

**Bestimmung von hochpolaren  
Pflanzenschutzmittelrückständen mit kleinen  
Molekulargewichten in pflanzlichen Materialien**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

dem Bereich Mathematik und Naturwissenschaften  
der Technischen Universität Dresden

von

Diplomlebensmittelchemikerin Julia Jasak  
geboren am 04.09.1985 in Spremberg

Eingereicht am: 19.07.2018

Tag der Verteidigung: 27.11.2018

Gutachter: Prof. Dr. Karl Speer  
Prof. Dr. Thorsten Reemtsma

## Danksagung

Zum Gelingen dieser Arbeit haben viele Personen beigetragen, bei denen ich mich an dieser Stelle bedanken möchte.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Karl Speer, danke ich für die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit. Besonders bei der Korrektur erhielt ich sehr viele hilfreiche Anmerkungen.

Herrn Dr. Patrick Billian und Herrn Dr. Andreas Stork bin ich sehr dankbar für dieses interessante Thema und für die Ermöglichung der praktischen Durchführung dieser Arbeit bei der Bayer AG.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Ralf M. Schöning für seine stete Unterstützung. Mit viel Engagement ermöglichte er die Prüfung vieler neuer Messtechniken.

Herrn Sven Stuke möchte ich für die wissenschaftlichen Diskussionen und Anregungen danken.

Ein großes Dankeschön gilt den ehemaligen Laboren Billian und Schöning sowie dem einstigen Wasserlabor. Das tolle Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft bei Defekten von Messsystemen waren eine enorme Hilfe für das Gelingen dieser Arbeit.

Frau Annegrit Voigt und Frau Dr. Steffi Liebscher danke ich für die schöne Studienzeit und die wertvollen Lernrunden vor Prüfungen.

Für das gewissenhafte Korrekturlesen dieser Arbeit bin ich Frau Dr. Stefanie Hebestreit und Herrn Dr. Alexander Einfeld sehr dankbar.

Ein herzliches Dankeschön gebührt meinen Freunden, die stets ein offenes Ohr für mich hatten.

Besonderen Dank möchte ich meiner Mama, meinem Onkel und meinen Großeltern aussprechen. Sie haben mich während meines gesamten Lebens immer unterstützt und ermöglichten mir meine Ausbildung. Danke, dass ihr immer an mich geglaubt habt.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Zielstellung</b> .....	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Theoretische Grundlagen von Pflanzenschutzmitteln</b> .....	<b>5</b>
3.1	Begriffsdefinition.....	5
3.2	Forschung und Entwicklung .....	6
3.3	Zulassung und rechtliche Grundlagen für Pflanzenschutzmittel.....	8
<b>4</b>	<b>Matrixeffekte in der LCMS-Analytik</b> .....	<b>11</b>
<b>5</b>	<b>Vorstellung der Zielanalyten und bisherige Analytik</b> .....	<b>12</b>
5.1	Triazol-Metaboliten.....	13
5.2	Difluoressigsäure.....	18
5.3	Ethephon und HEPA .....	20
5.4	Phosphonsäure .....	23
5.5	Glufosinat-Ammonium und dessen Metaboliten .....	25
<b>6</b>	<b>Experimenteller Teil</b> .....	<b>29</b>
6.1	Extraktion .....	29
6.1.1	Test verschiedener Extraktionsmittel.....	29
6.1.2	Test verschiedener Behandlungen während der Extraktion .....	31
6.2	Extraktaufreinigung .....	34
6.2.1	Extraktverdünnung .....	34
6.2.2	Festphasenextraktion .....	34
6.2.2.1	Triazol-Metaboliten.....	38
6.2.2.1.1	Unpolare SPE .....	39
6.2.2.1.2	Kationenaustausch-SPE .....	39
6.2.2.1.3	Anionenaustausch-SPE .....	40
6.2.2.2	DFA.....	41
6.2.2.2.1	Unpolare SPE .....	43
6.2.2.2.2	Kationenaustausch-SPE .....	43
6.2.2.3	Ethephon und HEPA .....	44
6.2.2.3.1	Unpolare SPE .....	45

6.2.2.3.2	Kationenaustausch-SPE .....	46
6.3	Trennverfahren.....	47
6.3.1	Flüssigkeitschromatographie.....	47
6.3.2	Kapillarelektrophorese.....	49
6.4	Detektion .....	50
6.4.1	Tandem-Massenspektrometrie.....	50
6.4.2	Differential-Mobilitäts-Spektrometrie .....	51
6.4.3	Time-of-Flight Detektion .....	53
<b>7</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>54</b>
7.1	Extraktion .....	55
7.1.1	Test verschiedener Extraktionsmittel.....	56
7.1.2	Test verschiedener Behandlungen während der Extraktion .....	65
7.2	Extraktaufreinigung .....	70
7.2.1	Extraktverdünnung .....	71
7.2.2	Festphasenextraktion .....	73
7.2.2.1	Triazol-Metaboliten.....	75
7.2.2.1.1	Unpolare SPE .....	75
7.2.2.1.1.1	Vortests.....	75
7.2.2.1.1.2	Ergebnisse und Diskussion der finalen Durchführung.....	79
7.2.2.1.2	Kationenaustausch-SPE .....	81
7.2.2.1.2.1	Wahl des pH-Wertes für die Probenaufgabe auf die SPE.....	81
7.2.2.1.2.2	Wahl des pH-Wertes für die Elution vom SPE-Material.....	83
7.2.2.1.2.3	Ergebnisse und Diskussion der finalen Durchführung.....	85
7.2.2.1.3	Anionenaustausch-SPE .....	90
7.2.2.1.3.1	Wahl des pH-Wertes für die Probenaufgabe auf die SPE.....	90
7.2.2.1.3.2	Wahl des pH-Wertes für die Elution vom SPE-Material.....	93
7.2.2.1.3.3	Ergebnisse und Diskussion der finalen Durchführung.....	95
7.2.2.2	DFA.....	98
7.2.2.2.1	Unpolare SPE .....	98
7.2.2.2.1.1	Vortests.....	98
7.2.2.2.1.2	Ergebnis und Diskussion der finalen Durchführung.....	100
7.2.2.2.2	Kationenaustausch-SPE .....	101
7.2.2.2.3	Anionenaustausch-SPE .....	102
7.2.2.2.3.1	Wahl des pH-Wertes für die Probenaufgabe auf die SPE.....	102
7.2.2.2.3.2	Wahl des pH-Wertes für die Elution vom SPE-Material.....	103

7.2.2.3	Ethephon und HEPA .....	105
7.2.2.3.1	Unpolare SPE .....	105
7.2.2.3.1.1	Vortests.....	105
7.2.2.3.1.2	Ergebnisse und Diskussion der finalen Durchführung.....	106
7.2.2.3.2	Kationenaustausch-SPE .....	107
7.2.2.3.3	Anionenaustausch-SPE .....	108
7.2.2.3.3.1	Wahl des pH-Wertes für die Probenaufgabe auf die SPE.....	108
7.2.2.3.3.2	Wahl des pH-Wertes für die Elution vom SPE-Material.....	110
7.3	Trennverfahren.....	112
7.3.1	Flüssigkeitschromatographie.....	112
7.3.1.1	Triazol-Metaboliten.....	114
7.3.1.2	DFA.....	119
7.3.1.3	Ethephon und HEPA .....	121
7.3.1.4	Phosphonsäure .....	124
7.3.1.5	Glufosinat und dessen Metaboliten .....	127
7.3.2	Kapillarelektrophorese.....	129
7.3.2.1	Triazol-Metaboliten.....	130
7.3.2.2	Difluoressigsäure.....	133
7.3.2.3	Ethephon und HEPA .....	134
7.3.2.4	Phosphonsäure .....	135
7.4	Detektion .....	136
7.4.1	Tandem-Massenspektrometrie.....	136
7.4.2	Differential-Mobilitäts-Spektrometrie .....	138
7.4.2.1	Triazol-Metaboliten.....	139
7.4.2.2	Difluoressigsäure.....	147
7.4.3	Time-of-Flight Detektion .....	152
7.4.3.1	Triazol-Metaboliten.....	154
7.4.3.2	Interferenz des 1,2,4-Triazol .....	157
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>161</b>
<b>9</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>167</b>
9.1	Verwendete Referenzsubstanzen und Interne Standards .....	167
9.2	Physikalisch-chemische Eigenschaften der Analyten.....	168
9.3	Strukturformeln der Analyten und Internen Standards .....	169
9.4	Anwendungsbeispiele der Analyten .....	173

9.5	Massenspektrometrische Parameter der Analyten.....	178
9.6	Verwendete LC-Parameter.....	181
9.7	Verwendete CE-MS/MS-Parameter .....	186
9.8	Verwendete Differential-Mobilitäts-Spektrometrie Parameter.....	187
9.9	Verwendete QTOF-Parameter .....	188
9.10	Verwendete Formeln .....	189
9.11	Ergebnisse .....	191
9.11.1	Test verschiedener LC-Phasen.....	191
9.11.1.1	Triazol-Metaboliten.....	192
9.11.1.1.1	Aquasil C18.....	192
9.11.1.1.2	Hypercarb.....	194
9.11.1.1.3	Luna SCX.....	196
9.11.1.1.4	ZIC-pHILIC .....	198
9.11.1.2	Difluoressigsäure.....	200
9.11.1.2.1	ZIC-pHILIC .....	200
9.11.1.2.2	Hypercarb.....	200
9.11.1.3	Ethephon und HEPA .....	201
9.11.1.3.1	Hypercarb.....	201
9.11.1.3.2	Luna NH <sub>2</sub> .....	203
9.11.1.4	Phosphonsäure .....	205
9.11.1.4.1	Hypercarb.....	205
9.11.1.5	Glufosinat und dessen Metaboliten .....	206
9.11.1.5.1	Hypercarb.....	206
9.11.1.5.2	ZIC-pHILIC .....	207
9.11.2	Validierung LC-DMS-MS/MS für TDMs .....	209
9.11.3	Validierung LC-DMS-MS/MS für DFA .....	217
9.11.4	Validierung MRM <sup>HR</sup> für TDMs.....	223
<b>10</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>241</b>
<b>11</b>	<b>Versicherung und Erklärung gemäß Promotionsordnung .....</b>	<b>252</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
ALARA	As Low As Reasonably Achievable
amu	Atomare Masseneinheit
Analyt-ISTD	Interner Standard des jeweiligen Analyten
Analyt-Q	Qualifier Ion des jeweiligen Analyten
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
bzw.	beziehungsweise
CE [V]	Collision Energy
CES [V]	Collision Energy Spread
CE	Capillary Electrophoresis
CoV	Compensation Voltage
cps	Counts per Second
CV	Relative Standardabweichung
CXP	Cell Exit Potential
CZE	Capillary Zone Electrophoresis
DFA	Difluoressigsäure
DFG	Deutsche Forschungsgesellschaft
DMS	Differential-Mobilitäts-Spektrometrie
DP	Declustering Potential
ECD	Elektronen-Einfang-Detektor
EG	Europäische Gemeinschaft
EP	Entrance Potential
EPA	United States Environmental Protection Agency
ESI	Electrospray Ionization
ESI <sup>+</sup>	ESI-Verfahren im positiven Ionenmessmodus
ESI <sup>-</sup>	ESI-Verfahren im negativen Ionenmessmodus
EU	Europäische Union
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FID	Flammenionisationsdetektor
FPD	Flammenphotometrischer Detektor
GC	Gaschromatographie
H <sub>2</sub> O	Milli-Q-Wasser
Hac	Essigsäure
HEPA	2-Hydroxyethylphosphonsäure, Metabolit von Ethepon
Hfo	Ameisensäure
HILIC	Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
ICP-MS	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma
ISTD	Interner Standard
JKI	Julius-Kühn-Institut
LC	Flüssigkeitschromatographie
LFGB	Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch
log p <sub>ow</sub>	Logarithmus des Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten

LOQ	Limit of Quantification
Lsgm.	Lösungsmittel
M	Ungeladenes Molekül
M*	Quellenfragment
2-MEE	2-(2-Methoxyethoxy)ethanol
ME	Matrixeffekt in %
MeOH	Methanol
MPPA	3-Methylphosphinico-propansäure
MRL	Maximum Residue Level
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MRM <sup>HR</sup>	Hochaufgelöstes Multiple Reaction Monitoring
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie mittels Tripelquadrupol
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
NAG	N-Acetyl-Glufosinat
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
Nr.	Nummer
PAT	Phosphinothricin-Acetyl-Transferase
PE	Parentequivalent, Rückstand ausgedrückt als Äquivalent des Wirkstoffs
Phosphons.	Phosphonsäure
pKs	Negative dekadische Logarithmus der Säurekonstante
PP	Polypropylen
PSM	Pflanzenschutzmittel
QMI	Quasimolekülion
QTOF	Quadrupol-Quadrupol-TOF-System
QuEChERS	Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe
RP	Reversed Phase
RT	Retentionszeit
S/N	Signal-Rausch-Verhältnis
SPE	Festphasenextraktion
SV	Separation Voltage
t <sub>1/2</sub>	Halbwertszeit
TAA	Triazolyl-essigsäure
Tab.	Tabelle
TAL	Triazolyl-alanin
TDMs	Triazole Derivative Metabolites
TLA	Triazolyl-milchsäure
TOF	Flugzeit, Time of Flight
TRZ	1,2,4-Triazol
u. a.	unter anderem
UBA	Umweltbundesamt
UV	Detektion mittels Ultraviolettem Licht
v. a.	vor allem
v/v	Angabe der Volumenanteile
WF	Wiederfindung in %
WHO	World Health Organization
$\bar{x}$	Mittelwert

## 1 Einleitung

Pflanzenschutzmittel sind Substanzen, die in der Landwirtschaft, im Obst- und Gemüseanbau sowie in vielen Kleingärten Anwendung finden. Ziel dieser Anwendung ist es, die Kulturpflanzen und Erntegüter vor Schädlingen zu schützen und somit Verluste an Erntegütern und Vorräten zu minimieren [1]. Derzeit sind 285 Wirkstoffe und über 1500 Pflanzenschutzmittel in Deutschland zugelassen (Stand Januar 2018, [2]). Allein in der Landwirtschaft gibt es etwa 240 bedeutende Schaderreger, von denen eine Bedrohung für Pflanzen ausgeht. Dazu gehören zum Beispiel Blattläuse, Spinnmilben, Rost- und Mehltau-Pilze sowie Viren und Bakterien. Hinzu kommen Unkräuter, die den Nutzpflanzen Nährstoffe, Wasser und Licht entziehen können [3]. Der Einsatz von Pflanzenschutzmitteln ist jedoch nur zugelassen, wenn keine Gefahr für Mensch, Tier und Umwelt besteht [1]. Dabei geht die Gefahr nicht nur vom Wirkstoff selbst aus, sondern auch dessen Abbauprodukte („Metaboliten“) können ein Risiko darstellen.

Um schädliche Wirkungen ausschließen zu können, sind Hersteller von Pflanzenschutzmitteln verpflichtet, diese ausgiebig zu erforschen [5]. Hierzu gehört nicht nur die Ermittlung toxikologischer und ökotoxikologischer Auswirkungen, sondern auch die Erforschung des Abbauverhaltens sowie der Rückstandssituation dieser Substanzen und ihrer Metaboliten nach sachgerechter Anwendung [1]. Letzteres bedarf Analysemethoden, mit deren Hilfe die Rückstände des Wirkstoffes und dessen Metaboliten ermittelt werden können. Dabei werden nicht nur alle Teile der Pflanzen und daraus hergestellte Lebensmittel analysiert. Es müssen zusätzlich Umweltproben, wie Boden, Wasser und Luft untersucht werden. Handelt es sich bei den angebauten Pflanzen um Futtermittel, so muss sichergestellt werden, dass keine bedenklichen Rückstände in Lebensmitteln tierischer Herkunft vorliegen. Die typischerweise eingesetzten Analyseverfahren beruhen zumeist auf einer chromatographischen Trennung und der Detektion mittels UV, FID oder Massenspektrometer. Die Art der Trennung und Detektion hängt dabei sehr stark von den chemischen und physikalischen Eigenschaften der Analyten ab.

Nicht nur bei der Zulassung von Pflanzenschutzmitteln ist die Rückstandsanalytik von Bedeutung. Im Rahmen der amtlichen Lebensmittelüberwachung dient sie der Aufdeckung von Höchstmengenüberschreitungen oder dem Nachweis verbotener Anwendungen [4]. Um mögliche Risiken frühzeitig zu erkennen, werden Lebens- und Futtermittel durch das Monitoring-Programm langfristig auf Rückstände von Pflanzenschutzmitteln untersucht [89, LFGB §§50-52].

In Deutschland werden jährlich über 15.000 Lebensmittelproben auf das Vorkommen von Pflanzenschutzmittelrückständen behördlich geprüft. Dazu zählen sowohl die Proben die im Rahmen des Monitoring-Programmes als auch die Proben die im Bereich der amtlichen Lebensmittelüberwachung untersucht werden [2].

Aufgrund der hohen Probenzahlen und der Wirkstoffvielfalt sind Multimethoden unerlässlich geworden.

## 2 Zielstellung

In Deutschland gibt es drei bedeutsame Multimethoden zur Untersuchung von Pflanzenschutzmitteln in Lebens- und Futtermitteln: die S19-Methode der Deutschen Forschungsgesellschaft (DFG-Methode S19), die Methode nach Klein und Alder und die QuEChERS-Methode. Doch es gibt Wirkstoffe und vor allem Abbauprodukte, die mit diesen Methoden nicht erfasst werden können. Grund hierfür ist in ihren chemischen Eigenschaften zu suchen. Hierbei handelt es sich u. a. um Substanzen, die eine sehr hohe Polarität und ein kleines Molekulargewicht aufweisen. Um diese in verschiedenen Matrices zu bestimmen, wurden Einzelanalysenmethoden entwickelt. Jedoch weisen diese Schwächen auf. So sind sie zum Teil sehr arbeits- und zeitaufwendig. Mitunter besitzen die Methoden keine ausreichende Spezifität und sind dadurch anfällig für Matrixinterferenzen, die zu falschen Analyseergebnissen führen können.

Ziel dieser Arbeit ist es, neue Ansätze für die Analytik kleiner und hochpolarer Pflanzenschutzmittelrückstände in den unterschiedlichsten pflanzlichen Materialien zu entwickeln. Dabei sollen die Präzision der Analyseergebnisse, der Arbeitsaufwand, sowie die Robustheit der Methoden und die daraus resultierende Übertragbarkeit für die Routineanalytik berücksichtigt werden.

Folgende Schritte einer Analysenmethode stehen zur Diskussion:

- Die Extraktion
- Die Extraktaufreinigung
- Die Derivatisierung
- Das Messsystem: Trennung und Detektion

Bei der Extraktion soll geprüft werden, ob durch die Wahl des Extraktionsverfahrens ein Einfluss auf die Mitextraktion von Matrixkomponenten genommen werden kann, ohne dabei eine schlechtere Extraktionseffizienz des Analyten zu erhalten.

Sofern möglich, gilt es den Extrakt unaufgereinigt bzw. lediglich verdünnt zu vermessen. Für den Fall von interferierenden Matrixkomponenten sollen aber auch Aufreinigungsprozeduren untersucht werden.

Derivatisierungsschritte sind in der Regel nicht nur zeit- und kostenintensiv, sondern können auch störanfällig gegenüber verschiedensten Matrixbestandteilen sein. Daher wird die Derivatisierung von Analyten zunächst nicht weiter berücksichtigt.

Aufgrund der hohen Polarität der Analyten ist die Flüssigkeitschromatographie gegenüber der Gaschromatographie das effektivere Trennverfahren. Aber auch die Kapillarelektrophorese, welche bisher kaum in der Rückstandsanalytik zum Einsatz kam, soll als Trennverfahren einbezogen werden.

In der Rückstandsanalytik haben sich massenselektive Detektionssysteme durchgesetzt. Diese ermöglichen eine Detektion anhand des Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses. Neben den gängigen Tripelquadrupolgeräten sollen auch mit hochauflösenden MS-Systemen, die zunehmend an Bedeutung gewinnen, Versuche durchgeführt werden. Zusätzlich soll ein neues System, die Differential-Mobilitäts-Spektrometrie (DMS), getestet werden.

### 3 Theoretische Grundlagen von Pflanzenschutzmitteln

#### 3.1 Begriffsdefinition

Pflanzenschutzmittel sind Stoffe, die dazu dienen „Pflanzen oder Pflanzenerzeugnisse vor Schadorganismen zu schützen [...], in einer anderen Weise als Nährstoffe die Lebensvorgänge von Pflanzen zu beeinflussen (z. B. Wachstumsregulatoren), Pflanzenerzeugnisse zu konservieren [...], unerwünschte Pflanzen oder Pflanzenteile zu vernichten [...], ein unerwünschtes Wachstum von Pflanzen zu hemmen oder einem solchen Wachstum vorzubeugen“ [5, Kapitel 1 Artikel 2 (1)].

In Abhängigkeit von ihrem Anwendungsgebiet sind sie in verschiedene Gruppen eingeteilt. In Tab. 1 sind die unterschiedlichen Anwendungsbereiche und die entsprechenden Zielorganismen aufgeführt. Mit einem Inlandsabsatz von fast 18 000 Tonnen stellen die Herbizide dabei einen sehr bedeutsamen Anwendungsbereich dar, gefolgt von den Fungiziden mit rund 10 500 Tonnen (Stand 2011, [6]).

Tab. 1: Typische Anwendungsbereiche von Pflanzenschutzmitteln

Anwendungsbereich	Zielorganismus
Herbizide	Unkräuter
Fungizide	Pilze und Pilzsporen
Insektizide	Insekten
Akarizide	Milben / Spinnentiere
Rodentizide	Nagetiere
Nematizide	Nematoden (Fadenwürmer)
Molluskizide	Weichtiere / Schnecken
Bakterizide	Bakterien

### 3.2 Forschung und Entwicklung

Die Entwicklung eines Pflanzenschutzmittelwirkstoffes ist ein sehr aufwendiger Prozess. Im Durchschnitt dauert es 10 Jahre, bis ein neues Produkt auf den Markt gebracht werden kann.

In Abb. 1 ist der Entwicklungsprozess schematisch dargestellt. Dieser beginnt mit der Synthese von neuen Verbindungen. Dabei eignet sich nur jede 100.000ste zu einem neuen Pflanzenschutzmittelwirkstoff. Zur Untersuchung der Wirkung neu synthetisierter Substanzen werden zunächst Screening-Tests an sogenannten „Targets“ durchgeführt, bevor Tests an kompletten Organismen folgen. Unter „Targets“ versteht man Proteine, die lebenswichtig für den zu bekämpfenden Organismus sind. Dies sind zum Beispiel bedeutsame Stoffwechsellzyme. Nur Substanzen, die im Screening-Prozess diese ausgewählten Proteine in ihrer Aktivität hemmen, werden am komplexen biologischen System getestet [7]. Werden neue Verbindungen mit gewünschter Wirkung gegen Schadorganismen gefunden, so muss nun ihr Verhalten im Boden, im Wasser, in der Luft, in Pflanzen und bei Tieren untersucht werden. Hierzu gehören u. a. das Abbauverhalten sowie die Rückstandssituation dieser Substanzen und ihrer Abbauprodukte in der Umwelt zu erforschen. Des Weiteren muss eine toxikologische Bewertung durchgeführt werden sowie die Ermittlung ökotoxikologischer Auswirkungen, wie zum Beispiel die Wirkung auf Nutzorganismen und die Anreicherung von Rückständen in der Nahrungskette. Nur wenn die neuen Wirkstoffe sicher und umweltverträglich sind, erhalten sie später eine Marktzulassung [1, 5].

Jahre	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Mio. Euro
Wirkstoff	Synthese											66
Chemie		Kilolabor										
Formulierung			Entwicklung									
						Verfahrensentwicklung						
Forschung												65
Biologie		Screening Labor / Gewächshaus										
Entwicklung			Kleinparzellen-Versuche									
Abbau und Rückstände												69
Toxikologie												
Ökotoxikologie												
Mio. Euro		102										200
Substanzen	100 000											98
												1

**Abb. 1: Die Entwicklung eines Pflanzenschutzmittels [1]**

Ist ein neuer Pflanzenschutzmittelwirkstoff gefunden, so muss dieser letztlich noch in eine geeignete Anwendungsform gebracht werden. Außerdem müssen Produktionswege definiert und der Markt in Form von Werbung vorbereitet werden. Pflanzenschutzmittel dürfen jedoch erst vertrieben werden, nachdem sie amtlich zugelassen sind.

### 3.3 Zulassung und rechtliche Grundlagen für Pflanzenschutzmittel

Bevor ein neues Pflanzenschutzmittel marktfähig ist, muss es amtlich zugelassen werden. Die Zulassungspflicht besteht in Deutschland bereits seit 1968. Die Anforderungen für eine amtliche Zulassung sind sehr hoch. Es ist ausführlich zu belegen, dass das Pflanzenschutzmittel wirksam die gewünschten Schadorganismen bekämpft, ohne dabei die Pflanze selbst zu schädigen. Des Weiteren müssen Ergebnisse umfangreicher Studien vorgelegt werden, die die Unbedenklichkeit der Anwendung für Mensch, Tier und Umwelt nachweisen [1].

Die Zuständigkeit der Zulassung ist nicht allein auf nationale Ebene beschränkt, sondern erfolgt seit 1993 mit Inkrafttreten der Richtlinie 91/414/EWG über das Inverkehrbringen von Pflanzenschutzmitteln auf Ebene der Europäischen Union. Mit dieser Richtlinie wurden einheitliche Regelungen über die Zulassung von Pflanzenschutzmittelwirkstoffen festgesetzt. In Deutschland wurde diese Richtlinie durch das Pflanzenschutzgesetz [9] in nationales Recht umgesetzt. Dieses regelt die Anwendung, die Überwachung und die Zulassung von Pflanzenschutzmitteln sowie die Zuständigkeiten der Behörden bei der Zulassung und Überwachung [2].

Im Juni 2011 erfolgte die Ablösung der Richtlinie 91/414/EWG durch die Verordnung (EG) 1107/2009. Die Zuständigkeiten der Wirkstoffprüfung wurden dabei nicht geändert und bestehen weiterhin auf der Basis der Europäischen Union. In Deutschland steuert das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) das Zulassungsverfahren. Diese Behörde ist für das Risikomanagement verantwortlich. Das BVL besitzt das Recht, ein Pflanzenschutzmittel nur in Verbindung mit besonderen Anwendungsbestimmungen und Auflagen zuzulassen und darf eine Zulassung jederzeit ändern oder widerrufen. Unterstützt wird das BVL vom Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), vom Julius-Kühn-Institut (JKI) und vom Umweltbundesamt (UBA). Das BfR ist für die Bewertung des Risikos für Mensch und Tier, das vom Pflanzenschutzmittel ausgeht, verantwortlich. Das JKI beurteilt die Wirksamkeit, die Pflanzenverträglichkeit und den Nutzen des jeweiligen Pflanzenschutzmittels.

Die möglichen Auswirkungen des Pflanzenschutzmittels auf die Umwelt werden vom UBA bewertet. Neben den Bewertungsberichten dieser drei Institutionen hört das BVL auch noch einen unabhängigen Sachverständigenausschuss an, bevor es eine Zulassungsentscheidung trifft [2].

Der Vorgang des Zulassungsverfahrens ist in Abb. 2 graphisch dargestellt.

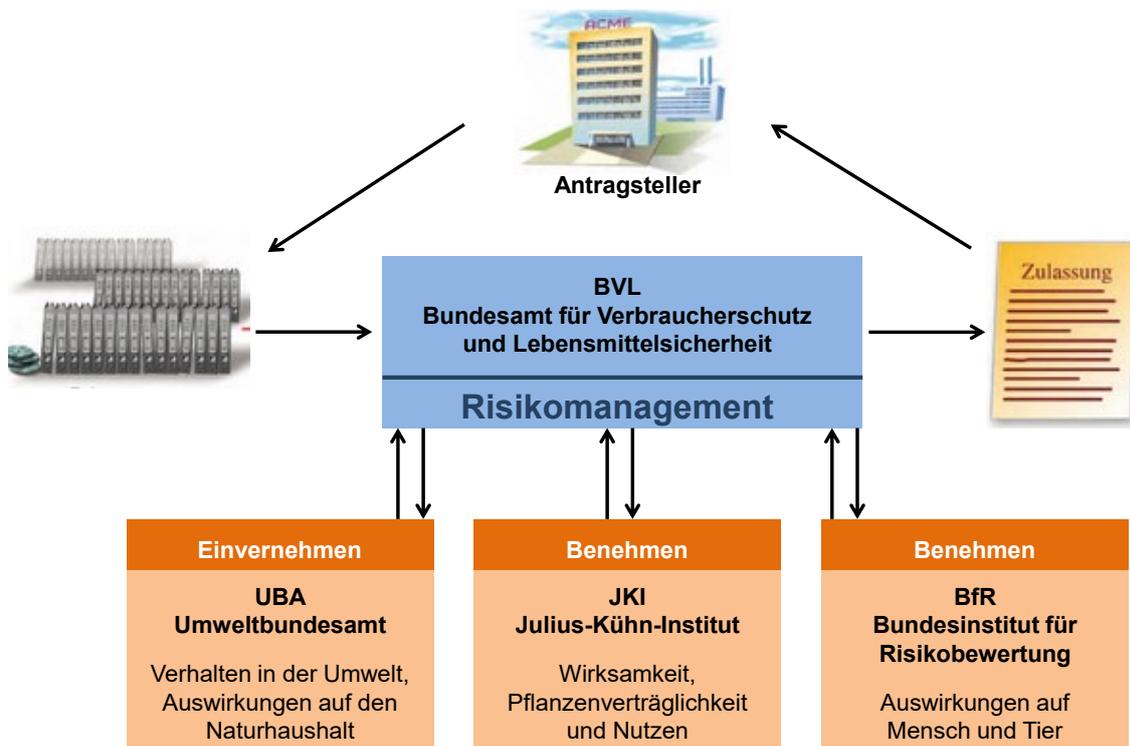


Abb. 2: Zuständigkeiten der Wirkstoffzulassung in Deutschland [1]

Im Falle einer Zulassung eines neuen Wirkstoffes gelangt dieser auf die sogenannte Positivliste. Nur Wirkstoffe, die sich auf dieser EU-weiten Positivliste befinden, dürfen in Pflanzenschutzmitteln eingesetzt werden [2].

Die Gültigkeit einer Zulassung ist auf 10 Jahre beschränkt. Nach dieser Dauer muss jeder Wirkstoff erneut geprüft werden.

Die Zulassung eines Pflanzenschutzmittels ist nur dann möglich, wenn für die vorgesehenen Anwendungsgebiete entsprechende Rückstandshöchstgehalte (MRL: Maximum Residue Level) festgesetzt sind. Unter dem MRL versteht man nach Artikel 3 Abschnitt 2d der VO (EG) 396/2005 [13] die Menge eines Pflanzenschutzmittelwirkstoffes in Milligramm, die in einem Kilogramm eines verkehrsfähigen Lebens- oder Futtermittels maximal enthalten sein darf.

Es handelt sich dabei nicht um einen Grenzwert, ab dem eine Gefährdung der menschlichen Gesundheit besteht, sondern um einen Wert, der die Verkehrsfähigkeit von Lebens- und Futtermitteln regelt [2].

Die Festsetzung des MRLs erfolgt gemäß *Artikel 14 der VO (EG) 396/2005 [13]* auf Grundlage der in den Feld-Rückstandsversuchen ermittelten Rückstände, den Daten zur Toxikologie und den üblichen Verzehrmenen der jeweiligen Erzeugnisse [2]. Dabei wird das Minimierungsprinzip, auch als ALARA-Konzept (As Low As Reasonably Achievable) bekannt, angewandt. Gemeint ist dabei, dass nur so viel an Pflanzenschutzmittel eingesetzt werden soll, wie es für die angestrebte Wirkung notwendig ist, um so den Rückstandsgehalt so gering wie möglich zu halten [3].

Mit der Verordnung (EG) Nr. 396/2005 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 23. Februar 2005 über die Höchstgehalte an Pestizidrückständen in oder auf Lebens- und Futtermitteln pflanzlichen und tierischen Ursprungs fand eine einheitliche Festsetzung des MRLs in der EU statt. Mit dieser Verordnung wurde ein Standardhöchstwert von 0,01 mg/kg eingeführt. Dieser gilt für alle Rückstände in Erzeugnissen, die in Anhang 1 dieser Verordnung aufgelistet sind. Davon ausgenommen sind Rückstände in Erzeugnissen, für die ein spezifischer MRL in Anhang 2 und 3 der genannten Verordnung festgelegt ist [2, 10, 13].

#### 4 **Matrixeffekte in der LCMS-Analytik**

Ein Faktor, der sich in der Rückstandsanalytik auf die Richtigkeit und Präzision von Ergebnissen sehr stark auswirkt, sind Matrixeffekte [14].

Es ist unvermeidbar, dass neben den Analyten auch Komponenten der Matrix extrahiert werden. Diese Komponenten können nachteilige Effekte bei der Bestimmung hervorrufen und stellen daher ein nicht zu unterschätzendes Problem dar. So können sie Einfluss auf das Analytsignal nehmen. Dies geschieht entweder in Form einer Steigerung oder Unterdrückung des Signals, wobei vor allem letzteres beobachtet wird. Der Mechanismus der Matrixeffekte ist noch nicht genau bekannt. Man geht aber davon aus, dass die mit-extrahierten Matrixbegleitstoffe die Effektivität des Ionisierungsprozesses beeinflussen. Dies geschieht entweder durch die Konkurrenz zwischen Analyten und Matrixkomponenten um die Ladungsträger, durch Adduktbildung der Analyten mit Matrixkomponenten oder durch das Vorhandensein nichtflüchtiger Matrixkomponenten. Letztere verhindern die Verkleinerung der Tröpfchenradien, welche Voraussetzung für die Coulomb-Explosion bei der Ionisierung ist [14].

Liegen Matrixeffekte vor, so sollten Maßnahmen zur deren Kompensation vorgenommen werden. Dazu gehören die Verwendung von Matrixstandards als Kalibrierstandards oder der Einsatz von isotopenmarkierten internen Standards.

Es gibt einige Maßnahmen, mit Hilfe derer eine Verminderung bzw. Elimination der Matrixeffekte möglich ist. Dazu gehört die Minimierung des Gehaltes an Matrixkomponenten in der Messlösung oder die Optimierung des Trennverfahrens von Analyten und mit-extrahierten Matrixkomponenten.

## 5 Vorstellung der Zielanalyten und bisherige Analytik

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Analyten handelt es sich um Rückstände von Pflanzenschutzmitteln. Dabei werden sowohl Wirkstoffe als auch Abbauprodukte berücksichtigt. Die Auswahl der Analyten beruht auf ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften. Es werden die Metaboliten der Triazol-Fungizide, Difluoressigsäure, Ethephon und dessen Abbauprodukt, der Metabolit von Fosetyl-Aluminium und Glufosinat einschließlich dessen Abbauprodukte untersucht. Sie alle weisen sowohl eine hohe Polarität als auch ein kleines Molekulargewicht auf. Daraus ergibt sich eine besondere Schwierigkeit in der heutigen Rückstandsanalytik. In Tab. 2 sind alle Analyten dieser Arbeit zusammengefasst.

**Tab. 2: Untersuchte Analyten der vorliegenden Arbeit**

<b>Zielanalyten</b>	
Triazol-Metaboliten:	1,2,4-Triazol Triazolyl-essigsäure Triazolyl-milchsäure Triazolyl-alanin
Metabolit eines neuen Bayerprodukts: Ethephon und Metabolit:	Difluoressigsäure Ethephon HEPA
Metabolit von Fosetyl-Aluminium: Glufosinat und Metaboliten:	Phosphonsäure Glufosinat-ammonium MPPA NAG

Die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Analyten wurden in Tab. 52 Anhang 9.2 zusammengestellt. Die Strukturformeln der Analyten sowie die Strukturen der zugehörigen isotopenmarkierten internen Standards befinden sich im Anhang 9.3. Anwendungsbeispiele der Analyten sind im Anhang 9.4 aufgeführt.

## 5.1 Triazol-Metaboliten

1,2,4-Triazol (TRZ) ist Grundbaustein der Triazol-Fungizide, wie zum Beispiel Triadimefon, Propioconazol und Tebuconazol. Die Triazol-Fungizide inhibieren die Demethylierung bei der Sterolbiosynthese, einem lebenswichtigen Prozess der Pilze [18].

Im Boden zersetzen sich die Triazol-Fungizide unter aeroben Bedingungen zu 1,2,4-Triazol. In Pflanzen wird dieses dann schnell zu Triazolyl-alanin (TAL), -milchsäure (TLA) und -essigsäure (TAA) umgewandelt (siehe Abb. 3) [16]. In Abhängigkeit von der Pflanzenart, zerfallen bis zu 17 % des Wirkstoffes zu TRZ, 0 - 89 % zu TAL und 0 - 76 % zu TAA [17]. Die Bildung von TLA tritt nur zu einem geringen Anteil auf. In der Literatur werden TRZ und dessen Konjugate oft auch als „Triazole Derivative Metabolites“ (TDMs) zusammengefasst.

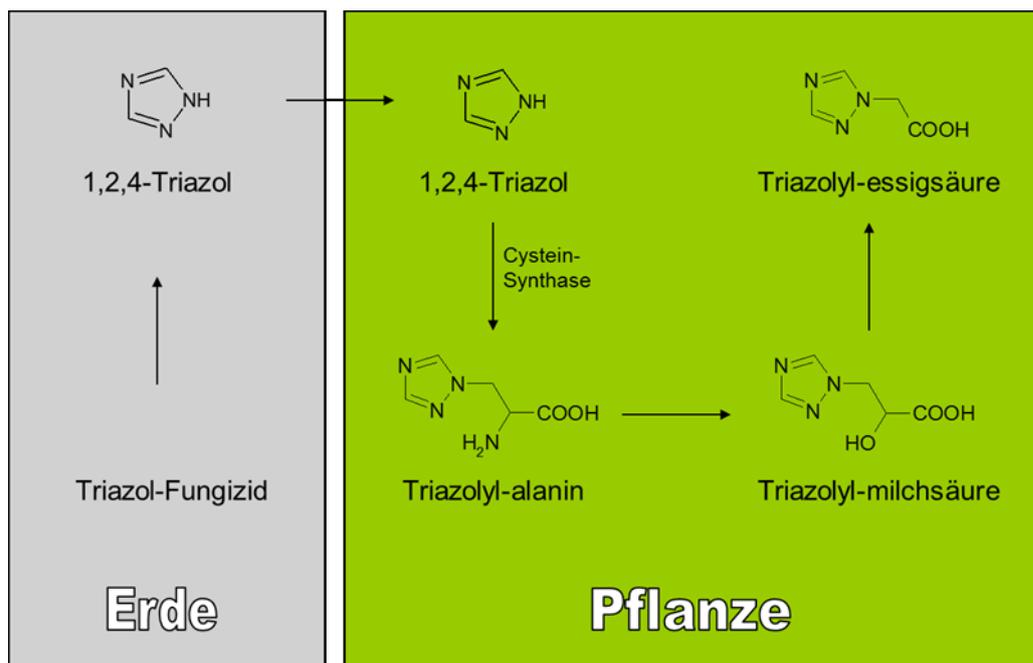


Abb. 3: Abbau von Triazol-Fungiziden

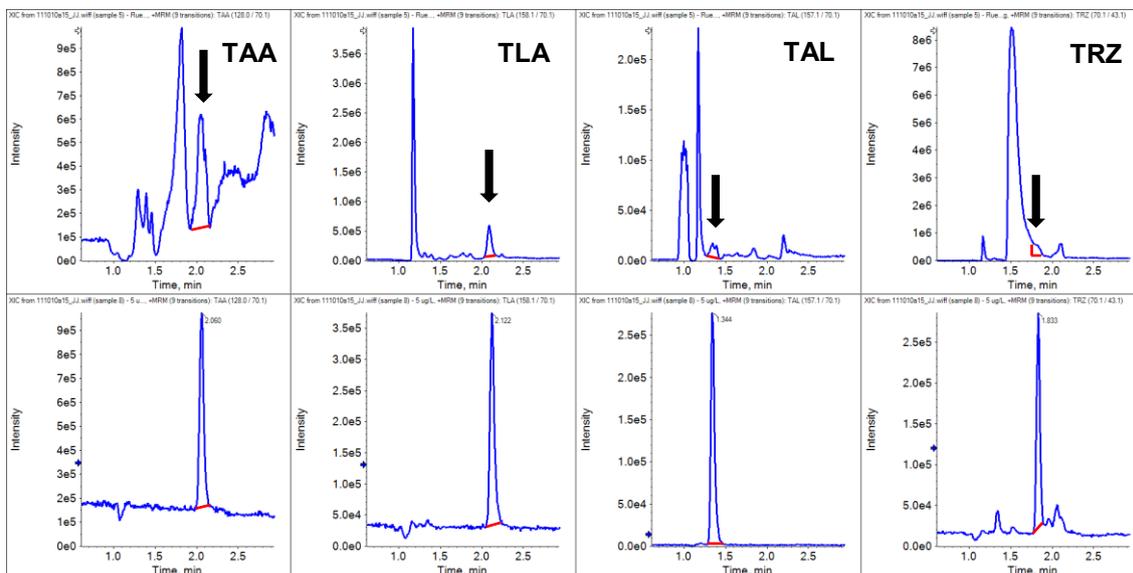
Der Nachweis von TRZ und dessen Konjugate in Wasser, Pflanzenmaterialien und tierischen Produkten weckte die Aufmerksamkeit der U.S. Environmental Protection Agency (EPA), welche daraufhin toxikologische Untersuchungen dieser Komponenten forderte, um so ein mögliches Risiko für die menschliche Gesundheit abschätzen zu können. Bei dem FAO/WHO Meeting von 2008 über Pflanzenschutzmittelrückstände, wurde TRZ bei oraler Exposition als moderat toxische Substanz eingestuft [17]. Der LD<sub>50</sub> bei oraler Exposition in Ratte liegt bei 1648 mg/kg Körpergewicht [19]. TRZ zeigt Effekte auf das zentrale und periphere Nervensystem, das sexuelle Fortpflanzungssystem und das hämatologische System [17]. TAA und TAL weisen bei oraler Exposition ein niedriges toxisches Potential auf mit einem LD<sub>50</sub>-Wert (Ratte, oral) von > 5000 mg/kg Körpergewicht [19]. Für TLA liegen bisher noch keine toxikologischen Informationen vor, die für eine Risikoeinschätzung ausreichend wären.

Um die Exposition des Verbrauchers für die Triazol-Metaboliten besser einschätzen zu können, müssen Hersteller von Pflanzenschutzmitteln im Rahmen eines Zulassungsprozesses auch Informationen zu deren Rückständen in pflanzlichen und tierischen Materialien sowie Umweltproben vorlegen [20].

Ein MRL für die Triazol-Metaboliten liegt noch nicht vor. Grund hierfür ist, dass auf EU-Ebene noch keine Entscheidung getroffen wurde, wie mit den Triazol-Metaboliten bezüglich ihrer Risikoeinschätzung weiter verfahren werden soll. Sie sind auch noch nicht Bestandteil der Rückstandsdefinitionen von Triazol-Fungiziden, da sie nicht ausreichend spezifisch für diese Wirkstoffe sind. So kann nicht mit Gewissheit gesagt werden, dass ausschließlich das angewandte Triazol-Fungizid die Quelle für die Kontamination von Pflanze, Tier und Umwelt darstellt [21].

Da kein Grenzwert für die Triazol-Metaboliten vorliegt, wird in dieser Arbeit der Standardhöchstwert von 0,01 mg/kg der Verordnung (EG) Nr. 396/2005 als Bestimmungsgrenze gewählt, die mindestens bei der Analytik der Triazol-Metaboliten erreicht werden muss.

Die hohe Polarität und das geringe Molekulargewicht der Triazol-Metaboliten machen ihre qualitative und quantitative Analyse in pflanzlichen Materialien schwierig. In der Routineanalytik hat sich für eine Vielzahl von Pflanzenschutzmitteln die direkte Vermessung des verdünnten Rohextraktes mittels Flüssigkeitschromatographie und anschließender Tripelquadrupol-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) als Standard durchgesetzt. Das führt aber im Falle der Triazol-Metaboliten zu unbefriedigenden analytischen Ergebnissen. Die erhaltenen LC-MS/MS-Chromatogramme sind charakterisiert durch einen hohen chemischen Untergrund. Zusätzlich sind die Signale der Analyten zum Teil durch Interferenzsignale von mit-extrahierten Matrixkomponenten überlagert. Die daraus resultierenden quantitativen Ergebnisse sind zum Teil nicht ausreichend reproduzierbar. Es besteht zudem das Risiko falsch positiver Ergebnisse und die Bestimmungsgrenze von 0,01 mg/kg wird nicht für alle Triazol-Metaboliten erreicht. In Abb. 4 werden zur Veranschaulichung Beispielchromatogramme von Futterrübe gezeigt, bei denen die Schwierigkeit der Analytik sichtbar ist.



**Abb. 4: TDMs 0,01 mg/kg in Rübe (oben) und 5 ng/ mL in Lösungsmittel (unten)**

Schermerhorn et al. entwickelten eine Methode zur Analyse von TRZ, TAA und TAL in Pfirsich, Apfel, Mehl und Wasser mittels SPE-Aufreinigung [22]. Diese Prozedur ist sehr zeitaufwendig und erbringt hinsichtlich der Spezifität keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Trotz der zusätzlichen Aufreinigung liegt zum Teil immer noch ein hoher chemischer Untergrund vor und Interferenzen können dadurch auch nicht vollständig eliminiert werden. Als Beispiel hierfür wird in Abb. 5 TRZ in Apfel gezeigt. Die Methode ist auch nicht auf alle Matrices gleich gut anwendbar. In Abb. 6 zeigt sich bei dem internen Standard des TAL, dass eine eindeutige Auswertung des Analytsignals in Apfel möglich ist. In Pfirsich hingegen wird das Signal durch Matrixinterferenzen überlagert und kann für eine zuverlässige, quantitative Auswertung nicht mehr verwendet werden.

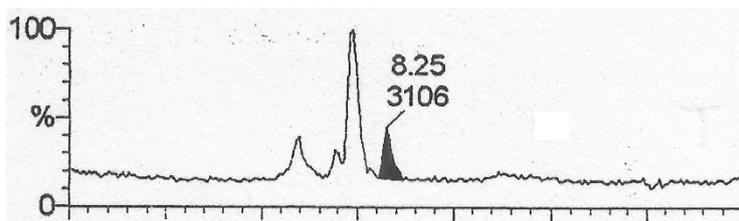


Abb. 5: 0,025 mg/kg TRZ in Apfel, Schermerhorn et al. [22]

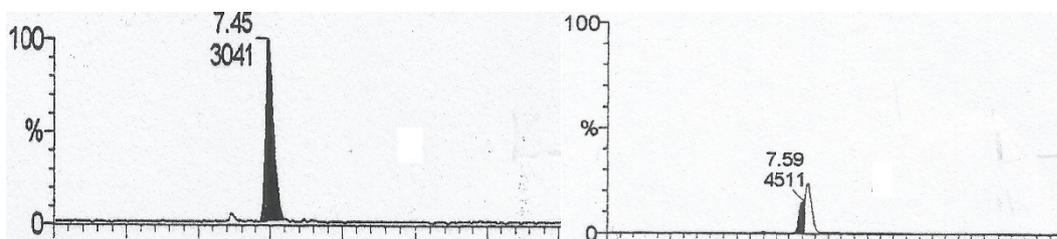
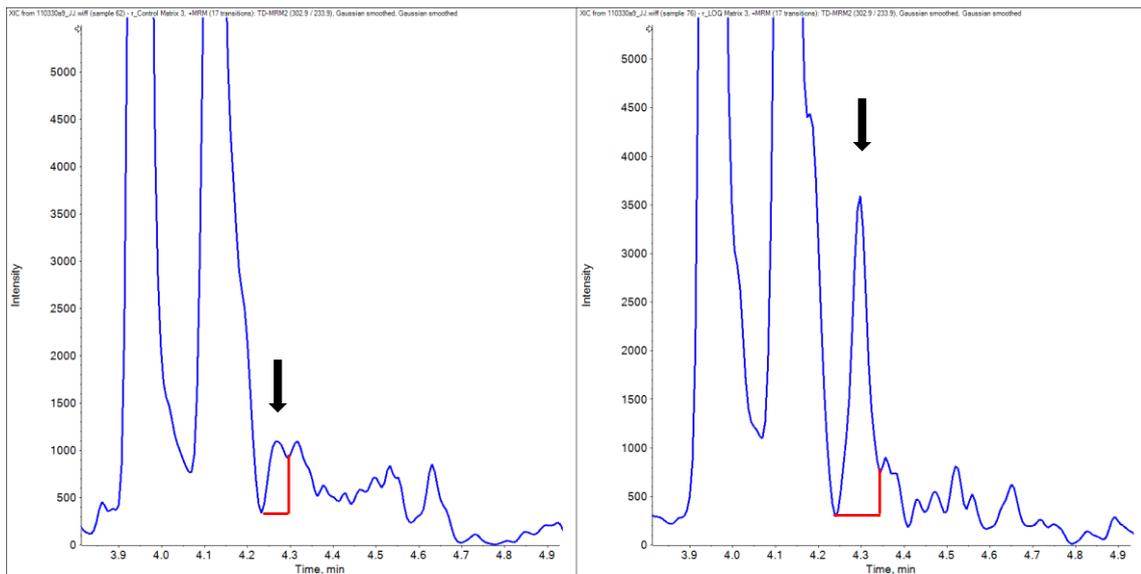


Abb. 6: TAL-ISTD in Apfel (links) und in Pfirsich (rechts), Schermerhorn et al. [22]

*Philipowski et al.* entwickelten eine Methode zur Bestimmung der Triazol-Metaboliten nach Derivatisierung [23]. Diese Methode basiert auf der Arbeit von *Westberg* [24]. Hierbei wird TRZ nach Dansylierung, TAA nach Veresterung mit Butanol und TAL nach Veresterung mit Butanol und anschließender Acetylierung mit Heptafluorbuttersäureanhydrid analysiert [23]. Die Derivatisierung ist sehr aufwendig und teuer. Des Weiteren erfordert sie ein gewisses Maß an Erfahrung beim Laborpersonal, um eine Reproduzierbarkeit zu gewährleisten.

Auch die Derivatisierungsmethode ist nicht auf alle Matrizes gleich gut anwendbar, wie in Abb. 7 beispielhaft dargestellt ist. Obwohl der Brokkoli frei von Triazolrückständen ist, erkennt man bereits in der Kontrolle ein Signal welches zur gleichen Zeit eluiert wie Triazol-dansyl. Dieses Störsignal entspricht ca. 30 % der Peakfläche von Triazol-dansyl bei 0,01 mg/kg Rückstand. Somit hat diese Interferenz Einfluss auf die quantitative Analyse und kann zu falsch-positiven Ergebnissen führen.



**Abb. 7: Brokkoli Kontrolle (links) und 0,01 mg/kg TRZ-dansyl in Brokkoli (rechts)**

## 5.2 Difluoressigsäure

Difluoressigsäure (DFA) ist Metabolit eines neuen Insektizids der Bayer CropScience AG, welches sich aktuell noch in der Entwicklung befindet.

Da derzeit noch kein Grenzwert für diesen Wirkstoff vorliegt, wird in dieser Arbeit der Standardhöchstwert von 0,01 mg/kg der Verordnung (EG) Nr. 396/2005 als Bestimmungsgrenze des Ausgangswirkstoffes gewählt. Geht man nun bei dem Ausgangswirkstoff von einem Grenzwert von 0,01 mg/kg aus, so ergibt sich unter Berücksichtigung des prozentualen Umsatzes des Wirkstoffes zu DFA, eine erforderliche Bestimmungsgrenze für DFA von 0,0033 mg/kg.

Für die Bestimmung von DFA in pflanzlichen Materialien sind zum bisherigen Zeitpunkt keine Publikationen bekannt. Es gibt jedoch eine Reihe von Veröffentlichungen, bei denen man sich mit der Analyse von Halogensäuren in den verschiedensten Matrices beschäftigte.

*Wujcik et al.* entwickelten eine Methode zur Analyse von Trifluoressigsäure in Umweltwasserproben. Hier wird Trifluoressigsäure mit 10%iger Schwefelsäure in Methanol derivatisiert und anschließend mittels GC-ECD vermessen [25]. Generell sind Derivatisierungen zeit- und arbeitsaufwendig und dadurch unbeliebt in der Routineanalytik. Im Falle der Derivatisierung in Gegenwart von Schwefelsäure kommt noch der Nachteil hinzu, dass dadurch die Lebensdauer der GC-Säulen verkürzt wird. Neben schwefelsauren Derivatisierungsreagenzien findet man auch andere wie zum Beispiel 1-(Pentafluorphenyl)-diazooethan [26]. Diese alternativen Reagenzien sind jedoch oft karzinogen oder explosiv und somit nicht für den Einsatz in der Routineanalytik geeignet.

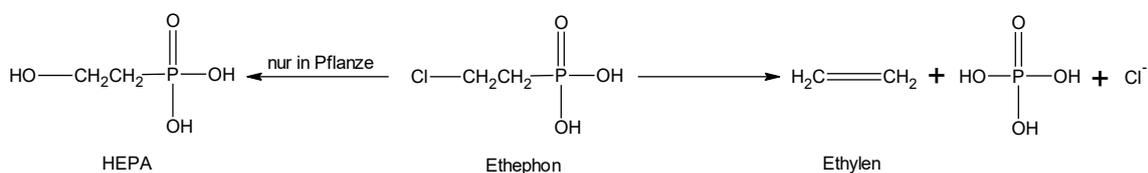
*Hettiarachchi et al.* und *Strege et al.* bestimmen Trifluoressigsäure underivatisiert mittels Kapillarelektrophorese und UV-Detektion [27, 28]. Nachteil dieser Methode ist die schlechte Sensitivität des UV-Detektors.

Neben GC und CE als Trennverfahren, liegen auch Publikationen vor, bei denen man die Flüssigkeitschromatographie (LC) gekoppelt an massenselektiven Detektoren zur Bestimmung von Halogensäuren verwendet. *Rusyn et al.* analysierten Di- und Trichloressigsäure in Serum und Blut mittels eines LC-MS/MS Verfahrens.

Bei den LC-Bedingungen handelt es sich um eine HILIC/Ionenaustausch-Chromatographie, wobei hier eine Säule eingesetzt wurde, deren stationäres Material freie Aminogruppen enthält. Zur besseren Ionisierung der Analyten setzten *Rusyn et al.* 2-(2-Methoxyethoxy)-ethanol den LC-Eluenten zu [20]. Auch bei *Bartlett et al.* kam HILIC/Ionenaustausch-LC-MS/MS zum Einsatz. Hier wurde Dichloressigsäure in Blut, Leber, Niere und Lunge bestimmt [30]. Auffallend in dieser Publikation sind die starken Matrixeinflüsse auf die Ionisierung des Analyten während der MS/MS-Detektion. So liegen bei Blut bis zu 70 % Suppressionseffekte vor [30]. *Chen et al.* analysierten 10 chlorierte und bromierte Essigsäuren in Trinkwasser mittels LC-MS/MS. Dabei testeten Sie zwei verschiedene LC-Bedingungen. Die LC-Chromatographie-Bedingungen mit der HILIC-Phase erbrachten im Vergleich zu einer BetaMax-Acid-Phase die besten Empfindlichkeiten [31].

### 5.3 Ethephon und HEPA

Ethephon, auch 2-Chlorethylphosphonsäure genannt, dient als Wachstumsregulator von Pflanzen durch seine systemischen Eigenschaften. Der Einfluss auf die Pflanzenwachstumsprozesse beruht auf dem Abbau des Ethephons zu Ethylen (siehe Abb. 8) [34]. Die Pflanzen absorbieren das gebildete Ethylen, welches anschließend die Mechanismen im Pflanzenwachstum stört [37, 38]. In Pflanzen absorbiertes Ethephon wird zunächst zu HEPA (2-Hydroxyethylphosphonsäure) abgebaut, bevor es zu Ethylen zerfällt.



**Abb. 8: Abbau von Ethephon in Wasser, Erde, Pflanze und Tier [34]**

Ethephon ist als Wirkstoff mit einer mittleren akuten Toxizität einzustufen. Bei Ratten wurde ein LD<sub>50</sub>-Wert bei oraler Exposition von 1564 mg/kg Körpergewicht ermittelt [38]. Ethephon hemmt die Plasma-Cholinesterase und mit zunehmender Exposition auch die Erythrozyten-Cholinesterase [37, 38]. Mutagene und karzinogene Effekte konnten bei Ethephon nicht festgestellt werden [37].

Im Rahmen der Überwachung wird nur der Wirkstoff Ethephon analysiert. Da Ethephon in Pflanzen jedoch recht schnell zu HEPA abgebaut wird, wird bei Untersuchungen im Rahmen einer Risikobewertung neben dem Wirkstoff Ethephon auch der Metabolit HEPA analytisch erfasst [35]. Der Rückstandshöchstgehalt von Ethephon ist mit der VO (EG) Nr. 396/2005 im Anhang 2 geregelt und beträgt 0,05 mg/kg bei den meisten pflanzlichen Materialien. Für einige wenige pflanzliche Materialien, sind auch höhere Rückstandsgehalte zugelassen. Im Rahmen einer Risikobewertung wird der Rückstand von Ethephon und HEPA insgesamt ermittelt und ausgedrückt als Ethephon (Masse von 144,5 g/mol) [13, 36].

Ein zunächst häufig verwendetes Verfahren zur Bestimmung von Ethephon war die indirekte Quantifizierung über Ethylen [39-41]. Mit Hilfe eines hohen pH-Wertes und/oder erhöhter Temperatur wurde das Ethephon vollständig zu Ethylen zersetzt und dieses mittels GC analysiert. Nachteil dieses Verfahrens ist die geringe Spezifität des Ethylens. Man setzt voraus, dass das gebildete Ethylen ausschließlich vom Ethephon stammt. Jedoch kann dieses auch noch aus verschiedenen anderen Komponenten gebildet werden, deren Vorkommen in komplexen pflanzlichen Matrices nicht unwahrscheinlich ist. Es besteht demnach ein Potential für falsch positive Ergebnisse und die Vorgehensweise ist somit für die Routineanalytik nicht geeignet.

Ein weiteres Verfahren Ethephon durch GC zu analysieren ist die Methylierung mittels Diazomethan [42, 43]. Diazomethan ist jedoch giftig und krebserzeugend. Des Weiteren ist die Derivatisierung auch immer mit einem Aufwand an Zeit und Kosten verbunden. Daher eignet sich auch dieses Verfahren nicht für die Routinebestimmung von Ethephon. Bis auf die Methode von *Takenaka* [43] sind die Publikationen über die Analyse von Ethephon mittels GC in den Hintergrund geraten. Heutzutage findet man Publikationen mit Trennverfahren, bei denen man sich die polaren Eigenschaften des Ethephons zu Nutze macht. So entwickelten *Cai et al.* eine Methode zur Bestimmung von Ethephon in Wasser mittels Ionenchromatographie gekoppelt mit ICP-MS [44]. Das ICP-MS Chromatogramm wurde dabei mit einem  $m/z$  31 (Phosphor) aufgezeichnet. Gefahr bei der ICP-MS ist, dass auch polyatomare Ionen wie  $^{14}\text{N}^{1}\text{H}^{16}\text{O}^+$  oder  $^{15}\text{N}^{16}\text{O}^+$  und andere phosphorhaltige Verbindungen ein Signal im Chromatogramm erzeugen [44], welches bei nicht ausreichender Trennung durch die Ionenchromatographie zu falsch-positiven Signalen führt.

Auch *Dusek et al.* veröffentlichten eine Methode zur Analyse von Ethephon mittels Ionenchromatographie. Sie nutzen jedoch eine massenspektrometrische Detektion mittels eines Tripelquadrupolgerätes [45]. Getestet wurde diese Methode an verschiedenen pflanzlichen Materialien, wobei starke Matrixeffekte beobachtet wurden [45].

*Hooijschur et al.* bestimmten Ethephon in Wasser und pflanzlichen Materialien mittels mikro-Flüssigkeitschromatographie ( $\mu$ LC) und Kapillarelektrophorese [46]. Zur Detektion wurde ein FPD-Detektor verwendet. Die Nachweisgrenze wurde auf 0,1-0,2 mg/kg bestimmt und somit weist die Methode eine nicht ausreichende Empfindlichkeit auf, um pflanzliche Materialien auf einen Rückstandshöchstgehalt von 0,05 mg/kg zu prüfen. *Takenaka* bemängelte an dieser Methode das Vorhandensein von Interferenzen, wodurch diese für die Bestimmung von Ethephon in pflanzlichen Materialien nur bedingt geeignet ist [43].

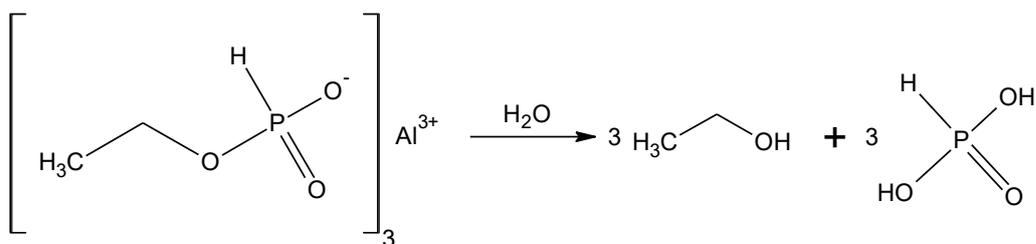
*Hernandez et al.* veröffentlichten eine Methode zur Bestimmung von Ethephon in Apfel, Kirsche und Tomate mittels Ionenpaar-Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit MS/MS Detektion [47]. Hierbei wurde Tetrabutylammoniumacetat als Ionenpaarbildner zum Extrakt zugegeben, wodurch die Retention des hochpolaren Ethepons auf der C18-Phase verbessert wurde.

Bei allen erwähnten Publikationen wurde nur der Wirkstoff Ethephon bestimmt. Dessen Metabolit HEPA wurde nicht berücksichtigt, was jedoch bei einer Risikoeinschätzung gefordert ist.

## 5.4 Phosphonsäure

Die Phosphonsäure, veraltet auch als Phosphorige Säure bezeichnet, ist Metabolit des Fungizides Fosetyl-Aluminium. Hinter dem Trivialnamen Fosetyl-Aluminium verbirgt sich die chemische Substanz Aluminium-tris(ethylphosphonat). In der Regel spricht man von Fosetyl-Aluminium und nicht Fosetyl, da der Wirkstoff in den meisten Formulierungen als Aluminiumsalz eingesetzt wird. Es dient im Pflanzenschutz u. a. zur Bekämpfung von Fäulniskrankheiten verursacht durch verschiedene *Phytophthora* Spezies [18]. Nach Anwendung einer solchen Formulierung wird das Fosetyl-Aluminium schnell von der Pflanze absorbiert und über alle Pflanzenteile, einschließlich Wurzel und Früchte, verteilt. Hier verhindert der Wirkstoff das Keimen der Pilzsporen und blockiert die Entwicklung der Myzelien [18].

In der Pflanze und im tierischen Organismus wird Fosetyl-Aluminium zur Phosphonsäure metabolisiert (siehe Abb. 9). Dies geschieht durch die hydrolytische Spaltung der Esterbindung, wodurch Phosphonsäure und Ethanol entstehen. Sofern das Ethanol sich nicht verflüchtigt, wird es zur Bildung von natürlichen Bestandteilen des pflanzlichen und tierischen Organismus genutzt. Dazu zählen zum Beispiel Glukose, Stärke oder Cellulose [48].



**Abb. 9: Abbau von Fosetyl-Aluminium in Tier und Pflanze [48]**

Die Phosphonsäure weist nur eine geringe akute Toxizität auf. Bei Ratten beträgt der LD<sub>50</sub>-Wert bei oraler Exposition 3624 mg/kg Körpergewicht [48]. Es konnten bisher keine genotoxischen Eigenschaften festgestellt werden und ein karzinogenes Potential wird ebenfalls ausgeschlossen [48].

Da Fosetyl-Aluminium zu einem großen Teil zur Phosphonsäure metabolisiert, wird letztere in der Rückstandsdefinition berücksichtigt. Daher ist der MRL-Wert für Fosetyl-Aluminium definiert als die Summe aus Fosetyl, Phosphonsäure und deren Salzen und wird ausgedrückt als Fosetyl (Molekulargewicht von 110,05 g/mol) [13, 35, 36]. Die MRL-Werte für die verschiedenen pflanzlichen Materialien unterscheiden sich sehr. So beträgt dieser zum Beispiel für Zitrusfrüchte, Gurke, Melone oder Salat 75 mg/kg. Hingegen ist zum Beispiel für Ölsamen, Getreide, Leguminosen oder Nüssen ein Gehalt von 2 mg/kg zugelassen [13, 36]. Der niedrigere MRL-Wert von 2 mg/kg steht jedoch zur Diskussion und wird eventuell in der Zukunft auf 75 mg/kg erhöht.

Neben Fosetyl-Aluminium gibt es noch weitere Quellen, die zu Phosphonsäure-Rückständen auf Pflanzen führen. Hierzu gehören verschiedene Düngerprodukte, welche auf die Blätter der Pflanzen aufgetragen werden. Dies führte in der Vergangenheit zu mehrmaligen MRL-Überschreitungen, die nicht auf die unsachgemäße Anwendung von Fosetyl-Aluminium zurückzuführen waren [49].

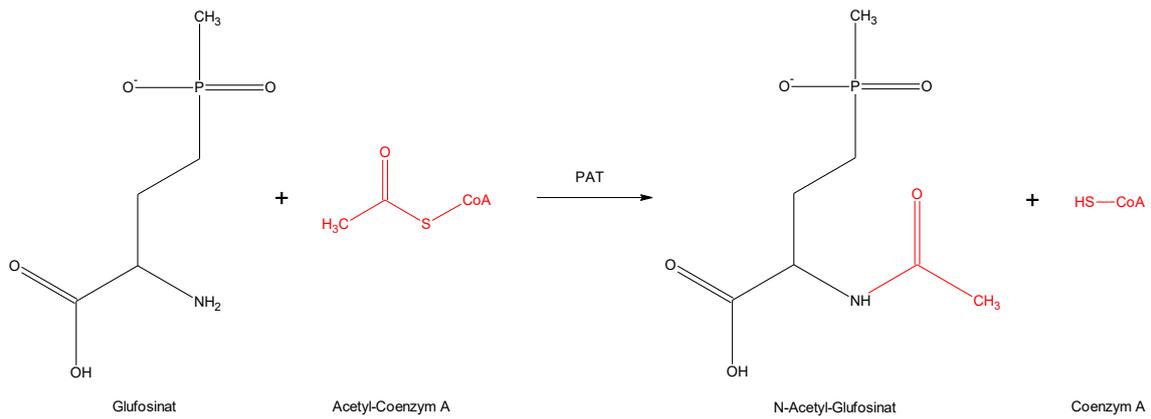
Zur Analytik von Phosphonsäure gibt es nur wenige Publikationen. In vielen Fällen hat man sich zunächst auf den Wirkstoff Fosetyl-Aluminium konzentriert. In den 90iger Jahren beschäftigte man sich mit der Analytik der Phosphonsäure, welche auch Hydrolyseprodukt von militärischen Kampfstoffen ist. *Morin et al.* bestimmten Phosphonsäure in Oberflächenwasser mittels CE-UV (quantitativ) und CE-MS/MS (qualitativ) [50]. Auch *Dreux et al.* führten die qualitative Analyse mittels CE-MS/MS in Oberflächenwasser durch [51]. Für die Quantifizierung verwendeten sie aber die LC-MS/MS-Technik. Mit Ergebnissen im mg/L-Bereich erreichten Sie aber keine ausreichende Empfindlichkeit.

## 5.5 Glufosinat-Ammonium und dessen Metaboliten

Unter dem Namen Glufosinat, auch Phosphinothricin genannt, verbirgt sich die chemische Substanz 2-Amino-4-(hydroxy-methyl-phosphoryl)butansäure. In den Pflanzenschutzmittelformulierungen wird der Wirkstoff in Form des Ammoniumsalzes eingesetzt, weshalb man oft die Bezeichnung Glufosinat-Ammonium findet. Es handelt sich bei diesem Wirkstoff um ein Breitbandherbizid, welches zur Bekämpfung gegen ein- und zweikeimblättrige Pflanzen eingesetzt wird [52].

Die Wirkung beruht auf der Hemmung des Enzyms Glutamin-Synthetase in den Pflanzen. Die Glutamin-Synthetase ist ein sehr wichtiges Enzym bei der Assimilation von Pflanzen. Durch sie wird das für die Zellen toxische Ammoniak zur Synthese der Aminosäure Glutamin verbraucht. Glutamin benötigt die Pflanze u. a. zur Bildung weiterer Aminosäuren und zur Nukleotid-Biosynthese. Ist das Enzym gehemmt, so steigt der Gehalt an Ammoniak und gleichzeitig fällt der des Glutamins in den Pflanzen, was letztendlich zum Tod der Pflanze führt [18, 52, 53]. Glufosinat ist ein racemisches Gemisch. Die Fähigkeit die Glutamin-Synthetase zu hemmen weist jedoch nur das L-*Enantiomer* auf [18].

Als unselektives Herbizid wirkt Glufosinat auch gegen Nutzpflanzen, wie zum Beispiel Reis oder Raps und konnte somit zunächst bei diesen Kulturen nicht zur Unkrautbekämpfung eingesetzt werden. Daher suchte man nach einer Lösung, bei der diese Pflanzen eine Resistenz gegenüber Glufosinat-Ammonium aufweisen. Dies gelang, indem man diese Pflanzen genetisch so veränderte, dass sie das Enzym Phosphinothricin-Acetyl-Transferase (PAT) synthetisieren können. Dieses Enzym acetyliert das Glufosinat zu N-Acetyl-Glufosinat (NAG), so dass die Glutamin-Synthetase-Hemmung ausbleibt und folglich keine negative Wirkung auf die Pflanze mehr vorliegt [18]. Die Inaktivierung von Glufosinat in transgenen Nutzpflanzen ist in Abb. 10 dargestellt.



**Abb. 10: Inaktivierung von Glufosinat in transgenen Nutzpflanzen durch PAT [18]**

Beispiele für die genetisch veränderten Nutzpflanzen sind die Reissorten *Liberty Link 62 (LL 62)* und *Liberty Link 601 (LL 601)*. Der Reis *LL 62* ist in den USA zugelassen und darf angebaut werden. In der Europäischen Union ist dies derzeit noch nicht erlaubt. Ein Antrag auf Zulassung wurde aber gestellt [54].

In Pflanzen wird Glufosinat überwiegend zu 3-Methylphosphinico-propansäure (MPPA) abgebaut. Die Metaboliten 3-Methylphosphinico-butansäure und -ethansäure liegen, wenn überhaupt, nur in vernachlässigbaren Mengen vor und werden bei rückstandsanalytischen Untersuchungen von Pflanzen nicht berücksichtigt [57].

Der MRL-Wert für Glufosinat ist definiert als die Summe aus Glufosinat und dessen Salzen, MPPA und NAG und wird ausgedrückt als Glufosinatäquivalent (Molekulargewicht von 181,13 g/mol) [13, 35, 36]. Auch wenn NAG nur bei transgenen Pflanzen auftritt, ist dieser Metabolit in der allgemeinen Rückstandsdefinition einbezogen. Für die meisten pflanzlichen Materialien liegt ein MRL-Wert der Glufosinatäquivalente von 0,1 mg/kg vor [36].

Glufosinat weist bei Ratten eine mittlere akute Toxizität auf. Bei oraler Exposition beträgt der LD<sub>50</sub>-Wert 1500-2000 mg/kg Körpergewicht. Die akute Toxizität des Wirkstoffes ist jedoch zwischen den Spezies sehr schwankend. So liegt zum Beispiel bei Hunden der LD<sub>50</sub>-Wert bei oraler Exposition im Bereich von 200-400 mg/kg Körpergewicht. Der Metabolit NAG wird im tierischen Organismus wieder zum freien Glufosinat abgebaut und weist daher ähnliches toxisches Potential wie der Ausgangswirkstoff auf. Der LD<sub>50</sub>-Wert bei oraler Exposition in Ratte beträgt 2900 mg/kg Körpergewicht. MPPA zeigt ebenfalls eine mittlere akute Toxizität. In Ratten wurde für diesen Metaboliten LD<sub>50</sub>-Wert bei oraler Exposition im Bereich von 1900-2900 mg/kg Körpergewicht ermittelt. Glufosinat weist ein neurotoxisches Potential auf. Dies ist auf die Ähnlichkeit zur Aminosäure Glutaminsäure zurückzuführen, die im Gehirn als exzitatorischer Neurotransmitter fungiert. Auch der Hauptmetabolit von Glufosinat, MPPA, wirkt neurotoxisch. Glufosinat ist des Weiteren als fruchtschädigend eingestuft. Bei Tierversuchen kam es nach Exposition mit diesem Wirkstoff zu einer erhöhten Rate an Früh- und Fehlgeburten und es wurden Unterentwicklungen von Gehirn und Nieren bei den Nachkommen beobachtet. Genotoxische, mutagene und krebserzeugende Eigenschaften wurden bei Glufosinat bisher nicht festgestellt [52, 53].

Im Jahr 2013 kam es mit der Durchführungsverordnung (EU) Nr. 365/2013 der Europäischen Kommission zur Änderung der Zulassungsbestimmungen von Glufosinat. Grund hierfür liegt in der Toxizität des Wirkstoffes. Es ist nicht auszuschließen, dass dessen Verwendung eine Gefahr für die Gesundheit von Mensch und Tier darstellt. Das BVL setzte die Durchführungsverordnung von Glufosinat in Deutschland um und änderte dessen Zulassungsbestimmungen bis zum November 2013. Für einen Teil der Anwendungsbereiche wurde die Zulassung widerrufen. Für den anderen Teil besteht weiterhin die Zulassung jedoch nur unter Einhaltung neuer und strengerer Anwendungsbedingungen [55]. So dürfen „nur streifenweise oder punktuelle Anwendungen als Herbizid [...] zugelassen werden, und zwar in Dosierungen von höchstens 750 g Wirkstoff/ha (behandelte Oberfläche) je Ausbringung und mit höchstens zwei Ausbringungen pro Jahr“ [56, Anhang Teil A].

Zur analytischen Bestimmung von Glufosinat finden sich in der Literatur verschiedene Ansätze. In den meisten Fällen beschränken sich diese Methoden jedoch nur auf Glufosinat, nicht jedoch auf dessen Abbauprodukte. Zum einen gibt es Verfahren mittels GC. Da Glufosinat aufgrund der chemischen Eigenschaften nicht direkt mittels GC analysierbar ist, ist dessen vorherige Derivatisierung notwendig. Verschiedene Derivatisierungsverfahren sind in der Literatur beschrieben. *Communal et al. [60]* und *Watanabe et al. [61]* verwenden Trimethylorthoacetat und Eisessig zur Bestimmung von Glufosinat in Wasser bzw. pflanzlichen Materialien. *Kataoka et al. [62]* derivatisieren das Glufosinat mittels Isopropylchloroformiat und Diazomethan, wobei diese aufgrund ihrer Toxizität und explosiven Eigenschaften nicht im Alltag eines Routinelabors verwendet werden sollten. Bei *Tsunoda et al. [63]* wird das *tert*-Butyldimethylsilyl-Derivat vom Glufosinat gebildet. Neben GC-Verfahren werden in der Literatur auch LC-Verfahren beschrieben, die eine UV-, Fluoreszenz- oder MS-Detektion nutzen. Auch hier wird Glufosinat nicht direkt analysiert, sondern eine Derivatisierung des Analyten ist erforderlich. Fast ausschließlich wird dafür 9-Fluorenylmethoxycarbonylchlorid (FMOC-Cl) verwendet. Vor allem im Bereich der Wasseranalytik lassen sich Veröffentlichungen mit diesem Verfahren finden. Dazu zählen die Arbeit von *van Zoonen et al. [65]*, *Hogendoorn et al. [66]* oder *Bobeldijk-Pastorova et al. [67]*. Auch mit Hilfe der Kapillarelektrophorese und anschließender UV-, Fluoreszenz- oder MS-Detektion kann Glufosinat bestimmt werden [68-71].

