynamischen Bereichs und des inkonsistenten Detektorsignals sind für diese beiden Analyten isotopenmarkierte interne Standards notwendig. Die isotopenmarkierten Chlorat- und Perchlorat-Substanzen verhielten sich analog zu den nativen Standards, dies hatte den Vorteil, dass Signaleinbrüche korrigiert werden konnten und der dynamische Bereich bis zu 10 mg/kg erweitert wurde. Darüber hinaus konnte bei der Quantifizierung der Proben auf eine Standardaddition verzichtet werden.

Für die anionischen Pestizide wurde eine Multimethode für polare Pestizide entwickelt. Die vorher üblichen drei Einzelmethoden konnten in einem Analysenlauf zusammengefasst werden. Die ausgewählten Analyten weisen ein komplexes chromatographisches Verhalten auf. Da die Methode aus 4 Wirkstoffen und 2 Metaboliten besteht, die jeweils eine breite Anwendung auf Lebensmitteln vor allem pflanzlicher Herkunft finden, wurden repräsentativ 6 Warengruppen gemäß der EU-Regelung wie Zitrusfrüchte, Getreide, Ölsaaten und getrocknete Früchte ausgewählt.

Anhand der Matrices wurde der Gradient entwickelt, um Störungen und Suppressionen zu vermeiden. Zusätzlich wurden für die Quantifizierung ILIS für die restlichen Analyten eingeführt.

5.3.2 Quartäre Ammoniumverbindungen

Die quartären Ammoniumverbindungen (*Quats*) umfassen Chlormequat, Mepiquat, Paraquat und Diquat. Die beiden Herbizide Paraquat und Diquat sind systemisch wirkende Pestizide, d.h. diese dringen in die Pflanze ein und verteilen sich über die Leitsysteme in die Organe vom Zielorganismus und wirken überall in der behandelten Pflanze. [186] Chlormequat und Mepiquat sind Pflanzenregulatoren, d.h. es handelt sich hierbei um Pflanzenhormone, die das Wachstum, die Form und den Nährstoffhaushalt der Pflanzen beeinflussen. [187, 188]

Bei den *Quats* handelt es sich um polare Pestizide, die allerdings permanente Mono- und Dikationen sind. [186, 189] Diese unterliegen ebenfalls nicht dem QuEChERS-Protokoll und sind nicht detektierbar mit der Pestizid Multimethode mittels RP-Chromatographie. Aufgrund ihrer positiven Ladung neigen diese zu starken Interaktionen mit verschiedenen Oberflächen und binden vor allem an Glasoberflächen. Weiterhin bilden die *Quats* aufgrund ihres geladenen Grundzustandes Komplexe mit verschiedenen Matrixbestandteilen. Aufgrund dieser Eigenschaften sind die *Quats*, insbesondere Paraquat und Diquat, mit einer Wasser-Methanol-Extraktion nach QuPPE aus stärkehaltigen und komplexen Matrices nicht extrahierbar. Für diese Analyten ist im QuPPE-Protokoll eine Heißextraktion mit 0,1 M HCl vorgeschlagen. Die Vorschrift wurde zur Grundlage genommen, um eine schnelle und einfache Extraktionsmethode zu entwickeln. Ziel war hier die Implementierung von allen vier *Quats* in eine Methode. Aufgrund ihrer Ladung benötigen diese eine separate stationäre Phase als die Anionen Pestizide (diskutiert im Abschnitt 4.3.1). Hier wurde eine Methode mit einer stationären Phase mit schwachem Kationenaustauscher Charakter als geeignet ausgewählt, da diese für alle vier Analyten eine hohe Detektorsensitivität aufwies.

Die Extraktion für die *Quats*-Methode wurde anhand der Matrix Chiasamen entwickelt. Die Chiasamen aus dem biologischen Anbau werden oft auf die *Quats* untersucht und stellen eine besondere Herausforderung für die Extraktion und aufgrund ihres Quellvermögens und relativ hohen Fettanteils eine komplexe Matrix dar. [190] Um eine hinreichende Wiederfindungsrate im Bereich von 80% - 120% zu

erreichen, wurde eine höher konzentrierte HCl-Lösung verwendet und das Extraktionsvolumen von 10 mL auf 20 mL erhöht, da eine hohe Detektorsensitivität gegeben war. Neben Wasser und Säure wurde Methanol zugegeben, um das Quellen dieser Matrix einzugrenzen. Mit diesem Extraktionsverfahren konnte im Vergleich mit und ohne Erhitzungsschritt eine gleichwertige Wiederfindung erzielt werden, so dass die Heißextraktion als nicht notwendig erachtet wurde.

Analog zu den anionischen Pestiziden wurden auch hier eine repräsentative Auswahl an Matrices stellvertretend für die pflanzlichen Warengruppen gemäß des Dokumentes SANTE/11945/2015 validiert mit einem LOQ von 0,010 mg/kg.

6. Schlussfolgerungen

Das HRMS System ermöglicht verschiedene Untersuchungsansätze auf dem Gebiet der Pestizidrückstandsanalytik. Eine Multimethode für die Pestizidwirkstoffe sowie relevante Metabolite als *targeted screening* wurde entwickelt. Diese Methode eignet sich als eigenständige Analyse und kann sowohl qualitativ als auch quantitativ eingesetzt werden. Die Hauptanwendung der HRMS ist vor allem jedoch für qualitative *Screenings* geeignet, da für die quantitative Bestimmung Tandem-MS als ein robustes Gerät mit sowohl höherer Sensitivität als auch einem größeren dynamischen Bereich bevorzugt wird.

Die HRMS im *full scan* Mode hat vor allem seinen Schwerpunkt in einer (Re-) Untersuchung der Daten. Oft handelt es sich bei dieser Technik um ein komplementäres *Screening*. Hier können Befunde aufgrund von Strukturaufklärungswerkzeugen bestätigt oder verworfen werden und es können hier mehr als nur Retentionszeit und Fragment zur Identifizierung herangezogen werden. Im Fall eines fehlenden Fragments (*qualifiers*) kann das Fragmentspektrum anhand einer *in-silico* Fragmentierung in der Retrospektive auf weitere Fragment-Ionen untersucht werden. Bei einer nicht detektierten Substanz (fehlender *quantifier*) kann das *precursor*-Spektrum auf weitere Addukte oder *in-source*-Fragmentierung *gescreent* werden. Innerhalb von einem 17 Minuten Analysenlauf können bis zu 300 Substanzen parallel bestimmt werden. Dabei wird die Analyse nicht durch die *dwell time* wie in Tandem-MS Instrumenten beschränkt, da die Massen mit HR bis zur vierten Nachkommastelle aufgelöst werden und alle Ionen auf einmal *gescannt* und anschließend fragmentiert werden können. Dies erlaubt eine Detektion von über 10000 Substanzen (*features*) pro Analysenlauf. Hierbei werden große Datensätze

erzeugt, die sowohl großes Datenvolumen als auch die Softwaregeschwindigkeit und somit die Prozessierungszeit verlängern. Daher ist ein Kompromiss bei der Datenerzeugung (*thresholds*) notwendig, um mit einer *targeted screening*-Methode routinetaugliche Auswertungen zu erzeugen. Das vorliegende QToF-MS Instrument ermöglicht zusätzlich die Kopplung von IMS und wird damit um eine Trenndimension innerhalb des Systems erweitert. Dies hat den Vorteil, dass Analyten nach der chromatographischen Trennung in der LC aufgrund ihrer 3D Struktur aufgetrennt werden, wobei die Kennziffern der Driftzeit und des CCS-Werts erhalten werden. Beide Parameter sind signifikant für einen Analyten und können als ein zusätzlicher Identifizierungspunkt innerhalb eines gewissen Schwellenwerts genutzt werden. Die CCS sind Matrix-unabhängig, wie die Retentionszeit robust und liefert analog Hinweise auf die Eigenschaft des Analyten, insbesondere auf die Größe des Moleküls. Aufgrund der in der Regel kleinen Strukturdifferenzen liegt im Bereich der *small molecule*-Anwendung ein geringer Grad von Unterschieden in dem CCS-Bereich vor. Hier muss ein Unterschied von mindestens > 2% CCS-delta vorliegen, um co-eluierende, isobare und als Isomere vorliegende Substanzen unterscheiden zu können. Die IMS dient in erster Linie der spektralen Auftrennung von Analyten von der Matrix und einer Form von MS/MS-Analogon, da die Fragmentierung erst nach der Auftrennung erfolgt, so dass eine korrekte Zuordnung von Fragmenten zu *precursor ions* erfolgen kann.

Des Weiteren bieten die Instrumente bei der Methodenentwicklung aufgrund ihrer Datenaufnahme ein Monitoring über die gesamte Probe. Da hier sowohl die Zielanalyten als auch Matrixbestandteile detektiert werden, kann eine visuelle Nachverfolgung von effizienten *clean-ups* als auch die Entwicklung von Gradienten erfolgen.

Die HRMS-*Screenings* sind wie so oft bei Multimethoden eine Kompromissmethode. Es erfolgt keine Optimierung der Kapillarspannung und Kollisionsenergien für jeden einzelnen Parameter, sondern es werden unter einer gemeinsamen Kapillarspannung alle Ionen aus der Probe ionisiert und mit einer Energierampe erfolgt eine Fragmentierung von allen Ionen, die dann auf die Muttermoleküle zurückgerechnet werden. Dies hat den Vorteil, dass diese Systeme komplette Datensätze von allen Ionen produzieren und somit weitere analytische Fragen geklärt werden können. Ohne Limitierung bei der Aufnahme von ionisierten Molekülen, wie im Vergleich zu dem Tandem-MS, können jederzeit weitere unbekannten

Substanzen identifiziert werden. Das HRMS System erlaubt in diesem Zusammenhang die Identifizierung von Wirkstoffen ohne Standards, die nicht im Routineumfang evaluiert wurden, die sehr selten oder verboten sind. Hier bietet sich auch die Untersuchung von möglichen Metaboliten dieser Wirkstoffe an.

Die Identifizierung von Metaboliten als Teil des *Pestizidscreenings* kann innerhalb der *targeted*-Methode implementiert werden. Metabolite können ohne die Notwendigkeit von Referenzsubstanzen anhand von unterschiedlichen Merkmalen identifiziert werden. Eine Kombination aus nichtselektiver Anreicherung / Extraktion zusammen mit selektivem und empfindlichem Nachweis durch HRMS, ermöglichte die Etablierung eines *suspect screening* Ansatzes *a priori*. Die Anschaffung von Referenzstandards ist notwendig, wenn eine Substanz nach Rückstandsrecht in den untersuchten Proben zu beanstanden wäre. So erleichtert der Workflow das Referenzstandard-Dilemma für das vermutete *Screening* von Hunderten von Verbindungen. Mittels automatischer und manueller Filter wie Referenzabgleich, Massengenauigkeit, Retentionszeit, Isotopenmuster, Fragmente sowie Intensität oder Peakform innerhalb der Softwareeinstellungen ist es möglich, den nachfolgenden manuellen Aufwand in der Bestätigungsanalyse zu reduzieren. *Screening*-Ansätze bieten schnelle und umfassende Ergebnisse für eine qualitative Beurteilung der Wirkstoffmetabolite in pflanzlichen Matrices.

Die häufigsten Befunde für Metabolite zeigten im Verlauf der Untersuchungen Blattgemüse. Im Vergleich dazu werden jedoch oft die Früchte der Pflanzen in der Routineanalytik untersucht, da dies überwiegend dem essbaren Anteil entspricht. Für eine Untersuchung von Metaboliten wäre es daher wichtig, die Blätter der Pflanzen zu analysieren. Die meisten Metabolite werden hier lokalisiert sein, da mit einigen Ausnahmen, wie der Vorlaufbehandlung, die Behandlung auf den Blättern erfolgt und folglich die Aufnahme der Wirkstoffe. Ebenfalls werden diese in den Vakuolen der Pflanzenblätter eingelagert, daher finden sich hier die Phase-I-Metabolite als auch die Konjugate der Phase-II-Reaktion. Die Mobilität der Metabolite ist weitestgehend beschränkt auf die Blätter. Am Ende der PHI (Wartezeit) können diese vergleichsweise nur in geringen Mengen in den Leitsystemen und der Wurzel gefunden werden. Die Halbwertszeit der Metabolite sinkt mit ihrer Löslichkeit, da diese weiter metabolisiert werden. Daher ist es wichtig, die Untersuchung auf den Blättern der Pflanze erfolgen zu lassen, oft werden die Metabolite jedoch weiter von

der Pflanze metabolisiert und somit während der Reifung, des Transportes oder der Lagerungszeit weiterhin abgebaut werden.

Ein möglicher Anwendungsnachweis ist jedoch auch in diesen Pflanzenteilen möglich, wie in der Modellstudie gezeigt wurde. Hierbei kann ein Metabolit auch in die Blüten oder Früchte transportiert und detektiert werden, ohne dass ein Wirkstoff nachweisbar ist. Ein *suspect screening*-Ansatz kann auch auf andere Substanzgruppen mit ähnlichen chemischen Strukturen ausgedehnt werden, für die die Referenzstandards nicht leicht zugänglich sind, wie Pharmazeutika, Industriechemikalien und deren Transformationsprodukte und andere Matrices.

Für polare Pestizide und Metabolite wurden zwei separate Methoden auf Tandem-MS Geräten entwickelt. Die polaren Substanzen lassen sich nicht in einer Multimethode etablieren, da diese nicht mittels QuEChERS extrahierbar und für die RP-Phase nicht geeignet sind. Von diesen polaren Zielanalyten sind Referenzsubstanzen kommerziell erhältlich, daher benötigt es keine Strukturaufklärungsarbeit und eine quantitative Beurteilung ist obligatorisch. Bei der quantitativen Analyse von *targeted*-Substanzen zeigt sich, dass die Tandem-MS für die Analytik im Vorteil ist, können diese Komponenten doch mit einem robusten Tandem-MS im MRM Modus bestimmt werden. Eine geeignete Multimethode für die polaren Pestizide und deren Metabolite wurde mit einem *reporting limit* von 0,010 mg/kg etabliert. Hier war insbesondere wichtig, die Einzelparameter in einem Analysenlauf für eine effiziente Routineanalytik zu ermöglichen. Die Methode erlaubt die Bestimmung von Phosphonsäure mit 0,010 mg/kg, was eine rechtskonforme Analyse gemäß der Diätverordnung und somit für den Bereich von Kinder- und Säuglingsnahrung zulässt. Hierbei konnten zwei Module aus dem QuPPE-Protokoll in einer Multimethode für die anionischen polaren Pestizide zusammengefasst werden. Weiterhin erlaubt das entwickelte System die Implementierung weiterer Analyten wie Maleinsäurehydrazid oder Glyphosat.

Zusätzlich wurde eine Methode für die kationischen quartären Ammoniumverbindungen entwickelt. Diese stellen permanente Kationen dar und können nicht von der Anionen Multimethode erfasst werden. Hier wurde eine gezielte Extraktion für die *Quats* optimiert und vereinfacht, um eine robuste Routinemethode zu etablieren.

Beide Methoden für polare Pestizide wurden anhand von repräsentativen pflanzlichen Matrices evaluiert und validiert, so dass eine Anwendung für unterschiedliche Lebensmittel möglich ist.

7. Literaturverzeichnis

- [1] EFSA. *Pestizide*. <https://www.efsa.europa.eu/de/topics/topic/pesticides>. Accessed 23 July 2017.
- [2] Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit. *Pflanzenschutzmittel (Pestizide)*. <https://www.lgl.bayern.de/lebensmittel/chemie/pflanzenschutzmittel/index.htm>. Accessed 23 July 2017.
- [3] Umweltbundesamt. *Zulassung von Pflanzenschutzmitteln*. <https://www.umweltbundesamt.de/daten/land-forstwirtschaft/landwirtschaft/pflanzenschutzmittelverwendung-in-der>. Accessed 23 July 2017.
- [4] Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. *Pflanzenschutz-Kontrollprogramm*. http://www.bvl.bund.de/DE/04_Pflanzenschutzmittel/01_Aufgaben/06_Pflanzenschutzkontrollprogramm/psm_Pflanzenschutzkontrollprogramm_node.html. Accessed 23 July 2017.
- [5] Bundesinstitut für Risikobewertung. *Pflanzenschutzmittel*. <http://www.bfr.bund.de/de/pflanzenschutzmittel-240.html>. Accessed 23 July 2017.
- [6] EU Pesticide database. *Search active substances*. <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.selection&language=EN>. Accessed 18 July 2017.
- [7] Wolfgang Reinert. 2015. *Pflanzenschutzmittel – Wirkstoffgenehmigung in der EU. Pflanzenschutzmittelzulassung – Wie funktioniert das?* http://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/Veranstaltungen/PSMZulassung-Reinert.pdf?__blob=publicationFile. Accessed 18 July 2017.
- [8] Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. *Verzeichnis zugelassener Pflanzenschutzmittel - Standardsuche*. Verzeichnis zugelassener Pflanzenschutzmittel - Standardsuche. Accessed 18 July 2017.
- [9] Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. *Wartezeit: Definitionen und Hinweise*. http://www.bvl.bund.de/DE/04_Pflanzenschutzmittel/01_Aufgaben/07_RueckstaendeHoechstgehalte/01_RueckstaendeHoechstgehalte/01_Wartezeit/psm_rueckst_und_hoechstM_Wartezeit_node.html. Accessed 18 July 2017.
- [10] Europäischen Parlaments und des Rates. 2009. *Verordnung (EG) Nr. 1107/2009 vom 21. Oktober 2009 über das Inverkehrbringen von Pflanzenschutzmitteln und zur Aufhebung der Richtlinien 79/117/EWG und 91/414/EWG des Rates*.

- [11] Deutscher Bundestag - Ausarbeitung. *Importtoleranzen für Wirkstoffe in Pflanzenschutzmitteln nach Auslaufen der Pflanzenschutzmittelzulassung*. <https://www.bundestag.de/blob/508956/5565cf79b547f6234aba243684329eaa/wd-5-021-17-pdf-data.pdf>. Accessed 18 July 2017.
- [12] Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. 2017. *Informationen über Pflanzenschutzmittel-Wirkstoffe*. http://www.bvl.bund.de/DE/04_Pflanzenschutzmittel/01_Aufgaben/03_EUWirkstoffpruefung/02_info_wirkstoffe/psm_euWirkstoffpruefung_psm_info_wirk_node.html. Accessed 18 July 2017.
- [13] Monika Krause. 2015. *Biozidprodukte- & Pflanzenschutzmittel-Zulassung*. https://www.baua.de/DE/Themen/Arbeitsgestaltung-im-Betrieb/Gefahrstoffe/pdf/Vortrag-Biozid-Produkte.pdf?__blob=publicationFile. Accessed 18 July 2017.
- [14] Eu-Kommission. 2013. *Verordnung (EU) Nr. 283/2013 vom 1. März 2013 zur Festlegung der Datenanforderungen für Wirkstoffe gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1107/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates über das Inverkehrbringen von Pflanzenschutzmitteln Text von Bedeutung für den EWR*.
- [15] Bayerisches Landesamt für Umwelt. 2008. *Pflanzenschutzmittel-Metaboliten Vorkommen und Bewertung*. https://www.lfu.bayern.de/analytik_stoffe/psm_metaboliten/doc/gesamtfassung_psm_metaboliten.pdf. Accessed 18 July 2017.
- [16] Europäischen Parlaments und des Rates. 2005. *Verordnung (EG) Nr. 396/2005 vom 23. Februar 2005 über Höchstgehalte an Pestizidrückständen in oder auf Lebens- und Futtermitteln pflanzlichen und tierischen Ursprungs und zur Änderung der Richtlinie 91/414/EWG des Rates Text von Bedeutung für den EWR*.
- [17] Umweltbundesamt. 2017. *Zulassung von Pflanzenschutzmitteln*. <https://www.umweltbundesamt.de/themen/chemikalien/pflanzenschutzmittel/zulassung-von-pflanzenschutzmitteln>. Accessed 18 July 2017.
- [18] Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. *Pflanzenschutzmittel-Rückstände auf Lebensmitteln*. http://www.bvl.bund.de/DE/04_Pflanzenschutzmittel/02_Verbraucher/02_PSM_Rueckstaende_LM/psm_PSMRueckstaendeLM_node.html. Accessed 18 July 2017.
- [19] Organisation for Economic Co-operation and Development. 2009. *Guidance document on the definition of residue*.

- <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/41784347.pdf>. Accessed 18 July 2017.
- [20] Botitsi, H., Economou, A., and Tsiipi, D. Development and validation of a multi-residue method for the determination of pesticides in processed fruits and vegetables using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, 6. 2007, 1685–1695.
- [21] Farag, A. T., El-Aswad, A. F., and Shaaban, N. A. Assessment of reproductive toxicity of orally administered technical dimethoate in male mice. *Reprod Toxicol*, 2. 2007, 232–238.
- [22] Sun, F., Liu, L., Ma, W., Xu, C., Wang, L., and Kuang, H. Rapid on-site determination of melamine in raw milk by an immunochromatographic strip. *Int J Food Sci Tech*, 7. 2012, 1505–1510.
- [23] Skretteberg, L. G., Lyrån, B., Holen, B., Jansson, A., Fohgelberg, P., Siivinen, K., Andersen, J. H., and Jensen, B. H. Pesticide residues in food of plant origin from Southeast Asia—a Nordic project. *Food Control*. 2015, 225–235.
- [24] Brancato, A., Brocca, D., Lentdecker, C. de, Erdos, Z., Ferreira, L., Greco, L., Jarrah, S., Kardassi, D., Leuschner, R., Lythgo, C., Medina, P., Miron, I., Molnar, T., Nougadere, A., Pedersen, R., Reich, H., Sacchi, A., Santos, M., Stanek, A., Sturma, J., Tarazona, J., Theobald, A., Vagenende, B., Verani, A., and Villamar-Bouza, L. Setting of an import tolerance for 2,4-D in maize. *EFS2*, 5. 2017.
- [25] Christian Sieke. 2014. *Rückstandsbelastung von Mensch und Tier durch glyphosathaltige Pflanzenschutzmittel*. <http://www.bfr.bund.de/cm/343/rueckstandsbelastung-von-mensch-und-tier-durch-glyphosathaltige-pflanzenschutzmittel.pdf>. Accessed 18 July 2017.
- [26] EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues. 2016. *Guidance on the establishment of the residue definition for dietary risk assessment*.
- [27] EFSA. *Threshold of Toxicological Concern*. <https://www.efsa.europa.eu/de/topics/topic/threshold-toxicological-concern>. Accessed 18 July 2017.
- [28] Garrido-Frenich, A., Romero-González, R., Martínez-Vidal, J. L., Plaza-Bolaños, P., Cuadros-Rodríguez, L., and Herrera-Abdo, M. A. Characterization of recovery profiles using gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry for the determination of pesticide residues in meat samples. *J Chromatogr A*, 1-2. 2006, 315–321.