Sehr niedrige Bestimmungsgrenzen können mit Hilfe eines Derivatisierungsverfahrens erreicht werden. *Watanabe et al.* können Glufosinat bis zu 0,01 mg/kg in Obst und Gemüse bestimmen [61]. Im Wasser werden Bestimmungsgrenzen im Bereich von 50-100 ng/ L berichtet [60, 67].

## 6 Experimenteller Teil

### 6.1 Extraktion

Um für alle Versuchsreihen einheitliches Probenmaterial zu nutzen, wurden für die Tests verschiedener Extraktionsverfahren zwei Arten von Probenmaterialien verwendet. Die Gurke wird in der Rückstandsanalytik auf Grund des sehr hohen Wassergehalts von über 95 % als die einfachere der beiden pflanzlichen Matrices angesehen. Hartweizenkorn hingegen ist eine Matrix mit sehr geringem Wasseranteil (< 15 %) und hohem Stärkegehalt (> 50 %). Diese Zusammensetzung führt häufig zu stärkeren Matrixeinflüssen.

Beide Materialien wurden unter Verwendung von Trockeneis homogenisiert und im Gefrierschrank bei ca. -25 °C gelagert.

Über einen Vortest wurde geprüft, dass die gewählten Materialien keine nennenswerten Rückstände der zu testenden Analyten enthielten.

#### 6.1.1 Test verschiedener Extraktionsmittel

Im Rahmen dieser Untersuchung wurden als Extraktionsmittel die drei organischen Lösungsmittel MeOH, ACN und Aceton in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen mit Wasser getestet. Dabei wurden 100 % Wasser als Extraktionsmittel (0/1, v/v), Mischungsverhältnisse von Wasser mit dem organischen Lösungsmittel von 1/4, 1/2, 1/1, 2/1, 4/1 (v/v) und 100 % des organischen Lösungsmittels (1/0, v/v) überprüft. Ein Überblick aller verwendeten Lösungsmittelgemische für die Extraktion ist in Tab. 3 abgebildet.

**Tab. 3: Getestete Lösungsmittelgemische**

	v/v						
MeOH / H <sub>2</sub> O	0/1	1/4	1/2	1/1	2/1	4/1	1/0
ACN / H <sub>2</sub> O	0/1	1/4	1/2	1/1	2/1	4/1	1/0
Aceton / H <sub>2</sub> O	0/1	1/4	1/2	1/1	2/1	4/1	1/0

Je Extraktionsmittel wurden  $5,00 \pm 0,05$  g Pflanzenmaterial in ein 100 mL-Becherglas eingewogen und mit 30 mL Lösungsmittelgemisch versetzt. Das Matrix-Lösungsmittel-Gemisch wurde für ca. 2 Minuten mit einem Ultra Turrax homogenisiert. Anschließend erfolgte eine Filtration mittels Faltenfilter, wobei das Eluat in einen 50 mL-Messkolben übergeführt wurde. Becherglas und Filterkuchen wurden zweimal mit wenigen Millilitern Extraktionsmittel gespült. Der Messkolben wurde anschließend mit dem Extraktionsmittel aufgefüllt. Ein Aliquot von 2,5 mL Rohextrakt wurde im Stickstoffevaporator bis zur Trockne eingengt und der Rückstand wurde mit 1 mL Milli-Q-Wasser gelöst. Zusätzlich wurde je Extraktionsmittel auch ein Blindwert ohne Matrix hergestellt, um so eine Blindwertkorrektur der Chromatogramme vornehmen zu können.

Die so entstandene Messlösung wurde mittels eines Q3-Fullscans vermessen. Die dabei verwendeten HPLC-Bedingungen sind in Tab. 4 und die massenspektrometrischen Parameter des Q3-Fullscans in Tab. 5 aufgelistet. Verwendet wurde ein Agilent 1290 Infinity LC-System mit einem HTC PAL Autosampler und SCIEX API 4000™ MS/MS System.

**Tab. 4: Verwendete HPLC-Bedingungen zum Test verschiedener Extraktionsverfahren**

Säule:	Aquasil C18 (Thermo Fisher Scientific) 150 x 3 mm / 3 µm		
Säulentemperatur:	60 °C		
Injektionsvolumen:	20 µL		
Eluenten:	A) H <sub>2</sub> O + 5 mL/L Ameisensäure B) Acetonitril + 5 mL/L Ameisensäure		
Fluss:	600 mL/min		
Gradient:	[min]	[%] A	[%] B
	0	100	0
	3	100	0
	5	50	50
	6	50	50
	6,01	100	0
	8	100	0

**Tab. 5: Verwendete MS-Parameter zum Test verschiedener Extraktionsverfahren**

Masse [Da]	30 bis 1.000
Zeit [s]	1,0
DP [V]	20 bis 90
EP [V]	10
CXP [V]	5 bis 20
Gas 1/2 [psi]	90/90
Curtain Gas [psi]	40
Quellentemperatur [°C]	600
Ionisierungsspannung [V]	5000

Zur Bestimmung der Extraktionseffizienz wurden die Pflanzenmaterialien noch ein weiteres Mal eingewogen und vor Zugabe des Extraktionsmittels mit Standardlösung versetzt, um somit dessen Wiederfindung zu ermitteln. Der daraus resultierende Rückstand der untersuchten Analyten entsprach hierbei dem 10-fachen der erforderlichen Bestimmungsgrenze. Um präzise Werte für die Extraktionseffizienz zu erhalten, wurde die Wiederfindung jedes Analyten bei jedem Extraktionsmittel dreifach bestimmt. Es wurden die gleichen LC-Bedingungen wie bei den undotierten Matrizes verwendet. Die massenspektrometrischen Parameter befinden sich im Anhang 9.5. Für eine bessere Richtigkeit der ermittelten Wiederfindungen wurden eventuell vorhandene Matrixeffekte durch isotoopenmarkierte interne Standards korrigiert. Im Falle der Phosphonsäure mussten Matrixstandards genutzt werden, da ein isotoopenmarkierter interner Standard nicht verfügbar war.

### 6.1.2 Test verschiedener Behandlungen während der Extraktion

Für die Untersuchung verschiedener Behandlungen wurden jeweils  $5,00 \pm 0,05$  g Pflanzenmaterial in ein 100 mL-Becherglas eingewogen und mit 30 mL Extraktionsmittel versetzt. Zur besseren Vergleichbarkeit der Extraktionsverfahren mittels Q3-Fullscans wurde für alle Analyten das gleiche Extraktionsmittel MeOH / H<sub>2</sub>O (1/1, v/v) verwendet. Die Ermittlung der Wiederfindungen zur Überprüfung der Extraktionseffizienz erfolgte mit dem jeweils radiovalidierten Extraktionsmittel (siehe Tab. 8).

Es wurden folgende 4 Extraktionsverfahren untersucht:

- a) 2 min Homogenisierung mit einem Ultra Turrax (TL5 basic, IKA Labortechnik) bei einer Leerlaufdrehzahl von 9500 [Bayer CropScience AG]
- b) 15 min Horizontalschüttler (SM 30, Edmund Bühler GmbH) bei 125 Schüttler pro Minute [77]
- c) 2 min Mikrowellenbehandlung (MLS-Ethos 1600, mLS GmbH) bei 200 W und unter Zugabe eines Rührfisches, wobei sich immer 10 Gefäße in der Mikrowelle befanden [Bayer CropScience AG]
- d) 10 min Ultraschallbad (Transsonic TS 540, Elma) [77]

Danach erfolgte eine Filtration mittels Faltenfilter, wobei das Eluat in einen 50 mL-Messkolben übergeführt wurde. Becherglas und Filterkuchen wurden zweimal mit wenigen Millilitern Extraktionsmittel gespült. Der Messkolben wurde anschließend mit dem Extraktionsmittel aufgefüllt. Ein Aliquot von 2,5 mL Rohextrakt wurde im Stickstoffevaporator bis zur Trockne eingengt und der Rückstand wurde mit 1 mL Milli-Q-Wasser gelöst. Zusätzlich wurde je Extraktionsmittel auch ein Blindwert ohne Matrix hergestellt, um so eine Blindwertkorrektur der Chromatogramme vornehmen zu können.

Die so entstandene Messlösung wurde mittels eines Q3-Fullscans vermessen. Die dabei verwendeten HPLC-Bedingungen sind in Tab. 4 angegeben und die massenspektrometrischen Parameter des Q3-Fullscans in Tab. 5. Verwendet wurde ein Agilent 1290 Infinity LC-System mit einem HTC PAL Autosampler und SCIEX API 4000™ MS/MS System.

Zur Bestimmung der Extraktionseffizienz wurden die Pflanzenmaterialien noch ein weiteres Mal eingewogen und vor Zugabe des Extraktionsmittels mit Standardlösung versetzt. Der daraus resultierende Rückstand der untersuchten Analyten entsprach hierbei dem 10-fachen der erforderlichen Bestimmungsgrenze. Um präzisere Werte für die Extraktionseffizienz zu erhalten, wurde die Wiederfindung jedes Analyten bei jedem Extraktionsmittel dreifach bestimmt. Es wurden die gleichen HPLC-MS-Bedingungen wie bei den undotierten Matrices verwendet. Die massenspektrometrischen Parameter befinden sich im Anhang 9.5.

Für eine bessere Richtigkeit der ermittelten Wiederfindungen wurden eventuell vorhandene Matrixeffekte durch isopenmarkierte interne Standards korrigiert. Im Falle der Phosphonsäure mussten Matrixstandards genutzt werden, da ein isopenmarkierter interner Standard nicht verfügbar war.

## 6.2 Extraktaufreinigung

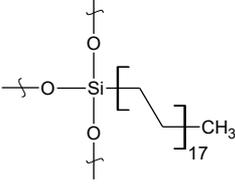
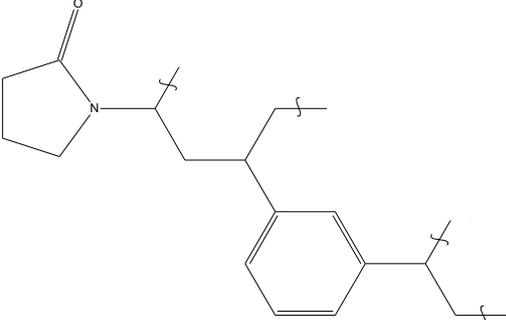
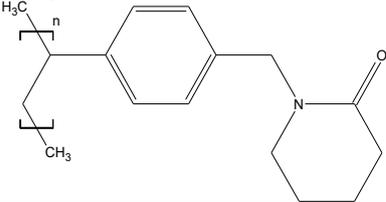
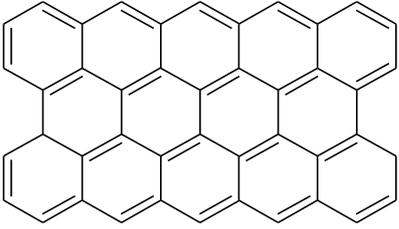
### 6.2.1 Extraktverdünnung

Je Pflanzenmaterial wurden  $5,00 \pm 0,05$  g in ein 100 mL-Becherglas eingewogen und mit 30 mL Methanol-Wasser-Gemisch (4/1, v/v) versetzt. Nach 2 minütiger Behandlung mit dem Ultra Turrax erfolgte eine Filtration mittels Faltenfilter, wobei das Eluat in einen 50 mL-Messkolben übergeführt wurde. Becherglas und Filterkuchen wurden zweimal mit wenigen Millilitern Extraktionsmittel gespült. Der Messkolben wurde anschließend mit dem Extraktionsmittel aufgefüllt. Ein Aliquot von 2,5 mL und 1,0 mL Rohextrakt wurden im Stickstoffevaporator bis zur Trockne eingengt und der Rückstand wurde mit 1 mL Milli-Q-Wasser gelöst. Dies entspricht den Verdünnungsfaktoren 0,4 und 1. Weitere Aliquots wurden mit Milli-Q-Wasser so verdünnt, dass eine 1:2, 1:10 und 1:100 Verdünnung getestet wurden (Verdünnungsfaktor 2, 10 und 100). Alle Matrixverdünnungen enthielten die internen Standards in der gleichen Konzentration von 12,5 ng/mL wie die Lösungsmittelstandards. So konnte die Berechnung des Matrixeffekts mittels der isotope markierten Standards durchgeführt werden. Die so erhaltenen Messlösungen wurden mittels LC-MS/MS vermessen. Verwendet wurde ein Agilent 1290 Infinity LC-System mit einem HTC PAL Autosampler und SCIEX API 4000™ MS/MS System. Die dabei verwendeten HPLC-Bedingungen entsprechen denen aus Tab. 4. Die massenspektrometrischen Parameter befinden sich im Anhang 9.5.

### 6.2.2 Festphasenextraktion

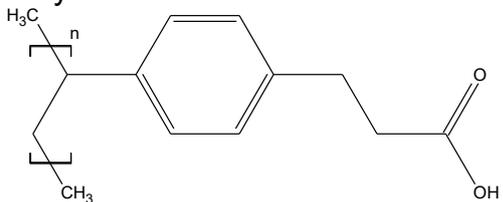
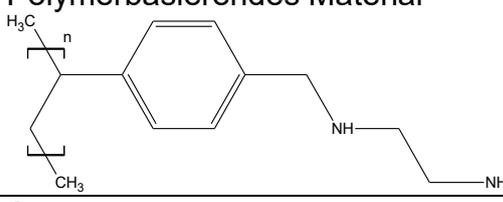
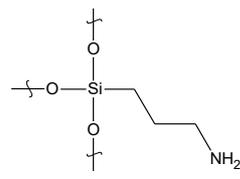
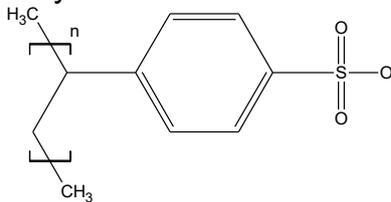
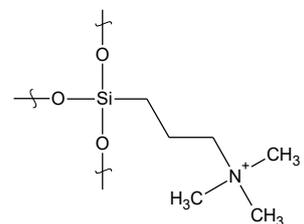
Alle getesteten SPE-Materialien sind in Tab. 6 zusammengefasst. Es wurden unpolare SPE-Materialien, Kationenaustausch- und Anionenaustausch-SPE-Materialien getestet.

Tab. 6: Verwendete SPE-Materialien

	SPE-Material (Materialmenge, Kartuschenvolumen)	Beschreibung *
Unpolar	Agilent Bond Elut C18 (2 g, 12 mL)	Kieselgelbasierendes Material mit C18 Kohlenstoffketten  
	Merck Lichrolut EN (200 mg, 3 mL)	Polymerbasierendes Material, Ethylvinylbenzol-Divinylbenzol-Copolymer
	Agilent Bond Elut ENV (500 mg, 6 mL)	Polymerbasierendes Material, Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymer
	Waters Oasis HLB 3cc (60 mg, 3 mL)	Polymerbasierendes Material, sowohl hydrophile als auch lipophile Eigenschaften  
	Phenomenex Strata-X (30 mg, 3 mL)	Polymerbasierendes Material  
	Alltech Carbograph (300 mg, 8 mL)	Graphitbasierendes poröses Material  

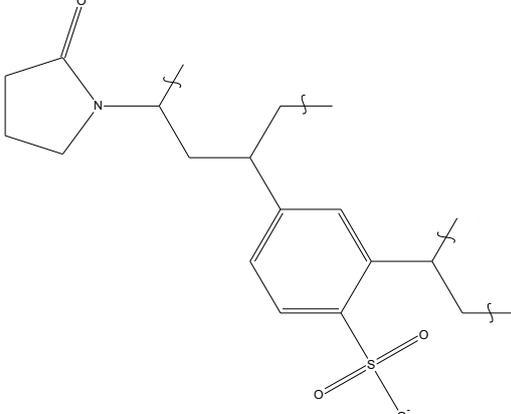
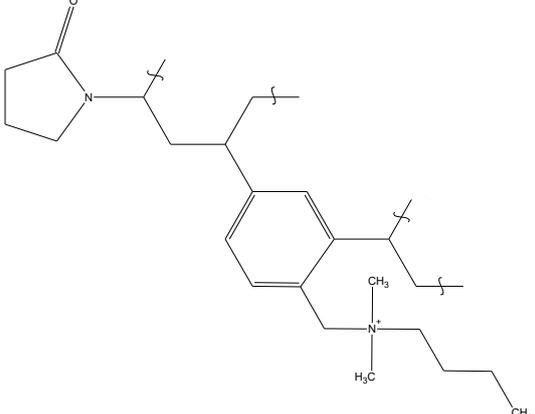
\* ... Informationen stammen vom jeweiligen Hersteller

Tab. 6 (Fortsetzung): Verwendete SPE-Materialien

		<b>SPE-Material</b> (Materialmenge, Kartuschenvolumen)	<b>Beschreibung</b> *
<b>Ionenaustausch</b>		Phenomenex Strata-X-CW (200 mg, 6 mL)	Schwacher Kationenaustauscher, Polymerbasierendes Material 
		Phenomenex Strata-X-AW (200 mg, 6 mL)	Schwacher Anionenaustauscher, Polymerbasierendes Material 
		Phenomenex Strata NH2 (500 mg, 6 mL)	Schwacher Anionenaustauscher, Kieselgelbasierendes Material 
		Phenomenex Strata-X-C (200 mg, 6 mL)	Starker Kationenaustauscher, Polymerbasierendes Material 
		Phenomenex Strata SAX (2 g, 12 mL)	Starker Anionenaustauscher, Kieselgelbasierendes Material 

\* ... Informationen stammen vom jeweiligen Hersteller

Tab. 6 (Fortsetzung): Verwendete SPE-Materialien

	SPE-Material (Materialmenge, Kartuschenvolumen)	Beschreibung *
Ionenaustausch	Waters Oasis MCX 3cc (60 mg, 3 mL)	Kationenaustauscher, Polymerbasierendes Material 
	Waters Oasis MAX 3cc (60 mg, 3 mL)	Anionenaustauscher, Polymerbasierendes Material 

\* ... Informationen stammen vom jeweiligen Hersteller

### 6.2.2.1 *Triazol-Metaboliten*

Alle verwendeten Pflanzenmaterialien wurden unter Verwendung von Trockeneis homogenisiert und im Gefrierschrank bei ca. -25 °C gelagert.

Bei den Vortests zur Optimierung der Festphasenextraktion wurden zunächst Lösungsmittelstandards verwendet. Nach dieser Optimierung erfolgte die Extraktaufreinigung bei Gurke und Hartweizenkorn (Hartweizen), den Matrizes die auch bei der Untersuchung verschiedener Extraktionsverfahren verwendet wurden. Konnte ein positiver Einfluss des jeweiligen Aufreinigungsverfahrens festgestellt werden, so wurde dieses auch noch bei weiteren pflanzlichen Materialien angewandt.

Die Auswahl weiterer Matrizes erfolgte entsprechend dem OECD-Dokument ENV/JM/MONO(2007)17 [87]. Hiernach müssen wasser-, säure-, stärke-, fett- und proteinhaltige Materialien verwendet werden, um ein repräsentatives Spektrum an pflanzlichen Matrizes abzudecken. Dieses wird erfüllt mit den Materialien Salatkopf (Salat), Weintrauben (Wein), Futterrübe (Rübe), Flachssamen (Flachs) und Sojabohnen (Soja). Zusätzlich wurde auch noch Brokkoli untersucht. Bei der Matrix Brokkoli wurden bei bisherigen Studien der Bayer CropScience AG starke Matrixeffekte beobachtet.

Es wurden  $5,00 \pm 0,05$  g Pflanzenmaterial in ein 100 mL-Becherglas eingewogen und mit 30 mL Methanol-Wasser-Gemisch (4/1, v/v) versetzt. Nach 2 minütiger Behandlung mit dem Ultra Turrax erfolgte eine Filtration über ein Reservoir mit Filtereinsatz, wobei das Eluat in einen 50 mL-Messkolben übergeführt wurde. Becherglas und Filterkuchen wurden zweimal mit wenigen Millilitern Extraktionsmittel gespült. Der Messkolben wurde anschließend mit dem Extraktionsmittel aufgefüllt. Ein Aliquot von 2,5 mL Rohextrakt wurde im Stickstoffevaporator bis zur Trockne eingeengt und für die SPE-Aufreinigung verwendet.

Zur Bestimmung der Wiederfindung bei der Extraktaufreinigung wurden die Pflanzenmaterialien vor Zugabe des Extraktionsmittels mit Standardlösung versetzt. Der daraus resultierende Rückstand der Analyten entsprach hierbei 0,10 mg/kg, dem 10-fachen der erforderlichen Bestimmungsgrenze.

Für eine bessere Richtigkeit der ermittelten Wiederfindungen wurden eventuell vorhandene Matrixeffekte durch isotopenmarkierte interne Standards korrigiert. Diese wurden nach der SPE-Aufreinigung den Matrixextrakten zugegeben. Die Matrixextrakte enthielten die internen Standards in der gleichen Konzentration von 12,5 ng/ mL wie die Lösungsmittelstandards. So konnte die Berechnung des Matrixeffekts mittels der isotopenmarkierten Standards durchgeführt werden.

Nach SPE-Aufreinigung wurden alle Lösungen mittels LC-MS/MS vermessen. Verwendet wurde ein Agilent 1290 Infinity LC-System mit einem HTC PAL Autosampler und SCIEX API 4000™ MS/MS System. Die dabei verwendeten HPLC-Bedingungen sind in Tab. 4 dargestellt. Die massenspektrometrischen Parameter befinden sich im Anhang 9.5.

#### *6.2.2.1.1 Unpolare SPE*

Die SPE-Kartuschen wurden einmal mit Methanol und zweimal mit Wasser, jeweils in einer Menge die dem Kartuschenvolumen entspricht, konditioniert. Der getrocknete Extraktionsrückstand wurde in 1 mL Milli-Q-Wasser gelöst und auf die SPE-Kartusche aufgegeben. Das Probengefäß wurde zweimal mit je 1 mL Wasser ausgespült, welche ebenfalls auf die SPE-Kartusche gegeben wurde. Das SPE-Material wurde anschließend mit ca. 2 mL Wasser gewaschen. Das komplette Eluat wurde aufgefangen und im Stickstoffevaporator bis zur Trockne eingeeengt. Der getrocknete Rückstand wurde in Milli-Q-Wasser gelöst und mittels LC-MS/MS vermessen.

#### *6.2.2.1.2 Kationenaustausch-SPE*

Die SPE-Kartuschen wurden einmal mit Methanol und zweimal mit Ameisensäurem Milli-Q-Wasser (pH 2,3), jeweils in einer Menge die dem Kartuschenvolumen entspricht, konditioniert. Der getrocknete Extraktionsrückstand wurde in 1 mL Ameisensäurem Milli-Q-Wasser (pH 2,3) gelöst und auf die SPE-Kartusche aufgegeben.

Das Probengefäß wurde zweimal mit je 1 mL ameisensaurem Milli-Q-Wasser (pH 2,3) ausgespült, welche ebenfalls auf die SPE-Kartusche gegeben wurde. Das SPE-Material wurde anschließend mit je einem Kartuschenvolumen ameisensaurem Milli-Q-Wasser (pH 2,3) und Methanol gewaschen. Das bisherige Eluat wurde verworfen. Danach erfolgte die Elution der Analyten mit zweimal 2,5 mL:

- a) Strata X-C (TAA und TLA): ammoniakalischem Milli-Q-Wasser (pH 10,8)
- b) Oasis MCX (TAL und TRZ): schwefelsaurem Milli-Q-Wasser (pH 12,3)

Das Eluat wurde im Stickstoffevaporator bis zur Trockne eingengt. Der getrocknete Rückstand wurde in Milli-Q-Wasser gelöst und mittels LC-MS/MS vermessen.

#### *6.2.2.1.3 Anionenaustausch-SPE*

Die SPE-Kartuschen wurden einmal mit Methanol und zweimal mit basischem Milli-Q-Wasser, jeweils in einer Menge die dem Kartuschenvolumen entspricht, konditioniert. Bei Oasis MAX wurde dabei das Milli-Q-Wasser bei der Konditionierung mit Ammoniak auf pH 10,8 gebracht und bei Strata SAX mit Natronlauge auf pH 12,3. Der getrocknete Extraktionsrückstand wurde in 1 mL basischem Milli-Q-Wasser des entsprechenden pH-Wertes gelöst und auf die SPE-Kartusche aufgegeben. Das Probengefäß wurde zweimal mit je 1 mL basischem Milli-Q-Wasser ausgespült, welche ebenfalls auf die SPE-Kartusche gegeben wurde. Das SPE-Material wurde anschließend mit je einem Kartuschenvolumen basischem Milli-Q-Wasser und Methanol gewaschen. Das bisherige Eluat wurde verworfen. Danach erfolgte die Elution der Analyten mit zweimal 2,5 mL ameisensaurem Milli-Q-Wasser (pH 2,3). Das Eluat wurde im Stickstoffevaporator bis zur Trockne eingengt. Der getrocknete Rückstand wurde in Milli-Q-Wasser gelöst und mittels LC-MS/MS vermessen.

#### 6.2.2.2 DFA

Alle verwendeten Pflanzenmaterialien wurden unter Verwendung von Trockeneis homogenisiert und im Gefrierschrank bei ca. -25 °C gelagert.

Bei den Vortests zur Optimierung der Festphasenextraktion wurden zunächst Lösungsmittelstandards verwendet. Das optimierte Aufreinigungsverfahren wurde anschließend bei verschiedenen pflanzlichen Materialien getestet. Die Auswahl der Matrices erfolgte entsprechend dem OECD-Dokument ENV/JM/MONO(2007)17 [87]. Um ein repräsentatives Spektrum an pflanzlichen Matrices abzudecken, wurden die Materialien Salatkopf (Salat), Orangenfrucht (Orange), Futterrübe (Rübe), Flachssamen (Flachs) und Sojabohnen (Soja) eingesetzt. Zusätzlich wurde auch noch Hopfendolden (Hopfen) gewählt. Bei dieser Matrix wurden bei bisherigen Studien der Bayer CropScience AG starke Matrixeffekte beobachtet.

Es wurden  $5,00 \pm 0,05$  g Pflanzenmaterial in ein 100 mL-Becherglas eingewogen und mit 20 mL ACN-Wasser-Ameisensäure-Gemisch (4/1/0,011, v/v/v) versetzt. Nach 1 minütiger Behandlung mit dem Ultra Turrax erfolgte eine Filtration über ein Reservoir mit Filtereinsatz, wobei das Eluat in einen 50 mL-Messkolben übergeführt wurde. Becherglas und Filterkuchen wurden zweimal mit wenigen Millilitern Extraktionsmittel gespült. Die Extraktion wurde mit weiteren 20 mL Extraktionsgemisch wiederholt. Der Messkolben wurde anschließend mit dem Extraktionsmittel aufgefüllt. Ein Aliquot von 2,5 mL Rohextrakt wurde im Stickstoffevaporator bis zur Trockne eingengt und für die SPE-Aufreinigung verwendet.

Zur Bestimmung der Wiederfindung bei der Extraktaufreinigung wurden die Pflanzenmaterialien vor Zugabe des Extraktionsmittels mit Standardlösung versetzt. Der daraus resultierende Rückstand der Analyten entsprach hierbei 0,10 mg/kg PE Bayerwirkstoff, dem 10-fachen der erforderlichen Bestimmungsgrenze.

Für eine bessere Richtigkeit der ermittelten Wiederfindungen wurden eventuell vorhandene Matrixeffekte durch den isotope markierten internen Standard korrigiert. Dieser wurde nach der SPE-Aufreinigung den Matrixextrakten zugegeben. Die Matrixextrakte enthielten die internen Standards in der gleichen Konzentration von 1,0 ng/ mL wie die Lösungsmittelstandards. So konnte die Berechnung des Matrixeffekts mittels des isotope markierten Standards durchgeführt werden.

Nach SPE-Aufreinigung wurden alle Lösungen mittels LC-MS/MS vermessen. Verwendet wurde ein Agilent 1290 Infinity LC-System mit einem HTC PAL Autosampler und SCIEX QTRAP® 5500 MS/MS System. Die dabei verwendeten HPLC-Bedingungen sind in Tab. 7 dargestellt. Die massenspektrometrischen Parameter befinden sich im Anhang 9.5.

**Tab. 7: HPLC Bedingungen Extraktreinigung DFA**

Säule:	Hypercarb (Fisher Scientific) 100 x 3 mm / 5 µm		
Säulentemperatur:	60 °C		
Injektionsvolumen:	20 µL		
Eluenten:	A) H <sub>2</sub> O + 5 mL/L Ameisensäure B) Methanol + 5 mL/L Ameisensäure		
Fluss:	700 mL/min		
Gradient:	[min]	[%] A	[%] B
	0	30	70
	0,5	30	70
	2,5	90	10
	3,4	90	10
	3,51	30	70
	6	30	70

#### *6.2.2.2.1 Unpolare SPE*

Die SPE-Kartuschen wurden einmal mit Methanol und zweimal mit Ameisensäurem Milli-Q-Wasser (pH 2,3), jeweils in einer Menge die dem Kartuschenvolumen entspricht, konditioniert. Der getrocknete Extraktionsrückstand wurde in 1 mL Ameisensäurem Milli-Q-Wasser (pH 2,3) gelöst und auf die SPE-Kartusche aufgegeben. Das Probengefäß wurde zweimal mit je 1 mL Ameisensäurem Milli-Q-Wasser (pH 2,3) ausgespült, welche ebenfalls auf die SPE-Kartusche gegeben wurde. Das SPE-Material wurde anschließend mit ca. 2 mL Ameisensäurem Milli-Q-Wasser (pH 2,3) gewaschen. Das komplette Eluat wurde aufgefangen und im Stickstoffevaporator bis zur Trockne eingengt. Der getrocknete Rückstand wurde in Milli-Q-Wasser gelöst und mittels LC-MS/MS vermessen.

#### *6.2.2.2.2 Kationenaustausch-SPE*

Die SPE-Kartuschen wurden einmal mit Methanol und zweimal mit Ameisensäurem Milli-Q-Wasser (pH 2,3), jeweils in einer Menge die dem Kartuschenvolumen entspricht, konditioniert. Der getrocknete Extraktionsrückstand wurde in 1 mL Ameisensäurem Milli-Q-Wasser (pH 2,3) gelöst und auf die SPE-Kartusche aufgegeben. Das Probengefäß wurde zweimal mit je 1 mL Ameisensäurem Milli-Q-Wasser (pH 2,3) ausgespült, welche ebenfalls auf die SPE-Kartusche gegeben wurde. Das SPE-Material wurde anschließend mit ca. 2 mL Ameisensäurem Milli-Q-Wasser (pH 2,3) gewaschen. Das komplette Eluat wurde aufgefangen und im Stickstoffevaporator bis zur Trockne eingengt. Der getrocknete Rückstand wurde in Milli-Q-Wasser gelöst und mittels LC-MS/MS vermessen.

### 6.2.2.3 *Ethephon und HEPA*

Alle verwendeten Pflanzenmaterialien wurden unter Verwendung von Trockeneis homogenisiert und im Gefrierschrank bei ca. -25 °C gelagert.

Bei den Vortests zur Optimierung der Festphasenextraktion wurden zunächst Lösungsmittelstandards verwendet. Das optimierte Aufreinigungsverfahren wurde anschließend bei verschiedenen pflanzlichen Materialien getestet. Die Auswahl der Matrizes erfolgte entsprechend dem OECD-Dokument ENV/JM/MONO(2007)17 [87]. Es wurden die Materialien Brokkoli, Orangenfrucht (Orange), Futterrübe (Rübe), Olivenfrucht (Olive) und weiße Bohne (Bohne) eingesetzt.

Es wurden  $5,00 \pm 0,05$  g Pflanzenmaterial in ein 100 mL-Becherglas eingewogen und mit 60 mL Methanol-Wasser-Ameisensäure-Gemisch (1/1/0,002, v/v/v) versetzt. Nach 2 minütiger Behandlung mit dem Ultra Turrax erfolgte eine Filtration über ein Reservoir mit Filtereinsatz, wobei das Eluat in einen 100 mL-Messkolben übergeführt wurde. Becherglas und Filterkuchen wurden zweimal mit wenigen Millilitern Extraktionsmittel gespült. Der Messkolben wurde anschließend mit dem Extraktionsmittel aufgefüllt. Ein Aliquot von 1,5 mL Rohextrakt wurde im Stickstoffevaporator bis zur Trockne eingeeengt und für die SPE-Aufreinigung verwendet.

Zur Bestimmung der Wiederfindung bei der Extraktaufreinigung wurden die Pflanzenmaterialien vor Zugabe des Extraktionsmittels mit Standardlösung versetzt. Der daraus resultierende Rückstand der Analyten entsprach hierbei 0,50 mg/kg PE Ethephon, dem 10-fachen der erforderlichen Bestimmungsgrenze.

Für eine bessere Richtigkeit der ermittelten Wiederfindungen wurden eventuell vorhandene Matrixeffekte durch den isotope markierten internen Standard korrigiert. Dieser wurde nach der SPE-Aufreinigung den Matrixextrakten zugegeben. Die Matrixextrakte enthielten die internen Standards in der gleichen Konzentration von 50 ng/ mL wie die Lösungsmittelstandards. So konnte die Berechnung des Matrixeffekts mittels des isotope markierten Standards durchgeführt werden.

Nach SPE-Aufreinigung wurden alle Lösungen mittels LC-MS/MS vermessen. Verwendet wurde ein Agilent 1290 Infinity LC-System mit einem HTC PAL Autosampler und SCIEX API 4000™ MS/MS System. Die dabei verwendeten HPLC-Bedingungen sind in Tab. 8 dargestellt. Die massenspektrometrischen Parameter befinden sich im Anhang 9.5.

**Tab. 8: HPLC Bedingungen Extraktreinigung Ethepon und HEPA**

Säule:	Hypercarb (Fisher Scientific) 100 x 3 mm / 5 µm		
Säulentemperatur:	60 °C		
Injektionsvolumen:	20 µL		
Eluenten:	A) H <sub>2</sub> O + 5 mL/L Ameisensäure B) Methanol + 5 mL/L Ameisensäure		
Fluss:	600 mL/min		
Gradient:	[min]	[%] A	[%] B
	0	45	55
	1,5	45	55
	2,8	95	5
	6,7	95	5
	6,71	45	55
	8,5	45	55

#### 6.2.2.3.1 Unpolare SPE

Die SPE-Kartuschen wurden einmal mit Methanol und zweimal mit Milli-Q-Wasser, jeweils in einer Menge die dem Kartuschenvolumen entspricht, konditioniert. Der getrocknete Extraktionsrückstand wurde in 1 mL ameisen-saurem Milli-Q-Wasser (pH 2,3) gelöst und auf die SPE-Kartusche aufgegeben. Das Probengefäß wurde zweimal mit je 1 mL ameisen-saurem Milli-Q-Wasser ausgespült, welche ebenfalls auf die SPE-Kartusche gegeben wurden. Das SPE-Material wurde anschließend mit ca. 2 mL ameisen-saurem Milli-Q-Wasser gewaschen. Das komplette Eluat wurde aufgefangen und im Stickstoffevaporator bis zur Trockne eingeeengt. Der getrocknete Rückstand wurde in 1,5 mL Methanol-Wasser-Ameisensäure-Gemisch (1/1/0,002, v/v/v) gelöst und mittels LC-MS/MS vermessen.

#### 6.2.2.3.2 Kationenaustausch-SPE

Die SPE-Kartuschen wurden einmal mit Methanol und zweimal mit Ameisensäurem Milli-Q-Wasser (pH 2,3), jeweils in einer Menge die dem Kartuschenvolumen entspricht, konditioniert. Der getrocknete Extraktionsrückstand wurde in 1 mL Ameisensäurem Milli-Q-Wasser (pH 2,3) gelöst und auf die SPE-Kartusche aufgegeben. Das Probengefäß wurde zweimal mit je 1 mL Ameisensäurem Milli-Q-Wasser (pH 2,3) ausgespült, welche ebenfalls auf die SPE-Kartusche gegeben wurden. Das SPE-Material wurde anschließend mit ca. 2 mL Ameisensäurem Milli-Q-Wasser (pH 2,3) gewaschen. Das komplette Eluat wurde aufgefangen und im Stickstoffevaporator bis zur Trockne eingengt. Der getrocknete Rückstand wurde in Milli-Q-Wasser gelöst und mittels LC-MS/MS vermessen.

## 6.3 Trennverfahren

### 6.3.1 Flüssigkeitschromatographie

Alle getesteten LC-Phasen sind in Tab. 9 zusammengestellt. Neben verschiedenen RP-LC-Säulen, wurden auch Ionenaustauschersäulen sowie die Spezialphasen HILIC und Hypercarb untersucht.

**Tab. 9: Verwendete LC-Säulen**

	<b>LC-Säule (Bezeichnung - Hersteller)</b>	<b>Beschreibung *</b>
<b>Reversed Phase Chromatographie</b>	Luna C18(2) - Phenomenex	Octadecylsilylierte Kieselgeloberfläche, unpolar endcapped durch Trimethylsilan-Gruppen
	Aquasil C18 - Thermo	Kieselgelbasiertes Material mit einem hohen Gehalt an C18-Ketten, hydrophil endcapped
	Zorbax Eclipse XDB-C8 - Agilent	Besonders dicht gebundene octadecylsilylierte Kieselgeloberfläche, doppelt endcapped durch Trimethylsilan-Gruppen
	Pinnacle DB Aqueous C18 - Restek	Polar modifiziertes und C18-Gruppen enthaltendes Kieselgel, Kohlenstoffgehalt 6 %
	Ultra Aqueous C18 - Restek	Polar modifiziertes und C18-Gruppen enthaltendes Kieselgel, Kohlenstoffgehalt 15 %
	Synergi Fusion-RP - Phenomenex	Polar eingebette C18-Gruppen, endcapped durch Trimethylsilan-Gruppen
	Synergi Polar-RP - Phenomenex	Über Etherbindungen verknüpfte Phenylphase, polar endcapped
<b>Ionen- austausch- Chromato- graphie</b>	Luna NH <sub>2</sub> - Phenomenex	Kieselgeloberfläche mit gebundenen primären Aminogruppen, schwache Anionenaustauschereigenschaften, endcapped durch Trimethylsilan-Gruppen
	Luna SCX - Phenomenex	Kieselgeloberfläche mit Benzylsulfonsäuregruppen, starke Kationenaustauschereigenschaften
<b>Spezial- Phasen</b>	Hypercarb™ - Thermo	Bestehend aus 100 % porösem Graphit
	ZIC®-pHILIC - Merck	Polymerbasiertes Material, zwitterionisch durch Sulfonsäure- und Amino-Gruppen welche zu gleichen Anteilen vorliegen

\* ... Informationen stammen vom jeweiligen Hersteller

Zunächst wurden Testmessungen durchgeführt, um den maximal möglichen Kapazitätsfaktor zu ermitteln. Hierfür wurde Standardlösung der Analyten injiziert und bei isokratischen Bedingungen die Retentionszeit ermittelt. Die Zusammensetzung der Eluenten wurde dabei von 100 % Eluent A (bzw. 95 % wenn die Säule nicht mit 100 % Wasser betrieben werden darf) bis auf 100 % B variiert.

Anschließend erfolgten Testmessungen mit Pflanzenmaterialien. Alle verwendeten Pflanzenmaterialien wurden unter Verwendung von Trockeneis homogenisiert und im Gefrierschrank bei ca. -25 °C gelagert. Die Auswahl der Matrices erfolgte entsprechend dem OECD-Dokument ENV/JM/MONO(2007)17 [87]. Um ein repräsentatives Spektrum an pflanzlichen Matrices abzudecken, wurden die Materialien Salatkopf (Salat), Weintrauben (Wein) oder Orangenfrucht (Orange), Futterrübe (Rübe), Flachssamen (Flachs) oder Rapssamen (Raps) und Sojabohnen (Soja) ausgewählt.

Es wurden  $5,00 \pm 0,05$  g Pflanzenmaterial in ein 100 mL-Becherglas eingewogen und mit 30 mL radiovalidiertem Extraktionsgemisch (siehe Tab. 12) versetzt. Nach zweiminütiger Behandlung mit dem Ultra Turrax erfolgte eine Filtration über ein Reservoir mit Filtereinsatz, wobei das Eluat in einen 50 mL-Messkolben übergeführt wurde. Becherglas und Filterkuchen wurden zweimal mit wenigen Millilitern Extraktionsmittel gespült. Der Messkolben wurde anschließend mit dem Extraktionsmittel aufgefüllt. Die Extrakte wurden mit Standardlösung der Analyten versetzt, so dass diese einen Rückstand vom 10-fachen der Bestimmungsgrenze (siehe Tab. 10) enthielten. Anschließend wurden diese entsprechend Tab. 15 verdünnt bzw. aufkonzentriert. Dabei wurde ein Lösungsmittelgemisch verwendet, welches den jeweiligen chromatographischen Startbedingungen der Eluenten entsprach.

Die verwendeten LC-Bedingungen der jeweiligen LC-Phasen sind in Anhang 9.6 aufgeführt. Verwendet wurde ein Agilent 1290 Infinity LC-System mit einem HTC PAL Autosampler. Die Detektion erfolgte mit einem SCIEX API 4000™ oder SCIEX QTRAP® 5500 MS/MS System. Die dabei verwendeten massenspektrometrischen Parameter befinden sich im Anhang 9.5.

### 6.3.2 Kapillarelektrophorese

Zunächst wurden Testmessungen für die TDMs, Ethephon und HEPA, DFA und Phosphonsäure durchgeführt. Die hierfür verwendeten Standardlösungen waren in reinem Milli-Q-Wasser hergestellt.

Für die TDMs und DFA erfolgten zusätzlich Testmessungen in den Matrices Brokkoli und Salat. Diese beiden Pflanzenmaterialien wurden unter Verwendung von Trockeneis homogenisiert und im Gefrierschrank bei ca. -25 °C gelagert. Es wurden  $5,00 \pm 0,05$  g Pflanzenmaterial in ein 100 mL-Becherglas eingewogen und mit 30 mL radiovalidiertem Extraktionsgemisch (siehe Tab. 12) versetzt. Nach zweiminütiger Behandlung mit dem Ultra Turrax erfolgte eine Filtration über ein Reservoir mit Filtereinsatz, wobei das Eluat in einen 50 mL-Messkolben übergeführt wurde. Becherglas und Filterkuchen wurden zweimal mit wenigen Millilitern Extraktionsmittel gespült. Der Messkolben wurde anschließend mit dem Extraktionsmittel aufgefüllt. Die Extrakte wurden mit Standardlösung der Analyten versetzt, so dass mehrere Rückstandslevels eingestellt wurden. Anschließend wurden diese entsprechend Tab. 15 verdünnt bzw. konzentriert. Dabei wurde Milli-Q-Wasser ohne weitere Additive verwendet.

Die verwendeten CE-MS/MS-Parameter sind in Anhang 9.7 aufgeführt. Verwendet wurde ein Agilent 7100 Kapillarelektrophorese-System, welches gekoppelt wurde mit einem Agilent 6490 Tripelquadrupol System.

## 6.4 Detektion

### 6.4.1 Tandem-Massenspektrometrie

Für die Ionisation der Analytmoleküle wurde das ESI-Verfahren verwendet. Die Optimierung der massenspektrometrischen Parameter aller untersuchten Analyten erfolgte über ein automatisches Tuning. Hierfür wurden Analytlösungen mit einer Konzentration von ca. 50 µg/L, gelöst in einem Gemisch aus Wasser und Methanol im Verhältnis 9/1 (v/v) mit Zusatz von 630 mg/L Ammoniumformiat und 120 µL/L Ameisensäure, eingesetzt. Über eine Spritzenpumpe wurden diese Lösungen direkt der Ionenquelle zugeführt. Neben den MRM-Übergängen wurden die optimalen Werte für die einflussreichen Parameter Declustering Potential (DP), Collision Energy (CE), Cell Exit Potential (CXP) für jeden Analyten ermittelt.

Alle verwendeten Pflanzenmaterialien wurden unter Verwendung von Trockeneis homogenisiert und im Gefrierschrank bei ca. -25 °C gelagert. Die Auswahl der Matrices erfolgte entsprechend dem OECD-Dokument ENV/JM/MONO(2007)17 [87]. Wasserhaltige Materialien wurden repräsentiert durch Salatkopf (Salat), Tomatenfrucht (Tomate) und Brokkoli. Als säurehaltige Materialien wurden Weintrauben (Wein) und Orangenfrucht (Orange) ausgewählt. Futterrübe (Rübe), Karotte und Gerstenkorn (Korn) stellen Beispiele für stärkehaltige Materialien dar. Flachssamen (Flachs) und Rapssamen (Raps) sind Vertreter für fetthaltige Materialien. Sojabohnen (Soja) und Gartenbohnen (Bohne) repräsentieren proteinhaltige Materialien.

Es wurden  $5,00 \pm 0,05$  g Pflanzenmaterial in ein 100 mL-Becherglas eingewogen und mit 30 mL radiovalidiertem Extraktionsgemisch (siehe Tab. 12) versetzt. Nach zweiminütiger Behandlung mit dem Ultra Turrax erfolgte eine Filtration über ein Reservoir mit Filtereinsatz, wobei das Eluat in einen 50 mL-Messkolben übergeführt wurde. Becherglas und Filterkuchen wurden zweimal mit wenigen Millilitern Extraktionsmittel gespült. Der Messkolben wurde anschließend mit dem Extraktionsmittel aufgefüllt. Die Extrakte wurden mit Standardlösung der Analyten versetzt, so dass diese einen Rückstand der Bestimmungsgrenze und vom 10-fachen der Bestimmungsgrenze (siehe Tab. 10) enthielten.

Anschließend wurden diese entsprechend Tab. 15 verdünnt bzw. konzentriert. Dabei wurde ein Lösungsmittelgemisch verwendet, welches den jeweiligen chromatographischen Startbedingungen der Eluenten entsprach.

Die verwendeten LC-Bedingungen sind in Anhang 9.6 aufgeführt. Verwendet wurde ein Agilent 1290 Infinity LC-System mit einem HTC PAL Autosampler. Die Detektion erfolgte mit einem SCIEX API 4000™ MS/MS System oder einem QTRAP® 5500 MS/MS System. Die dabei verwendeten massenspektrometrischen Parameter befinden sich im Anhang 9.5.

#### **6.4.2 Differential-Mobilitäts-Spektrometrie**

Zunächst wurden die DMS spezifischen Parameter optimiert in Hinsicht auf maximale Empfindlichkeit und Selektivität. Dies erfolgte über eine T-Infusion von Standardlösung mit einer Konzentration von 250 ng/ mL in den LC-Fluss. Die LC-Parameter entsprachen dabei denen der später bei der LC-DMS-MS/MS-Messung verwendeten Bedingungen. Die Eluentenzusammensetzung wurde entsprechend den vorliegenden Bedingungen der Analyten-Elution gewählt. Sowohl mit als auch ohne Verwendung von Modifier wurden Kombinationen von SV und CoV bestimmt, die die beste Signalintensität des Analyten aufwiesen. Als Modifier wurden Acetonitril, Isopropanol und Methanol getestet. Sie wurden mit einer Konzentration von 1,5 % dem Curtain Gas eingesetzt. Für die Optimierung der DMS-Zellentemperatur wurden 150, 225 und 300°C geprüft. Die DMS-Auflösung wurde bei allen Messungen auf gering gesetzt.

Nach der Optimierung über die Infusion erfolgten LC-DMS-MS/MS-Messungen in Matrix. Zunächst zur Beurteilung, welche DMS-Bedingungen die beste Abtrennung von Matrixkomponenten aufweisen und anschließend die Anwendbarkeit der optimierten Bedingungen auf eine repräsentative Auswahl verschiedener Pflanzenmatrizes. Alle verwendeten Pflanzenmaterialien wurden unter Verwendung von Trockeneis homogenisiert und im Gefrierschrank bei ca. -25 °C gelagert.

Die Auswahl der Matrices erfolgte entsprechend dem OECD-Dokument ENV/JM/MONO(2007)17 [87]. Wasserhaltige Materialien wurden repräsentiert durch Salatkopf (Salat), Tomatenfrucht (Tomate) und Brokkoli. Als säurehaltige Materialien wurden Weintrauben (Wein) und Orangenfrucht (Orange) ausgewählt. Futterrübe (Rübe), Karotte und Gerstenkorn (Korn) stellen Beispiele für stärkehaltige Materialien dar. Flachssamen (Flachs) und Rapssamen (Raps) sind Vertreter für fetthaltige Materialien. Sojabohnen (Soja) und Gartenbohnen (Bohne) repräsentieren proteinhaltige Materialien.

Es wurden  $5,00 \pm 0,05$  g Pflanzenmaterial in ein 100 mL-Becherglas eingewogen und mit 30 mL radiovalidiertem Extraktionsgemisch (siehe Tab. 12) versetzt. Nach zweiminütiger Behandlung mit dem Ultra Turrax erfolgte eine Filtration über ein Reservoir mit Filtereinsatz, wobei das Eluat in einen 50 mL-Messkolben überführt wurde. Becherglas und Filterkuchen wurden zweimal mit wenigen Millilitern Extraktionsmittel gespült. Der Messkolben wurde anschließend mit dem Extraktionsmittel aufgefüllt. Die Extrakte wurden mit Standardlösung der Analyten versetzt, so dass diese einen Rückstand der Bestimmungsgrenze und vom 10-fachen der Bestimmungsgrenze (siehe Tab. 10) enthielten. Anschließend wurden diese entsprechend Tab. 15 verdünnt bzw. aufkonzentriert. Dabei wurde ein Lösungsmittelgemisch verwendet, welches den jeweiligen chromatographischen Startbedingungen der Eluenten entsprach.

Die verwendeten LC-Bedingungen sind in Anhang 9.6 aufgeführt. Verwendet wurde ein Agilent 1290 Infinity LC-System mit einem HTC PAL Autosampler. Die Detektion erfolgte mit einem SCIEX QTRAP® 5500 MS/MS System, welches mit der SCIEX SelexION® Ion Mobility Einheit gekoppelt war. Die dabei verwendeten massenspektrometrischen Parameter befinden sich im Anhang 9.5 und die verwendeten DMS-Parameter sind in Anhang 9.8 aufgeführt.

Neben der LC-DMS-MS/MS wurden auch alle Probelösungen mit LC-MS/MS vermessen. Hierfür wurden die gleichen LC- und massenspektrometrischen Parameter verwendet. Jedoch wurde die SCIEX SelexION® Ion Mobility Einheit vom Massenspektrometer entfernt.

### 6.4.3 Time-of-Flight Detektion

Alle verwendeten Pflanzenmaterialien wurden unter Verwendung von Trockeneis homogenisiert und im Gefrierschrank bei ca. -25 °C gelagert. Die Auswahl der Matrices erfolgte entsprechend dem OECD-Dokument ENV/JM/MONO(2007)17 [87]. Um ein repräsentatives Spektrum an pflanzlichen Matrices abzudecken, wurden die Materialien Salatkopf (Salat), Weintrauben (Wein) oder Orangenfrucht (Orange), Futterrübe (Rübe), Flachssamen (Flachs) oder Rapssamen (Raps) und Sojabohnen (Soja) ausgewählt.

Es wurden  $5,00 \pm 0,05$  g Pflanzenmaterial in ein 100 mL-Becherglas eingewogen und mit 30 mL radiovalidiertem Extraktionsgemisch (siehe Tab. 12) versetzt. Nach zweiminütiger Behandlung mit dem Ultra Turrax erfolgte eine Filtration über ein Reservoir mit Filtereinsatz, wobei das Eluat in einen 50 mL-Messkolben übergeführt wurde. Becherglas und Filterkuchen wurden zweimal mit wenigen Millilitern Extraktionsmittel gespült. Der Messkolben wurde anschließend mit dem Extraktionsmittel aufgefüllt. Die Extrakte wurden mit Standardlösung der Analyten versetzt, so dass diese einen Rückstand der Bestimmungsgrenze und vom 10-fachen der Bestimmungsgrenze (siehe Tab. 10) enthielten. Anschließend wurden diese entsprechend Tab. 15 verdünnt bzw. konzentriert. Dabei wurde ein Lösungsmittelgemisch verwendet, welches den jeweiligen chromatographischen Startbedingungen der Eluenten entsprach.

Die verwendeten LC-Bedingungen sind in Anhang 9.6 aufgeführt. Verwendet wurde ein Agilent 1290 Infinity LC-System mit einem HTC PAL Autosampler. Die Detektion erfolgte mit einem SCIEX Triple TOF® 5600 QTOF-System. Die dabei verwendeten massenspektrometrischen Parameter befinden sich im Anhang 9.9.

## 7 Ergebnisse und Diskussion

Ziel dieser Arbeit ist es zu analysieren, welche Verfahren bzw. Parameter sich zur Bestimmung von hochpolaren Pflanzenschutzmittelrückständen mit niedrigen Molekulargewichten in pflanzlichen Materialien eignen und welche nicht geeignet sind. Dabei werden folgende Bereiche der analytischen Bestimmung diskutiert: Extraktion, Extraktaufreinigung, Trennung, Detektion und die Notwendigkeit einer Derivatisierung.

Tab. 10 enthält eine Zusammenstellung der Bestimmungsgrenzen, die ausgehend von den gesetzlich vorgeschriebenen MRL-Werten, mindestens für die gewählten Analyten erfüllt werden müssen. Für die meisten der gewählten Analyten ist die erforderliche Bestimmungsgrenze im Bereich von 0,01 mg/kg. Bei einigen Metaboliten ist der Rückstand als Äquivalent zum Pflanzenschutzmittelwirkstoff zu ermitteln. In diesen Fällen ist die erforderliche Bestimmungsgrenze als Wirkstoffäquivalent (PE) angegeben.

**Tab. 10: Übersicht erforderlicher LOQ-Werte der Analyten**

<b>Analyt</b>	<b>Erforderliche LOQ</b>
1,2,4-Triazol	0,01 mg/kg
Triazolyl-essigsäure	0,01 mg/kg
Triazolyl-milchsäure	0,01 mg/kg
Triazolyl-alanin	0,01 mg/kg
Difluoressigsäure	0,01 mg/kg PE Bayerwirkstoff
Ethephon	0,05 mg/kg
HEPA	0,05 mg/kg PE Ethephon
Phosphonsäure	2 mg/kg PE Fosetyl
Glufosinat-ammonium	0,1 mg/kg Glufosinat
MPPA	0,1 mg/kg PE Glufosinat
NAG	0,1 mg/kg PE Glufosinat

## 7.1 Extraktion

Durch die Variation verschiedener Extraktionsverfahren soll untersucht werden, ob die Menge an mit-extrahierten Matrixkomponenten bei gegebener Extraktionseffizienz des Analyten minimiert werden kann. Dabei steht jedoch nicht die Gesamtmenge der mit-extrahierten Matrixkomponenten im Fokus, sondern nur jene Matrix, die aufgrund ähnlicher chemischer Eigenschaften die Bestimmung des Analyten stört.

Bei der Extraktion wird zu einer definierten und homogenen Menge an pflanzlicher Matrix ein Extraktionsmittel gegeben, mit dem die Analyten aus der Probe herausgelöst werden sollen. Beliebte Extraktionsmittel in der Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln sind Gemische aus Wasser und einem organischen Lösungsmittel, wie Acetonitril (z. B. QuEChERS-Methode), Methanol (z. B. Methode nach Klein und Alder) sowie Aceton (z. B. DFG-Methode S19) [72-75]. Zur Steigerung der Extraktionseffizienz und zur Verringerung der Extraktionsdauer werden zusätzlich Verfahren eingesetzt, wie das Schütteln, eine weitere Homogenisierung mittels Ultra Turrax oder die Behandlung mit Mikro- oder Ultraschallwellen. Durch ein anschließendes Filtrieren oder Dekantieren werden die nicht gelösten Bestandteile der Probe abgetrennt, da diese sonst die folgende Analytik stören. [76-78]

### 7.1.1 Test verschiedener Extraktionsmittel

Im Rahmen dieser Untersuchung wurden die drei in der Rückstandsanalytik vornehmlich genutzten organischen Lösungsmittel (MeOH, ACN und Aceton) in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen mit Wasser getestet.

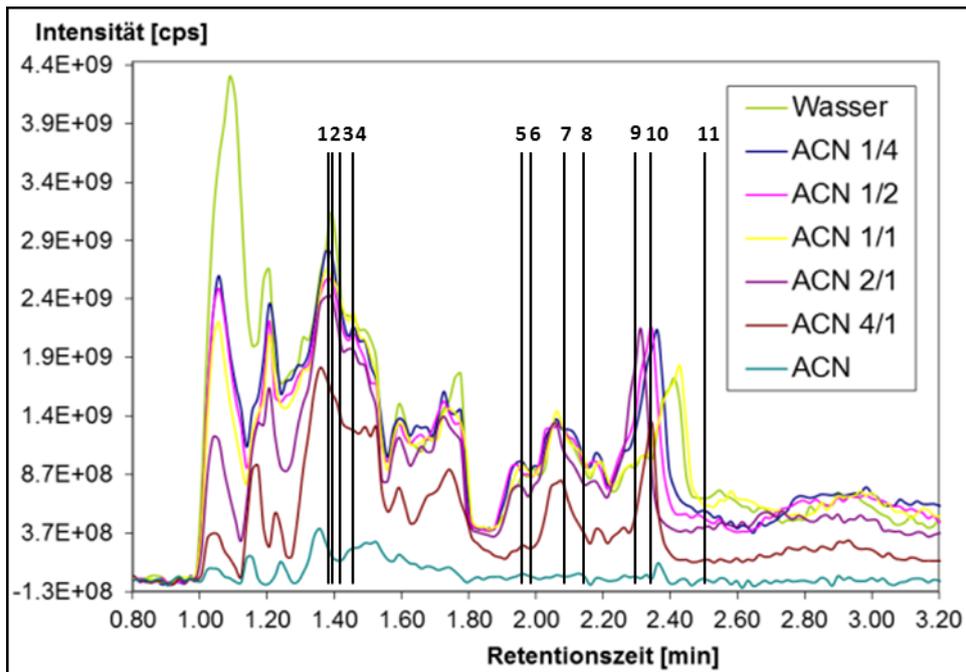
In Abb. 11 sind die Q3-Fullscans der verschiedenen Methanol-Wasser-Gemische von Hartweizen dargestellt. Es fällt auf, dass mit zunehmendem Anteil an Methanol im Extraktionsmittel, die Intensitäten der Q3-Fullscans zu den Retentionszeiten der Analyten abnehmen. Dies bedeutet eine Abnahme der mit-extrahierten Matrixbestandteile. Bei der Gurke (siehe Abb. 12) zeigt sich ein ähnliches Bild, wenn auch die Matrixeffekte nicht so stark ausgeprägt sind wie bei Hartweizen. Demnach sollten die Matrixeffekte bei hohem Methanolanteil im Extraktionsmittel am geringsten ausfallen. Limitiert wird dies jedoch mit einer Abnahme der Extraktionseffizienz einiger Analyten.



Die Extraktionseffizienz wurde über die Bestimmung der Wiederfindung an der 10-fachen Bestimmungsgrenze ermittelt. Ist die Wiederfindung sehr gering, so ist dies ein Zeichen für eine mangelnde Effizienz des Extraktionsmittels. Wird hingegen eine zu hohe Wiederfindung beobachtet, so ist dies ein Indiz für das Vorhandensein von Interferenzen durch mit-extrahierte Matrixkomponenten. Da es sich um Wiederfindungen in Matrix handelt, werden Wiederfindungen von 75 - 120 % toleriert. Die Ergebnisse der Wiederfindungen der einzelnen Analyten bei den verschiedenen Extraktionsmitteln befinden sich in Tab. 11. Mit Wiederfindungen von 90 % in Gurke und 100 % in Hartweizen beim Analyten Triazol kann 100 % Methanol für die Extraktion verwendet und dadurch eine minimale Mitextraktion von Matrixbestandteilen erreicht werden. Jedoch wird neben dem Triazol auch noch TAL, TAA und TLA analysiert. Die Analytik des Triazols mit einem anderen Extraktionsverfahren als bei den übrigen TDMs durchzuführen würde ggf. Vorteile für die Bestimmung des Triazols bringen, ist aber in der Rückstandsanalytik nicht routinetauglich aufgrund des höheren Zeit- und Kostenaufwands. Für TAL, TAA und TLA wurden v. a. in Hartweizen ungenügende Wiederfindungen bei 100 % Methanol als Extraktionsmittel mit 48 % für TAL, 44 % für TLA und 50 % für TAA bestimmt. Daher ist für die TDMs ein Extraktionsmittel mit einem Methanol-zu-Wasser-Anteil von maximal 4/1 geeignet. Gleiches Verhalten zeigen Ethephon und HEPA. Auch hier ist ein Methanol-zu-Wasser-Anteil von maximal 4/1 geeignet, da bei höherem Anteil von Methanol Wiederfindungen für das HEPA von 78 % in Gurke bzw. 64 % in Hartweizen erreicht werden. Auch bei der Phosphonsäure wird eine Abnahme der Extraktionseffizienz mit zunehmendem Anteil an Methanol beobachtet. Eine optimale Extraktion von Glufosinat wird erreicht, wenn auf Methanol bei der Extraktion verzichtet wird. Hier wurden bei Hartweizen nur Wiederfindungen im Bereich von 14 - 74 % bestimmt. Für die DFA hingegen kann mit Wiederfindungen von 92 % in Gurke und 86 % in Hartweizen reines Methanol für die Extraktion verwendet werden.

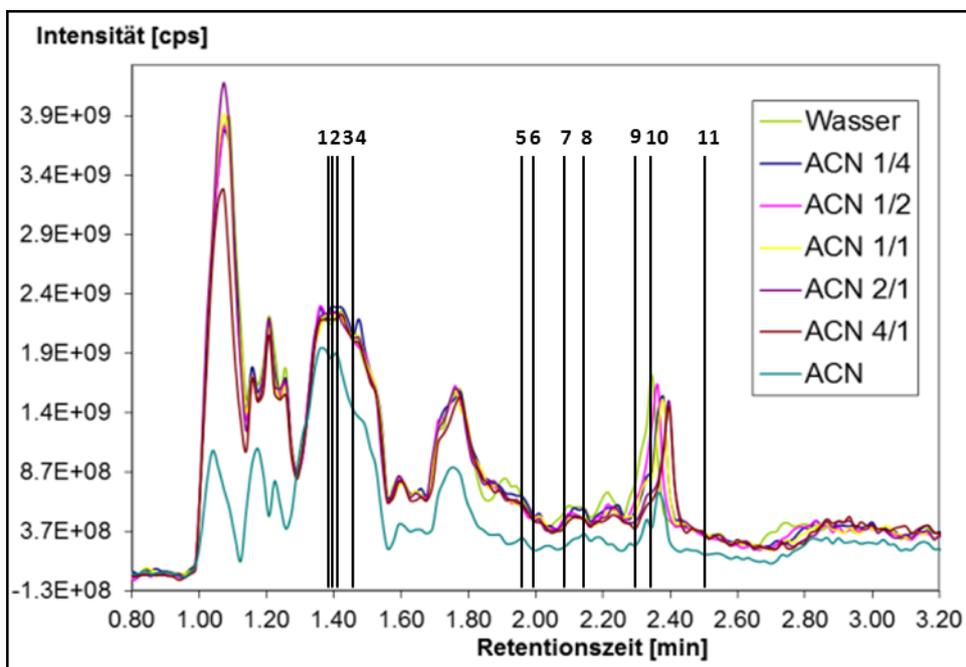
Die Ergebnisse der Tests mit Acetonitril und Aceton ähneln sehr denen mit Methanol und sind in Abb. 13 bis Abb. 16 dargestellt. Auch hier sinkt mit steigendem Organikanteil im Extraktionsmittel die Menge mit-extrahierter Matrixkomponenten.

Auch bei Aceton und ACN werden Limitierungen anhand der Extraktionseffizienz der Analyten (siehe Tab. 11) beobachtet, weshalb ein hoher Anteil dieser organischen Lösungsmittel im Extraktionsmittel nicht in jedem Fall anwendbar ist.



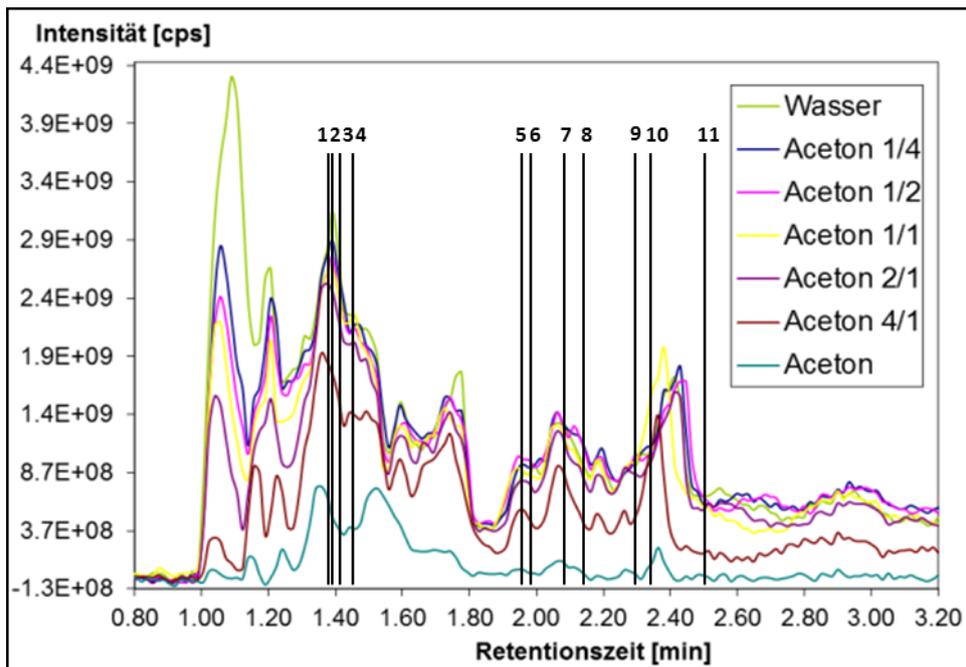
**Abb. 13: Q3-Fullscan von ACN-H<sub>2</sub>O-Extraktionsgemischen in Hartweizen**

1 Phosphonsäure, 2 Glufosinat, 3 HEPA, 4 TAL, 5 DFA, 6 TRZ, 7 Ethephon, 8 MPPA, 9 TAA, 10 TLA, 11 NAG



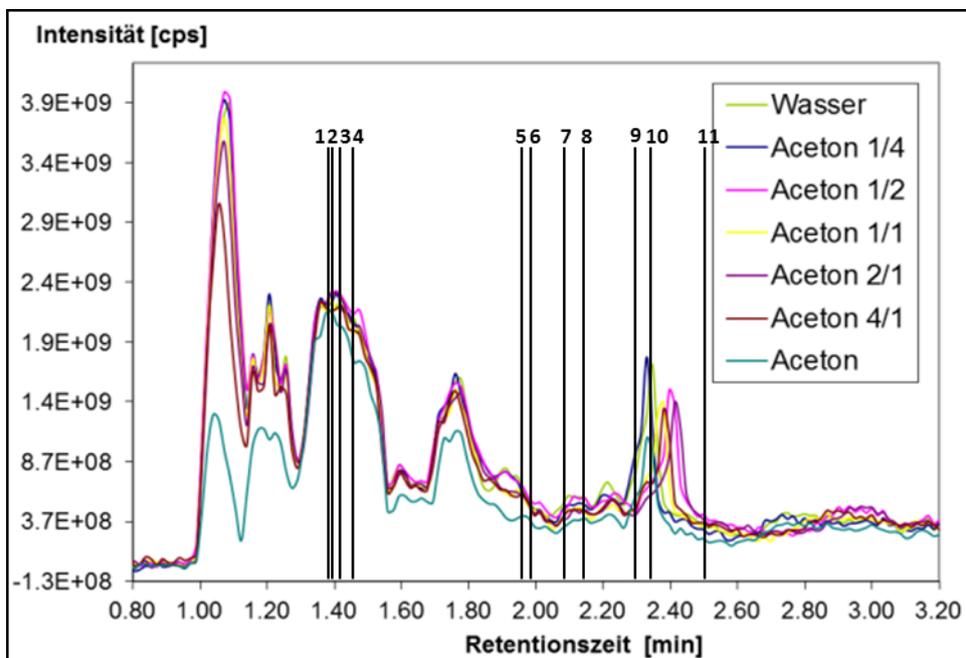
**Abb. 14: Q3-Fullscan von ACN-H<sub>2</sub>O-Extraktionsgemischen in Gurke**

1 Phosphonsäure, 2 Glufosinat, 3 HEPA, 4 TAL, 5 DFA, 6 TRZ, 7 Ethephon, 8 MPPA, 9 TAA, 10 TLA, 11 NAG



**Abb. 15: Q3-Fullscan von Aceton-H<sub>2</sub>O-Extraktionsgemischen in Hartweizen**

1 Phosphonsäure, 2 Glufosinat, 3 HEPA, 4 TAL, 5 DFA, 6 TRZ, 7 Ethephon, 8 MPPA, 9 TAA, 10 TLA, 11 NAG



**Abb. 16: Q3-Fullscan von Aceton-H<sub>2</sub>O-Extraktionsgemischen in Gurke**

1 Phosphonsäure, 2 Glufosinat, 3 HEPA, 4 TAL, 5 DFA, 6 TRZ, 7 Ethephon, 8 MPPA, 9 TAA, 10 TLA, 11 NAG

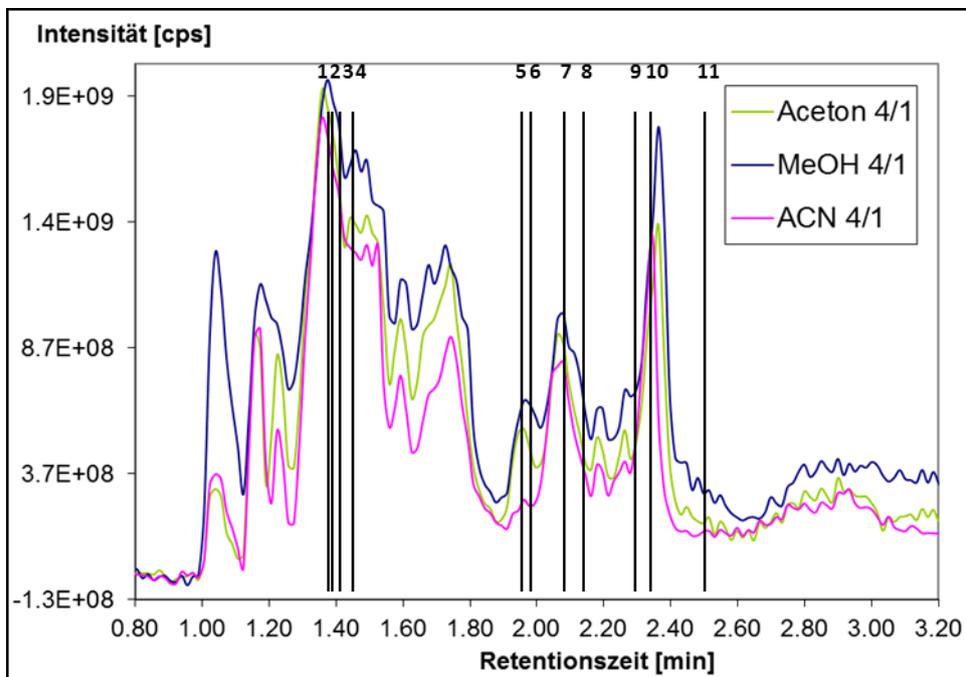
**Tab. 11: Wiederfindungen Analyten bei verschiedenen Extraktionsmitteln**

	[%] WF* vom Analyt (Retentionszeit-Nr.) bei 10xLOQ																					
	TRZ (6)		TAL (4)		TLA (10)		TAA (9)		DFA (5)		Ethephon (7)		HEPA (3)		Phosphons. (1)		Glufosinat (2)		MPPA (8)		NAG (11)	
	Gurke	Weizen	Gurke	Weizen	Gurke	Weizen	Gurke	Weizen	Gurke	Weizen	Gurke	Weizen	Gurke	Weizen	Gurke	Weizen	Gurke	Weizen	Gurke	Weizen	Gurke	Weizen
H2O	106	115	108	92	90	72	85	71	82	87	104	99	112	103	97	85	108	92	94	97	89	101
MeOH/H2O 1/4	104	121	112	101	112	84	80	79	99	119	118	91	96	117	105	87	79	71	95	103	122	106
MeOH/H2O 1/2	100	122	107	103	84	78	85	81	95	92	91	96	102	106	95	79	76	74	102	91	100	92
MeOH/H2O 1/1	99	105	98	82	82	75	82	70	90	104	112	94	88	119	101	88	75	68	111	99	114	84
MeOH/H2O 2/1	97	123	106	93	92	76	79	82	85	82	95	85	94	98	87	78	67	71	94	117	103	93
MeOH/H2O 4/1	91	104	98	79	97	75	81	79	84	87	88	98	85	81	83	71	46	35	98	84	97	98
MeOH	90	100	102	48	90	44	78	50	92	86	91	86	78	64	71	43	29	14	81	83	88	91
ACN/H2O 1/4	96	121	103	94	90	73	79	73	85	93	106	110	91	86	95	88	75	79	81	72	84	86
ACN/H2O 1/2	87	117	91	91	77	76	75	75	91	84	121	99	90	83	91	98	77	71	87	84	99	103
ACN/H2O 1/1	91	121	102	91	86	59	76	75	98	95	105	80	86	61	102	104	68	74	97	86	80	98
ACN/H2O 2/1	106	123	122	67	111	67	87	72	103	88	98	117	77	69	89	82	73	72	105	75	83	107
ACN/H2O 4/1	101	100	110	18	102	35	79	34	111	86	102	92	72	49	82	74	65	54	93	68	86	112
ACN	80	16	51	0	85	1	69	0	94	98	94	87	74	36	54	55	44	39	82	79	81	95
Aceton/H2O 1/4	99	112	98	93	82	67	79	77	82	76	97	102	86	82	97	89	81	73	78	75	93	97
Aceton/H2O 1/2	100	115	103	98	64	76	77	76	85	78	104	91	86	78	83	90	74	69	72	76	92	86
Aceton/H2O 1/1	95	104	96	90	83	75	80	77	93	71	87	106	74	76	85	82	72	70	67	63	87	74
Aceton/H2O 2/1	97	106	102	66	76	65	78	59	75	74	91	88	55	58	54	53	55	43	70	65	85	73
Aceton/H2O 4/1	88	106	93	24	78	37	75	30	72	59	100	106	41	37	6	18	49	33	69	58	68	65
Aceton	82	52	81	1	90	1	74	1	78	53	98	84	36	15	3	11	5	4	56	47	76	61

\*... Mittelwert aus Dreifachbestimmung, CV <15 %, Matrixeffekte korrigiert mittels interner Standardsubstanzen bzw.

Matrixstandards

Durch die bisher durchgeführten Untersuchungen wurde festgestellt, dass mit zunehmendem Organikanteil im Extraktionsmittel die Extraktion von gegebenenfalls störenden Matrixbestandteilen abnimmt. In Abb. 17 sind die Q3-Scans von Methanol, Acetonitril und Aceton gegenübergestellt. Bei diesen Daten kann beurteilt werden, bei welchem dieser organischen Lösungsmittel am wenigsten störende Matrixbestandteile aus Hartweizen mit-extrahiert werden. Hierbei erweist sich Acetonitril als das Lösungsmittel, bei dem die geringsten und Methanol bei dem die höchsten Mengen an Matrixbestandteilen mit-extrahiert werden. Jedoch liegt im Falle der TDMs TAL, TLA und TAA eine schlechtere Extraktionseffizienz mit Acetonitril und Aceton vor, weshalb Methanol zu bevorzugen ist. Beispielhaft sei hier TAL in Hartweizen genannt, wo bei einem Methanol-Wasser-Gemisch (4/1, v/v) 79 %, bei einem ACN-Wasser-Gemisch (4/1, v/v) 18 % und bei einem Aceton-Wasser-Gemisch (4/1, v/v) 24 % Wiederfindung ermittelt wurden. Im Falle von der Difluoressigsäure und der Phosphorigen Säure ist ein Gemisch aus Wasser und Acetonitril sehr gut für die Extraktion geeignet und aufgrund der geringeren Mitextraktion von Matrixbestandteilen dem Methanol zu bevorzugen.



**Abb. 17: Q3-Fullscan verschiedener organischer Lösungsmittel in Hartweizen**

1 Phosphonsäure, 2 Glufosinat, 3 HEPA, 4 TAL, 5 DFA, 6 TRZ, 7 Ethephon, 8 MPPA, 9 TAA, 10 TLA, 11 NAG

In Tab. 12 sind die Extraktionsmittel für die Analyten aufgelistet, die von der Bayer CropScience AG radiovalidiert wurden. Bei einer Radiovalidierung wird die Extraktionseffizienz des Extraktionsmittels anhand der Wiederfindung gewachsener, radioaktiver Rückstände ermittelt. Vergleicht man diese mit den Ergebnissen dieses Extraktionsmitteltests, so stimmen für viele Analyten die Extraktionsmittel überein. Somit konnte mit diesen Untersuchungen bestätigt werden, dass es sich bei den meisten der von Bayer CropScience AG radiovalidierten Extraktionsmittel um optimale Bedingungen hinsichtlich der Mitextraktion von Matrixbestandteilen handelt. Im Falle der Difluoressigsäure gibt es Unterschiede, so wird ein Acetonitril-Wasser-Gemisch von 4/1 verwendet anstelle von reinem Acetonitril. Bei reinem Acetonitril im Vergleich zu dem Gemisch werden weniger Matrixbestandteile extrahiert. Der Unterschied zwischen diesen beiden Extraktionsmitteln ist jedoch gering und rechtfertigt somit nicht den Aufwand einer Radiovalidierung von Acetonitril als Extraktionsmittel für die Difluoressigsäure. Daher werden für alle nachfolgenden Untersuchungen dieser Arbeit die radiovalidierten Extraktionsmittel der Bayer CropScience AG verwendet.

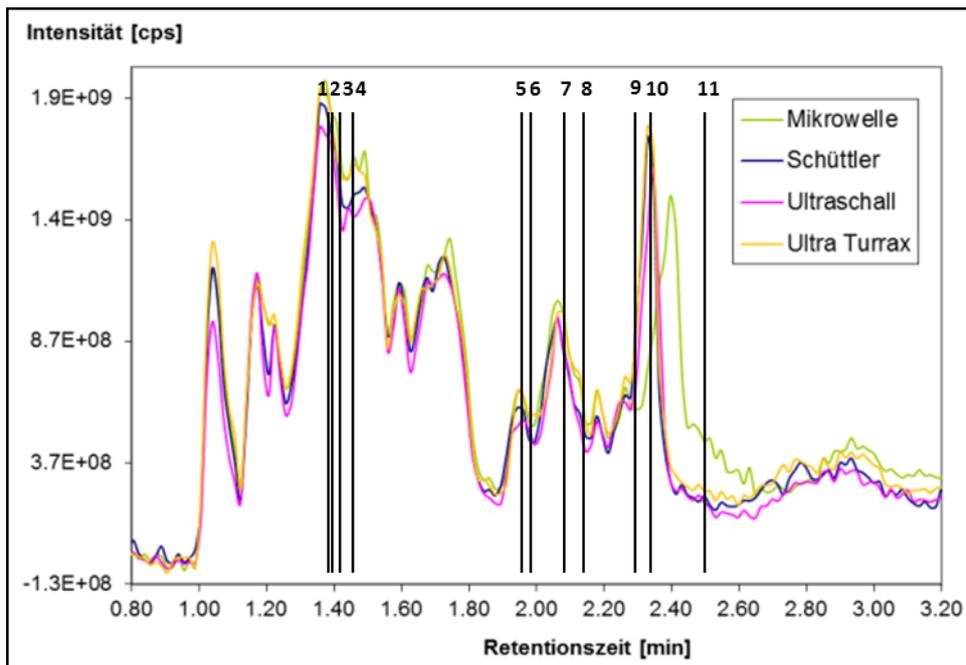
**Tab. 12: Ergebnisse und radiovalidierte Extraktionsmittel [Bayer CropScience AG]**

<b>Analyt</b>	<b>Ergebnis Test Extraktionsmittel</b>	<b>Radiovalidiertes Extraktionsmittel</b>
1,2,4-Triazol Triazolyl-essigsäure Triazolyl-milchsäure Triazolyl-alanin	ACN / H <sub>2</sub> O (4/1, v/v) MeOH / H <sub>2</sub> O (4/1, v/v) * MeOH / H <sub>2</sub> O (4/1, v/v) * MeOH / H <sub>2</sub> O (4/1, v/v) *	MeOH / H <sub>2</sub> O (4/1, v/v)
Difluoressigsäure	ACN	ACN / H <sub>2</sub> O / HFo (4/1/0,011, v/v/v)
Ethephon HEPA	ACN MeOH / H <sub>2</sub> O (4/1, v/v) *	MeOH / H <sub>2</sub> O / HFo (1/1/0,002, v/v/v)
Phosphonsäure	ACN / H <sub>2</sub> O (1/1, v/v)	ACN / H <sub>2</sub> O (1/1, v/v)
Glufosinat-ammonium MPPA NAG	H <sub>2</sub> O * MeOH / H <sub>2</sub> O (4/1, v/v) ACN / H <sub>2</sub> O (4/1, v/v)	H <sub>2</sub> O

\* ... für alle Analyten einer Wirkstoffgruppe geeignet

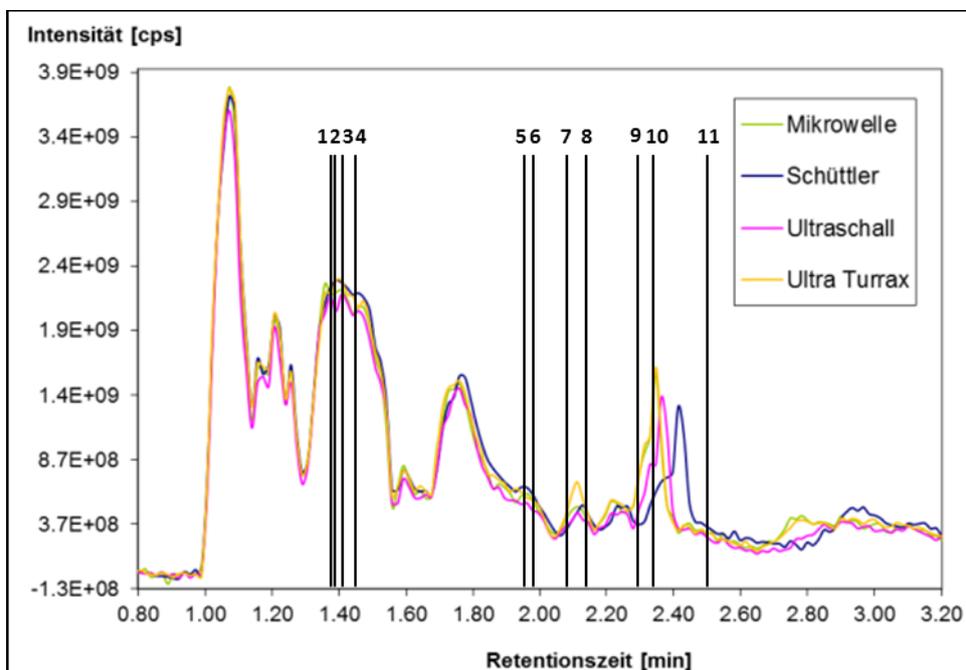
### **7.1.2 Test verschiedener Behandlungen während der Extraktion**

Der Unterschied zwischen den Extraktionsverfahren bezüglich der mit-extrahierten Matrixkomponenten ist sehr gering. In Hartweizen (siehe Abb. 18) ist eine leichte Tendenz zu erkennen, dass bei der Ultraschallbehandlung und beim Schütteln weniger Matrix mit-extrahiert wird als bei der Behandlung mit Ultra Turrax und Mikrowelle. Ein vergleichbares Ergebnis wurde auch in Gurke (siehe Abb. 19) ermittelt, wenn auch die Matrixeffekte nicht so stark ausgeprägt sind wie bei dem Hartweizen.



**Abb. 18: Q3-Fullscan verschiedener Extraktionsverfahren in Hartweizen**

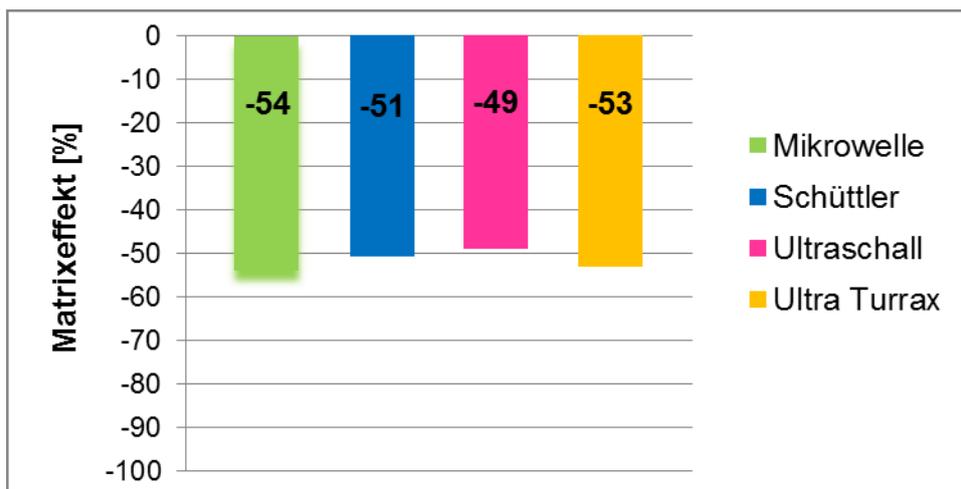
1 Phosphonsäure, 2 Glufosinat, 3 HEPA, 4 TAL, 5 DFA, 6 TRZ, 7 Ethephon, 8 MPPA, 9 TAA, 10 TLA, 11 NAG



**Abb. 19: Q3-Fullscan verschiedener Extraktionsverfahren in Gurke**

1 Phosphonsäure, 2 Glufosinat, 3 HEPA, 4 TAL, 5 DFA, 6 TRZ, 7 Ethephon, 8 MPPA, 9 TAA, 10 TLA, 11 NAG

Die ermittelten Unterschiede bezüglich der mit-extrahierten Matrixkomponenten hatten nur sehr geringe Auswirkungen auf die bestehenden Matrixeffekte. Die Auswirkungen verschiedener Extraktionen werden exemplarisch am Beispiel des internen Standards für TAL in Hartweizen gezeigt (Abb. 20). Die Berechnung des Matrixeffektes erfolgte nach Formel 4. Bei der Aufarbeitung mittels Ultraschall wurde ein Matrixeffekt des TAL-IS von -49 % bestimmt. Dies bedeutet eine Signalunterdrückung durch mit-extrahierte Matrixkomponenten um 49 %. Bei der Extraktion mit Schüttler wurde ein Matrixeffekt von -51 %, mit dem Ultra Turrax von -53 % und mit Mikrowellen von -54 % ermittelt. Bei der Behandlung mit dem Ultra Turrax und der Mikrowelle sind die Suppressionseffekte demnach nur um wenige Prozent stärker ausgeprägt. Es kann daher kein nennenswerter Einfluss auf die Mitextraktion von Matrixkomponenten über das Extraktionsverfahren genommen werden.



**Abb. 20: Suppression TAL-ISTD in Hartweizen bei den Extraktionsverfahren**

Die Extraktionseffizienz wurde über die Bestimmung der Wiederfindungen bei dem 10-fachen der Bestimmungsgrenze geprüft. Die Ergebnisse sind in Tab. 13 zusammengefasst. Bis auf TLA und TAA wurden bei allen getesteten Extraktionsverfahren ausreichend gute Extraktionseffizienzen für die Analyten bestimmt. So liegen die ermittelten Wiederfindungen im Bereich von 80 - 116 %. Im Falle von TLA und TAA wurden bei der Behandlung mit Mikrowellen und Ultraschallwellen geringere Extraktionseffizienzen ermittelt. So liegen die bestimmten Wiederfindungen im Bereich von 59 - 79 %.

Für die weitere Arbeit wurde die Homogenisierung mittels Ultra Turrax als Extraktionsverfahren verwendet. Dieses Verfahren wurde auch bei der Radiovalidierung der Bayer CropScience AG bei allen Analyten verwendet und so ist gesichert, dass auch bei gewachsenen Rückständen eine ausreichende Extraktionseffizienz gegeben ist.

**Tab. 13: Wiederfindungen Analyten bei verschiedenen Extraktionsverfahren**

	[%] WF* vom Analyt (Retentionszeit-Nr.) bei 10xLOQ																					
	TRZ (6)		TAL (4)		TLA (10)		TAA (9)		DFA (5)		Ethephon (7)		HEPA (3)		Phosphons. (1)		Glufosinat (2)		MPPA (8)		NAG (11)	
	Gurke	Weizen	Gurke	Weizen	Gurke	Weizen	Gurke	Weizen	Gurke	Weizen	Gurke	Weizen	Gurke	Weizen	Gurke	Weizen	Gurke	Weizen	Gurke	Weizen	Gurke	Weizen
Ultra Turrax	99	93	107	84	85	87	85	91	94	87	109	97	81	84	80	107	90	87	93	87	91	88
Schüttler	89	105	99	99	80	83	94	85	111	82	95	82	100	108	86	98	92	86	102	116	90	91
Mikrowelle	80	113	85	95	64	65	79	74	89	85	86	103	89	95	91	101	97	91	86	88	96	83
Ultraschall	83	110	89	97	73	59	75	69	103	91	104	85	96	90	84	96	84	81	82	77	80	79

\*... Matrixeffekte korrigiert mittels interner Standardsubstanzen bzw. Matrixstandards

## 7.2 Extraktreinigung

Im Abschnitt 7.1 wurde gezeigt, dass trotz Optimierung des Extraktionsverfahrens Matrixkomponenten in den erhaltenen Extrakten vorliegen. Diese stören die nachfolgende Analytik der gewählten Komponenten. Dies äußert sich zum einen in Interferenzen und hohem chemischen Untergrund in den MS-Chromatogrammen, so wie es der Fall bei den TDMs ist (beispielhaft in Abb. 4 gezeigt). Zum anderen liegen Matrixeffekte vor. Nach Anwendung des in Abschnitt 7.1 optimierten Extraktionsverfahrens liegen für die Analyten in Tab. 14 zusammengestellten Matrixeffekte in Gurke und Hartweizen vor. Die Ermittlung der Matrixeffekte erfolgte anhand der Peakflächen des internen Standards in Lösungsmittel sowie in Matrix und wurde mit Formel 4 berechnet. Da kein interner Standard für die Phosphonsäure zur Verfügung stand, wurden die Peakflächen des Analyten in Lösungsmittel und Matrixstandards verwendet.

**Tab. 14: Matrixeffekte der Analyten in Gurke und Hartweizen**

Analyt	Matrixeffekt [%]	
	Gurke	Weizen
TRZ	-37	-58
TAL	-58	-53
TLA	-32	-47
TAA	-55	-76
DFA	-17	-42
Ethephon	-3	-6
HEPA	12	-38
Phosphons.	-3	-7
Glufosinat	-7	-38
MPPA	-17	-13
NAG	-5	-33

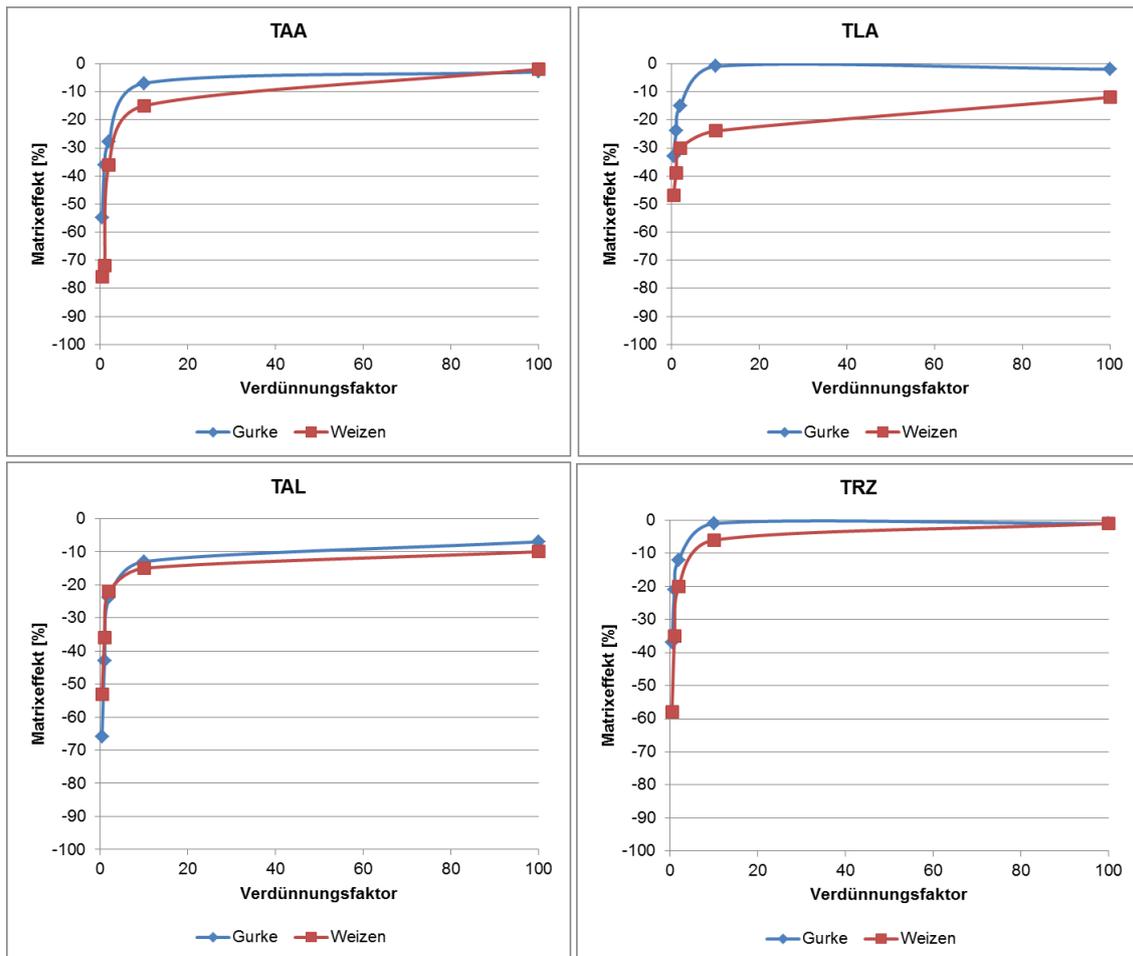
Alle Analyten weisen negative Matrixeffekte auf, welches eine Unterdrückung des Analytsignales bedeutet. Im Vergleich zu Gurke, gilt Hartweizen aufgrund des geringeren Wassergehaltes als die „schwierigere“ der beiden Matrices. Dies äußert sich auch bei den Matrixeffekten, die bei Hartweizen stärker vorliegen. Vergleicht man die Analyten untereinander, so fällt auf, dass besonders bei den TDMs große Matrixeffekte bestehen. So gibt es hier Unterdrückungen der Analytsignale um 37 - 58 % in Gurke und 47 - 76 % in Hartweizen.

Die stärksten Signalunterdrückungen liegen bei TAA vor. Hier wurde ein Matrixeffekt von -55 % in Gurke und -76 % in Weizen bestimmt.

In diesem Kapitel wird zum einen die Verringerung der Matrixeffekte durch Extraktverdünnung diskutiert als auch die Entfernung der mit-extrahierten Komponenten durch Aufreinigung der Extrakte.

### **7.2.1 Extraktverdünnung**

Die Verdünnung des Extraktes ist eine sehr einfache Methode zur Reduzierung von Matrixeffekten. In der Analytik von Pflanzenschutzmitteln in pflanzlichen Materialien ist es eine bewährte Methode. Der erforderliche Verdünnungsfaktor, bei dem Matrixeffekte ausreichend eliminiert sind, schwankt in Abhängigkeit vom Analyten und der Matrix um den Faktor 10 bis 100 [79-80]. Es soll daher getestet werden, ob auch im Falle von hochpolaren Pflanzenschutzmitteln eine Extraktverdünnung hilfreich zur Vermeidung der Matrixeffekte ist. Da die Matrixeffekte am stärksten bei den TDMs auftraten, wurde für diese am Beispiel Gurke und Hartweizen der Test verschiedener Extraktverdünnungen durchgeführt. Für alle 4 TDMs lässt sich ein exponentielles Verhalten zwischen Verdünnungsfaktor und Matrixeffekt feststellen. Bei der Gurke lassen sich die Matrixeffekte mit einer 1:10 Verdünnung des Extraktes relativ gut eliminieren. So liegt eine Unterdrückung des Analytsignals von unter 13 % vor. Beim Hartweizen liegen bei einer 1:10 Verdünnung noch stärkere Matrixeffekte vor. Besonders bei TLA mit -24 %. Hier ist eine 1:10 Verdünnung noch nicht ausreichend zur Reduzierung der Matrixeffekte. Erst bei einer Verdünnung von 1:100 kann ein Matrixeffekt von -10 % beobachtet werden. Diese starken Matrixeffekte lassen sich mit der Co-Elution von mit-extrahierten Matrixkomponenten erklären, die bei TLA sehr stark ausgeprägt ist (siehe Abb. 18). Je höher die Menge an ko-eluierenden Matrixkomponenten ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass große Matrixeffekte auftreten. Die Ergebnisse dieses Tests sind in Abb. 21 dargestellt.



**Abb. 21: Matrixeffekt bei verschiedenen Verdünnungen bei den TDMs**

Nachteil bei der Reduzierung der Matrixeffekte mittels Verdünnung ist, dass die Analyten selbst auch verdünnt werden. So reicht die Empfindlichkeit des API 4000™ nicht aus, um die TDMs nach einer 1:10 Verdünnung bei einem Rückstand von 0,01 mg/kg zu detektieren. So ist es bei den TDMs notwendig, weiterhin den Extrakt leicht anzureichern, entsprechend einem Verdünnungsfaktor von 0,4.

So muss entweder ein empfindlicheres Detektionssystem verwendet werden oder die mit-extrahierten Matrixverbindungen müssen abgetrennt werden. Letzteres kann entweder durch eine Extraktreinigung mittels SPE erfolgen oder durch Optimierung des Trennverfahrens vor der MS/MS-Detektion.

Auch bei den Analyten Ethephon, HEPA, Phosphonsäure, Glufosinat und den Glufosinat-Metaboliten reicht die Empfindlichkeit nicht aus, um die Extrakte im starken Maße verdünnen zu können. Daher werden bei diesen Analyten die Extrakte unverdünnt (Verdünnungsfaktor = 1,0) gemessen. Bei DFA kann eine 1:2 Verdünnung durchgeführt werden, um die Matrixeffekte zu verringern. Welcher Verdünnungsfaktor in den nachfolgenden Tests bei den einzelnen Analyten verwendet wird, ist in Tab. 15 zusammengefasst.

**Tab. 15: Verdünnungsfaktoren der einzelnen Analyten**

<b>Analyt</b>	<b>Verdünnungsfaktor</b>
1,2,4-Triazol Triazolyl-essigsäure Triazolyl-milchsäure Triazolyl-alanin	0,4
Difluoressigsäure	2,0
Ethephon HEPA	1,0
Phosphonsäure	1,0
Glufosinat-ammonium MPPA NAG	1,0

### 7.2.2 Festphasenextraktion

Die Festphasenextraktion (SPE = solid phase extraction) ist das gängigste Verfahren in der Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln, um mit-extrahierte Matrixkomponenten aus dem Extrakt zu entfernen. Neben der SPE wird auch die Flüssigextraktion mit einer Kartusche (SLE = solid supported liquid extraction) die Diatomeenerde (ChemElut) enthält, gern verwendet. Allerdings erfordert dies eine gute Löslichkeit des Analyten in unpolaren Lösungsmitteln. Da dies bei den sehr polaren Analyten dieser Arbeit nicht gegeben ist, ist die Extraktreinigung mittels ChemElut nicht geeignet.

Bei der SPE werden Kartuschen verwendet, in denen sich ein Adsorbiermaterial befindet. Idealerweise zeigt der Analyt eine stärkere Wechselwirkung mit diesem Material als die Matrix, so dass diese abgetrennt werden kann. Es kann aber auch der umgekehrte Fall vorliegen, wo die Matrix stärker als der Analyt am Adsorbiermaterial gehalten wird und die Analyten mit dem Waschvorgang eluieren. Die SPE besteht aus folgenden Arbeitsschritten: Konditionierung des Adsorbiermaterials, Probenaufgabe, Waschen, Trocknen und der Elution. [81, 82] In Abhängigkeit von dem Adsorbiermaterial und den vorliegenden Wechselwirkungen unterteilt man klassischerweise in 3 verschiedene Arten von SPE: die polare SPE, die unpolare SPE und die Ionenaustausch-SPE. Die polare SPE eignet sich für Extrakte, welche aus unpolaren Lösungsmitteln bestehen. Die Analyten weisen in der Regel polare Gruppen auf, über die mittels Dipol-Dipol-Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen Wechselwirkungen mit dem SPE-Material stattfinden. Bei der unpolaren SPE muss der Extrakt wässrig bzw. mischbar mit Wasser sein. Hier führen van-der-Waals-Kräfte zur Retention der Komponenten auf dem SPE-Material. Liegen die Analyten im Extrakt in ionischer Form vor, so kann die Ionenaustausch-SPE angewandt werden. Hier werden elektrostatische Wechselwirkungen (Coulomb-Wechselwirkungen) genutzt. Die SPE-Materialien bestehen meist aus einem kieselgelbasierenden oder aus einem polymerbasierenden Material. [82]

Die gewählten Analyten dieser Arbeit sind aufgrund ihrer Eigenschaften nicht mit einem unpolaren Lösungsmittel extrahierbar und somit kann die polare SPE direkt als Aufreinigungsverfahren ausgeschlossen werden. Sowohl die unpolare SPE als auch die Ionenaustausch-SPE kann bei den vorliegenden Analyten angewendet werden.

Alle getesteten SPE-Materialien sind in Tab. 6 aufgelistet. Es wurden verschiedene unpolare SPE-Materialien eingesetzt, die entweder kieselgelbasierend, polymerbasierend oder graphitbasierend sind. Des Weiteren wurden verschiedene Ionenaustauschmaterialien ausgewählt. Darunter befinden sich sowohl starke als auch schwache Anionen- und Kationenaustauscher.

Bei der SPE, v. a. bei der Ionenaustausch-SPE, ist es von entscheidender Bedeutung, den Protonierungszustand der Analyten zu kennen. Hierzu kann die Henderson-Hasselbalch-Gleichung zur Hilfe genommen werden. Diese beschreibt das Gleichgewicht zwischen protonierter und deprotonierter Form einer schwachen Base oder Säure in wässriger Lösung. Ist der pH-Wert gleich dem pKs-Wert, so liegen beide Protonierungsformen zu gleichen Teilen vor. Ist nun der pH-Wert größer als  $pKs+2$ , so verschiebt sich das Gleichgewicht zu 100 % zur deprotonierten Form. Möchte man nur die protonierte Form vorliegen haben, so muss der pH-Wert mindestens kleiner  $pKs-2$  betragen. [82, 85]

### 7.2.2.1 *Triazol-Metaboliten*

#### 7.2.2.1.1 *Unpolare SPE*

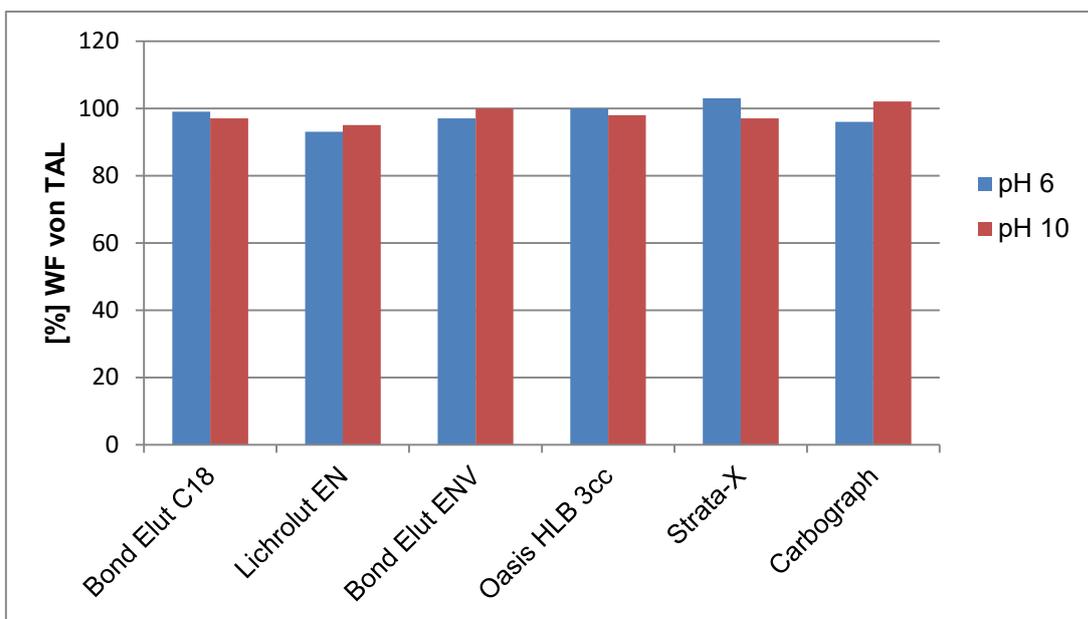
##### 7.2.2.1.1.1 *Vortests*

Bei der unpolaren SPE sind es die van-der-Waals-Kräfte, die für die Wechselwirkung des Analyten mit dem Adsorbentmaterial verantwortlich sind. Diese sind umso größer, je geringer die Anzahl ionischer Ladungen des Analyten ist. TRZ hat die pKs-Werte 2,2 und 10,2 und liegt im pH-Bereich von 4,2 bis 8,2 ungeladen vor. TAA besitzt zwei pKs-Werte. Für die protonierte Form des Essigsäurerestes (pKs  $\sim 3,2$ ) ist ein pH-Wert unter 1,2 erforderlich. Hier liegt jedoch der Stickstoff des Triazolrings des TAAs (pKs  $\sim 2,0$ ) zu über 75 % in deprotonierter Form vor. Vergleichbares trifft auch auf TLA mit den pKs-Werten 3,1 und 2,0 zu. TAL hat neben dem protonierbaren Stickstoff des Triazolrings (pKs  $\sim 2,2$ ), eine primäre Aminogruppe mit einem pKs-Wert von 7,9. Damit diese nicht protoniert vorliegt, ist mindestens ein pH-Wert von 9,9 erforderlich.

Ob die Verwendung eines stark basischen pH-Wertes zu verbesserten Wechselwirkungen des TAL mit den unpolaren SPE-Materialien führt, wurde mittels eines Vortests überprüft. Hierfür wurde TAL-Standardlösung mit den pH-Werten 6 und 10 auf die ausgewählten und entsprechend konditionierten SPE-Materialien gegeben, das Eluat direkt aufgefangen und im Stickstoffevaporator bis zur Trockne eingengt. Der getrocknete Rückstand wurde in Milli-Q-Wasser gelöst und mittels LC-MS/MS vermessen.

Lässt sich das TAL in diesem Eluat zu 100 % wiederfinden, so liegen zu geringe Wechselwirkungen zwischen TAL und SPE-Material vor und die Substanz wird nicht zurückgehalten.

Das Ergebnis dieses Vortests ist in Abb. 22 dargestellt. Bei keiner der verwendeten SPE-Phasen wurde eine Retention von TAL an den Adsorbentmaterialien nachgewiesen und somit liegen die ermittelten Wiederfindungen des TAL im Bereich von 93 - 103 %. Die Erhöhung des pH-Wertes auf 10 führt bei keinem SPE-Material zur verbesserten Wechselwirkung mit TAL. Daher wurde auf die Verwendung eines solchen extremen pH-Wertes verzichtet und für alle TDMs ein neutraler bis schwach saurer pH-Wert bevorzugt. Da das verwendete Milli-Q-Wasser einen pH-Wert von 6 aufwies, wurde diese Bedingung ohne Zusatz von Säure bereits eingestellt.



**Abb. 22: Wiederfindungen TAL bei pH 6 und pH 10**

Ob es Wechselwirkungen zwischen den TDMs und den unpolaren SPE-Materialien gibt und welches Elutionsmittel notwendig ist, um diese wieder zu überwinden, wurde mittels dieses Vortests überprüft. Hierfür wurde eine Standardlösung, die alle 4 TDMs enthält, auf die ausgewählten und konditionierten SPE-Materialien gegeben. Danach wurde mit Wasser, Wasser-Methanol (95/5, v/v), Wasser-Methanol (9/1, v/v) bzw. Wasser-Methanol (8/2, v/v) eluiert. Das Eluat wurde aufgefangen und im Stickstoffevaporator bis zur Trockne eingengt.

Der getrocknete Rückstand wurde in Milli-Q-Wasser gelöst und mittels LC-MS/MS vermessen. Lassen sich die TDMs in diesem Eluat zu 100 % wiederfinden, so liegen zu geringe Wechselwirkungen zwischen ihnen und dem SPE-Material vor und sie werden nicht zurückgehalten. Werden hingegen 0 % wiedergefunden, so wird der Analyt vom SPE-Material festgehalten und kann eventuell somit von störenden Matrixbestandteilen abgetrennt werden.

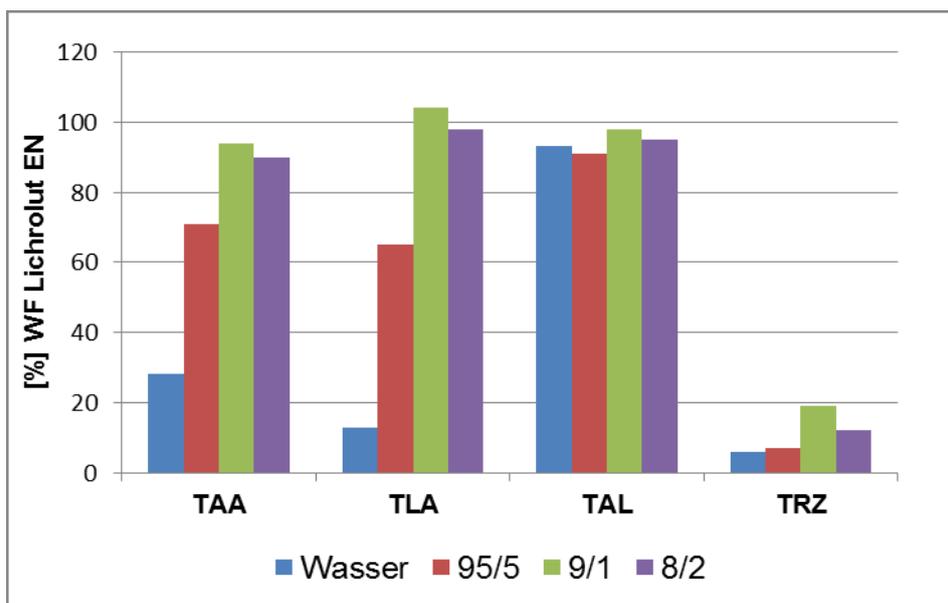
Bis auf TAA, TLA und TRZ bei dem SPE-Material Lichrolut EN wurden keine starken Wechselwirkungen der TDMs mit den getesteten unpolaren SPE-Materialien festgestellt. So eluieren sie direkt bei Aufgabe des wässrigen Extraktes mit Wiederfindungen im Bereich von 89 - 108 %. Dennoch werden diese SPE-Materialien weiter getestet. Schließlich besteht die Möglichkeit, dass störende Matrixbestandteile mit diesen Materialien wechselwirken und somit entfernt werden können. Es ist also nicht auszuschließen, dass Interferenzen und Matrixeffekte damit minimiert werden können. Die Ergebnisse dieses Vortests sind in Tab. 16 zusammengefasst.

**Tab. 16: Ermittelte Wiederfindungen bei dem Elutionsmittel Wasser**

SPE-Material	[%] WF mit H <sub>2</sub> O als Elutionsmittel			
	TAA	TLA	TAL	TRZ
Bond Elut C18	97	94	99	89
Lichrolut EN	28	13	93	6
Bond Elut ENV	97	94	97	98
Oasis HLB 3cc	108	107	100	95
Strata-X	105	100	103	97
Carbograph	94	91	96	104

Im Falle von Lichrolut EN liegen stärkere Wechselwirkungen bei TAA, TLA und TRZ vor. Jedoch bricht schon ein Teil der Analyten TAA und TLA bei der Aufgabe des wässrigen Extraktes durch. Dies ist v. a. bei TAA zu sehen. Hier werden 28 % des TAA in dem Eluat wiedergefunden. Demnach werden nur ca. 2/3 des TAA vom Adsorbermaterial retardiert. Daher muss das wässrige Eluat für die quantitative Bestimmung der TDMs aufgefangen werden und kann nicht verworfen werden. Zusätzlich ist ein Elutionsmittel mit organischem Anteil erforderlich. Es wurden 5 %, 10 % und 20 % Methanol in Wasser getestet.

Wie Abb. 23 entnommen werden kann, sind mindestens 10 % Methanol im Wasser erforderlich, um Wiederfindungen über 90 % von TAA und TLA zu erzielen. Im Fall von Triazol liegen die Wiederfindungen unter 20 %. Für TRZ wurden zusätzlich 100 % Methanol als Elutionsmittel getestet. Hier lag die Wiederfindung bei 72 %. Zusätzlich erhöhte sich das chemische Grundrauschen in den Chromatogrammen von TRZ. Dieses konnte durch einen erhöhten Aufwand bei der Konditionierung des SPE-Materials entfernt werden, indem die dreifache Menge an Methanol und Wasser verwendet wurde. Demnach wurde das erhöhte chemische Grundrauschen durch Verunreinigungen vom SPE-Material verursacht, welche mit der Analytik des TRZs interferieren. Der erhöhte Aufwand bei der Konditionierung führt zu einem höheren Zeitaufwand und Lösungsmittelverbrauch, weshalb es im Routinealltag nicht praktikabel ist. Des Weiteren ist eine Wiederfindung von TRZ mit 72 % ungenügend. Das Lichrolut EN Material wird daher bei der Extraktreinigung von den TDMs nicht weiter berücksichtigt.



**Abb. 23: Wiederfindungen verschiedener Elutionsmittel bei Lichrolut EN**

### 7.2.2.1.1.2 Ergebnisse und Diskussion der finalen Durchführung

Entsprechend der SANCO-Richtlinie [86] müssen 70 - 120 % des Analyten wiedergefunden werden, damit eine ausreichende Richtigkeit der Analyse gewährleistet ist. Bis auf eine Ausnahme wurde bei den getesteten unpolaren SPE-Materialien für die TDMs in Gurke und Hartweizen Wiederfindungen von 70 - 117 % ermittelt und somit die Anforderung der SANCO Richtlinie erfüllt. Lediglich für TAL in Gurke wurde bei dem Material Oasis HLB mit 123 % eine etwas zu hohe Wiederfindung bestimmt. Somit kommt es auch in Anwesenheit von Matrix nicht zu Verlusten der TDMs durch die Aufreinigung mit unpolaren SPE-Materialien. Auch bei einer komplexen Matrix wie Hartweizen konnten gute Wiederfindungen erreicht werden. Die erhaltenen Wiederfindungen sind in Tab. 17 zusammengestellt.

**Tab. 17: Wiederfindungen TDMs nach unpolarer SPE**

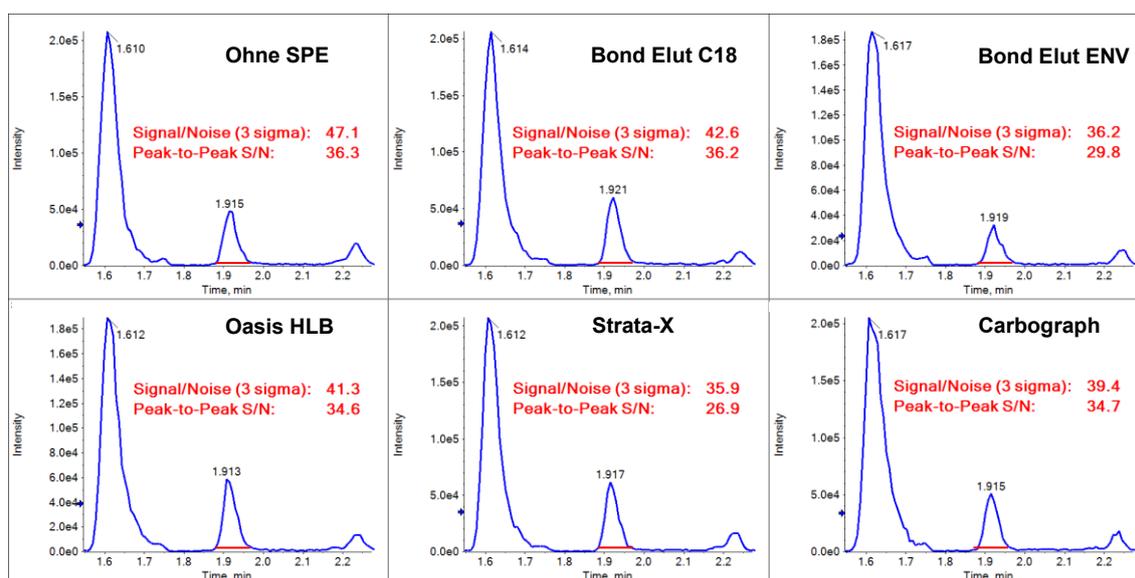
SPE-Material	[%] WF vom Analyt bei 0,10 mg/kg							
	TAA		TLA		TAL		TRZ	
	Gurke	Weizen	Gurke	Weizen	Gurke	Weizen	Gurke	Weizen
Bond Elut C18	87	85	90	86	96	108	92	100
Bond Elut ENV	84	90	112	114	91	108	109	106
Oasis HLB 3cc	99	70	109	95	123	117	105	101
Strata-X	95	79	94	98	101	90	89	107
Carbograph	91	78	77	83	102	101	93	104

Eine positive Auswirkung auf die Analytik der TDMs konnte durch diese SPE-Materialien nicht beobachtet werden. Wie in Tab. 18 zusammengefasst, bewirkte diese Art der Extraktreinigung keine Verringerung der Matrixeffekte (berechnet nach Formel 4). So liegt zum Beispiel bei TAL in Weizen ohne SPE-Aufreinigung ein Matrixeffekt von -46 % vor und nach den SPE-Aufreinigungen im Bereich von -51 - -45 % vor. Es bestehen somit nach der Aufreinigung mit den unpolaren SPE-Materialien vergleichbare Suppressionseffekte des Analytsignales wie ohne Aufreinigung.

**Tab. 18: Matrixeffekte TDMs nach unpolarer SPE**

SPE-Material	Matrixeffekt [%]							
	TAA		TLA		TAL		TRZ	
	Gurke	Weizen	Gurke	Weizen	Gurke	Weizen	Gurke	Weizen
ohne SPE	-49	-67	-26	-46	-64	-46	-28	-73
Bond Elut C18	-53	-78	-26	-35	-62	-47	-32	-68
Bond Elut ENV	-58	-76	-32	-46	-59	-45	-33	-67
Oasis HLB 3cc	-54	-80	-29	-40	-62	-51	-35	-73
Strata-X	-61	-81	-40	-46	-63	-51	-42	-69
Carbograph	-42	-62	-11	-41	-55	-42	-48	-69

Auch in den MS-Chromatogrammen lassen sich keine Vorteile der Aufreinigung mit unpolaren SPE erkennen. Interferenzen konnten nicht entfernt werden. Des Weiteren wurde keine Erniedrigung des chemischen Untergrunds erreicht. Letzteres lässt sich über die Bestimmung des Signal-zu-Rauschverhältnisses (Formel 6 und Formel 7) beobachten. Der Vergleich des chemischen Untergrunds anhand der ermittelten Signal-zu-Rauschverhältnisse wird in Abb. 24 beispielhaft für Triazol in Hartweizen dargelegt. Ohne SPE wurde ein Signal-zu-Rauschverhältnis von 47,1 (3 sigma) bzw. 36,3 (Peak-to-Peak) bestimmt. Nach Aufreinigung mit unpolaren SPE-Materialien wurden Signal-zu-Rauschverhältnisse im Bereich von 35,9 - 42,6 (3 sigma) bzw. 26,9 - 36,2 (Peak-to-Peak) ermittelt. Die unpolare SPE ist daher kein geeignetes Verfahren zur Extraktaufreinigung bei der Analytik der TDMs.



**Abb. 24: Signal-Rausch-Verhältnisse nach unpolarer SPE von TRZ in Hartweizen**

### 7.2.2.1.2 Kationenaustausch-SPE

Alle 4 TDMs weisen den 1,2,4-Triazol-Ring als Grundbaustein auf. Der Stickstoff an der vierten Position dieses Grundbausteins weist einen pKs-Wert von ca. 2,0 - 2,2 auf. Bei sehr niedrigen pH-Werten ist demnach eine positive Ladung durch Vorliegen der protonierten Form dieses Stickstoffs denkbar. TAL besitzt neben diesem Triazol-Ring auch noch eine primäre Aminogruppe (pKs 7,9) und weist daher die stärksten kationischen Eigenschaften von den vier TDMs auf. Bei TLA und TAA sind aufgrund ihres Milch- bzw. Essigsäurerestes nur sehr schwache kationische Eigenschaften zu erwarten.

#### 7.2.2.1.2.1 Wahl des pH-Wertes für die Probenaufgabe auf die SPE

Ziel ist es Bedingungen der Probenaufgabe zu ermitteln, bei denen eine Retention der Analyten auf dem SPE-Material stattfindet. Hierfür wurde eine Standardlösung verschiedener pH-Werte auf die ausgewählten und entsprechend konditionierten SPE-Materialien gegeben, das Eluat direkt aufgefangen und im Stickstoffevaporator bis zur Trockne eingengt. Der getrocknete Rückstand wurde in Milli-Q-Wasser gelöst und mittels LC-MS/MS vermessen. Lassen sich die TDMs in diesem Eluat zu 100 % wiederfinden, so liegen zu geringe Wechselwirkungen zwischen ihnen und dem SPE-Material vor und sie werden nicht zurückgehalten. Werden hingegen 0 % wiedergefunden, so wird der Analyt vom SPE-Material festgehalten und kann eventuell somit von störenden Matrixbestandteilen abgetrennt werden.

Die getesteten pH-Bereiche und die verwendeten Additive, um diesen einzustellen, sind in Tab. 19 zusammengefasst.

**Tab. 19: Getestete pH-Werte bei Probenaufgabe Kationenaustausch-SPE**

<b>pH-Wert</b>	<b>Additiv zum Milli-Q-Wasser</b>
6,9	Ammoniumacetat
6,0	Milli-Q-Wasser ohne Zusatz
2,3	Ameisensäure
1,4	Schwefelsäure

TAL und TRZ verhalten sich vergleichbar bei den getesteten Kationenaustausch-SPEs. Auf dem Strata-X-CW-Material sind die ionischen Wechselwirkungen zwischen dem Material und den Analyten zu schwach und somit werden nahezu 100 % an TAL und TRZ im Eluat wiedergefunden. Auf dem Oasis MCX-Material wird ab pH 2,3 und kleiner eine Retention der Analyten auf dem SPE-Material erreicht, die ermittelten Wiederfindungen liegen bei 0 %. Auf dem Strata-X-C-Material findet bei allen getesteten pH-Werten eine Retention der Analyten statt, es werden 0 % der Analyten wiedergefunden.

TLA und TAA verhalten sich auch vergleichbar bei diesem Test. Auf dem Strata-X-CW-Material werden sie nicht zurückgehalten und eluieren nahezu 100%ig. Bei dem Oasis MCX-Material nehmen die Wechselwirkungen zwischen den Analyten und dem SPE-Material mit sinkendem pH-Wert zu, sind jedoch nicht ausreichend stark, um TLA und TAA vollständig zu retardieren. So werden bei pH 1,4 bei diesem Material 36 % TLA und 64 % TAA wiedergefunden. Auf dem Strata-X-C-Material wird ab pH 2,3 und kleiner eine Retention der Analyten auf dem SPE-Material erreicht.

Das schwache Kationenaustauscher-Material Strata-X-CW eignet sich nicht für die Analytik der TDMs. Das Oasis MCX Material wird weiter untersucht für die Extraktreinigung von TAL und TRZ. Dabei wird bei weiteren Tests ein pH-Wert von 2,3 bei der Probenaufgabe eingestellt. Auch das Strata-X-C-Material wird bei den anschließenden Tests berücksichtigt. Hier würde sich im Falle von TAL und TRZ jeder der getesteten pH-Werte bei der Probenaufgabe eignen. Jedoch findet erst bei einem pH-Wert von 2,3 und kleiner ein Zurückhalten von TAA und TLA statt. Daher wird bei diesem Material ein pH-Wert von 2,3 verwendet, um alle 4 TDMs gleichzeitig mit diesem SPE-Material aufzureinigen zu können.

Die Ergebnisse dieses Tests sind in Abb. 25 dargestellt.

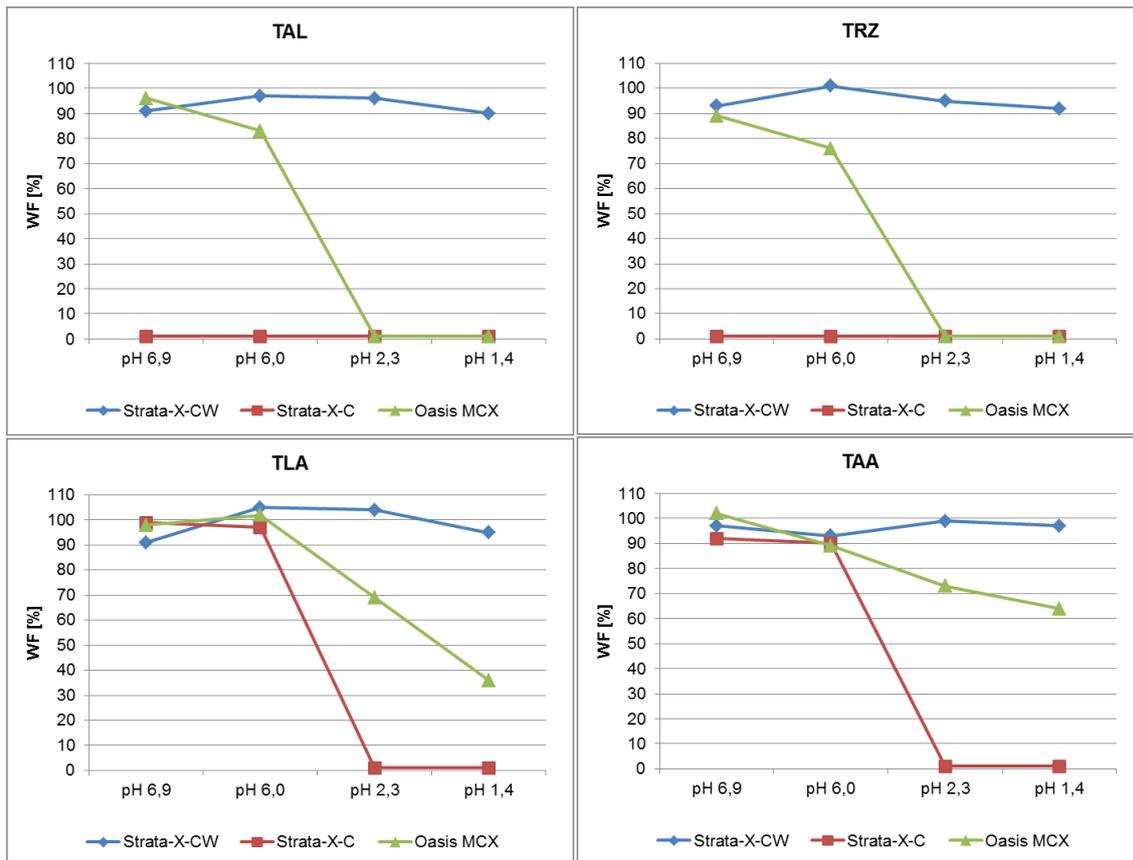


Abb. 25: Wiederfindungen verschiedener pH-Werte bei Probenaufgabe auf SPE

#### 7.2.2.1.2.2 Wahl des pH-Wertes für die Elution vom SPE-Material

Nach Bestimmung der Retentionsbedingungen der einzelnen Analyten auf den SPE-Materialien müssen nun die optimalen Elutionsbedingungen ermittelt werden. Hierfür wurde Standardlösung mit dem zuvor ermittelten pH-Wert auf die ausgewählten und entsprechend konditionierten SPE-Materialien gegeben. Anschließend wurden verschiedene wässrige Lösungen mit unterschiedlichen pH-Werten auf die SPE-Kartusche gegeben, das Eluat aufgefangen und im Stickstoffevaporator bis zur Trockne eingengt. Der getrocknete Rückstand wurde in Milli-Q-Wasser gelöst und mittels LC-MS/MS vermessen. Lassen sich die Analyten in diesem Eluat zu 100 % wiederfinden, so konnten sie von dem SPE-Material gelöst werden. Werden hingegen 0 % wiedergefunden, so wird der Analyt weiterhin vom SPE-Material festgehalten.

Die getesteten pH-Bereiche für die Elution vom SPE-Material und die verwendeten Additive, um diesen einzustellen, sind in Tab. 20 zusammengefasst.

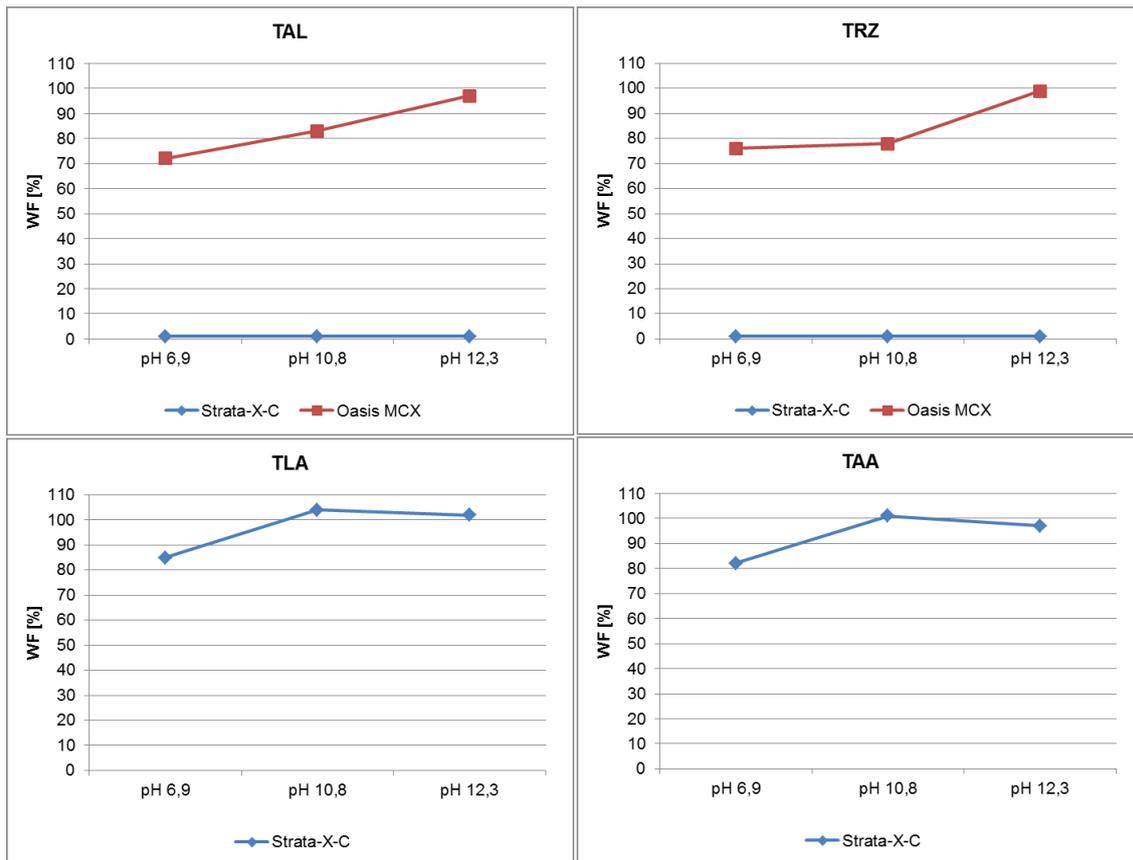
**Tab. 20: Getestete pH-Werte zur Elution von Kationenaustausch-SPE**

<b>pH-Wert</b>	<b>Additiv zum Milli-Q-Wasser</b>
6,9	Ammoniumacetat
10,8	Ammoniak
12,3	Natriumhydroxid

Bei dem Strata-X-C-Material ist es auch mit einem stark basischen pH-Wert nicht möglich, TAL und TRZ vom Material zu eluieren. Für TAL und TRZ ist dieses Material demnach nicht geeignet. TLA und TAA wechselwirken nicht so stark mit diesem Material. Ab einem pH-Wert von 10,8 werden annähernd 100 % von diesen beiden Analyten wiedergefunden.

Bei dem Oasis MCX Material nehmen die Wechselwirkungen zwischen TAL bzw. TRZ mit diesem Material bei zunehmend basischen pH-Wert ab. Um annähernd 100 % wiederzufinden und somit TAL und TRZ vollständig vom Material zu lösen ist ein pH-Wert von 12,3 erforderlich.

Die Ergebnisse dieses Tests sind in Abb. 26 zusammengefasst.



**Abb. 26: Wiederfindungen bei der Elution mit Lösungen verschiedener pH-Werte**

### 7.2.2.1.2.3 Ergebnisse und Diskussion der finalen Durchführung

Entsprechend der SANCO-Richtlinie [86] müssen 70 - 120 % des Analyten wiedergefunden werden, damit eine ausreichende Richtigkeit gewährleistet ist. Dieses ist sowohl bei Hartweizen als auch Gurke für TAL und TRZ nach der SPE-Aufreinigung mit Wiederfindungen im Bereich von 79 - 90 % gegeben. Vergleicht man die Matrixeffekte mit und ohne SPE, so lässt sich bei Gurke und Hartweizen eine leichte Verbesserung erkennen. So wurde der Matrixeffekt von TAL in Hartweizen von -71 % auf -55 % reduziert. Aus diesem Grund wurde diese Aufreinigung auch noch bei weiteren Matrices getestet. Die Auswahl weiterer Matrices erfolgte entsprechend dem OECD-Dokument ENV/JM/MONO(2007)17 [87].

Bis auf TAL in Weintrauben und Futterrübe liegen die ermittelten Wiederfindungen für TRZ und TAL bei den getesteten Matrizes nach der SPE im Bereich von 72 - 118 % und die geforderten 70 - 120 % werden erreicht. Bei Sojabohnen und Brokkoli kann durch die SPE-Aufreinigung eine Verbesserung der Wiederfindung für TAL beobachtet werden. So steigt die Wiederfindung von TAL in Sojabohnen von 66 % auf 107 % an und in Brokkoli von 60 % auf 98 %.

Mit Hilfe des internen Standards wurden zusätzlich die Matrixeffekte nach Formel 4 bestimmt. Betrachtet man die Matrixeffekte, so liegt nur in wenigen Fällen eine Verbesserung vor. So wurde eine Verbesserung des Matrixeffekts für TAL in Flachs von -57 % auf -36 % ermittelt. Auch bei der Futterrübe wurde eine Verringerung des Matrixeffektes von -65 % auf -39 % beobachtet. Dies führt zu einer Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses. Dies ist exemplarisch für TAL in Futterrübe in Abb. 27 dargestellt. Durch die Aufreinigung des Extraktes erhöht sich das Signal-Rausch-Verhältnis (3 sigma) von 45,0 auf 105,1. Dies führt zu einer Verbesserung der Bestimmungsgrenze in der Matrix Futterrübe um Faktor 2. Für die Mehrzahl der Matrizes kann jedoch keine Minimierung der Matrixeffekte beobachtet werden.

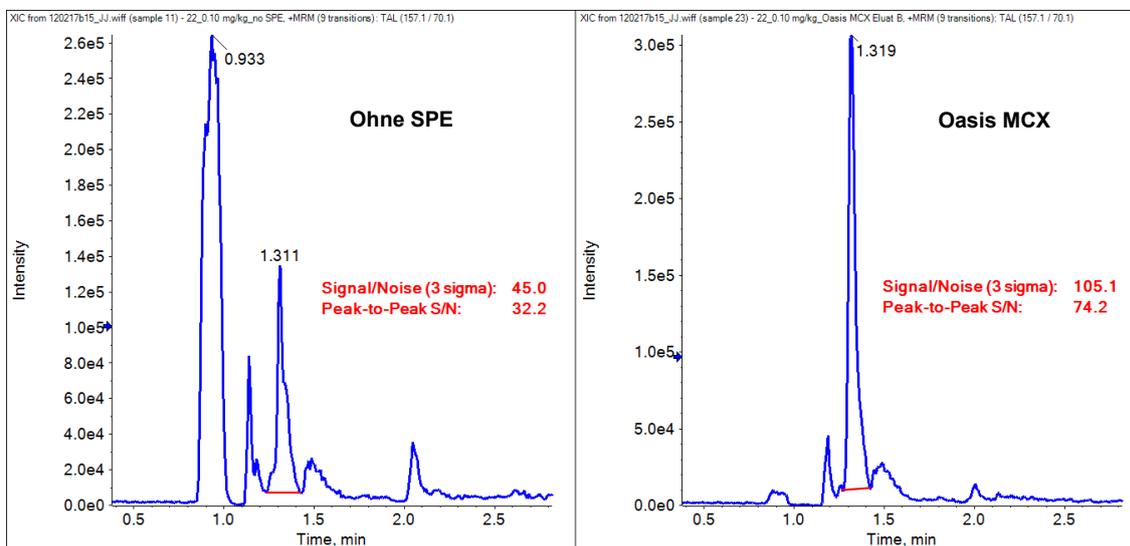


Abb. 27: 0,10 mg/kg TAL in Futterrübe, ohne SPE (links) und Oasis MCX (rechts)

Die SPE-Aufreinigung mittels des Materials Oasis MCX zeigt nur im Einzelfall Erfolge. Als generelles Verfahren, welches die Analytik von TAL und TRZ verbessert, kann es daher nicht angesehen werden.

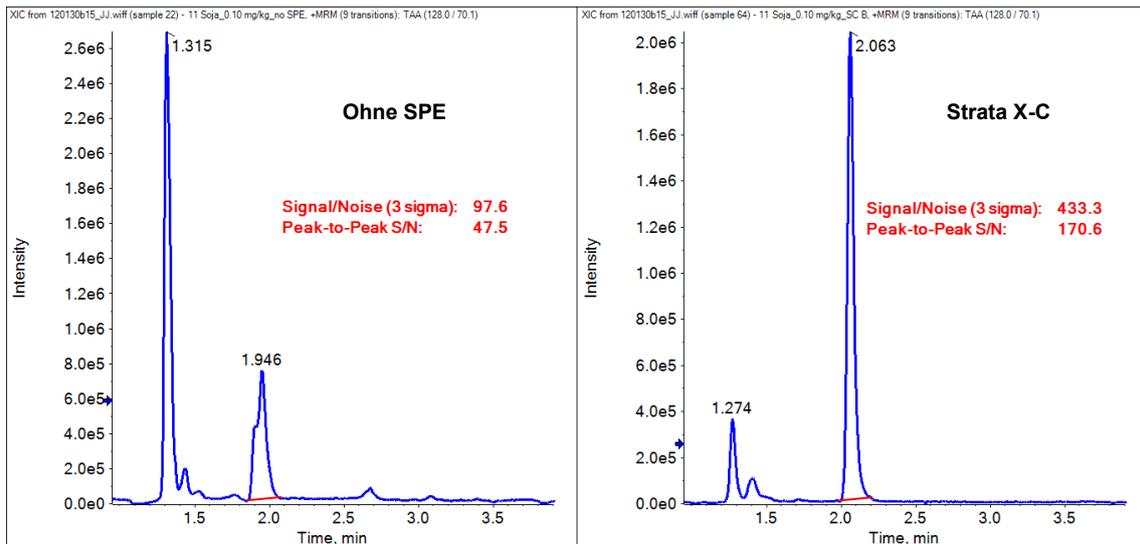
Die Ergebnisse von der Extraktreinigung mittels des SPE-Materials Oasis MCX sind in Tab. 21 zusammengestellt.

**Tab. 21: Wiederfindungen und Matrixeffekte nach Oasis MCX**

Matrix	Wiederfindung bei 0,10 mg/kg [%] / Matrixeffekt [%]			
	TAL		TRZ	
	Ohne SPE	Oasis MCX	Ohne SPE	Oasis MCX
Gurke	76 / -19	86 / -7	90 / -60	84 / -37
Hartweizen	86 / -71	85 / -55	82 / -30	79 / -27
Salat	96 / -56	88 / -57	107 / -33	115 / -40
Wein	82 / -50	128 / -50	86 / -67	101 / -55
Soja	66 / -64	107 / -61	72 / -97	113 / -90
Flachs	103 / -57	96 / -36	102 / -84	118 / -85
Rübe	105 / -65	122 / -39	109 / -52	114 / -53
Brokkoli	60 / -85	98 / -88	77 / -84	90 / -73

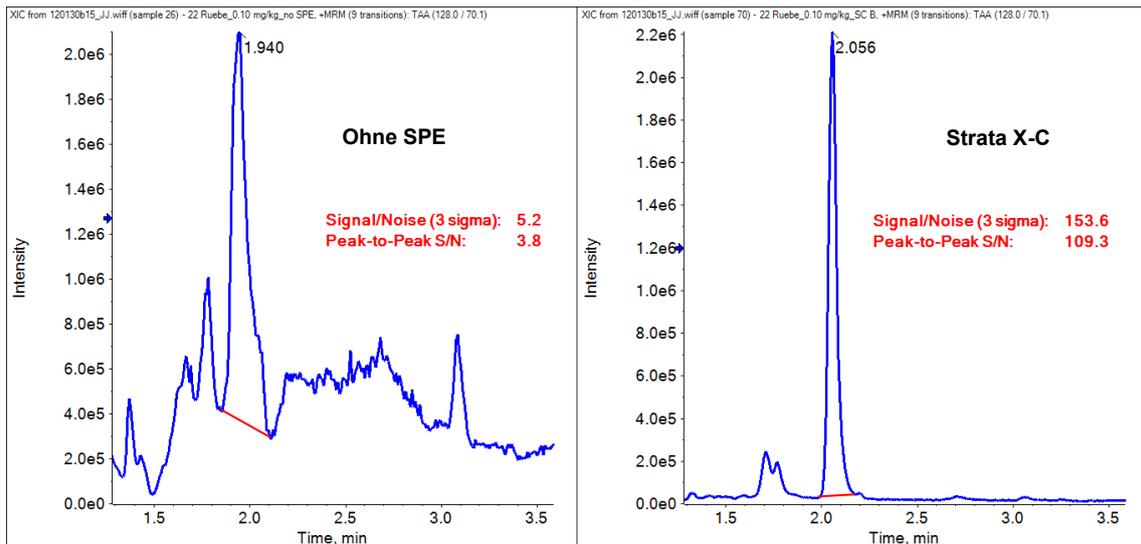
Das SPE-Material Strata X-C wurde für die Analyten TAA und TLA getestet. In Tab. 22 die ermittelten Wiederfindungen zusammengestellt. Diese liegen bei den verschiedenen Matrices im Bereich von 80 - 106 %. Damit werden die geforderten 70 - 120 % Wiederfindung erreicht.

Mit Hilfe des internen Standards wurden zusätzlich die Matrixeffekte nach Formel 4 bestimmt. Betrachtet man die Matrixeffekte, so ergibt sich nur für TAA in Soja eine wesentliche Verringerung der Matrixeffekte von -66 % auf -36 %. Dies führt zu einer Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses, welches in Abb. 28 gezeigt wird. Durch die Aufreinigung des Extraktes erhöht sich das Signal-Rausch-Verhältnis (3 sigma) von 97,6 auf 433,3. Dies führt zu einer Verbesserung der Bestimmungsgrenze in der Matrix Soja um den Faktor 3 bis 4.



**Abb. 28: 0,10 mg/kg TAA in Sojabohne, ohne SPE (links) und Strata X-C (rechts)**

In Futterrübe wurden Matrixeffekte für TAA von -45 % ohne SPE und -37 % nach Aufreinigung des Extraktes mit Strata X-C bestimmt. Eine deutliche Verringerung des Matrixeffektes durch SPE wurde demnach nicht ermittelt. Jedoch konnte durch die Aufreinigung des Futterrübenextraktes mittels Strata X-C der chemische Untergrund in den MS-Chromatogrammen reduziert werden. In Abb. 29 sind 0,10 mg/kg TAA in Futterrübe dargestellt. Durch die Extraktreinigung mittels Strata X-C erhöht sich das Signal-Rausch-Verhältnis (3 sigma) von 5,2 auf 153,6. Dadurch verbessert sich die Bestimmungsgrenze, welche ein Signal-Rausch-Verhältnis von 10 haben sollte, enorm. Für TAA ist eine Bestimmungsgrenze von 0,01 mg/kg gefordert. Durch die Extraktreinigung mittels Strata X-C kann diese Forderung erreicht werden.



**Abb. 29: 0,10 mg/kg TAA in Futterrübe, ohne SPE (links) und Strata X-C (rechts)**

Die SPE-Aufreinigung mittels des Materials Strata X-C erwies sich im Einzelfall erfolgreich. Als generelles Verfahren, welches die Analytik von TAA und TLA verbessert, kann es aber nicht angesehen werden.

Die Ergebnisse von der Extraktreinigung mittels des SPE-Materials Strata X-C sind in Tab. 22 zusammengestellt.

**Tab. 22: Wiederfindungen und Matrixeffekte nach Strata X-C**

Matrix	Wiederfindung bei 0,10 mg/kg [%] / Matrixeffekt [%]			
	TAA		TLA	
	Ohne SPE	Strata X-C	Ohne SPE	Strata X-C
Salat	94 / -28	85 / -45	116 / -41	88 / -43
Wein	100 / -27	88 / -36	114 / -24	84 / -34
Soja	94 / -66	91 / -26	121 / -27	80 / -28
Flachs	94 / -27	91 / -28	114 / -17	87 / -25
Rübe	111 / -45	91 / -37	116 / -30	106 / -38

### 7.2.2.1.3 Anionenaustausch-SPE

TAL, TAA und TLA haben alle einen Carbonsäurerest im Molekül und somit ist es denkbar, dass diese Analyten von einem Anionenaustauscher-Material festgehalten werden können. TRZ besitzt am ersten Stickstoff im Molekül die Möglichkeit, ein Proton abzugeben, um somit negativ geladen vorzuliegen. Bei einem pKs-Wert von 10,2 ist hier jedoch ein pH-Wert von 12,2 erforderlich.

#### 7.2.2.1.3.1 Wahl des pH-Wertes für die Probenaufnahme auf die SPE

Wie bei der Kationenaustausch-SPE werden auch hier zunächst die Bedingungen der Probenaufnahme getestet. Hierfür wurde Standardlösung verschiedener pH-Werte auf die ausgewählten und entsprechend konditionierten SPE-Materialien gegeben und das Eluat direkt aufgefangen und im Stickstoffevaporator bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in Milli-Q-Wasser gelöst und mittels LC-MS/MS vermessen. Lassen sich die TDMs in diesem Eluat zu 100 % wiederfinden, so liegen zu geringe Wechselwirkungen zwischen ihnen und dem SPE-Material vor und sie werden nicht zurückgehalten. Werden hingegen 0 % wiedergefunden, so wird der Analyt vom SPE-Material festgehalten und kann eventuell somit von störenden Matrixbestandteilen abgetrennt werden.

Die getesteten pH-Bereiche und die verwendeten Additive, um diesen einzustellen, sind in Tab. 23 zusammengefasst.

**Tab. 23: Getestete pH-Werte bei Probenaufnahme Anionenaustausch-SPE**

<b>pH-Wert</b>	<b>Additiv zum Milli-Q-Wasser</b>
6,9	Ammoniumacetat
8,3	Ammoniak und Ammoniumacetat
10,8	Ammoniak
12,3	Natriumhydroxid

Bis auf Oasis MAX wird TRZ von keinem der getesteten Materialien zurückgehalten und annähernd zu 100 % des Analyten wiedergefunden. Bei dem Oasis MAX-Material hingegen liegen die Wiederfindungen des TRZ bei 57 % bei pH 6,9, 42 % bei pH 8,3 und bei 0 % ab einem pH von 10,8 und basischer. Auffällig ist, dass bereits bei einem pH-Wert von 6,9 eine Retention von ca. 50 % TRZ beobachtet werden kann. Mit einem pKs-Wert von 10,2, sollte bei einem pH-Wert von 6,9 noch kein deprotoniertes Triazol vorliegen. Es ist zu vermuten, dass andere als die elektrostatischen Wechselwirkungen vorliegen. Denkbar sind Wasserstoffbrückenbindungen und  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zwischen TRZ und dem Oasis MAX-Material.

TAL wird bei den Materialien Strata-X-AW, Strata NH<sub>2</sub> und Strata SAX im Bereich von 85 - 102 % wiedergefunden. Hier liegen keine ausreichend starken Wechselwirkungen zwischen Analyt und SPE-Material vor, um diesen zu retardieren. Bei dem Oasis MAX-Material hingegen wird der Analyt ab einem pH-Wert von 10,8 und basischer auf dem SPE-Material retardiert und Wiederfindungen um 0 % wurden ermittelt.

Bei TLA und TAA nehmen mit steigendem pH-Wert die Wechselwirkungen zwischen diesen Analyten und den SPE-Materialien zu. Mit Wiederfindungen bei pH 12,3 im Bereich von 86 - 88 % auf dem Strata NH<sub>2</sub>-Material und im Bereich von 65 - 67 % auf dem Strata-X-AW-Material sind diese Wechselwirkungen jedoch nicht ausreichend stark, um TLA und TAA auf den SPE-Materialien zurückzuhalten. Bei den Materialien Strata SAX und Oasis MAX liegen ausreichend starke Wechselwirkungen zur Retention der Analyten auf dem SPE-Material vor und so wurden Wiederfindungen von annähernd 0 % im stark basischen Bereich bestimmt. Bei dem Oasis MAX-Material ist hierfür ein pH-Wert von 10,8 ausreichend. Bei dem Strata SAX-Material ist wegen des TLAs ein pH-Wert von 12,3 notwendig.