- [29] Gavrilescu, M. Fate of Pesticides in the Environment and its Bioremediation. *Eng Life Sci*, 6. 2005, 497–526.
- [30] Jacobs, M. N., Covaci, A., Gheorghe, A., and Schepens, P. Time trend investigation of PCBs, PBDEs, and organochlorine pesticides in selected n-3 polyunsaturated fatty acid rich dietary fish oil and vegetable oil supplements; nutritional relevance for human essential n-3 fatty acid requirements. *J Agric Food Chem*, 6. 2004, 1780–1788.
- [31] Waliszewski, S. M., Carvajal, O., Gómez-Arroyo, S., Amador-Muñoz, O., Villalobos-Pietrini, R., Hayward-Jones, P. M., and Valencia-Quintana, R. DDT and HCH isomer levels in soils, carrot root and carrot leaf samples. *Bull Environ Contam Toxicol*, 4. 2008, 343–347.
- [32] Worrall, F., Fernandez-Perez, M., Johnson, A., Flores-Cespedes, F., and Gonzalez-Pradas, E. Limitations on the role of incorporated organic matter in reducing pesticide leaching. *J Contam Hydrol*, 3-4. 2001, 241–262.
- [33] Ahmad, R., Salem, N. M., and Estaitieh, H. Occurrence of organochlorine pesticide residues in eggs, chicken and meat in Jordan. *Chemosphere*, 6. 2010, 667–671.
- [34] Organisation for Economic Co-operation and Development. 2007. *OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Metabolism in Crops No 507*.
- [35] Khan, S. U. Bound pesticide residues in soil and plants. *Residue Reviews: Residues of Pesticides and Other Contaminants in the Total Environment*. 1982, 1.
- [36] Bundesinstitut für Risikobewertung. *Fachgruppe Toxikologie der Wirkstoffe und ihrer Metaboliten*. http://www.bfr.bund.de/de/fachgruppe_toxikologie_der_wirkstoffe_und_ihrer_metaboliten-7561.html. Accessed 18 July 2017.
- [37] Berg, M., Mueller, S. R., and Schwarzenbach, R. P. Simultaneous Determination of Triazines Including Atrazine and Their Major Metabolites Hydroxyatrazine, Desethylatrazine, and Deisopropylatrazine in Natural Waters. *Anal Chem*, 11. 1995, 1860–1865.
- [38] Schreglmann, K., Hoeche, M., Steinbeiss, S., Reinnicke, S., and Elsner, M. Carbon and nitrogen isotope analysis of atrazine and desethylatrazine at sub-microgram per liter concentrations in groundwater. *Anal Bioanal Chem*, 9. 2013, 2857–2867.

- [39] Bottoni, P., Grenni, P., Barra, C., and Martinelli, A. Environmental fate of terbuthylazine and desethylterbuthylazine in soil, surface water and groundwater.
http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/_Public/40/032/40032831.pdf. Accessed 18 July 2017.
- [40] Holtze, M. S., Sørensen, S. R., Sørensen, J., and Aamand, J. Microbial degradation of the benzonitrile herbicides dichlobenil, bromoxynil and ioxynil in soil and subsurface environments--insights into degradation pathways, persistent metabolites and involved degrader organisms. *Environ Pollut*, 2. 2008, 155–168.
- [41] Gauch, R., Leuenberger, U., and Müller, U. Bestimmung des Herbizids Glyphosat und dessen Hauptmetabolit Aminomethylphosphonsäure (AMPA) in Trinkwasser mit Hilfe der HPLC. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 1. 1989, 36–38.
- [42] Lenz, P. and Schüle, E. 2008. *Abbauprodukte von Pflanzenschutzmitteln in Trinkwasser*. http://www.cvuas.de/pub/beitrag.asp?subid=1&Thema_ID=2&ID=742&Pdf=No. Accessed 18 July 2017.
- [43] Michalski, B., Stein, B., Niemann, L., Pfeil, R., and Fischer, R. Beurteilung der Relevanz von Metaboliten im Grundwasser im Rahmen des nationalen Zulassungsverfahrens für Pflanzenschutzmittel. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes*, 3. 2004, 53–59.
- [44] Bundesgesetzblatt. 2001. *Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch (Trinkwasserverordnung - TrinkwV)*. *TrinkwV*.
- [45] Sandermann, H. Plant metabolism of xenobiotics. *Trends in biochemical sciences*, 2. 1992, 82–84.
- [46] Casida, J. E. and Lykken, L. Metabolism of organic pesticide chemicals in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol*, 1. 1969, 607–636.
- [47] Sandermann Jr, H. Higher plant metabolism of xenobiotics. The 'green liver' concept. *Pharmacogenet Genomics*, 5. 1994, 225–241.
- [48] van Eerd, L. L., Hoagland, R. E., Zablotowicz, R. M., and Hall, J. C. Pesticide metabolism in plants and microorganisms. *Weed Sci*, 4. 2003, 472–495.
- [49] Reichhart, D., Salaun, J.-P., Benveniste, I., and Durst, F. Time Course of Induction of Cytochrome P-450, NADPH-Cytochrome c Reductase, and

- Cinnamic Acid Hydroxylase by Phenobarbital, Ethanol, Herbicides, and Manganese in Higher Plant Microsomes. *Plant Physiol*, 4. 1980, 600–604.
- [50] Bode, M. 2004. *Studien zum Metabolismus von Pestiziden und Xenobiotika durch humane Cytochrom P450-Monooxygenasen in transgenen Tabakzellkulturen*, Bibliothek der RWTH Aachen. URN: urn:nbn:de:hbz:82-opus-9757.
- [51] Coleman, J., Blake-Kalff, M., and Davies, E. Detoxification of xenobiotics by plants. Chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends Plant Sci*, 4. 1997, 144–151.
- [52] Kreuz, K., Tommasini, R., and Martinoia, E. Old enzymes for a new job (herbicide detoxification in plants). *Plant Physiol*, 2. 1996, 349.
- [53] Schripsema, J. and Verpoorte, R. 2012. *Primary and Secondary Metabolism of Plants and Cell Cultures III. Proceedings of the Workshop Held in Leiden, The Netherlands, 4–7 April 1993*. Springer Science & Business Media.
- [54] Sandermann, H., Haas, M., Messner, B., Pflugmacher, S., Schröder, P., and Wetzel, A. The role of glucosyl and malonyl conjugation in herbicide selectivity. *Regulation of Enzymatic Systems Detoxifying Xenobiotics in Plants. NATO ASI Series. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers*. 1997, 211–231.
- [55] Breuer, J. 2001. *Aufnahme, Metabolismus und Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände aus 4-Nitrophenol in Soja und Weizen. Ein Vergleich verschiedener In-vitro-Systeme*. Shaker. URN: urn:nbn:de:hbz:82-opus-3770.
- [56] Payá, P., Anastassiades, M., Mack, D., Sigalova, I., Tasdelen, B., Oliva, J., and Barba, A. Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. *Anal Bioanal Chem*, 6. 2007, 1697–1714.
- [57] Anastassiades, M., Di Kolberg, Benkenstein, A., Eichhorn, E., Zechmann, S., Mack, D., Wildgrube, C., Sigalov, I., Dörk, D., and Barth, A. Quick method for the analysis of numerous highly polar pesticides in foods of plant origin via LC-MS/MS involving simultaneous extraction with methanol (QuPPe-method). *EU Reference Laboratory for pesticides requiring Single Residue Methods (EURL-SRM)*, Version 9.2. 2016.

- [58] Alder, L., Greulich, K., Kempe, G., and Vieth, B. Residue analysis of 500 high priority pesticides. Better by GC-MS or LC-MS/MS? *Mass Spectrom Rev*, 6. 2006, 838–865.
- [59] Lesueur, C., Maestroni, B. Comparioson of QuEChERS-based methods for the analysis of 600 pesticides in common fruit and vegetables with GC-MS/MS and LC-MS/MS. *EPRW*, 2014.
- [60] Fernandes, V. C., Lehotay, S. J., Geis-Asteggianti, L., Kwon, H., Mol, H. G. J., van der Kamp, H., Mateus, N., Domingues, V. F., and Delerue-Matos, C. Analysis of pesticide residues in strawberries and soils by GC-MS/MS, LC-MS/MS and two-dimensional GC-time-of-flight MS comparing organic and integrated pest management farming. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2. 2014, 262–270.
- [61] Donato, F. F., Martins, M. L., Munaretto, J. S., Prestes, O. D., Adaime, M. B., and Zanella, R. Development of a Multiresidue Method for Pesticide Analysis in Drinking Water by Solid Phase Extraction and Determination by Gas and Liquid Chromatography with Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometry. *J Braz Chem Soc*, 2015.
- [62] Pérez-Ortega, P., Lara-Ortega, F. J., Gilbert-López, B., Moreno-González, D., García-Reyes, J. F., and Molina-Díaz, A. Screening of Over 600 Pesticides, Veterinary Drugs, Food-Packaging Contaminants, Mycotoxins, and Other Chemicals in Food by Ultra-High Performance Liquid Chromatography Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry (UHPLC-QTOFMS). *Food Anal Methods*, 5. 2017, 1216–1244.
- [63] Mastovska, K., Dorweiler, K. J., Lehotay, S. J., Wegscheid, J. S., and Szpylka, K. A. Pesticide multiresidue analysis in cereal grains using modified QuEChERS method combined with automated direct sample introduction GC-TOFMS and UPLC-MS/MS techniques. *J Agric Food Chem*, 10. 2010, 5959–5972.
- [64] Hildmann, F. 2016. *Entwicklung einer Multimethode zur Probenaufarbeitung und Bestimmung von gas-und flüssigkeitschromatographisch erfassbaren Pestiziden in Hühnereiern*, Saechsische Landesbibliothek-Staats-und Universitaetsbibliothek Dresden. URN: urn:nbn:de:bsz:14-qucosa-209382.
- [65] Pizzutti, I., Kok, A. de, da Silva, R., and Rohers, G. Comparison Between Three Chromatographic (GC-ECD, GC-PFPD and GC-ITD-MS) Methods and a UV-Vis

- Spectrophotometric Method for the Determination of Dithiocarbamates in Lettuce. *J Braz Chem Soc.* 2016.
- [66] European Commission. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. *SANTE/11945 /2015.* 2016.
- [67] Verordnung über diätetische Lebensmittel. 1963. *Diätverordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 28. April 2005 (BGBl. I S. 1161), die durch Artikel 22 der Verordnung vom 5. Juli 2017 (BGBl. I S. 2272) geändert worden ist.*
- [68] Lehotay, S. J., Son, K. A., Kwon, H., Koesukwiwat, U., Fu, W., Mastovska, K., Hoh, E., and Leepipatpiboon, N. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *J Chromatogr A*, 16. 2010, 2548–2560.
- [69] Corley, J. Best practices in establishing detection and quantification limits for pesticide residues in foods. *Handbook of residue analytical methods for agrochemicals.* 2003, 471491942–471491944.
- [70] Lambropoulou, D. A. and Albanis, T. A. Methods of sample preparation for determination of pesticide residues in food matrices by chromatography-mass spectrometry-based techniques. A review. *Anal Bioanal Chem*, 6. 2007, 1663–1683.
- [71] Cantwell, F. F. and Losier, M. 2002. Chapter 11 Liquid—liquid extraction. In *Sampling and Sample Preparation for Field and Laboratory.* Comprehensive Analytical Chemistry. Elsevier, 297–340. DOI=10.1016/S0166-526X(02)80048-4.
- [72] Wells, D. A. and Wells, D. Liquid Liquid Extraction. Strategies for method development and optimization. *High Throughput Bioanalytical Sample Preparation-Methods and Automation Strategies.* 2003, 307–326.
- [73] Tuzimski, T. and Sherma, J. 2015. *High Performance Liquid Chromatography in Pesticide Residue Analysis.* P 493. Crc Press. ISBN 9781466568815.
- [74] Vagi, M. C., Petsas, A. S., Kostopoulou, M. N., Karamanoli, M. K., and Lekkas, T. D. Determination of organochlorine pesticides in marine sediments samples using ultrasonic solvent extraction followed by GC/ECD. *Desalination*, 1-3. 2007, 146–156.

- [75] Masiá, A., Suarez-Varela, M. M., Llopis-Gonzalez, A., and Picó, Y. Determination of pesticides and veterinary drug residues in food by liquid chromatography-mass spectrometry. A review. *Anal Chim Acta*, 2016, 40–61.
- [76] Mol, H. G., van Dam, R. C., and Steijger, O. M. Determination of polar organophosphorus pesticides in vegetables and fruits using liquid chromatography with tandem mass spectrometry. Selection of extraction solvent. *J Chromatogr A*, 1-2. 2003, 119–127.
- [77] Hennion, M.-C. Solid-phase extraction. Method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *J Chromatogr A*, 1. 1999, 3–54.
- [78] Kolbe, N. and Andersson, J. T. Simple and sensitive determination of o-phenylphenol in citrus fruits using gas chromatography with atomic emission or mass spectrometric detection. *J Agric Food Chem*, 16. 2006, 5736–5741.
- [79] Anastassiades, M., Scherbaum, E., Bertsch D. 2003. Validation of a simple and rapid multiresidue method (QuEChERS) and its implementation in routine pesticide analysis. [http://www.cromlab.es/Articulos/EFS/Quechers/Quechers %20Validation%20of%20a%20Simple%20and%20Rapid%20Multiresidue%20Met hod%20\(QuEChERS\)%20and%20its%20Implementation%20in%20Routine%20 Pesticide%20Analysis.pdf](http://www.cromlab.es/Articulos/EFS/Quechers/Quechers%20Validation%20of%20a%20Simple%20and%20Rapid%20Multiresidue%20Method%20(QuEChERS)%20and%20its%20Implementation%20in%20Routine%20Pesticide%20Analysis.pdf). Accessed 18 July 2017.
- [80] Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Stajnbaher, D., and Schenck, F. J. 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*, 2. 2003, 412–431.
- [81] Anastassiades, M., Scherbaum, E., Mack, D. 2004. *Implementation of the QuEChERS Method for the Routine Analysis of Pesticide Residues - Validation and Experiences*. [http://cvuas.untersuchungsämter-bw.de/pdf/ poster_implementation_quechers_eprw.pdf](http://cvuas.untersuchungsämter-bw.de/pdf/poster_implementation_quechers_eprw.pdf). Accessed 20 July 2017.
- [82] Schreiber, A. LC-MS/MS Analysis of Emerging Food Contaminants. AB SCIEX. [https://sciex.com/Documents/tech%20notes/Emerging%20food_QTRAP%2045 00_acrylamide_AB%20SCIEX_5470412-01.pdf](https://sciex.com/Documents/tech%20notes/Emerging%20food_QTRAP%204500_acrylamide_AB%20SCIEX_5470412-01.pdf). Accessed 20 July 2017.
- [83] Kolberg, D. I. S., Mack, D., Anastassiades, M., Hetmanski, M. T., Fussell, R. J., Meijer, T., and Mol, H. G. J. Development and independent laboratory validation of a simple method for the determination of paraquat and diquat in potato, cereals and pulses. *Anal Bioanal Chem*, 8. 2012, 2465–2474.

- [84] Mol, H. G. J. and van Dam, R. C. J. Rapid detection of pesticides not amenable to multi-residue methods by flow injection-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, 27. 2014, 6817–6825.
- [85] Churchwell, M. I., Twaddle, N. C., Meeker, L. R., and Doerge, D. R. Improving LC-MS sensitivity through increases in chromatographic performance. Comparisons of UPLC-ES/MS/MS to HPLC-ES/MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2. 2005, 134–143.
- [86] Swartz, M. E. UPLC™. An Introduction and Review. *J Liq Chromatogr Rel Technol*, 7-8. 2005, 1253–1263.
- [87] Gumustas, M., Kurbanoglu, S., Uslu, B., and Ozkan, S. A. UPLC versus HPLC on Drug Analysis. Advantageous, Applications and Their Validation Parameters. *Chromatographia*, 21-22. 2013, 1365–1427.
- [88] Organization, W. H. Pesticide Residues in Food. *Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and a WHO Expert Group on Pesticide Residues*, 1988, 92. Food & Agriculture Organization.
- [89] Seccia, S., Fidente, P., Barbini, D. A., and Morrica, P. Multiresidue determination of nicotinoid insecticide residues in drinking water by liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chim Acta*, 1-2. 2005, 21–26.
- [90] Lee, S. M., Papathakis, M. L., Feng, H.-M. C., Hunter, G. F., and Carr, J. E. Multipesticide residue method for fruits and vegetables. California Department of Food and Agriculture. *Fresenius J Anal Chem*, 6. 1991, 376–383.
- [91] Gros, M., Petrović, M., and Barceló, D. Multi-residue analytical methods using LC-tandem MS for the determination of pharmaceuticals in environmental and wastewater samples. A review. *Anal Bioanal Chem*, 4. 2006, 941–952.
- [92] Vass, A., Robles-Molina, J., Pérez-Ortega, P., Gilbert-López, B., Dernovics, M., Molina-Díaz, A., and García-Reyes, J. F. Study of different HILIC, mixed-mode, and other aqueous normal-phase approaches for the liquid chromatography/mass spectrometry-based determination of challenging polar pesticides. *Anal Bioanal Chem*, 18. 2016, 4857–4869.
- [93] Buszewski, B. and Noga, S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)--a powerful separation technique. *Anal Bioanal Chem*, 1. 2012, 231–247.

- [94] Gao, S., Zhang, Z.-P., and Karnes, H. T. Sensitivity enhancement in liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry using derivatization and mobile phase additives. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2. 2005, 98–110.
- [95] Scherbaum, E. 2005. *Einsatz der HPLC-MS-(MS) in der Pestizidanalytik*. http://cvuas.untersuchungsämter-bw.de/pdf/vortrag_lcms_varian.pdf. Accessed 21 July 2017.
- [96] Blakley, C. R., Carmody, J. J., and Vestal, M. L. Liquid chromatograph-mass spectrometer for analysis of nonvolatile samples. *Anal Chem*, 11. 2002, 1636–1641.
- [97] Mbughuni, M. M., Jannetto, P. J., and Langman, L. J. Mass spectrometry applications for toxicology. *EJIFCC*, 4. 2016, 272.
- [98] Tsipi, D., Botitsi, H., and Economou, A. 2015. *Mass spectrometry for the analysis of pesticide residues and their metabolites*. P. 133-143. John Wiley & Sons. ISBN: 111906998X.
- [99] Müller, R. 2010. *Stabilität und Zerfallsdynamik hochgeladener Flüssigkeitströpfchen*. urn:nbn:de:gbv:ilm1-2009000486.
- [100] Bakdash, A. 2011. *Identifizierung und Interpretation von Wirkstoffmetaboliten in der systematischen toxikologischen Analyse unter Verwendung der HPLC mit Photodiodenarray-Detektor (HPLC-DAD) und der Flüssigchromatographie mit Flugzeit-Massenspektrometrie (LC-TOF-MS)*, Freie Universität Berlin. URN: urn:nbn:de:kobv:188-fudissthesis000000023674-1.
- [101] Hofstadler, S. A., Bakhtiar, R., and Smith, R. D. Electrospray Ionization Mass Spectroscopy. Part I. Instrumentation and Spectral Interpretation. *J Chem Educ*, 4. 1996, A82.
- [102] Gates, J. P. 2014. *Electrospray Ionisation (ESI)*. <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/esi-ionisation.xhtml>. Accessed 21 July 2017.
- [103] Kruve, A., Kaupmees, K., Liigand, J., Oss, M., and Leito, I. Sodium adduct formation efficiency in ESI source. *J Mass Spectrom*, 6. 2013, 695–702.
- [104] Weinmann, W., Stoertz, M., Vogt, S., Svoboda, M., and Schreiber, A. Tuning compounds for electrospray ionization/in-source collision-induced dissociation and mass spectra library searching. *J Mass Spectrom*, 9. 2001, 1013–1023.
- [105] Niessen, W. M. A. 2017. *Interpretation of MS-MS Mass Spectra of Drugs and Pesticides*. P. 353, John Wiley & Sons. ISBN: 1118500180.

- [106] Taylor, P. J. Matrix effects. The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clin Biochem*, 4. 2005, 328–334.
- [107] Zrostlíková, J., Hajšlová, J., Poustka, J., and Begany, P. Alternative calibration approaches to compensate the effect of co-extracted matrix components in liquid chromatography–electrospray ionisation tandem mass spectrometry analysis of pesticide residues in plant materials. *J Chromatogr A*, 1-2. 2002, 13–26.
- [108] Claudia Müller. 2004. *Entwicklung von Screeningverfahren für Arzneistoffe und Metaboliten mittels LC-MS und LC-MS/MS*. URN: urn:nbn:de:bsz:25-opus-14029.
- [109] King, R., Bonfiglio, R., Fernandez-Metzler, C., Miller-Stein, C., and Olah, T. Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. *J Am Soc Mass Spectrom*, 11. 2000, 942–950.
- [110] Bonfiglio, R., King, R. C., Olah, T. V., and Merkle, K. The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 12. 1999, 1175–1185.
- [111] Stüber, M. and Reemtsma, T. Evaluation of three calibration methods to compensate matrix effects in environmental analysis with LC-ESI-MS. *Anal Bioanal Chem*, 4. 2004, 910–916.
- [112] Mol, H. G. J., Zomer, P., and Koning, M. de. Qualitative aspects and validation of a screening method for pesticides in vegetables and fruits based on liquid chromatography coupled to full scan high resolution (Orbitrap) mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, 10. 2012, 2891–2908.
- [113] Grimalt, S., Sancho, J. V., Pozo, O. J., and Hernández, F. Quantification, confirmation and screening capability of UHPLC coupled to triple quadrupole and hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry in pesticide residue analysis. *J Mass Spectrom*, 4. 2010, 421–436.
- [114] García-Reyes, J. F., Molina-Díaz, A., and Fernandez-Alba, A. R. Identification of pesticide transformation products in food by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry via "fragmentation-degradation" relationships. *Anal Chem*, 1. 2007, 307–321.