Die Materialien Strata-X-AW und Strata NH<sub>2</sub> erweisen sich als ungeeignet für die Analytik der TDMs und werden bei den nachfolgenden Untersuchungen nicht weiter berücksichtigt. Das Strata SAX-Material wird für TLA und TAA weiter untersucht. Der zukünftig verwendete pH-Wert für die Probenaufgabe liegt bei 12,3. Bei dem Oasis MAX-Material zeigen alle TDMs ausreichend starke Wechselwirkungen. Hier wird bei den weiteren Tests ein pH-Wert von 10,8 bei der Probenaufgabe verwendet.

Die Ergebnisse dieser Voruntersuchung sind in Abb. 30 dargestellt.

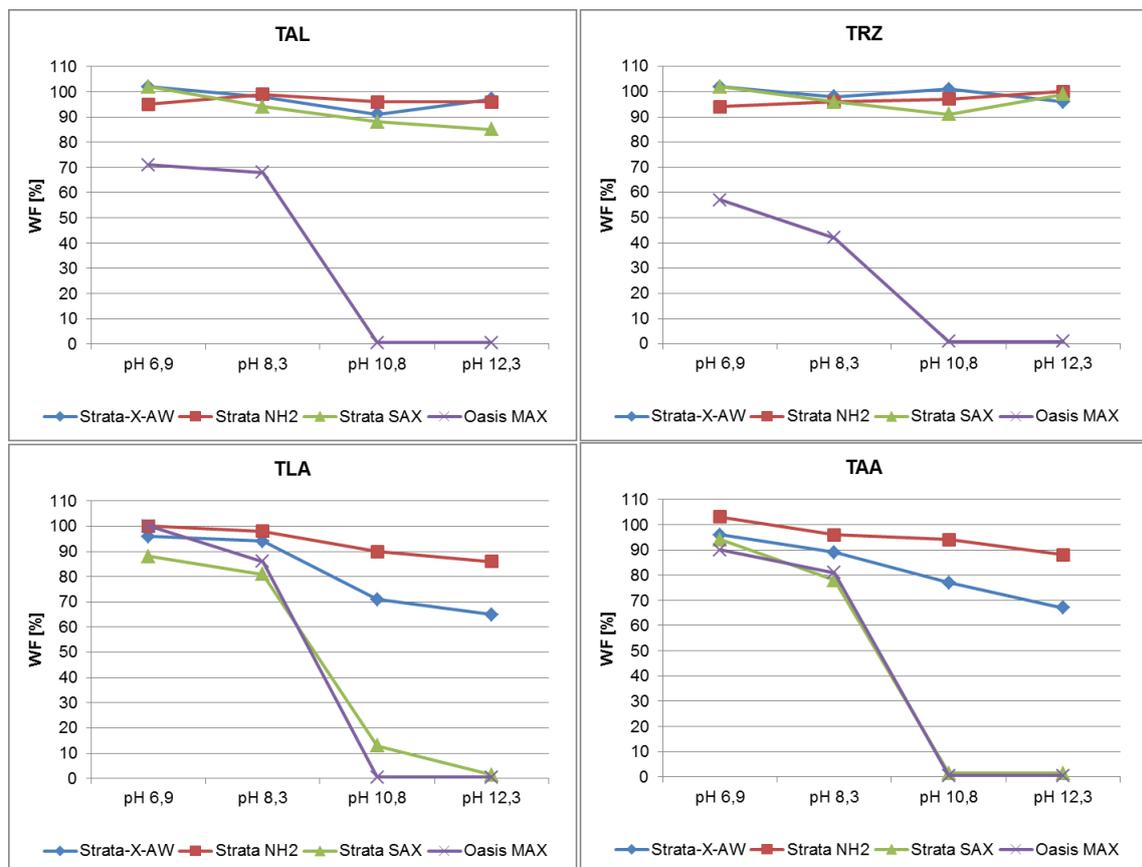


Abb. 30: Wiederfindungen verschiedener pH-Werte bei Probenaufgabe auf SPE

### 7.2.2.1.3.2 Wahl des pH-Wertes für die Elution vom SPE-Material

Nachdem Bedingungen ermittelt wurden bei denen die Analyten vom SPE-Material retardiert werden, müssen nun jene ermittelt werden um diese wieder vom Material zu lösen.

Hierfür wurde Standardlösung mit dem zuvor ermittelten pH-Wert auf die ausgewählten und entsprechend konditionierten SPE-Materialien gegeben. Anschließend wurden verschiedene wässrige Lösungen mit unterschiedlichen pH-Werten auf die SPE-Kartusche gegeben, das Eluat aufgefangen und im Stickstoffevaporator bis zur Trockne eingengt. Der getrocknete Rückstand wurde in Milli-Q-Wasser gelöst und mittels LC-MS/MS vermessen. Lassen sich die Analyten in diesem Eluat zu 100 % wiederfinden, so konnten sie von dem SPE-Material gelöst werden. Werden hingegen 0 % wiedergefunden, so wird der Analyt weiterhin vom SPE-Material retardiert.

Die getesteten pH-Bereiche für die Elution vom SPE-Material und die verwendeten Additive, um diesen einzustellen, sind in Tab. 24 zusammengefasst.

**Tab. 24: Getestete pH-Werte für Elution von Anionenaustausch-SPE**

<b>pH-Wert</b>	<b>Additiv zum Milli-Q-Wasser</b>
6,9	Ammoniumacetat
2,3	Ameisensäure
1,4	Schwefelsäure

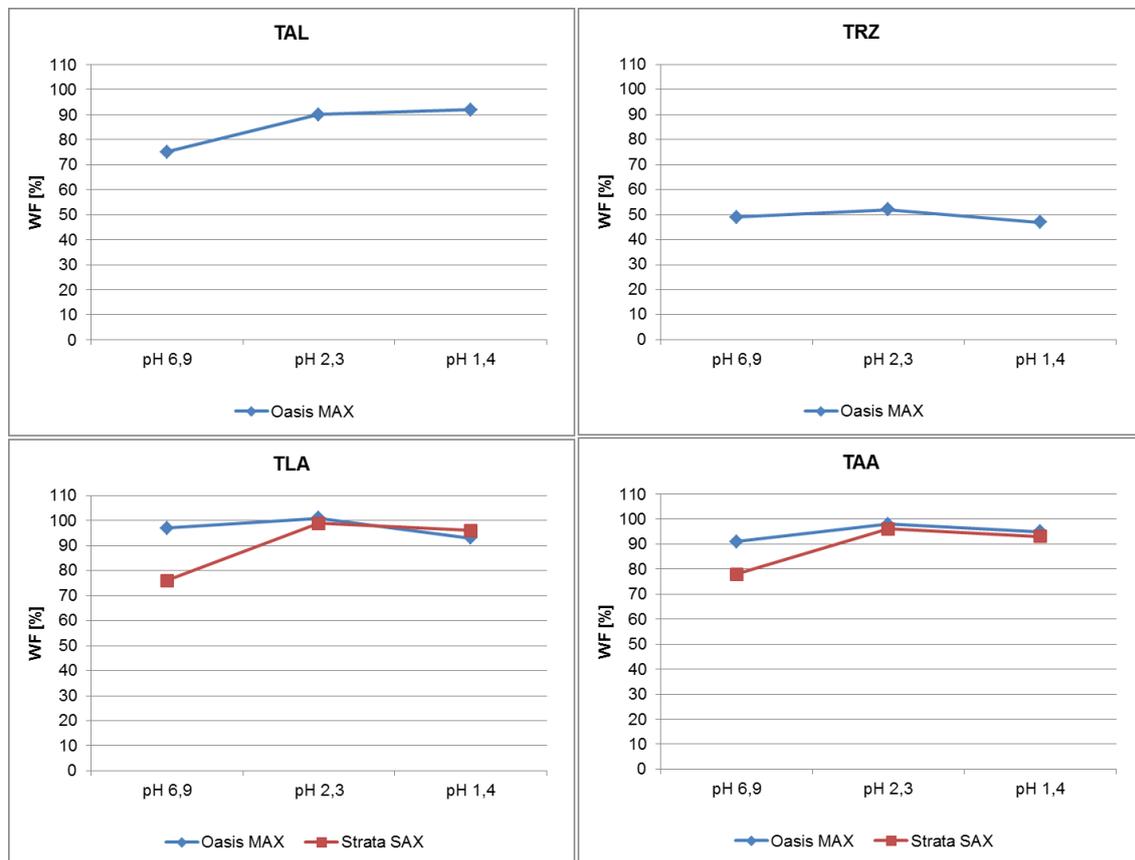
Bei einem pH-Wert von 6,9 kann TAL von dem Oasis MAX-Material noch nicht vollständig gelöst werden und es werden nur 75 % wiedergefunden. Ab einem pH-Wert von 2,3 eluiert das TAL annähernd vollständig vom SPE-Material und es werden über 90 % des Analyten wiedergefunden.

Bei TRZ wird eine Wiederfindung von nur ca. 50 % bei einem pH-Wert von 1,4 ermittelt. Somit ist das Oasis MAX-Material nicht zur Extraktreinigung für diesen Analyten geeignet.

Über 90 % Wiederfindung wurden für TLA und TAA bei allen getesteten pH-Werten bei dem SPE-Material Oasis MAX bestimmt. Für das Strata SAX SPE-Material ist mindestens ein pH-Wert von 2,3 und niedriger notwendig, um für diese Analyten Wiederfindungen von nahezu 100 % zu erhalten. Bei einem pH-Wert von 6,9 belegen die ermittelten Wiederfindungen von 76 % für TLA und 78 %, dass diese beiden Analyten noch nicht vollständig von dem SPE-Material gelöst werden.

Für die SPE-Materialien Strata SAX und Oasis MAX ergibt sich ein optimaler pH-Wert von 2,3 für die Elution der Analyten. Strata SAX wird dabei für die Extraktreinigung von TAA und TLA und Oasis MAX für die Extraktreinigung von TAA, TLA und TAL weiter untersucht.

Die Ergebnisse dieses Tests sind in Abb. 31 zusammengefasst.



**Abb. 31: Wiederfindungen bei der Elution mit Lösungen verschiedener pH-Werte**

### 7.2.2.1.3.3 Ergebnisse und Diskussion der finalen Durchführung

Das SPE-Material Oasis MAX wurde für die Extraktaufreinigung der Analyten TLA und TAA untersucht. Die ermittelten Wiederfindungen in Gurke und Hartweizen (in Tab. 25 als „Eluat nach der Elution“ bezeichnet) liegen im Bereich von 4 - 50 %. Aufgrund dieser schlechten Wiederfindungen wurde das Eluat, welches bei der Probenaufgabe auf dem SPE-Material anfällt und i. d. R. verworfen wird, ebenfalls mittels LC-MS/MS gemessen. Hier werden 34 - 104 % an TAA und TLA nachgewiesen. Demnach beeinflusst die Matrix die Wechselwirkungen zwischen SPE-Material und TAA bzw. TLA, so dass diese Analyten nur in geringen Mengen von dem Material festgehalten werden. Dies resultiert in mangelhaften Wiederfindungen der Analyten. Daher wurde vor der Aufreinigung mit Oasis MAX eine Aufreinigung des Extrakts mit dem unpolaren SPE-Material Bond Elut C18 nach 6.2.2.1.1 durchgeführt. Des Weiteren wurde die Menge des Rohextraktes von 2,5 mL auf 0,5 mL verringert. Trotz deutlicher Reduzierung des Gehalts an Matrix bei der Probenaufgabe auf dem Oasis MAX-Material können keine Verbesserungen hinsichtlich der Wiederfindungen bestimmt werden. So liegen diese auch hier nur im Bereich von 12 - 47 %.

In Tab. 25 und Tab. 26 sind die ermittelten Wiederfindungen von der Extraktaufreinigung mit Oasis MAX für TAA und TLA aufgeführt. Da die Wiederfindungen von TAA und TLA in Matrix bei diesem SPE-Material nicht im Bereich von 70 - 120 % liegen, eignet sich diese Aufreinigung nicht für die quantitative Bestimmung dieser Analyten.

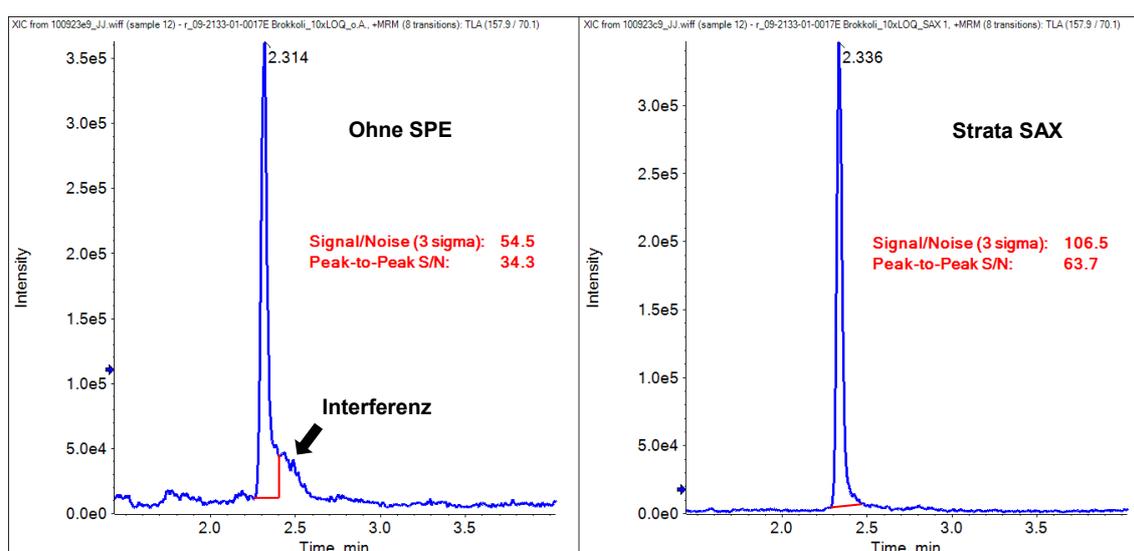
**Tab. 25: Wiederfindungen nach Oasis MAX mit 2,5 mL Rohextrakt**

Oasis MAX (2,5 mL Extrakt)	[%] WF vom Analyt bei 0,10 mg/kg					
	TLA		TAA		TAL	
	Gurke	Weizen	Gurke	Weizen	Gurke	Weizen
Eluat nach Probenaufgabe	56	42	77	34	104	50
Eluat nach Elution	36	50	18	41	4	32

**Tab. 26: Wiederfindungen nach Bond Elut C18 und Oasis MAX mit 0,5 mL Rohextrakt**

Bond Elut C18 & Oasis MAX (0,5 mL Extrakt)	[%] WF vom Analyt bei 0,10 mg/kg					
	TLA		TAA		TAL	
	Gurke	Weizen	Gurke	Weizen	Gurke	Weizen
Eluat nach Probenaufgabe	65	61	75	45	87	56
Eluat nach Elution	26	33	23	28	12	47

Nach der Extraktreinigung mit Strata SAX, konnte TLA im Bereich von 93 - 115 % in den getesteten Matrices wiedergefunden werden. Die bestimmten Matrixeffekte sind im Bereich von -58 bis -76 %. Diese sind zum Teil doppelt so groß wie die Matrixeffekte ohne Aufreinigung mit Strata SAX. Grund hierfür ist der stark saure pH-Wert, der für die Elution der Analyten eingestellt werden muss und zur Elution von Kontaminanten des SPE-Materials führt. Dennoch eignet sich dieses SPE-Material im Einzelfall für die Bestimmung von TLA. Das Analytsignal von TLA in Brokkoli, siehe Abb. 32, ist gestört durch eine Matrixinterferenz. Durch diese Interferenz ist das Analytsignal von TLA nicht mehr eindeutig integrierbar. Des Weiteren führt dies zu einer erhöhten Wiederfindung des Analyten von 149 %. Durch die Extraktreinigung mit Strata SAX, lässt sich diese Interferenz entfernen und es konnte nun eine Wiederfindung des TLA von 115 % ermittelt werden. Zusätzlich wird durch das SPE-Material der chemische Untergrund in dem MS-Chromatogramm erniedrigt, wodurch sich das Signal-Rausch-Verhältnis (3 sigma) um Faktor zwei verbessert von 54,5 auf 106,5.



**Abb. 32: 0,10 mg/kg TLA in Brokkoli, ohne SPE (links) und Strata SAX (rechts)**

Mit Ausnahme von Brokkoli liegen die bestimmten Wiederfindungen von TAA in den getesteten Matrices nach Extraktreinigung mittels Strata SAX im Bereich von 73 - 76 %. Bei Brokkoli konnten nur 54 % Wiederfindung ermittelt werden. Bis auf diese eine Ausnahme befinden sich die Wiederfindungen im Bereich von 70 - 120 %. Jedoch ist eine Tendenz von mindestens 15 % Verlust bei der Wiederfindung zu erkennen. Ursache hierfür sind Verluste des Analyten bei der Probenaufgabe, da durch die Matrix die Wechselwirkung zwischen Analyt und SPE-Material gestört wird. Wie bei TLA sind auch bei TAA die Matrixeffekte mit 74 - 116 % zum Teil doppelt so groß aufgrund von interferierenden Komponenten des SPE-Materials.

Die Wiederfindungen und Matrixeffekte von TLA und TAA sind in Tab. 27 zusammengefasst.

**Tab. 27: Wiederfindungen und Matrixeffekte nach Strata SAX**

Matrix	Wiederfindung bei 0,10 mg/kg [%] / Matrixeffekt [%]			
	TLA		TAA	
	Ohne SPE	Strata SAX	Ohne SPE	Strata SAX
Salat	116 / -41	104 / -69	94 / -28	74 / -71
Wein	114 / -24	93 / -72	100 / -27	75 / -74
Soja	121 / -27	98 / -76	94 / -66	75 / -78
Flachs	114 / -17	93 / -71	94 / -27	76 / -73
Rübe	116 / -30	106 / -72	111 / -45	73 / -74
Brokkoli	149 / -64	115 / -58	96 / -66	54 / -40

Die SPE-Aufreinigung mittels Strata SAX erwies sich für TLA erfolgreich. Als generelles Verfahren, welches die Analytik von TAA und TLA verbessert, kann es aber nicht angesehen werden. Für TAA ist das Material nicht geeignet, da mit mindestens 15 % Verlust des Analyten gerechnet werden muss.

## 7.2.2.2 DFA

### 7.2.2.2.1 Unpolare SPE

#### 7.2.2.2.1.1 Vortests

Bei der unpolaren SPE sind es - wie bereits bei den vorhergehenden Analyten beschrieben, die van-der-Waals-Kräfte - die für die Wechselwirkung des Analyten mit dem Adsorbiermaterial verantwortlich sind. Diese sind umso größer, je geringer die Anzahl ionischer Ladungen des Analyten ist. DFA hat einen pKs-Wert von 1,2. Es handelt sich hierbei um eine starke Säure, die dissoziiert und somit geladen vorliegt. Es ist zu erwarten, dass daher der pH-Wert bei der Probenaufgabe keinen Einfluss zeigt. Um dies praktisch auch noch einmal zu bestätigen, wurde DFA-Standardlösung mit dem pH-Wert 1,4 und 2,3 auf die ausgewählten und entsprechend konditionierten SPE-Materialien gegeben, das Eluat direkt aufgefangen und im Stickstoffevaporator bis zur Trockne eingengt. Zur Einstellung des pH-Wertes wurden Ameisensäure (pH 2,3) und Schwefelsäure (pH 1,4) verwendet. Der getrocknete Rückstand wurde in Milli-Q-Wasser gelöst und mittels LC-MS/MS vermessen. Lässt sich DFA in diesem Eluat zu 100 % wiederfinden, so liegen zu geringe Wechselwirkungen zwischen DFA und SPE-Material vor und die Substanz wird nicht zurückgehalten.

Bis auf Carbograph, lässt sich bei allen getesteten unpolaren SPE-Materialien die DFA im Bereich von 87 - 96 % wiederfinden. Sowohl die Wiederfindungen bei pH 2,3 als auch die bei pH 1,4 liegen in diesem Bereich. Dies bestätigt die Annahme, dass der pH-Wert keinen Einfluss bei der Probenaufgabe hat. Die bestimmten Wiederfindungen liegen bei annähernd 100 %. Demnach wird die DFA nicht von den SPE-Materialien festgehalten. Das Material Carbograph stellt eine Ausnahme dar. Hier wurden Wiederfindungen von 1 - 2 % ermittelt. Es findet ein Zurückhalten der DFA auf dem Material statt.

Die Wiederfindungen dieses Vortests sind in Tab. 28 zusammengestellt.

**Tab. 28: Wiederfindungen von DFA bei Probenaufgabe mit verschiedenen pH-Werten**

SPE-Material	WF [%] von DFA	
	pH 2,3	pH 1,4
Bond Elut C18	95	92
Lichrolut EN	96	92
Bond Elut ENV	90	87
Oasis HLB 3cc	94	93
Strata-X	94	96
Carbograph	1	2

Da bei dem Material Carbograph eine Retention von DFA beobachtet wurde, erfolgte ein zweiter Test bezüglich des Elutionsmittels. Hierfür wurde DFA-Standardlösung auf dem konditionierten Carbograph-Materialien gegeben. Danach wurde mit Wasser, Wasser-Methanol (1/1, v/v), Methanol, 1 % Ammoniaklösung in Methanol und Acetonitril eluiert. Das Eluat wurde aufgefangen und im Stickstoffevaporator bis zur Trockne eingengt. Der getrocknete Rückstand wurde in Milli-Q-Wasser gelöst und mittels LC-MS/MS vermessen.

Die Wiederfindungen von DFA im Elutionsmittel wurden in Bereich von 0 - 4 % bestimmt. Die Wechselwirkungen zwischen der DFA und dem Carbograph-Material sind so stark, dass der Analyt mit keinem getesteten Elutionsmittel vom Material gelöst werden konnte. Die ermittelten Wiederfindungen sind in Tab. 29 gelistet.

**Tab. 29: Wiederfindungen beim Test verschiedener Elutionsmittel**

Elutionsmittel	WF [%] von DFA
H <sub>2</sub> O	1
MeOH / H <sub>2</sub> O (1/1, v/v)	2
MeOH	4
1 % NH <sub>3</sub> in MeOH	1
ACN	0

Das SPE-Material Carbograph eignet sich nicht für die Extraktreinigung von DFA, da der Analyt sich nicht mehr vom Material lösen lässt. Für alle anderen unpolaren SPE-Materialien werden weitere Tests mit Matrix durchgeführt, um zu untersuchen, ob diese Materialien positive Auswirkungen, wie z. B. die Minimierung von Matrixeffekten, auf die Analytik von DFA haben. DFA wird von diesen SPE-Materialien nicht festgehalten und eluiert direkt. Jedoch besteht die Möglichkeit, dass mit-extrahierte Matrixkomponenten, die die Analytik stören, von diesen Materialien absorbiert werden.

### 7.2.2.2.1.2 Ergebnis und Diskussion der finalen Durchführung

Sowohl mit als auch ohne SPE konnten gute Wiederfindungen für DFA im Bereich von 85 - 106 % bestimmt werden. Eine Reduktion der Matrixeffekte ließ sich mittels SPE nicht ermitteln. So wurde z. B. in Salat ein Matrixeffekt von -63 ohne Aufreinigung und von -64 bis -72 % nach Aufreinigung mit unpolaren SPE-Materialien bestimmt. Zum Teil wurde sogar eine Zunahme der Matrixeffekte beobachtet. Beispielhaft sei hier Raps genannt, wo der Matrixeffekt von 4 % ohne SPE auf -57 % nach Aufreinigung mit Bond Elut C18 anstieg. Grund hierfür sind Verunreinigungen der SPE-Materialien, die die Analytik von DFA interferieren. Es kann geschlussfolgert werden, dass die Extraktreinigung mittels unpolaren SPE-Materialien keine Verbesserung bei der quantitativen Bestimmung von DFA in pflanzlichen Materialien darstellt.

Die Ergebnisse für die Wiederfindungen und Matrixeffekte sind in Tab. 30 und Tab. 31 zusammengestellt.

**Tab. 30: Wiederfindungen DFA nach unpolarer SPE**

SPE-Material	[%] WF DFA bei 0,10 mg/kg PE					
	Salat	Orange	Soja	Raps	Rübe	Hopfen
ohne SPE	101	106	106	104	105	99
Bond Elut C18	93	86	102	85	96	99
Lichrolut EN	105	98	105	97	100	99
Bond Elut ENV	101	98	103	98	101	96
Oasis HLB 3cc	101	91	104	95	101	99
Strata-X	99	101	93	105	97	94

**Tab. 31: Matrixeffekte nach unpolarer SPE**

SPE-Material	Matrixeffekt [%]					
	Salat	Orange	Soja	Raps	Rübe	Hopfen
ohne SPE	-63	-27	-14	4	-29	-47
Bond Elut C18	-72	-62	-59	-57	-57	-77
Lichrolut EN	-64	-33	-19	-4	-60	-61
Bond Elut ENV	-64	-33	-18	-5	-58	-59
Oasis HLB 3cc	-66	-32	-15	-1	-59	-57
Strata-X	-65	-31	-19	-1	-55	-52

#### 7.2.2.2.2 Kationenaustausch-SPE

DFA ist ein Molekül mit einer negativen Ladung. Ein Festhalten dieses Analyten auf Kationenaustausch-SPE-Materialien kann daher ausgeschlossen werden. Jedoch besteht die Möglichkeit, dass interferierende Matrixkomponenten starke Wechselwirkungen mit diesen Materialien aufweisen und somit abgetrennt werden können. Daher wurde auch die Kationenaustausch-SPE zur Extraktreinigung bei der DFA untersucht. Es wurde dabei das starke Kationenaustauscher-Material Oasis MCX getestet. Die Probenaufgabe erfolgte bei pH 2,3, da ein saurer pH-Wert das Vorliegen von positiven Ladungen begünstigt.

Bei Salat, Orange und Raps konnte keine Reduktion der Matrixeffekte durch die Behandlung mit einem Kationenaustauscher beobachtet werden. Bei Rübe und Hopfen erhöhen sich die Matrixeffekte von -29 % auf -54 % und -47 % auf -61 %. Ursache hierfür ist in einer Kontamination von dem SPE-Material zu suchen, welche ebenfalls eluiert wurde. Bei Soja wurde eine leichte Reduktion des Matrixeffekts von -14 % auf -5 % beobachtet. Es lässt sich schlussfolgern, dass die Kationenaustausch-SPE keine starke Verbesserung bei der quantitativen Bestimmung von DFA in pflanzlicher Matrix mit sich bringt. Die bestimmten Matrixeffekte sind Tab. 32 zu entnehmen.

**Tab. 32: Matrixeffekte nach Kationenaustausch-SPE**

SPE-Material	Matrixeffekt [%]					
	Salat	Orange	Soja	Raps	Rübe	Hopfen
ohne SPE	-63	-27	-14	4	-29	-47
Oasis MCX	-65	-25	-5	6	-54	-61

### 7.2.2.2.3 Anionenaustausch-SPE

#### 7.2.2.2.3.1 Wahl des pH-Wertes für die Probenaufgabe auf die SPE

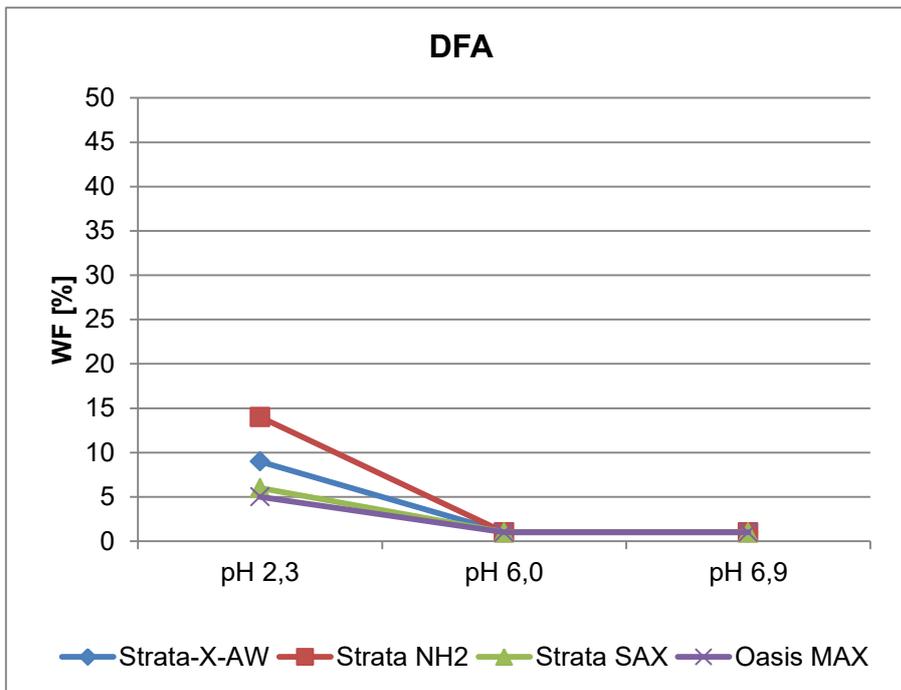
Zunächst wurden die Bedingungen der Probenaufgabe geprüft. Hierfür wurde Standardlösung verschiedener pH-Werte auf die ausgewählten, entsprechend konditionierten SPE-Materialien gegeben, das Eluat direkt aufgefangen und im Stickstoffevaporator bis zur Trockne eingengt. Der getrocknete Rückstand wurde in Milli-Q-Wasser gelöst und mittels LC-MS/MS vermessen. Lässt sich die DFA in diesem Eluat zu 100 % wiederfinden, so liegen zu geringe Wechselwirkungen zwischen dem Analyten und dem SPE-Material vor und er wird nicht zurückgehalten. Werden hingegen 0 % wiedergefunden, so wird der Analyt vom SPE-Material retardiert und kann eventuell von störenden Matrixbestandteilen abgetrennt werden.

Die getesteten pH-Bereiche und die verwendeten Additive, um diesen einzustellen, sind in Tab. 33 zusammengefasst.

**Tab. 33: Getestete pH-Werte bei Probenaufgabe Anionenaustausch-SPE**

<b>pH-Wert</b>	<b>Additiv zum Milli-Q-Wasser</b>
2,3	Ameisensäure
6,0	-
6,9	Ammoniumacetat

Bei einem pH-Wert von 2,3 wird die DFA von den Anionenaustauscher-Materialien noch vollständig festgehalten und so lassen sich noch 5 - 14 % des Analyten wiederfinden. Ab einem pH-Wert von 6,0 wird das DFA vollständig gebunden und die Wiederfindungen liegen bei 0 %. Die ermittelten Wiederfindungen sind in Abb. 33 graphisch dargestellt.



**Abb. 33: Wiederfindungen verschiedener pH-Werte bei Probenaufgabe auf SPE**

#### 7.2.2.2.3.2 Wahl des pH-Wertes für die Elution vom SPE-Material

Nachdem die Bedingungen ermittelt worden waren, unter denen DFA vom SPE-Material retardiert wird, wurden in einem zweiten Schritt nun jene ermittelt, um diese wieder vom Material zu lösen.

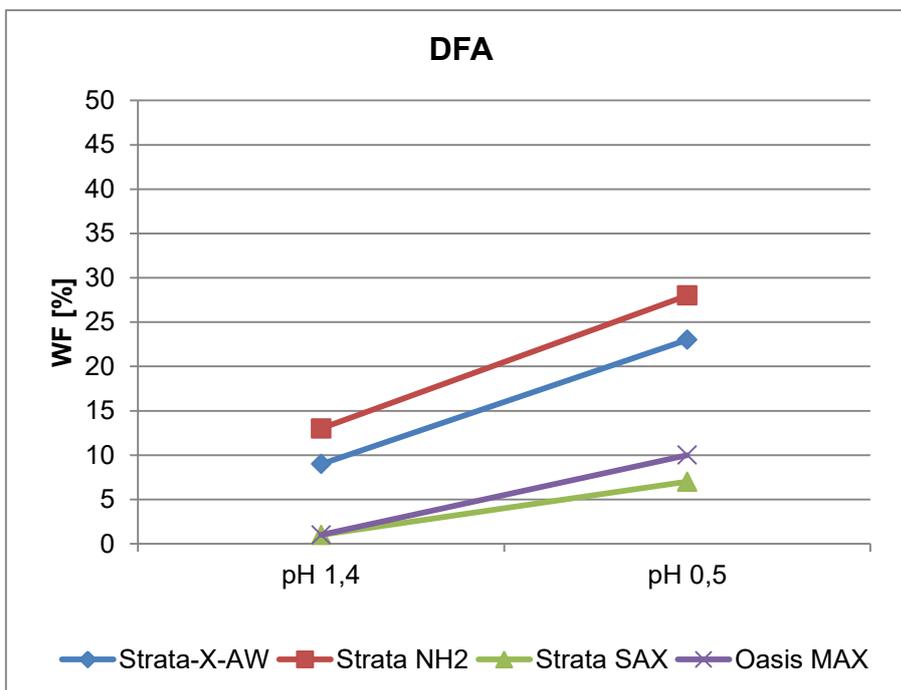
Hierfür wurde Standardlösung mit einem pH-Wert von 6,0 auf die ausgewählten und entsprechend konditionierten SPE-Materialien gegeben. Anschließend wurden verschiedene wässrige Lösungen mit unterschiedlichen pH-Werten auf die SPE-Kartusche gegeben, das Eluat aufgefangen und im Stickstoffevaporator bis zur Trockne eingengt. Der getrocknete Rückstand wurde in Milli-Q-Wasser gelöst und mittels LC-MS/MS vermessen. Lässt sich die DFA in diesem Eluat zu 100 % wiederfinden, so konnte diese von dem SPE-Material gelöst werden. Werden hingegen 0 % wiedergefunden, so wird der Analyt weiterhin vom SPE-Material festgehalten.

Die getesteten pH-Bereiche für die Elution vom SPE-Material und die verwendeten Additive, um diesen einzustellen, sind in Tab. 34 zusammengefasst.

**Tab. 34: Getestete pH-Werte für Elution von Anionenaustausch-SPE**

pH-Wert	Additiv zum Milli-Q-Wasser
1,4	Schwefelsäure
0,5	Salzsäure

Die ermittelten Wiederfindungen der DFA nehmen mit sinkendem pH-Wert zu. Jedoch ist die DFA mit einem pKs-Wert von 1,2 eine so starke Säure, dass sie sogar bei einem pH-Wert von 0,5 sich nicht vollständig von den Anionenaustauscher-Materialien lösen lässt. So liegen die Wiederfindungen bei pH 0,5 im Bereich von 7 - 28 %. Die Wechselwirkungen zwischen Analyt und SPE-Materialien sind zu stark, weshalb die Extraktreinigung mittels Anionenaustauscher-SPE für die DFA nicht geeignet ist. Die ermittelten Wiederfindungen sind in Abb. 34 graphisch dargestellt.



**Abb. 34: Wiederfindungen bei der Elution mit Lösungen verschiedener pH-Werte**

### 7.2.2.3 Ethephon und HEPA

#### 7.2.2.3.1 Unpolare SPE

##### 7.2.2.3.1.1 Vortests

Ethephon weist pKs-Werte von 2,8 und 7,2 auf. Die von HEPA liegen bei 1,8 und 8,3. Je saurer der pH-Wert ist, desto höher ist der Anteil der vollständig protonierten Phosphonsäuregruppe bei diesen Analyten und desto stärker die Wechselwirkungen mit den unpolaren SPE-Materialien.

Zum Test dieser Wechselwirkungen wurde Standardlösung dieser beiden Substanzen mit dem pH-Wert 1,4 und 2,3 auf die ausgewählten, entsprechend konditionierten SPE-Materialien gegeben, das Eluat direkt aufgefangen und im Stickstoffevaporator bis zur Trockne eingengt. Zur Einstellung des pH-Wertes wurden Ameisensäure (pH 2,3) und Schwefelsäure (pH 1,4) verwendet. Der getrocknete Rückstand wurde mit Milli-Q-Wasser gelöst und mittels LC-MS/MS vermessen. Werden Wiederfindungen von 100 % der Analyten in der Lösung ermittelt, so steht dies für eine zu geringe Wechselwirkung der Analyten zum SPE-Material und sie werden somit nicht auf dem Material zurückgehalten.

Sowohl bei Ethephon als auch bei HEPA sind bei den verwendeten pH-Werten die Wechselwirkungen zu schwach, um diese Analyten vollständig auf den unpolaren SPE-Materialien festzuhalten. So liegen die Wiederfindungen im Bereich von 71 - 103 %. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass interferierende Matrixbestandteile bei diesen Bedingungen entfernt werden, weshalb Tests mit verschiedenen Pflanzenmatrizes folgten.

**Tab. 35: Wiederfindungen Ethephon und HEPA bei Probenaufgabe mit verschiedenen pH-Werten**

SPE-Material	[%] WF bei 0,50 mg/kg PE			
	Ethephon		HEPA	
	pH 2,3	pH 1,4	pH 2,3	pH 1,4
Bond Elut C18	100	103	100	92
Lichrolut EN	80	81	80	75
Bond Elut ENV	76	72	87	71
Oasis HLB 3cc	82	77	79	80
Carboglyph	92	89	89	85

### 7.2.2.3.1.2 Ergebnisse und Diskussion der finalen Durchführung

Nicht alle unpolaren SPE-Materialien sind gleich gut für die Bestimmung von Ethephon und HEPA geeignet. Bei den Materialien Bond Elut C18, Lichrolut EN, Bond Elut ENV konnten quantitative Verluste beobachtet werden und die ermittelten Wiederfindungen liegen im Bereich von 37 - 77 % für Ethephon und 58 - 77 % für HEPA. Bei den SPE-Materialien Oasis HLB und Carbograph wurden Wiederfindungen von 77 - 102 % für Ethephon und 70 - 99 % für HEPA ermittelt und entsprechen damit den Anforderungen der SANCO Richtlinie [86]. Aus quantitativer Sicht sind diese Materialien besser für die Analytik von Ethephon und HEPA geeignet.

**Tab. 36: Wiederfindungen Ethephon und HEPA nach unpolarer SPE**

SPE-Material	[%] WF bei 0,50 mg/kg PE									
	Brokkoli		Orange		Bohne		Rübe		Olive	
	Eth.	HEPA	Eth.	HEPA	Eth.	HEPA	Eth.	HEPA	Eth.	HEPA
ohne SPE	72	81	97	79	76	76	89	80	95	83
Bond Elut C18	58	62	61	58	74	69	65	68	61	68
Lichrolut EN	45	74	37	68	58	68	49	76	44	72
Bond Elut ENV	61	65	71	62	63	77	77	64	68	68
Oasis HLB 3cc	78	78	82	72	79	70	83	78	86	77
Carbograph	100	93	100	76	97	73	100	87	102	99

In Bezug auf die Matrixeffekte konnte bis auf eine Ausnahme keine Verbesserung mit den unpolaren SPE-Materialien erreicht werden. Nur im Falle von HEPA in Brokkoli konnte der Matrixeffekt von -39 % ohne SPE-Aufreinigung auf -11 % mit Bond Elut C18 und -15 % mit Bond Elut ENV minimiert werden.

**Tab. 37: Matrixeffekte nach unpolarer SPE**

SPE-Material	Matrixeffekt [%]									
	Brokkoli		Orange		Bohne		Rübe		Olive	
	Eth.	HEPA	Eth.	HEPA	Eth.	HEPA	Eth.	HEPA	Eth.	HEPA
ohne SPE	32	-46	-11	-55	42	-76	-18	-65	66	-39
Bond Elut C18	92	-40	76	-51	41	-70	83	-41	74	-11
Lichrolut EN	21	-31	35	-57	45	-72	41	-62	69	-37
Bond Elut ENV	87	-49	38	-55	60	-76	54	-64	82	-15
Oasis HLB 3cc	31	-51	29	-72	46	-81	34	-56	70	-34
Carboglyph	34	-42	-12	-66	39	-71	-22	-61	72	-41

Es kann geschlussfolgert werden, dass im Ausnahmefall eine Verbesserung für die Analytik von Ethephon und HEPA in pflanzlichen Materialien erreicht werden kann. Die ermittelten Wiederfindungen und Matrixeffekte sind in Tab. 36 und in Tab. 37 zusammengefasst.

#### 7.2.2.3.2 Kationenaustausch-SPE

Ethephon und HEPA sind Moleküle mit negativen Ladungszuständen. Ein Festhalten dieser Analyten auf Kationenaustausch-Materialien kann daher ausgeschlossen werden. Jedoch besteht die Möglichkeit, dass interferierende Matrixkomponenten starke Wechselwirkungen mit diesen Materialien aufweisen und somit abgetrennt werden können. Daher wurde auch die Kationenaustausch-SPE zur Extraktreinigung bei Ethephon und HEPA untersucht. Getestet wurde das starke Kationenaustauscher-Material Strata X-C.

Aufgrund fehlender Wechselwirkungen mit dem SPE-Material kam es zu keinen Analytverlusten und die ermittelten Wiederfindungen liegen im Bereich von 70 - 102 % nach Extraktreinigung. Vergleicht man die Matrixeffekte mit und ohne Kationenaustausch-SPE, so kann keine Verbesserung festgestellt werden. Die Kationenaustausch-SPE dient somit nicht zur Verbesserung der Analytik von Ethephon und HEPA in pflanzlichen Materialien.

Die ermittelten Wiederfindungen und Matrixeffekte sind in Tab. 38 und Tab. 39 zusammengefasst.

**Tab. 38: Wiederfindungen Ethephon und HEPA nach Kationenaustausch-SPE**

SPE-Material	[%] WF bei 0,50 mg/kg PE									
	Brokkoli		Orange		Bohne		Rübe		Olive	
	Eth.	HEPA	Eth.	HEPA	Eth.	HEPA	Eth.	HEPA	Eth.	HEPA
ohne SPE	72	81	97	79	76	76	89	80	95	83
Strata X-C	102	77	96	70	98	84	95	88	101	79

**Tab. 39: Matrixeffekte bei Ethephon und HEPA nach Kationenaustausch-SPE**

SPE-Material	Matrixeffekt [%]									
	Brokkoli		Orange		Bohne		Rübe		Olive	
	Eth.	HEPA	Eth.	HEPA	Eth.	HEPA	Eth.	HEPA	Eth.	HEPA
ohne SPE	32	-46	-11	-55	42	-76	-18	-65	66	-39
Strata X-C	30	-42	-11	-56	46	-78	-11	-57	70	-43

### 7.2.2.3.3 Anionenaustausch-SPE

#### 7.2.2.3.3.1 Wahl des pH-Wertes für die Probenaufgabe auf die SPE

Zunächst wurden die Bedingungen der Probenaufgabe getestet. Hierfür wurde Standardlösung verschiedener pH-Werte auf die ausgewählten und entsprechend konditionierten SPE-Materialien gegeben und das Eluat direkt aufgefangen und im Stickstoffevaporator bis zur Trockne eingengt. Der getrocknete Rückstand wurde in Milli-Q-Wasser gelöst und mittels LC-MS/MS vermessen. Lassen sich Ethephon und HEPA in diesem Eluat zu 100 % wiederfinden, so liegen zu geringe Wechselwirkungen zwischen dem Analyten und dem SPE-Material vor und dieser wird nicht zurückgehalten. Werden hingegen 0 % wiedergefunden, so werden die Analyten vom SPE-Material festgehalten und können eventuell von störenden Matrixbestandteilen abgetrennt werden.

Die getesteten pH-Bereiche und die verwendeten Additive, um diesen einzustellen, sind in Tab. 40 zusammengefasst.

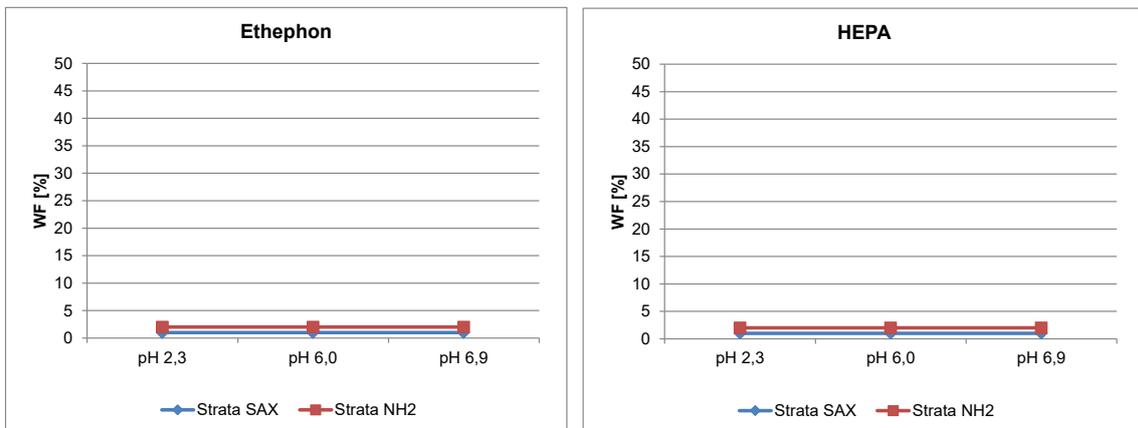
**Tab. 40: Getestete pH-Werte bei Probenaufgabe Anionenaustausch-SPE**

pH-Wert	Additiv zum Milli-Q-Wasser
2,3	Ameisensäure
6,0	-
6,9	Ammoniumacetat

Unabhängig von den getesteten pH-Werten konnte eine vollständige Retention von Ethephon und HEPA beobachtet werden. So werden auf beiden getesteten Materialien 0 % der Analyten im Eluat wiedergefunden. Beide Analyten weisen so starke saure Eigenschaften auf, dass diese sogar bei pH-Bedingungen von 2,3 im negativ geladenen Zustand vorliegen.

Für weitere Untersuchungen wurde ein pH-Wert von 2,3 verwendet. Dieser entspricht dem pH-Wert des Extraktionsmittels von Ethephon und HEPA und ist somit am einfachsten in die Analytik zu integrieren.

Die Wiederfindungen der Probenaufgabe bei verschiedenen pH-Werten sind in Abb. 35 dargestellt.



**Abb. 35: Wiederfindungen verschiedener pH-Werte bei Probenaufgabe auf SPE**

#### 7.2.2.3.3.2 Wahl des pH-Wertes für die Elution vom SPE-Material

Nachdem die Bedingung ermittelt wurde, bei der Ethephon und HEPA vom SPE-Material festgehalten werden, müssen nun jene bestimmt werden, um diese wieder vom Material zu lösen.

Hierfür wurde Standardlösung mit einem pH-Wert von 2,3 auf die ausgewählten und entsprechend konditionierten SPE-Materialien gegeben. Anschließend wurden verschiedene wässrige Lösungen mit unterschiedlichen pH-Werten auf die SPE-Kartusche gegeben, das Eluat aufgefangen und im Stickstoffevaporator bis zur Trockne eingengt. Der getrocknete Rückstand wurde in Milli-Q-Wasser gelöst und mittels LC-MS/MS vermessen. Lassen sich die Analyten in diesem Eluat zu 100 % wiederfinden, so konnten diese von dem SPE-Material gelöst werden. Werden hingegen 0 % wiedergefunden, so werden die Analyten weiterhin vom SPE-Material festgehalten.

Die getesteten pH-Bereiche für die Elution vom SPE-Material und die verwendeten Additive, um diesen einzustellen, sind in Tab. 41 zusammengefasst.

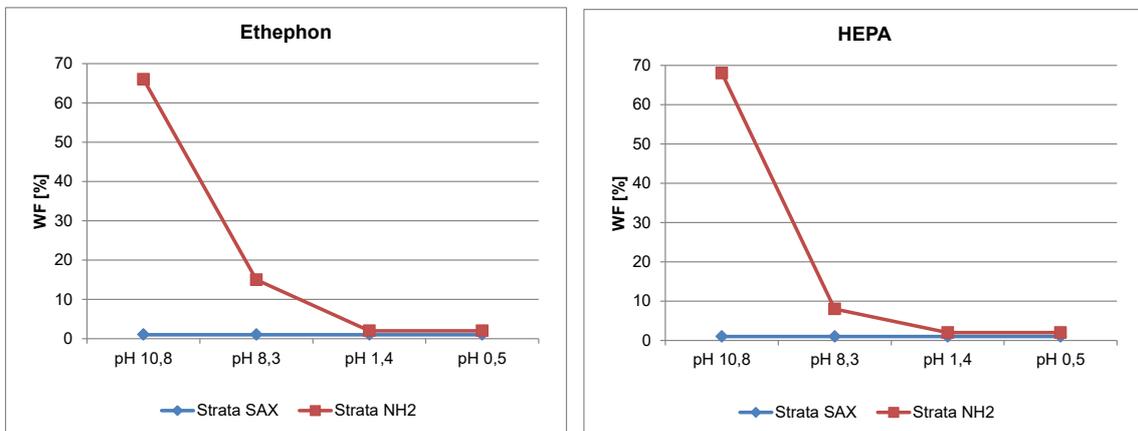
**Tab. 41: Getestete pH-Werte für Elution von Anionenaustausch-SPE**

<b>pH-Wert</b>	<b>Additiv zum Milli-Q-Wasser</b>
10,8	Ammoniak
8,3	Ammoniak und Ammoniumacetat
1,4	Schwefelsäure
0,5	Salzsäure

Selbst bei einem stark saurem pH-Wert von 0,5 liegen Ethephon und HEPA in der negativ geladenen Form vor und es kommt somit nicht zur Elution dieser Analyten von den Anionenaustauscher-Materialien. Die ermittelten Wiederfindungen liegen bei 0 %. Bei dem SPE-Material Strata NH<sub>2</sub> kann im basischen pH-Bereich eine Elution beobachtet werden. Diese lässt sich dadurch erklären, dass die primäre Aminogruppe des SPE-Materials im basischen pH-Bereich die positive Ladung verliert und neutral geladen vorliegt und somit die ionischen Wechselwirkungen zu Ethephon und HEPA aufgehoben werden. Jedoch werden nur 66 % an Ethephon und 68 % an HEPA wiedergefunden. Somit liegen zwischen dem SPE-Material und den Analyten weitere Wechselwirkungen vor. Es findet keine vollständige Elution der Analyten statt.

Aufgrund der fehlenden Elution beim Strata SAX-Material und der quantitativen Verluste bei dem Strata NH<sub>2</sub>-Material, eignet sich die Anionenaustausch-SPE nicht zur Extraktreinigung von Ethephon und HEPA.

Die ermittelten Wiederfindungen sind in Abb. 36 graphisch dargestellt.



**Abb. 36: Wiederfindungen bei der Elution mit Lösungen verschiedener pH-Werte**

### 7.3 Trennverfahren

In diesem Kapitel werden verschiedene Verfahren untersucht, die zur Abtrennung der Matrixbestandteile von den Analyten dienen sollen und so die darauf folgende Detektion nicht mehr interferieren können.

#### 7.3.1 Flüssigkeitschromatographie

Bei der Chromatographie handelt es sich um ein physikalisch-chemisches Trennverfahren, bei dem die zu trennenden Analyten zwischen zwei nicht miteinander mischbaren Phasen verteilt werden. Dabei ist eine der beiden Phasen eine festliegende Phase, die sogenannte stationäre Phase und die andere eine mobile Phase. Meist handelt es sich bei der stationären Phase um Siliciumdioxid, welches durch die Reaktion der freien Silanolgruppen mit Alkyldimethylchlorsilan chemisch modifizierbar ist (siehe Abb. 37). [90-91]

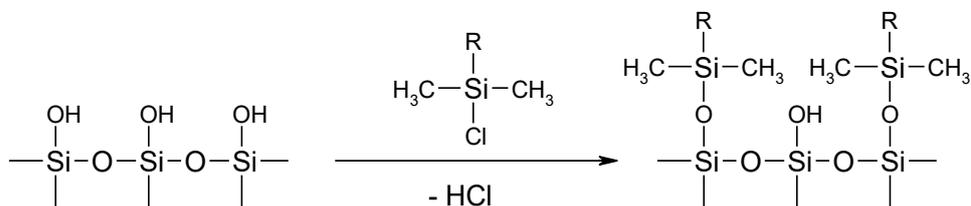


Abb. 37: Chemische Modifizierung von Kieselgel

Durch Variation des Restes R ergibt sich eine Vielzahl möglicher Eigenschaften der stationären Phase. Über den Rest R ist die stationäre Phase in der Lage, mehr oder weniger stark mit den einzelnen aufzutrennenden in Wechselwirkung zu treten. Diese Wechselwirkungen sind nicht nur abhängig von den Eigenschaften der stationären Phase, sondern auch von denen der mobilen Phase und den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Analyten. Es finden mehrere reversible Gleichgewichtseinstellungen der Komponenten zwischen der mobilen und stationären Phase statt, wodurch sich die Transportgeschwindigkeit der einzelnen Analyten im Vergleich zur Eluentengeschwindigkeit verringert. [90-91]

Je stärker sich die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Analyten unterscheiden, desto besser sind diese voneinander trennbar. Bei schwachen Wechselwirkungen mit der stationären Phase liegt nur eine geringe Retention des Analyten vor, wodurch dieser nur geringfügig langsamer eluiert als die mobile Phase. Hingegen liegt bei stärkeren Wechselwirkungen eine stärkere Retention und somit eine stärker verzögerte Elution vor.

Die Flüssigkeitschromatographie (LC) stellt neben der Gaschromatographie (GC) ein Hauptverfahren der chromatographischen Trenntechniken dar. Hierbei wird als mobile Phase eine Flüssigkeit verwendet. Abhängig vom Betriebsdruck ergeben sich unterschiedliche Arten der LC. In der Rückstandsanalytik kommt heute überwiegend die Hochleistungsflüssigkeits-chromatographie (HPLC: High Performance Liquid Chromatographie) zum Einsatz. [90-91]

Getestet wurden mehrere LC-Phasen. Zum einen verschiedene C18-Phasen, die durch spezielles Endcapping auch für polare Analyten geeignet sein sollten. Des Weiteren wurden Ionenaustauschphasen getestet, wo durch ionische Wechselwirkungen eine chromatographische Auftrennung erreicht werden soll. Ferner wurden die zwei Sonderphasen Hypercarb™ und ZIC®-pHILIC untersucht, die laut Herstelleraussagen gezielt für hochpolare Analyten entwickelt wurden.

Hypercarb™ ist ein Material bestehend aus 100 % porösem Graphit. Für die chromatographische Auftrennung bei diesem Material spielen zwei Mechanismen eine Rolle: zum einen hydrophobe und zum anderen elektrostatische Wechselwirkungen.

Die Abkürzung HILIC steht für Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography. Aktuelle Theorien gehen davon aus, dass auf der Oberfläche der stationären Phase ein Wasserfilm vorliegt, der durch die polaren Gruppen des Materials stabilisiert wird. Zwischen diesem Wasserfilm und der verwendeten mobilen Phase findet eine Flüssig-Flüssig-Verteilung statt. Je hydrophiler dabei der Analyt ist, umso stärker ist die Retention auf der stationären Phase. Des Weiteren geht man davon aus, dass zusätzlich elektrostatische Wechselwirkungen von großer Bedeutung sind. [83]

Zur Charakterisierung der getesteten LC-Phasen auf die ausgewählten polaren Analyten wird der Kapazitätsfaktor  $k'$ , auch Retentionsfaktor genannt, herangezogen. Dieser wurde aus der experimentell ermittelten Retentionszeit der Analyten und Totzeit der LC-Säule ermittelt (siehe Formel 8). Je größer der Kapazitätsfaktor ist, desto stärker ist die Wechselwirkung des Analyten mit der stationären Phase der LC-Säule. Alle ermittelten Kapazitätsfaktoren sind zusammenfassend im Anhang 9.11.1 in Tab. 82 aufgeführt.

#### 7.3.1.1 *Triazol-Metaboliten*

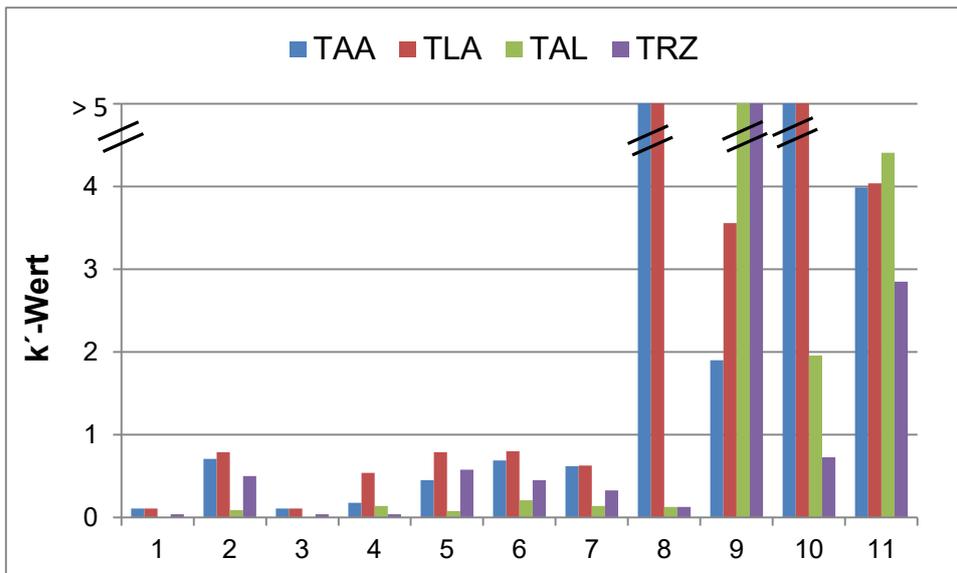
Die Triazol-Metaboliten weisen durch ihren hohen Anteil an Stickstoff im Molekül und durch den zusätzlichen Essigsäure-, Milchsäure- oder Alanin-Rest eine hohe Polarität auf. So zeigen diese Analyten auf den getesteten C18-Phasen nur eine schlechte Retention und es wurden Kapazitätsfaktoren von kleiner eins ermittelt. Auf den Phasen Luna C18(2) und Zorbax Eclipse XDB-C8 wurde dabei die geringste Retention der Analyten beobachtet. Am besten schnitten bei den C18-Phasen die Aquasil C18 und die Synergi Fusion-RP ab. Bezüglich der Peak-Schärfe und des Signal-Rausch-Verhältnisses, konnten keine signifikanten Unterschiede bei diesen zwei Phasen festgestellt werden. Daher wurden nur mit der Aquasil C18 weitere Testmessungen mit Matrixlösungen durchgeführt.

Die LC-Phase Luna NH<sub>2</sub> ist eine schwache Anionenaustauscher und somit konnte nur für die Säuren TAA und TLA eine Retention beobachtet werden. Die ermittelten Kapazitätsfaktoren liegen hier bei größer 10. Für TAL und TRZ ist diese Phase aufgrund fehlender Retention nicht geeignet. Bei beiden wurde ein Kapazitätsfaktor von 0,13 ermittelt. Da dies eine doppelte Messung von den Triazol-Metaboliten bedeuten würde, was zu gesteigerten Kosten und Mehraufwand bei der Analytik der Triazol-Metaboliten führt, wird diese Phase bei weiteren Untersuchungen mit Pflanzenmatrizes nicht mehr berücksichtigt.

Die LC-Phase Luna SCX ist ein Kationenaustauscher. Alle 4 Triazol-Metaboliten weisen den 1,2,4-Triazol-Ring als Grundbaustein auf, dessen Stickstoff an der vierten Position einen pKs-Wert von ca. 2,0 - 2,2 besitzt. Bei sehr niedrigen pH-Werten liegt dieser positiv geladen vor und somit konnte eine Retention der Analyten auf der Luna SCX Phase beobachtet werden. TAA und TLA weisen aufgrund ihres Milch- bzw. Essigsäurerestes geringere kationische Eigenschaften auf als TRZ und TAL. Hier wurden Werte für den Kapazitätsfaktor von 1,9 und 3,6 ermittelt. TRZ besitzt keine zusätzlichen Reste, die die Wechselwirkungen mit der LC-Phase stören. TAL besitzt neben dem Triazol-Ring auch noch eine primäre Aminogruppe (pKs = 7,9) und verfügt daher über die stärksten kationischen Eigenschaften. Für TRZ und TAL wurde ein Kapazitätsfaktor von über 15 bestimmt, welcher starke Wechselwirkungen der Analyten mit der Luna SCX Phase bewirkt.

Hypercarb ist eine Phase aus 100 % porösem Graphit und wurde speziell für hochpolare Analyten entwickelt. Eine starke Retention konnte v. a. bei den Analyten TAA und TLA beobachtet werden und für diese beiden Analyten konnte ein Kapazitätsfaktor von über 10 bestimmt werden. TAL und TRZ zeigen geringere Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial. Hier wurden Werte für den Kapazitätsfaktor von 1,9 und 0,7 ermittelt.

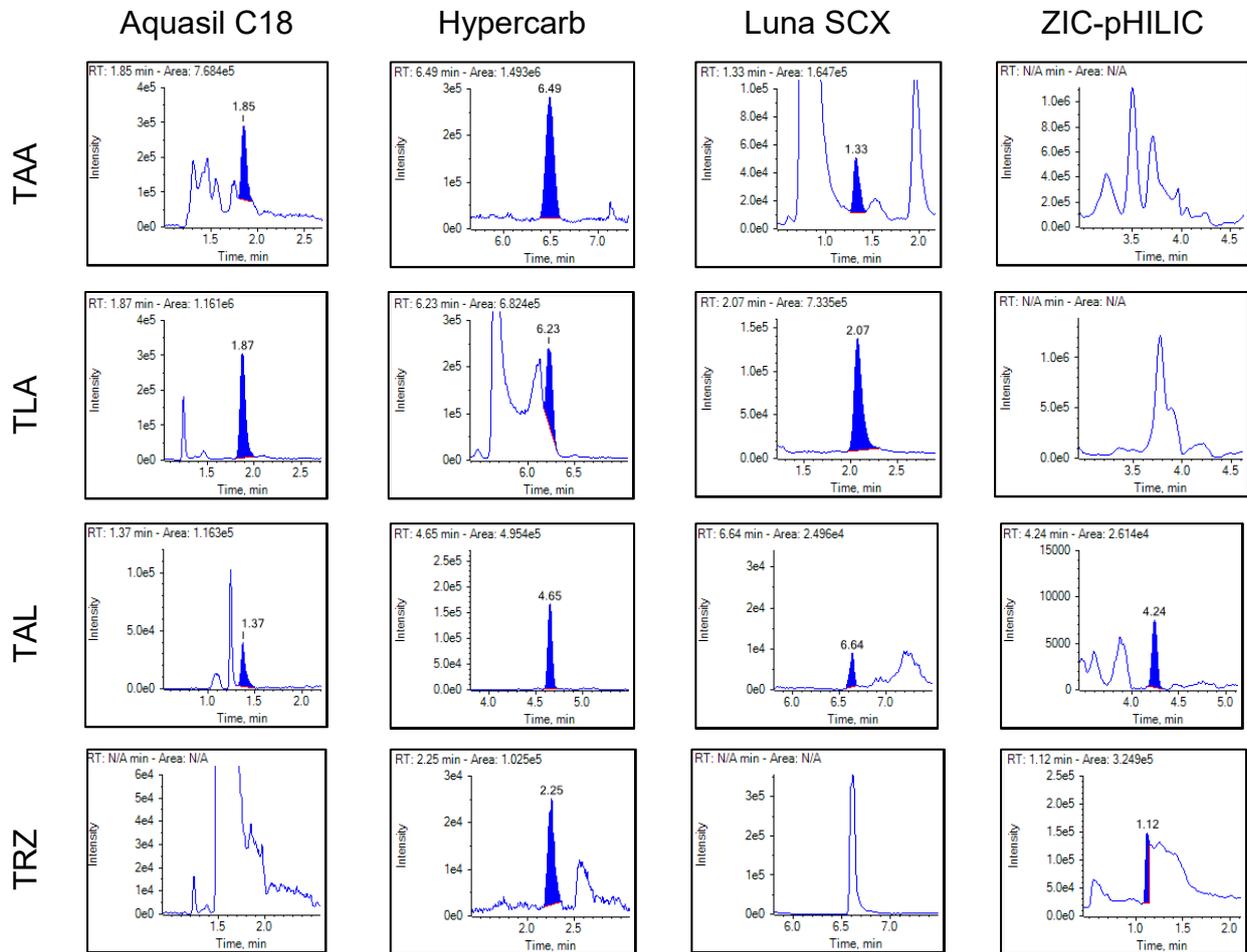
Die HILIC-Phase ist ein speziell für hochpolare Analyten entwickeltes Material. Hier zeigen die Triazol-Metaboliten auch ein gutes Retentionsverhalten mit Werten für den Kapazitätsfaktor von 3,9 bei TAA, 4,0 bei TLA, 4,4 bei TAL und 2,85 bei TRZ. Alle ermittelten Kapazitätsfaktoren für die Triazol-Metaboliten sind in Abb. 38 graphisch dargestellt.



**Abb. 38: k'-Werte der Triazol-Metaboliten**

1 Luna C18(2) - Phenomenex, 2 Aquasil C18 - Thermo, 3 Zorbax Eclipse XDB-C8 - Agilent, 4 Pinnacle DB Aqueous C18 - Restek, 5 Ultra Aqueous C18 - Restek, 6 Synergi Fusion-RP - Phenomenex, 7 Synergi Polar-RP - Phenomenex, 8 Luna NH<sub>2</sub> - Phenomenex, 9 Luna SCX - Phenomenex, 10 Hypercarb - Thermo, 11 ZIC-pHILIC - Merck

Für die Phasen Aquasil C18, Hypercarb, Luna SCX und ZIC-pHILIC wurden weitere Tests mit Matrixlösung durchgeführt. Die erhaltenen Chromatogramme aller Matrices sind in Anhang 9.11.1.1 zusammengestellt. In Abb. 39 sind exemplarisch die Ergebnisse von der Matrix Futterrübe dargestellt.



**Abb. 39: 0,10 mg/kg TDMs in Futterrübe - verschiedene LC-Phasen**

Bei der Phase Aquasil C18 weist das chromatographische Signal von TAA einen hohen chemischen Untergrund. Dies kann zu ungenauen und falsch-positiven Ergebnissen führen. Des Weiteren wird dadurch die Bestimmungsgrenze von 0,01 mg/kg in der Matrix Futterrübe unerreichbar. Die Signale von TLA und TAL sind weniger gestört und können ohne Einschränkungen für die quantitative Bestimmung dieser Analyten in Futterrübe verwendet werden. Bei TRZ ist das Analytsignal durch eine Interferenz überlagert und somit nicht auswertbar.

Bei der Hypercarb-Phase eignen sich die Signale von TAA, TAL und TRZ für die quantitative Bestimmung in Futterrübe. Bei TLA ist das Analytsignal durch eine Interferenz überlagert und kann für quantitative Aussagen nicht verwendet werden. Die Luna-SCX weist für TAA einen sehr hohen chemischen Untergrund auf. Dies limitiert die Bestimmungsgrenze auf 0,10 mg/kg, also dem zehnfachen der geforderten Bestimmungsgrenze. Bei TAL liegt zwar ein geringerer chemischer Untergrund vor, jedoch zeigt dieser Analyt unter diesen LC-Bedingungen eine zu geringe Empfindlichkeit. Vergleicht man die erreichten Intensitäten der Triazol-Metaboliten bei der Luna SCX Phase mit denen der Aquasil C18 und Hypercarb, so fällt auf, dass bei allen Triazol-Metaboliten die Empfindlichkeit bei der Luna SCX am geringsten ist. Der Grund hierfür ist die LC-Eluenten-Zusammensetzung, welche die Ionisierung bei der MS/MS-Detektion nicht so gut fördert wie die Eluenten bei der Aquasil C18 und Hypercarb-Säule. Im Falle von TRZ liegt bei der Trennung mit der Luna SCX zusätzlich eine Interferenz vor, die das Analytsignal vollständig überlagert.

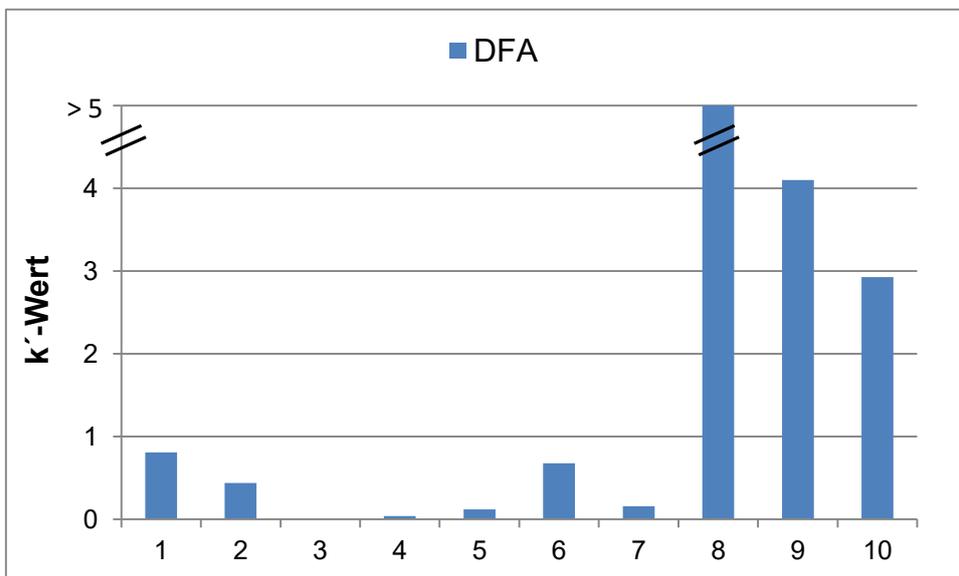
Die HILIC-Phase eignet sich am wenigsten für die quantitative Analyse der Triazol-Metaboliten in Futterrübe. Hier wurde nur für TAL ein störungsfreies Analytsignal erhalten. Die Chromatogramme der anderen 3 TDMs sind mit Interferenzen gestört, weshalb eine quantitative Auswertung dieser nicht möglich ist.

Keine der getesteten LC-Phasen eignet sich für die gleichzeitige quantitative Analyse aller 4 TDMs in pflanzlichen Materialien. Abhängig von der Matrix ist mindestens bei einem der 4 Analyten das Chromatogramm charakterisiert durch einen hohen chemischen Untergrund oder das Analytsignal wird durch eine Interferenz überlagert, wodurch die quantitative Bestimmung bei 0,01 mg/kg nicht möglich ist. Daher werden in den nachfolgenden Kapiteln Möglichkeiten untersucht, die Selektivität der Detektion zu erhöhen. Betrachtet werden die Aquasil C18 und die Hypercarb, da diese gegenüber den beiden anderen LC-Phasen bisher die besten Ergebnisse lieferten.

### 7.3.1.2 DFA

Die DFA ist aufgrund der Säuregruppe ein hochpolarer Analyt. So zeigte dieser Analyt nur sehr geringe Wechselwirkungen mit den getesteten C18-Materialien (Abb. 40, Säulen 1-7) und es wurden Kapazitätsfaktoren kleiner eins bestimmt. Bei der Luna NH<sub>2</sub>-Phase, einem schwachen Anionenaustausch-Material, wurde die DFA sehr stark retardiert und der ermittelte Wert für den Kapazitätsfaktor liegt bei 13. Auch bei den Phasen Hypercarb und HILIC zeigte die DFA gute Retention und es wurden Werte für den Kapazitätsfaktor von 4,1 und 2,9 bestimmt.

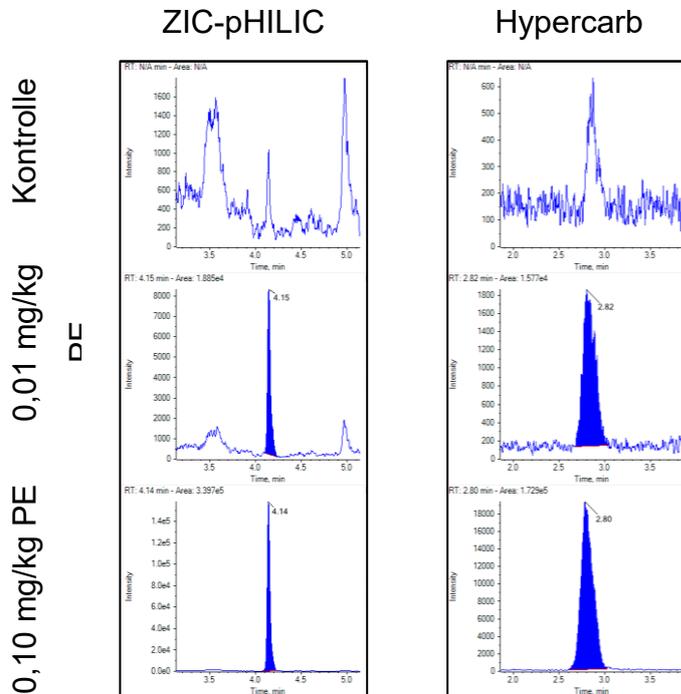
Eine grafische Darstellung der ermittelten Kapazitätsfaktoren für DFA befindet sich in Abb. 40.



**Abb. 40: k'-Werte der DFA**

1 Luna C18(2) - Phenomenex, 2 Aquasil C18 - Thermo, 3 Zorbax Eclipse XDB-C8 - Agilent, 4 Pinnacle DB Aqueous C18 - Restek, 5 Ultra Aqueous C18 - Restek, 6 Synergi Fusion-RP - Phenomenex, 7 Synergi Polar-RP - Phenomenex, 8 Luna NH<sub>2</sub> - Phenomenex, 9 Hypercarb - Thermo, 10 ZIC-pHILIC - Merck

Durch die verwendeten Additive in den Eluenten zeigte die DFA bei der Luna NH<sub>2</sub>-Phase eine sehr schlechte Empfindlichkeit. Daher wurden weitere Untersuchungen mit Pflanzenmatrizes nur mit den Phasen Hypercarb und HILIC durchgeführt.



**Abb. 41: DFA in Soja - Vergleich LC-Säulen ZIC-pHILIC und Hypercarb**

Vergleicht man die Ergebnisse beider LC-Phasen miteinander, so zeigen beide Phasen unterschiedliche Stärken. Beispielhaft wird dies für die Matrix Sojabohne in Abb. 41 gezeigt. Bei der HILIC-Phase ist das Analytsignal der DFA schmäler als das bei der Hypercarb-Phase, was bei geringen Rückständen aufgrund der daraus resultierenden höheren Signalintensität von Vorteil sein kann. Jedoch ist der chemische Untergrund bei der HILIC-Phase stärker ausgeprägt als bei der Hypercarb-Phase. Die Ergebnisse aller getesteten Matrizes befinden sich im Anhang 9.11.1.2.

Es zeigt sich aber, dass beide LC-Phasen für die Bestimmung von DFA in allen getesteten pflanzlichen Materialien geeignet sind. Entsprechend der Richtlinie der SANCO [86] müssen 70 - 120 % des Analyten wiedergefunden werden, damit eine ausreichende Richtigkeit gewährleistet ist. Bei der HILIC-Phase liegen die ermittelten Wiederfindungen im Bereich von 99 - 109 % und bei der Hypercarb im Bereich von 88 - 107 %. Beide Phasen erfüllen damit das Kriterium der SANCO-Richtlinie. Des Weiteren liegen die ermittelten relativen Standardabweichungen unter 9 %. Entsprechend der SANCO-Richtlinie wären bis zu 20 % zulässig. Somit weisen die ermittelten quantitativen Ergebnisse eine ausreichende Richtigkeit und Reproduzierbarkeit auf.

Die bestimmten Wiederfindungen und Wiederholbarkeiten der DFA in den getesteten pflanzlichen Materialien sind in Tab. 42 zusammengefasst.