- [115] Elisa De Ranieri, Senior Editor, *Nature Energy*. 2005. *Milestone 4 - When a velocitron meets a reflectron*. <http://www.nature.com/milestones/milemassspec/full/milemassspec04.html>. Accessed 5 November 2017.
- [116] Staub, A., Schappler, J., Rudaz, S., and Veuthey, J.-L. CE-TOF/MS. Fundamental concepts, instrumental considerations and applications. *Electrophoresis*, 10. 2009, 1610–1623.
- [117] Santacruz, C. P., Håkansson, P., Barofsky, D. F., and Piyadasa, C. K. G. A constant-momentum/energy-selector time-of-flight mass spectrometer. *J Am Soc Mass Spectrom*, 1. 2007, 92–101.
- [118] El-Aneed, A., Cohen, A., and Banoub, J. Mass Spectrometry, Review of the Basics. Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. *Appl Spectrosc Rev*, 3. 2009, 210–230.
- [119] Guilhaus, M., Mlynski, V., and Selby, D. Perfect Timing. Time-of-flight Mass Spectrometry†. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 9. 1997, 951–962.
- [120] Ferrer, I. and Thurman, E. M. 2009. *Liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry*. P. 24. John Wiley & Sons. ISBN: 978-0-470-13797-0.
- [121] Alelyunas, Y. W., Wrona, M. D., Cook, K., McDonald, S., and Rainville, P. D. Effect of MS Scan Speed on UPLC Peak Separation and Metabolite Identification. Time-of-Flight HRMS vs. Orbitrap. <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720004762en.pdf>. Accessed 5 November 2017.
- [122] Herbert, C. G. and Johnstone, R. A. W. 2002. *Mass spectrometry basics*. P. 158. Crc Press. ISBN 9780849313547.
- [123] Gómez-Pérez, M. L., Romero-González, R., Martínez Vidal, J. L., and Garrido Frenich, A. Analysis of veterinary drug and pesticide residues in animal feed by high-resolution mass spectrometry. Comparison between time-of-flight and Orbitrap. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 10. 2015, 1637–1646.
- [124] Polgár, L., García-Reyes, J. F., Fodor, P., Gyepes, A., Dernovics, M., Abrankó, L., Gilbert-López, B., and Molina-Díaz, A. Retrospective screening of relevant pesticide metabolites in food using liquid chromatography high resolution mass spectrometry and accurate-mass databases of parent molecules and diagnostic fragment ions. *J Chromatogr A*. 2012, 83–91.

- [125] Mandel, F. 2017. LC-MS für alle (s)?–LC-MS-Tipps. *Das HPLC-MS-Buch für Anwender*. S. 38. Wiley-VCH, Weinheim. ISBN: 978-3-527-34291-4.
- [126] Waters Corporation. *ZSpray™-Quellenarchitektur*. http://www.waters.com/waters/de_DE/SQ-Detector-2---Single-Quadrupole-Detection/nav.htm?cid=134631584&locale=de_DE. Accessed 21 July 2017.
- [127] Sage, A. 2005. *Lockspray. Automated exact mass measurement for electrospray applications*. Waters Corporation: Manchester, UK.
- [128] Kafle, G. K., Khot, L. R., Sankaran, S., Bahlol, H. Y., Tufariello, J. A., and Hill, H. H. State of ion mobility spectrometry and applications in agriculture. A review. *Eng Agric Environ Food*, 4. 2016, 346–357.
- [129] Gray, C. J., Thomas, B., Upton, R., Migas, L. G., Evers, C. E., Barran, P. E., and Flitsch, S. L. Applications of ion mobility mass spectrometry for high throughput, high resolution glycan analysis. *Biochim Biophys Acta*, 8. 2016, 1688–1709.
- [130] Cumeras, R., Figueras, E., Davis, C. E., Baumbach, J. I., and Gràcia, I. Review on ion mobility spectrometry. Part 1. Current instrumentation. *Analyst*, 5. 2015, 1376–1390.
- [131] Kurulugama, R. T., Darland, E., Kuhlmann, F., Stafford, G., and Fjeldsted, J. Evaluation of drift gas selection in complex sample analyses using a high performance drift tube ion mobility-QTOF mass spectrometer. *Analyst*, 20. 2015, 6834–6844.
- [132] Roy Martin. New Mass Spectrometry Technologies for Biomolecule Characterization. Waters Corporation. 2009 http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/local_seminar_presentations/CoreFacilitiesTechSummit/LeRoyMartin_MSTechnologies_BiomoleculeCharacterization.pdf. Accessed 24 October 2017.
- [133] Goscinny, S., Joly, L., Pauw, E. de, Hanot, V., and Eppe, G. Travelling-wave ion mobility time-of-flight mass spectrometry as an alternative strategy for screening of multi-class pesticides in fruits and vegetables. *J Chromatogr A*, 1405. 2015, 85–93.
- [134] Linne Uwe. 2016. *Ionenmobilitätstrennung (IMS)*. <https://www.uni-marburg.de/fb15/massenspektrometrie/service/speziellmethoden>. Accessed 22 July 2017.

- [135] Lapthorn, C., Pullen, F., and Chowdhry, B. Z. Ion mobility spectrometry-mass spectrometry (IMS-MS) of small molecules. Separating and assigning structures to ions. *Mass Spectrom Rev*, 1. 2013, 43–71.
- [136] Regueiro, J., Negreira, N., and Berntssen, M. H. G. Ion-Mobility-Derived Collision Cross Section as an Additional Identification Point for Multiresidue Screening of Pesticides in Fish Feed. *Anal Chem*, 22. 2016, 11169–11177.
- [137] Kurulugama, R., Imatani, K., and Taylor, L. The Agilent Ion Mobility QTOF Mass Spectrometer System. *Technical overview by Agilent Technologies*. 2013.
- [138] Tandem-MS. http://lh5.ggpht.com/_NNjxeW9ewEc/TJj7UkEGijI/AAAAAAAC3A/2oGgv_1NNiQ/tmp1E459_thumb1_thumb1.jpg?imgmax=800. Accessed 22 July 2017.
- [139] Schreiber, A. Advantages of Using Triple Quadrupole over Single Quadrupole Mass Spectrometry to Quantify and Identify the Presence of Pesticides in Water and Soil Samples. *Sciex Concord Ontario*. 2010, 1–6.
- [140] Thomson, B. A. 1997 McBryde Medal Award Lecture Radio frequency quadrupole ion guides in modern mass spectrometry. *Can. J. Chem.*, 5. 1998, 499–505.
- [141] Dawson, P. H. 1976. *Quadrupole mass spectrometry and its applications*. P. 21. Elsevier. ISBN: 978-0-444-41345-1.
- [142] Vékey, K. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. *J Chromatogr A*, 2. 2001, 227–236.
- [143] Pantiru, M. E. 2004. *Entwicklung einer LC/MS/MS-Methode zur Analytik polarer Pflanzenschutzmittel-Wirkstoffe und ihrer Metabolite in Erntegütern*. URN: urn:nbn:de:bvb:91-diss 20040 92011943.
- [144] Roos, C. 2004. Bestimmung von Pestiziden in Flusswasser im ng/L- und sub-ng/L-Bereich mittels Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS)-Verfahrensentwicklung, Validierung und Anwendung für die Untersuchung der Elbe. URN: urn:nbn:de:gbv:18-11782.
- [145] Ferrer, I., Thurman, E. M., and Zweigenbaum, J. A. Screening and confirmation of 100 pesticides in food samples by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 23. 2007, 3869–3882.
- [146] Tadeo, J. L. 2008. *Analysis of pesticides in food and environmental samples*. P-63. Crc Press. ISBN 9780849375521.

- [147] Sargent, M. Guide to achieving reliable quantitative LC-MS measurements. *RSC Analytical Methods Committee, Teddington, Middlesex, United Kingdom*. 2013. http://www.rsc.org/images/AMC%20LCMS%20Guide_tcm18-240030.pdf. Accessed 23 July 2017.
- [148] García-Reyes, J. F., Hernando, M. D., Molina-Díaz, A., and Fernández-Alba, A. R. Comprehensive screening of target, non-target and unknown pesticides in food by LC-TOF-MS. *TrAC Trends Anal Chem*, 8. 2007, 828–841.
- [149] Lacorte, S. and Fernandez-Alba, A. R. Time of flight mass spectrometry applied to the liquid chromatographic analysis of pesticides in water and food. *Mass Spectrom Rev*, 6. 2006, 866–880.
- [150] Ferrer, I., García-Reyes, J. F., Mezcua, M., Thurman, E. M., and Fernández-Alba, A. R. Multi-residue pesticide analysis in fruits and vegetables by liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1. 2005, 81–90.
- [151] Grimalt, S., Pozo, O. J., Sancho, J. V., and Hernández, F. Use of liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry to investigate pesticide residues in fruits. *Anal Chem*, 7. 2007, 2833–2843.
- [152] Ferrer, I. and Thurman, E. M. Multi-residue method for the analysis of 101 pesticides and their degradates in food and water samples by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1. 2007, 24–37.
- [153] Picó, Y., Farré, M., Soler, C., and Barceló, D. Confirmation of fenthion metabolites in oranges by IT-MS and QqTOF-MS. *Anal Chem*, 24. 2007, 9350–9363.
- [154] Mezcua, M., Malato, O., García-Reyes, J. F., Molina-Díaz, A., and Fernández-Alba, A. R. Accurate-mass databases for comprehensive screening of pesticide residues in food by fast liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem*, 3. 2009, 913–929.
- [155] Thurman, E. M., Ferrer, I., Zavitsanos, P., and Zweigenbaum, J. A. Identification of imidacloprid metabolites in onion (*Allium cepa* L.) using high-resolution mass spectrometry and accurate mass tools. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 17. 2013, 1891–1903.
- [156] Sánchez-Hernández, L., Hernández-Domínguez, D., Martín, M. T., Nozal, M. J., Higes, M., and Bernal Yagüe, J. L. Residues of neonicotinoids and their

- metabolites in honey and pollen from sunflower and maize seed dressing crops. *J Chromatogr A*, 2016, 220–227.
- [157] He, Z., Xu, Y., Wang, L., Peng, Y., Luo, M., Cheng, H., and Liu, X. Wide-scope screening and quantification of 50 pesticides in wine by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry combined with liquid chromatography/quadrupole linear ion trap mass spectrometry. *Food Chem*, 2016, 1248–1255.
- [158] Gautam, M., Etzerodt, T., and Fomsgaard, I. S. Quantification of azoxystrobin and identification of two novel metabolites in lettuce via liquid chromatography–quadrupole-linear ion trap (QTRAP) mass spectrometry. *Int J Environ Anal Chem*, 5. 2017, 419–430.
- [159] Bijlsma, L., Bade, R., Celma, A., Mullin, L., Cleland, G., Stead, S., Hernandez, F., and Sancho, J. V. Prediction of Collision Cross-Section Values for Small Molecules. Application to Pesticide Residue Analysis. *Anal Chem*, 12. 2017, 6583–6589.
- [160] Fu, Y., Zhou, Z., Kong, H., Lu, X., Zhao, X., Chen, Y., Chen, J., Wu, Z., Xu, Z., Zhao, C., and Xu, G. Nontargeted Screening Method for Illegal Additives Based on Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography-High-Resolution Mass Spectrometry. *Anal Chem*, 17. 2016, 8870–8877.
- [161] Milman, B. L. General principles of identification by mass spectrometry. *Trends Anal Chem*, 2015, 24–33.
- [162] Rathahao-Paris, E., Alves, S., Junot, C., and Tabet, J.-C. High resolution mass spectrometry for structural identification of metabolites in metabolomics. *Metabolomics*, 1. 2016, W94.
- [163] Kind, T., Tsugawa, H., Cajka, T., Ma, Y., Lai, Z., Mehta, S. S., Wohlgemuth, G., Barupal, D. K., Showalter, M. R., Arita, M., and Fiehn, O. Identification of small molecules using accurate mass MS/MS search. *Mass Spectrom Rev*, 2017.
- [164] Twohig, M., O’Leary, M., and Cleland, G. *Methodology for the Identification of Pesticide Metabolites in Complex Matrices Using UPLC-ToF/MSE and the UNIFI Scientific Information System*. <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720005357en.pdf>. Accessed 23 July 2017.
- [165] Allen, F., Greiner, R., and Wishart, D. Competitive fragmentation modeling of ESI-MS/MS spectra for putative metabolite identification. *Metabolomics*, 1. 2015, 98–110.

- [166] Schymanski, E. L., Jeon, J., Gulde, R., Fenner, K., Ruff, M., Singer, H. P., and Hollender, J. Identifying small molecules via high resolution mass spectrometry. Communicating confidence. *Environ Sci Technol*, 4. 2014, 2097–2098.
- [167] Jang, J., Rahman, M. M., Abd El-Aty, A. M., Ko, A.-Y., Park, J.-H., Cho, J. M., Cho, S.-K., Seo, Y. M., and Shim, J.-H. A Simple and Improved HPLC Method for the Analysis of Dithianon in Red Pepper with Tandem Mass Spectrometry Confirmation. *Food Anal Methods*, 3. 2014, 653–659.
- [168] Jansson, C., Pihlström, T., Österdahl, B.-G., and Markides, K. E. A new multi-residue method for analysis of pesticide residues in fruit and vegetables using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *J Chromatogr A*, 1. 2004, 93–104.
- [169] Leitner, A., Emmert, J., Boerner, K., and Lindner, W. Influence of Solvent Additive Composition on Chromatographic Separation and Sodium Adduct Formation of Peptides in HPLC–ESI MS. *Chromatographia*, 11-12. 2007, 649–653.
- [170] Wang, J., Chow, W., Chang, J., and Wong, J. W. Development and Validation of a Qualitative Method for Target Screening of 448 Pesticide Residues in Fruits and Vegetables Using UHPLC/ESI Q-Orbitrap Based on Data-Independent Acquisition and Compound Database. *J Agric Food Chem*, 2. 2017, 473–493.
- [171] Mezcua, M., Ferrer, C., García-Reyes, J. F., Martínez-Bueno, M. J., Albarracín, M., Claret, M., and Fernández-Alba, A. R. Determination of selected non-authorized insecticides in peppers by liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 9. 2008, 1384–1392.
- [172] Malato, O., Lozano, A., Mezcua, M., Agüera, A., and Fernandez-Alba, A. R. Benefits and pitfalls of the application of screening methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *J Chromatogr A*, 42. 2011, 7615–7626.
- [173] Gómez-Ramos, M. M., Ferrer, C., Malato, O., Agüera, A., and Fernández-Alba, A. R. Liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry for pesticide residue analysis in fruit and vegetables. Screening and quantitative studies. *J Chromatogr A*, 2013, 24–37.
- [174] Kruve, A., Leito, I., and Herodes, K. Combating matrix effects in LC/ESI/MS. The extrapolative dilution approach. *Anal Chim Acta*, 1. 2009, 75–80.

- [175] Ferrer, C., Lozano, A., Agüera, A., Girón, A. J., and Fernández-Alba, A. R. Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables. *J Chromatogr A*, 42. 2011, 7634–7639.
- [176] Romero-González, R. and Frenich, A. G. 2017. *Applications in High Resolution Mass Spectrometry 8.4 p. 255. Food Safety and Pesticide Residue Analysis*. Elsevier. ISBN: 9780128094648.
- [177] Sandermann, H. Higher plant metabolism of xenobiotics: the 'green liver' concept. *Pharmacogenetics*, 5. 1994, 225–241.
- [178] Ripley, B. D., Ritcey, G. M., Harris, C. R., Denommé, M. A., and Lissemore, L. I. Comparative persistence of pesticides on selected cultivars of specialty vegetables. *J Agric Food Chem*, 5. 2003, 1328–1335.
- [179] López-Bucio, J., Nieto-Jacobo, M. F., Ramírez-Rodríguez, V., and Herrera-Estrella, L. Organic acid metabolism in plants. From adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. *Plant Sci*, 1. 2000, 1–13.
- [180] Vryzas, Z. The Plant as Metaorganism and Research on Next-Generation Systemic Pesticides - Prospects and Challenges. *Front Microbiol*, 2016, 1968.
- [181] McCutcheon, S. C. 2003. *Phytoremediation. Transformation and Control of Contaminants*. P. 60. A wiley-interscience series of texts and monographs. Wiley-Interscience, S.I. ISBN: 9780471273042.
- [182] Gilbert-López, B., García-Reyes, J. F., Mezcua, M., Ramos-Martos, N., Fernández-Alba, A. R., and Molina-Díaz, A. Multi-residue determination of pesticides in fruit-based soft drinks by fast liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Talanta*, 4-5. 2010, 1310–1321.
- [183] Vass, A., Robles-Molina, J., Perez-Ortega, P., Gilbert-Lopez, B., Dernovics, M., Molina-Díaz, A., and Garcia-Reyes, J. F. Study of different HILIC, mixed-mode, and other aqueous normal-phase approaches for the liquid chromatography/mass spectrometry-based determination of challenging polar pesticides. *Anal Bioanal Chem*, 18. 2016, 4857–4869.
- [184] Federal Office of Consumer Protection and Food Safety. (BVL) - Berichte zur Lebensmittelsicherheit 2011. *Monitoring*. 2011.
- [185] ChemAxon. *chemicalize database*. <https://chemicalize.com/>. Accessed 17 August 2017.

- [186] Pizzutti, I. R., Vela, G. M. E., Kok, A. de, Scholten, J. M., Dias, J. V., Cardoso, C. D., Concenco, G., and Vivian, R. Determination of paraquat and diquat: LC-MS method optimization and validation. *Food Chem*, 2016, 248–255.
- [187] Reddy, A. R., Reddy, K. R., and Hodges, H. F. Mepiquat chloride (PIX)-induced changes in photosynthesis and growth of cotton. *Plant Growth Regul*, 3. 1996, 179–183.
- [188] EFSA. Review of the existing maximum residue levels for chlormequat according to Article 12 of Regulation. *EFS2*, 3. 2016.
- [189] Hao, C., Zhao, X., Morse, D., Yang, P., Taguchi, V., and Morra, F. Optimized liquid chromatography tandem mass spectrometry approach for the determination of diquat and paraquat herbicides. *J Chromatogr A*, 2013, 169–176.
- [190] Bushway, A. A., Belyea, P. R., and Bushway, R. J. Chia Seed as a Source of Oil, Polysaccharide, and Protein. *J Food Sci*, 5. 1981, 1349–1350.

Anhang

A Supplementary Material zu den Publikationen

1. Supplementary Material: Pestizidscreening mittels IMS-Q-ToF-MS in pflanzlichen Lebensmitteln (Publikation I)

Evaluation and validation of an ion mobility quadrupole time-of-flight mass spectrometry pesticide screening approach

Anna Bauer¹, Juergen Kuballa¹, Sascha Rohn², Eckard Jantzen¹, Jens Luetjohann^{1*}

¹ Research and Development Department, GALAB Laboratories GmbH, Am Schleusengraben 7, 21029 Hamburg

² Institute of Food Chemistry, University of Hamburg, Grindelallee 117, Hamburg, Germany

Corresponding Author

*Email: jens.luetjohann@galab.de (J. Luetjohann) Tel.: +49 40 368077 432
www.galab.de

Content:

Figure S-1: CCS inter-day precision of the tested pesticide parameter scope.

Figure S-2: UPLC-TWIMS-QToF-MS base peak chromatogram of a solvent injection for a full view of the system impact.

Figure S-3: IMS-spectra of spinetoram of peaks two different sodium adduct after ion mobility spectrometry separation. Main peak $[M + H, Na, K]^+$ and fragments (142.1226, 629.3650 and 517.2783 m/z) (A1-2) and secondary peak $[M + Na]^+$ resulted in a different fragment spectrum (630.4127 and 481.3255 m/z) (B1-2).

Figure S-4: UPLC-TWIMS-QToF-MS full scan chromatograms in comparison of high acid (top) and high water (bottom) commodity in relation to the abundance of matrix interferences.

Figure S-5: UPLC-TWIMS-QToF-MS full scan chromatograms of rape (top) in comparison with soy (bottom) of the same commodity group and different matrix impact on pesticide detection.

Table S-1: Commodity groups according to Annex A SANTE/11945/2015 [14].

Table S-2: Detection rates applying different detection criterion according to SANTE/11945/2015, in combination with CCS and with CCS without one fragment ion.

Table S-3: Number of false detects in non-spiked blank samples.

Table S-4: Method validation data for application of SANTE/CCS filter including the exact monoisotopic mass, retention time, CCS value for the corresponding main adduct and number of detects at an SDL.

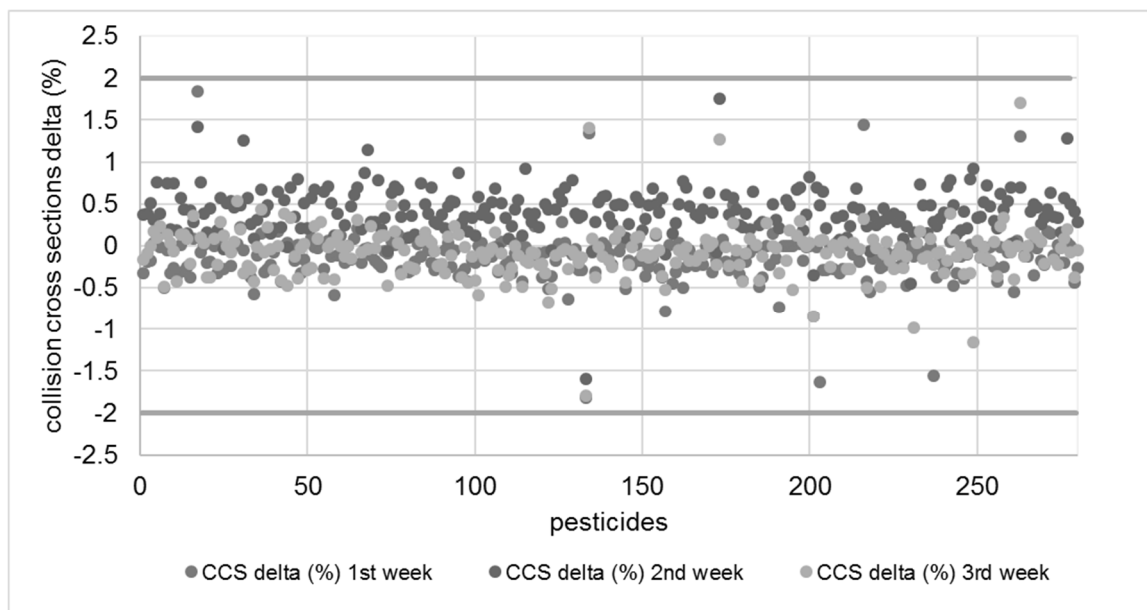


Figure S-1: CCS inter-day precision of the tested pesticide parameter scope.

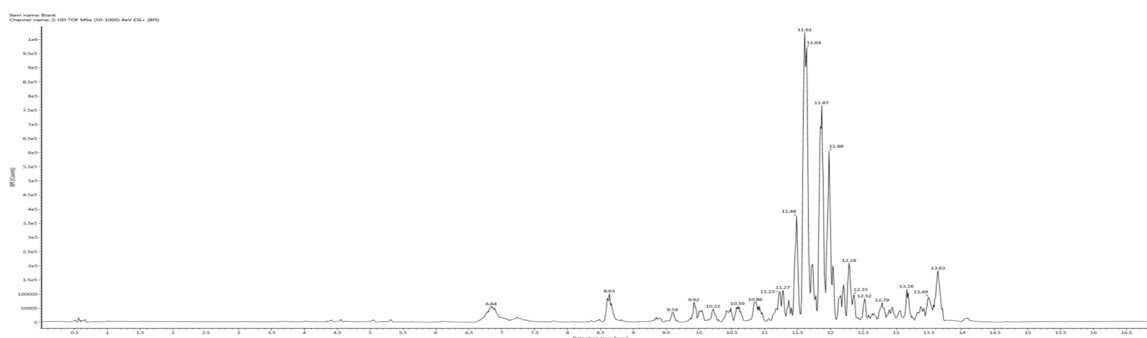


Figure S-2: UPLC-TWIMS-QToF-MS base peak chromatogram of a solvent injection for a full view of the system impact.

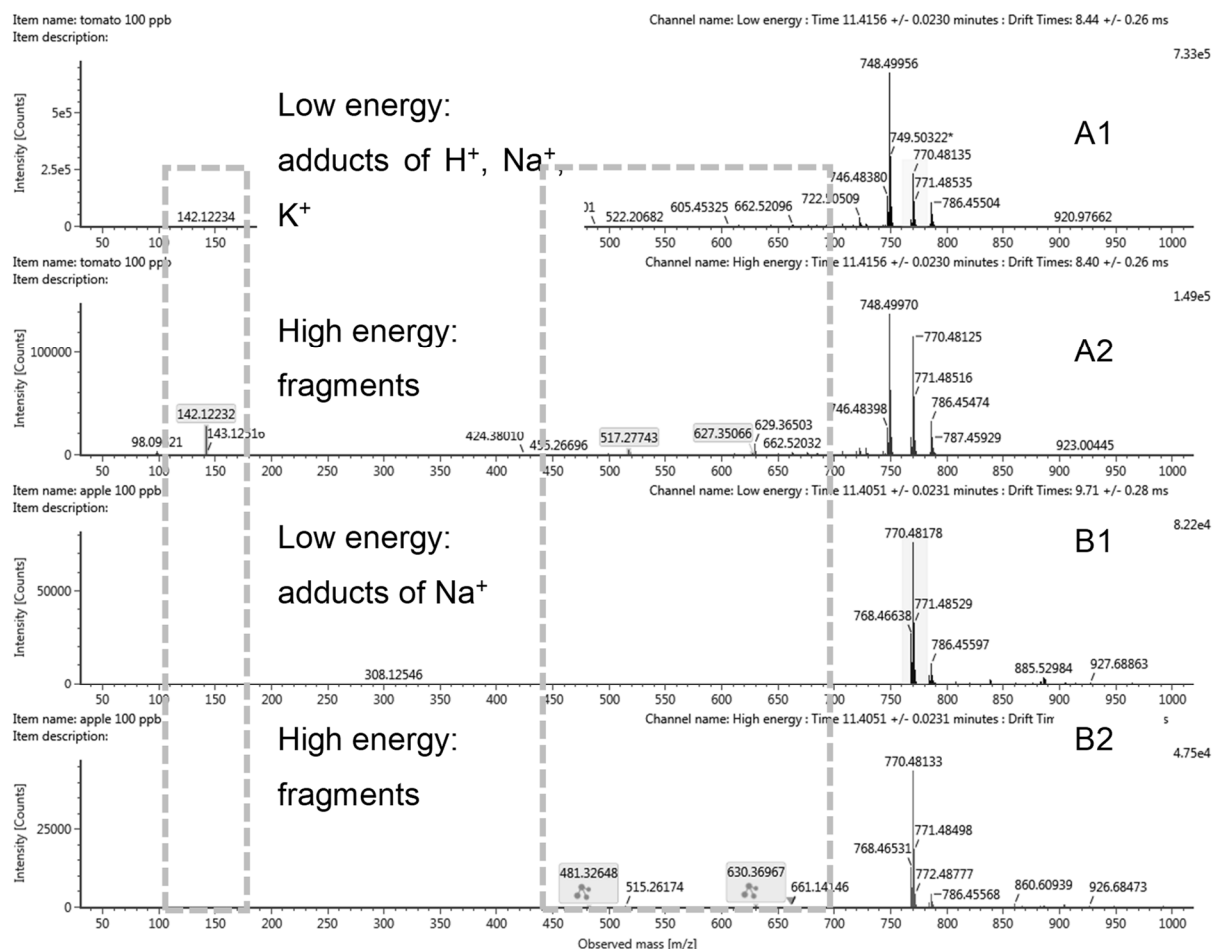


Figure S-3: IMS-spectra of spinetoram of peaks two different sodium adduct after ion mobility spectrometry separation. Main peak $[M + H, Na, K]^+$ and fragments (142.1226, 629.3650 and 517.2783 m/z) (A1-2) and secondary peak $[M + Na]^+$ resulted in a different fragment spectrum (630.4127 and 481.3255 m/z) (B1-2).

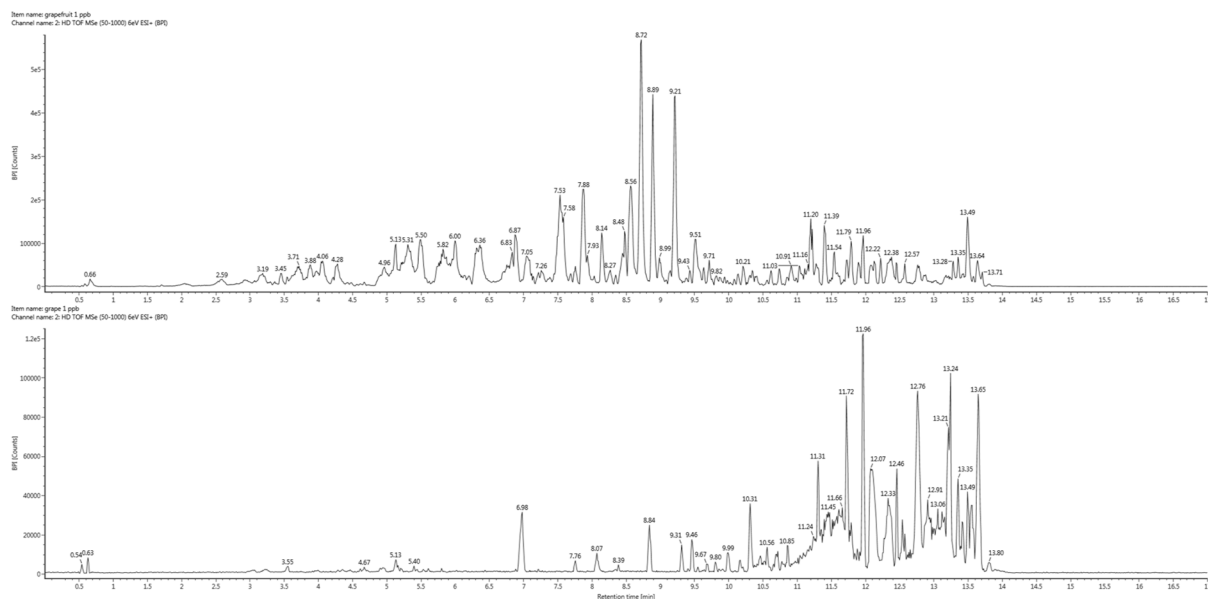


Figure S-4: UPLC-TWIMS-QToF-MS full scan chromatograms in comparison of high acid (top) and high water (bottom) commodity in relation to the abundance of matrix interferences.

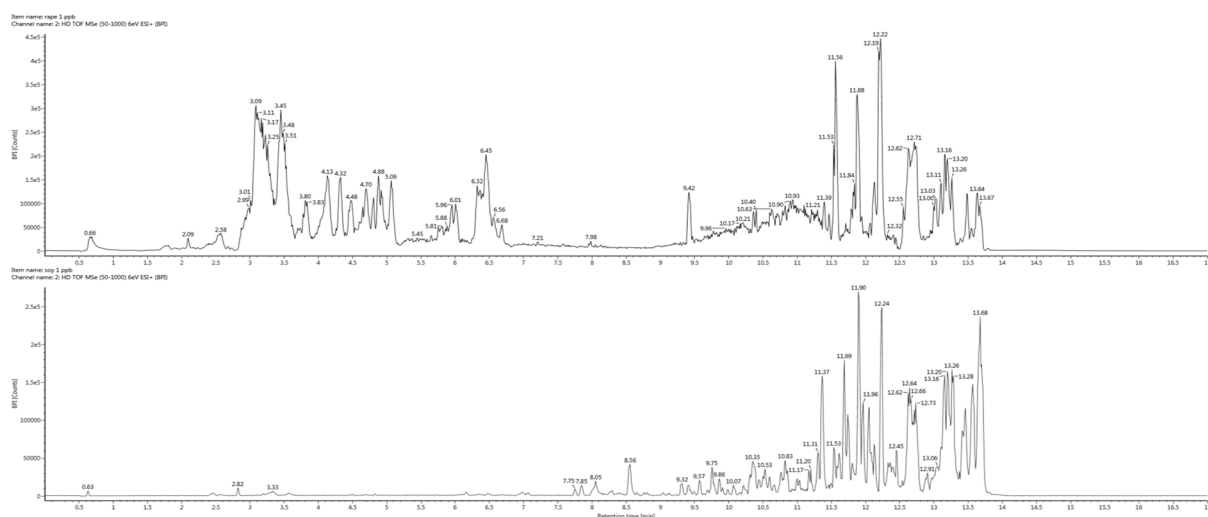


Figure S-5: UPLC-TWIMS-QToF-MS full scan chromatograms of rape (top) in comparison with soy (bottom) of the same commodity group and different matrix impact on pesticide detection.

Table S-1. Commodity groups according to Annex A SANTE/11945/2015 [14].

commodity group	commodity categories	investigated matrices	sample weight
1. high water content	fruiting vegetables, pome fruit, stone fruit	tomato, apple, pear, peach, cucumber	10 g
2. high acid content and high water content	citrus fruit, small fruit and berries	orange, lemon, grapefruit, strawberry, grape	10 g
3. high sugar and low water content	dried fruit, honey	raisin, honey	5 g + 5 g water
4. high oil content and very low water content	tree nuts, oil seeds	hazelnut, chia seed, rape, soy	5 g + 10 g water
5. high starch and/or protein content and low water and fat content	cereal grain and products there of	wheat, rye, oats	5 g + 10 g water
6. difficult or unique commodities	-	black tea	2 g + 10 g water

Table S-2. Detection rates applying different detection criterion according to SANTE/11945/2015, in combination with CCS and with CCS without one fragment ion.

Detection rates (%)									
Commodities	Detection filter								
	SANTE	SANTE and CCS	SANTE and CCS without fragment ion	SANTE	SANTE and CCS	SANTE and CCS without fragment ion	SANTE	SANTE and CCS	SANTE and CCS without fragment ion
	0.001 mg/kg			0.01 mg/kg			0.10 mg/kg		
strawberry	36	37	48	82	82	96	100	99	100
pear	38	39	55	80	78	98	99	96	100
tomato	41	41	50	80	79	97	100	100	100
cucumber	43	43	54	80	79	97	99	98	100
peach	42	42	52	80	79	97	100	99	100
apple	43	43	59	79	77	96	100	100	100
grape	39	40	59	75	73	94	100	100	100
wheat	36	36	47	79	76	95	98	98	100
rye	28	28	33	79	75	87	99	96	99
oats	34	35	49	77	75	90	98	98	99
hazelnut	34	35	46	78	75	96	100	96	100
chia seed	34	34	38	78	75	89	100	99	100
rape	20	23	23	71	69	73	96	92	96
soy	38	39	55	80	78	90	99	93	100

black tea	23	24	26	77	74	83	93	91	99
honey	35	36	45	85	83	96	100	98	100
raisin	34	35	49	76	75	94	97	94	98
lemon	30	31	34	74	70	83	100	99	100
orange	27	28	30	79	76	86	98	87	97
grapefruit	16	17	18	69	66	71	98	88	93
average detection rates	33	34	44	78	76	90	99	96	99

Table S-3. Number of false detects in non-spiked blank samples.

No. of false positives in blank samples used for the validation study			
Commodities	Detection filter		
	SANTE	SANTE and CCS	SANTE and CCS without fragment
strawberry	1	1	1
pear	1	0	0
tomato	4	3	3
cucumber	2	1	1
peach	2	1	1
apple	4	2	2
grape	3	1	1
wheat	0	0	0
rye	1	1	1
oats	3	0	0
hazelnut	1	1	1
chia seed	1	1	1
rape	0	0	0
soy	1	1	1
black tea	1	0	0
honey	1	1	1
raisin	0	0	0
lemon	1	1	1
orange	1	1	1
grapefruit	0	0	0

Table S-4. Method validation data for application of SANTE/CCS filter including the exact monoisotopic mass, retention time, CCS value for the corresponding main adduct and number of detects at an SDL.

Component		Exact mono- isotopic mass (Da)	Experi- mental CCS (Å²)	RT (min)	Corre- spon- ding adduct	SDL (mg/kg)			SDL (mg/kg)		
name	Formula					SANTE + CCS			SANTE		
						0.1	0.01	0.001	0.1	0.01	0.001
2,3,5-Trimethacarb/3,4,5-Trimethacarb	C11H15NO2	193.1103	147.25	7.61	+Na	14	2	n.d.	14	2	n.d.
Acetamiprid	C10H11ClN4	222.0672	148.23	4.69	+H	20	7	n.d.	20	7	n.d.
Acetochlor/Alachlor	C14H20ClNO2	269.1183	166.29	9.07	+Na	20	20	9	20	20	9
Acrinathrin	C26H21F6NO5	541.1324	215.84	11.54	+Na	20	20	6	20	20	6
Allethrin	C19H26O3	302.1882	183.73	10.72	+Na	20	20	4	20	20	5
Ametoctradin	C15H25N5	275.211	173.53	10.18	+H	20	20	20	20	20	20
Ametryn	C9H17N5S	227.1205	152.3	8.23	+H	6	6	19	20	20	20
Amidosulfuron	C9H15N5O7S2	369.0413	170.67	4.23	+H	20	2	n.d.	20	2	n.d.
Anilazine	C9H5Cl3N4	273.958	148.42	8.55	+H	20	n.d.	n.d.	20	n.d.	n.d.
Atrazine	C8H14ClN5	215.0938	147.13	7.37	+H	20	19	14	20	19	14
Atrazine-desethyl	C6H10ClN5	187.0625	137.12	5	+H	16	n.d.	n.d.	18	n.d.	n.d.
Avermectin (B1a)	C48H72O14	872.4922	294.66	11.71	+Na	20	n.d.	2	20	n.d.	2
Avermectin (B1b)	C47H70O14	858.4766	295.79	11.53	+Na	3	13	n.d.	4	13	n.d.

Azaconazole	C ₁₂ H ₁₁ Cl ₂ N ₃ O ₂	299.0228	162.79	7.77	+Na	20	20	8	20	20	8
Azinphos-ethyl	C ₁₂ H ₁₆ N ₃ O ₃ PS ₂	345.0371	173.63	8.98	+Na	20	20	n.d.	20	20	n.d.
Aziprotryne	C ₇ H ₁₁ N ₇ S	225.0797	144.72	8.46	+H	20	1	n.d.	20	1	n.d.
Azoxystrobin	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅	403.1168	193.36	8.38	+Na	20	20	20	20	20	20
Benalaxyl	C ₂₀ H ₂₃ NO ₃	325.1678	174.4	9.68	+Na	20	20	20	20	20	20
Benodanil	C ₁₃ H ₁₀ INO	322.9807	144.95	7.32	+H	16	20	8	20	20	8
Bensulfuron methyl	C ₁₆ H ₁₈ N ₄ O ₇ S	410.0896	190.79	7.84	+Na	20	20	13	20	20	13
Benthiavalicarb-isopropyl	C ₁₈ H ₂₄ FN ₃ O ₃ S	381.1522	184.56	8.71	+H	20	19	20	20	19	20
Bifenazate	C ₁₇ H ₂₀ N ₂ O ₃	300.1474	181.36	8.94	+Na	20	18	2	20	18	2
Bifenthrin	C ₂₃ H ₂₂ ClF ₃ O ₂	422.126	188.66	12.03	+Na	19	5	n.d.	20	5	n.d.
Bitertanol	C ₂₀ H ₂₃ N ₃ O ₂	337.179	193.4	9.95	+Na	14	16	13	14	16	13
Bixafen	C ₁₈ H ₁₂ Cl ₂ F ₃ N ₃ O	413.031	185.27	9.5	+Na	20	20	18	20	20	18
Boscalid	C ₁₈ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O	342.0327	170.65	8.56	+H	20	20	13	20	20	13
Brodifacoum	C ₃₁ H ₂₃ BrO ₃	522.0831	223.84	10.67	+H	20	20	9	20	20	9
Bromfenvinfos	C ₁₂ H ₁₄ BrCl ₂ O ₄ P	401.919	251.51	9.87	+Na	20	1	n.d.	20	1	n.d.
Bromuconazole I	C ₁₃ H ₁₂ BrCl ₂ N ₃ O	374.9541	163.96	8.84	+H	20	20	n.d.	20	20	n.d.
Bromuconazole II	C ₁₃ H ₁₂ BrCl ₂ N ₃ O	374.9541	166.13	9.44	+H	20	18	n.d.	20	18	n.d.
Bupirimate	C ₁₃ H ₂₄ N ₄ O ₃ S	316.1569	171.7	9.38	+H	20	20	20	20	20	20
Buprofezin	C ₁₆ H ₂₃ N ₃ OS	305.1562	170.77	10.68	+H	20	20	19	20	20	19
Butralin	C ₁₄ H ₂₁ N ₃ O ₄	295.1532	165.68	11.09	+H	17	n.d.	n.d.	17	n.d.	n.d.
Buturon	C ₁₂ H ₁₃ ClN ₂ O	236.0716	150.31	7.51	+H	16	4	1	20	6	1

Carbendazim	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂	191.0695	135.69	4.88	+H	10	13	2	20	19	3
Carbofuran	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃	221.1052	152.69	6.52	+Na	20	20	5	20	20	6
Carboxin	C ₁₂ H ₁₃ NO ₂ S	235.0667	147.06	6.73	+H	20	6	n.d.	20	6	n.d.
Chlorantraniliprole/Rynaxypyr	C ₁₈ H ₁₄ BrCl ₂ N ₅ O ₂	480.9708	200.01	8.04	+Na	20	11	2	20	11	2
Chlorbromuron	C ₉ H ₁₀ BrClN ₂ O ₂	291.9614	148.85	8.38	+H	20	20	n.d.	20	20	n.d.
Chlorfenvinphos	C ₁₂ H ₁₄ Cl ₃ O ₄ P	357.9695	173.7	9.75	+Na	17	20	7	20	20	7
Chlorfluazuron	C ₂₀ H ₉ Cl ₃ F ₅ N ₃ O ₃	538.963	219.81	11.38	+Na	20	20	1	20	20	1
Chloroxuron	C ₁₅ H ₁₅ ClN ₂ O ₂	290.0822	169.57	8.9	+H	20	20	20	20	20	20
Chlorpyrifos (Dursban)	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS	348.9263	159.97	10.81	+H	15	6	n.d.	20	6	n.d.
Chlorsulfuron	C ₁₂ H ₁₂ ClN ₅ O ₄ S	357.0299	171.23	5.11	+H	20	1	n.d.	20	1	n.d.
Cinidon-ethyl	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ NO ₄	393.0535	188.66	10.59	+H	20	20	3	20	20	3
Cinosulfuron	C ₁₅ H ₁₉ N ₅ O ₇ S	413.1005	186.2	5.67	+H	20	18	9	20	18	9
Clethodim	C ₁₇ H ₂₆ ClNO ₃ S	359.1322	185.47	7.9	+Na	14	5	4	14	5	4
Clofentezine	C ₁₄ H ₈ Cl ₂ N ₄	302.0126	158.34	9.88	+H	20	13	n.d.	20	13	n.d.
Clomazone	C ₁₂ H ₁₄ ClNO ₂	239.0713	143.47	7.99	+H	20	12	n.d.	20	12	n.d.
Coumachlor	C ₁₉ H ₁₅ ClO ₄	342.0659	172.24	8.16	+H	20	17	n.d.	20	17	n.d.
Coumaphos	C ₁₄ H ₁₆ ClO ₅ PS	362.0145	176.27	9.66	+H	20	20	20	20	20	20
Ccoumatetralyl	C ₁₉ H ₁₆ O ₃	292.1099	160.8	7.01	+H	20	20	14	20	20	16
Cyantraniliprole	C ₁₉ H ₁₄ BrClN ₆ O ₂	472.005	201.46	7.21	+Na	20	16	1	20	16	1
Cyflufenamid	C ₂₀ H ₁₇ F ₅ N ₂ O ₂	412.121	178.49	9.93	+H	20	20	20	20	20	20
Cyfluthrin	C ₂₂ H ₁₈ Cl ₂ FNO ₃	433.0648	198.6	11.28	+Na	13	2	n.d.	13	2	n.d.