**Tab. 42: Wiederfindung und Reproduzierbarkeit ZIC-pHILIC und Hypercarb bei DFA**

DFA	ZIC-pHILIC				Hypercarb			
	0,01 mg/kg PE		0,10 mg/kg PE		0,01 mg/kg PE		0,10 mg/kg PE	
	[%] WF	[%] CV*						
<b>Salat</b>	100	3	104	1,5	88	6,9	101	3,2
<b>Orange</b>	104	1,5	104	0,6	96	4,2	96	1
<b>Soja</b>	108	3,3	109	4,3	92	8,5	107	2,6
<b>Raps</b>	99	1,3	103	1,4	98	7,74	102	1,3
<b>Rübe</b>	101	3	104	0,9	101	5,7	101	2

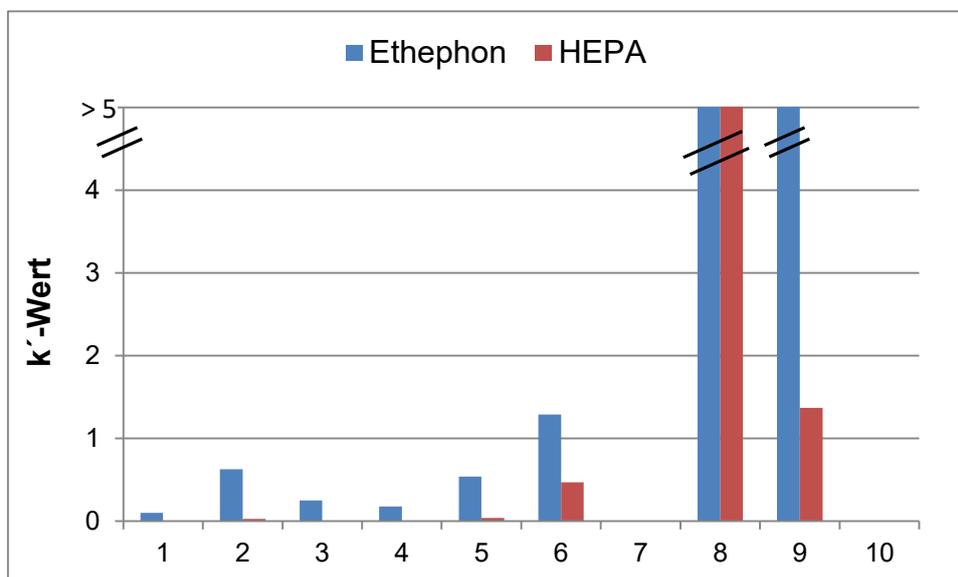
\* ... 5 Wiederholungen

### 7.3.1.3 *Ethephon und HEPA*

Auch Ethephon und HEPA erwiesen sich als zu polar, um starke Wechselwirkungen mit den stationären Phasen der gewählten C18-Phasen einzugehen. Mit Kapazitätsfaktoren kleiner eins liegt hier eine zu geringe Retention vor. Bei der Luna NH<sub>2</sub>-Phase konnte eine sehr gute Retention dieser beiden Analyten beobachtet werden. Es wurden Werte für den Kapazitätsfaktor von größer 10 ermittelt.

Bei der Hypercarb-Phase konnte v. a. für das Ethephon mit einem Kapazitätsfaktor von 6,0 eine gute Retention beobachtet werden. Bei HEPA sind die Wechselwirkungen auf dieser stationären Phase geringer. Es wurde ein Kapazitätsfaktor von 1,4 bestimmt. Die HILIC-Phase eignet sich nicht als Trennverfahren für Ethephon und HEPA. Trotz Variation von pH-Wert und Pufferzusammensetzung bei den LC-Eluenten war es nicht möglich, scharfe Analytsignale zu erhalten.

Die ermittelten Kapazitätsfaktoren für Ethephon und HEPA sind in Abb. 42 graphisch dargestellt.



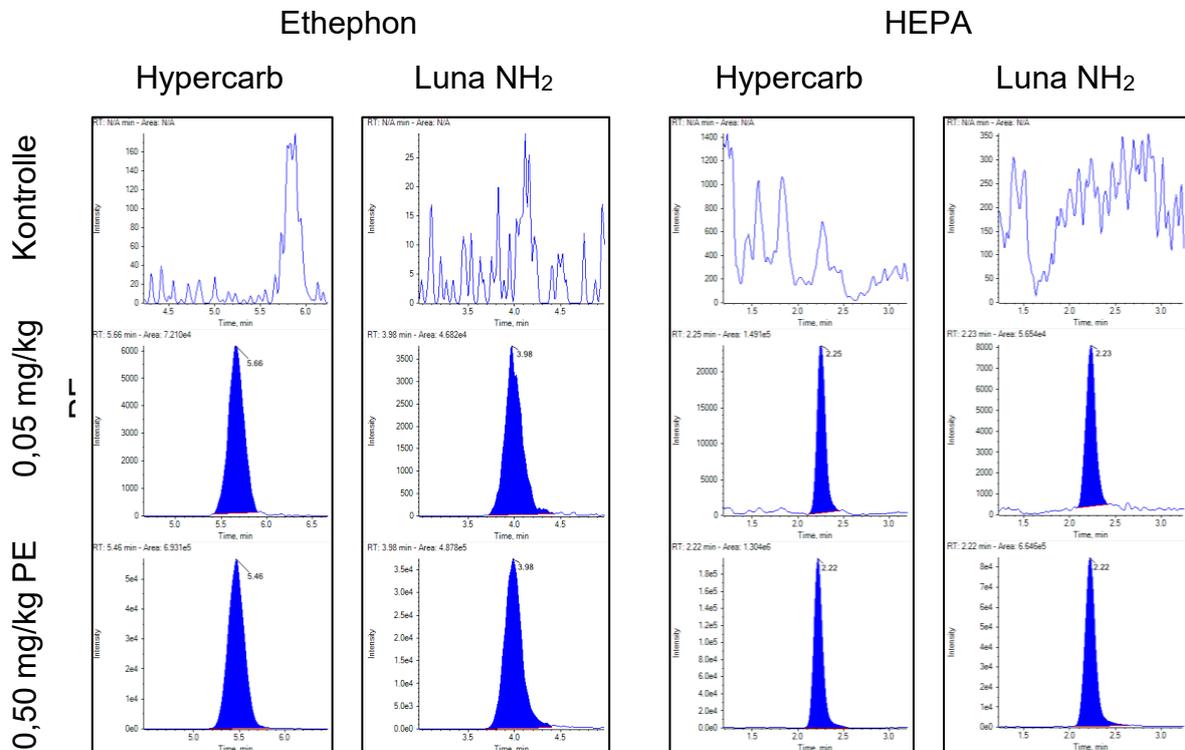
**Abb. 42: k'-Werte von Ethephon und HEPA**

1 Luna C18(2) - Phenomenex, 2 Aquasil C18 - Thermo, 3 Zorbax Eclipse XDB-C8 - Agilent, 4 Pinnacle DB Aqueous C18 - Restek, 5 Ultra Aqueous C18 - Restek, 6 Synergi Fusion-RP - Phenomenex, 7 Synergi Polar-RP - Phenomenex, 8 Luna NH<sub>2</sub> - Phenomenex, 9 Hypercarb - Thermo, 10 ZIC-pHILIC - Merck

Da für die LC-Phasen Hypercarb und Luna NH<sub>2</sub> die besten Retentionen der Analyten beobachtet wurden, folgten bei diesen Phasen Tests mit verschiedensten Pflanzenmatrizes. Sowohl die Hypercarb-Phase als auch das LC-Material Luna NH<sub>2</sub> eignen sich für die Bestimmung der Analyten Ethephon und HEPA.

In Abb. 43 sind die Ergebnisse beispielhaft für die Matrix Orange dargestellt. Die beobachteten Signale sind frei von Interferenzen und ausreichend intensiv, um diese auch im geforderten LOQ-Bereich auswerten zu können.

Die Ergebnisse aller Matrices befinden sich im Anhang 9.11.1.3.



**Abb. 43: Ethephon und HEPA in Orange - Vergleich Hypercarb und Luna NH<sub>2</sub>**

Die ermittelten Wiederfindungen im LOQ- und zehnfach LOQ-Bereich liegen im Bereich von 80 - 120 % bei der Hypercarb-Phase und im Bereich von 90 - 115 % bei der Luna NH<sub>2</sub> Phase für beide Analyten. Die ermittelten relativen Standardabweichungen befinden sich unter 10 %. Die Ergebnisse sind somit nach der SANCO-Richtlinie ausreichend präzise und wiederholbar. Beide getesteten LC-Phasen eignen sich für die quantitative Bestimmung von Ethephon und HEPA in pflanzlichen Materialien.

Alle ermittelten Wiederfindungen und relativen Standardabweichungen von Ethephon und HEPA in den verschiedensten pflanzlichen Materialien sind in Tab. 43 und Tab. 44 zusammengefasst.

**Tab. 43: Wiederfindung und Reproduzierbarkeit von Ethephon auf Hypercarb und Luna NH<sub>2</sub>**

Ethe- phon	Hypercarb				Luna NH <sub>2</sub>			
	0,05 mg/kg		0,50 mg/kg		0,05 mg/kg		0,50 mg/kg	
	[%] WF	[%] CV*	[%] WF	[%] CV*	[%] WF	[%] CV*	[%] WF	[%] CV*
<b>Salat</b>	120	4,7	115	2,1	98	3,5	114	4,6
<b>Orange</b>	95	2,5	97	2,3	110	4,1	115	2,3
<b>Soja</b>	91	6,0	97	1,3	98	1,9	104	2,0
<b>Raps</b>	98	2,2	95	1,2	93	5,7	100	2,6
<b>Rübe</b>	118	9,8	84	2,2	107	6,2	100	2,4

\* ... 5 Wiederholungen

**Tab. 44: Wiederfindung und Reproduzierbarkeit von HEPA auf Hypercarb und Luna NH<sub>2</sub>**

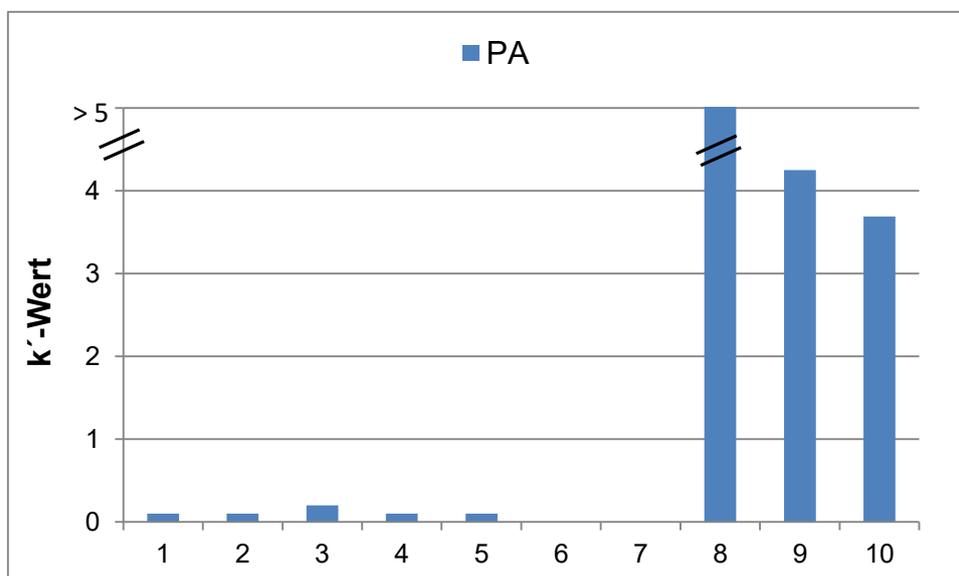
HEPA	Hypercarb				Luna NH <sub>2</sub>			
	0,05 mg/kg PE		0,50 mg/kg PE		0,05 mg/kg PE		0,50 mg/kg PE	
	[%] WF	[%] CV*	[%] WF	[%] CV*	[%] WF	[%] CV*	[%] WF	[%] CV*
<b>Salat</b>	98	5,7	100	5,4	94	4,4	105	3,8
<b>Orange</b>	102	3,1	102	1,4	94	2,5	104	1,5
<b>Soja</b>	119	2,6	116	1,5	101	3,9	94	2,2
<b>Raps</b>	108	7,3	106	5,4	93	5,3	95	1,9
<b>Rübe</b>	80	9,2	98	6,8	90	7,6	103	5,2

\* ... 5 Wiederholungen

#### 7.3.1.4 Phosphonsäure

Die Phosphonsäure zeigt auf der Luna NH<sub>2</sub>, der Hypercarb und auf der ZIC-pHILIC ein gutes Retentionsverhalten. Hier wurden Kapazitätsfaktoren von >10, 4,25 und 3,7 ermittelt. C18-Phasen sind für diesen Analyten nicht geeignet, da hier nur eine sehr schwache bis gar keine Retention des Analyten auf der stationären Phase beobachtet wurde.

Alle ermittelten Werte für den Kapazitätsfaktor der verschiedenen LC-Phasen sind in Abb. 44 dargestellt.



**Abb. 44: k'-Werte der Phosphonsäure**

1 Luna C18(2) - Phenomenex, 2 Aquasil C18 - Thermo, 3 Zorbax Eclipse XDB-C8 - Agilent, 4 Pinnacle DB Aqueous C18 - Restek, 5 Ultra Aqueous C18 - Restek, 6 Synergi Fusion-RP - Phenomenex, 7 Synergi Polar-RP - Phenomenex, 8 Luna NH<sub>2</sub> - Phenomenex, 9 Hypercarb - Thermo, 10 ZIC-pHILIC - Merck

Die am besten von Matrix abgetrennten und intensivsten Signale für Phosphonsäure wurden bei dem LC-Material Hypercarb beobachtet, weshalb hierfür weitere Tests mit pflanzlichen Materialien folgten. Die Hypercarb-Phase erwies sich dabei als geeignet für die Bestimmung der Phosphonsäure in den getesteten pflanzlichen Matrizes. Es liegen keine Interferenzen vor, die das Analytsignal stören. Des Weiteren ist der chemische Untergrund zwar leicht erhöht, stört aber die quantitative Auswertung des Signales nicht. Problematisch ist das ubiquitäre Vorkommen der Phosphonsäure in pflanzlichen Materialien, weshalb keine rückstandsfreien Materialien gefunden wurden. Nach Abzug des Blindwertes wurden Wiederfindungen für die Phosphonsäure in den getesteten Materialien von 91 - 115 % bestimmt. Die Werte für die relativen Standardabweichungen lagen unter 12 %. Somit eignet sich die Hypercarb für die quantitative Bestimmung der Phosphonsäure in pflanzlichen Materialien. Die ermittelten Ergebnisse sind ausreichend präzise und reproduzierbar.

Die Ergebnisse für die Phosphonsäure-Bestimmung mittels Hypercarb sind in Abb. 45 und in Tab. 45 dargestellt. Phosphonsäure kommt in pflanzlichen Materialien ubiquitär vor. Daher sind bereits in den Kontrollen Rückstände von Phosphonsäure sichtbar und berechnete Wiederfindungen mussten um den Blindwert korrigiert werden.

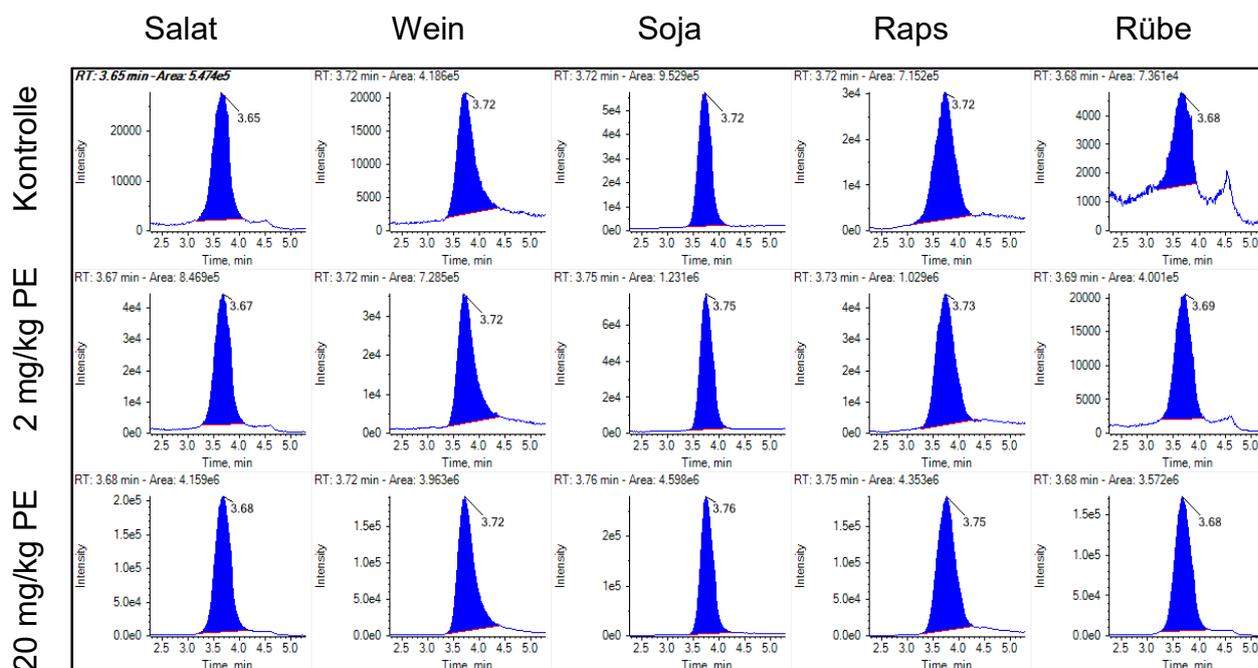


Abb. 45: Hypercarb - Phosphonsäure in verschiedenen pflanzlichen Matrices

Tab. 45: Wiederfindung und Reproduzierbarkeit von Phosphonsäure auf Hypercarb

Phosphonsäure	Hypercarb			
	2 mg/kg PE		20 mg/kg PE	
	[%] WF*	[%] CV**	[%] WF*	[%] CV**
Salat	98	2,2	118	1,9
Wein	102	5,4	116	3,6
Soja	91	2,3	119	2,7
Raps	103	4,6	119	3,7
Rübe	107	11,8	115	9,5

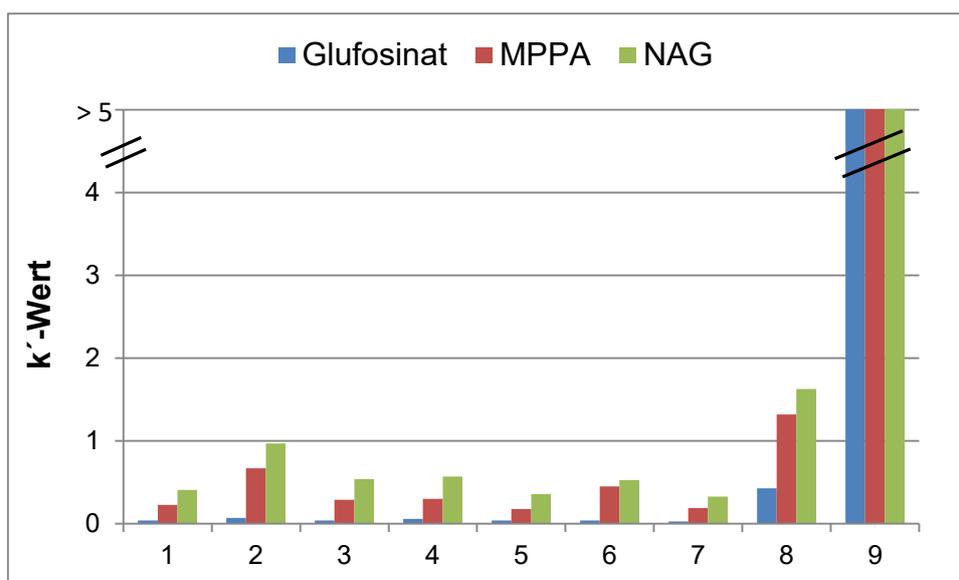
\* ... Blindwert korrigiert

\*\* ... 5 Wiederholungen

### 7.3.1.5 Glufosinat und dessen Metaboliten

NAG weist im Vergleich zu Glufosinat und MPPA die geringste Polarität auf und zeigt somit von diesen 3 Analyten das beste Retentionsverhalten auf den getesteten C18-Phasen. Aber auch bei NAG ist dieses sehr gering und die ermittelten Kapazitätsfaktoren liegen unter eins. Auf der Hypercarb-Phase wurde eine etwas stärkere Retention der Analyten beobachtet mit Kapazitätsfaktoren von 0,4 für Glufosinat, 1,3 für MPPA und 1,6 für NAG. Die stärksten Wechselwirkungen zwischen den Analyten und der stationären Phase wurden jedoch bei der HILIC-Phase festgestellt mit Kapazitätsfaktoren von 6,6 für Glufosinat, 6,6 für MPPA und 5,9 für NAG.

Alle ermittelten Kapazitätsfaktoren der 3 Analyten auf den verschiedensten LC-Phasen sind in Abb. 46 dargestellt.



**Abb. 46: k'-Werte von Glufosinat, MPPA und NAG**

1 Luna C18(2) - Phenomenex, 2 Aquasil C18 - Thermo, 3 Zorbax Eclipse XDB-C8 - Agilent, 4 Pinnacle DB Aqueous C18 - Restek, 5 Ultra Aqueous C18 - Restek, 6 Synergi Fusion-RP - Phenomenex, 7 Synergi Polar-RP - Phenomenex, 8 Hypercarb - Thermo, 9 ZIC-pHILIC - Merck

Aufgrund des Vermögens die 3 Analyten zu retardieren, eignen sich die Phasen Hypercarb und HILIC am besten zur Bestimmung dieser Analyten in pflanzlichen Materialien. Es folgten somit Untersuchungen in Matrix.

Die Ergebnisse dieser Tests am Beispiel Sojabohne sind in Abb. 47 dargestellt. Vergleicht man die zwei getesteten Phasen, so scheint bei der HILIC-Phase eine bessere Auftrennung von Analyten und Matrix vorzuliegen. Bei der Hypercarb-Phase sind die Analytsignale durch Interferenzen überlagert wie z. B. bei Glufosinat in Soja. Des Weiteren ist das chemische Untergrundrauschen teilweise so stark, dass die Analytsignale dadurch überlagert werden wie es bei MPPA in Soja der Fall ist. Auf der HILIC-Phase sind die Analytsignale frei von Interferenzen und das chemische Untergrundrauschen ist auch nicht so stark ausgeprägt. Jedoch sind die Analytsignale von NAG in einigen Matrizen nicht intensiv genug für die quantitative Auswertung im geforderten LOQ-Bereich.

Für die Analytik von Glufosinat und dessen Metaboliten bedarf es einer höheren Selektivität zur Entfernung von Interferenzen und auch mehr Empfindlichkeit, um noch im geforderten LOQ-Bereich quantitativ auswerten zu können.

Die Ergebnisse von Glufosinat und dessen Metaboliten in den gewählten pflanzlichen Matrizen befinden sich im Anhang 9.11.1.5.

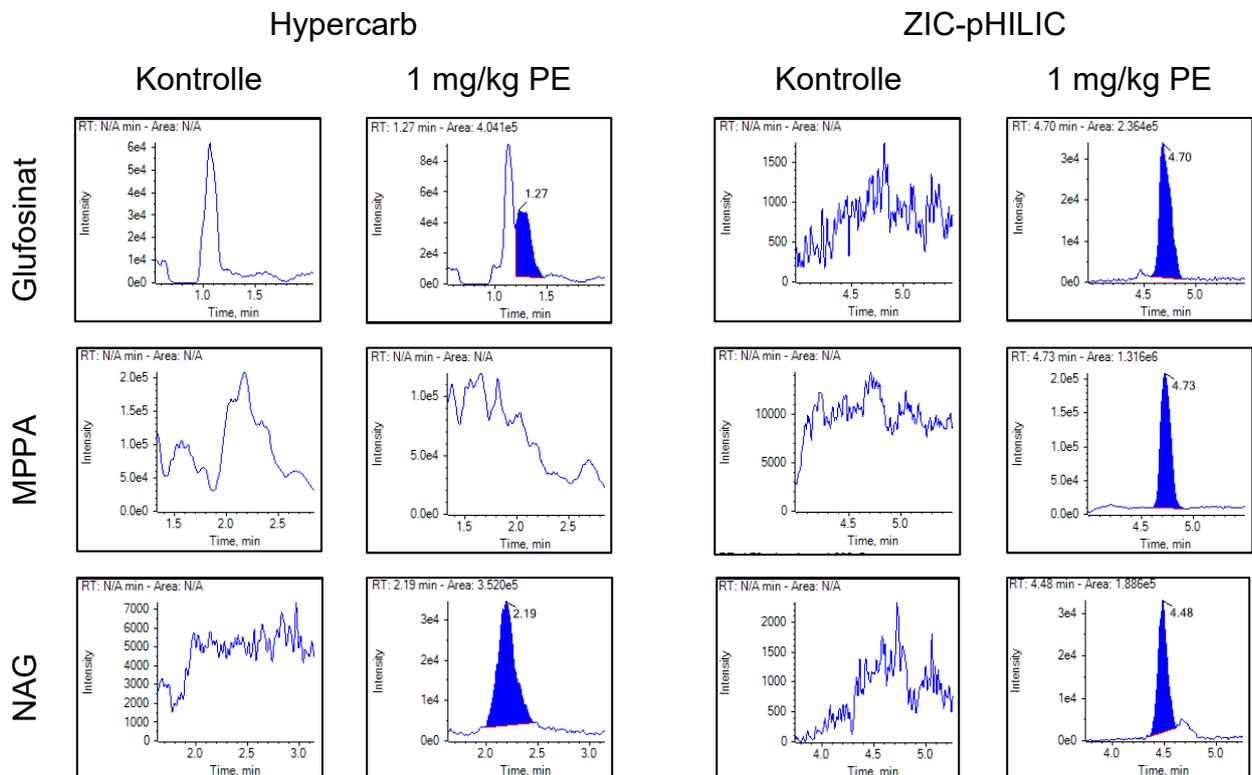


Abb. 47: Glufosinat und Metaboliten in Soja - Vergleich Hypercarb und ZIC-pHILIC

### 7.3.2 Kapillarelektrophorese

Die Elektrophorese ist ein Trennverfahren für Analyten, die geladen sind. Unter Anwesenheit eines elektrischen Feldes werden die in Lösung vorliegenden Ionen aufgrund ihrer unterschiedlichen Mobilitäten innerhalb dieses Feldes aufgetrennt. Die Mobilität hängt dabei von der Ladung des Analyten, dessen Größe und von der Viskosität des Puffers ab. Des Weiteren spielen die Ionenstärke des verwendeten Puffers, die Temperatur und der pH-Wert eine wichtige Rolle bei der Mobilität der Analyten in diesem elektrischen Feld. [92]

Ein Kapillarelektrophorese-System besteht aus einer fused-silica Kapillare, deren Enden jeweils in einem Pufferreservoir eingetaucht sind. In diese Pufferreservoir tauchen auch die Kathode bzw. Anode. Über diese Elektroden wird der Kontakt zwischen Kapillare und Hochspannungsfeld hergestellt. Für die Probenaufgabe wird eines der Pufferreservoir, meist das der Anode, durch ein Probenreservoir ausgetauscht. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes oder durch Ausübung von Druck wird die Probe in die Kapillare übergeführt. Nach Wechsel vom Proben- in das Pufferreservoir und Anlegen des Hochspannungsfeldes kann dann die Auftrennung der Ionen erfolgen. [92-93]

Es gibt eine Vielzahl von Ausführungen bei der Kapillarelektrophorese. Am weitesten verbreitet ist die Kapillar-Zonenelektrophorese (CZE), die auch im Rahmen dieser Arbeit für die ausgewählten Analyten getestet wurde.

Die Messzeit am Agilent CE-MS/MS-System war auf vier Tage beschränkt, so dass nur wenige Testmessungen durchgeführt werden konnten. Technische Unterstützung erhielt ich dabei von Dr. Gordon A. Ross.

### 7.3.2.1 *Triazol-Metaboliten*

Die Triazol-Metaboliten lassen sich gut mit der Kapillarelektrophorese auftrennen und so wurden Migrationszeiten von 11,01 min für TAA, 10,83 min für TLA, 8,73 min für TAL und 6,45 min für TRZ bestimmt. Auch für die Matrix Brokkoli erwies sich die Kapillarelektrophorese als sehr gut geeignet. Neben den Analytsignalen sind zwar Störsignale sichtbar, diese sind jedoch vollständig von den Analytsignalen abgetrennt und interferieren somit nicht die quantitative Bestimmung. Die Elektropherogramme der Triazol-Metaboliten in Lösungsmittel und Brokkoli-Matrix sind in Abb. 48 dargestellt und zudem für einen besseren Vergleich in Abb. 49 die LC-MS/MS-Chromatogramme der Triazol-Metaboliten.

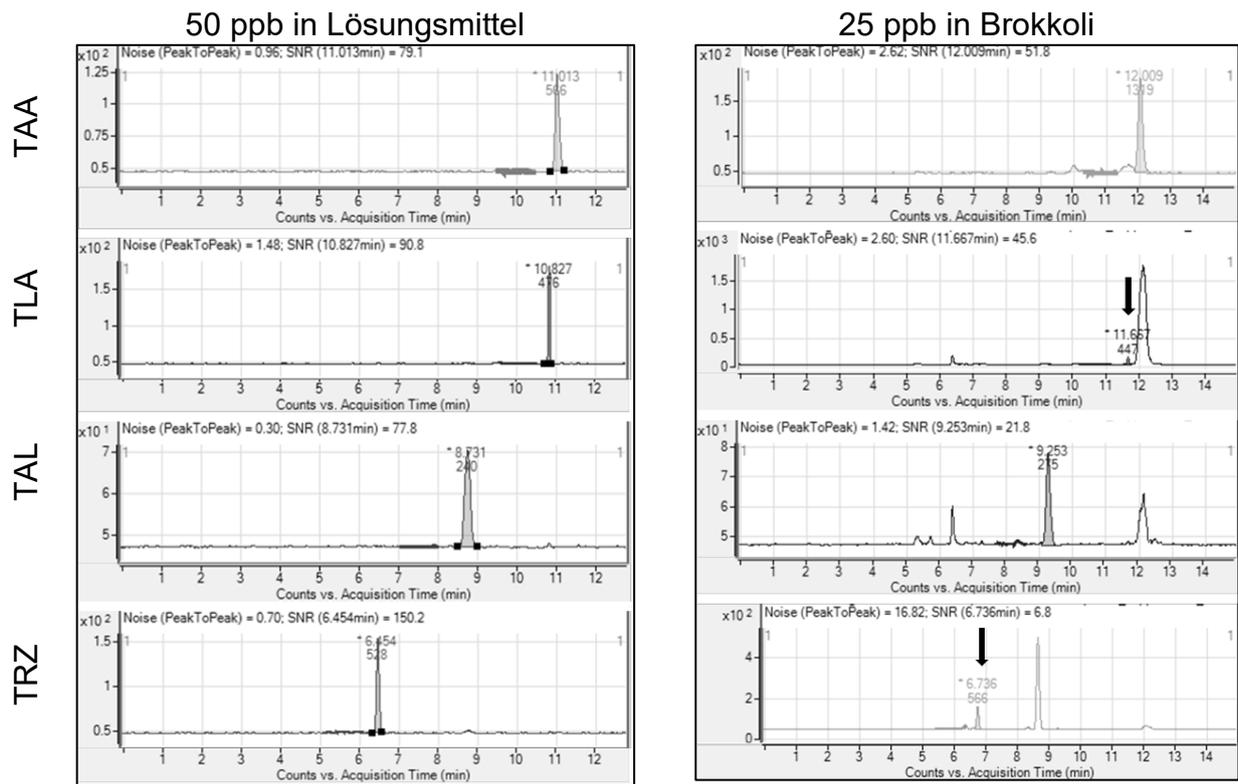


Abb. 48: CE-MS/MS-Ergebnisse der Triazol-Metaboliten

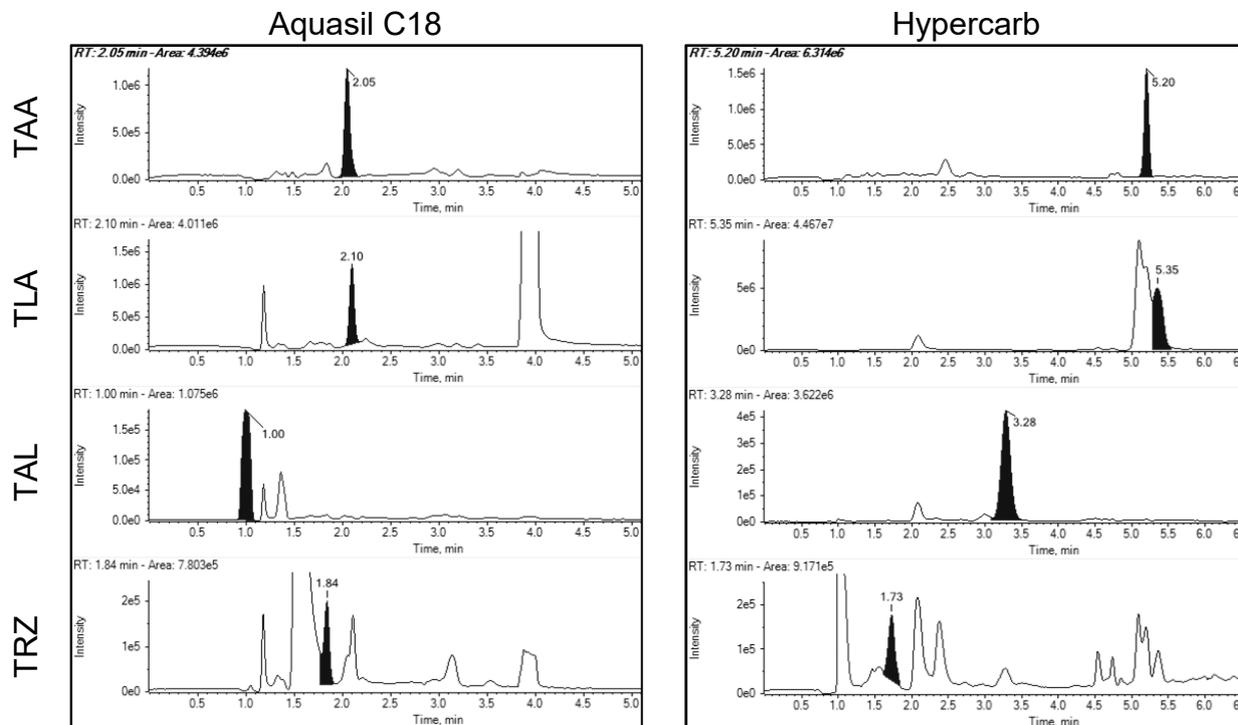


Abb. 49: LC-MS/MS - 12,5 ppb Triazol-Metaboliten in Brokkoli

Weder die LC-Phase Aquasil C18 noch die LC-Phase Hypercarb sind ausreichend selektiv, um störungsfreie Analytsignale zu erhalten. Hier erweist sich die Kapillarelektrophorese als das bessere Trennverfahren, da die Analytsignale in den Elektropherogrammen problemlos quantitativ auswertbar sind. Besonders im Falle von TRZ kann eine bessere Auftrennung des Analyten von der Matrix im Vergleich zur LC-MS/MS-Bestimmung beobachtet werden.

Nachteil der CE-MS/MS-Trenntechnik ist die mangelnde Empfindlichkeit der Analyten, sodass die geforderten Bestimmungsgrenzen nicht erreicht werden. Bei der Kapillarelektrophorese wurden im Lösungsmittelstandard bedeutend geringere Signal-Rausch-Verhältnisse ermittelt als bei der LC-MS/MS-Bestimmung. Besonders mit der LC-Phase Aquasil C18 werden viel höhere Werte für das Signal-Rausch-Verhältnis ermittelt. So liegen diese bei CE-MS/MS für die TDMs bei 50 ppb im Bereich von 78 - 150. Bei der LC-MS/MS-Messung wurden Signal-Rausch-Verhältnisse bei einem um Faktor 5 geringeren Standard von 10 ppb im Bereich von 158 - 393 bestimmt. Ursache für die geringere Empfindlichkeit bei der CE-MS/MS-Bestimmung ist zum einen das geringere Probenvolumen, welches für die Bestimmung verwendet wird. Des Weiteren werden bei der Kapillarelektrophorese hohe Pufferkonzentrationen eingesetzt, die die Ionisierung negativ durch Ionensuppressionseffekte beeinflussen können. Auch die Kopplung des Agilent 7100 CE-Systems mit dem Agilent 6490 Tripelquadrupol, welches durch die Verwendung eines sogenannten „Sheath Liquid Interface“ gewährleistet wird, hat negative Einflüsse auf die Messempfindlichkeit. Hierbei wird ein zusätzliches Lösungsmittel während der Elektrosprayionisation eingeleitet. Dies führt jedoch zur Verdünnung der Messlösung, wodurch die Messempfindlichkeit reduziert wird.

Die ermittelten Signal-Rausch-Verhältnisse im Lösungsmittelstandard nach CE- und LC-MS/MS-Bestimmung sind in Tab. 46 zusammengestellt.

**Tab. 46: Vergleich S/N CE mit LC**

Trennverfahren	Konzentration	Peak-to-Peak S/N			
		TAA	TLA	TAL	TRZ
CE	50 ppb	79	91	78	150
Aquasil C18	10 ppb	158	207	393	205
Hypercarb	10 ppb	34	83	150	47

### 7.3.2.2 Difluoressigsäure

Bei der Difluoressigsäure eignen sich die CE und die LC gleichermaßen gut als Trennsystem. Bei beiden sind die beobachteten Analytsignale frei von Interferenzen und der chemische Untergrund stellt auch kein Problem dar. Genauso wie bei den TDMs, kann auch bei der Difluoressigsäure ein großer Unterschied bezüglich der Empfindlichkeit beobachtet werden. So wurde mit CE-MS/MS bei 25 ppb DFA in Salat ein Peak-to-Peak S/N von 9 bestimmt. Im Vergleich dazu liegt bei der LC-MS/MS-Messung bei 5 ppb DFA in Salat, also einem Fünftel der Konzentration bei CE, ein Peak-to-Peak S/N von 101 vor. Elektropherogramm und Chromatogramm der DFA in Salat sind in Abb. 50 dargestellt.

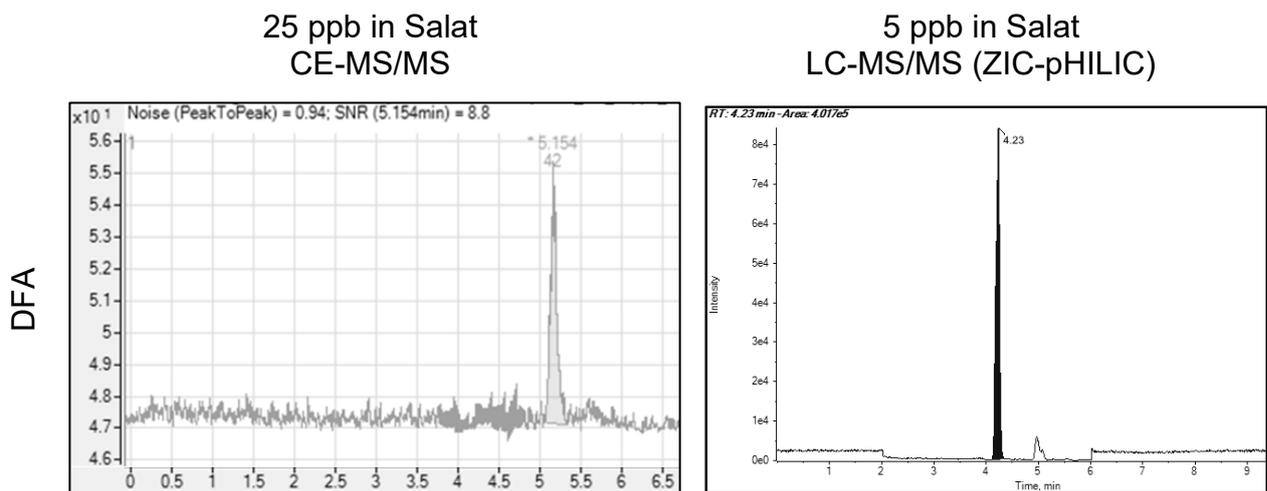


Abb. 50: DFA in Salat - Vergleich CE-MS/MS mit LC-MS/MS

### 7.3.2.3 Ethephon und HEPA

Für Ethephon und HEPA können im Elektropherogramm schmale Signale beobachtet werden, jedoch zeigen diese eine zu geringe Empfindlichkeit. So wurden bei einem 500 ppb Lösungsmittelstandard Werte für das Peak-to-Peak S/N von 24 für Ethephon und 8 für HEPA bestimmt. Bei einem um Faktor 10 geringeren konzentrierteren Standard werden mit dem LC-MS/MS-Verfahren Werte für das Peak-to-Peak S/N von 553 für Ethephon und 922 für HEPA erreicht. Die Empfindlichkeit ist bei dem CE-MS/MS-Verfahren zu gering für die quantitative Bestimmung dieser Analyten in pflanzlichen Materialien.

Elektropherogramm und Chromatogramm von Ethephon und HEPA in Lösungsmittel sind in Abb. 51 dargestellt.

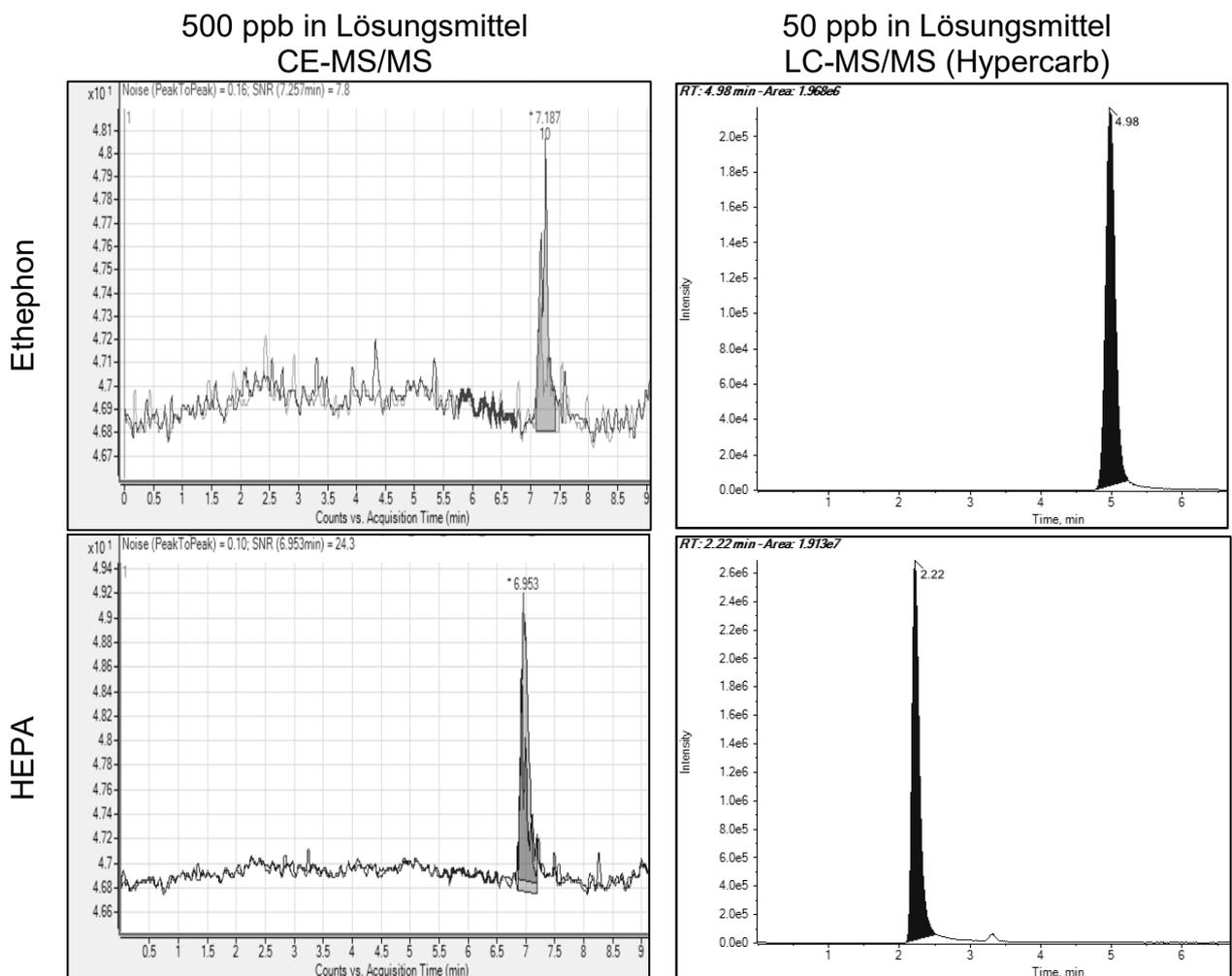


Abb. 51: Ethephon und HEPA - Vergleich CE-MS/MS mit LC-MS/MS

### 7.3.2.4 Phosphonsäure

Die Phosphonsäure zeigt bei dem CE-MS/MS-Verfahren ein vergleichbares Verhalten wie Ethephon und HEPA. Eine gute Trennleistung ist gegeben, jedoch ist die beobachtete Empfindlichkeit ungenügend. So wurde bei einem 1 ppm Lösungsmittelstandard ein Peak-to-Peak S/N von 34 bestimmt. Wendet man die LC-MS/MS-Bestimmung an, so wird bei einem 25 ppb Lösungsmittelstandard ein Peak-to-Peak S/N von 331 erreicht.

Elektropherogramm und Chromatogramm von Ethephon und HEPA in Lösungsmittel sind in Abb. 52 dargestellt.

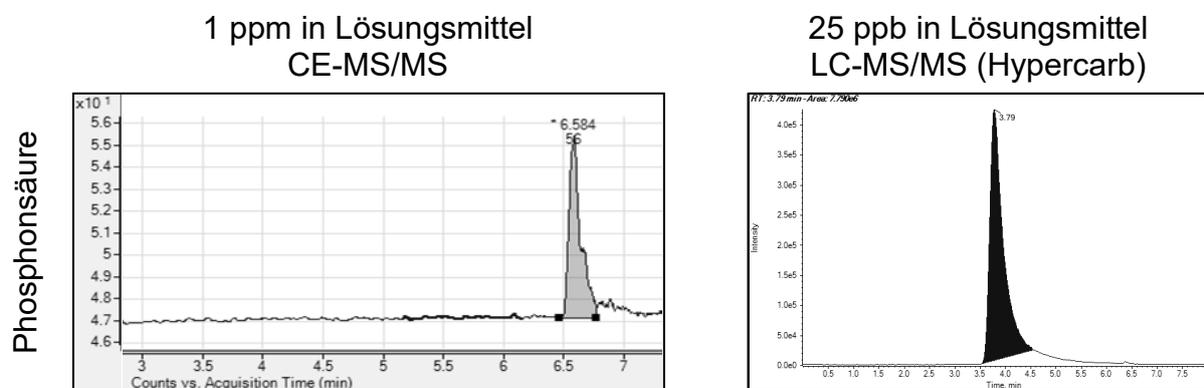


Abb. 52: Phosphonsäure - Vergleich CE-MS/MS mit LC-MS/MS

## 7.4 Detektion

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf den massenspektrometrischen Detektionsverfahren. Unter Massenspektrometrie versteht man ein physikalisches Verfahren, bei dem Ionen erzeugt und anschließend nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis getrennt werden.

Prinzipiell bestehen Massenspektrometer aus einem Einlasssystem zur Probeneinführung, einer Ionisationseinheit zur Ionisierung der Analyten, einem Analysator zur Fraktionierung der Ionen nach dem Masse-zu-Ladungsverhältnis und einer Detektionseinheit. [94] Der Probeneinlass und die Ionisation sind sowohl unter Atmosphärendruck als auch unter Vakuum möglich. Bei der Ionentrennung und bei der Detektion hingegen muss ein Hochvakuum anliegen, da nur so eine bleibende Ionisierung und die Bildung von fokussierbaren Ionenstrahlen möglich sind. [76]

### 7.4.1 Tandem-Massenspektrometrie

Bei allen bisher durchgeführten Messungen erfolgte die Detektion mittels eines Tripelquadrupols. Hierbei handelt es sich um ein aus drei Quadrupolen bestehendes System. Bei einem Quadrupol erfolgt die Trennung der Ionen durch ihre Ablenkung mittels elektrischer Felder. Er setzt sich aus vier Stabelektroden zusammen, die parallel zueinander angeordnet und von denen die gegenüberliegenden Elektrodenpaare an eine Gleichspannungsquelle angeschlossen sind. Dabei sind zwei Stäbe an einer positiv gepolten und die anderen zwei Stäbe an einer negativ gepolten Gleichspannungsquelle angeschlossen. Zusätzlich liegt noch an jedem Paar gegenüberliegenden Stabelektroden eine Wechselspannung an, wobei die zwei Wechselspannungen um  $\pi$  voneinander versetzt sind. Während der positiven Phase der Wechselspannung erfolgt eine Ablenkung der positiven Ionen zur Mittelachse, hingegen in der negativen Phase diese zu den Stäben beschleunigt werden. Der Grad der Ablenkung der Ionen hängt dabei von der Stärke der angelegten Spannung, deren Frequenz sowie der Masse der Ionen und deren Ladung ab.

Durch Abstimmung von Wechsel- und Gleichspannung der beiden Stabsysteme ist es möglich, dass jeweils nur die ausgewählten Masse-zu-Ladungsverhältnisse den Quadrupol passieren. [94]

Bei einem Tripelquadrupol wirken nur der erste und dritte Quadrupol als Massenfilter. Der zweite Quadrupol fungiert als Kollisionszelle, in der die im ersten Quadrupol ausgewählten Ionen mit Gasmolekülen zusammenstoßen. Dabei entsteht ein Gemisch aus Fragment- und Neutralionen. Für den im zweiten Quadrupol stattfindenden stoßinduzierten Zerfall findet man in der Literatur häufig die Abkürzung CAD, die für Collisionally Activated Dissociation steht. Als Stoßgas wird Helium, Stickstoff, Argon oder Xenon eingesetzt. Im dritten Quadrupol werden ausgewählte Fragment-Ionen anhand ihrer Masse separiert, um sie anschließend detektieren zu können. [15, 81]

Diese sogenannte Tandem-Massenspektrometrie weist eine hohe Selektivität auf und kann auch in Gegenwart von sehr komplexen Matrices angewandt werden, da hier charakteristische Zerfallsreaktionen durchgeführt werden und eine zweifache Massenselektion stattfindet. Bei den getesteten Analyten war diese Selektivität jedoch nicht ausreichend und die Analytsignale waren zum Teil überlagert von Interferenzen und hohem chemischen Untergrundrauschen (siehe Abb. 58). Ursache hierfür ist, dass die Zerfallsprodukte der Analyten sich nicht hinreichend von denen der Matrixbestandteile abgrenzen. Des Weiteren führte das vorgeschaltete Trennverfahren nicht zur Abtrennung störender Matrixkomponenten, welches in Abschnitt 7.3 untersucht wurde. Daher werden im Folgenden Techniken eingesetzt, mit denen eine höhere Selektivität erreicht werden soll. Geprüft wurden die hochauflösende Massenspektrometrie und die Differential-Mobilitäts-Spektrometrie.

## 7.4.2 Differential-Mobilitäts-Spektrometrie

Bei der Differential-Mobilitäts-Spektrometrie (DMS) werden Ionen anhand ihrer Mobilität in einem elektrischen Feld in der Gasphase getrennt. Das getestete DMS-Gerät befindet sich in einer keramischen Haltevorrichtung, die zwischen Curtain Plate und Orifice Inlet des Massenspektrometers vorliegt (siehe Abb. 53).

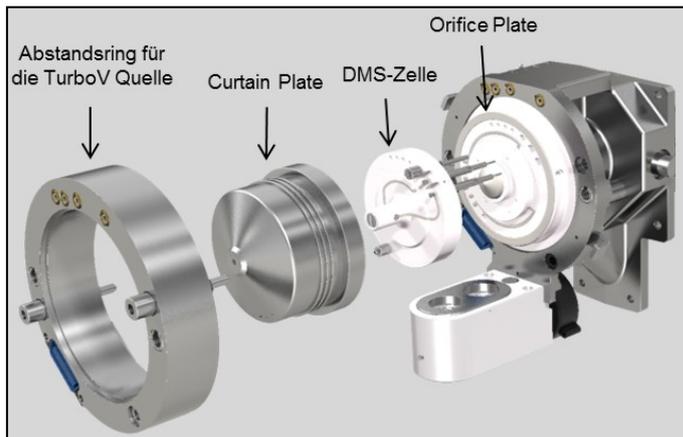
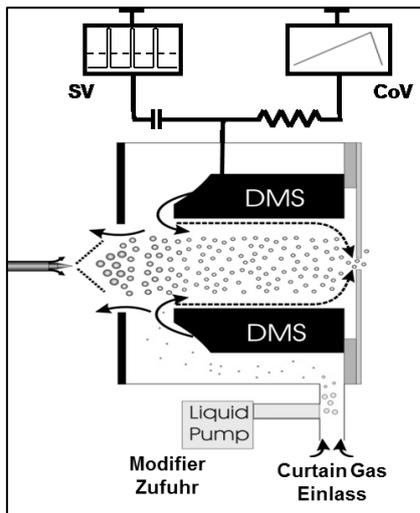


Abb. 53: Aufbau des DMS-MS/MS-Systems SelexION™ [SCIEX]

Die DMS-Zelle setzt sich aus zwei planaren, parallel angeordneten Elektroden zusammen. An einer dieser Elektroden ist ein hochfrequentes asymmetrisches Wechselfeld angelegt, die sogenannte Separation Voltage (SV). Jede Periode dieser Separation Voltage besteht aus einer langen Niedrigspannungsphase und einer kurzen Hochspannungsphase. Bedingt durch die unterschiedlichen Mobilitäten in diesen Niedrig- und Hochspannungsphasen, bewegen sich die Ionen in Richtung einer dieser Elektroden. Bei Kontakt mit der Elektrodenwand werden sie entladen und sind nicht mehr detektierbar. Um diese Kollision mit der Elektrodenwand zu vermeiden, liegt zusätzlich ein Gleichspannungsfeld an, die sogenannte Compensation Voltage (CoV). [95-97] Zusätzlich kann über das Curtain Gas auch noch ein Modifier zugeführt werden, wodurch die Mobilität des Analyten verändert werden kann. Häufig werden dabei Isopropanol, Acetonitril oder Methanol als Modifier verwendet. Der Aufbau der DMS-Einheit ist in Abb. 54 dargestellt.

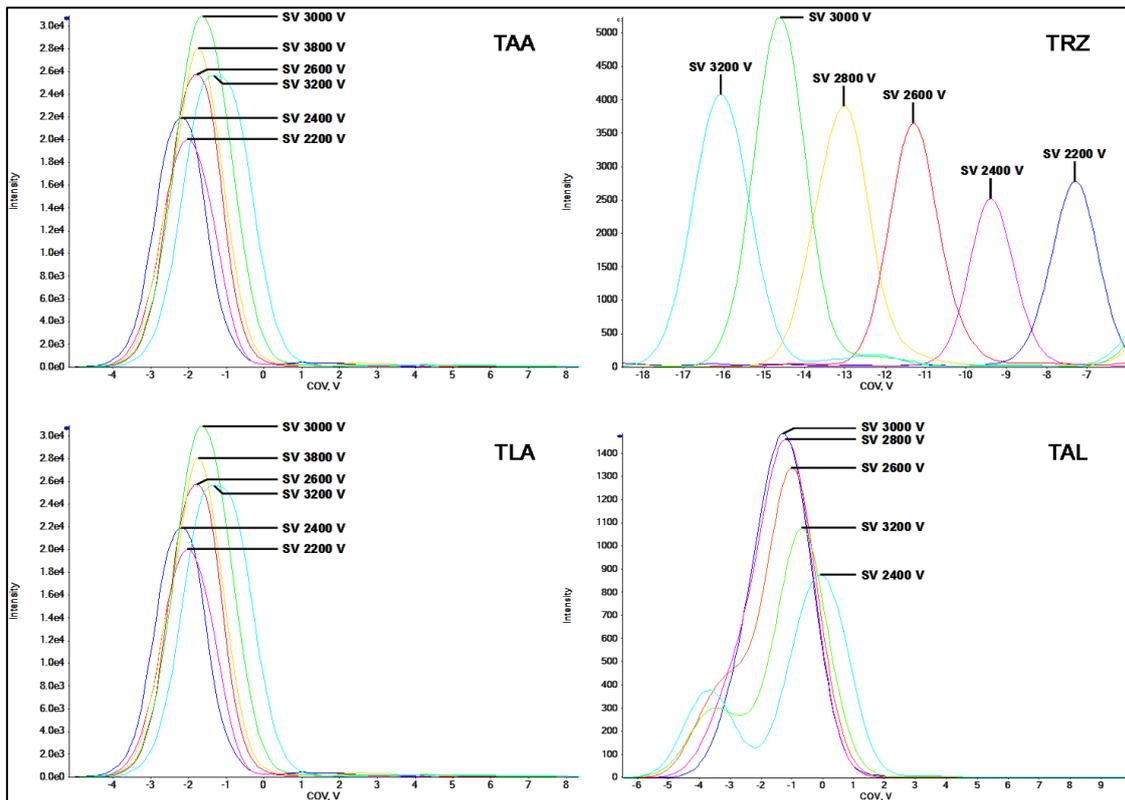


**Abb. 54: Aufbau des DMS-Systems [SCIEX]**

Für eine maximale Signalintensität und optimale Abtrennung der mit-extrahierten Matrixkomponenten müssen folgende Parameter optimiert werden: SV, CoV, DMS-Zellentemperatur und ggf. Art und Konzentration des Modifiers. Des Weiteren kann die DMS-Auflösung über die Nutzung eines sogenannten "Throttle Gas" verändert werden. Erhöht man den Volumenstrom dieses Gases, so verlängert sich die Verweilzeit der Analyten in der DMS-Zelle, wodurch eine höhere Auflösung resultiert. Durch die längere Verweilzeit der Analyten in der DMS-Zelle kommt es jedoch verstärkt zu Diffusionsverlusten und somit zur Verringerung der Signalintensität. Daher wurde bei allen getesteten Analyten die geringste Einstellung für die Auflösung gewählt, um eine maximale Empfindlichkeit bei der Detektion zu erreichen.

#### 7.4.2.1 Triazol-Metaboliten

Für die 4 TDMs wurde kein signifikanter Einfluss der DMS-Zellentemperatur auf die Signalintensität der Analyten ermittelt. Es wurde eine Temperatur von 150°C gewählt. Bei der SV wurde sowohl ein Einfluss auf die Auftrennung von Analyten und Matrix mit der DMS-Zelle beobachtet als auch ein Einfluss auf die Signalintensität der Analyten.



**Abb. 55: DMS ohne Modifier - Optimierung SV für TDMs**

In Abb. 55 sind die Optimierungsergebnisse der TDMs für die SV ohne Verwendung eines DMS-Modifiers dargestellt. Getestet wurde im Bereich von 2200 V bis 3200 V. Von 2200 bis 3000 V kann ein Anstieg der Signalintensität für alle TDMs beobachtet werden. Dieser Anstieg lässt sich durch die Verringerung von Diffusionsverlusten bei zunehmender SV erklären. Bei SV größer 3000 V scheint zu viel Energie vorzuliegen, die Analyten zersetzen sich und die Signalintensität nimmt dadurch wieder ab. Der optimale Wert für die SV liegt somit für alle TDMs bei 3000 V. Hier liegt die maximale Signalintensität der Analyten vor. Bei allen 4 TDMs kann beobachtet werden, dass mit zunehmender SV die Mobilität der Ionen in der Hochspannungsphase stärker zunimmt als in der der Niedrigspannungsphase der SV. Die daraus resultierende Abdrift muss somit mit einer negativ geladen Gleichspannung, der CoV, korrigiert werden.

Bei nachfolgenden Testmessungen mit Matrix konnte bei dieser SV auch eine ausreichende Abtrennung von mit-extrahierten Matrixbestandteilen erreicht werden. Dies ist exemplarisch in Abb. 56 für TAA in Futterrübe dargestellt. Bei einer geringen SV von 500 V zeigen die mit-extrahierten Matrixbestandteile ein sehr ähnliches Verhalten in der DMS-Zelle wie der Analyt TAA. Ihre Migration wird mit der gleichen CoV korrigiert wie die des TAA und somit ist keine Abtrennung möglich (siehe Abb. 56, links oben). Das resultierende Chromatogramm ist charakterisiert von Interferenzen und hohem chemischen Untergrundrauschen (siehe Abb. 56, links unten). Bei einer SV von 3000 V weist das TAA ein anderes Verhalten als die mit-extrahierten Matrixkomponenten auf. Die Migration des TAA wird mit einem anderen Wert für die CoV korrigiert als die der Matrixkomponenten und somit können letztere vom Analyten abgetrennt werden (siehe Abb. 56, rechts oben). Das daraus resultierende Chromatogramm stellt nun das Analytsignal von TAA störungsfrei dar (siehe Abb. 56, rechts unten).

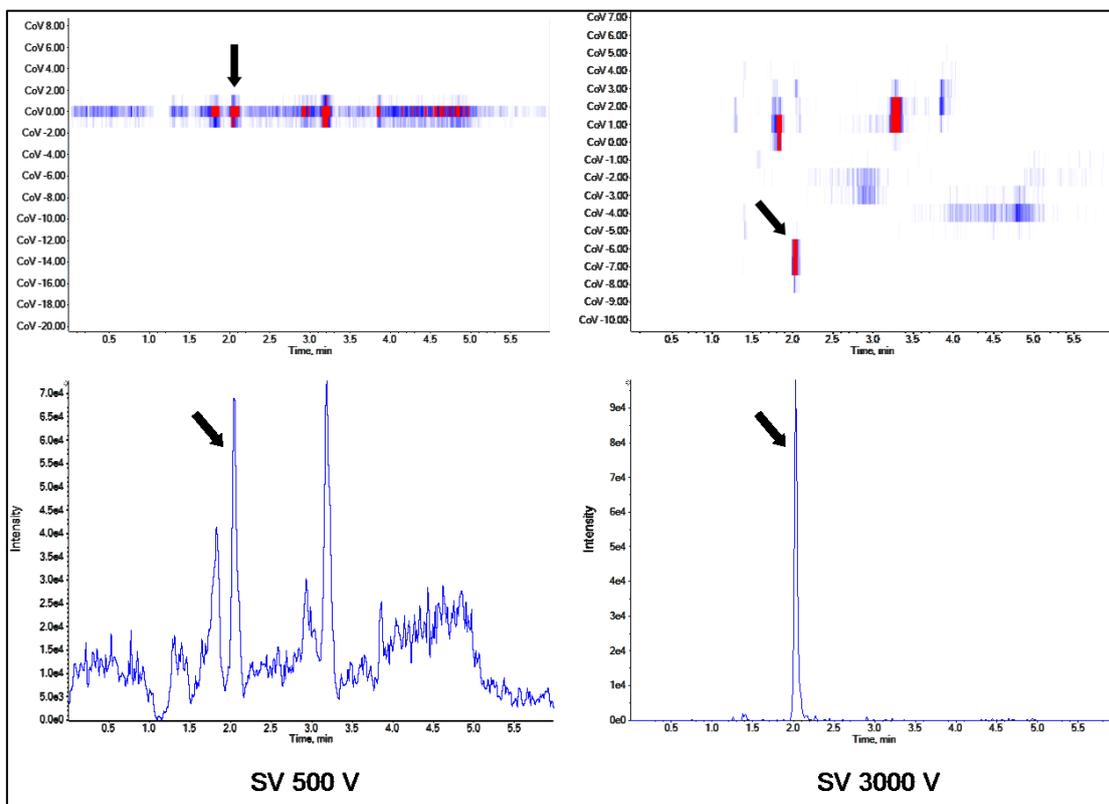
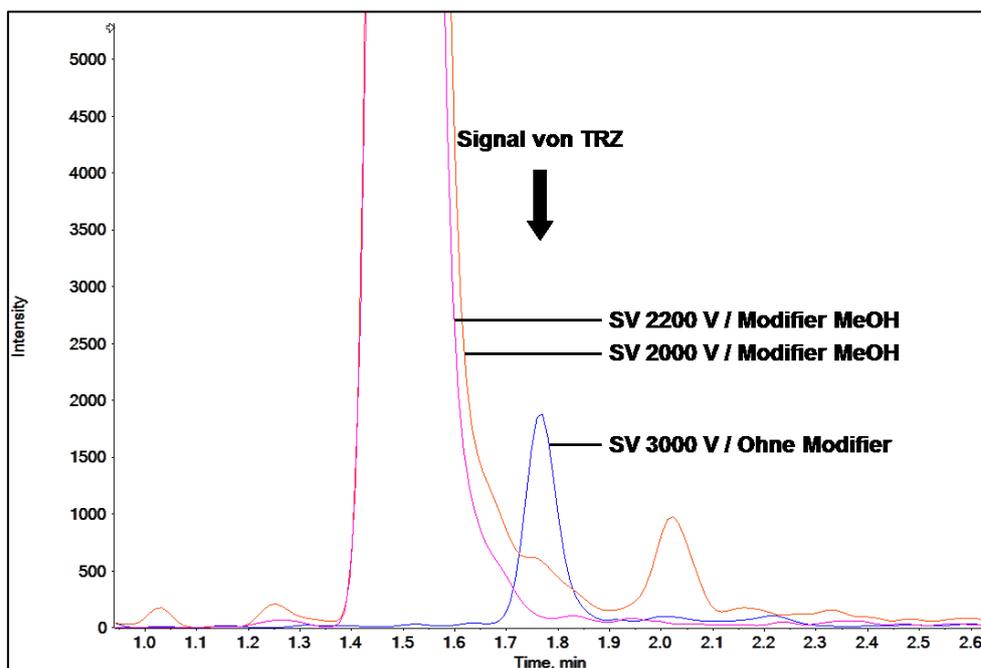


Abb. 56: 0,01 mg/kg TAA in Futterrübe - Vergleich SV 500 V und 3000 V

Optimierungen mit verschiedenen DMS-Modifiern ergaben, dass diese für die Analytik der TDMs nicht geeignet sind. Bei Acetonitril und Isopropanol wurde eine derart starke Verringerung der Signalintensität der Analyten beobachtet, dass eine Bestimmung der TDMs bei 0,01 mg/kg nicht möglich ist. Bei Methanol als DMS-Modifizier ist die Verringerung der Signalintensität weniger stark ausgeprägt. Eine ausreichende Empfindlichkeit mit Methanol als Modifizier ergab sich jedoch nur bei einer SV von 2000 - 2200 V. In diesem SV-Bereich liegt jedoch eine zu geringe Trennleistung vor. Beispielhaft ist dies in Abb. 57 dargestellt. Mit der Verwendung von Methanol als Modifizier ist das Analytsignal von TRZ überlagert von einer Interferenz. Ohne Verwendung von Modifizier konnte die Interferenz abgetrennt werden. Somit eignet sich auch Methanol nicht als Modifizier für die Analytik der TDMs.

Beste Signalintensität und Trennleistung bei der Analytik der TDMs in pflanzlichen Materialien wurde bei SV 3000 V beobachtet, ohne den Einsatz von DMS-Modifizier.



**Abb. 57: 0,01 mg/kg TRZ in Weintraube - Vergleich DMS mit und ohne Modifizier**

Mit den optimierten Parametern wurde dann eine Validierung der LC-DMS-MS/MS Methode für die TDMs in verschiedenen pflanzlichen Materialien vorgenommen. Die Extrakte wurden entsprechend den Angaben aus 6.4.2 hergestellt.

Entsprechend der Richtlinie der SANCO [86] müssen 70 - 120 % des Analyten wiedergefunden werden, damit eine ausreichende Richtigkeit gewährleistet ist. Eine ausreichende Reproduzierbarkeit ist gegeben bei einer relativen Standardabweichung von <20 % [86].

Die Ergebnisse der Validierung sind in Tab. 47 zusammengefasst. Bis auf 3 Ausnahmen konnten für alle 4 TDMs in allen getesteten Matrices Wiederfindungen bestimmt werden, die die Regularien der SANCO erfüllen. Die ermittelten Wiederfindungen liegen im Bereich von 74 - 117 %. Lediglich für 0,01 mg/kg TAA in Bohne, 0,01 mg/kg TRZ in Soja und 0,10 mg/kg TAL in Flachs konnten die Anforderungen der SANCO nicht erfüllt werden. Hier wurden Wiederfindungen von 129 %, 124 % und 65 % bestimmt. Sowohl die Analytsignale als auch die dazugehörigen Matrixblindwerte zeigten keinerlei Interferenzen. So lassen sich die Wiederfindungen außerhalb der Anforderungen der SANCO-Richtlinie nicht aufgrund mangelnder Selektivität des Detektionssystems erklären. Ursache ist vielmehr eine mangelnde Stabilität der Analyten nach Extraktion. So wurde die Bestimmung der Wiederfindungen für diese 3 Ausnahmen noch einmal wiederholt mit sofortiger Messung der Extrakte nach Herstellung und es wurden nun Wiederfindungen von 99 %, 94 % und 87 % ermittelt. Für die relativen Standardabweichungen aller TDMs in den verschiedenen Matrices wurden Werte unter 10 % bestimmt.

**Tab. 47: Validierungsergebnisse Analyse TDMs mittels LC-DMS-MS/MS**

Matrix	Level [mg/kg]	TAA		TLA		TRZ		TAL	
		WF * [%]	CV [%]	WF * [%]	CV [%]	WF * [%]	CV [%]	WF * [%]	CV [%]
Salat	0,01	105	2,5	98	5,2	117	2,9	100	3,2
	0,10	106	0,5	102	2,8	105	3,5	93	2,4
Tomate	0,01	104	1,0	104	1,7	77	6,9	111	4,3
	0,10	101	2,1	98	2,9	74	2,2	94	1,3
Brokkoli	0,01	103	4,4	100	5,7	111	7,8	- <sup>2</sup>	- <sup>2</sup>
	0,10	103	0,8	97	1,7	91	3,8	78 <sup>1</sup>	2,8
Bohne	0,01	129	3,3	103 <sup>1</sup>	5,9	112	7,6	87 <sup>1</sup>	8,3
	0,10	112	2,6	98	2,2	94	7,2	98	1,1
Soja	0,01	107 <sup>1</sup>	6,5	104 <sup>1</sup>	1,6	124	9,3	70 <sup>1</sup>	6,2
	0,10	93	1,5	90	2,4	76	2,5	76	2,3
Rübe	0,01	108	3,7	96	3,2	85	6,1	80	4,5
	0,10	102	1,4	93	1,0	79	1,8	77	1,8
Karotte	0,01	100	2,2	100	1,5	85	4,1	92	1,5
	0,10	100	2,3	96	0,5	85	1,8	87	1,5
Korn	0,01	76 <sup>1</sup>	4,2	94	5,3	85	6,0	75 <sup>1</sup>	5,9
	0,10	84	2,0	84	1,5	79	3,8	83	2,5
Orange	0,01	102	8,7	99 <sup>1</sup>	2,3	94	3,1	99 <sup>1</sup>	5,8
	0,10	98	2,2	98	1,9	87	3,1	93	3,4
Wein	0,01	102	2,9	94 <sup>1</sup>	3,2	84	2,3	87	5,3
	0,10	100	1,8	97	1,7	82	2,6	89	2,7
Flachs	0,01	81	3,4	73 <sup>1</sup>	3,6	83	7,6	75 <sup>1</sup>	7,7
	0,10	91	2,1	86	1,2	80	2,0	65	1,6
<b>Mittelwert</b>	<b>0,01</b>	<b>102</b>	<b>3,9</b>	<b>97</b>	<b>3,6</b>	<b>96</b>	<b>5,8</b>	<b>88</b>	<b>5,3</b>
	<b>0,10</b>	<b>99</b>	<b>1,8</b>	<b>94</b>	<b>1,8</b>	<b>85</b>	<b>3,1</b>	<b>85</b>	<b>2,1</b>

\* ... Mittelwert der Fünffachbestimmung, Matrixeffekte korrigiert mittels interner Standardsubstanzen

<sup>1</sup> ... Blindwertkorrektur wurde durchgeführt

<sup>2</sup> ... Kein adäquates Material für die Validierung war verfügbar

In Abb. 58 und Abb. 59 sind die Chromatogramme der TDMs in einer Auswahl von Matrices nach MS/MS- und DMS-MS/MS-Detektion dargestellt. Bei der MS/MS-Detektion sind die Chromatogramme charakterisiert durch einen hohen chemischen Untergrund. Des Weiteren sind die Analytsignale durch Interferenzen überlagert, wie es zum Beispiel bei TRZ in allen abgebildeten Matrices der Fall ist. Durch die DMS-MS/MS-Detektion kann eine deutliche Verbesserung der Selektivität bei der Bestimmung der TDMs in pflanzlichen Materialien im Vergleich zur „konventionellen“ MS/MS-Detektion erreicht werden. Der chemische Untergrund in den Chromatogrammen ist deutlich reduziert und Interferenzen konnten vollständig eliminiert werden. So sind die Analytsignale präziser und reproduzierbarer integrierbar. Des Weiteren liegen jetzt Signale vor, die auch von einer MS-Auswertesoftware automatisiert ausgewertet werden können, welches unverzichtbar im analytischen Routinealltag ist.

Die DMS-Technologie führt zu einer signifikanten Verbesserung der Analytik von den TDMs in pflanzlichen Materialien. Das Verfahren ist valide, es konnten akkurate und reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden. Die Selektivitätssteigerung führte zur Entfernung von Interferenzen und zur Reduktion des chemischen Untergrunds. Es wurde ein robustes und präzises Verfahren entwickelt, das sich in der Routineanalytik der TDMs in pflanzlichen Materialien bereits etabliert hat.