Cypermethrin	C22H19Cl2NO3	415.0742	196.92	11.38	+Na	8	1	n.d.	8	1	n.d.
Cyproconazole II	C15H18ClN3O	291.1138	164.17	8.93	+H	20	17	3	20	18	3
Cyprodinil	C14H15N3	225.1266	151.07	9.52	+H	20	7	4	20	7	4
DEET	C12H17NO	191.131	141	7.58	+H	20	15	1	20	15	1
Deltamethrin	C22H19Br2NO3	502.9732	200.71	11.43	+Na	20	5	6	20	6	6
Demeton-S-methyl-sulfone	C6H15O5PS2	262.0099	140.83	3.48	+H	19	8	n.d.	19	8	n.d.
Desethylsimazin	C5H8ClN5	173.0468	131.51	3.66	+H	5	n.d.	n.d.	5	n.d.	n.d.
Diafenthiuron	C23H32N2OS	384.2235	196	11.22	+H	18	14	1	18	14	1
Diazinon	C12H21N2O3PS	304.1011	168.67	9.67	+H	20	20	14	20	20	14
Dichlofluanid	C9H11Cl2FN2O2S2	331.9623	163.81	9	+Na	20	5	n.d.	20	5	n.d.
Diclobutrazol	C15H19Cl2N3O	327.0905	169.34	9.5	+H	20	20	10	20	20	10
Diclofop-methyl	C16H14Cl2O4	340.0269	176.66	10.63	+Na	20	18	n.d.	20	18	n.d.
Difenoconazole I	C19H17Cl2N3O3	405.0647	196.22	10.17	+H	20	20	18	20	20	18
Diflubenzuron	C14H9ClF2N2O2	310.0321	171.31	9.28	+Na	20	16	5	20	16	5
Diflufenican	C19H11F5N2O2	394.0741	182.22	10.21	+H	20	20	18	20	20	18
Dimefuron	C15H19ClN4O3	338.1146	187.45	8.1	+H	20	20	16	20	20	16
Dimethomorph I	C21H22ClNO4	387.1237	195.09	8.52	+H	20	20	7	20	20	7
Dimethomorph II	C21H22ClNO4	387.1237	195.48	8.8	+H	20	19	7	20	19	7
Dimoxystrobin	C19H22N2O3	326.163	177.27	9.45	+Na	20	19	2	20	19	2
Diniconazole	C15H17Cl2N3O	325.0749	169.9	10.04	+H	20	20	11	20	20	11
Diuron	C9H10Cl2N2O	232.017	145.18	7.57	+H	20	16	1	20	16	1

Dodine	C13H29N3	227.2362	173.43	10.15	+H	20	16	2	20	16	2
Emamectin B1a	C49H75NO13	885.5238	295.27	11.13	+H	19	20	15	20	20	15
Emamectin B1b	C48H73NO13	871.5081 9	296.28	10.92	+H	20	15	n.d.	20	15	n.d.
Esfenvalerat/Fenvalerat	C25H22ClNO3	419.1288	195.97	11.51	+Na	13	2	n.d.	14	2	n.d.
Etaconazole	C14H15Cl2N3O2	327.0541	168.07	9.17	+H	20	8	11	20	8	11
Ethion	C9H22O4P2S4	383.9876	178.16	10.72	+Na	20	20	2	20	20	2
Ethoprophos	C8H19O2PS2	242.0564	146.85	9.07	+H	20	5	n.d.	20	5	n.d.
Ethoxyquin	C14H19NO	217.1467	150.12	9.06	+H	20	4	n.d.	20	4	n.d.
Etofenprox	C25H28O3	376.2038	187.73	11.89	+Na	20	12	6	20	12	7
Etoazole	C21H23F2NO2	359.1697	182.66	11.09	+H	20	20	20	20	20	20
Etrimfos	C10H17N2O4PS	292.0647	158.01	9.5	+H	20	20	n.d.	20	20	n.d.
famoxadone	C22H18N2O4	374.1267	205.18	9.81	+Na	14	7	2	14	7	3
Famphur	C10H16NO5PS2	325.0208	165.37	7.45	+H	20	20	15	20	20	15
Fenamidone	C17H17N3OS	311.1092	167.13	8.47	+H	20	20	6	20	20	6
Fenamiphos	C13H22NO3PS	303.1058	168.13	9.33	+H	20	20	20	20	20	20
Fenamiphos sulphone	C13H22NO5PS	335.0956	175.92	6.96	+H	20	20	20	20	20	20
Fenamiphos sulfoxide	C13H22NO4PS	319.1007	175.96	6.81	+H	20	20	20	20	20	20
Fenarimol	C17H12Cl2N2O	330.0327	170.05	9.09	+H	20	20	n.d.	20	20	n.d.
Fenazaquin	C20H22N2O	306.1732	170.08	11.43	+H	20	20	19	20	20	19
Fenbuconazole	C19H17ClN4	336.1142	179.35	9.31	+H	20	19	n.d.	20	19	n.d.

Fenhexamid	C14H17Cl2NO2	301.0636	161.25	9.04	+H	20	17	n.d.	20	17	n.d.
Fenoxycarb	C17H19NO4	301.1314	180.84	9.41	+Na	20	20	11	20	20	11
Fenpropidin	C19H31N	273.2457	164.68	8.38	+H	20	20	20	20	20	20
Fenpyroximate	C24H27N3O4	421.2002	199.77	11.22	+H	20	20	18	20	20	18
Fenthion	C10H15O3PS2	278.02	151.97	9.56	+H	14	6	n.d.	20	6	n.d.
Fenthion-Oxonsulfoxid	C10H15O5PS	278.0378	159.06	4.93	+H	3	n.d.	n.d.	9	n.d.	n.d.
Fenthion-sulfone	C10H15O5PS2	310.0099	161.84	7.09	+H	20	20	5	20	20	5
Fenthion-sulfoxide	C10H15O4PS2	294.0149	162.56	6.87	+H	20	20	20	20	20	20
Fipronil	C12H4Cl2F6N4OS	435.9387	188.28	9.38	+Na	20	19	n.d.	20	20	n.d.
Fipronil-sulfone	C12H4Cl2F6N4O2S	451.9336	191.5	9.74	+Na	20	11	1	20	12	1
Flamprop-M-isopropyl	C19H19ClFNO3	363.1038	188.41	9.72	+K	20	16	1	20	16	1
Flamprop-M-methyl	C17H15ClFNO3	335.0725	179.81	8.86	+Na	20	19	17	20	19	17
Flazasulfuron	C13H12F3N5O5S	407.0511	180.78	6.3	+Na	20	20	4	20	20	4
Flonicamid	C9H6F3N3O	229.0463	143.6	3.23	+H	20	n.d.	n.d.	20	n.d.	n.d.
Florasulam	C12H8F3N5O3S	359.03	165.83	4.84	+H	20	8	n.d.	20	8	n.d.
Fluazifop	C15H12F3NO4	327.0718	169.45	7.23	+H	20	20	3	20	20	3
Fluazifop-P-butyl	C19H20F3NO4	383.1344	191.5	10.53	+H	20	20	20	20	20	20
Fluazuron	C20H10Cl2F5N3O3	505.0019	204.87	10.97	+H	20	20	10	20	20	10
Flubendiamide	C23H22F7IN2O4S	682.0233	223.67	9.54	+Na	20	1	9	20	20	20
Flubenzimine	C17H10F6N4S	416.053	180.55	10.59	+H	20	17	n.d.	20	17	n.d.
Fludioxonil	C12H6F2N2O2	248.0397	155.05	8.49	+Na	20	6	n.d.	20	6	n.d.

Flufenacet	C14H13F4N3O2S	363.0665	181.28	9.05	+Na	17	20	20	20	20	20
Flufenoxuron	C21H11ClF6N2O3	488.0362	212.93	11.14	+Na	20	20	15	20	20	15
Flumioxazin	C19H15FN2O4	354.1016	181	8.06	+H	20	13	n.d.	20	13	n.d.
Fluomethuron	C10H11F3N2O	232.0824	145.03	7.03	+H	17	8	4	16	8	4
Fluopicolide	C14H8Cl3F3N2O	381.9654	169.64	8.65	+H	20	20	20	20	20	20
Fluopyram	C16H11ClF6N2O	396.0464	179.83	8.96	+Na	20	19	20	20	19	20
Flurochloridon	C12H10Cl2F3NO	311.0092	157.84	8.78	+H	20	18	n.d.	20	18	n.d.
Flurprimidol	C15H15F3N2O2	312.1086	166.96	8.71	+H	20	20	13	20	20	13
Flusilazole	C16H15F2N3Si	315.1003	168.99	9.38	+H	14	20	20	20	20	20
Flutolanil	C17H16F3NO2	323.1133	168.18	8.64	+H	20	20	20	20	20	20
Flutriafol	C16H13F2N3O	301.1027	160.81	7.51	+H	20	19	3	20	19	3
Fosthiazate	C9H18NO3PS2	283.0466	161.81	7.18	+Na	20	20	13	20	20	13
Haloxypop	C15H11ClF3NO4	361.0329	175.99	8.49	+H	20	20	n.d.	20	20	n.d.
Haloxypop-2-ethoxyethyl	C19H19ClF3NO5	433.0904	183.99	10.51	+H	20	20	20	20	20	20
Haloxypop-methylester	C16H13ClF3NO4	375.0485	180.27	10.15	+H	20	20	20	20	20	20
Hexaflumuron	C16H8Cl2F6N2O3	459.9816	197.41	10.32	+Na	20	9	n.d.	20	9	n.d.
Hexazinone	C12H20N4O2	252.1586	157.46	6.54	+H	20	20	7	20	20	7
Hexythiazox	C17H21ClN2O2S	352.1012	193.4	10.89	+Na	20	20	14	20	20	14
Imazalil	C14H14Cl2N2O	296.0483	161.9	9.32	+H	20	20	20	20	20	20
Imazamox	C15H19N3O4	305.1376	168.62	3.42	+H	20	6	n.d.	20	6	n.d.
Imidacloprid	C9H10ClN5O2	255.0523	150.24	4.21	+H	15	4	n.d.	20	4	n.d.

Indoxacarb	C22H17ClF3N3O7	527.0707	214.65	10.26	+Na	20	20	20	20	20	20
Iodofenphos	C8H8Cl2IO3PS	411.8354	154.52	10.8	+H	12	n.d.	n.d.	12	n.d.	n.d.
Iodosulfuron methyl	C14H14IN5O6S	506.971	193	6.04	+H	11	10	n.d.	11	10	n.d.
Iprobenphos	C13H21O3PS	288.0949	163.94	9.45	+Na	20	20	16	20	20	20
Isofenphos	C15H24NO4PS	345.1164	178.49	9.92	+Na	20	20	20	20	20	20
Isofenphos-methyl	C14H22NO4PS	331.1007	174.31	9.5	+Na	20	20	13	20	20	14
Isoprothiolane	C12H18O4S2	290.0647	171.51	8.66	+Na	20	19	20	20	19	20
Isoproturon	C12H18N2O	206.1419	149.03	7.53	+H	20	20	1	20	20	1
Isopyrazam	C20H23F2N3O	359.1809	179.98	10.15	+H	20	20	20	20	20	20
Isoxaben	C18H24N2O4	332.1736	181.38	8.68	+H	19	16	n.d.	19	16	n.d.
Isoxaflutole	C15H12F3NO4S	359.0439	180.89	7.64	+Na	20	3	n.d.	20	3	n.d.
Isoxathion	C13H16NO4PS	313.0538	174.86	9.85	+Na	20	20	15	20	20	15
Jasmolin I	C21H30O3	330.2195	191.14	11.47	+Na	8	2	2	8	2	2
Jasmolin II	C22H30O5	374.2093	196.78	10.58	+Na	16	3	1	16	3	2
Kresoxim-methyl	C18H19NO4	313.1314	168.57	9.48	+Na	20	20	19	20	20	20
Cyhalothrin, -lambda	C23H19ClF3NO3	449.1006	204.03	11.31	+Na	16	3	n.d.	20	12	n.d.
Linuron	C9H10Cl2N2O2	248.0119	147.58	8.18	+H	20	20	n.d.	20	20	n.d.
Lufenuron	C17H8Cl2F8N2O3	509.9784	206.09	10.82	+Na	20	20	7	20	20	7
Malaoxon	C10H19O7PS	314.0589	160.57	6.7	+Na	20	10	7	20	10	7
Mandipropamid	C23H22ClNO4	411.1237	189.66	8.65	+Na	20	20	20	20	20	20
Mepanipyrim	C14H13N3	223.111	149.75	8.87	+H	20	20	6	20	20	6

Mepronil	C17H19NO2	269.1416	176.51	8.64	+Na	20	6	4	20	6	4
Mesosulfuron-methyl	C17H21N5O9S2	503.0781	195.63	6.82	+H	20	20	12	20	20	12
Metaflumizone	C24H16F6N4O2	506.1177	212.13	10.74	+H	20	7	1	20	7	1
Metalaxyl	C15H21NO4	279.1471	164.05	7.69	+Na	20	20	20	20	20	20
Metazachlor	C14H16ClN3O	277.0982	164.23	7.53	+Na	20	20	17	20	20	17
Metconazole	C17H22ClN3O	319.1451	169.83	9.87	+Na	19	13	n.d.	20	15	n.d.
Methabenzthiazuron	C10H11N3OS	221.0623	139.89	7.35	+H	20	20	n.d.	20	20	n.d.
Methidathion	C6H11N2O4PS3	301.9619	156.18	7.73	+Na	20	7	3	20	7	3
Methoprene	C19H34O3	310.2508	184.97	11.69	+Na	20	1	2	20	4	5
Metoxuron	C10H13ClN2O2	228.0666	148.14	5.64	+H	20	20	6	20	20	6
Monolinuron	C9H11ClN2O2	214.0509	141.14	6.86	+H	20	3	n.d.	20	3	n.d.
Neburon	C12H16Cl2N2O	274.064	160.93	9.39	+H	20	20	20	20	20	20
Nicosulfuron	C15H18N6O6S	410.1009	187.65	5.07	+Na	20	20	1	20	20	2
Nitralin	C13H19N3O6S	345.0995	174.03	9.34	+H	20	13	2	20	13	2
Norflurazon	C12H9ClF3N3O	303.0386	165.95	7.75	+Na	16	19	20	16	20	20
Novaluron	C17H9ClF8N2O4	492.0123	205.21	10.41	+Na	20	20	4	20	20	4
Ofurace	C14H16ClNO3	281.0819	160.87	6.64	+Na	20	20	16	20	20	16
Omethoate	C5H12NO4PS	213.0225	140.18	2.43	+Na	11	n.d.	n.d.	13	n.d.	n.d.
Oxadiargyl	C15H14Cl2N2O3	340.0382	173.87	9.87	+H	20	20	6	20	20	6
Oxadixyl	C14H18N2O4	278.1267	160.74	6.05	+Na	15	9	1	15	9	1
Oxamyl	C7H13N3O3S	219.0678	145.76	3.11	+Na	12	2	n.d.	12	2	n.d.

Oxydemeton-methyl	C6H15O4PS2	246.0149	147.04	3.39	+Na	19	2	n.d.	19	2	n.d.
Paclobutrazol	C15H20ClN3O	293.1295	165.64	8.6	+H	20	14	5	20	14	5
Paraoxon	C10H14NO6P	275.0559	155.66	7.39	+H	20	19	n.d.	20	20	n.d.
Paraoxon-Methyl	C8H10NO6P	247.0246	146.07	5.8	+H	20	3	n.d.	20	4	n.d.
Penconazole	C13H15Cl2N3	283.0643	160.22	9.59	+H	20	20	3	20	20	3
Pencycuron	C19H21ClN2O	328.1342	176.75	10.04	+H	20	20	20	20	20	20
Pentachlor	C13H18ClNO	239.1077	154.43	9.34	+H	20	20	10	20	20	10
Phenothrin	C23H26O3	350.1882	180.77	11.76	+Na	20	11	n.d.	20	11	n.d.
Phenthoate	C12H17O4PS2	320.0306	169.47	9.42	+Na	15	19	3	20	20	3
Phorate sulfone	C7H17O4PS3	292.0027	157.04	7.43	+Na	20	20	3	20	20	3
Phorate sulfoxide	C7H17O3PS3	276.0077	153.21	7.26	+Na	11	4	3	20	5	3
Phosalone	C12H15ClNO4PS2	366.9869	176.15	9.88	+Na	20	20	10	20	20	10
Phosfolan	C7H14NO3PS2	255.0153	146.01	5.64	+H	18	20	10	19	20	10
Phoxim	C12H15N2O3PS	298.0541	169.25	9.8	+Na	20	10	n.d.	20	10	n.d.
Picoxystrobin	C18H16F3NO4	367.1031	174.19	9.41	+Na	20	20	20	20	20	20
Piperonyl butoxide	C19H30O5	338.2093	177.04	10.68	+Na	16	14	19	16	14	19
Pirimicarb	C11H18N4O2	238.143	152.95	7.31	+H	20	20	14	20	20	16
Pirimicarb, Desmethyl-	C10H16N4O2	224.1273	149.18	5.85	+H	19	20	6	20	20	6
Pirimiphos-ethyl	C13H24N3O3PS	333.1276	173.13	10.63	+H	20	20	20	20	20	20
Pirimiphos-methyl	C11H20N3O3PS	305.0963	163.19	9.88	+H	20	20	7	20	20	7
Prochloraz	C15H16Cl3N3O2	375.0308	186.11	9.95	+Na	20	17	1	20	17	1

Profenofos	C11H15BrClO3PS	371.9351	163.48	10.47	+H	20	20	9	20	20	9
Prometryn	C10H19N5S	241.1361	161.44	8.96	+H	20	20	20	20	20	20
Propanil	C9H9Cl2NO	217.0061	142.32	8.19	+H	20	7	n.d.	20	7	n.d.
Propaquizafop	C22H22ClN3O5	443.1248	195.21	10.6	+H	20	20	20	20	20	20
Propargite	C19H26O4S	350.1552	185.56	11.07	+Na	20	17	n.d.	20	18	n.d.
Propetamphos	C10H20NO4PS	281.0851	166.28	8.8	+Na	14	10	n.d.	17	10	n.d.
Propiconazole I	C15H17Cl2N3O2	341.0698	172.86	9.72	+H	19	20	12	20	20	12
Propoxycarbazone	C15H18N4O7S	398.0896	190.83	5.08	+Na	20	16	n.d.	20	16	n.d.
Propyzamide	C12H11Cl2NO	255.0218	154.02	8.53	+H	20	11	n.d.	20	11	n.d.
Proquinazid	C14H17IN2O2	372.0335	164.92	11.25	+H	20	20	16	20	20	16
Prosulfuron	C15H16F3N5O4S	419.0875	181.36	7.07	+H	12	10	n.d.	12	10	n.d.
Pyraclostrobin	C19H18ClN3O4	387.0986	191.89	9.85	+K	20	20	18	20	20	18
Pyraflufen-Ethyl	C15H13Cl2F3N2O4	412.0205	181.82	9.71	+H	20	20	20	20	20	20
Pyrazophos	C14H20N3O5PS	373.0861	185.55	9.86	+H	20	20	20	20	20	20
Pyrethrin I	C21H28O3	328.2038	185.48	11.19	+Na	20	16	8	20	16	8
Pyrethrin II	C22H28O5	372.1937	190.01	10.24	+Na	20	20	11	20	20	11
Pyridaben	C19H25ClN2OS	364.1376	184.97	11.49	+H	20	7	n.d.	20	8	n.d.
Pyridalyl	C18H14Cl4F3NO3	488.968	198.63	12.26	+H	20	20	1	20	20	1
Pyridaphenthion	C14H17N2O4PS	340.0647	171.46	8.83	+H	20	20	20	20	20	20
Pyridate	C19H23ClN2O2S	378.1169	215.9	11.77	+Na	20	15	1	20	15	1
PyrifenoX I	C14H12Cl2N2O	294.0327	164	9.03	+H	20	20	2	20	20	2

Pyrimethanil	C12H13N3	199.111	140.95	8.2	+H	20	1	n.d.	20	1	n.d.
Pyriproxifen	C20H19NO3	321.1365	183.94	10.74	+Na	20	20	19	20	20	19
Quinmerac	C11H8ClNO2	221.0244	136.04	3.63	+H	19	n.d.	n.d.	20	n.d.	n.d.
quizalofop-ethyl	C19H17ClN2O4	372.0877	188.14	10.42	+H	20	20	20	20	20	20
Rabenzazol	C12H12N4	212.1062	143.34	7.41	+H	20	20	18	20	20	18
Rimsulfuron	C14H17N5O7S2	431.0569	187.79	5.27	+H	19	17	n.d.	19	17	n.d.
Rotenone	C23H22O6	394.1416	191.55	9.37	+H	20	20	20	20	20	20
Sebuthylazine	C9H16ClN5	229.1094	152.37	8.22	+H	20	20	8	20	20	8
Simazine	C7H12ClN5	201.0781	140.61	6.36	+H	20	2	n.d.	20	2	n.d.
Spinetoram (major component)	C42H69NO10	747.4922	309.59	11.41	+Na	20	20	17	20	20	17
Spinetoram (minor component)	C43H69NO10	759.4922	276.77	11.74	+H	20	20	4	20	20	4
Spinosyn A	C41H65NO10	731.4609	267.8	11.07	+H	20	20	20	20	20	20
Spinosyn D	C42H67NO10	745.4765	271.41	11.42	+H	20	18	8	20	18	10
Spirodiclofen	C21H24Cl2O4	410.1052	204.83	11.25	+Na	20	20	20	20	20	20
Spiromesifen	C23H30O4	370.2144	197.59	11.03	+K	20	20	2	20	20	2
Spirotetramat	C21H27NO5	373.1889	197.16	9.05	+Na	20	20	13	20	20	13
Spirotetramat-enol-Glc	C24H33NO8	463.2206	214.64	4.32	+K	19	16	n.d.	19	16	n.d.
Spiroxamine I	C18H35NO2	297.2668	178.03	9.08	+H	20	18	6	20	18	6
Sulfentrazone	C11H10Cl2F2N4O3 S	385.9819	172.21	6.85	+H	20	20	4	20	20	4
Sulfosulfuron	C16H18N6O7S2	470.0678	198.2	5.72	+Na	20	18	3	20	18	3

Tau-Fluvalinate	C26H22ClF3N2O3	502.1271	203.63	11.69	+Na	19	2	n.d.	19	3	n.d.
Tebuconazole	C16H22ClN3O	307.1451	164.38	9.62	+H	20	19	11		19	11
Tebufenozide	C22H28N2O2	352.2151	198.39	9.4	+Na	20	20	2	20	20	2
Tebufenpyrad	C18H24ClN3O	333.1608	188.07	10.61	+H	20	20	20	20	20	20
Tebutam	C15H23NO	233.178	152.69	9.15	+H	20	16	5	20	16	5
Teflubenzuron	C14H6Cl2F4N2O2	379.9743	182.9	10.7	+Na	18	18	n.d.	20	20	n.d.
Tembotrione	C17H16ClF3O6S	440.0308	178.37	5.84	+Na	20	8	n.d.	20	8	n.d.
TEPP	C8H20O7P2	290.0684	159.1	6.21	+Na	20	20	20	20	20	20
Terbumeton	C10H19N5O	225.159	153.32	8.33	+H	20	20	20	20	20	20
Terbuthylazine	C9H16ClN5	229.1094	150.95	8.41	+H	20	20	1	20	20	2
Terbutryn	C10H19N5S	241.1361	160.18	9.09	+H	20	20	20	20	20	20
Tetrachlorvinphos (ROL)	C10H9Cl4O4P	363.8993	170.59	9.45	+Na	20	20	2	20	20	2
Tetraconazole	C13H11Cl2F4N3O	371.0215	169.94	9.14	+H	20	20	17	20	20	17
Tetramethrin	C19H25NO4	331.1784	193.61	10.55	+Na	20	20	20	20	20	20
Thiabendazole	C10H7N3S	201.0361	136.52	5.61	+H	11	9	n.d.	20	20	4
Thiabendazole-5-Hydroxy	C10H7N3OS	217.031	139.49	4.18	+H	12	10	n.d.	20	10	n.d.
Thiacloprid	C10H9ClN4S	252.0236	152.41	5.19	+H	20	17	1	20	17	1
Thiodicarb	C10H18N4O4S3	354.0490	185.8	7.22	+K	20	5	3	20	5	3
Thifensulfuron methyl	C12H13N5O6S2	387.0307	179.9	4.81	+H	20	10	3	20	10	3
Thiophanate-methyl	C12H14N4O4S2	342.0457	170.84	6.45	+H	20	20	3	20	20	3
Tolfenpyrad	C21H22ClN3O2	383.1401	206.01	10.72	+H	20	20	20	20	20	20

Tralkoxydim	C20H27NO3	329.1991	180.69	9.05	+H	20	20	20	20	20	20
Triadimefon	C14H16ClN3O2	293.0931	167.88	8.72	+H	20	19	2	20	19	2
Triadimenol	C14H18ClN3O2	295.1088	173.3	8.9	+Na	20	17	1	20	17	1
Tri-allate	C10H16Cl3NOS	303.0018	156.81	10.92	+H	20	n.d.	n.d.	20	n.d.	n.d.
Triasulfuron	C14H16ClN5O5S	401.0561	181.83	5.92	+H	19	20	1	19	20	1
Tribenuron-methyl	C15H17N5O6S	395.09	187.01	6.58	+Na	20	20	2	20	20	2
Trichlorfon	C4H8Cl3O4P	255.9226	134.76	4.44	+H	6	n.d.	n.d.	20	n.d.	n.d.
Tricyclazole	C9H7N3S	189.0361	133.45	5.46	+H	19	20	1	19	20	1
Tridemorph	C19H39NO	297.3031	182.78	11.88	+H	20	19	6	20	20	6
Trietazine	C9H16ClN5	229.1094	148.49	8.93	+H	20	20	7	20	20	7
Trifloxystrobin	C20H19F3N2O4	408.1297	188.36	10.26	+Na	20	20	20	20	20	20
Triflumizole	C15H15ClF3N3O	345.0856	182.57	10.35	+Na	15	n.d.	n.d.	15	n.d.	n.d.
Triflumuron	C15H10ClF3N2O3	358.0332	180.8	9.87	+Na	20	20	16	20	20	16
Triforine II	C10H14Cl6N4O2	431.9248	182.11	8.2	+Na	19	4	n.d.	19	4	n.d.
Uniconazole	C15H18ClN3O	291.1138	167.23	9.29	+H	19	15	4	19	15	5
Valifenalate	C19H27ClN2O5	398.1609	197.47	8.87	+K	20	17	13	20	18	13
Zoxamide	C14H16Cl3NO2	335.0247	171.46	9.68	+H	20	20	20	20	20	20
Sum						236	157	58	254	163	60
SDL (% of original scope of 280 pesticide compounds)						(84%)	(56%)	(21%)	(91%)	(58%)	(21%)

n.d. – not detected

2. Supplementary Material: Identifizierung von Pestizidmetaboliten in Brassica Pflanzen mittels TWIMS-QToF-MS (Publikation II)

Identification and characterization of pesticide metabolites in *Brassica* species by liquid chromatography travelling wave ion mobility quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-TWIMS-QTOF-MS)

Anna Bauer^a, Jens Luetjohann^{a*}, Franziska S. Hanschen^b, Monika Schreiner^b, Jürgen Kuballa^a, Eckard Jantzen^a, Sascha Rohn^c

^a*Research and Development Department, GALAB Laboratories GmbH, Am Schleusengraben 7, 21029 Hamburg, Germany*

^b*Leibniz Institute of Vegetable and Ornamental Crops, Theodor-Echtermeyer-Weg 1, 14979 Grossbeeren, Germany*

^c*Institute of Food Chemistry, Hamburg School of Food Science, University of Hamburg, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany*

*Corresponding author. Tel.: +4940368077432. E-mail address: jens.luetjohann@galab.de (J. Luetjohann).

Content:

Table S-1. IUPAC names for detected pesticides and metabolites.

Table S-2. Validation data for the quantification of active compounds and thiacloprid metabolites in pak choi.

Figure S-1. Mechanistic biotransformation reactions of difenoconazole in the *Brassica* crops of the present study, modified according to [1].

Figure S-2. Distribution of azoxystrobin metabolites in broccoli plant compartments.

Figure S-3. Distribution of thiacloprid metabolites (A) and difenoconazole metabolites (B) in broccoli plant compartments.

Figure S-4. Quantification of thiacloprid in pak choi. A) blank sample, B) blank sample spiked with 10 mg/kg thiacloprid, C) blank sample spiked with 100 mg/kg thiacloprid, D) treated sample of day 2 from the kinetic study.

Figure S-5. Quantification of thiacloprid metabolite TM16 in pak choi. A) treated sample of day 1 from the kinetic study, B) blank sample spiked with 0.100 mg/kg TM16, C) solvent standard of TM16 with 0.001 mg/mL.

Table S-1. IUPAC names for detected pesticides and metabolites.

Compound	acronym ¹	IUPAC
thiacloprid		(Z)-N-(3-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)thiazolidin-2-ylidene)cyanamide
4-hydroxy-KKO 2254	TM37	(Z)-1-(3-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)-4-hydroxythiazolidin-2-ylidene)urea
thiacloprid-amide	TM02	(Z)-1-(3-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)thiazolidin-2-ylidene)urea
4-hydroxy-thiacloprid	TM01	(Z)-N-(3-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)-4-hydroxythiazolidin-2-ylidene)cyanamide
thiacloprid-olefin	TM38	(Z)-N-(3-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)thiazol-2(3H)-ylidene)cyanamide
Thiacloprid thiazolidinimine	TM29	3-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)thiazolidin-2-imine
thiacloprid O-analogue	TM26	(Z)-N-((6-chloropyridin-3-yl)methyl)-N'-cyano-N-(2-hydroxyethyl)carbamidodithioic acid
6-CPA-glucoside	TM04	2-((6-chloropyridin-3-yl)methoxy)-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triol
6-CP-biuret sulfoxide	TM10	N-[(6-chloro-3-pyridinyl)methyl]-N-N-[2-(methylsulfinyl)ethyl]iminodi carbonic diamide
azoxystrobin		Methyl (E)-2-[2-[6-(2-cyanophenoxy)pyrimidin-4-yloxy] phenyl]-3-methoxyacrylate
R400753 Compound 24	AMC24	Methyl 2-[2-[6-(2-cyanophenoxy)pyrimidin-4-yloxy]phenyl]-glycolate
Compound U5	AMU5	2-[2-[6-(2-cyanophenoxy)pyrimidin-4-yloxy]-phenyl]-3-methoxypropionic acid
R40051 Compound 21	AMC21	Methyl 2-[6-(2-cyano- phenoxy)pyrimidin-4-yloxy]phenylacetate
Compound N1	AMN1	Glucosyl (E)-2-[2-[6-(2-cyanophenoxy)pyrimidin-4-yloxy]phenyl]-3-methoxypropionate
Compound O2	AMO2	Glucosylmalonyl 2-[2-[6-(2-cyanophenoxy)pyrimidin-4-yloxy]phenyl]-3-methoxypropionate
Compound O1	AMO1	Methyl (E)-2-[2-[6-(2-cyanophenoxy)pirimidin-4-yloxy]phenyl]-3-(glucosylmalonyl)-acrylate
Compound M2	AMM2	Malonylglucosyl 3-hydroxy-2-[2-[6-(2-cyanophenoxy)pyrimidin-4-yloxy]phenyl]propionate
Compound M3	AMM3	Methyl(E)-2-[2-[6-(2-cyanophenoxy)pyrimidin-4-yloxy]phenyl]-3-glucosylacrylate
Compound M1	AMM1	Glucosyl 2-[6-(2-cyanophenoxy)pyrimidin-4-yloxy]benzoate
Compound U6	AMU6	2-(2-((6-(2-cyanophenoxy)pyrimidin-4-yl)oxy)phenyl)-2-hydroxy-3-methoxypropanoic acid

Compound 35/U3	AMC3 5_U3	2-{2-[6-(2-cyanophenoxy)pyrimidin-4-yloxy]phenyl}-glycolic acid
difenoconazole		1-((2-(2-chloro-4-(4-chlorophenoxy)phenyl)-4-methyl-1,3-dioxolan-2-yl)methyl)-1H-1,2,4-triazole
hydroxyl-difenoconazole	DM08	5-(4-(2-((1H-1,2,4-triazol-1-yl)methyl)-4-methyl-1,3-dioxolan-2-yl)-3-chlorophenoxy)-2-chlorophenol
CGA 205375	DM03	1-(2-chloro-4-(4-chlorophenoxy)phenyl)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)ethan-1-ol
CGA 205375	DM02	1-(2-chloro-4-(4-chlorophenoxy)phenyl)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)ethan-1-one

¹Acronyms and abbreviations used in this study.

Table S-2. Validation data for the quantification of active compounds and thiachloprid metabolites in pak choi

Compound	RL ¹ [mg/kg]	spiking level 0.010 mg/kg		spiking level 0.100 mg/kg		linear range tested [mg/kg]	ME ³ [%]
		recovery rate [%]	RSD ² [%]	recovery rate [%]	RSD ² [%]		
thiacloprid	0.010	87	8	92	9	0.001 - 1.000	-27
azoxy-strobin	0.010	104	12	103	7	0.001 - 1.000	-3
difenoco-nazole	0.010	102	11	97	6	0.001 - 1.000	-1
TM02	0.010	98	9	95	7	0.001 - 1.000	-55
TM37	0.010	95	7	99	5	0.001 - 1.000	-69
TM16	0.010	86	10	94	9	0.001 - 1.000	-26

¹RL: reporting limit according to guidance document SANTÉ/11945/2015 RSD ≤ 20% and mean recovery 70 - 120%

²RSD: relative standard deviation

³ME: matrix effects obtained

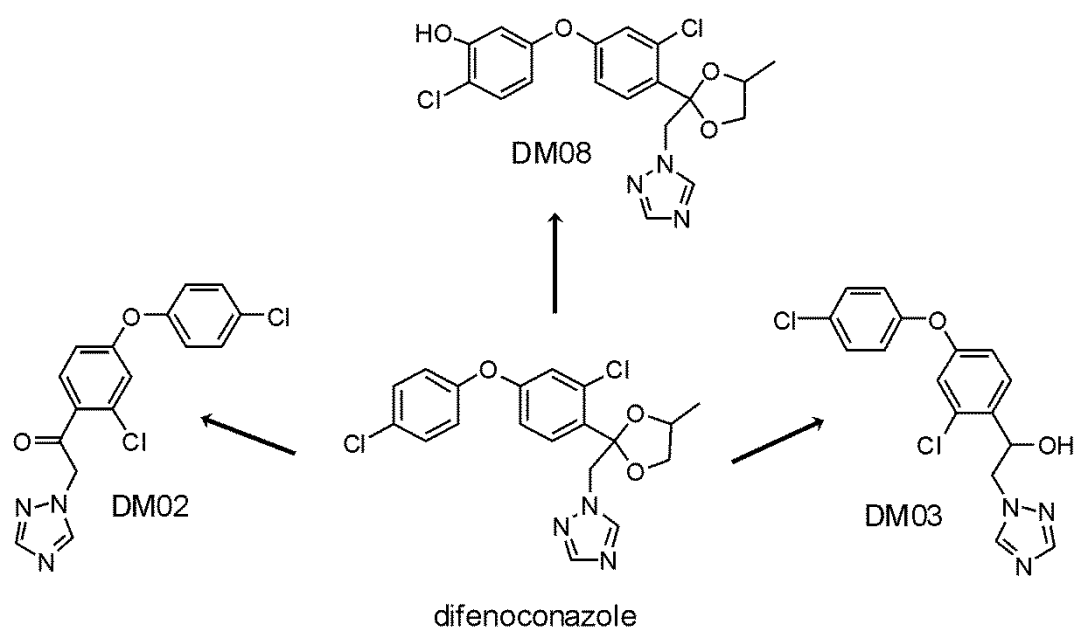


Figure S-1. Mechanistic biotransformation reactions of difenoconazole in *Brassica* species of the present study, modified according to [1].

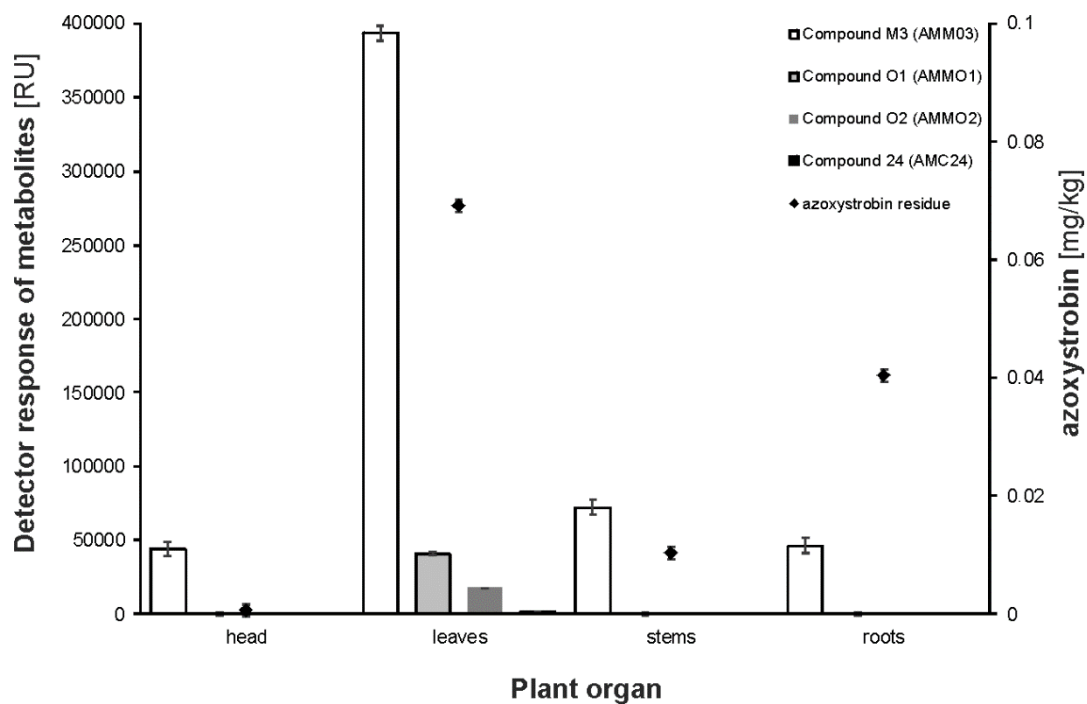


Figure S-2. Distribution of azoxystrobin metabolites in broccoli plant compartments. The error bars indicate the standard deviation ($n = 3$).

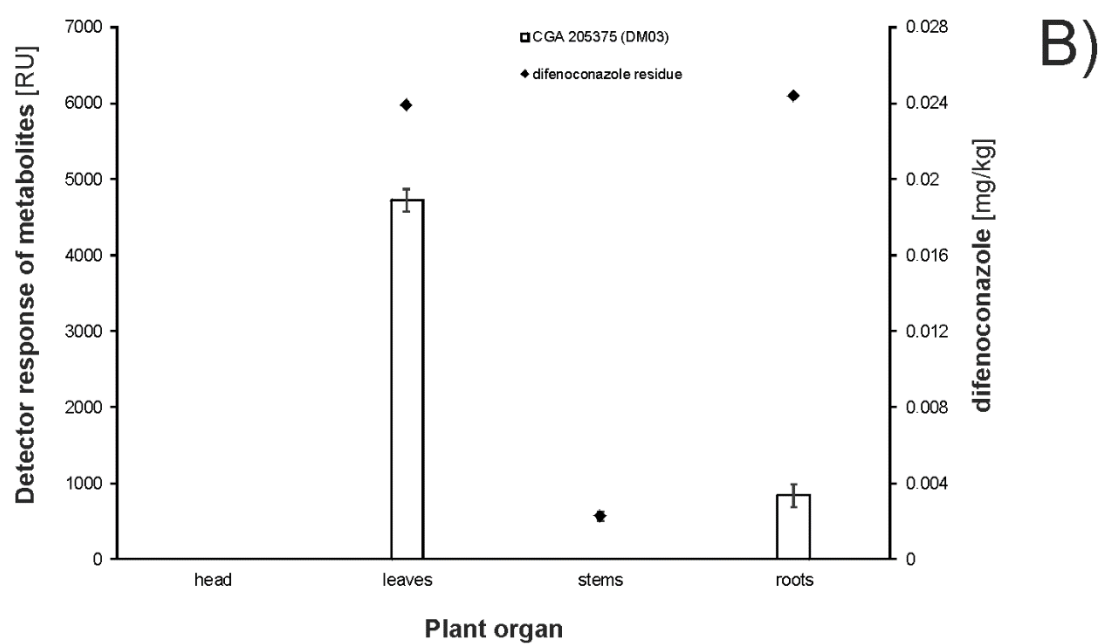
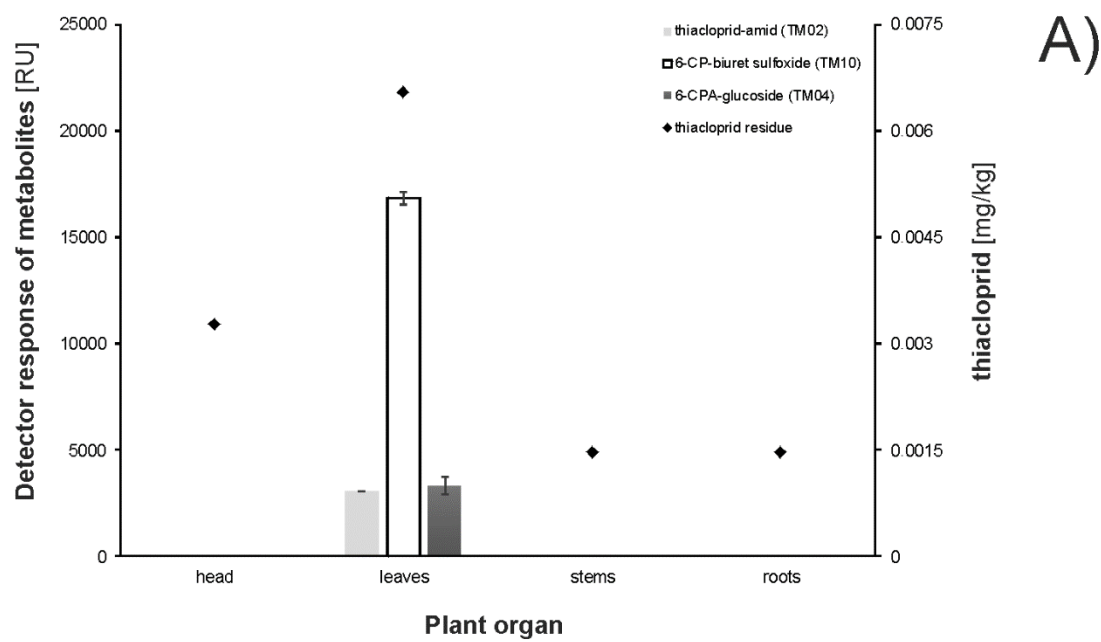


Figure S-3. Distribution of thiocloprid metabolites (A) and difenoconazole metabolites (B) in broccoli plant compartments. The error bars indicate the standard deviation ($n = 3$).

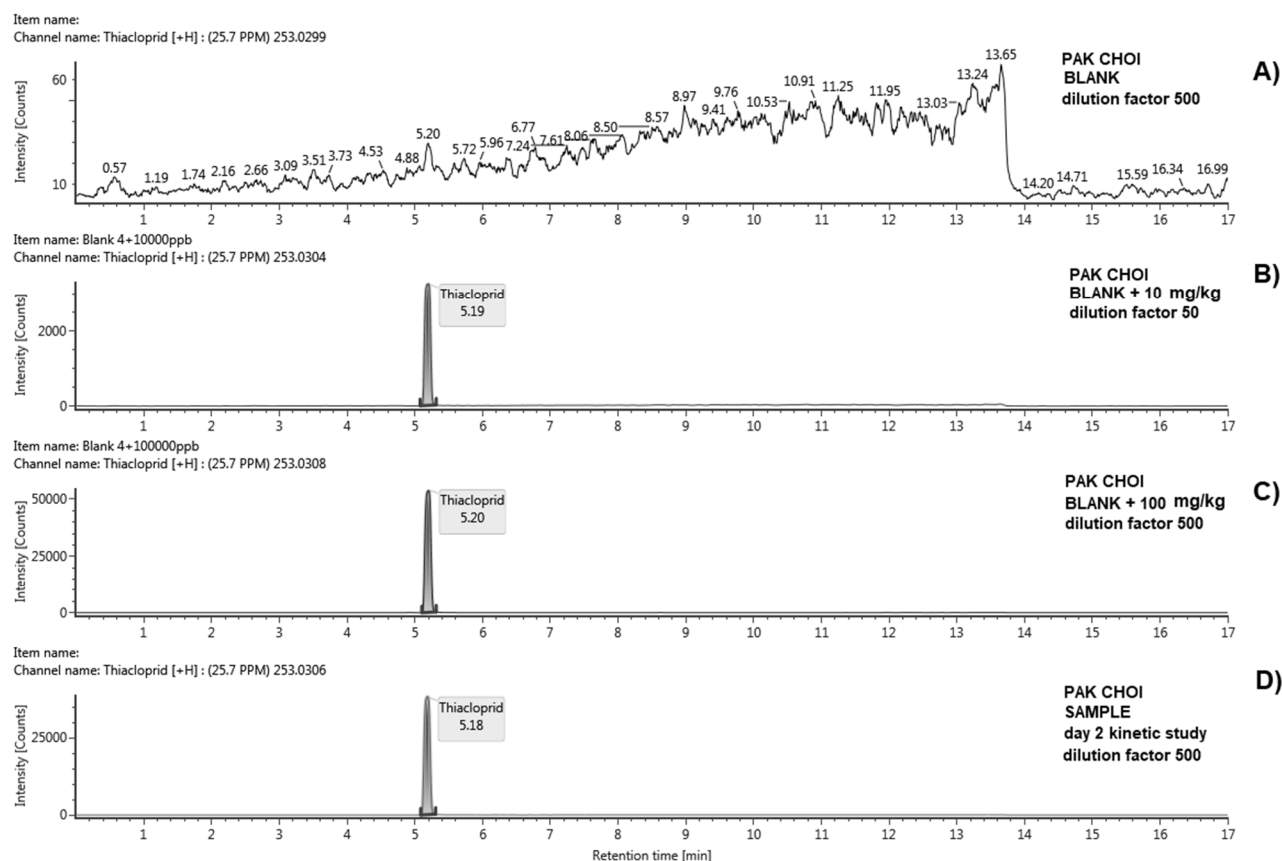


Figure S-4. Quantification of thiachloprid in pak choi. A) blank sample, B) blank sample spiked with 10 mg/kg thiachloprid, C) blank sample spiked with 100 mg/kg thiachloprid, D) treated sample of day 2 from the kinetic study.