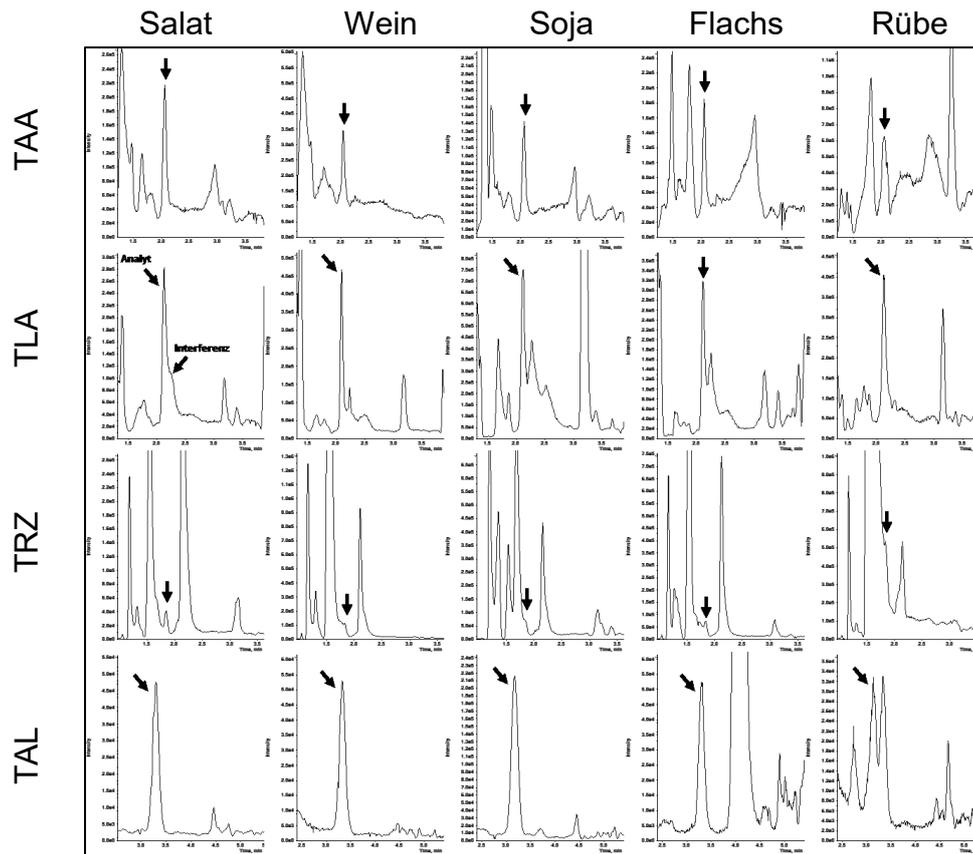


Abb. 58: LC-MS/MS-Bestimmung von 0,01 mg/kg TDMs (Aquisil C18)

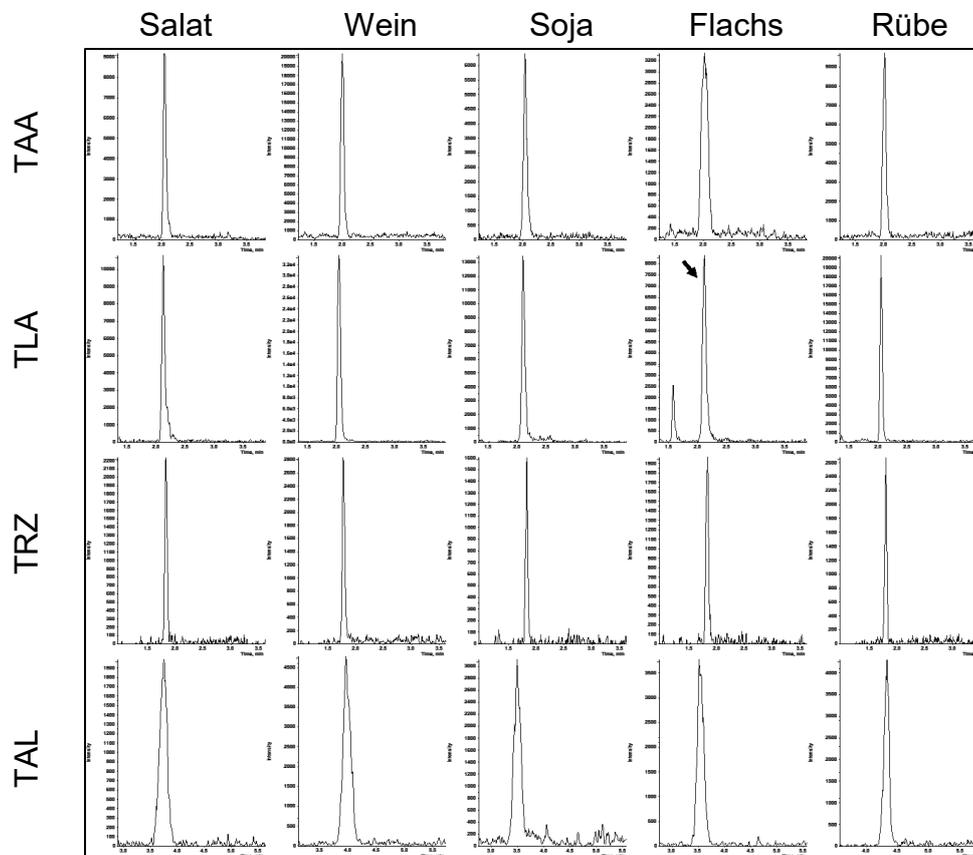
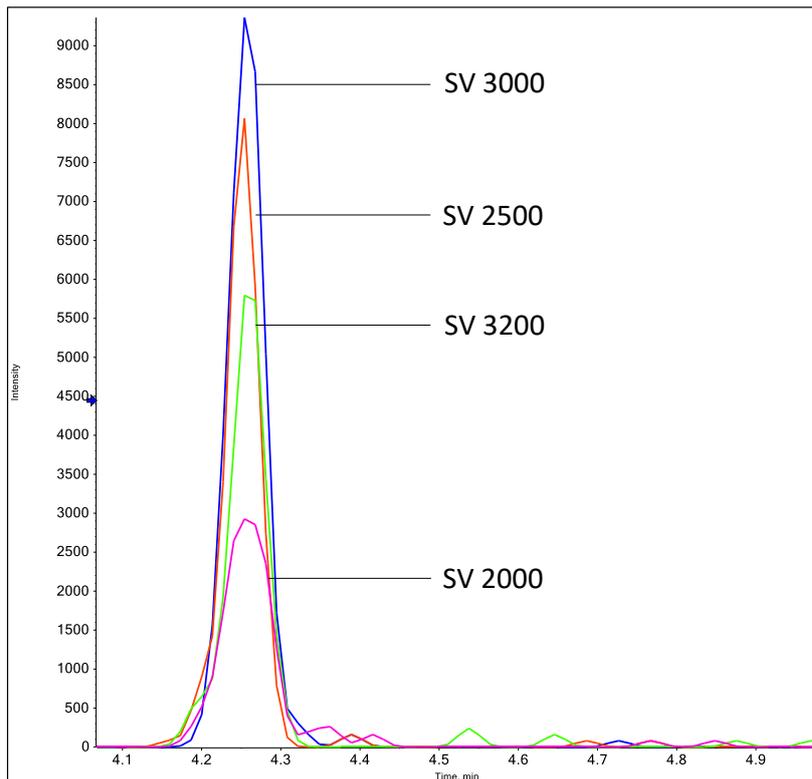


Abb. 59: LC-DMS-MS/MS-Bestimmung von 0,01 mg/kg TDMs (Aquisil C18)

#### 7.4.2.2 *Difluoressigsäure*

Anders als bei den TDMs lag bei der DFA kein Selektivitätsproblem vor. Wie in Kapitel 7.3.1.2 dargelegt wurde, sind die LC-MS/MS-Ergebnisse bei Verwendung eines HILIC-Materials als LC-Trennsäule für die qualitative und quantitative Bestimmung von DFA in pflanzlichen Materialien geeignet. Die erzielten Chromatogramme sind frei von Matrixinterferenzen. Daher besteht nicht die Dringlichkeit die Selektivität der MS/MS-Detektion mittels DMS zu erhöhen. Jedoch weist der Analyt DFA auf Grund der kleinen Molekülgröße nur einen MRM-Übergang auf. Nach SANCO-Richtlinie ist ein MRM-Übergang nicht genügend, damit das quantitative Ergebnis ausreichend abgesichert ist. Es bedarf eines zweiten MRM-Überganges oder eines zweiten Analysenverfahrens [86]. Ersteres ist nicht gegeben und letzteres ist aufwendig und kostenintensiv. Alternativ kann aber auch ein Analysenverfahren verwendet werden, welches selektiver ist als die Detektion mittels MS/MS und somit das Vorhandensein von zwei MRM-Übergängen nicht notwendig ist. Aktuell sind das nach SANCO-Richtlinie die hochauflösenden Detektionssysteme, die im folgenden Kapitel näher untersucht werden. Bei diesen Systemen ist das quantitative Ergebnis ausreichend verifizierbar durch das Mutterion und ein Fragmention [86]. Ein zweites Fragmention, welches einem zweiten MRM entsprechen würde, ist nicht erforderlich. Folgende Untersuchungsergebnisse für die DFA sollen zeigen, dass auch die DMS-MS/MS zukünftig zu diesen selektiveren Verfahren der SANCO-Richtlinie zählen könnte. Dabei wurden, wie bei hochauflösenden Systemen, das Mutterion und ein Fragmention berücksichtigt.

Wie für die TDMs mussten auch für die DFA die DMS-Zellenparameter optimiert werden. Bei der DMS-Zellentemperatur konnte kein signifikanter Einfluss auf die DFA-Analytik ermittelt werden und so wurde eine Temperatur von 150°C gewählt. Die Optimierungsergebnisse für die SV ohne Verwendung eines DMS-Modifiers sind in Abb. 60 dargestellt.

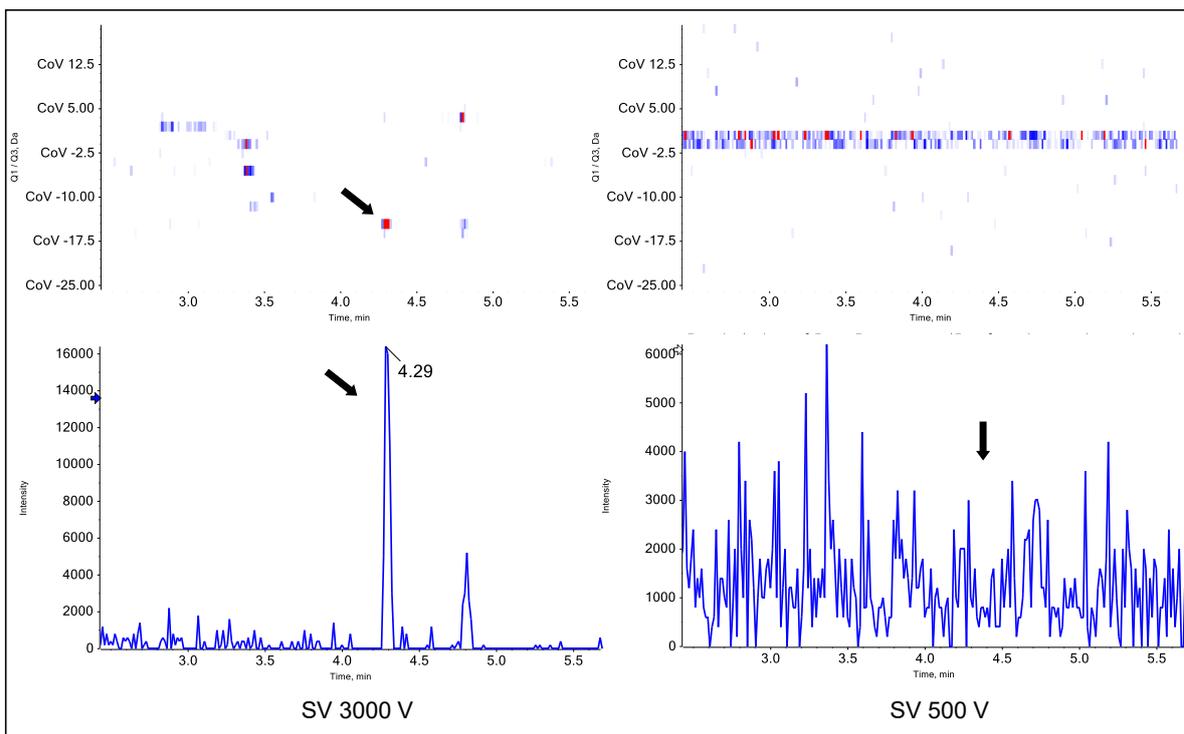


**Abb. 60: Optimierung SV für DFA**

Getestet wurde im Bereich von 2000 V bis 3800 V. Mit zunehmender SV kann ein Anstieg der Signalintensität für die DFA beobachtet werden. Dieser Anstieg lässt sich durch die Verringerung von Diffusionsverlusten bei zunehmender SV erklären. Bei einer SV größer 3000 V konnten gelegentlich Messabbrüche durch Überschlüge in der DMS-Zelle beobachtet werden. Diese lassen sich durch die Verwendung von hohen Pufferkonzentrationen in den LC-Eluenten erklären, wodurch im negativen Messmodus zu viele Ladungsträger in der DMS-Zelle vorliegen. Diese hohe Pufferkonzentration ist jedoch für die HILIC-Chromatographie notwendig. Um dennoch die Routinetauglichkeit der Methode ohne Messabbrüche zu gewährleisten, wurde eine SV von 3000 V gewählt, dem maximalen Wert wo noch eine Messstabilität gewährleistet ist.

Bei nachfolgenden Testmessungen mit Orangenmatrix konnte bei dieser SV auch eine ausreichende Abtrennung von mit-extrahierten Matrixbestandteilen beobachtet werden (siehe Abb. 61). Bei einer geringen SV von 500 V zeigen die mit-extrahierten Matrixbestandteile ein sehr ähnliches Verhalten in der DMS-Zelle wie der Analyt. Ihre Migration wird mit der gleichen CoV korrigiert wie die der DFA und somit ist keine Abtrennung möglich (siehe Abb. 61, rechts oben).

In dem resultierenden Chromatogramm ist das Analytsignal für DFA aufgrund des chemischen Untergrunds nicht sichtbar (siehe Abb. 61, rechts unten). Bei einer SV von 3000 V weist die DFA ein anderes Verhalten als die mit-extrahierten Matrixkomponenten auf. Die Migration wird mit einem anderen Wert für die CoV korrigiert als die der Matrixkomponenten und somit können letztere vom Analyten abgetrennt werden (siehe Abb. 61, links oben). Das daraus resultierende Chromatogramm stellt nun das Analytsignal von DFA störungsfrei dar (siehe Abb. 61, links unten).



**Abb. 61: DFA 0,01 mg/kg PE in Orange - Vergleich SV 3000 V und 500 V**

Mit den optimierten Parametern wurde dann eine Validierung der LC-DMS-MS und LC-DMS-MS/MS Methode für die DFA in verschiedenen pflanzlichen Materialien vorgenommen. Die Extrakte wurden, wie in 6.4.2 beschrieben, hergestellt.

Entsprechend der Richtlinie der SANCO [86] müssen 70 - 120 % des Analyten wiedergefunden werden, damit eine ausreichende Richtigkeit gewährleistet ist. Eine ausreichende Reproduzierbarkeit ist gegeben bei einer relativen Standardabweichung von <20 % [86]. Die Ergebnisse der Validierung sind in Tab. 48 zusammengefasst.

**Tab. 48: Validierungsergebnisse Analyse DFA mittels LC-DMS-MS/MS und LC-DMS-MS**

Matrix	Level [mg/kg] PE	DFA DMS-MS/MS		DFA DMS-MS	
		WF * [%]	CV [%]	WF * [%]	CV [%]
Salat	0,01	77	1,9	108	2,8
	0,10	101	2,0	113	0,9
Soja	0,01	71	7,6	100	5,7
	0,10	103	5,1	108	3,2
Rübe	0,01	105	3,3	118	9,4
	0,10	102	3,5	99	5,2
Korn	0,01	114	1,2	111	2,7
	0,10	102	0,6	99	1,5
Orange	0,01	103	0,8	98	1,2
	0,10	95	0,7	97	0,9
Hopfen	0,01	119	2,1	114	3,6
	0,10	100	1,0	103	2,9
Raps	0,01	105	0,8	104	1,6
	0,10	103	0,7	109	3,0
<b>Mittelwert</b>	<b>0,01</b>	<b>99</b>	<b>2,5</b>	<b>108</b>	<b>3,9</b>
	<b>0,10</b>	<b>101</b>	<b>1,9</b>	<b>104</b>	<b>2,5</b>

\* ... Mittelwert der Fünffachbestimmung, Matrixeffekte korrigiert mittels interner Standardsubstanz

PE ... Parentequivalent

Für alle getesteten Matrices konnten Wiederfindungen und relative Standardabweichungen bestimmt werden, die die Regularien der SANCO erfüllen. Die ermittelten Wiederfindungen liegen im Bereich von 71 - 119 % und die relativen Standardabweichungen unter 10 %.

In Abb. 62 und Abb. 63 sind die Chromatogramme von DFA bei einem Rückstand von 0,01 mg/kg PE in den getesteten Matrices dargestellt, gemessen ohne und mit DMS.

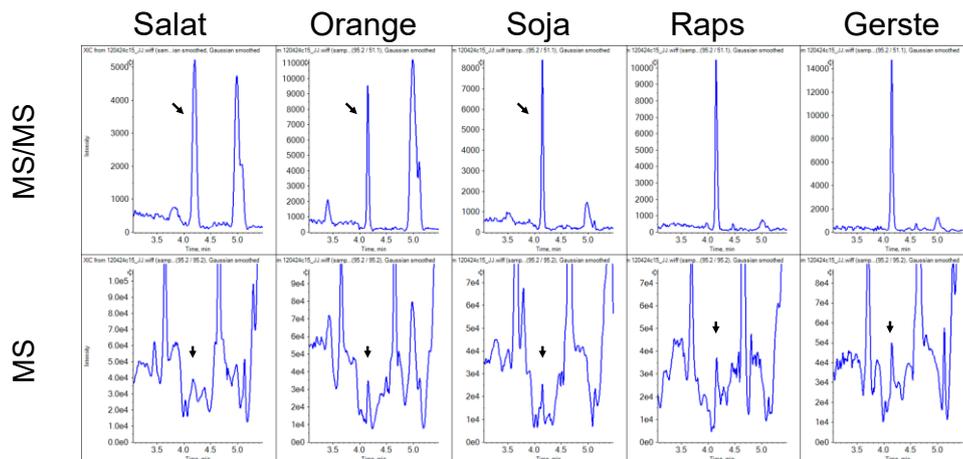


Abb. 62: DFA 0,01 mg/kg PE LC-MS/MS und LC-MS

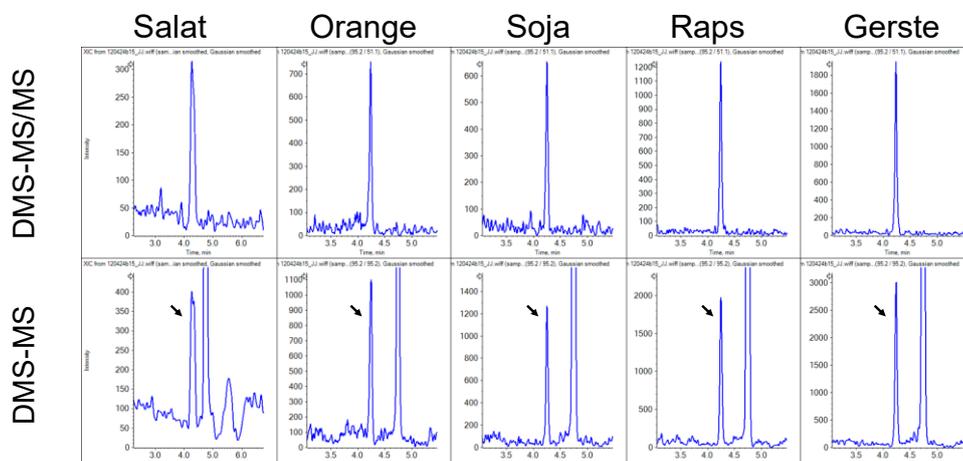


Abb. 63: DFA 0,01 mg/kg PE LC-DMS-MS/MS und LC-DMS-MS

Ohne DMS sind nur die Analytsignale der MS/MS-Detektion auswertbar, jedoch nicht die der MS-Detektion. Bei letzterer sind die Chromatogramme gestört durch Interferenzen und hohen chemischen Untergrund. Durch Steigerung der Selektivität mittels DMS können diese Interferenzen bei allen getesteten Matrices abgetrennt werden und die erhaltenen Signale der MS-DMS-Detektion sind quantitativ auswertbar. Bei der DMS-MS/MS-Detektion können keine Nachteile gegenüber der „konventionellen“ MS/MS-Detektion festgestellt werden und die Chromatogramme weisen für die Quantifizierung eine vergleichbar gute Qualität auf.

Durch die selektivere Detektion mittels DMS besteht nun die Möglichkeit, die DFA sowohl auf dem Fragmentation als auch auf dem Mutterion quantitativ zu bestimmen. Dadurch liegt nun eine Verifizierung des Analyseergebnisses vor. Aktuell ist die DMS-Technologie noch nicht in der SANCO-Richtlinie berücksichtigt. Aber es ist sehr gut vorstellbar, dass in zukünftigen Revisionen dieser Richtlinie die Quantifizierung eines Analyten auf Basis von Mutter- und Fragmentation nicht nur bei hochauflösenden MS-Detektoren, sondern auch mittels DMS anerkannt wird.

### 7.4.3 Time-of-Flight Detektion

Bei TOF-Geräten erfahren die gebildeten Ionen durch einen kurzen Spannungsstoß eine Beschleunigung und gelangen anschließend in ein feldfreies, evakuiertes Flugrohr. Leichte Ionen werden dabei stärker beschleunigt als schwere, wodurch die leichten das Ende des Flugrohres schneller erreichen als schwere. Die Trennung der Ionen erfolgt demzufolge nach der massenabhängigen Flugzeit. Für TOF-Geräte gilt [76]:

$$\frac{m}{z} = \frac{2 \cdot U \cdot t^2}{s^2}$$

mit m ... Ionenmasse

z ... Ionenladung

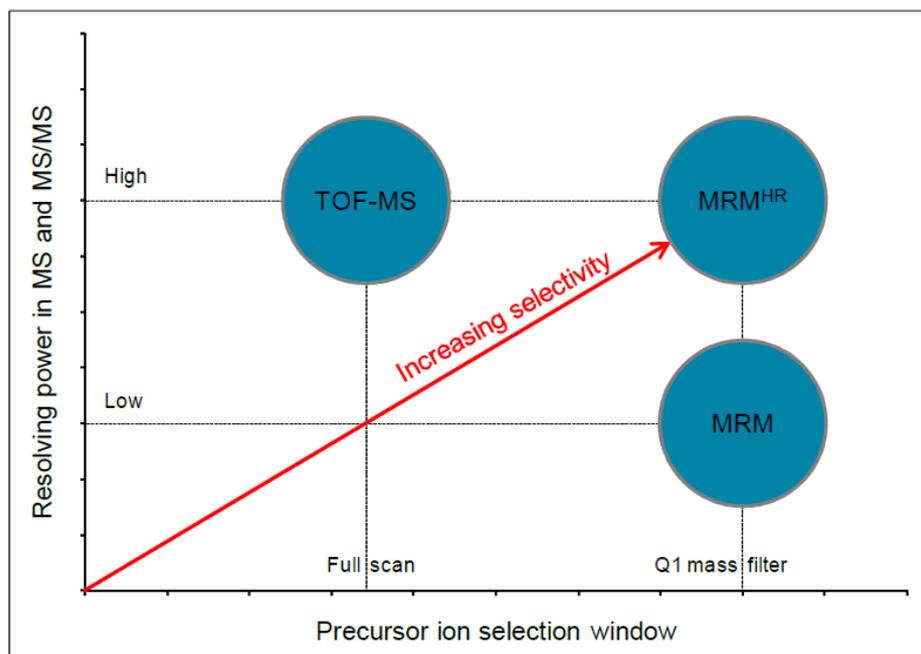
U ... Beschleunigungsspannung

t ... Flugzeit

s ... Flugstrecke

In TOF-Geräten ist demnach das Quadrat der Flugzeit proportional zum Masse-zu-Ladungsverhältnis. Der Betrieb erfolgt gepulst [94].

Das Auflösungsvermögen dient zur Beschreibung der Trennleistung eines Massenspektrometers. Abhängig davon, wie gut zwei benachbarte Signale voneinander getrennt werden können, unterscheidet man in hochauflösend und niedrigauflösend. Als hochauflösende Massenspektrometer werden solche bezeichnet, die C-, H-, N-, und O-Multipletts voneinander unterscheiden können, wo hingegen bei niedrigauflösenden Geräten nur die Trennung nach ganzen Massenzahlen möglich ist (Einheitsmassenauflösung) [81].



**Abb. 64: Selektivitätsvergleich [SCIEX]**

Bei einem QTOF-System sind dem Flugrohr zwei Quadrupole vorgeschaltet. Dadurch hat man nicht nur die Möglichkeit das Mutterion hochaufgelöst zu detektieren, sondern auch dessen Fragmentationen. Man kann somit vergleichbare MRM-Messungen wie auf einem Tripelquadrupolsystem durchführen. Durch die Kombination von MRM und Hochauflösung erreicht man eine Steigerung der Selektivität des Detektionssystems (siehe Abb. 64). Im Folgenden wird geprüft, ob diese selektivere Detektionsart auch für die Analytik von den TDMs geeignet ist, bei denen, wie bereits ausführlich gezeigt wurde, die „konventionelle“ MRM-Detektion nicht ausreichend selektiv ist.

#### 7.4.3.1 Triazol-Metaboliten

Es wurde eine Validierung der LC-MRM<sup>HR</sup>-Detektion für die TDMs in verschiedenen pflanzlichen Materialien vorgenommen. Die Extrakte wurden entsprechend den Angaben aus 6.4.3 hergestellt.

Nach Vorgaben der SANCO [86] müssen 70 - 120 % des Analyten wiedergefunden werden, damit eine ausreichende Richtigkeit gewährleistet ist. Eine ausreichende Reproduzierbarkeit ist gegeben bei einer relativen Standardabweichung von <20 % [86].

Die Extrakte wurden zunächst mit der Aquasil C18 LC-Phase gemessen. Bei dieser Phase liegt eine nur sehr geringe Retention des TALs vor, viele mit-extrahierte Matrixkomponenten ko-eluierten mit diesem Analyten und es können starke Matrixeffekte in Form von Signalsuppression beobachtet werden. Bei der Messung mit DMS-MS/MS störte diese Signalsuppression nicht. Die MRM<sup>HR</sup>-Detektion ist jedoch etwas weniger sensitiv. Somit führt die starke Signalsuppression bei TAL dazu, dass in einigen Matrices, wie Soja und Bohne, die erforderliche LOQ von 0,01 mg/kg nicht erreicht wird. Für alle anderen Matrices wurden für das TAL sehr hohe relative Standardabweichungen bestimmt. Bei einem Rückstand von 0,01 mg/kg wurde im Durchschnitt eine relative Standardabweichung von 19 % ermittelt. Auch dies wird durch die schlechtere Sensitivität verursacht. Daher wurden die Extrakte ein weiteres Mal mit der LC-Phase Hypercarb gemessen. Hier konnten deutlich bessere Ergebnisse für das TAL erreicht werden. Es wurden bei 0,01 mg/kg relative Standardabweichungen von durchschnittlich 9,3 % ermittelt. Leider sind die Peakschärfen der anderen TDMs auf der Hypercarb deutlich schlechter als auf der Aquasil C18 (siehe Kapitel 7.3.1.1), wodurch sich für diese Analyten schlechtere Empfindlichkeiten auf dieser LC-Phase ergeben. Die Validierung von TAA, TLA und TRZ mit MRM<sup>HR</sup>-Detektion wurde daher mit der LC-Phase Aquasil C18 durchgeführt. Die Validierung für TAL erfolgte mit der Hypercarb. Die Ergebnisse der Validierung sind in Tab. 49 zusammengefasst. Die vollständigen Ergebnisse für alle TDMs bei beiden LC-Phasen befinden sich im Anhang 9.11.4.

Mit Wiederfindungen von durchschnittlich 86 - 100 % und relativen Standardabweichungen im von durchschnittlich 3,7 - 14,3 % kann die quantitative Analyse der TDMs mittels LC-MRM<sup>HR</sup> als weitere Option zur LC-DMS-MS/MS-Bestimmung angesehen werden, bei der valide und akkurate Ergebnisse ermittelt werden.

**Tab. 49: Validierungsergebnisse Analyse TDMs mittels LC-MRM<sup>HR</sup>**

Matrix	Level [mg/kg]	TAA (Aquasil C18)		TLA (Aquasil C18)		TRZ (Aquasil C18)		TAL (Hypercarb)	
		WF *	CV	WF *	CV	WF *	CV	WF *	CV
		[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
Salat	0,01	90	5,5	120	6,0	90	15,1	89	8,3
	0,10	94	3,4	102	3,6	91	11,9	91	2,2
Tomate	0,01	90	6,6	70	10,3	90	12,1	102	5,0
	0,10	104	5,3	71	8,7	88	5,3	87	2,3
Brokkoli	0,01	80	6,9	110	17,0	80	16,6	- <sup>2</sup>	- <sup>2</sup>
	0,10	88	5,4	86	5,3	84	11,3	96 <sup>1</sup>	6,8
Bohne	0,01	100	5,8	110 <sup>1</sup>	28,6	80	11,1	97 <sup>1</sup>	6,7
	0,10	90	3,8	97	9,0	98	7,8	90	5,4
Soja	0,01	80 <sup>1</sup>	10,6	90 <sup>1</sup>	12,7	110	11,2	78 <sup>1</sup>	8,8
	0,10	94	7,5	99	15,6	98	7,7	84	4,0
Rübe	0,01	90	5,2	90	6,2	100	16,5	82	7,6
	0,10	106	3,2	84	9,1	85	5,8	97	3,7
Karotte	0,01	80	4,8	100	6,4	100	21,8	89	4,1
	0,10	83	2,9	96	5,4	98	6,4	87	1,6
Korn	0,01	69 <sup>1</sup>	6,8	99	3,9	110	6,7	68 <sup>1</sup>	17,1
	0,10	86	4,7	71	2,2	85	4,2	72	6,1
Orange	0,01	100	7,8	110 <sup>1</sup>	14,0	90	17,5	87 <sup>1</sup>	18,7
	0,10	98	5,8	102	7,3	89	7,3	88	2,1
Wein	0,01	100	8,0	90 <sup>1</sup>	7,6	100	11,9	93	5,4
	0,10	99	2,3	80	4,6	95	0,7	86	3,5
Flachs	0,01	90	6,1	110 <sup>1</sup>	16,9	100	17,2	71 <sup>1</sup>	11,1
	0,10	81	5,1	105	9,3	94	5,1	71	2,8
<b>Mittelwert</b>	<b>0,01</b>	<b>88</b>	<b>6,7</b>	<b>100</b>	<b>11,8</b>	<b>95</b>	<b>14,3</b>	<b>86</b>	<b>9,3</b>
	<b>0,10</b>	<b>93</b>	<b>4,5</b>	<b>90</b>	<b>7,3</b>	<b>91</b>	<b>6,7</b>	<b>86</b>	<b>3,7</b>

\* ... Mittelwert der Fünffachbestimmung, Matrixeffekte korrigiert mittels interner Standardsubstanzen

<sup>1</sup> ... Blindwertkorrektur wurde durchgeführt

<sup>2</sup> ... Kein adäquates Material für die Validierung war verfügbar

Vergleicht man die chromatographischen Ergebnisse der MRM<sup>HR</sup>-Detektion mit der „konventionellen“, einheitsaufgelösten MRM-Detektion, so wird eine deutliche Selektivitätssteigerung erreicht. Sowohl der hohe chemische Untergrund als auch interferierende Signale können mittels MRM<sup>HR</sup> ausgeblendet werden. Ein Vergleich von MRM, MRM<sup>HR</sup>, und DMS ist in Abb. 65 dargestellt.

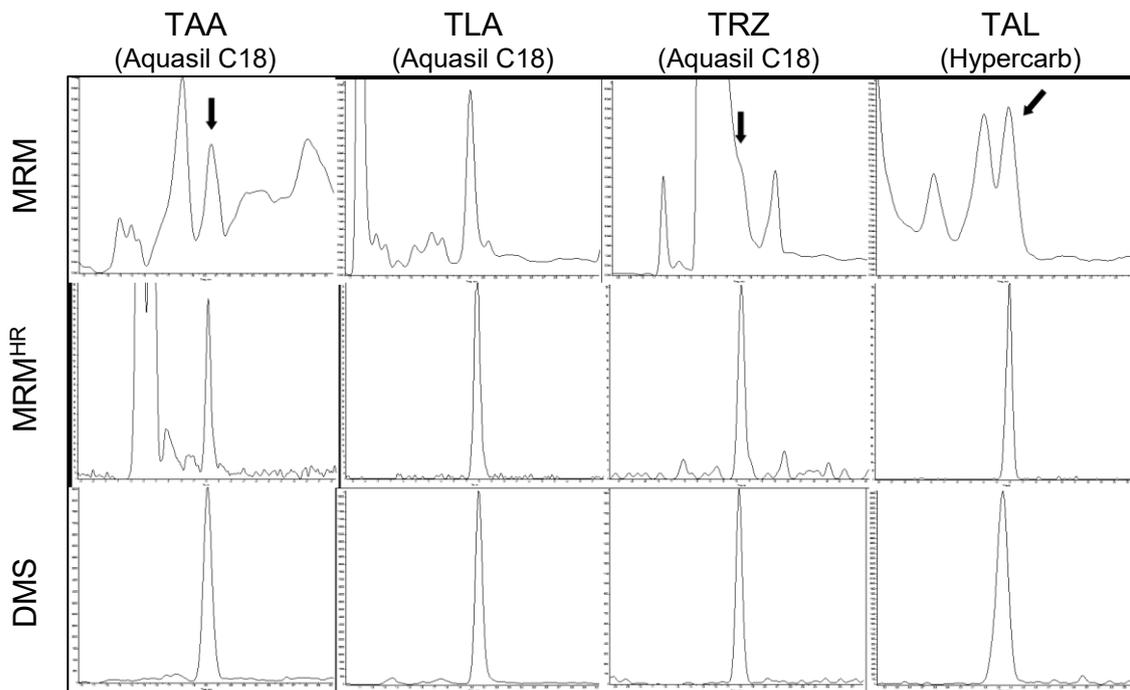


Abb. 65: 0,01 mg/kg TDMs in Futterrübe, Vergleich Detektionstechniken

#### 7.4.3.2 Interferenz des 1,2,4-Triazol

Im Vergleich zu den anderen Triazol-Metaboliten zeigte sich beim 1,2,4-Triazol in den unterschiedlichen pflanzlichen Materialien ein ähnliches Verhalten der Interferenzen. Kurz vor dem TRZ eluierte bei vielen Matrizen eine Interferenz, die das Analytsignal überlagerte (siehe Abb. 66). Daher wurde mit Hilfe eines hochauflösenden Detektionssystems diese nun näher untersucht.

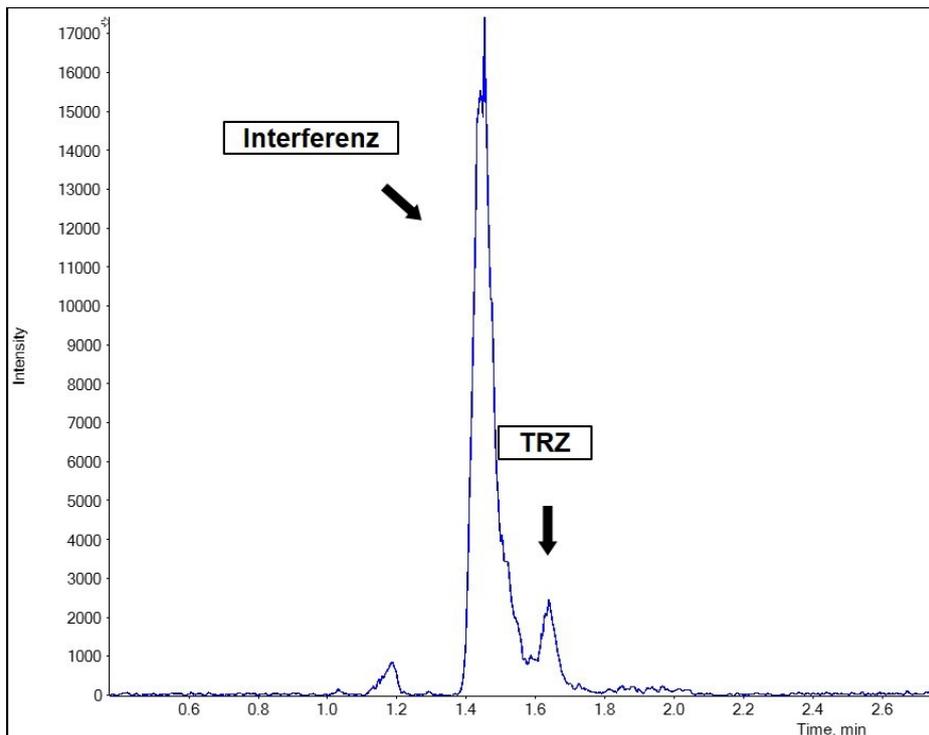


Abb. 66: 0,10 mg/kg TRZ in Orange

Als erstes wurde ein TOFMS-Scan durchgeführt, um die akkurate Masse der Interferenz zu bestimmen. Die akkurate Masse des TRZs und der Interferenz können Abb. 67 entnommen werden. Analyt und Interferenz unterscheiden sich lediglich um rund 0,02 amu.

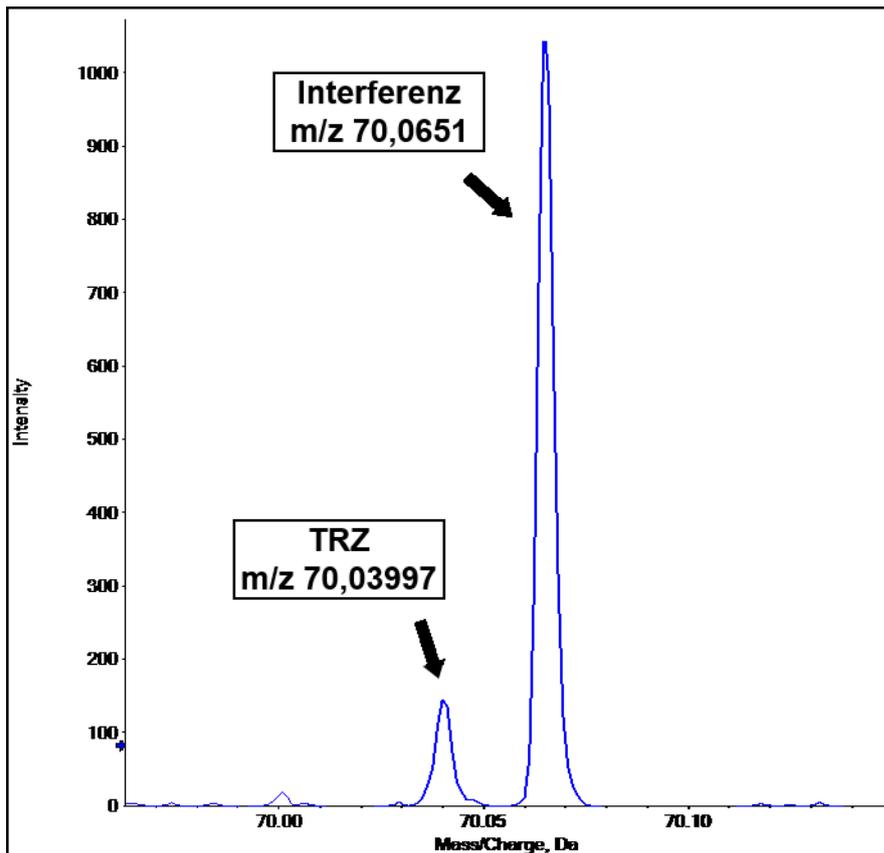


Abb. 67: 0,10 mg/kg TRZ in Orange, TOFMS-Spektrum

Des Weiteren wurde ein hochaufgelöstes Produktions-Spektrum sowohl von dem TRZ als auch von der Interferenz aufgezeichnet (siehe Abb. 68 und Abb. 69). Bei dem TRZ fragmentiert das Mutterion  $m/z$  70,039 zu dem Fragmention  $m/z$  43,029. Die Interferenz zeigt ähnliches Verhalten und fragmentiert vom Mutterion  $m/z$  70,065 auf das Fragmention  $m/z$  43,054. Hier lässt sich die Ursache erkennen, warum mit einem Tripelquadrupol-Massenspektrometer Analyt und Interferenz nicht aufgetrennt werden können. Die Massendifferenz zwischen den beiden Ionen ist zu gering und kann von einheitsauflösenden Systemen nicht unterschieden werden.

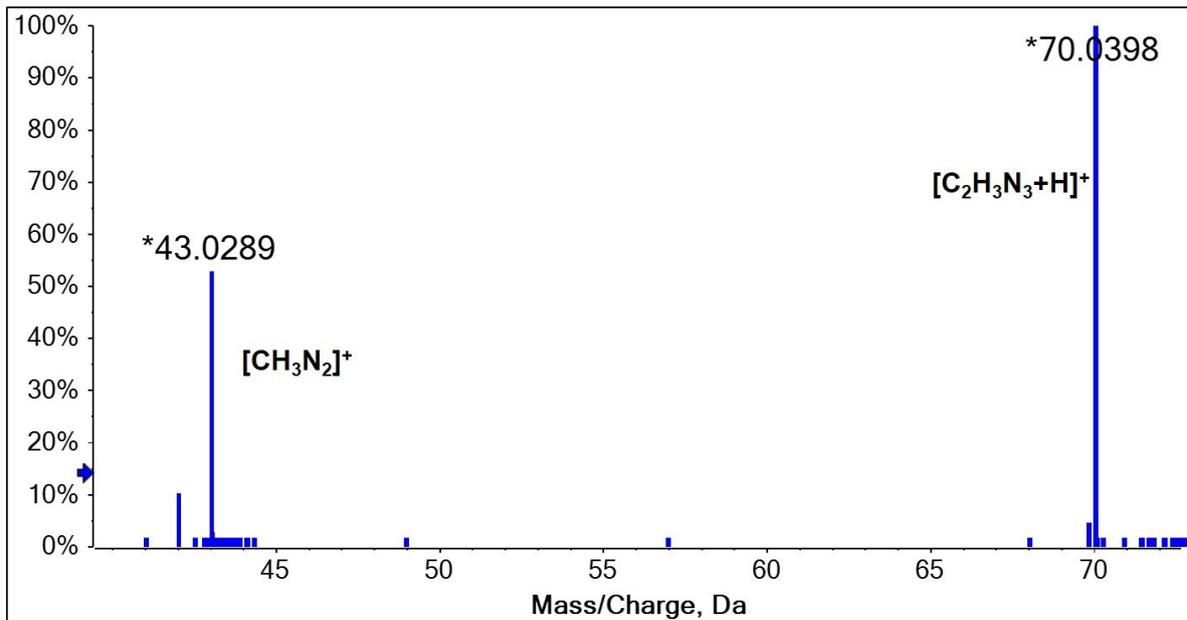


Abb. 68: Produktionen-Scan von TRZ

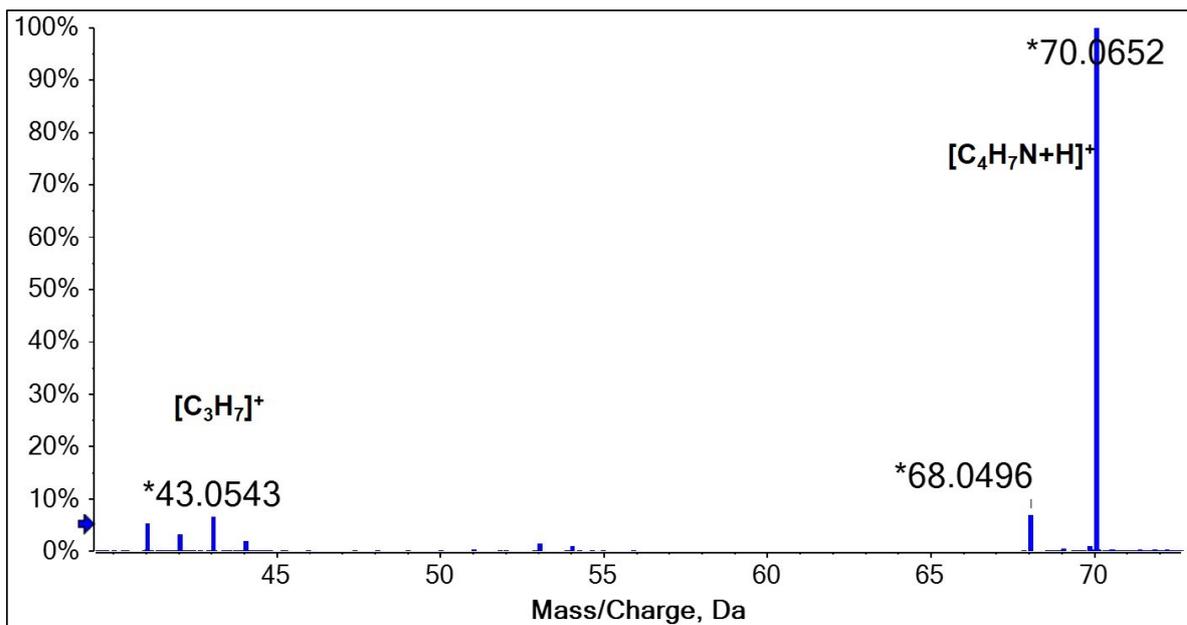
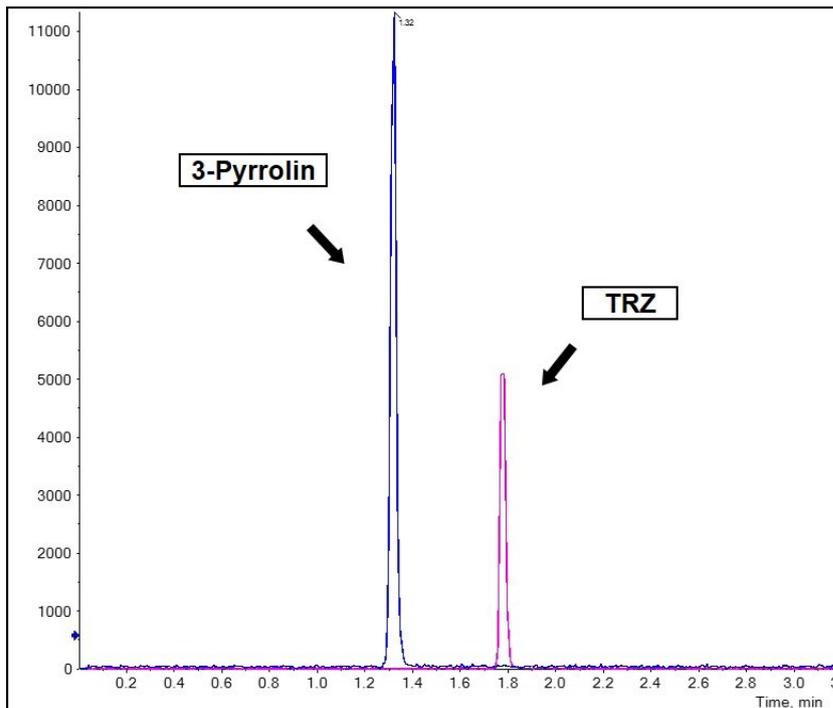


Abb. 69: Produktionen-Scan von der Interferenz, Matrix Orange

Mit Hilfe der akkuraten Masse wurde die Summenformel der Interferenz bestimmt. Es handelt sich hierbei um eine Substanz mit der Summenformel  $C_4H_7N$ . In der ChemSpider-Datenbank sind aktuell 33 Substanzen mit dieser Summenformel gelistet [98, Stand 2018], darunter das 3-Pyrrolin. Diese Substanz weist ähnliche physikalisch-chemische Eigenschaften auf wie das TRZ und dessen Struktur ist kompatibel mit dem gemessenen Produktionen-Spektrum.

Es wurden LC-MS/MS-Testmessungen mit dieser Substanz durchgeführt um zu überprüfen, ob es sich bei dem 3-Pyrrolin um die Interferenz handelt. Das Ergebnis ist in Abb. 70 dargestellt. 3-Pyrrolin lässt sich deutlich vom TRZ chromatographisch abtrennen, im Gegenteil zur Interferenz. Somit handelt es sich hier nicht um das 3-Pyrrolin, sondern um eine dem 3-Pyrrolin sehr ähnliche Substanz. Für weitere Angaben wäre eine Vermessung mittels NMR-Spektroskopie erforderlich.



**Abb. 70: Chromatogramm von TRZ und 3-Pyrrolin**

## 8 Zusammenfassung und Ausblick

Pflanzenschutzmittel sind Substanzen, die in der Landwirtschaft, im Obst- und Gemüseanbau sowie in vielen Kleingärten Anwendung finden. Ziel einer Anwendung ist es, die Kulturpflanzen und Erntegüter vor Schädlingen zu schützen und somit Verluste an Erntegütern und Vorräten zu minimieren [1]. Der Einsatz von Pflanzenschutzmitteln ist jedoch nur zugelassen, wenn keine Gefahr für Mensch, Tier und Umwelt besteht [1]. Dabei geht die Gefahr nicht nur vom Wirkstoff selbst aus, sondern auch dessen Abbauprodukte („Metaboliten“) können ein Risiko darstellen. Um schädliche Wirkungen ausschließen zu können, sind Hersteller von Pflanzenschutzmitteln verpflichtet, diese nach gesetzlichen Vorgaben zu erforschen [5]. Hierzu gehört nicht nur die Ermittlung toxikologischer und ökotoxikologischer Auswirkungen, sondern auch die Erforschung des Abbauverhaltens sowie der Rückstandssituation dieser Substanzen und ihrer Metaboliten nach sachgerechter Anwendung [1]. Letzteres bedarf Analysemethoden, mit deren Hilfe die Rückstände des Wirkstoffes und dessen Metaboliten bestimmt werden können.

Nicht nur bei der Zulassung von Pflanzenschutzmitteln ist die Rückstandsanalytik von Bedeutung. Im Rahmen der amtlichen Lebensmittelüberwachung dient sie der Aufdeckung von Höchstmengenüberschreitungen oder dem Nachweis verbotener Anwendungen [4]. Um mögliche Risiken frühzeitig zu erkennen, werden Lebens- und Futtermittel durch Monitoring-Programme langfristig auf Rückstände von Pflanzenschutzmitteln untersucht [89, LFGB §§50-52].

Aufgrund der hohen Probenzahlen und der Wirkstoffvielfalt sind Multimethoden unerlässlich geworden. Es gibt jedoch Wirkstoffe und vor allem Abbauprodukte, die mit diesen Methoden nicht erfasst werden können. Der Grund hierfür liegt in ihren chemischen Eigenschaften. Vielfach handelt es sich hierbei um Substanzen, die eine sehr hohe Polarität und ein kleines Molekulargewicht aufweisen. Um diese in verschiedenen Matrices zu bestimmen, wurden Einzelanalysenmethoden entwickelt. Jedoch weisen diese Schwächen auf. So sind sie zum Teil sehr arbeits- und zeitaufwendig. Zudem erreichen sie mitunter keine ausreichende Selektivität, was sie anfällig für Matrixinterferenzen macht und zu falschen Analyseergebnissen führen kann.

Das stellt nicht nur eine Gefahr für Mensch, Tier und Umwelt dar, sondern gefährdet auch die Zulassung eines neuen Pflanzenschutzmittels, welches mit einem enormen finanziellen Schaden für den Hersteller verbunden ist.

Ziel dieser Arbeit war es, neue Ansätze für die Analytik kleiner und hochpolarer Pflanzenschutzmittelrückstände in unterschiedlichsten pflanzlichen Materialien zu entwickeln. Dabei standen die Präzision der Analyseergebnisse, der Arbeitsaufwand, sowie die Robustheit der Methoden und die daraus resultierende Übertragbarkeit für die Routineanalytik im Vordergrund. Hierzu wurden verschiedene Arbeitsschritte von Analysemethoden an ausgewählten Beispielen von hochpolaren Pflanzenschutzmittelrückständen mit niedrigem Molekulargewicht untersucht. Für folgende Analyten wurden im Rahmen dieser Arbeit Methoden entwickelt: die Metaboliten der Triazol-Fungizide, für Difluoressigsäure, für Ethephon und dessen Abbauprodukt, für den Metaboliten von Fosetyl-Aluminium sowie für Glufosinat einschließlich dessen Abbauprodukte. Für die meisten der gewählten Analyten galt es, die erforderliche Bestimmungsgrenze von 0,01 mg/kg zu erreichen. Bei den pflanzlichen Materialien wurden nicht nur wasserhaltige, sondern auch säure-, stärke-, protein- und fetthaltige Materialien untersucht. Besonders für komplexe Materialien wie Sojabohne oder Futterrübe sollten Lösungen gefunden werden, da hier die Analytik der genannten Substanzen sehr störanfällig ist.

Zuerst wurde geprüft, ob durch die Wahl des Extraktionsverfahrens ein Einfluss auf die Mitextraktion von Matrixkomponenten genommen werden kann. Hierbei wurden sowohl unterschiedliche Lösungsmittel als auch verschiedene physikalische Verfahren geprüft. Die Mitextraktion von Matrixkomponenten konnte jedoch nicht signifikant durch Änderung des Extraktionsverfahrens reduziert werden. Daher sollte bei der Analytik von kleinen und hochpolaren Pflanzenschutzmittelrückständen die Auswahl des Extraktionsverfahrens auf Grundlage der Extraktionseffizienz der Analyten gewählt werden.

Eine sehr wirkungsvolle Methode, die Matrixeffekte zu reduzieren, ist die Verdünnung des Extraktes. Je stärker der verdünnt wird, desto mehr werden die Matrixeffekte reduziert. Dabei wurde ein exponentielles Verhalten zwischen Verdünnung und Matrixeffekt beobachtet. Wie sich es in dieser Arbeit zeigte, ist dies aber nur bedingt möglich.

Die geforderten Bestimmungsgrenzen der Analyten sind sehr niedrig und die Messempfindlichkeit der verwendeten Systeme nicht ausreichend, um in den stark verdünnten Extrakten die Analyten noch detektieren zu können. Dennoch sollte die Extraktverdünnung als ein Mittel zur Reduktion der Matrixeffekte betrachtet werden. Analytische Messgeräte werden kontinuierlich mit dem Ziel weiterentwickelt, die Messempfindlichkeit zu steigern.

Als Alternative zur Verdünnung, um die Matrixeffekte zu reduzieren, wurde die Extraktaufreinigung mittels SPE untersucht. Hier zeigte sich, dass die SPE-Materialien oft nicht ausreichend selektiv sind, um mit-extrahierte Matrixkomponenten zu entfernen. Teilweise wurden sogar Substanzen über die SPE dem Messextrakt zugeführt, welche die quantitative Analyse interferierten. In Einzelfällen konnten Interferenzen mittels SPE eliminiert werden. Dies war aber sehr von der Matrix abhängig. Eine allgemeine Empfehlung bei der Analytik kleiner und hochpolarer Pflanzenschutzmittelrückstände eine SPE-Aufreinigung durchzuführen, kann daher nicht ausgesprochen werden. Bei Problemfällen mit einer spezifischen Matrix kann die SPE-Aufreinigung aber als hilfreich angesehen werden. Als Beispiel sei hier TAA in Futterrübe genannt. Durch die Aufreinigung des Analysenextraktes mittels eines kationischen SPE-Materials konnten ko-eluierende Matrixinterferenzen entfernt werden und das S/N um den Faktor 3 bis 4 verbessert werden. Dadurch wird eine akkurate Quantifizierung ohne falsch positiver Ergebnisse erreicht an der erforderlichen Bestimmungsgrenze von 0,01 mg/kg.

Als Trennverfahren vor der Detektion wurden die Flüssigkeitschromatographie und die Kapillarelektrophorese geprüft. Bei dem Test der Flüssigkeitschromatographie als Trennverfahren wurden neben verschiedenen RP-Säulen, auch Ionenaustauschersäulen sowie die Spezialphasen HILIC und Hypercarb untersucht. Die beiden Spezialphasen sind zwar komplexer in ihrer Anwendung, zeigten aber die besten Trennleistungen von allen getesteten LC-Phasen. Daher sollten diese bei der Methodenentwicklung von kleinen und hochpolaren Pflanzenschutzmittelrückstände stets mit berücksichtigt werden. So eignet sich zum Beispiel für kleine Säuren wie die DFA die HILIC-Phase. Für Ethephon, HEPA und die Triazol-Metaboliten wurden gute Trennleistungen mit der Hypercarb-Phase erreicht.

Die Kopplung der Kapillarelektrophorese mit einem MS-Detektor ist noch eine neuere Technologie. Bei dem getesteten System erfolgt die Kopplung dieser beiden Einheiten über das sogenannten „Sheath Liquid Interface“. Hier wird ein zusätzliches Lösungsmittel während der Elektrosprayionisation eingeleitet. Dies führte jedoch zur starken Verdünnung der Messlösung, wodurch die Messempfindlichkeit reduziert wird und somit erforderliche Bestimmungsgrenzen für die Analyten nicht erreicht werden konnten. Dennoch soll hervorgehoben werden, dass mit der Kapillarelektrophorese die mit-extrahierten Matrixkomponenten von den Analyten abgetrennt werden konnten. Dies konnte sehr gut für die Analyten Ethephon und HEPA, als auch für die Triazol-Metaboliten belegt werden. Neuere CE-MS-Systeme verwenden anstelle des Sheath Liquid Interface ein Interface, welches auf der Nanospray-LC-MS-Technologie basiert. Hier muss kein zusätzliches Lösungsmittel während der Elektrosprayionisation eingeleitet werden und somit können höhere Messempfindlichkeiten erreicht werden [99]. Noch gibt es Probleme mit der Robustheit der CE-MS-Analytik bei sehr komplexen pflanzlichen Matrices. Die Entwicklung der CE-MS-Kopplung ist gewiss noch nicht ausgereift. Aber aufgrund der hervorragenden Trenneffizienz der Kapillarelektrophorese sollte diese Technologie zukünftig nicht außer Acht gelassen werden bei der Analytik niedrigmolekularer und hochpolarer Pflanzenschutzmittelrückstände. Neben der Kopplung von Kapillarelektrophorese mit MS ist auch die Kopplung der Ionenchromatographie mit MS eine zukunftssträchtige Technologie bei der Bestimmung von hochpolaren Analyten [100]. Auch mit der Ionenchromatographie ist eine sehr gute Auftrennung von Analyten und mit-extrahierten Matrixkomponenten gegeben [Jasak et al., 101].

In der Rückstandsanalytik haben sich massenselektive Detektionssysteme durchgesetzt. Für die meisten der getesteten Analyten konnten sehr gute Ergebnisse mit einem Tripelquadrupol-Massenspektrometers erreicht werden. Nur bei den Triazol-Metaboliten war dieses Detektionssystem nicht ausreichend selektiv. Dies führte zu einem hohen chemischen Untergrund und zu Interferenzen, die das Analytsignal überlagerten und die quantitativen Ergebnisse negativ beeinflussten. Daher wurden für die Triazol-Metaboliten Detektionssysteme mit höherer Selektivität getestet.

Zum einen wurde ein hochauflösendes QTOF-System eingesetzt. Durch die Kombination von MRM und Hochauflösung ließ sich die Selektivität so sehr steigern, dass die Interferenzen abgetrennt werden konnten und die Analytsignale nun akkurat quantifizierbar sind. Diese Option des MRM<sup>HR</sup> wurde neben dieser Arbeit auch bei Pflanzenschutzmittelrückständen getestet, die weniger polar sind, jedoch unspezifische MRM-Übergänge aufweisen. Auch hier konnte mittels MRM<sup>HR</sup> die Qualität der Analytsignale deutlich gesteigert werden, wodurch eine akkurate quantitative Auswertung dieser gewährleistet ist [Jasak et al., 102]. Neben dem hochauflösenden QTOF-System wurde die Differential-Mobilitäts-Spektrometrie als weitere Option der selektiveren Detektion geprüft. Die Bestimmung der Triazol-Metaboliten mittels LC-DMS-MS/MS erwies sich als sehr leistungsstark. Die quantitative Bestimmung der TDMs bei 0,01 mg/kg war damit in allen getesteten pflanzlichen Matrices gegeben. Durch die hohe Selektivität konnten alle Interferenzen von den verschiedenen pflanzlichen Materialien entfernt und somit die Gefahr falsch-positiver Ergebnisse deutlich reduziert werden. Vor dem in dieser Arbeit entwickeltem LC-DMS-MS/MS-Verfahren wurden die TDMs meist nach Derivatisierung bestimmt. Diese Vorgehensweise war nicht nur zeit- und kostenintensiv, sondern auch störanfällig gegenüber verschiedensten Matrixbestandteilen, wodurch es immer wieder zu falsch positiven Ergebnissen kam. Unter Berücksichtigung von Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Arbeitszeit ist die Bestimmung der TDMs mittels der in dieser Arbeit entwickelten LC-DMS-MS/MS drei- bis fünfmal kostengünstiger als die Bestimmung nach Derivatisierung. Es handelt sich um ein routinetaugliches Bestimmungsverfahren, welches die Derivatisierungsmethode in vielen Industrie- und Auftragslaboren erfolgreich ersetzt hat. Auch das Chemische und Veterinäruntersuchungsamt (CVUA) Stuttgart, das Europäische Referenzlabor für Einzelmethoden in der Pestizidanalytik, wendet mittlerweile die in dieser Arbeit entwickelte Methode für die Bestimmung der TDMs an [103].

Im Falle von der DFA wurde mit der DMS eine Möglichkeit aufgezeigt, wie man im Einklang mit der SANCO-Richtlinie das analytische Ergebnis verifizieren kann. Durch die hohe Selektivität der DMS-MS/MS-Detektion konnte die DFA neben dem einzig vorhandenen Fragmention auch auf dem Mutterion quantitativ und störungsfrei bestimmt werden. Noch ist die DMS-Technologie nicht in der SANCO-Richtlinie berücksichtigt. Setzt man allerdings die Selektivität der DMS gleich mit der Selektivität von hochauflösenden Systemen, so hätte man für die DFA ausreichend viele Identifizierungspunkte vorliegen.

Basierend auf diesen Ergebnissen lässt sich festhalten, dass die Differential-Mobilitäts-Spektrometrie eine sehr leistungsstarke Technologie bei der Analytik von hochpolaren Pflanzenschutzmittelrückständen in unterschiedlichsten pflanzlichen Materialien darstellt.

Mit dieser Arbeit wurde aufgezeigt, dass bisher keine allgemeingültige Methode für die quantitative Bestimmung hochpolarer Pestizide und deren Metaboliten vorhanden ist. In Abhängigkeit von den physikalisch-chemischen Eigenschaften bedarf es spezifischer Methoden für die verschiedenen Analyten. Die Ergebnisse dieser Arbeit vereinfachen die Entwicklung dieser spezifischen Analysenmethoden. So wurde dargelegt, dass der Fokus bei der Optimierung dieser Methoden v.a. auf den Trenn- als auch Detektionsverfahren liegen sollte, nicht jedoch auf Extraktions- und Aufreinigungsverfahren, und eine Derivatisierung nicht zwingend notwendig ist. Auf Basis dieser Arbeit wurden somit der Aufwand und die damit verbundenen Kosten einer Methodenentwicklung reduziert. Im Falle von Analyten mit hohem Potenzial falsch-positiver Ergebnisse wurde gezeigt, dass neue Detektionsmethoden wie MRM<sup>HR</sup> mittels eines hochauflösenden QTOF-Systems und die Differential-Mobilitäts-Spektrometrie neue Möglichkeiten aufweisen diese Analyten richtig und reproduzierbar zu analysieren. Im Falle aller Analyten konnte die geforderte Bestimmungsgrenze, die bei den meisten Wirkstoffen bei 0,01 mg/kg lag, erreicht werden. Dadurch wird gewährleistet, dass mit den ermittelten Messdaten eine zuverlässige Gefährdungsbeurteilung für Mensch, Tier und Umwelt bei Einsatz von Pflanzenschutzmitteln vorgenommen werden kann. Hersteller von Pflanzenschutzmitteln generieren dadurch valide Daten, welche eine unabdingbare Voraussetzung für die Zulassung eines neuen Pflanzenschutzmittels sind.

## 9 Anhang

### 9.1 Verwendete Referenzsubstanzen und Interne Standards

Tab. 50: Verwendete Referenzsubstanzen

Referenzsubstanz	Reinheit [%]
1,2,4-Triazol	99,5
Triazolyl-essigsäure	87,0
Triazolyl-milchsäure	95,3
Triazolyl-alanin	98,6
Difluoressigsäure	98,3
Ethephon	98,2
HEPA	95,3
Phosphonsäure	96,2
Glufosinat-ammonium	98,5
MPPA	98,7
NAG	> 90

Tab. 51: Verwendete Interne Standardsubstanzen

Interne Standardsubstanz von	Reinheit [%]
1,2,4-Triazol	99,1
Triazolyl-essigsäure	94,8
Triazolyl-milchsäure	98,0
Triazolyl-alanin	88,7
Difluoressigsäure	99,0
Ethephon	0,43 %ige Lösung
HEPA	5 %ige Lösung
Phosphonsäure	-
Glufosinat-ammonium	97,8
MPPA	> 90
NAG	> 90

## 9.2 Physikalisch-chemische Eigenschaften der Analyten

Tab. 52: Physikalisch-chemische Eigenschaften der Analyten

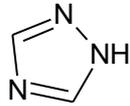
Analyt	Molekulargewicht [g/mol]	log p <sub>ow</sub>		pKs	Löslichkeit [g/L]		Hydrolysestabilität	
		Wert	pH		Lsgm.	Wert	t <sub>½</sub>	pH
1,2,4-Triazol	69,07	-0,62 -0,71 -0,68	5 7 9	2,2 10,2 <sup>[88]</sup>	Wasser Alkohol Ether Benzole	1250 gut mäßig mäßig	30 d	5-9
Triazolyl-essigsäure	127,1			(2,0) (3,2)				
Triazolyl-milchsäure	157,1			(2,0) (3,1)				
Triazolyl-alanin	156,1	-2	5	2,2 7,9	Wasser	27		
Difluoressigsäure	96,03			1,2				
Ethephon	144,5	-0,63 -1,89 -1,81	2 7 10	2,8 7,2	Wasser p-Xylen Methanol Aceton Acetonitril DMSO Ethylacetat	> 800 0,083 > 600 > 600 > 600 > 600 > 600	74 d 2.4 d 1.0 d	5 7 9
HEPA	126,1			(1,8) (8,3)				
Phosphonsäure	91,99			2,0 6,6	Wasser 0°C 40°C Ethanol	3090 6940 löslich		
Glufosinat-ammonium	198,2	-3,77 -4,01 -4,07	5 7 9	<2 2,9 9,8	Wasser Aceton Ethanol Toluol Methanol	1370 0,16 0,65 0,14 0,12	>300 d	5,7 7 9
MPPA	152,1			(2,0) (2,7)	Wasser Aceton Toluol Methanol Isopropanol	794 2,9 < 0,01 > 500 94		
NAG	222,2			(2,0) (4,1)				

Die Daten entstammen, wenn nichts anderes angegeben ist, internen Datenbanken der Bayer CropScience AG.

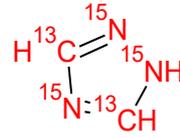
Die in Klammern stehenden Werte für pKs sind theoretisch berechnete Werte [84].