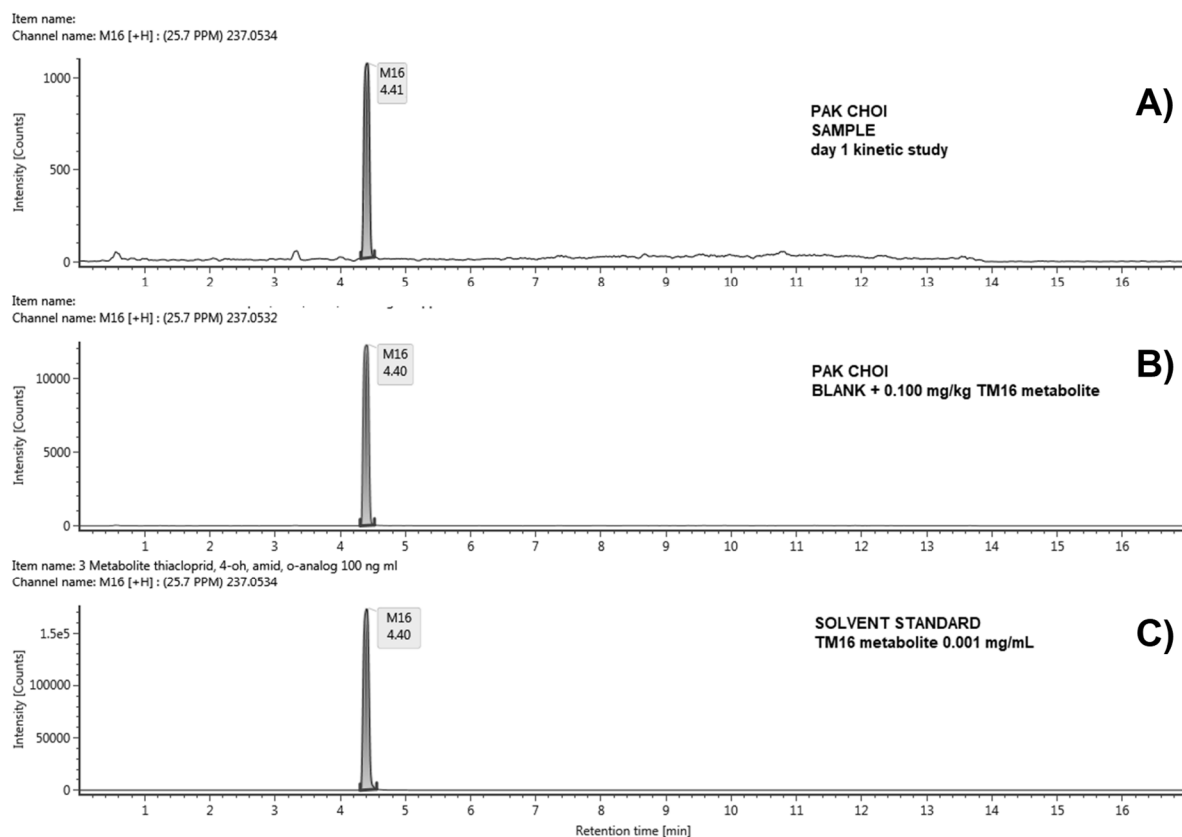


Figure S-5. Quantification of thiacloprid metabolite TM16 in pak choi. A) treated sample of day 1 from the kinetic study, B) blank sample spiked with 0.100 mg/kg TM16, C) solvent standard of TM16 with 0.001 mg/mL

3. Supplementary Material: Multiscreening für suspect Pestizidmetabolite in pflanzlichen Lebensmitteln mittels TWIMS-QToF-MS (Publikation III)

Development of a suspect screening strategy for pesticide metabolites in fruit and vegetables by UPLC-QToF-MS

Anna Bauer^a, Jens Luetjohann^{a*}, Sascha Rohn^b, Eckard Jantzen^a, Jürgen Kuballa^a

^a*Research and Development Department, GALAB Laboratories GmbH, Am Schleusengraben 7, 21029 Hamburg, Germany*

^b*Institute of Food Chemistry, Hamburg School of Food Science, University of Hamburg, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany*

* Corresponding author. Tel.: +4940368077432. E-mail address: jens.luetjohann@galab.de (J. Luetjohann).

Content:

Table S-1. Relevant commodities analyzed for pesticides in daily routine from April to August 2016 used for the study.

Table S-2. Top five residue detects for the individual most relevant commodities, evaluated in the years 2008 – 2014.

Table S-1. Relevant commodities analyzed for pesticides in daily routine from April to August 2016 used for the study.

April	samples (%)	May	samples (%)	June	samples (%)	July	samples (%)	August	samples (%)
bananas	8.3	peppers	7.3	strawberries	13.5	strawberries	8.6	cherries	8.9
grapes	8.3	apples	6.1	peppers	6.9	oranges	6.3	strawberries	6.7
pears	4.6	bananas	6.1	apples	6.8	apples	5.6	lemons	5.9
tomatoes	4.5	grapes	6.1	oranges	4.6	peppers	4.9	apricots	5.5
peppers	4.0	strawberries	4.5	tomatoes	4.1	currants	4.7	grapes	4.2
apples	3.7	tomatoes	3.0	grapefruits	3.9	cherries	3.6	peppers	4.0
Percentage of total samples	33.4		33.1		39.8		33.7		35.1

Table S-2. Top five residue detects for the individual most relevant commodities, evaluated in the years 2008 – 2014.

Most relevant commodities		Top 5 residues evaluated from 2008 to 2014			
apples	Captan	Trifloxystrobin	Pirimicarb	Pyrimethanil	Chlorantraniliprol
bananas	Imazalil	Azoxystrobin	Thiabendazol	Mycobutanil	Fenpropimorph
pears	Boscalid	Chlorpyrifos	Fludioxonil	Chlorantraniliprol	Captan
strawberries	Cyprodinil	Fludioxonil	Azoxystrobin	Pyrimethanil	Boscalid
cherries	Carbendazim	Omethoat	Cypermethrin	Dodin	Dimethoat
oranges	Imazalil	Chlorpyrifos	Thiabendazol	Pyriproxyfen	Imidachloprid
peppers	Flutriafol	Fludioxonil	Azoxystrobin	Imidacloprid	Indoxacarb
grapes	Azoxystrobin	Cyprodinil	Fenhexamid	Pyrimethanil	Boscalid
tomatoes	Spiromesifen	Pyrimethanil	Cyprodinil	Fludioxonil	Azoxystrobin
grapefruits	Imazalil	Chlorpyrifos	Prochloraz	Myclobutanil	Pyriproxyfen
lemons	Imazalil	Pyriproxyfen	Chlorpyrifos	Thiabendazol	Prochloraz
apricots	Carbendazim	Imidacloprid	Tebuconazole	Dodin	Cyprodinil

3. Supplementary Material: Multimethode für polare und anionische Pestizide mittels IC-MS/MS (Publikation V)

Ion chromatography tandem mass spectrometry (IC-MS/MS) multimethod for the determination of highly polar pesticides in plant-derived commodities

Anna Bauer^a, Jens Luetjohann^{a*}, Sascha Rohn^b, Jürgen Kuballa^a, Eckard Jantzen^a

^a*Research and Development Department, GALAB Laboratories GmbH, Am Schleusengraben 7, 21029 Hamburg, Germany*

^b*Institute of Food Chemistry, Hamburg School of Food Science, University of Hamburg, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany*

*Corresponding author. Tel.: +4940368077432. E-mail address:
jens.luetjohann@galab.de (J. Luetjohann).

Content:

Table S-1: Residue data for ethephon in non-spiked samples from routine analysis (a total of 13.285 samples with 1.451 samples > RL of 0.010 mg/kg corresponding to 11% of total samples).

Table S-2: Residue data for perchlorate in non-spiked samples from routine analysis (a total of 4.416 samples with 787 samples > RL of 0.010 mg/kg corresponding to 18% of total samples).

Table S-3: Residue data for chlorate in non-spiked samples from routine analysis (a total of 4147 samples with 1815 samples > RL of 0.010 mg/kg corresponding to 43.8% of total samples).

Table S-4: Recovery rates of the analyte compounds of this study in routine analysis.

Table S-5: Standard deviations within replicate determinations of the analyte compounds of this study in routine analysis in non-spiked samples.

Table S-1. Residue data for ethephon in non-spiked samples from routine analysis (a total of 13.285 samples with 1.451 samples > RL of 0.010 mg/kg corresponding to 11% of total samples).

Commodity group	main commodities	number of samples	number of samples > RL 0.01 mg/kg	ratio samples (positive/total samples) [%]	Range ethephon [mg/kg]
1. High water content	Ananas, tomatoes, peppers, mangoes, figs, other fruiting vegetables	10704	403	3,8	0.017 - 1.52
2. High acid content and high water content	table grapes	2017	917	45,5	0.010 - 1.48
3. High sugar and low water content	dried fruit, fruit juice concentrates	549	130	23,7	0.014 - 0.523
4. High oil content	-	-	-	-	-
5. High starch and/or protein content and low water and fat content	dried lentils	15	1	6,7	0.170

Table S-2. Residue data for perchlorate in non-spiked samples from routine analysis (a total of 4.416 samples with 787 samples > RL of 0.010 mg/kg corresponding to 18% of total samples).

Commodity group	main commodities	number of samples	number of samples > RL 0.01 mg/kg	ratio samples (positive/total samples) [%]	Range perchlorate [mg/kg]
1. High water content	melons, carrots, tomatoes, peppers, other fruiting vegetables	1937	399	20,6	0.010 - 0.879
2. High acid content and high water content	table grapes, strawberries, citrus fruit	818	141	17,2	0.010 - 0.303
3. High sugar and low water content	dried fruit, fruit juice concentrates	1588	236	14,9	0.011 - 0.540
4. High oil content	oil, oil seeds	17	3	17,6	0.017 - 0.029
5. High starch and/or protein content and low water and fat content	cereals, starch	56	8	14,3	0.010 - 0.158

Table S-3. Residue data for chlorate in non-spiked samples from routine analysis (a total of 4147 samples with 1815 samples > RL of 0.010 mg/kg corresponding to 43.8% of total samples).

Commodity group	main commodities	number of samples	number of samples > RL 0.01 mg/kg	ratio samples (positive/total samples) [%]	Range chlorate [mg/kg]
1. High water content	pome fruits, tomatoes, stone fruits, other fruiting vegetables	1534	877	57,2	0.010 - 0.976
2. High acid content and high water content	table grapes, citrus fruit	695	187	26,9	0.010 - 0.661
3. High sugar and low water content	dried fruit, fruit juice concentrates	1584	655	41,4	0.010- 2.46
4. High oil content	nuts, oil seeds, coco nuts	193	64	33,2	0.011 - 0.902
5. High starch and/or protein content and low water and fat content	cereals, dried pulses, starch	141	32	22,7	0.010 - 0.339

Table S-4. Recovery rates of the analyte compounds of this study in routine analysis.

Commodity group	Ethephon	Chlorate	Perchlorate
	range of recovery rates [%]	range of recovery rates [%]	range of recovery rates [%]
1. High water content	95 - 103	88 - 111	89 - 106
2. High acid content and high water content	93 - 105	92 - 108	99 - 108
3. High sugar and low water content	83 - 112	87 - 107	79 - 105
4. High oil content	88 - 106	96 - 108	82 - 99
5. High starch and/or protein content and low water and fat content	87 - 107	89 - 107	84 - 102

Table S5. Relative standard deviations (RSDs) within replicate determinations of the analyte compounds of this study in routine analysis in non-spiked samples.

Commodity group	Ethephon	Chlorate	Perchlorate
	RSD range of replicate determinations [%]	RSD range of replicate determinations [%]	RSD range of replicate determinations [%]
1. High water content	3 - 12	5 - 11	0 - 15
2. High acid content and high water content	7 - 15	1 - 9	5 - 12
3. High sugar and low water content	4 - 12	3 - 19	3 - 10
4. High oil content	n.d.	4 - 15	2 - 11
5. High starch and/or protein content and low water and fat content	13	5 - 20	6 - 11

*n.d. not detected, RL < 0.010 mg/kg

B Auflistung der Gefahrenstoffe nach GHS

Substanz	CAS-Nummer	GHS-Kodierung	H-Sätze	P-Sätze
Acetonitril	75-05-8	07, 03	H225- H302 + H312 + H332-H319	P: 210 - 240 - 302+352 - 305+351+338 403+233
Methanol	67-56-1	02, 06, 08	H: 225-331-311-301-370	P: 210-233-280-302+352-304+340-308+310-403+235
2-Propanol	67-63-0	02, 07	H: 225-319-336	P: 210-233-240-305+351+338-403+235
Ameisensäure (99,8%)	64-18-6	02, 06, 05	H: 226-302-314-331	P: 210-280-303+361+353-304+340+310-305+351+338-403+233
Essigsäure (100%)	64-19-7	02, 05	H: 226-290-314	P: 210-280-301+330+331-305+351+338-308+310
Ammoniumacetat	631-61-8	-	-	-
Natriumhydrogencarbonat	144-55-8	-	-	-
Magnesiumsulfat	7487-88-9	-	-	-
Natriumchlorid	7647-14-5	-	-	-
Triphenylphosphat	115-86-6	09	H: 410	P: 273-501
primary secondary amine (PSA)	63231-67-4	-	-	-
graphitized carbon black (GCB)	7440-44-0	08	H: 351	P: 281

Dinatriumhydrogencitrat-Sesquihydrat	6132-05-4	-	-	-
Trinatriumcitrat-Dihydrat	68-04-2	-	-	-
Mepiquat	24307-26-4	07	H: 302-412	P: 273
Paraquat Dichlorid-Hydrate	1910-42-5	06, 08, 09	H: 301-311-330-315-319-335-372-410	P: 261-273-305+351+338-314-501
Diquat Dibromide-Monohydrate	6385-62-2	06, 08, 09	H: 330-372-302-319-335-315-317-410	P: 260 – 280 – 301+ 330 + 331 + 310 – 302 + 352 + 312 – 304 + 340 + 310 – 305 + 351 + 338
Chlormequat	999-81-5	07	H: 312-302	P: 280-301+312+330
diquat dibromide monohydrate	85-00-7	06, 08, 09	H: 301 + 311 – 315 – 317 – 319 – 330 – 335 – 372 – 410	P: 260 – 273 – 280 – 301 + 310 + 330 – 304 + 340 + 310 – 403 + 233
diquat (d₄) dibromide	-	06, 08, 09, 07	H: 302-330-315-319-317-335-372-410	P: 280-305+351+338-310-320-405-501
mepiquat (d₃) iodide	32317-85-4	-	-	-
chlormequat (d₄) chloride	-	07	H: 302+312	P: 280-264-270-321-301+312-501
paraquat (d₆) diiodide	-	06, 08, 09	H: 301+311-315-319-330-335-372-410	P: 260-273-280-301+310+330-304-340+310-403-233
Phosphonsäure	13598-36-2	05, 07	H: 290-302-314	P: 280-305+351+338-310
¹⁸O₃-Phosphonsäure	-	-	-	-

Natriumchlorat (>99%)	7775-09-9	03, 07, 09	H: 271 – 302 – 411 –	P: 220 - 273
Perchlorsäure (>99%)	7601-90-3	03, 08, 05, 07	H: 271-290-302-314-373	P: 210-280-303+361+353-304+340-310-305+351+338-371+380+375
Ethephon	16672-87-0	06, 05, 09	H: 302+332-311-314-411	P: 261-273-280-303+361+353-304+340-310-305+351+338
Hydroxy-, Ethephon	22987-21-9	05, 07	H: 314 – 302 – 312 – 332 - 412	P: 280 – 303 + 361 + 353 – 305 + 351 + 338 – 310 – 405 - 501
¹⁸O₃-chlorat, Kalium	82664-91-3	-	-	-
¹⁸O₄-perchlorate. Natrium	1173022-22-4	07	H: 315-317-319	P: 280-305+351+338
Ethephon (d₄)	1020719-29-2	06, 05, 09, 07	H: 302 + 332 – 311 – 314 – 411	P: 280 – 303 + 361 + 353 – 305 + 351 + 338
2,3,5-Trimethacarb/3,4,5-Trimethacarb	2655-15-4	06	H: 301 - 319	P: 301 + 310 – 305 + 351 + 338
Acetamiprid	135410-20-7	06	H: 301-330-412	P: 260-273-284-301+310-310
Acetochlor/Alachlor	34256-82-1	08, 07, 09	H: 332-315-317-335-361f-373-410	P: 261-273-280-501
Acrinathrin	101007-06-1	07, 09	H: 332-410	P: 273-501
Allethrin	584-79-2	07, 09	H: 302 – 332 – 410	P: 273 – 501
Ametoctradin	865318-97-4	07	H: 302	-
Ametryn	834-12-8	07, 09	H: 302 – 410	P: 273 – 501
Amidosulfuron	120923-37-7	09	H: 410	P: 273

Anilazine	101-05-3	07, 09	H: 315-319-410	P: 273-305+351+338-501
Atrazine	1912-24-9	08, 07, 09	H: 317-373-410	P: 273-280-501
Atrazine-desethyl	6190-65-4	07	H: 302 – 319 – 332	P: 305 + 351 + 338
Avermectin (B1a)	65195-55-3	06, 07, 09	H: 300 – 330 – 361 – 372 – 400- -410	P: 301+310-312-310-304-403+233-320- 281-260
Avermectin (B1b)	65195-56-4	02, 07	H: 225-302+312+332- 319	P: 210-280-305+351+338
Azaconazole	60207-31-0	07	H: 302	P: 264-270-301+312-330-501
Azinphos-ethyl	2642-71-9	06, 09	H: 300-311-410	P: 264-273-280-301+310-312-501
Aziprotryne	4658-28-0	-	-	-
Azoxystrobin	131860-33-8	06, 09	H: 331-410	P: 261-273-311-501
Benalaxyl	71626-11-4	09	H: 410	P: 273-501
Benodanil	15310-01-7	-	-	-
Bensulfuron methyl	83055-99-6	07, 09	H: 317-411	P: 273-280
Benthiavalicarb-isopropyl	413615-35-7	09, 07	H: 332-411	P: 261-273-271-304+340-312-501
Bifenazate	149877-41-8	08, 07, 09	H: 373-317-410	P: 273-280-305+351+338
Bifenthrin	82657-04-3	06, 08, 09	H: 351-331-300-372-317 -410	P: 261-264-273-280-301+310-311
Bitertanol	55179-31-2	06	H: 302-330	P: 260-284-310
Bixafen	581809-46-3	09	H: 400	P: 273

Boscalid	188425-85-6	09	H: 411	P: 391
Brodifacoum	56073-10-0	06, 08, 09	H: 300-310-330-360D-372-410	P: 273-314-501
Bromfenvinfos	33399-00-7	06	H: 300	P: 264-270-301+310-321-405-501
Bromuconazole I	116255-48-2	07, 09	H: 302-400	P: 273
Bupirimate	41483-43-6	08, 07, 09	H: 351-317-410	P: 280
Buprofezin	69327-76-0	09, 07	H: 332-411	P: 261-273-271-304+340-312-501
Butralin	33629-47-9	07, 08, 09	H: 302-319-341-410	P: 273-281-305+351+338-501
Buturon	3766-60-7	06	H: 302-311	P: 280-312
Carbendazim	10605-21-7	08, 09	H: 340-360FD-410	P: 201-280-273-391-308+313-405-501
Carbofuran	1563-66-2	06, 09	H: 300+330-410	P: 260-264-273-284-301+310-310
Carboxin	5234-68-4	07	H: 302+312-411	P: 280-273-264-321-301+312-501-
Chlorantraniliprole/Rynaxypyr	500008-45-7	09	H: 410	P: 273-391-501
Chlorbromuron	13360-45-7	07	H: 315-319	P: 280-305+351+338-321-362-332+313-337+313
Chlorfenvinphos	470-90-6	06, 09	H: 300+330-311-410	P: 260-264-280-284-301+310
Chlorfluazuron	71422-67-8	07	H: 302-319	P: 280-264-305+351+338-301+312-337+313-501
Chloroxuron	1982-47-4	07, 09	H: 332-400	P: 273
Chlorpyrifos (Dursban)	2921-88-2	06, 09	H: 301-410	P: 270-273-301+310-330-391-405-501

Chlorsulfuron	64902-72-3	09	H: 410	P: 273-501
Cinidon-ethyl	142891-20-1	08, 07, 09	H: 351-317-410	P: 273-280-501
Cinosulfuron	94593-91-6	02, 07	H: 225-302+312+332-319	P: 210-280-305+351+338
Clethodim	99129-21-2	-	H: 412	P: 273
Clofentezine	74115-24-5	09	H: 410	P: 273-391-501
Clomazone	81777-89-1	07	H: 302+332-315-319	P: 261-301+312+330-305+351+338
Coumachlor	81-82-3	07	H: 315-317-319	P: 280-305+351+338
Coumaphos	56-72-4	06, 09	H: 300-311-410	P: 273-280-301+310-302+352-405-501
Ccoumatetralyl	5836-29-3	06, 08, 09	H: 300-311-330-360D-372-410	P: 264-273-280-301+310-302+350-310
Cyantraniliprole	736994-63-1	07	H: 315-335	P: 261-305+351+338
Cyflufenamid	180409-60-3	07, 09	H: 319-332-410	P: 273-305+351+338-501
Cyfluthrin	68359-37-5	06, 09	H: 300-331-410	P: 261-264-273-301+310-311-501
Cypermethrin	52315-07-8	06, 09	H: 301-332-335-410	P: 261-304+340-301+312-312-405-501
Cyproconazole II	113096-99-4	08, 07, 09	H: 302-361d-410	P: 281-273-301+312-308+313-405-501
Cyprodinil	121552-61-2	07, 09	H: 317-410	P: 273-280-305+351+338-333+313-391-501
DEET	134-62-3	07	H: 302-319-315-412	P: 273-305+351+338
Deltamethrin	52918-63-5	06, 09	H: 300-312-331-410	P: 261-273-301+310+330-302+352+312-

				304+340+311-403+233
Demeton-S-methyl-sulfone	17040-19-6	06, 09	H: 300+330-311-411	P: 260-264-273-280-284-301+310
Desethylsimazin	1007-28-9	02, 07	H: 225-302+312+332-319	P: 210-280-305+351+338
Diafenthiuron	80060-09-9	06, 08, 09	H: 331-373-410	P: 260-261-321-311-405-501
Diazinon	333-41-5	07, 09	H: 302-410	P: 273-501
Dichlofluanid	1085-98-9	07, 09	H: 332-319-317-400	P: 261-273-280-302+352+312-304+340+312-501
Diclobutrazol	75736-33-3	07, 09	H: 319-411	P: 273-305+351+338
Diclofop-methyl	51338-27-3	07, 09	H: 302-317-410	P: 273-280-501
Difenoconazole I	119446-68-3	07, 09	H: 302+332-410	P: 273-501
Diflubenzuron	35367-38-5	07, 09	H: 312-410	P: 273-280-501
Diflufenican	83164-33-4	-	H: 412	P: 273
Dimefuron	34205-21-5	07	H: 315-319-335	P: 261-305+351+338
Dimethomorph	110488-70-5	09	H: 411	P: 273
Dimoxystrobin	149961-52-4	07, 08, 09	H: 332-351-361d-410	P: 273
Diniconazole	83657-24-3	07, 09	H: 302-410	P: 273-501
Diuron	330-54-1	08, 07, 09	H: 302-351-373-410	P: 273-301+312-330-391-501
Dodine	2439-10-3	07, 09	H: 302-315-319-410	P: 273-305+351+338-501

Emamectin B1a	121124-29-6	02, 07	H: 225-302+312+332-319-	P: 210-280-305+351+338
Emamectin B1b	121424-52-0	02, 07	H: 225-302-312-332-319	P: 210-280305+351+338
Esfenvalerat/Fenvalerat	66230-04-4	06, 09	H: 301-317-331-410	P: 261-273-280-301+310-311-501
Etaconazole	71245-23-3	07	H: 302-411	P: 273-264-270-301+312-330-501-
Ethion	563-12-2	06, 09	H: 300-310-410	P: 273-280-301+310+330-302+352+312-391-501
Ethoprophos	13194-48-4	06, 09	H: 300+310+330-317-410	P: 260-264-273-280-284-301+310
Ethoxyquin	91-53-2	07	H: 302	P: 301+312+330
Etofenprox	80844-07-1	09	H: 362-410	P: 201-260-263-273-308+313-391
Etoxazole	153233-91-1	09	H: 410	P: 261-273-304+340+312-391-501
Etrimfos	38260-54-7	02, 06, 08	H: 225-301+311+331-370	P: 280-210-301+310-303+361+353-405-501
Famoxadone	131807-57-3	08, 09	H: 373-410	P: 210-280-305+351+338
Famphur	52-85-7	06, 07	H: 300-312-315-319	P: 280-301+310-305+351+338-321-405-501
Fenamidone	161326-34-7	09	H: 410	P: 273-501
Fenamiphos	22224-92-6	06, 09	H: 300-310-330-319-410	P: 260-280-301+310+330-302+352+310-304+340+310-403+233

Fenamiphos sulphone	31972-44-8	06, 09, 07	H: 300+310+330-319-410	P: 280-301+310-305+351+338-320-405-501
Fenamiphos sulfoxide	31972-43-7	02, 06, 08	H: 225-301+311+331-370-412	P: 280-210-301+310-303+361+353-405-501
Fenarimol	60168-88-9	08, 09	H: 361fd-362-411	P: 263-273-281
Fenazaquin	120928-09-8	06, 09	H: 301-332-410	P: 273-301+310-501
Fenbuconazole	114369-43-6	09	H: 410	P: 273-501
Fenhexamid	126833-17-8	09	H: 411	P: 273-391-501
Fenoxycarb	79127-80-3	08, 09	H: 351-410	P: 273-391-501
Fenpropidin	67306-00-7	07	H: 302-312-319	P: 280-305+351+338
Fenpyroximate	111812-58-9	06, 09	H: 301-330-317-410	P: 260-280-304+340+310-403+233
Fenthion	55-38-9	08, 06 09	H: 302-312-331-341-372-410	P: 261-273-280-311-501
Fenthion-Oxonsulfoxid	6552-13-2	06	H: 300	P: 264-270-301+310-321-405-501
Fenthion-sulfone	3761-42-0	06, 07	H: 301-312	P: 280-301+310-321-312-405-501
Fenthion-sulfoxide	3761-41-9	06	H: 301	P: 264-270-301+310-321-405-501
Fipronil	120068-37-3	06, 08, 09	H: 330-311-301-372-410	P: 261-273-280-301+310-311-501
Fipronil-sulfone	120068-36-2	06, 09	H: 301-410	P: 273-264-301+310-321-405-501
Flamprop-M-isopropyl	63782-90-1	09, 07	H: 312-411	P: 280-273-321-312-302+352-501
Flamprop-M-methyl	63729-98-6	09, 07	H: 302+312-411	P: 280-273-264-321-301+312-501

Flazasulfuron	104040-78-0	09	H: 410	P: 273-501
Flonicamid	158062-67-0	08, 07	H: 302-361	P: 281-264-270-308+313-405-501-
Florasulam	145701-23-1	02, 07	H: 225-302+312+332-319	P: 280-210-241-303+351+338-501
Fluazifop	69335-91-7	08, 09	H: 361-410	P: 281-273-308+313-391-405-501
Fluazifop-P-butyl	79241-46-6	08, 09	H: 361d-410	P: 273-281-501
Fluazuron	86811-58-7	09	H: 410	P: 273-391-501
Flubendiamide	272451-65-7	09	H: 400	P: 273
Flubenzimine	37893-02-0	09, 07	H: 319-410	P: 280-273-264-305+351+338-337+313-501
Fludioxonil	131341-86-1	09, 07	H: 315-319-410	P: 280-273-305+351+338-321-332+313-501
Flufenacet	142459-58-3	08, 07, 09	H: 302-317-373-410	P: 273-280-501
Flufenoxuron	101463-69-8	09	H: 362-410	P: 263-260-273-264-308+313-501
Flumioxazin	103361-09-7	08, 09	H: 360D-410	P: 201-273-308+313-391-501
Fluomethuron	2164-17-2	07, 09	H: 302-332-319-410	P: 261-273-280-304+340-305+351+338-312
Fluopicolide	239110-15-7	09	H: 400	P: 273
Fluopyram	658066-35-4	09	H: 411	P: 273-501
Flurochloridon	61213-25-0	09	H: 410	P: 273-391-501

Flurprimidol	56425-91-3	07	H: 302+332-315-319-412	P: 261-280-305+351+338-321-362-501
Flusilazole	85509-19-9	08, 07, 09	H: 302-351-360D-411	P: 201-273-281-308+313
Flutolanil	66332-96-5	09	H: 411	P: 273-391-501
Flutriafol	76674-21-0	07	H: 302+312+332	P: 280-261-321-301+312-304+340-501
Fosthiazate	98886-44-3	06, 09	H: 301-312-317-331-410	P: 261-273-280-301+310-311-501
Haloxyfop	69806-34-4	07	H: 302	P: 264-270-301+312-330-501
Haloxyfop-2-ethoxyethyl	87237-48-7	02, 08, 09, 07	H: 225-315-336-304-410	P: 280-210-301+310-303+361+353-405-501
Haloxyfop-methylester	69806-40-2	07	H: 302	P: 264-270-330-301+312-501
Hexaflumuron	86479-06-3	07, 09	H: 332-410	P: 273-501
Hexazinone	51235-04-2	07, 09	H: 302-319-410	P: 273-305+351+338-501
Hexythiazox	78587-05-0	09	H: 410	P: 273-501
Imazalil	35554-44-0	06, 05, 08, 09	H: 301-332-318-351-410	P: 273-280-305+351+338-501
Imazamox	114311-32-9	09	H: 410	P: 273-391-501
Imidacloprid	105827-78-9	07, 09	H: 302-410	P: 301+312+330
Indoxacarb	144171-61-9	06, 08, 09	H: 301-332-372-317-410	P: 273-301+310-314-501
Iodofenphos	18181-70-9	06, 09	H: 311-410	P: 280-273-321-312-405-501
Iodosulfuron methyl	144550-36-7	09	H: 410	P: 273-391-501

Iprobenphos	26087-47-8	02, 07	H: 225-302+312+332-319	P: 280-210-241-303+361+353-305+351+338-501
Isofenphos	25311-71-1	06, 09	H: 301+311-410	P: 273-280-301+310-312-501
Isofenphos-methyl	99675-03-3	06, 09	H: 301+311-410	P: 280-301+310-361-322-405-501
Isoprothiolane	50512-35-1	07	H: 302-411	P: 273-264-270-301+312-330-501
Isoproturon	34123-59-6	08, 09	H: 351-410	P: 261-273-304+340+312-391-501
Isopyrazam	881685-58-1	07, 08, 09	H: 317-351-361-410	P: 273-280-501
Isoxaben	82558-50-7	-	H: 413	P: 413-273-501
Isoxaflutole	141112-29-0	08, 09	H: 361d-410	P: 273-281-501
Isoxathion	18854-01-8	06, 09	H: 301+311-410	P: 273-280-301+310-312-501
Jasmolin	8003-34-7	07, 09	H: 332-312-302-410	P: 273-280-501
Kresoxim-methyl	143390-89-0	08, 09	H: 351-410	P: 273-281-501
Cyhalothrin, -lambda	91465-08-6	06, 09, 07	H: 301-312-330-410	P: 280-260-301+310-320-405-501
Linuron	330-55-2	07, 08, 09	H: 302-351-360Df-373-410	P: 201-273-281-308+313-501
Lufenuron	103055-07-8	07, 09	H: 317-410	P: 273-280-501
Malaoxon	1634-78-2	06, 09	H: 301-310-410	P: 301+310-310-361-321-405-501
Mandipropamid	374726-62-2	09	H: 410	P: 273-391-501
Mepanipyrim	110235-47-7	08, 09	H: 351-410	P: 273-281-501

Mepronil	55814-41-0	09	H: 400-410	P: 273-391-501
Mesosulfuron-methyl	208465-21-8	09, 07	H: 332-410	P: 261-271-273-304+340-312-501
Metaflumizone	139968-49-3	09	H: 400	P: 273
Metalaxyl	57837-19-1	07	H: 302-317-412	P: 273-280
Metazachlor	67129-08-2	07, 08, 09	H: 317-351-410	P: 273-301+312+330-391-501 [
Metconazole	125116-23-6	08, 07, 09	H: 302-361d-411	P: 273-281
Methabenzthiazuron	18691-97-9	09	H: 410	P: 273-501
Methidathion	950-37-8	06, 05, 09	H: 300+310+330-318-410	P: 260-264-273-280-284-301+310
Methoprene	40596-69-8	07, 09	H: 315-319-335-411	P: 261-273-305+351+338
Metoxuron	19937-59-8	09	H: 410	P: 273-391-501
Monolinuron	1746-81-2	08, 09, 07	H: 302-373-410	P: 260-273-264-270-301+312-501
Neburon	555-37-3	09, 07	H: 302-410	P: 273-264-270-301+312-330-501
Nicosulfuron	111991-09-4	07, 09	H: 315-319-410	P: 273-305+351+338-501
Nitralin	4726-14-1	09	H: 400	P: 273-391-501
Norflurazon	27314-13-2	09	H: 400	P: 273
Novaluron	116714-46-6	09	H: 410	P: 273-391-501
Ofurace	58810-48-3	07	H: 319	P: 305+351+338
Omethoate	1113-02-6	06, 09	H: 300-311-400	P: 264-273-280-301+310-312

Oxadiargyl	39807-15-3	08, 09	H: 361d-373-410	P: 201-273-308+313-391-501
Oxadixyl	77732-09-3	07	H: 302	P: 264-270-301+312-330-501
Oxamyl	23135-22-0	06, 09	H: 300-312-330-411	P: 260-273-280-284-301+310
Oxydemeton-methyl	301-12-2	06, 09	H: 301-311-400	P: 273-280-301+310-312
Paclobutrazol	76738-62-0	02, 07, 08	H: 228-302-361	P: 210-280-301+312+330-370+378
Paraoxon	311-45-5	06, 09	H: 300-310-330-400	P: 260-264-273-280-284-302+350
Paraoxon-Methyl	950-35-6	06	H: 300	P: 264-270-301+310-321-405-501
Penconazole	66246-88-6	07, 08, 09	H: 302-361d-410	P: 201-273-301+312-330-308+313-391-501
Pencycuron	66063-05-6	06, 09	H: 331-410	P: 261-321-311-304+340-405-501
Pentanochlor	2307-68-8	09, 07	H: 315-319-335-410	P: 280-261-305+351+338-321-405-501
Phenothrin	26002-80-2	07, 09	H: 302-312-332-410	P: 273-280-501
Phenthoate	2597-03-7	07, 09	H: 312-302-410	P: 260-273-280-284-310-501
Phorate sulfone	2588-04-7	02, 08, 09, 07	H: 225-315-336-304-410	P: 280-201-301+310-303+361+353-405-501
Phorate sulfoxide	2588-03-6	02, 06, 08, 09	H: 225-301+311+331-370-411	P: 280-210-301+310-303+361+353-405-501
Phosalone	2310-17-0	06, 09	H: 301-312-332-317-410	P: 273-280-301+310-501
Phosfolan	947-02-4	06	H: 300+310	P: 262-270-301+310-302+352-330-501
Phoxim	14816-18-3	08, 07, 09	H: 302-317-361f-410	P: 273-280-501

Picoxystrobin	117428-22-5	07, 09	H: 319-332-400	P: 273-305+351+338
Piperonyl butoxide	51-03-6	09	H: 410	P: 273
Pirimicarb	23103-98-2	06, 08, 09	H: 301-331-317-351-410	P: 273-501
Pirimicarb, Desmethyl-	30614-22-3	06, 08, 09	H: 301+331-317-351-410	P: 280-261-301+310-321-405-501
Pirimiphos-ethyl	23505-41-1	06, 09, 07	H: 301-312-410	P: 280-301+310-321-312-405-501
Pirimiphos-methyl	29232-93-7	07, 09	H: 302-410	P: 273-501
Prochloraz	67747-09-5	07, 09	H: 302-410	P: 273-501
Profenofos	41198-08-7	07, 09	H: 332-312-302-410	P: 273-280-501
Prometryn	7287-19-6	07, 09	H: 332-400	P: 273
Propanil	709-98-8	07, 09	H: 302-400	P: 273
Propaquizafop	111479-05-1	07	H: 332	P: 280-261-305+351+338-321-304+340-501
Propargite	2312-35-8	06, 05, 08, 09	H: 331-315-318-351-410	P: 261-273-280-305+351+338-311-501
Propetamphos	31218-83-4	06, 09	H: 301-410	P: 273-301+310-501
Propiconazole I	60207-90-1	07, 09	H: 302-317-410	P: 273-280-501
Propoxycarbazone	181274-15-7	09	H: 410	P: 273-391-501
Propyzamide	23950-58-5	08, 09	H: 351-410	P: 273-281-501
Proquinazid	189278-12-4	08, 09	H: 351-410	P: 273-501

Prosulfuron	94125-34-5	09, 07	H: 302-410	P: 273-264-270-301+312-330-501
Pyraclostrobin	175013-18-0	06, 09	H: 331-315-410	P: 261-273-311-501
Pyraflufen-Ethyl	129630-19-9	09	H: 410	P: 273-391-501
Pyrazophos	13457-18-6	06, 09	H: 301-332-410	P: 273-301+310-501
Pyrethrine	8003-34-7	07, 09	H: 332-312-302-410	P: 273-280-501
Pyridaben	96489-71-3	06, 09	H: 301-331-410	P: 261-273-301+310-311-501
Pyridalyl	179101-81-6	09	H: 410	P: 273-391-501
Pyridaphenthion	119-12-0	07, 09	H: 302-332-411	P: 261-273-301+312-304+340-312-501
Pyridate	55512-33-9	07, 09	H: 315-317-410	P: 273-280-501
PyrifenoX I	88283-41-4	07, 09	H: 302-315-410	P: 280-273-321-301+312-332+313-501
Pyrimethanil	53112-28-0	09	H: 411	P: 273
Pyriproxifen	95737-68-1	09	H: 410	P: 273-501
Quinmerac	90717-03-6	09, 07	H: 319-410	P: 280-273-264-305+351+338-337+313-501
quizalofop-ethyl	76578-12-6	07	H: 302-312-413	P: 280
Rabenzazol	40341-04-6	07	H: 302-315-319-335	P: 280-261-350+351+338-321-405-501
Rimsulfuron	122931-48-0	07	H: 319	P: 280-264-305+351+338-337+313
Rotenone	83-79-4	06, 09	H: 301-315-319-335-410	P: 261-273-301+310-305+351+338-501
Sebuthylazine	7286-69-3	08, 09, 07	H: 317-373-411	P: 260-273-280-321-333+312-501

Simazine	122-34-9	08, 09	H: 351-410	P: 273-281-501
Spinetoram (major and minor component)	935545-74-7	08, 09, 07	H: 317-373-410	P: 260-273-280-321-333+313-501
Spinosyn A	131929-60-7	09	H: 410	P: 273-391-501
Spinosyn D	131929-63-0	09	H: 410	P: 273-391-501
Spirodiclofen	148477-71-8	07	H: 317	P: 280
Spiromesifen	283594-90-1	07, 09	H: 317-332-410	P: 273-280-501
Spirotetramat	203313-25-1	08, 07, 09	H: 361fd-317-319-335-410	P: 280
Spirotetramat-enol-Glc	203312-38-3	-	H: 412	-
Spiroxamine I	118134-30-8	07, 09	H: 302+312+332-315-317-410	P: 273-280-501
Sulfentrazone	122836-35-5	07	H: 332-319-412	P: 261-280-304+340-305+351+338-312-501
Sulfosulfuron	141776-32-1	09	H: 410	P: 273-501
Tau-Fluvalinate	102851-06-9	07, 09	H: 302-315-410	P: 273-501
Tebuconazole	107534-96-3	07, 08, 09	H: 302-361d-410	P: 273-281 [
Tebufenozide	112410-23-8	09	H: 411	P: 273
Tebufenpyrad	119168-77-3	06, 08, 09	H: 301-332-373-317-410	P: 261-280-301+310-321-504-501
Tebutam	35256-85-0	07	H: 315-319-412	P: 280-273-305+351+338-321-332+313-501

Teflubenzuron	83121-18-0	09	H: 410	P: 273-391-501
Tembotrione	335104-84-2	07, 09	H: 317-400	P: 273-280
TEPP	107-49-3	06, 09	H: 300-310-400	P: 264-273-280-301+310-302+350-310
Terbumeton	33693-04-8	07, 09	H: 302-410	P: 273-501
Terbuthylazine	5915-41-3	07	H: 302-332	P: 301+312+330
Terbutryn	886-50-0	07, 09	H: 319-400	P: 273-305+351+338-337+313-391
Tetrachlorvinphos (ROL)	961-11-5	07, 09	H: 302-400	P: 273
Tetraconazole	112281-77-3	07, 09	H: 302+332-411	P: 273
Tetramethrin	7696-12-0	09	H: 410	P: 273-501
Thiabendazole	148-79-8	09	H: 410	P: 273-501
Thiabendazole, 5-Hydroxy-	948-71-0	07, 09	H: 302-400	P: 273
Thiacloprid	111988-49-9	06, 08, 09	H: 301-332-336-351-360FD-410	P: 201-261-280-301+330+331+310-308+313
Thiodicarb	59669-26-0	06, 09	H: 301-330-400	P: 260-273-284-310
Thifensulfuron methyl	79277-27-3	09	H: 410	P: 273-391-501
Thiophanate-methyl	23564-05-8	07, 08, 09	H: 332-317-341-410	P: 273-280-501
Tolfenpyrad	129558-76-5	07, 09	H: 302+332-410	P: 273-501
Tralkoxydim	87820-88-0	07, 08, 09	H: 302-351-411	P: 273-301+312-330-391-501
Triadimefon	43121-43-3	07, 09	H: 302-317-411	P: 273-280

Triadimenol	55219-65-3	07	H: 302+332	P: 261-301+312+330
Tri-allate	2303-17-5	07, 08, 09	H: 302-317-373-410	P: 273-280-501
Triasulfuron	82097-50-5	09	H: 410	P: 273-501
Tribenuron-methyl	101200-48-0	07, 09	H: 317-410	P: 273-280-333+313-391-501
Trichlorfon	52-68-6	07, 09	H: 302-317-410	P: 273-280-501
Tricyclazole	41814-78-2	07	H: 302	P: 264-270-301+312-330-501
Tridemorph	24602-86-6	08, 07, 09	H: 302-332-315-360D-410	P: 201-273-308+313-501
Trietazine	1912-26-1	07, 09	H: 302-400	P: 273-301+312-330-391
Trifloxystrobin	141517-21-7	07, 09	H: 317-410	P: 273-280-501
Triflumizole	68694-11-1	08, 07, 09	H: 302-317-360D-373-410	P: 273
Triflumuron	64628-44-0	06	H: 330	P: 260-284-310
Triforine II	26644-46-2	07	H: 332	P: 261-271-304+340-312
Uniconazole	83657-22-1	07, 09	H: 302-411	P: 273-264-270-301+312-330-501
Valifenalate	283159-90-0	-	-	-
Zoxamide	156052-68-5	07, 09	H: 317-319-410	P: 273-280-305+351+338-333+313-391-501

Danksagung

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Jürgen Kuballa und Herrn Dr. Eckard Jantzen für die Möglichkeit diese Arbeit anfertigen zu können. Für das spannende Thema sowie die vielen interessanten Projekte, die mir anvertraut wurden und die lehrreiche Zeit.

Mein ausdrücklicher Dank gilt auch Herrn Dr. Jens Lütjohann für sein großes Engagement, mit der er diese Arbeit wissenschaftlich betreut hat. Herrn Prof. Dr. Rohn danke ich ebenfalls für die wissenschaftliche Betreuung und für die jederzeit wertvolle Unterstützung, auf die ich zählen konnte.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Stefan Neubauer bedanken für seine instrumentelle Ausbildung und wegweisenden Ratschläge und Beistand. Sowie bei Frau Tran Hütgens und Frau Núria Sucarrat möchte ich mich bedanken für unsere schöne, gemeinsame Arbeitszeit mit ihren Höhen und Tiefen.

Auch allen Mitarbeitern bei GALAB Laboratories GmbH danke ich für die freundliche Aufnahme, eine angenehme Zeit in der Firma sowie die Geduld und Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Schreiner und Frau Dr. Franziska S. Hanschen sowie Frau Elke Büsch vom IGZ für das Ermöglichen der Pflanzen-Metabolismusstudien bedanken.

Außerdem ein großes Dankeschön an mein Testpublikum Nele Bredehöft und Theresa Ettenauer, die immer ein offenes Ohr hatten. Und ebenfalls an Carolin und Dominique Lörchner, die sich zum Schluss auf Fehlersuche begaben.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei meinen Freunden und vor allem bei meiner Familie bedanken für ihren dicken Geduldsfaden und die Unterstützung, wohin die Reise auch führen mag.

CV

entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

Eidesstaatliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.

Datum, Unterschrift