### 9.3 Strukturformeln der Analyten und Internen Standards

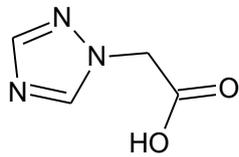
1,2,4-Triazol



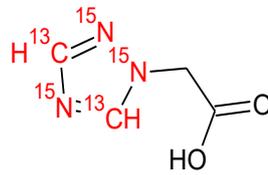
1,2,4-Triazol ISTD



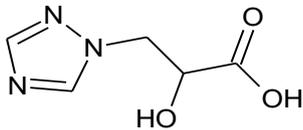
Triazolyl-essigsäure



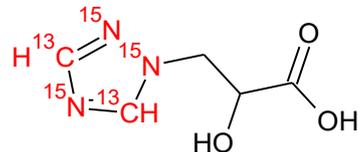
Triazolyl-essigsäure ISTD



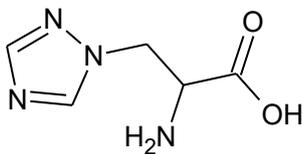
Triazolyl-milchsäure



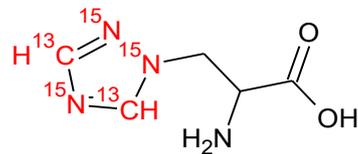
Triazolyl-milchsäure ISTD



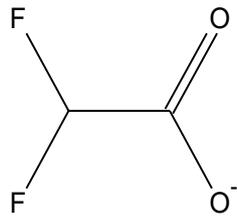
Triazolyl-alanin



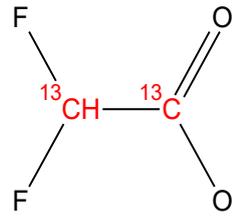
Triazolyl-alanin ISTD



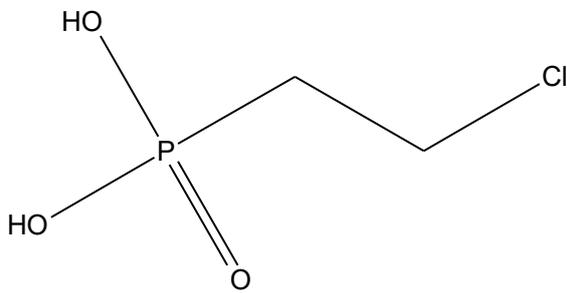
Difluoressigsäure



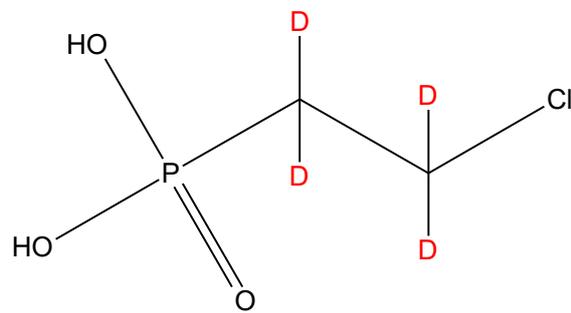
Difluoressigsäure ISTD



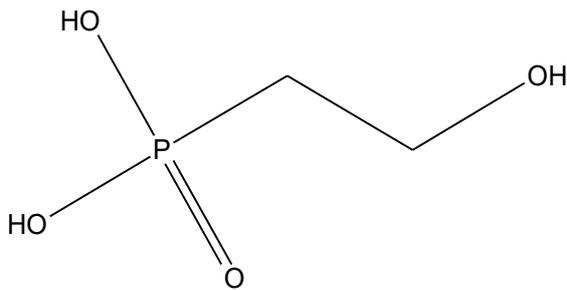
Ethephon



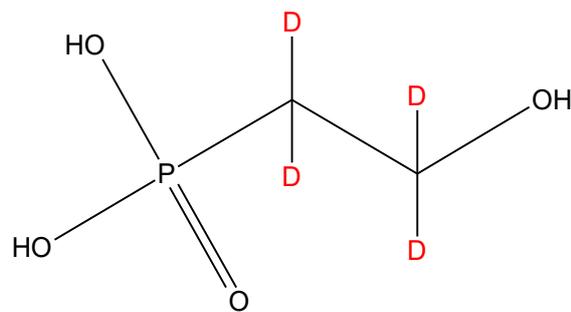
Ethephon ISTD



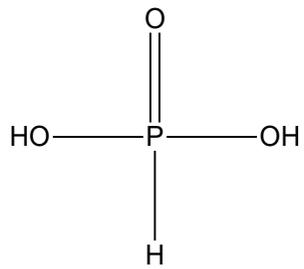
HEPA



HEPA ISTD



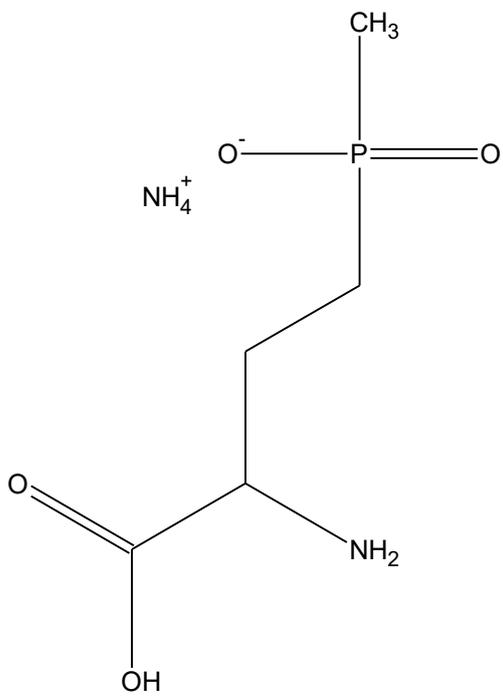
Phosphonsäure



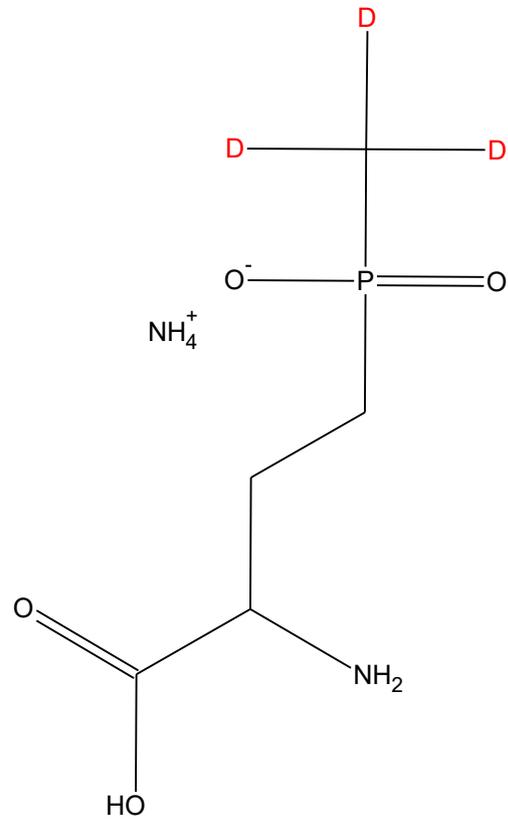
Phosphonsäure ISTD

Nicht vorhanden

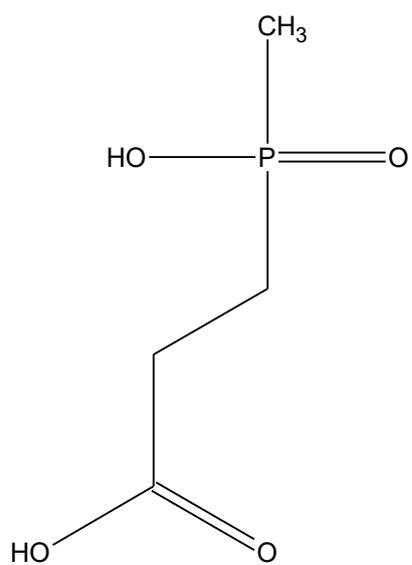
Glufosinat-ammonium



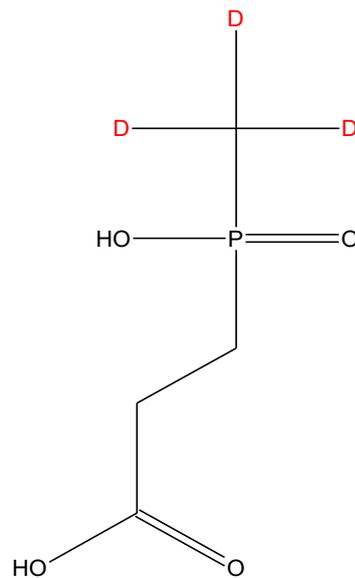
Glufosinat-ammonium ISTD



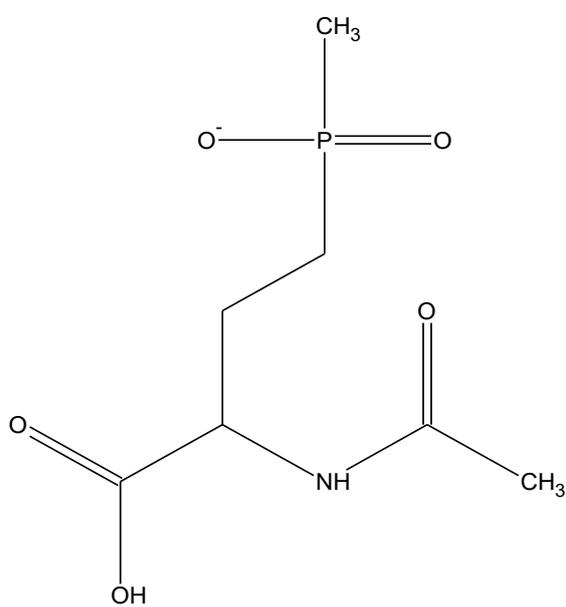
MPPA



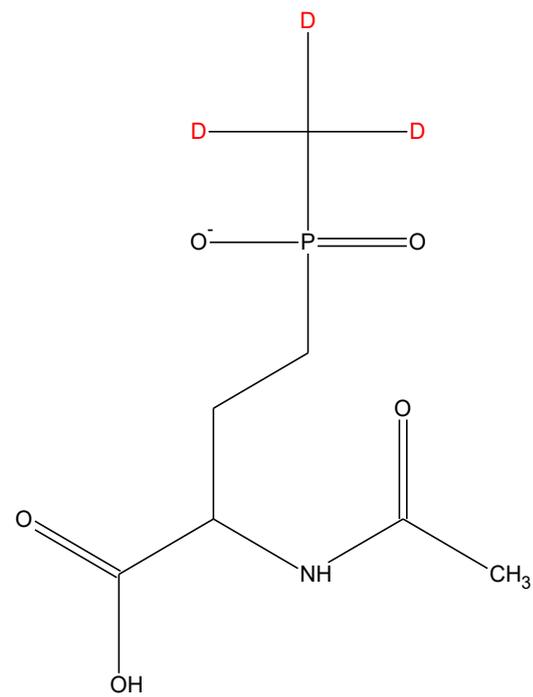
MPPA ISTD



NAG



NAG ISTD



## 9.4 Anwendungsbeispiele der Analyten

**Tab. 53: Anwendungsbeispiele für die Triazol-Metaboliten [18]**

Wirkstoff	Markteinführung Hersteller (Jahr)	Produkte	Kulturen	Beispiele für die Anwendung	
					Zielorganismen
Triadimefon	Bayer (1976)	Bayleton®	Ananas	Ananas Fäule ( <i>Ceratocystis paradoxa</i> )	
			Kiefer	Fusiformrost ( <i>Cronartium quercuum</i> ), Kiefernblasenrost ( <i>Endocronartium harknessii</i> ), Kiefernadel-Spaltlippe ( <i>Lophodermium pinastri</i> )	
			Fichte (Weihnachtsbaum)	Sirococcus-Triebsterben ( <i>Sirococcus strobilinus</i> )	
			Gerste	Mehltau ( <i>Erysiphe graminis</i> )	
Bitertanol	Bayer (1979)	Baycor®, Sibutol®	Rosen	Echter Mehltau ( <i>Sphaerotheca pannosa</i> ), Sternrußtau ( <i>Marssonina rosea</i> ), Rost ( <i>Phragmidium mucronatum</i> )	
			Apfel	Echter Mehltau ( <i>Podosphaera leucotricha</i> )	
			Kirsche	Spitzendürre ( <i>Monilia laxa</i> ),	
			Wein	Echter Mehltau/Oidium ( <i>Uncinula necator</i> )	
Triadimenol	Bayer (1980)	Bayfidan®, Baytan®	Rosen	Echter Mehltau ( <i>Sphaerotheca pannosa</i> )	
			Gerste	Streifenkrankheit ( <i>Pyrenophora graminea</i> ); Flugbrand ( <i>Ustilago nuda</i> f. <i>sp. hordei</i> ); Netzfleckenkrankheit ( <i>Pyrenophora teres</i> ); Typhula-Fäule ( <i>Typhula incarnata</i> ); Echter Mehltau ( <i>Erysiphe graminis</i> ); Blattfleckenkrankheit ( <i>Rhynchosporium secalis</i> )	
			Roggen	Echter Mehltau ( <i>Erysiphe graminis</i> ); <i>Rhynchosporium secalis</i> ; Braunrost ( <i>Puccinia Recondite</i> )	
			Weizen, ausgenommen Hartweizen	Echter Mehltau ( <i>Erysiphe graminis</i> ); <i>Septoria nodorum</i> ; Braunrost ( <i>Puccinia recondita</i> ); Gelbrost ( <i>Puccinia striiformis</i> ); <i>Septoria-Blattdürre</i> ( <i>Septoria tritici</i> )	
			Winterraps	Weißstängeligkeit ( <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> ); Wurzelhals- und Stängelfäule ( <i>Leptosphaeria maculans</i> )	
Propioconazole	Ciba-Geigy (1980)	Tilt®	Weizen	Echter Mehltau ( <i>Erysiphe graminis</i> ), Blatt- und Spelzenbräune ( <i>Septoria nodorum</i> ), Braunrost ( <i>Puccinia recondita</i> ), Gelbrost ( <i>Puccinia striiformis</i> ), DTR-Blattdürre ( <i>Drechslera tritici-repentis</i> )	
			Gerste	Echter Mehltau ( <i>Erysiphe graminis</i> ), Zwergrost ( <i>Puccinia hordei</i> ), <i>Rhynchosporium-Blattflecken</i> ( <i>Rhynchosporium secalis</i> ), Netzfleckenkrankheit ( <i>Pyrenophora teres</i> )	
			Roggen	Echter Mehltau ( <i>Erysiphe graminis</i> ), Braunrost ( <i>Puccinia recondita</i> )	

**Tab. 53 (Fortsetzung): Anwendungsbeispiele für die Triazol-Metaboliten [18]**

Wirkstoff	Markteinführung Hersteller (Jahr)	Produkte	Kulturen	Beispiele für die Anwendung	
					Zielorganismen
Flusilazole	DuPont (1986)	Punch®, Nustar®	Weizen	Halbruchkrankheit ( <i>Pseudocercospora herpotrichoides</i> )	
			Erdnüsse	Blattfleckenkrankheit ( <i>Cercospora arachidicola</i> , <i>Cercosporidium personata</i> ), Grauschimmelfäule ( <i>Botrytis cinerea</i> ), Rostpilz ( <i>Puccinia arachidis</i> )	
			Erbse	Echter Mehltau ( <i>Erysiphe pisi</i> )	
			Mais	Blattfleckenkrankheit ( <i>Cercospora zeae-maydis</i> )	
Tebuconazole	Bayer (1988)	Folicur®, Raxil®	Rosen	Echter Mehltau ( <i>Sphaerotheca pannosa</i> )	
			Roggen	Echter Mehltau ( <i>Erysiphe graminis</i> ); <i>Rhynchosporium secalis</i> ; Braunrost ( <i>Puccinia Recondite</i> )	
			Weizen, ausgenommen Hartweizen	Echter Mehltau ( <i>Erysiphe graminis</i> ); <i>Septoria nodorum</i> ; Braunrost ( <i>Puccinia recondita</i> ); Gelbrost ( <i>Puccinia striiformis</i> ); <i>Septoria-Blattdürre</i> ( <i>Septoria tritici</i> )	
			Winterraps	Weißstängeligkeit ( <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> ); Wurzelhals- und Stängelfäule ( <i>Leptosphaeria maculans</i> )	
Tetraconazole	Montedison (1991)	Eminent®	Weinrebe	Echter Mehltau ( <i>Uncinula necator</i> ); Schwarzfäule ( <i>Guignardia bidwellii</i> )	
			Weizen	Echter Mehltau ( <i>Erysiphe graminis</i> ); Blatt- und Spelzenbräune ( <i>Septoria nodorum</i> ); <i>Septoria-Blattdürre</i> ( <i>Septoria tritici</i> ); Gelbrost ( <i>Puccinia striiformis</i> ); Braunrost ( <i>Puccinia recondita</i> )	
Epoconazole	BASF (1993)	Juwel®, Xemium®	Zuckerrübe	Echter Mehltau ( <i>Erysiphe betae</i> ); <i>Cercospora beticola</i> ; <i>Ramularia-Blattflecken</i> ( <i>Ramularia beticola</i> )	
			Spargel	Spargelrost ( <i>Puccinia asparagi</i> )	
			Kohlrübe, Speiserübe	Echter Mehltau ( <i>Erysiphe cruciferarum</i> ); Pilzliche Blattfleckenerreger	
			Rote Bete	Echter Mehltau ( <i>Erysiphe betae</i> ); <i>Cercospora beticola</i> ; <i>Ramularia-Blattflecken</i> ( <i>Ramularia beticola</i> )	
			Gerste	Echter Mehltau ( <i>Erysiphe graminis</i> ); Zwergrost ( <i>Puccinia hordei</i> ); Netzfleckenkrankheit ( <i>Pyrenophora teres</i> ); <i>Rhynchosporium secalis</i>	
			Roggen	Echter Mehltau ( <i>Erysiphe graminis</i> ); <i>Rhynchosporium secalis</i> ; Braunrost ( <i>Pucciniarecondita</i> )	
Weizen	Echter Mehltau ( <i>Erysiphe graminis</i> ); <i>Septoria-Blattdürre</i> ( <i>Septoria tritici</i> ); DTR-Blattdürre ( <i>Drechslera tritici-repentis</i> ); Braunrost ( <i>Puccinia recondita</i> )				

**Tab. 54: Anwendungsbeispiele für die Difluoressigsäure**

Wirkstoff	Markteinführung Hersteller (Jahr)	Produkte	Kulturen	Beispiele für die Anwendung	
					Zielorganismen
NN	Bayer (in den nächsten Jahren)	NN	Apfel, Salat, Gurke, Kohl, Melone, Tomate, Paprika, Weizen, Gerste		Insekten

**Tab. 55: Anwendungsbeispiele für Ethephon [18, 32, 33]**

Wirkstoff	Markteinführung Hersteller (Jahr)	Produkte	Kulturen	Beispiele für die Anwendung	
					Zielorganismen
Ethephon	Bayer (1960iger)	Cerone®, Camposan®, Flordimex®	Roggen, Gerste, Weizen, Triticale  Apfel  Sauerkirsche  Dendranthema x grandiflorum, Pelargonium zonale		Halmfestigung  Förderung der Blütenbildung  Ernteerleichterung  Förderung der Triebbildung

**Tab. 56: Anwendungsbeispiele für die Phosphonsäure [18, 33]**

Wirkstoff	Markteinführung Hersteller (Jahr)	Produkte	Kulturen	Beispiele für die Anwendung Zielorganismen
Fosetyl- Aluminium	Rhône-Poulenc, heute Bayer (1977)	Fenomenal®, Aliette® WG, Previcur® Energy, Mikal®, Valiant®, Proban®, Mikalix®, Odyssee®, Rhodax®, Almanach®, Artimon®	Erdbeere	Rhizomfäule ( <i>Phytophthora cactorum</i> ), Rote Wurzelfäule ( <i>Phytophthora fragariae</i> )
			Ziergehölze	Phytophthora-Arten ( <i>Phytophthora species</i> )
			Zierpflanzen	Pythium-Arten ( <i>Pythium spp.</i> ), Phytophthora-Arten ( <i>Phytophthora species</i> ), Falsche Mehltaupilze ( <i>Peronosporaceae</i> )
			Salate, Endivien	Falscher Mehltau ( <i>Bremia lactucae</i> )
			Gurke	Falscher Mehltau ( <i>Pseudoperonospora cubensis</i> ), Pythium-Arten ( <i>Pythium spp.</i> )
			Zucchini, Kürbis- Hybriden	Falscher Mehltau ( <i>Pseudoperonospora cubensis</i> )
			Echte Kamille	Falsche Mehltaupilze ( <i>Peronosporaceae</i> )
			Hopfen	Falscher Mehltau ( <i>Pseudoperonospora humuli</i> )
			Kohlgemüse	Falscher Mehltau ( <i>Peronospora parasitica</i> ), Pythium-Arten ( <i>Pythium spp.</i> )
			Gemüsepaprika, Aubergine, Tomate	Pythium-Arten ( <i>Pythium spp.</i> )

**Tab. 57: Anwendungsbeispiele für Glufosinat-Ammonium [18, 33]**

Wirkstoff	Markteinführung Hersteller (Jahr)	Produkte	Kulturen	Beispiele für die Anwendung Zielorganismen
Glufosinat- Ammonium	Hoechst, heute Bayer (1984)	Basta®, HYGANEX- flüssig, RA-200- flüssig	Feldsalat, Spargel, Artischocke, Gurke, Kürbis, Melone, Kernobst, Steinobst, Erdbeere, Brombeere, Ziergehölze  Steinobst  Erdbeere	Einjährige einkeimblättrige Unkräuter, Einjährige zweikeimblättrige Unkräuter   Abtötung von Wurzelschossern  Abtötung von Ausläufern

## 9.5 Massenspektrometrische Parameter der Analyten am SCIEX API 4000™ und am QTRAP® 5500 MS/MS-System

Tab. 58: Komponentenspezifische Parameter am SCIEX API 4000™ MS/MS System

Analyt	Q1 [Da]	Q3 [Da]	DP [V]	EP [V]	CE [V]	CXP [V]	QMI
TAA	128,0	70,1	56	10	29	12	[M+H] <sup>+</sup>
TAA-ISTD	133,0	75,1	56	10	29	12	
TLA	158,1	70,1	36	10	29	6	[M+H] <sup>+</sup>
TLA-ISTD	163,1	75,1	36	10	29	6	
TRZ	70,1	43,1	61	10	29	6	[M+H] <sup>+</sup>
TRZ-ISTD	75,1	46,1	61	10	29	6	
TAL	157,1	70,1	46	10	25	6	[M+H] <sup>+</sup>
TAL	157,1	88,1	46	10	17	14	
TAL-ISTD	162,1	75,1	46	10	25	6	
DFA	95,2	51,1	-40	-10	-18	-7	[M-H] <sup>-</sup>
DFA-ISTD	97,2	52,1	-40	-10	-18	-7	
Ethephon	142,8	106,9	-20	-10	-10	-7	[M-H] <sup>-</sup>
Ethephon-ISTD	147	111	-20	-10	-10	-7	
HEPA	124,9	94,9	-55	-10	-18	-15	[M-H] <sup>-</sup>
HEPA-ISTD	128,9	96,9	-55	-10	-18	-15	
Phosphonsäure	80,8	78,8	-50	-10	-21	-9	[M-H] <sup>-</sup>
Phosphonsäure	80,8	62,7	-50	-10	-30	-9	
Glufosinat (ESI <sup>+</sup> )	182,0	56,0	21	10	33	10	[M+H] <sup>+</sup>
Glufosinat-ISTD (ESI <sup>+</sup> )	185,0	139,0	21	10	17	4	
MPPA (ESI <sup>+</sup> )	153,0	135,0	61	10	15	10	[M+H] <sup>+</sup>
MPPA-ISTD (ESI <sup>+</sup> )	156,0	82,0	61	10	33	4	
NAG (ESI <sup>+</sup> )	224,1	56,1	61	10	47	10	[M+H] <sup>+</sup>
NAG (ESI <sup>+</sup> )	224,1	118,1	61	10	27	4	
NAG-ISTD (ESI <sup>+</sup> )	227,1	56,1	61	10	47	10	

**Tab. 59: Komponentenspezifische Parameter am SCIEX QTRAP® 5500 MS/MS System**

Analyt	Q1 [Da]	Q3 [Da]	DP [V]	EP [V]	CE [V]	CXP [V]	QMI
TAA	128,0	70,1	81	10	25	6	[M+H] <sup>+</sup>
TAA-ISTD	133,0	75,1	81	10	25	6	
TLA	158,1	70,1	101	10	27	4	[M+H] <sup>+</sup>
TLA-ISTD	163,1	75,1	101	10	27	4	
TRZ	70,1	43,1	156	10	29	8	[M+H] <sup>+</sup>
TRZ-ISTD	75,1	46,1	156	10	29	8	
TAL	157,1	70,1	81	10	19	4	[M+H] <sup>+</sup>
TAL	157,1	88,1	81	10	17	14	
TAL-ISTD	162,1	75,1	81	10	19	4	
DFA	95,2	51,1	-65	-10	-18	-12	[M-H] <sup>-</sup>
DFA-ISTD	97,2	52,1	-65	-10	-18	-12	
Ethephon	106,9	78,9	-120	-10	-28	-21	[M*-H] <sup>-</sup>
Ethephon	106,9	62,7	-120	-10	-66	-9	[M-H] <sup>-</sup>
Ethephon	142,8	106,9	-30	-10	-14	-11	
Ethephon-ISTD	110,9	78,9	-120	-10	-28	-21	[M*-H] <sup>-</sup>
HEPA	124,9	78,9	-55	-10	-32	-13	[M-H] <sup>-</sup>
HEPA	124,9	95,0	-55	-10	-18	-1	
HEPA	124,9	62,9	-55	-10	-68	-9	
HEPA-ISTD	128,9	78,9	-55	-10	-32	-13	
Phosphonsäure	80,8	78,8	-60	-10	-22	-13	[M-H] <sup>-</sup>
Phosphonsäure	80,8	62,7	-60	-10	-46	-9	
Glufosinat (ESI <sup>-</sup> )	179,0	62,9	-110	-10	-60	-23	[M-H] <sup>-</sup>
Glufosinat (ESI <sup>-</sup> )	179,0	94,8	-110	-10	-26	-13	
Glufosinat (ESI <sup>-</sup> )	179,0	85,0	-110	-10	-26	-15	
Glufosinat-ISTD (ESI <sup>-</sup> )	182,9	62,9	-110	-10	-60	-23	
MPPA (ESI <sup>-</sup> )	150,7	62,9	-50	-10	-54	-3	[M-H] <sup>-</sup>
MPPA (ESI <sup>-</sup> )	150,7	133,0	-50	-10	-18	-15	
MPPA (ESI <sup>-</sup> )	150,7	106,9	-50	-10	-22	-7	
MPPA (ESI <sup>-</sup> )	150,7	77,9	-50	-10	-32	-13	
MPPA-ISTD (ESI <sup>-</sup> )	153,7	62,9	-50	-10	-54	-3	
NAG (ESI <sup>-</sup> )	221,9	62,9	-45	-10	-80	-9	[M-H] <sup>-</sup>
NAG (ESI <sup>-</sup> )	221,9	136,1	-45	-10	-30	-9	
NAG-ISTD (ESI <sup>-</sup> )	224,9	62,9	-45	-10	-80	-9	
Glufosinat (ESI <sup>+</sup> )	182,0	136,2	21	10	17	4	[M+H] <sup>+</sup>
Glufosinat (ESI <sup>+</sup> )	182,0	56,0	21	10	33	10	
Glufosinat-ISTD (ESI <sup>+</sup> )	185,0	139,0	21	10	17	4	
MPPA (ESI <sup>+</sup> )	153,0	135,0	61	10	15	10	[M+H] <sup>+</sup>
MPPA (ESI <sup>+</sup> )	153,0	79,0	61	10	33	4	
MPPA-ISTD (ESI <sup>+</sup> )	156,0	82,0	61	10	33	4	
NAG (ESI <sup>+</sup> )	224,1	56,1	61	10	47	10	[M+H] <sup>+</sup>
NAG (ESI <sup>+</sup> )	224,1	136,0	61	10	29	8	
NAG (ESI <sup>+</sup> )	224,1	118,1	61	10	27	4	
NAG-ISTD (ESI <sup>+</sup> )	227,1	56,1	61	10	47	10	

**Tab. 60: Quellenparameter am MS/MS-System für Triazol-Metaboliten**

Parameter	Positiver ESI-Modus
Kollisionsgas (Stickstoff)	6 psi
Curtain Gas (Stickstoff) API 4000™	30 psi
Curtain Gas (Stickstoff) QTRAP® 5500	40 psi
Gas 1/2 (Stickstoff)	70/80 psi
Quellentemperatur	600 °C
Ionisierungsspannung	5500 V

**Tab. 61: Quellenparameter am MS/MS-System für DFA**

Parameter	Negativer ESI-Modus
Kollisionsgas (Stickstoff)	6 psi
Curtain Gas (Stickstoff) API 4000™	30 psi
Curtain Gas (Stickstoff) QTRAP® 5500	40 psi
Gas 1/2 (Stickstoff)	70/80 psi
Quellentemperatur	380 °C
Ionisierungsspannung	-300 V

**Tab. 62: Quellenparameter am MS/MS-System für Ethephon und HEPA**

Parameter	Negativer ESI-Modus
Kollisionsgas (Stickstoff)	6 psi
Curtain Gas (Stickstoff) API 4000™	30 psi
Curtain Gas (Stickstoff) QTRAP® 5500	40 psi
Gas 1/2 (Stickstoff)	70/80 psi
Quellentemperatur	450 °C
Ionisierungsspannung	-4500 V

**Tab. 63: Quellenparameter am MS/MS-System für Phosphonsäure**

Parameter	Negativer ESI-Modus
Kollisionsgas (Stickstoff)	6 psi
Curtain Gas (Stickstoff) API 4000™	30 psi
Curtain Gas (Stickstoff) QTRAP® 5500	40 psi
Gas 1/2 (Stickstoff)	70/80 psi
Quellentemperatur	450 °C
Ionisierungsspannung	-4000 V

**Tab. 64: Quellenparameter am MS/MS-System für Glufosinat und Metaboliten**

Parameter	Positiver ESI-Modus	Negativer ESI-Modus
Kollisionsgas (Stickstoff)	6 psi	6 psi
Curtain Gas (Stickstoff) API 4000™	30 psi	-
Curtain Gas (Stickstoff) QTRAP® 5500	40 psi	40 psi
Gas 1/2 (Stickstoff)	70/80 psi	70/80 psi
Quellentemperatur	600 °C	600 °C
Ionisierungsspannung	3000 V	-4500 V

## 9.6 Verwendete LC-Parameter

**Tab. 65: Aquasil C18 - Triazol-Metaboliten**

Säule:	Aquasil C18 (Thermo) 150 x 3 mm / 3µm		
Säulentemperatur:	60 °C		
Injektionsvolumen:	15 µL		
Eluenten:	A) H <sub>2</sub> O + 5 mL/L Ameisensäure B) Methanol + 5 mL/L Ameisensäure		
Fluss:	600 mL/min		
Gradient:	[min]	[%] A	[%] B
	0	100	0
	1,0	100	0
	2,0	90	10
	2,5	90	10
	2,51	5	95
	3,5	5	95
	3,51	100	0
	6,0	100	0

**Tab. 66: Hypercarb - Triazol-Metaboliten**

Säule:	Hypercarb (Thermo) 100 x 3 mm / 5 µm		
Säulentemperatur:	60 °C		
Injektionsvolumen:	10 µL		
Eluenten:	A) H <sub>2</sub> O + 5 mL/L Ameisensäure B) Methanol + 5 mL/L Ameisensäure		
Fluss:	600 mL/min		
Gradient:	[min]	[%] A	[%] B
	0	100	0
	3,0	100	0
	5,0	50	50
	6,0	50	50
	6,01	100	0
	8,0	100	0

**Tab. 67: Luna SCX - Triazol-Metaboliten**

Säule:	Luna SCX (Phenomenex) 150 x 2 mm / 5 µm		
Säulentemperatur:	60 °C		
Injektionsvolumen:	20 µL		
Eluenten:	A) H <sub>2</sub> O + 15 mM Ammoniumacetat B) H <sub>2</sub> O + 10 % Essigsäure		
Fluss:	600 mL/min		
Gradient:	[min]	[%] A	[%] B
	0	5	95
	1,5	5	95
	2,8	95	5
	6,7	95	5
	6,71	5	95
	8,5	5	95

**Tab. 68: ZIC®-pHILIC - Triazol-Metaboliten**

Säule:	ZIC®-pHILIC (Merck) 150 x 2,1 mm / 5 µm		
Säulentemperatur:	Raumtemperatur		
Injektionsvolumen:	20 µL		
Eluenten:	A) H <sub>2</sub> O + 75 mM Ammoniumacetat + 1 % Essigsäure B) Acetonitril		
Fluss:	550 mL/min		
Gradient:	[min]	[%] A	[%] B
	0	5	95
	1,0	5	95
	3,0	30	70
	4,0	50	50
	4,5	50	50
	4,51	5	95
	8,0	5	95

**Tab. 69: ZIC®-pHILIC - DFA**

Säule:	ZIC®-pHILIC (Merck) 150 x 4,6 mm / 5 µm		
Säulentemperatur:	Raumtemperatur		
Injektionsvolumen:	20 µL		
Eluenten:	A) H <sub>2</sub> O + 50 mM Ammoniumacetat + 1 mL/L Essigsäure B) Acetonitril + 1 mL/L Essigsäure		
Fluss:	800 mL/min		
Gradient:	[min]	[%] A	[%] B
	0	5	95
	2,0	25	75
	3,5	90	10
	5,5	90	10
	5,51	5	95
	10,0	5	95

**Tab. 70: Hypercarb - DFA**

Säule:	Hypercarb (Fisher Scientific) 100 x 3 mm / 5 µm		
Säulentemperatur:	60 °C		
Injektionsvolumen:	20 µL		
Eluenten:	A) H <sub>2</sub> O + 5 mL/L Ameisensäure B) Methanol + 5 mL/L Ameisensäure		
Fluss:	700 mL/min		
Gradient:	[min]	[%] A	[%] B
	0	30	70
	0,5	30	70
	2,5	90	10
	3,5	90	10
	3,51	30	70
	6,0	30	70

**Tab. 71: Hypercarb - Ethephon und HEPA**

Säule:	Hypercarb (Fisher Scientific) 100 x 3 mm / 5 µm		
Säulentemperatur:	60 °C		
Injektionsvolumen:	20 µL		
Eluenten:	A) H <sub>2</sub> O + 5 mL/L Ameisensäure B) Methanol + 5 mL/L Ameisensäure		
Fluss:	600 mL/min		
Gradient:	[min]	[%] A	[%] B
	0	45	55
	1,5	45	55
	2,8	95	5
	6,7	95	5
	6,71	45	55
	8,5	45	55

**Tab. 72: Luna NH<sub>2</sub> - Ethephon und HEPA**

Säule:	Luna NH <sub>2</sub> (Phenomenex) 50 x 2 mm / 3 µm		
Säulentemperatur:	60 °C		
Injektionsvolumen:	20 µL		
Eluenten:	A) H <sub>2</sub> O + 20 mL/L Ameisensäure B) Methanol + 20 mL/L Ameisensäure		
Fluss:	600 mL/min		
Gradient:	[min]	[%] A	[%] B
	0	90	10
	3,8	90	10
	3,81	100	0
	4,5	100	0
	4,51	90	10
	6,0	90	10

**Tab. 73: Hypercarb - Phosphonsäure**

Säule:	Hypercarb (Fisher Scientific) 100 x 3 mm / 5 µm		
Säulentemperatur:	60 °C		
Injektionsvolumen:	20 µL		
Eluenten:	A) H <sub>2</sub> O + 5 mL/L Ameisensäure B) Methanol + 5 mL/L Ameisensäure		
Fluss:	500 mL/min		
Gradient:	[min]	[%] A	[%] B
	0	45	55
	2,0	45	55
	5,0	95	5
	5,01	45	5
	8,0	45	55

**Tab. 74: Hypercarb - Glufosinat und Metaboliten**

Säule:	Hypercarb (Fisher Scientific) 100 x 3 mm / 5 µm		
Säulentemperatur:	60 °C		
Injektionsvolumen:	20 µL		
Eluenten:	A) H <sub>2</sub> O + 5 mL/L Ameisensäure B) Methanol + 5 mL/L Ameisensäure		
Fluss:	600 mL/min		
Gradient:	[min]	[%] A	[%] B
	0	30	70
	5,0	30	70

**Tab. 75: ZIC®-pHILIC - Glufosinat und Metaboliten**

Säule:	ZIC®-pHILIC (Merck) 150 x 2,1 mm / 5 µm		
Säulentemperatur:	Raumtemperatur		
Injektionsvolumen:	20 µL		
Eluenten:	A) H <sub>2</sub> O + 50 mM Ammoniumacetat + 4mL/L Essigsäure B) Acetonitril + 1 mL/L Essigsäure		
Fluss:	550 mL/min		
Gradient:	[min]	[%] A	[%] B
	0	20	80
	0,8	20	80
	5,0	40	60
	5,01	20	80
	7,0	20	80

## 9.7 Verwendete CE-MS/MS-Parameter

Verwendet wurde ein Agilent 7100 Kapillarelektrophorese-System, welches gekoppelt wurde mit einem Agilent 6490 Tripelquadrupol System.

**Tab. 76: Bedingungen Kapillarelektrophorese**

Kapillare:	60 cm x 50 µm Innendurchmesser
Injektion:	500 mbar*s 1000 mbar*s bei den TDMs
CE Puffer:	100 mM Ameisensäure
CE Bedingungen:	15 kV (+10 mbar)
Sheath Liquid:	ESI <sup>+</sup> : MeOH/H <sub>2</sub> O (1/1, v/v) + 0,1% Ameisensäure (pH 2,6)  ESI <sup>-</sup> : 5 mM Ammoniumformiat/Isopropanol (1/1, v/v) + 1% Ammoniumhydroxid (pH 8,0)
Fluss Sheath Liquid:	10 µL/min

**Tab. 77: Quellenparameter am CE-MS/MS-System**

Parameter	Positiver ESI-Modus	Negativer ESI-Modus
Drying Gas Temperature	150 °C	150 °C
Drying Gas Flow	11 L/min	11 L/min
Nebulizer Pressure	10 psi	10 psi
Sheath Gas Temperature	195 °C	195 °C
Sheath Gas Flow	3,5 L/min	3,5 L/min
Capillary Voltage	4000 V	4000 V
Nozzle Voltage	2000 V	2000 V

## 9.8 Verwendete Differential-Mobilitäts-Spektrometrie Parameter

**Tab. 78: DMS-Bedingungen für die Triazol-Metaboliten**

DMS Temperatur:	150 °C
DMS offset:	-3 V
Resolution enhancement:	off
Modifier:	Ohne Modifier
Separation Voltage:	3000 V
Compensation Voltage:	- TAA + TAA-ISTD: - 4,6 V - TLA + TLA-ISTD: - 1,7 V - TRZ + TRZ-ISTD: - 14,6 V - TAL + TAL-ISTD: - 0,3 V

**Tab. 79: DMS-Bedingungen für die DFA**

DMS Temperatur:	150 °C
DMS offset:	3 V
Resolution enhancement:	off
Modifier:	Ohne Modifier
Separation Voltage:	3000 V
Compensation Voltage:	- 14,5 V

Alle weiteren MS-Parameter sind Anhang 9.5 zu entnehmen.

,

## 9.9 Verwendete QTOF-Parameter

**Tab. 80: QTOF- Bedingungen für die Triazol-Metaboliten**

Accumulation Time:	25 ms
DP:	50 V
CE:	29 V mit CES 10 V
Scan Range:	m/z 50 – 400
Mode:	High Sensitivity (Auflösung ~ 12 000)
Experiment 1:	Product Ion Scan von 133,03
Experiment 2:	Product Ion Scan von 158,06
Experiment 3:	Product Ion Scan von 163,06
Experiment 4:	Product Ion Scan von 157,07
Experiment 5:	Product Ion Scan von 162,07
Experiment 6:	Product Ion Scan von 70,04
Experiment 7:	Product Ion Scan von 75,04
Experiment 8:	Product Ion Scan von 128,04

**Tab. 81: Quellenparameter am QTOF-System für Triazol-Metaboliten**

Parameter	Positiver ESI-Modus
Curtain Gas (Stickstoff)	30 psi
Gas 1/2 (Stickstoff)	50/50 psi
Quellentemperatur	600 °C
Ionisierungsspannung	5500 V

## 9.10 Verwendete Formeln

### Formel 1: Mittelwert $\bar{x}$

$$\bar{x} = \frac{\sum_i x_i}{n}$$

$i$  ... Laufzahl;  $i = 1, 2, 3, \dots, n$

$x_i$  ...  $i$ -ter Messwert

$n$  ... Anzahl der Messwerte

### Formel 2: Standardabweichung $s$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

$i$  ... Laufzahl;  $i = 1, 2, 3, \dots, n$

$x_i$  ...  $i$ -ter Messwert

$\bar{x}$  ... Mittelwert

$n$  ... Anzahl der Messwerte

### Formel 3: Relative Standardabweichung CV

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$$

$s$  ... Standardabweichung

$\bar{x}$  ... Mittelwert

### Formel 4: Matrixeffekt ME

$$ME = \left( \frac{A_{Matrix}}{A_{Solvent}} - 1 \right) \cdot 100$$

$A_{Matrix}$  ... Peakfläche in Matrix

$A_{Solvent}$  ... Peakfläche im Lösungsmittel

**Formel 5: Wiederfindung WF**

$$WF = \left( \frac{c_{ist}}{c_{soll}} \right) \cdot 100$$

$c_{ist}$  ... Berechnete Konzentration

$c_{soll}$  ... Erwartete Konzentration

**Formel 6: Signal-Rausch-Verhältnis S/N (Peak-to-Peak)**

$$\frac{S}{N} = \frac{H_S}{H_{N,max} - H_{N,min}}$$

$H_S$  ... Höhe Analytsignal

$H_{N,max}$  ... Maximale Höhe des chemischen  
Untergrundrauschens

$H_{N,min}$  ... Minimale Höhe des chemischen  
Untergrundrauschens

**Formel 7: Signal-Rausch-Verhältnis S/N (3 sigma)**

$$\frac{S}{N} = \frac{H_S}{s_N \cdot 3}$$

$H_S$  ... Höhe Analytsignal

$s_N$  ... Standardabweichung des chemischen  
Untergrundrauschens

**Formel 8: k'-Wert**

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

$t_R$  ... Retentionszeit

mit  $t_0 = \frac{V_{gesamt}}{Fluss_{LC}}$

$t_0$  ... Totzeit

$V_{gesamt}$  ... Gesamtvolumen von Injektionsschleife,  
LC-Kapillaren, LC-Säule

$Fluss_{LC}$  ... LC Flussgeschwindigkeit

## 9.11 Ergebnisse

### 9.11.1 Test verschiedener LC-Phasen

Tab. 82: Ermittelte  $k'$ -Werte verschiedener LC-Phasen

	$k'$										
	TAA	TLA	TAL	TRZ	DFA	Ethe- phon	HEPA	Phos- phons.	Glufo- sinat	MPPA	NAG
Luna C18(2) Phenomenex	0.11	0.11	0	0.04	0.81	0.1	0		0.04	0.23	0.41
Aquasil C18 Thermo	0.71	0.79	0.09	0.5	0.44	0.63	0.03	0	0.07	0.67	0.97
Zorbax Eclipse XDB-C8 Agilent	0.11	0.11	0	0.04	0	0.25	0	0.09	0.04	0.29	0.54
Pinnacle DB Aqueous C18 Restek	0.18	0.54	0.14	0.04	0.04	0.18	0	0	0.06	0.3	0.57
Ultra Aqueous C18 - Restek	0.45 *	0.79	0.08	0.58	0.12	0.54	0.04	0	0.04	0.18	0.36
Synergi Fusion- RP Phenomenex	0.69	0.8	0.21	0.45	0.68	1.29	0.47	-	0.04	0.45	0.53
Synergi Polar- RP Phenomenex	0.62	0.63	0.14	0.33	0.16	-	-	-	0.03	0.19	0.33
Luna NH2 Phenomenex	> 15	10.38	0.13	0.13	13	> 15	12	>15	NA	NA	NA
Luna SCX Phenomenex	1.9	3.56	> 15	> 15	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Hypercarb	k.E.	k.E.	1.96	0.73	4.1	5.96	1.37	4.25	0.43	1.32	1.63
ZIC-pHILIC Merck	3.99	4.04 *	4.41	2.85	2.93	-	-	3.69	6.57	6.56	5.87

- \* ... schlechte Peakbreite
- k.E. ... keine Elution von Säule
- ... kein Peak
- NA ... nicht getestet

### 9.11.1.1 Triazol-Metaboliten

#### 9.11.1.1.1 Aquasil C18

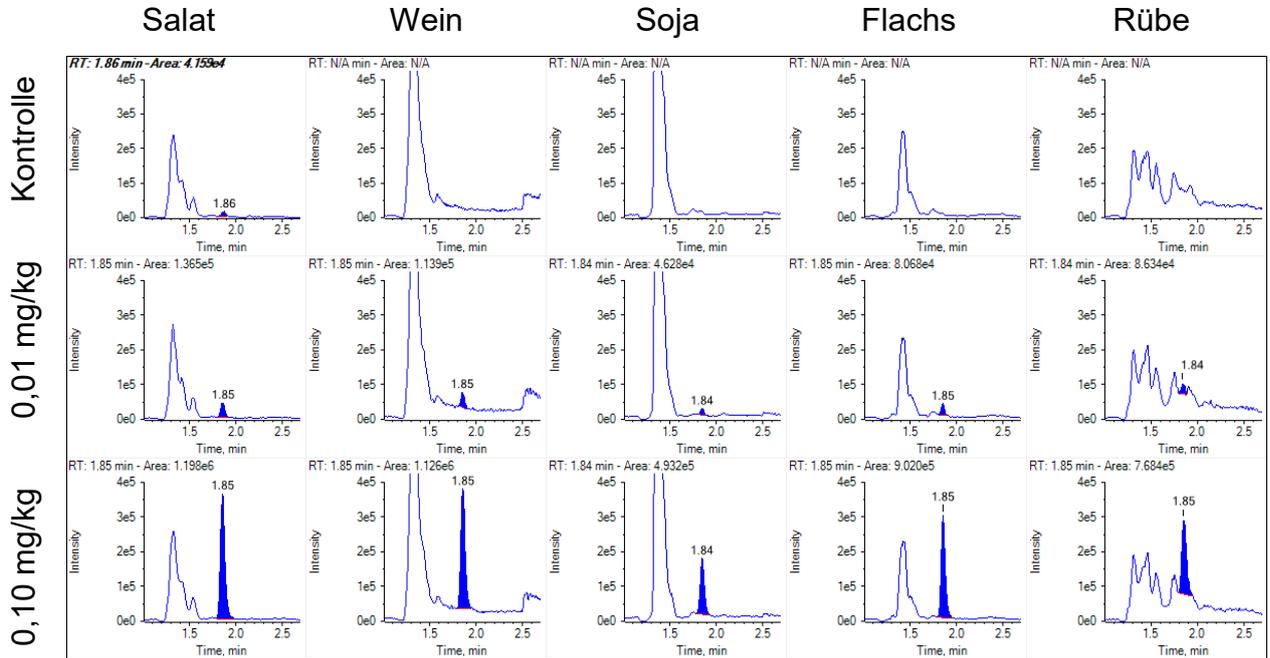


Abb. 71: Aquasil C18 - TAA in verschiedenen pflanzlichen Matrices

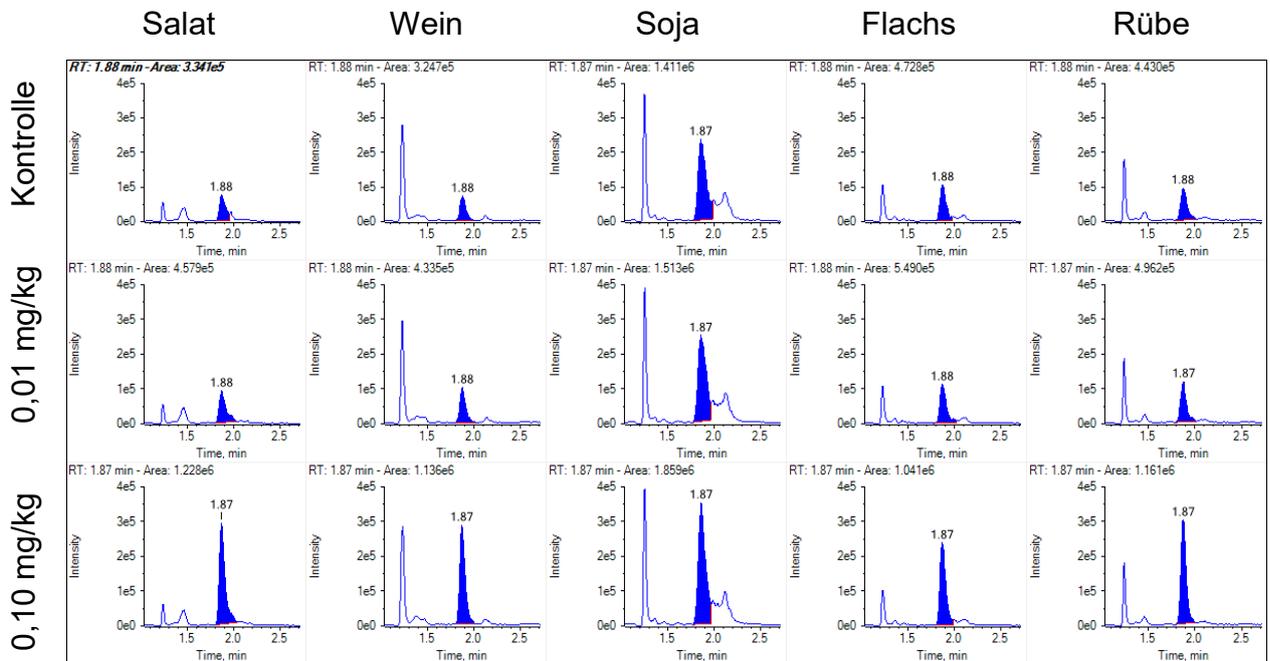


Abb. 72: Aquasil C18 - TLA in verschiedenen pflanzlichen Matrices

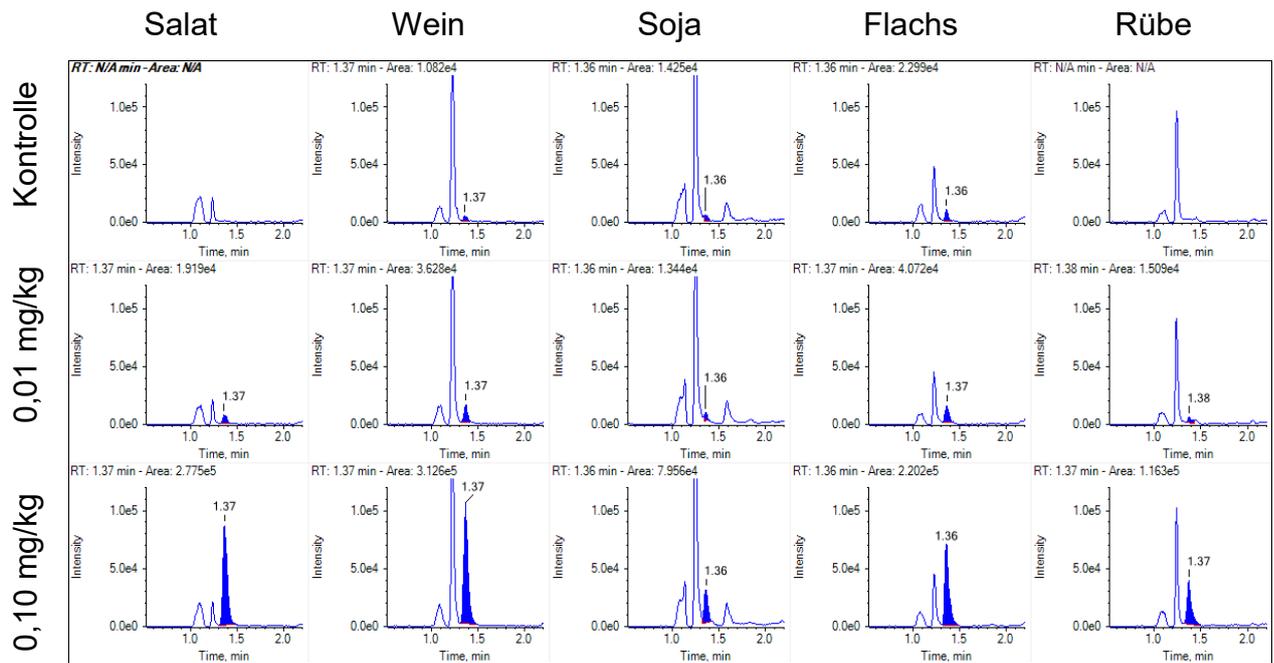


Abb. 73: Asaqualin C18 - TAL in verschiedenen pflanzlichen Matrices

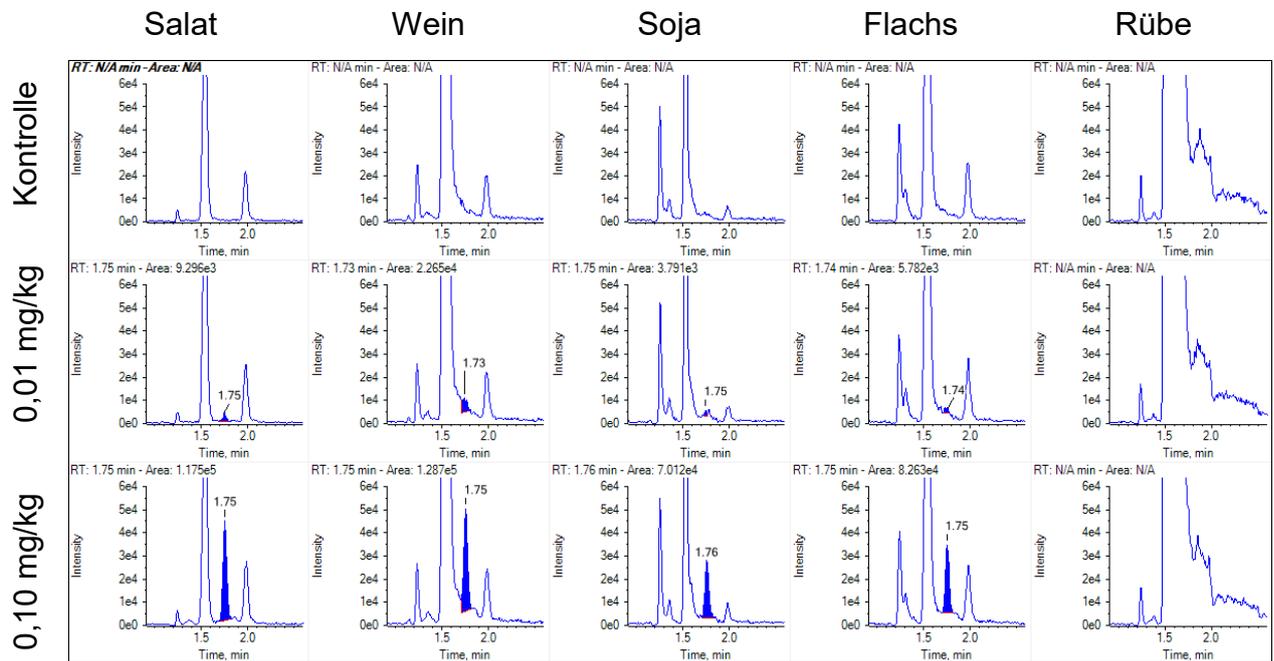


Abb. 74: Asaqualin C18 - TRZ in verschiedenen pflanzlichen Matrices

### 9.11.1.1.2 Hypercarb

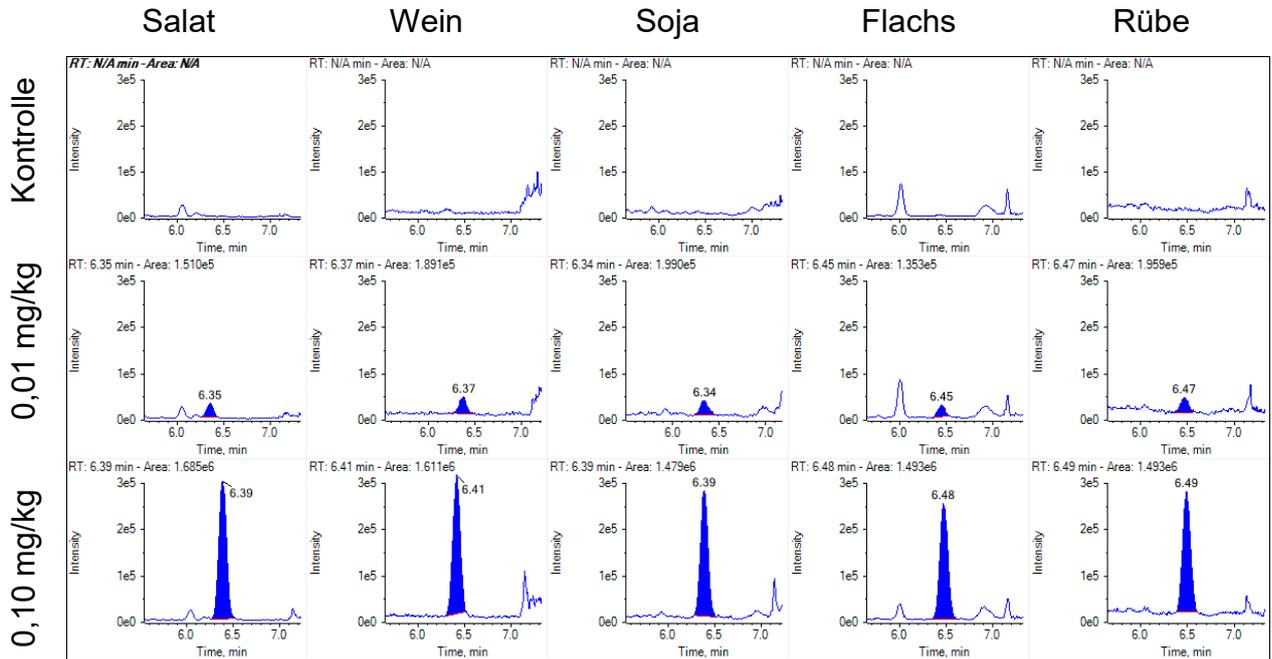


Abb. 75: Hypercarb - TAA in verschiedenen pflanzlichen Matrices

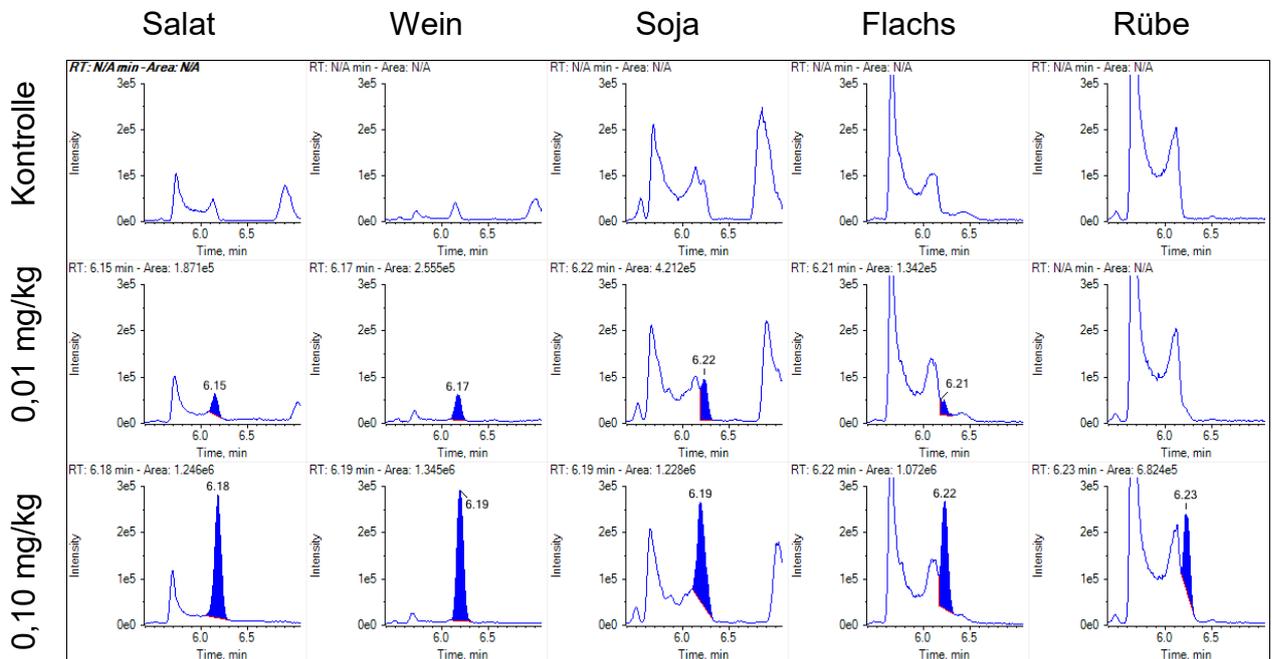


Abb. 76: Hypercarb - TLA in verschiedenen pflanzlichen Matrices

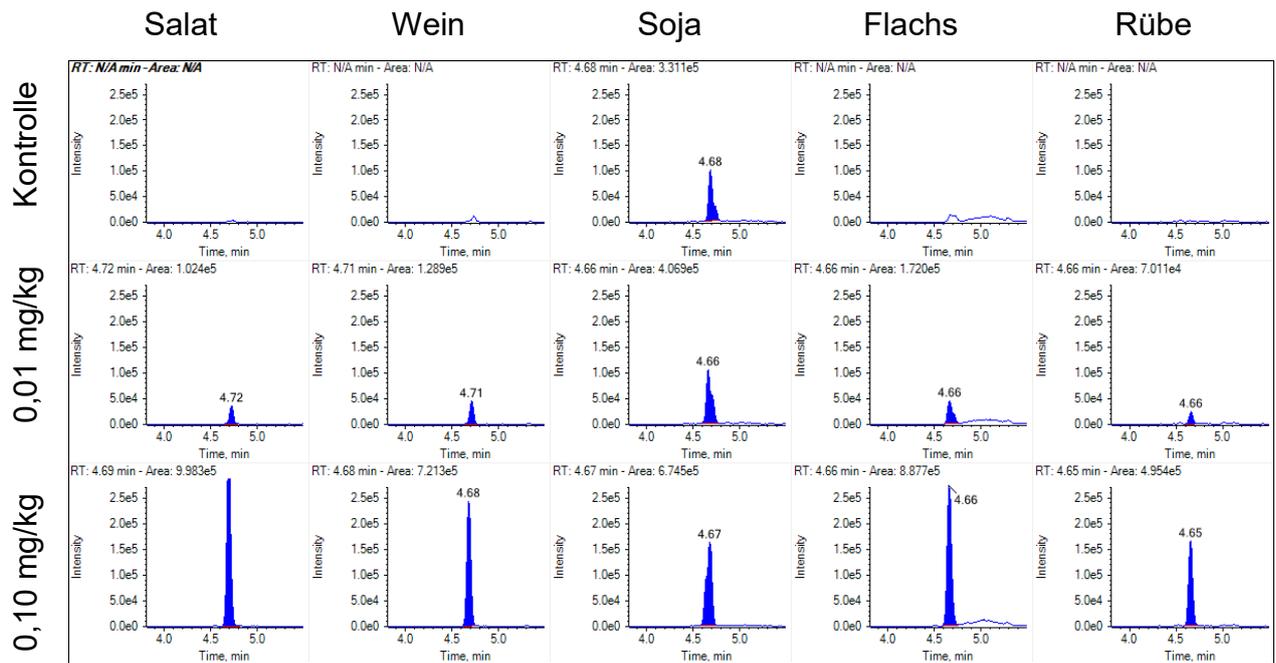


Abb. 77: Hypercarb - TAL in verschiedenen pflanzlichen Matrices

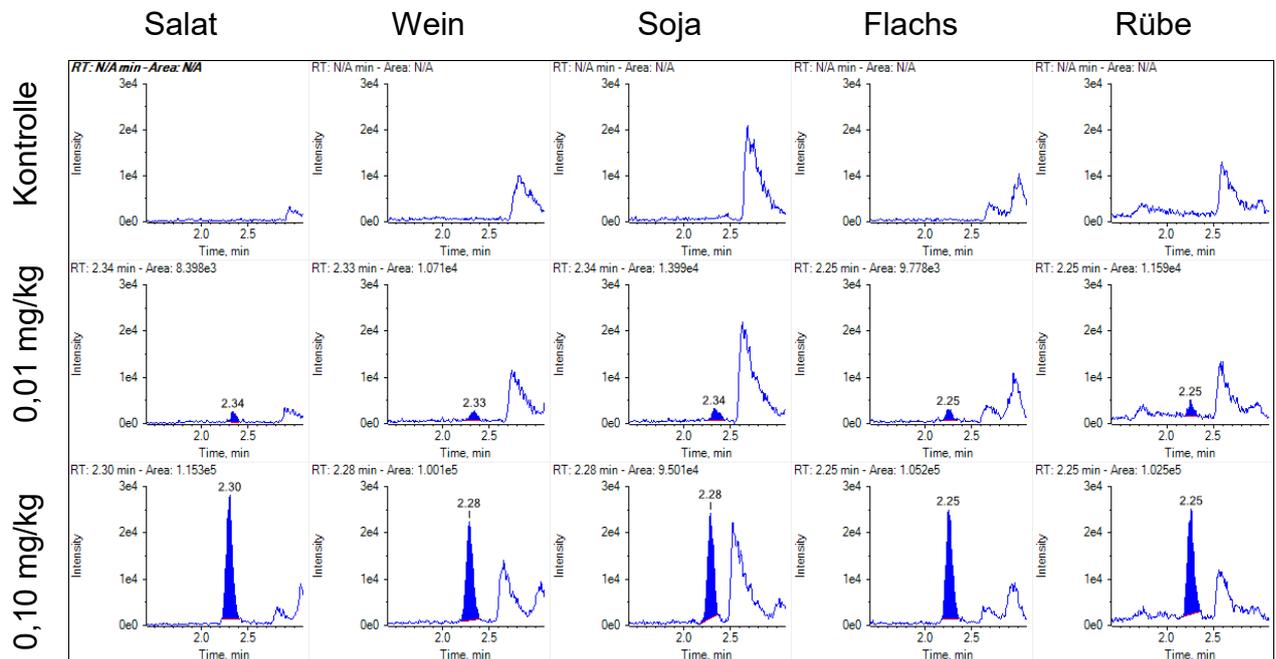


Abb. 78: Hypercarb - TRZ in verschiedenen pflanzlichen Matrices

9.11.1.1.3Luna SCX

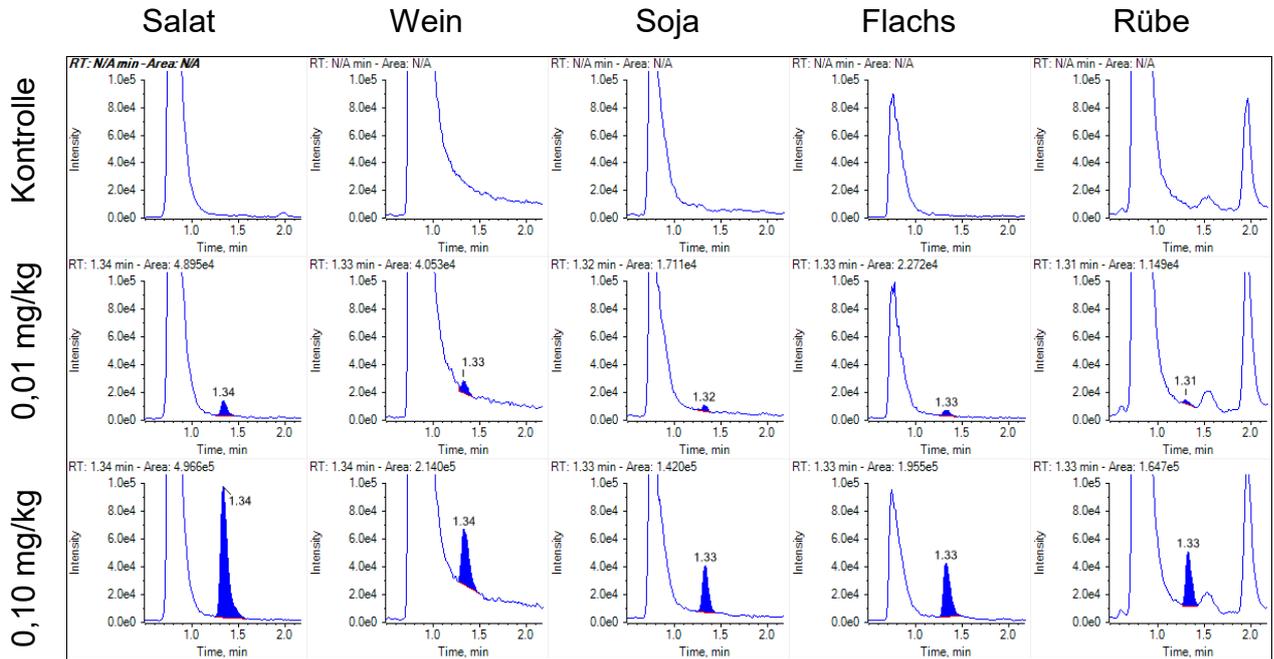


Abb. 79: Luna SCX - TAA in verschiedenen pflanzlichen Matrices

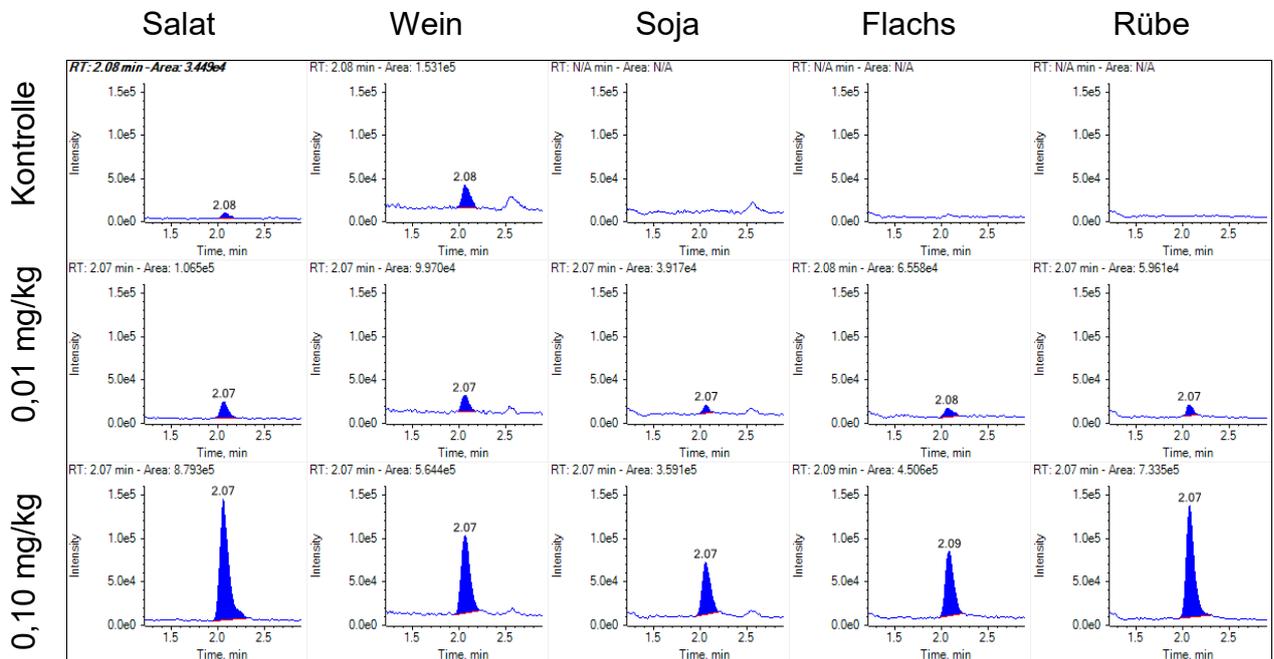


Abb. 80: Luna SCX - TLA in verschiedenen pflanzlichen Matrices

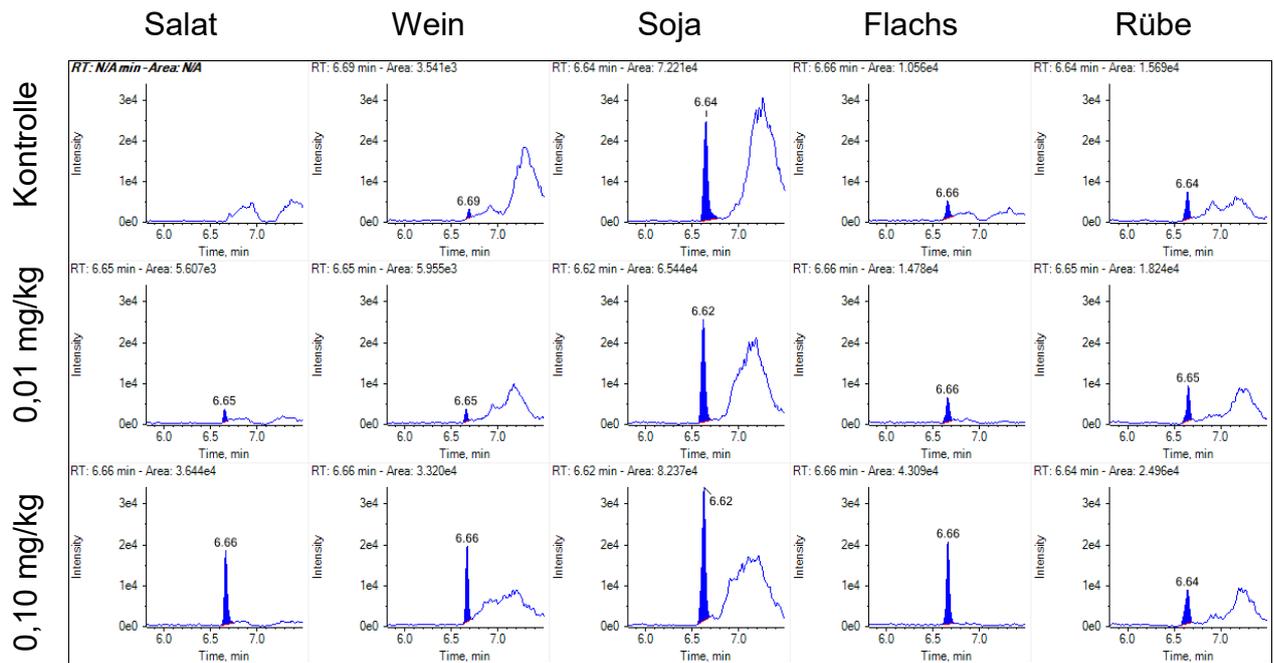


Abb. 81: Luna SCX - TAL in verschiedenen pflanzlichen Matrices

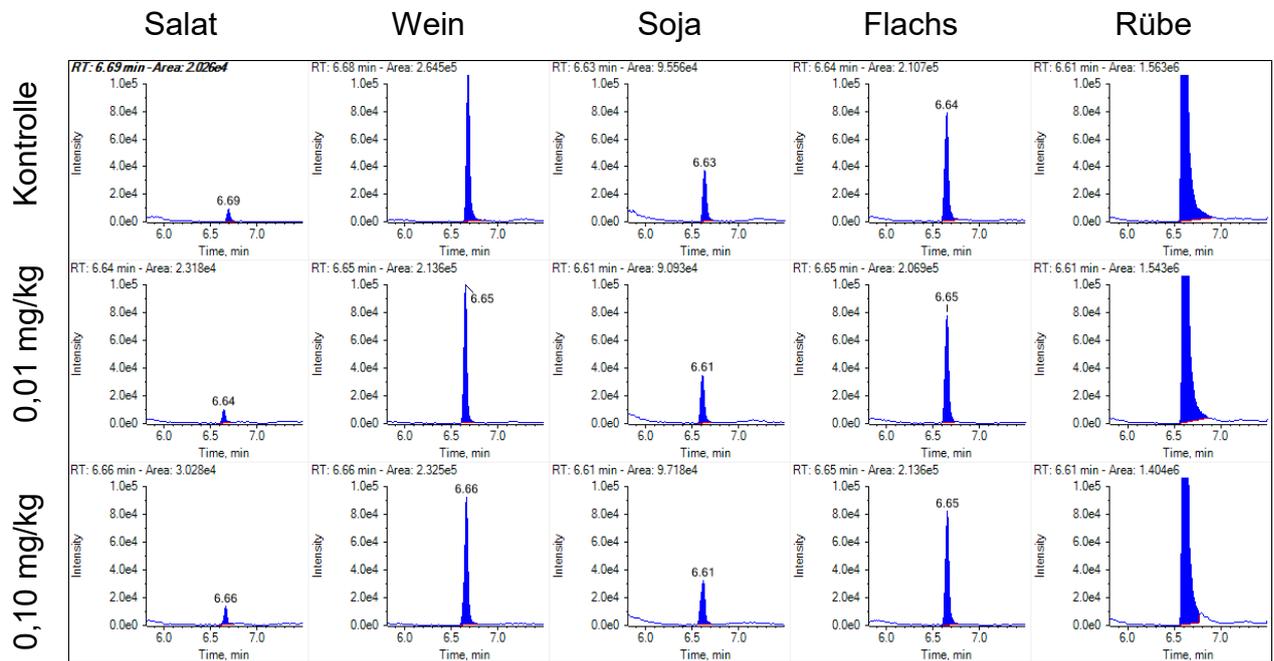


Abb. 82: Luna SCX - TRZ in verschiedenen pflanzlichen Matrices

### 9.11.1.1.4ZIC-pHILIC

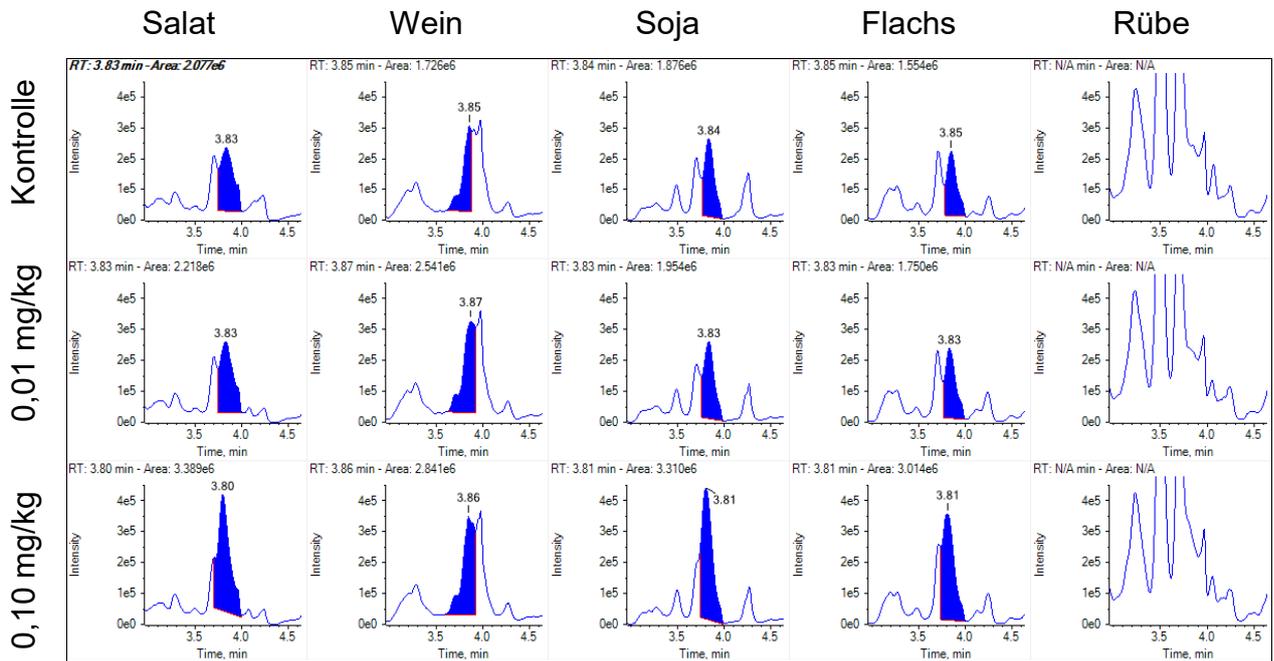


Abb. 83: ZIC-pHILIC - TAA in verschiedenen pflanzlichen Matrices

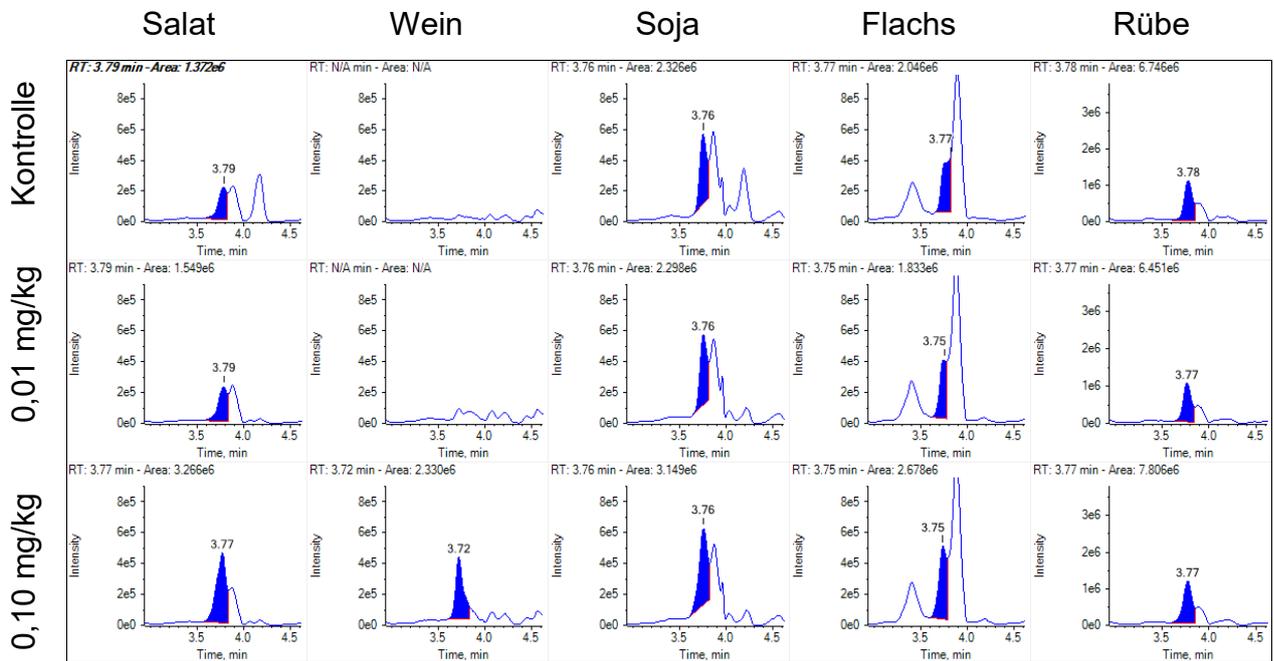


Abb. 84: ZIC-pHILIC - TLA in verschiedenen pflanzlichen Matrices

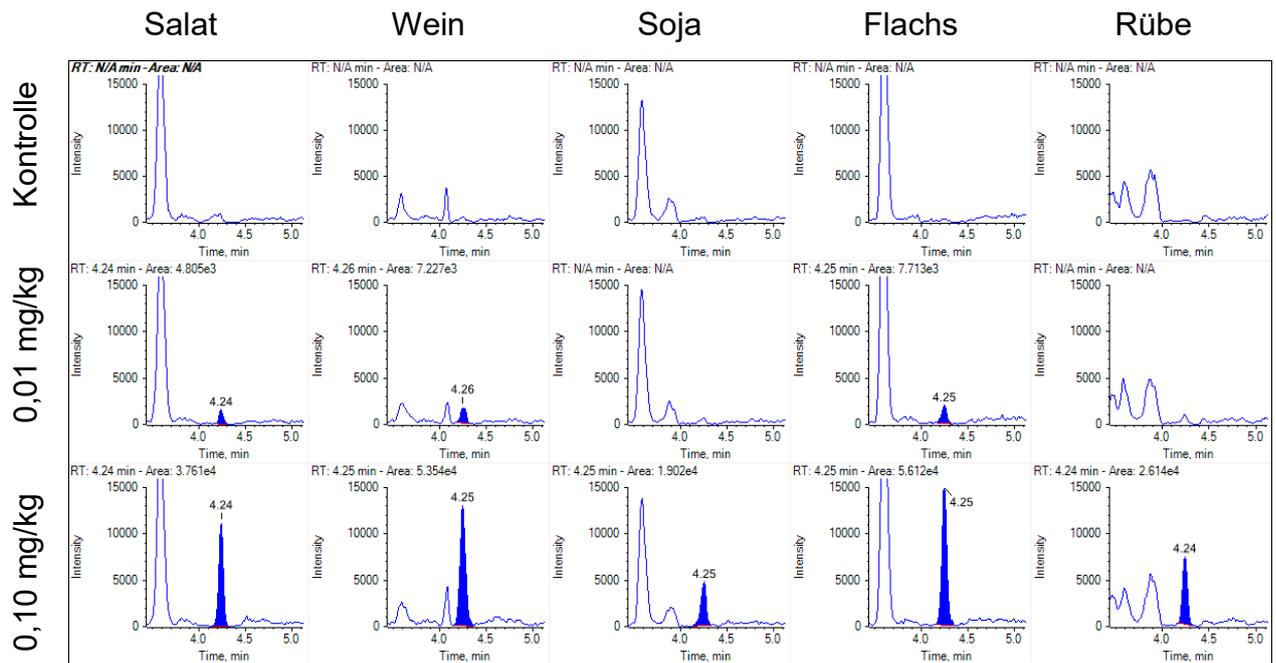


Abb. 85: ZIC-pHILIC - TAL in verschiedenen pflanzlichen Matrices

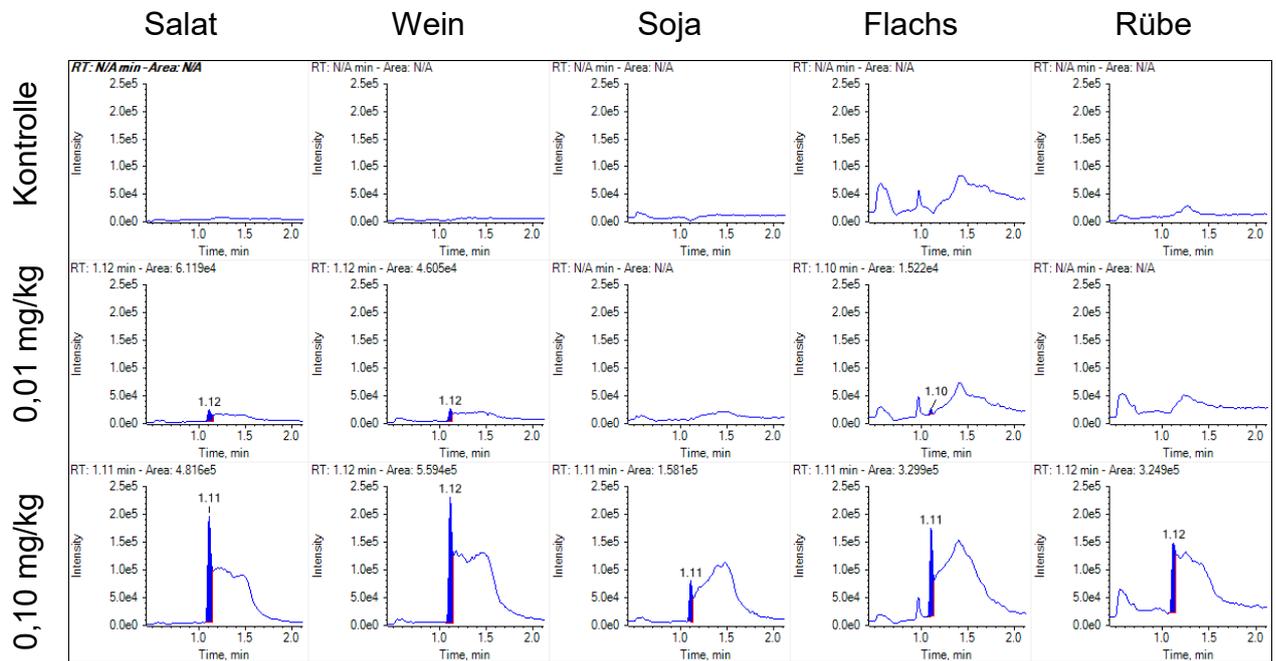


Abb. 86: ZIC-pHILIC - TRZ in verschiedenen pflanzlichen Matrices

## 9.11.1.2 Difluoressigsäure

### 9.11.1.2.1ZIC-pHILIC

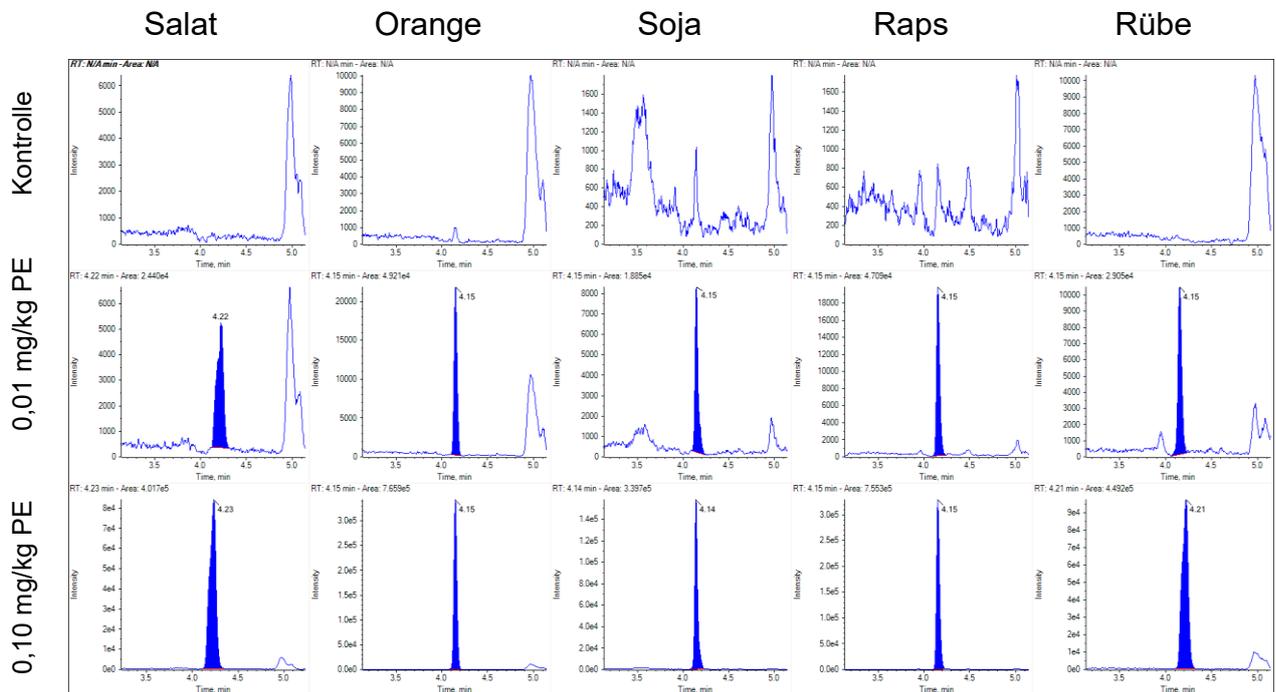


Abb. 87: ZIC-pHILIC - DFA in verschiedenen pflanzlichen Matrices

### 9.11.1.2.2Hypercarb

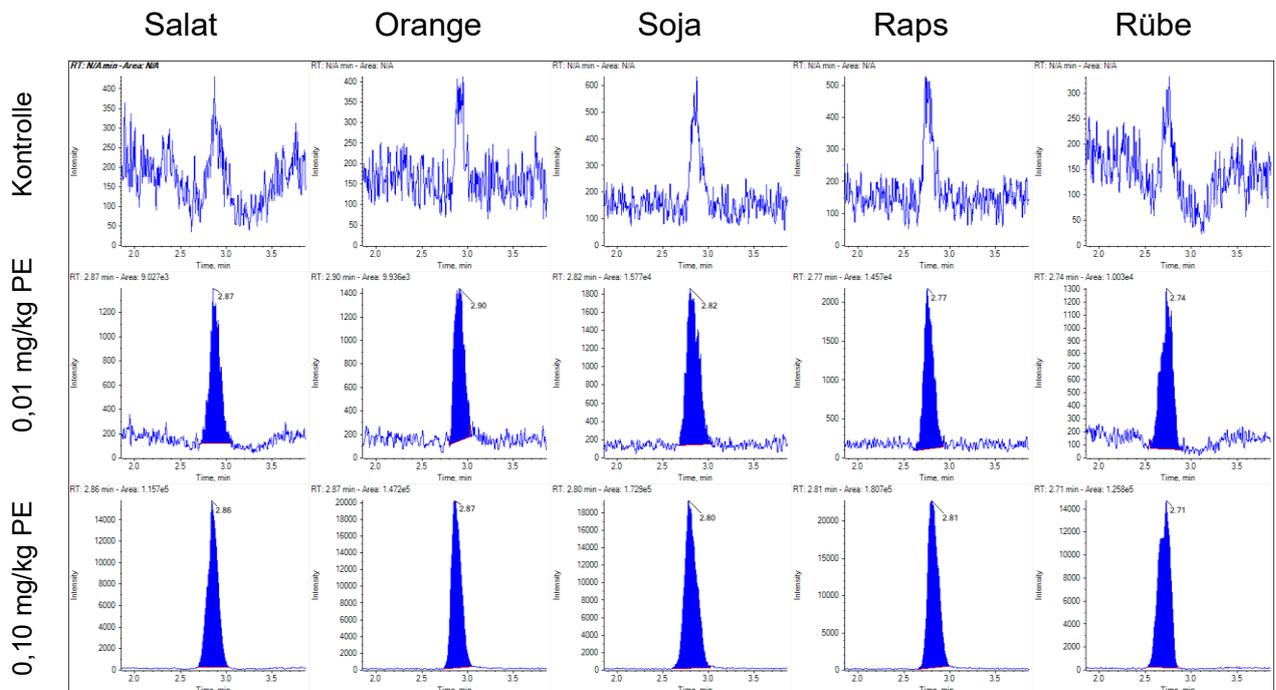


Abb. 88: Hypercarb - DFA in verschiedenen pflanzlichen Matrices

### 9.11.1.3 Ethephon und HEPA

#### 9.11.1.3.1 Hypercarb

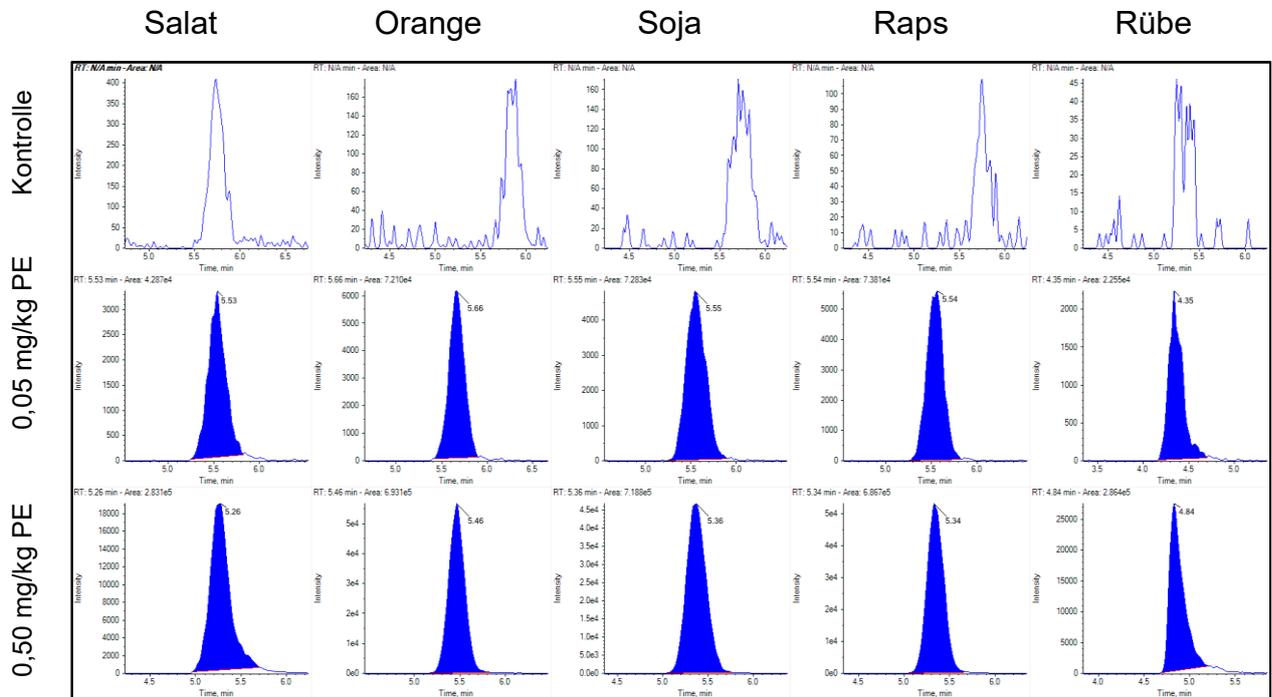


Abb. 89: Hypercarb - Ethephon (143>107) in verschiedenen pflanzlichen Matrices

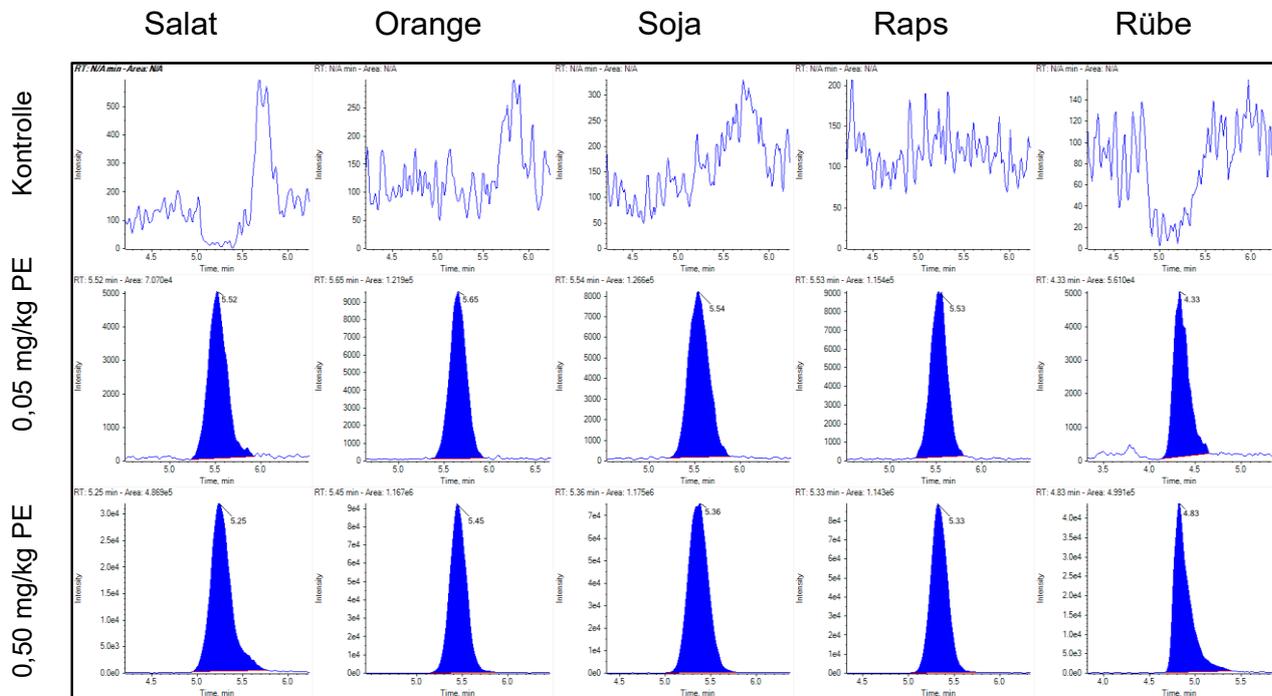


Abb. 90: Hypercarb - Ethephon (107>79) in verschiedenen pflanzlichen Matrices

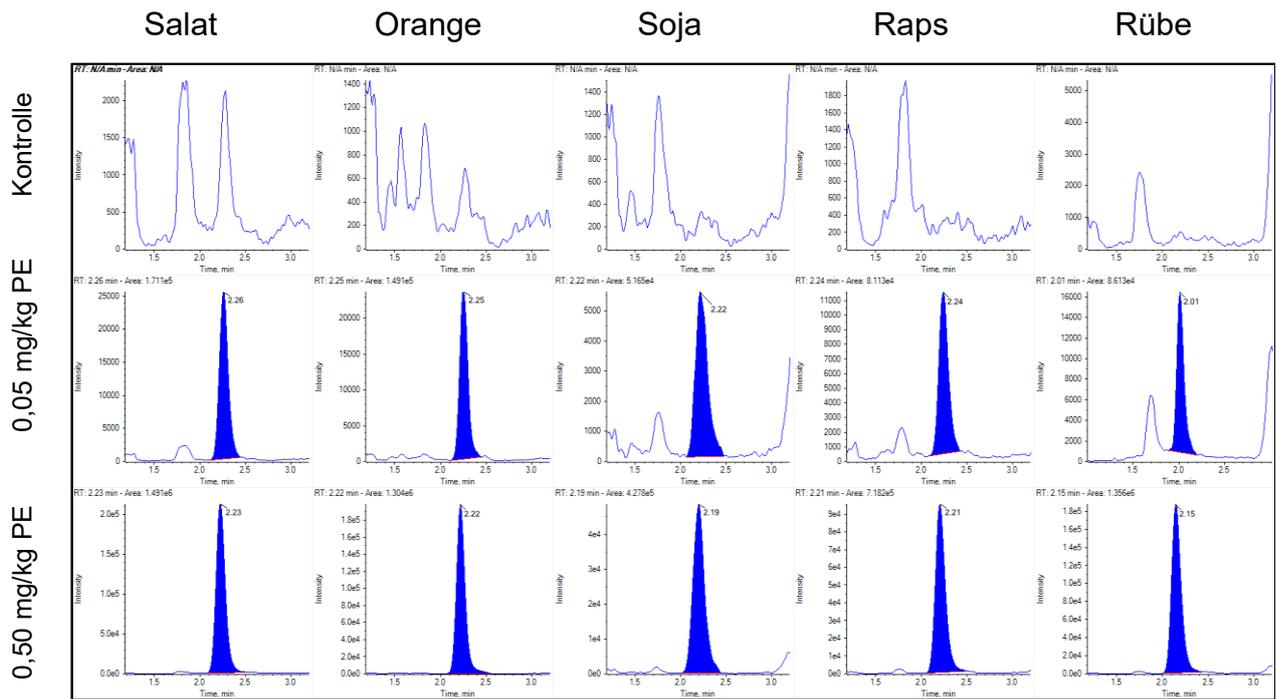


Abb. 91: Hypercarb - HEPA (125>79) in verschiedenen pflanzlichen Matrices

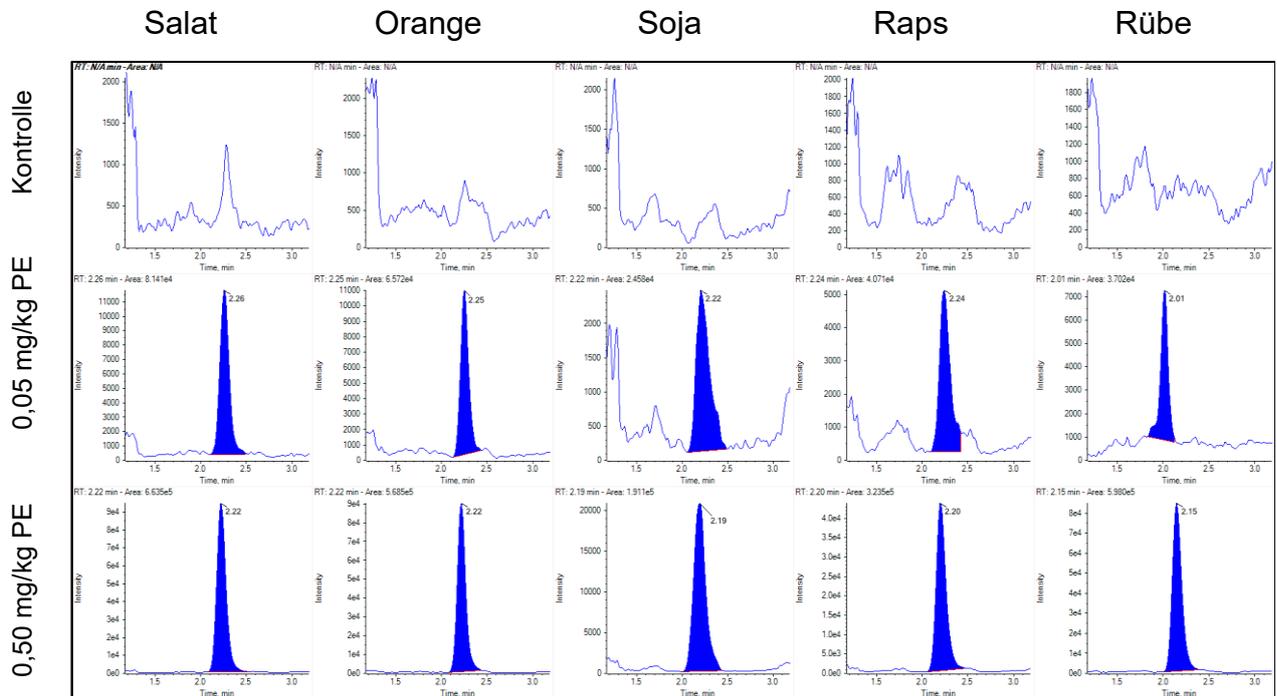


Abb. 92: Hypercarb - HEPA (125>95) in verschiedenen pflanzlichen Matrices

9.11.1.3.2 Luna NH<sub>2</sub>

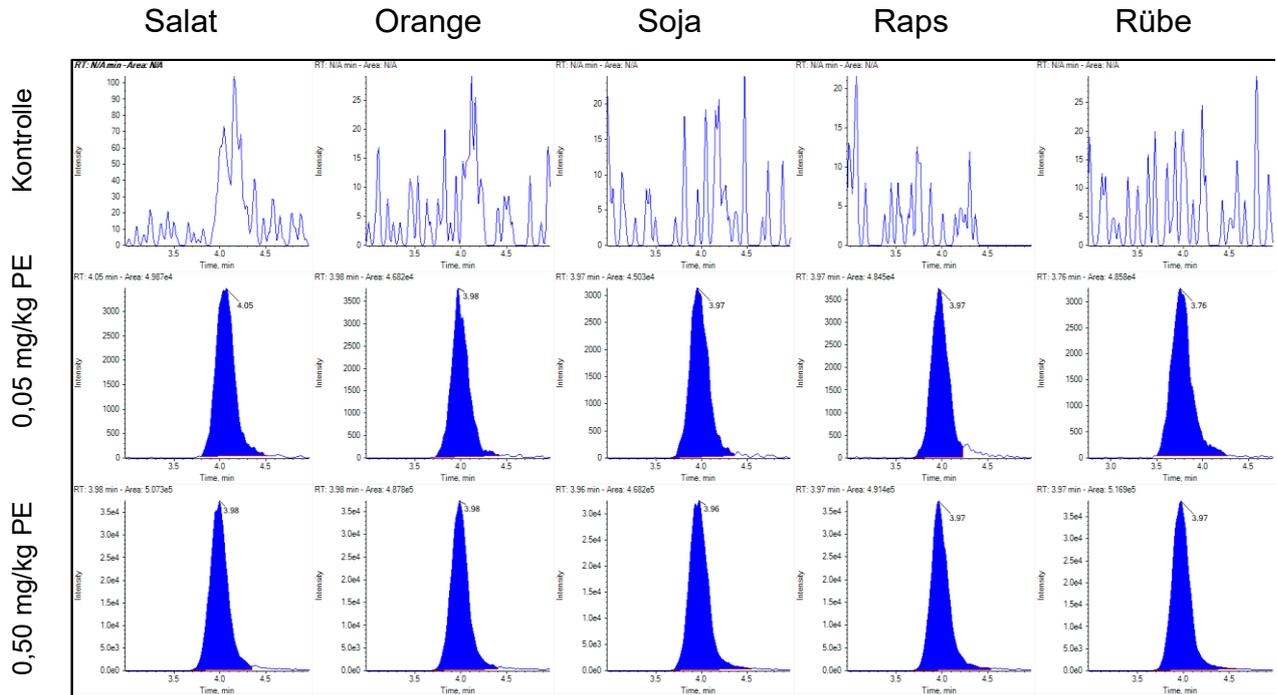


Abb. 93: Luna NH<sub>2</sub> - Ethephon (143>107) in verschiedenen pflanzlichen Matrices

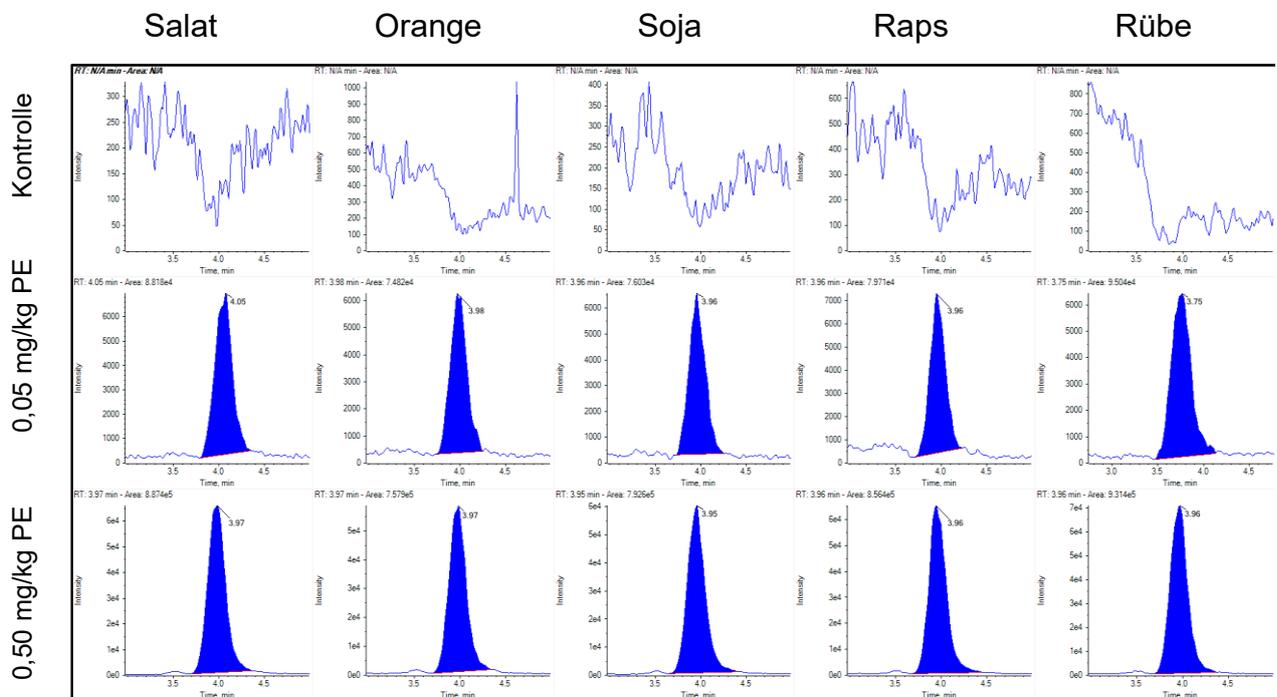


Abb. 94: Luna NH<sub>2</sub> - Ethephon (107>79) in verschiedenen pflanzlichen Matrices

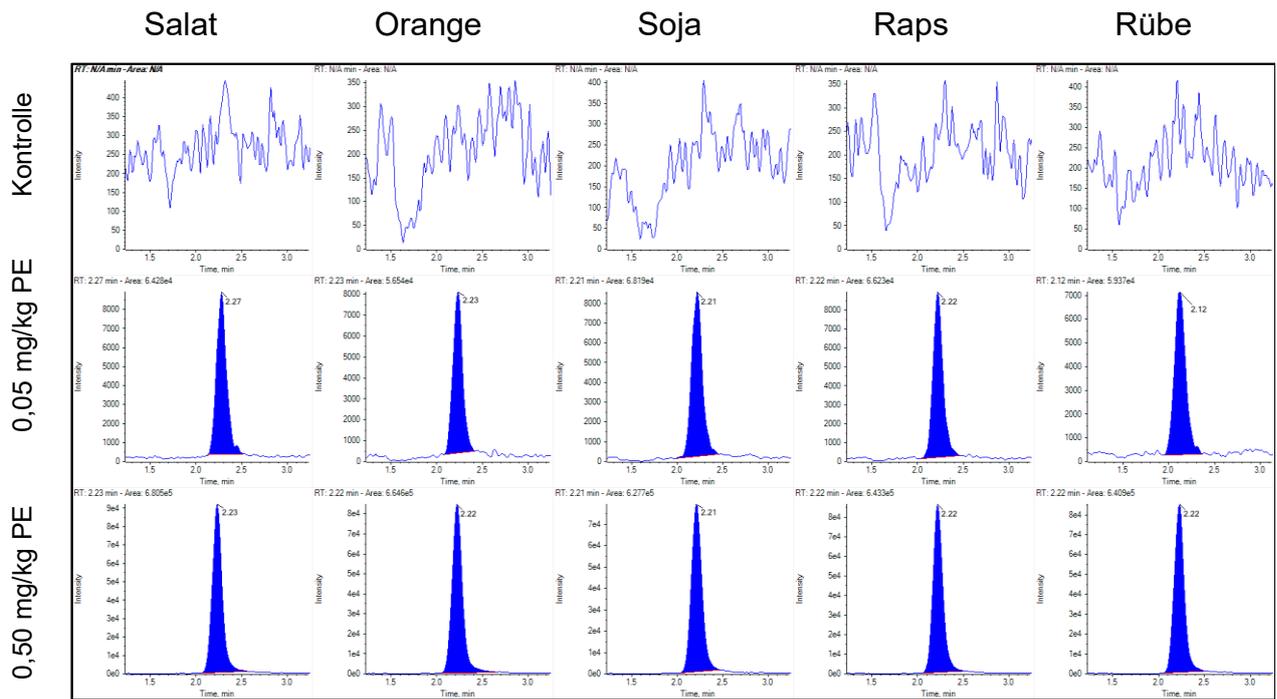


Abb. 95: Luna NH<sub>2</sub> - HEPA (125>79) in verschiedenen pflanzlichen Matrices

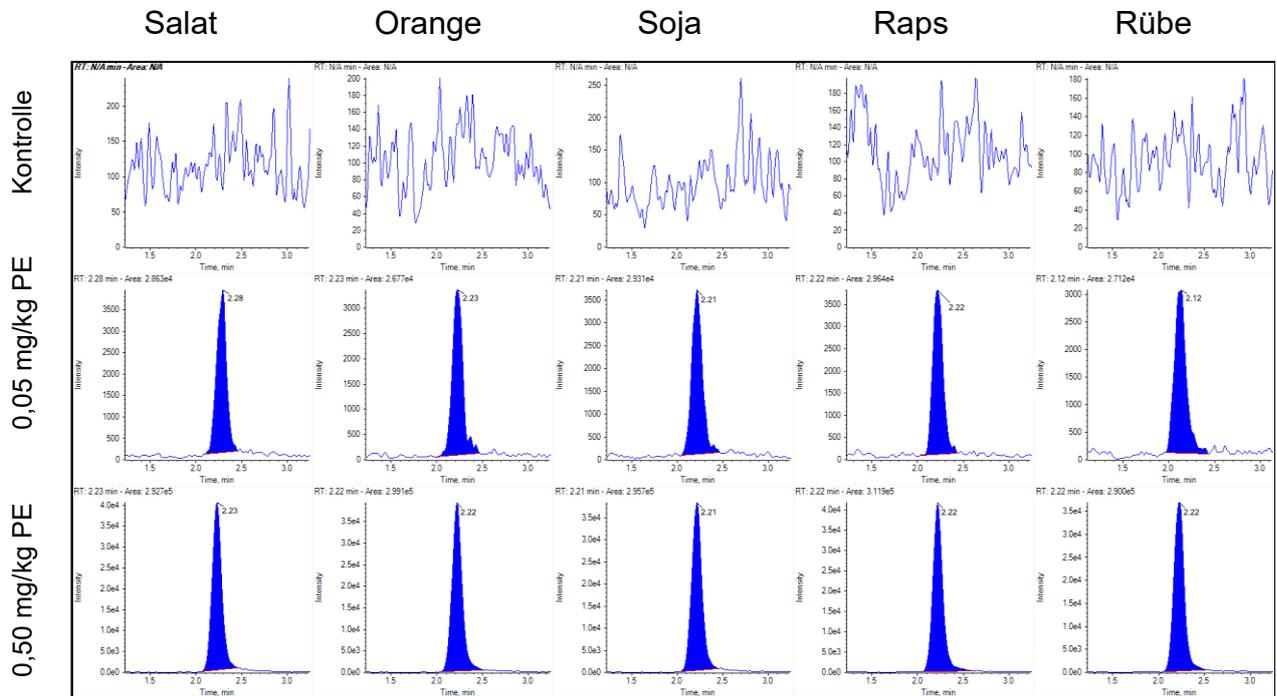


Abb. 96: Luna NH<sub>2</sub> - HEPA (125>95) in verschiedenen pflanzlichen Matrices

### 9.11.1.4 Phosphonsäure

#### 9.11.1.4.1 Hypercarb

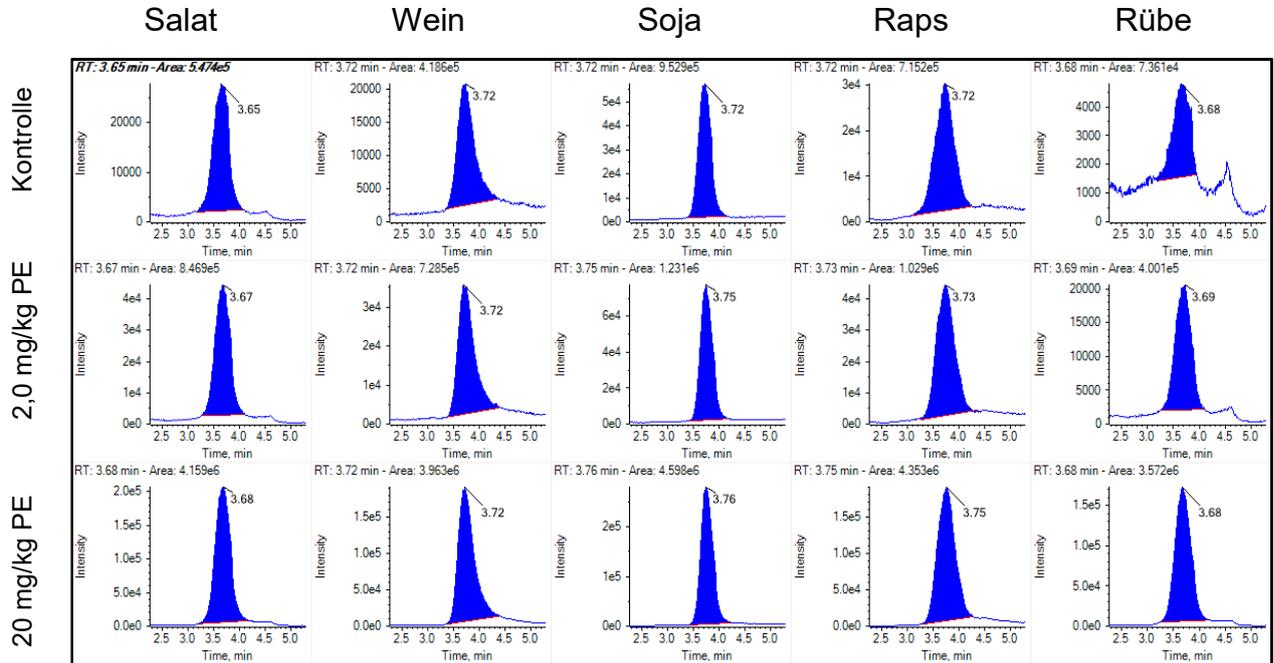


Abb. 97: Hypercarb - PA (81>79) in verschiedenen pflanzlichen Matrices

### 9.11.1.5 Glufosinat und dessen Metaboliten

#### 9.11.1.5.1 Hypercarb

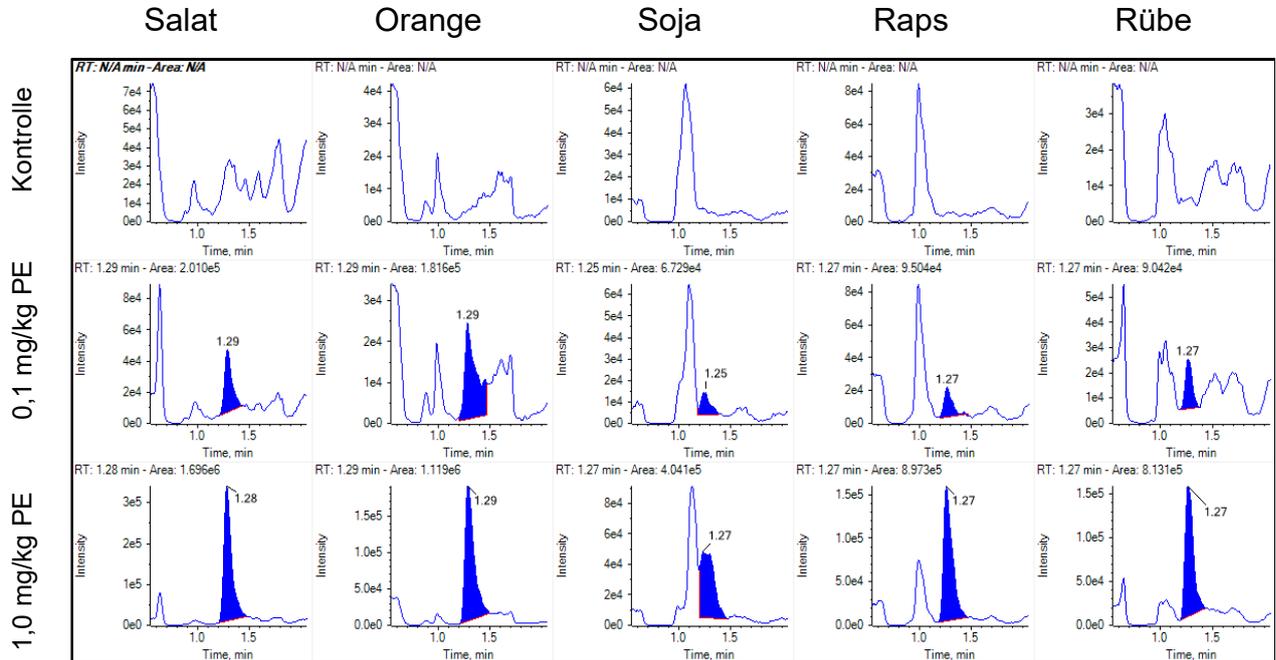


Abb. 98: Hypercarb - Glufosinat (182>56) in verschiedenen pflanzlichen Matrices

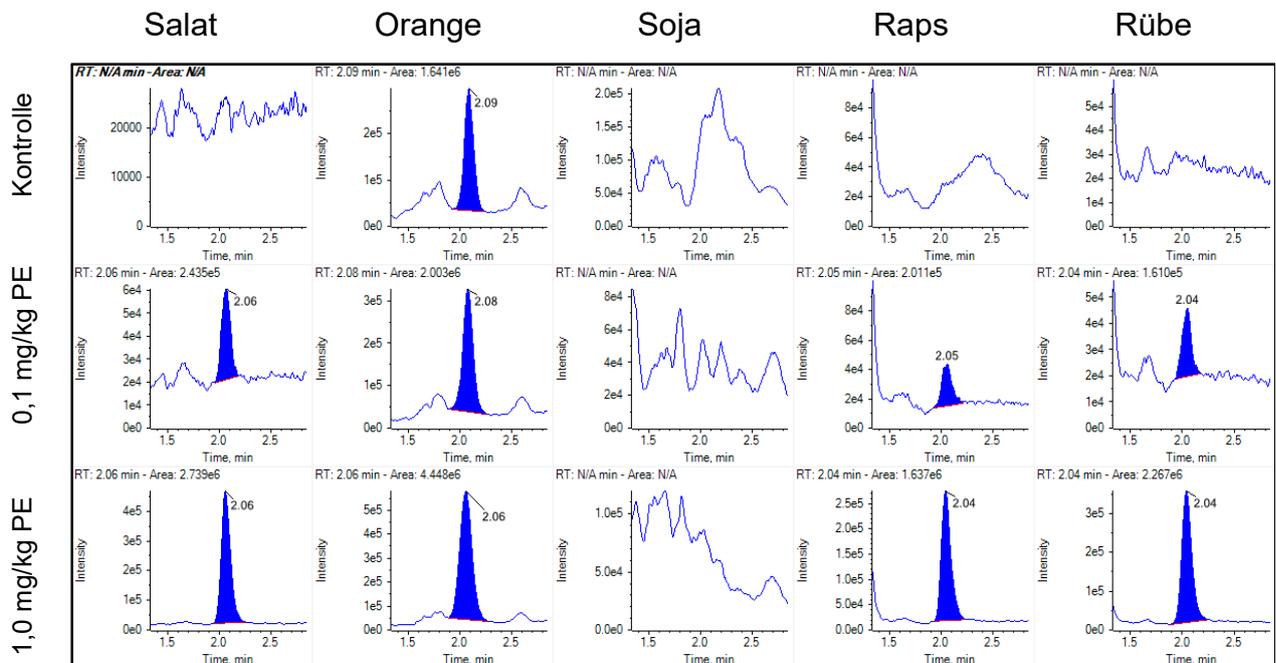


Abb. 99: Hypercarb - MPPA (153>135) in verschiedenen pflanzlichen Matrices

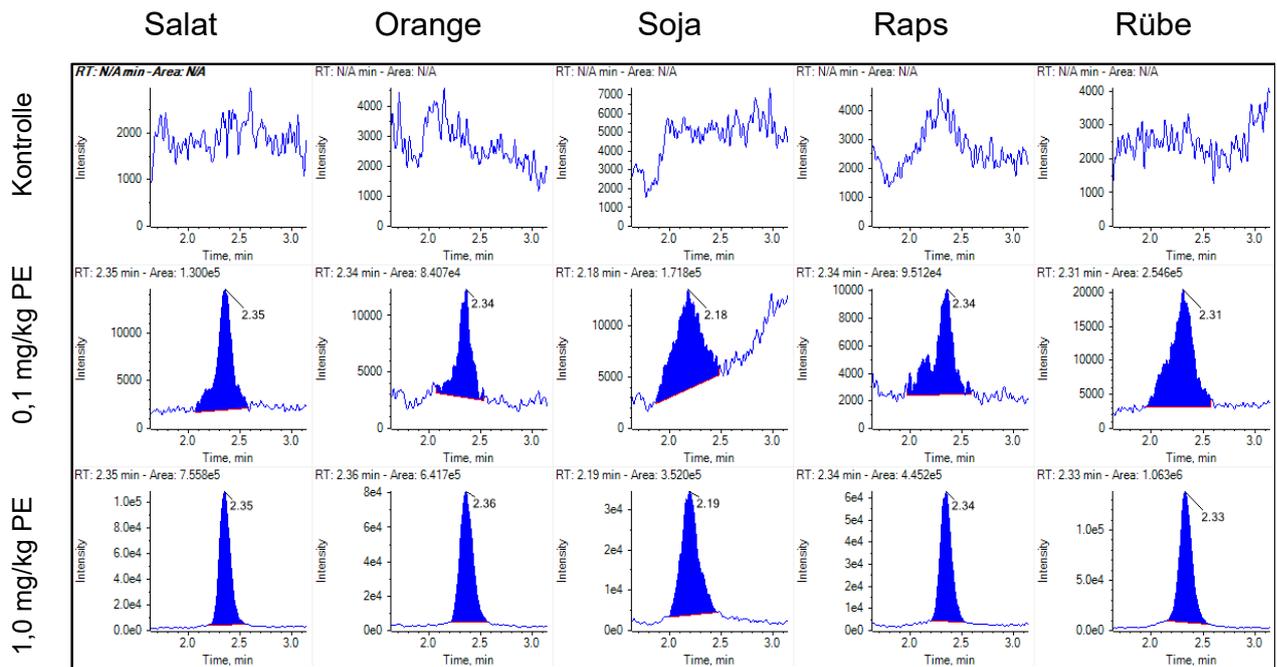


Abb. 100: Hypercarb - NAG (224>136) in verschiedenen pflanzlichen Matrices

### 9.11.1.5.ZIC-pHILIC

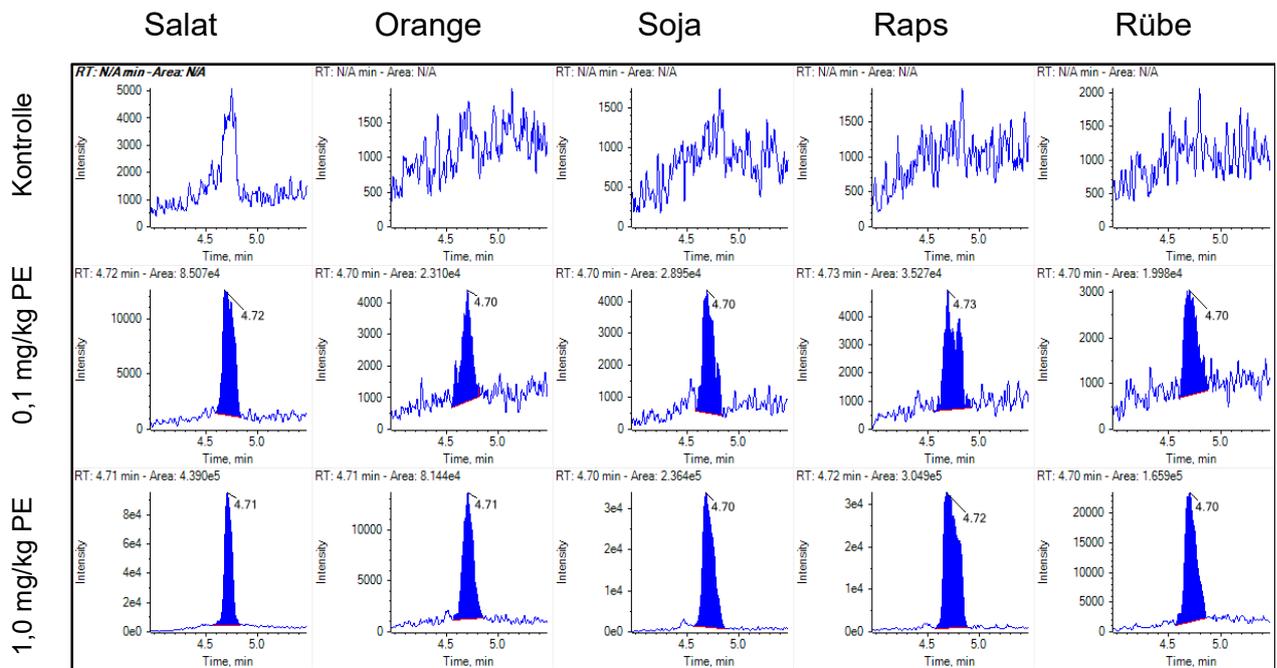


Abb. 101: ZIC-pHILIC - Glufosinat (182>56) in verschiedenen pflanzlichen Matrices

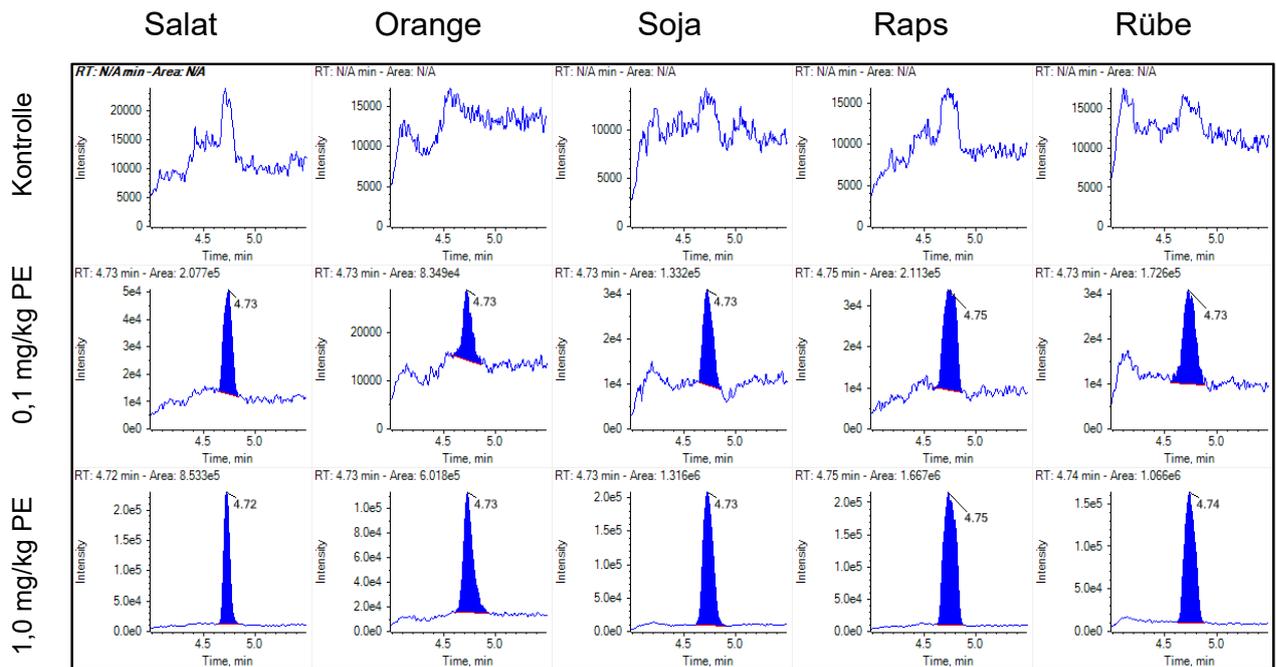


Abb. 102: ZIC-pHILIC - MPPA (153>135) in verschiedenen pflanzlichen Matrices

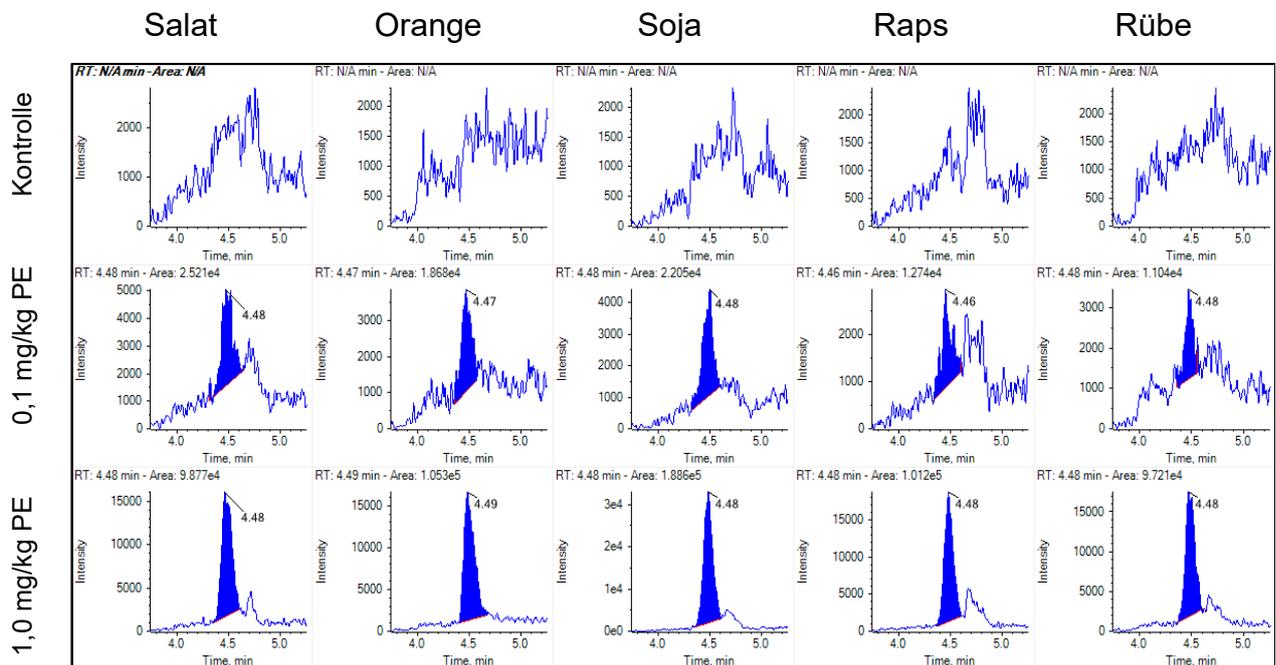


Abb. 103: ZIC-pHILIC - NAG (224>136) in verschiedenen pflanzlichen Matrices

## 9.11.2 Validierung LC-DMS-MS/MS für TDMs

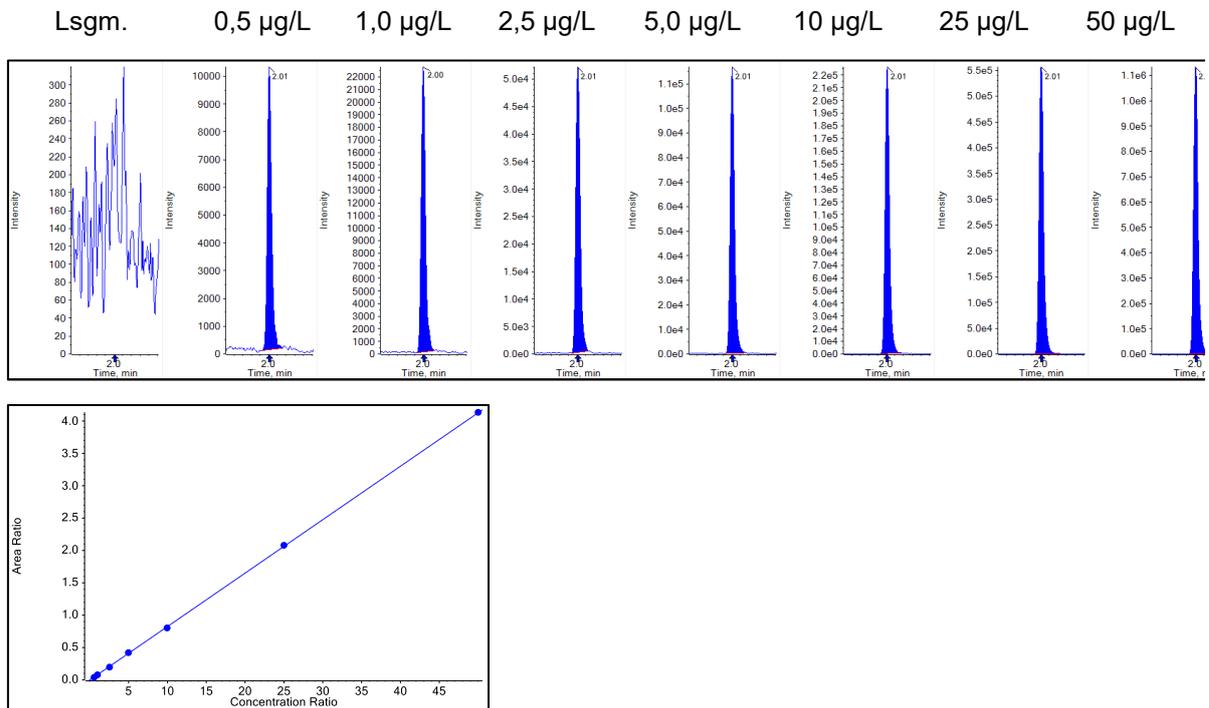


Abb. 104: Lösungsmittelstandards und Kalibrierreihe für TAA

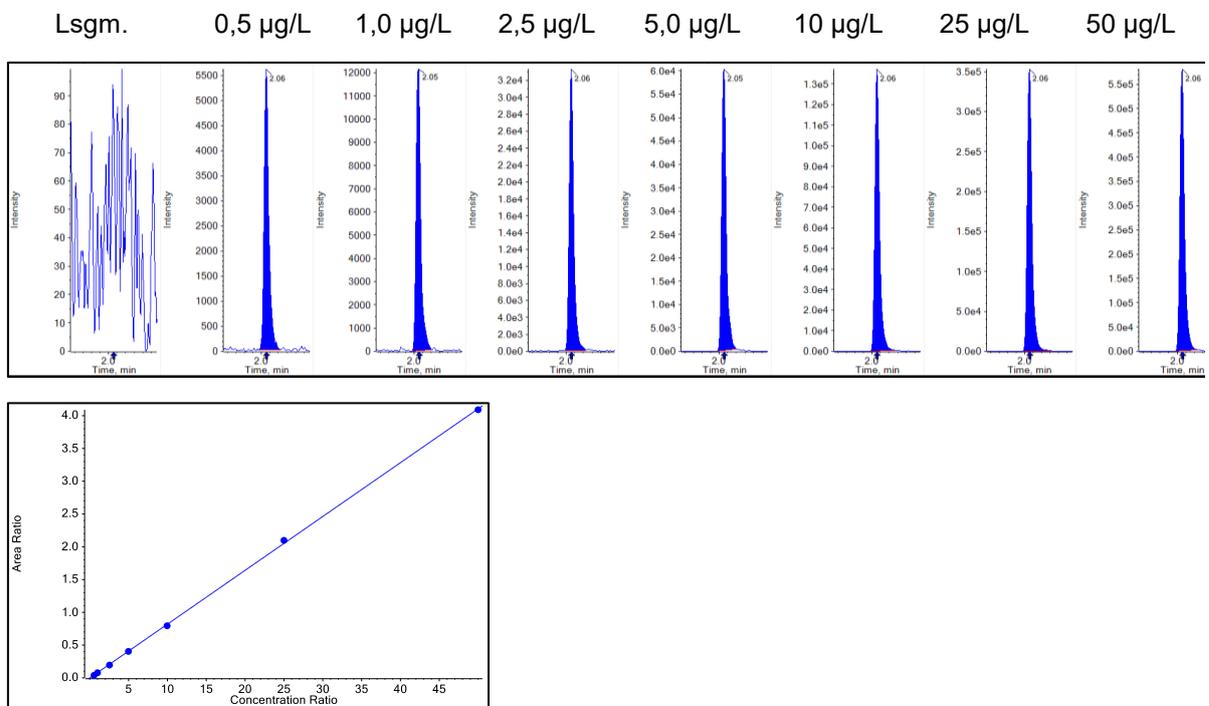
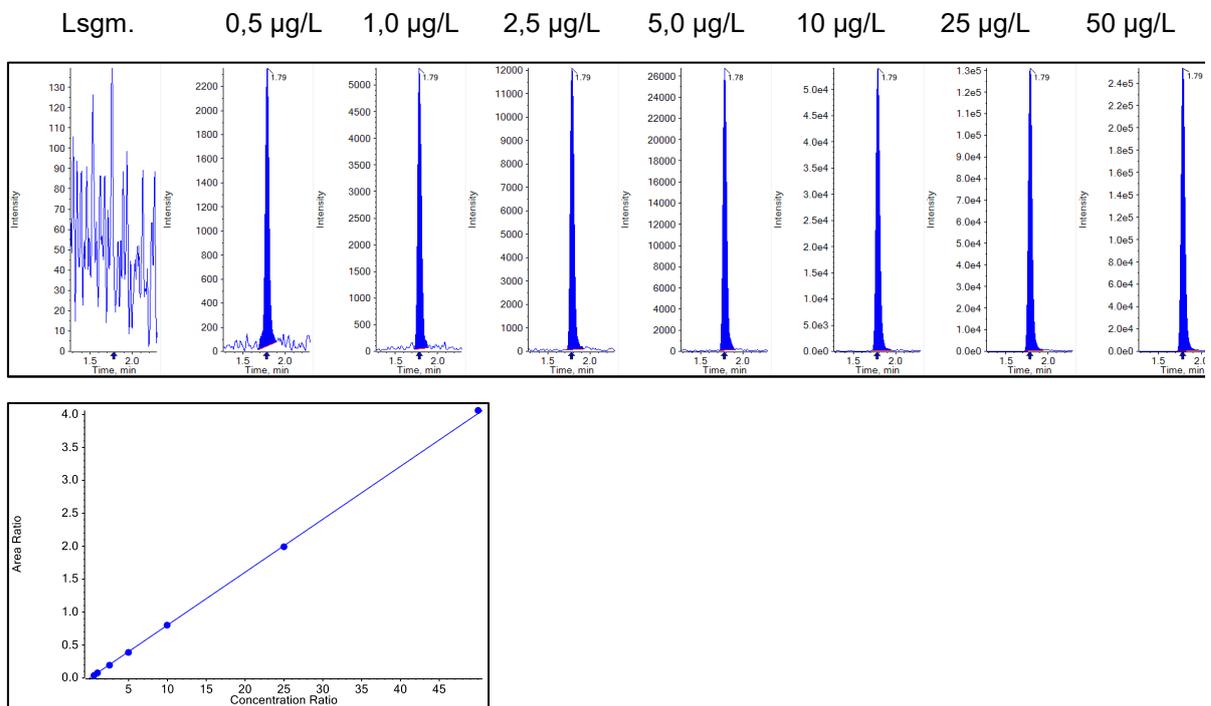
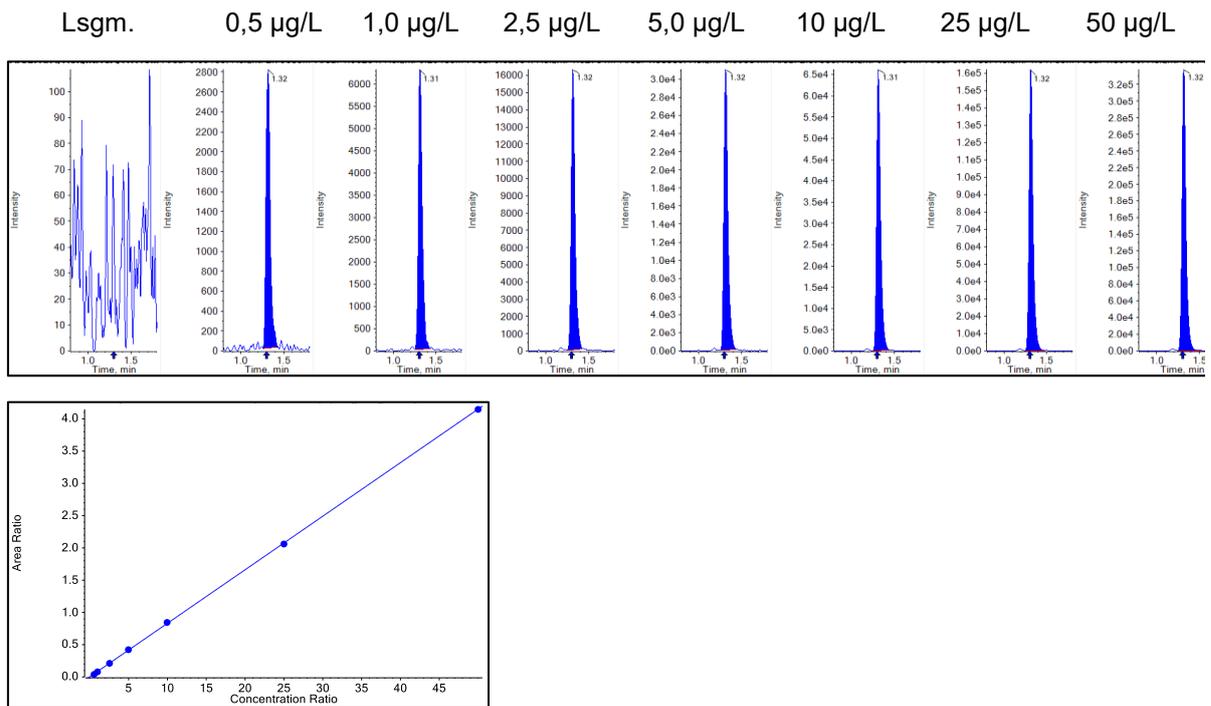


Abb. 105: Lösungsmittelstandards und Kalibrierreihe für TLA



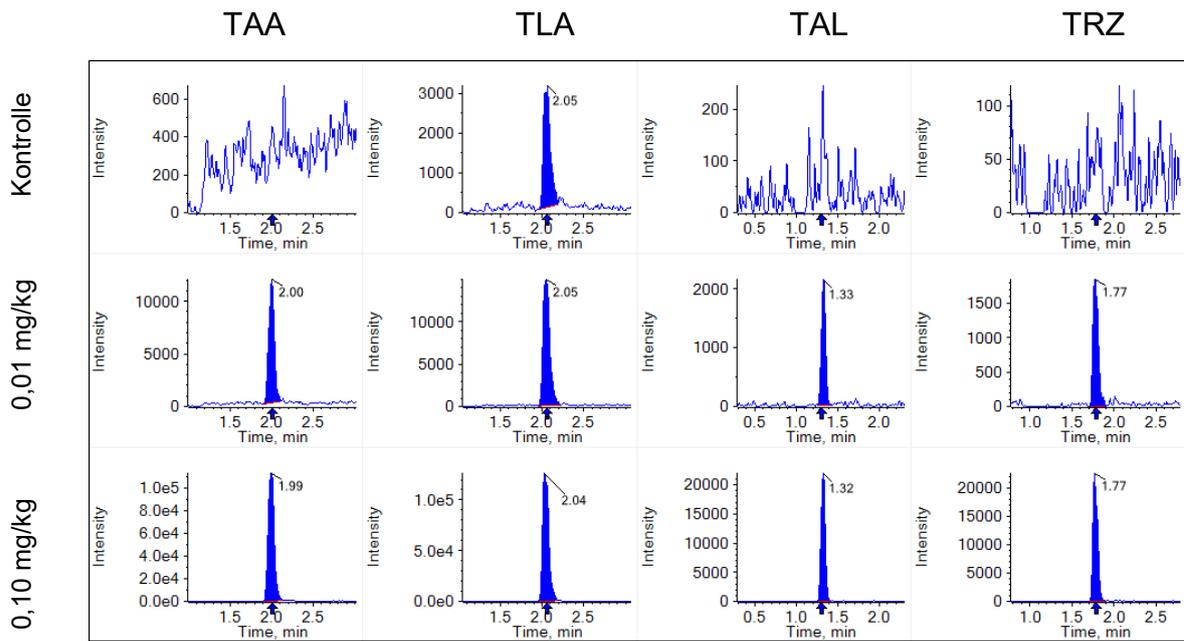


Abb. 108: Validierung LC-DMS-MS/MS für TDMs in Salat

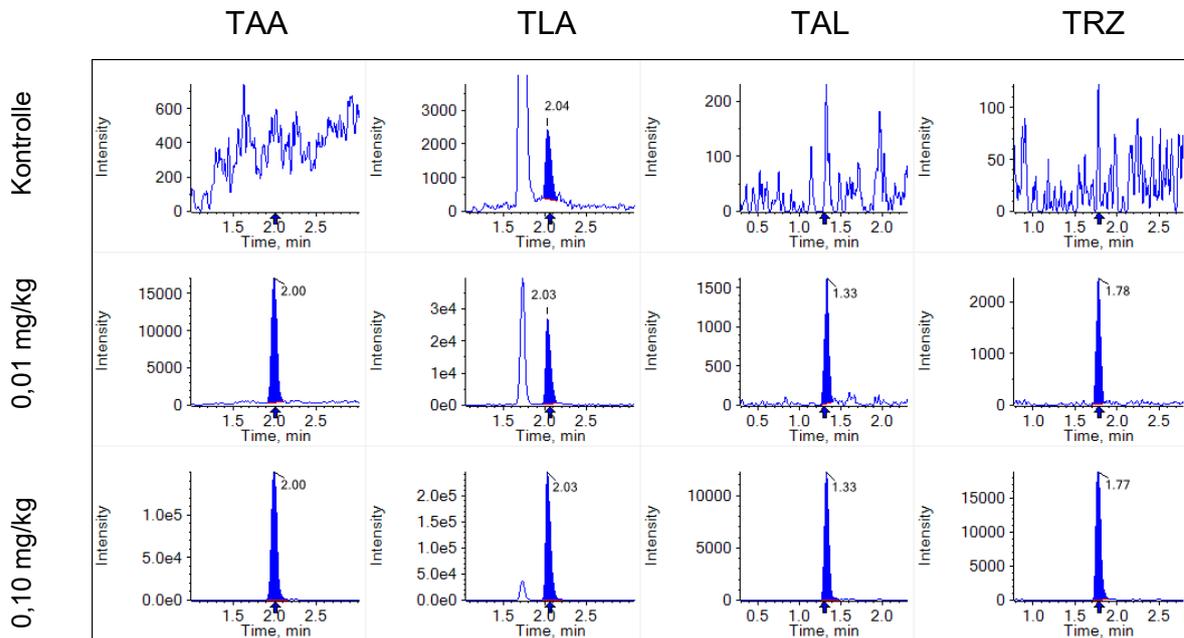


Abb. 109: Validierung LC-DMS-MS/MS für TDMs in Tomate

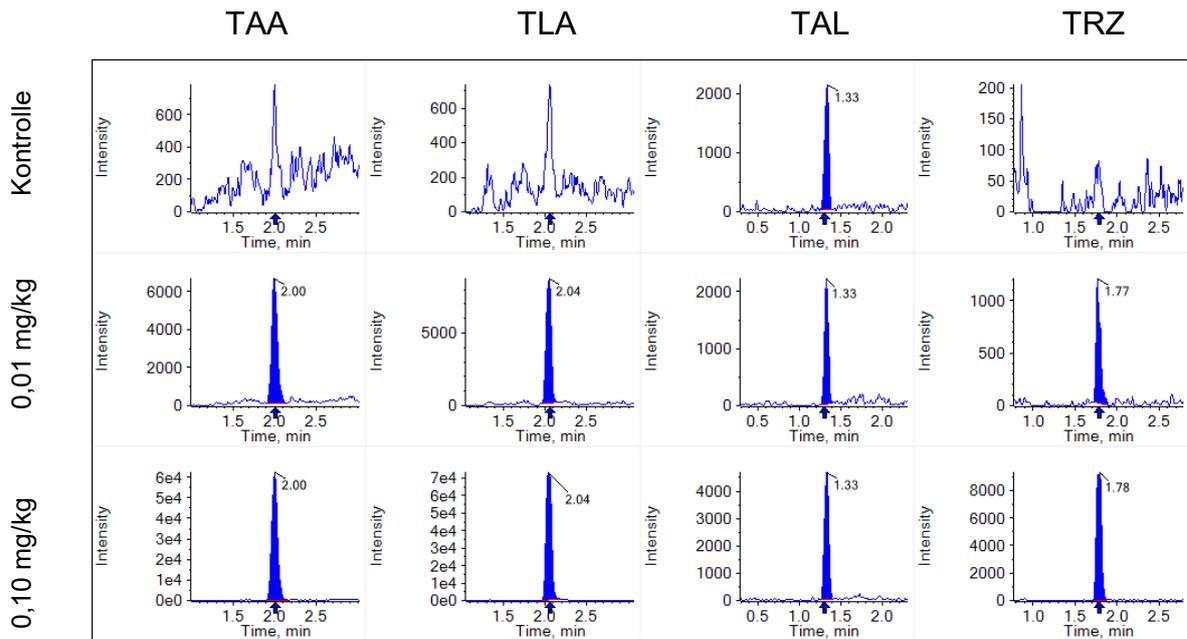


Abb. 110: Validierung LC-DMS-MS/MS für TDMs in Brokkoli

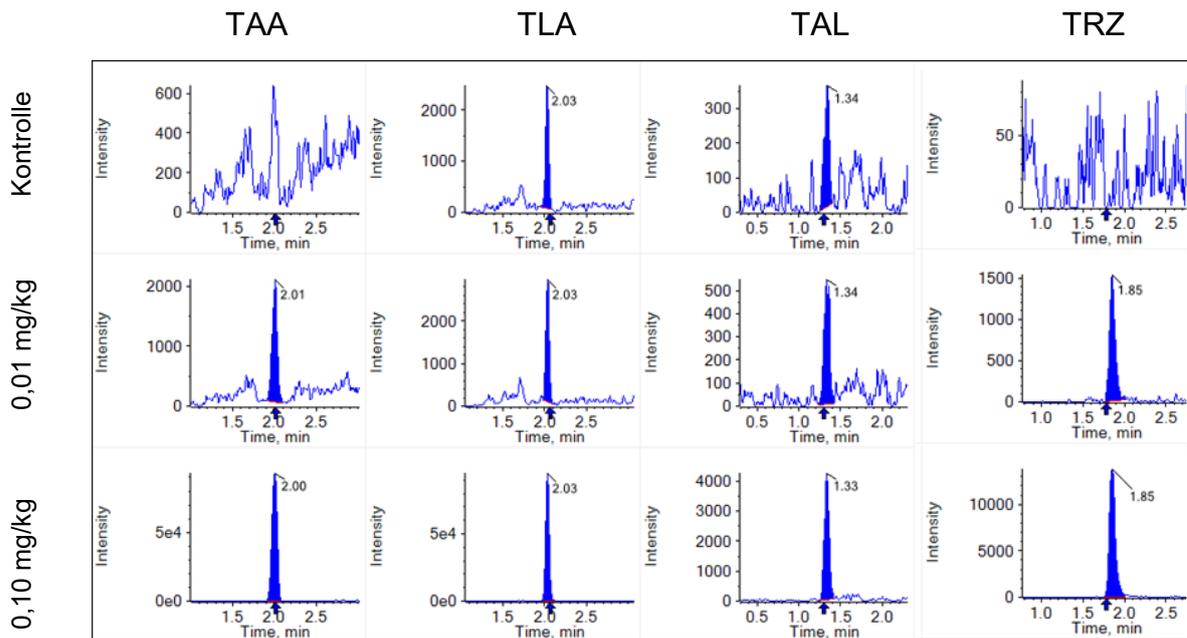


Abb. 111: Validierung LC-DMS-MS/MS für TDMs in Bohne

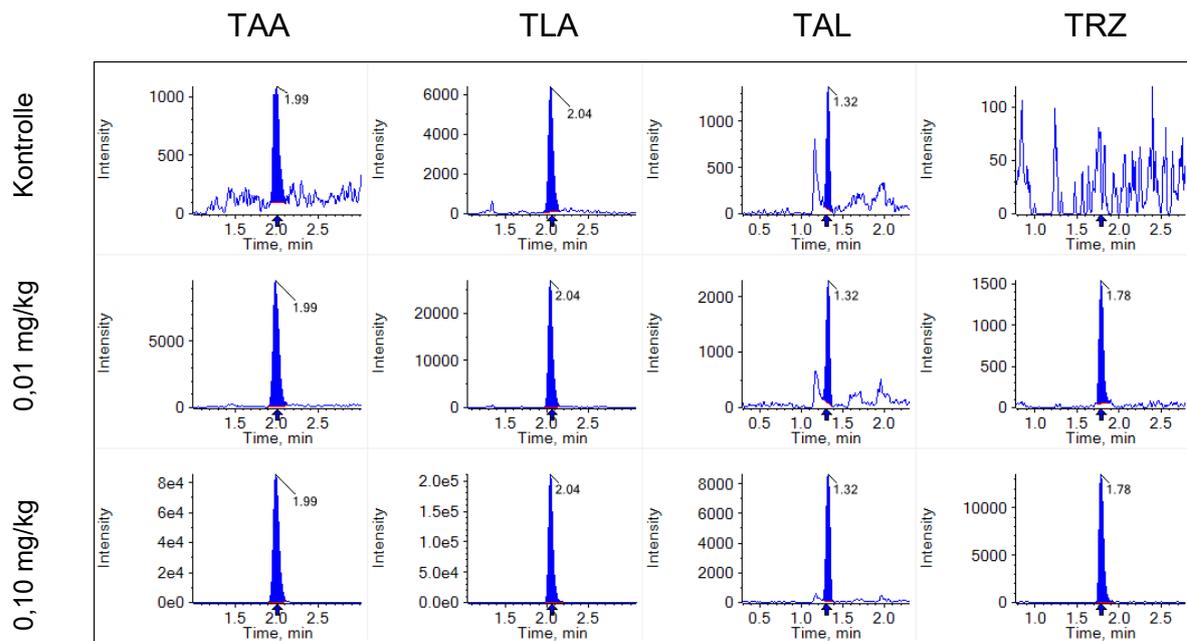


Abb. 112: Validierung LC-DMS-MS/MS für TDMs in Soja

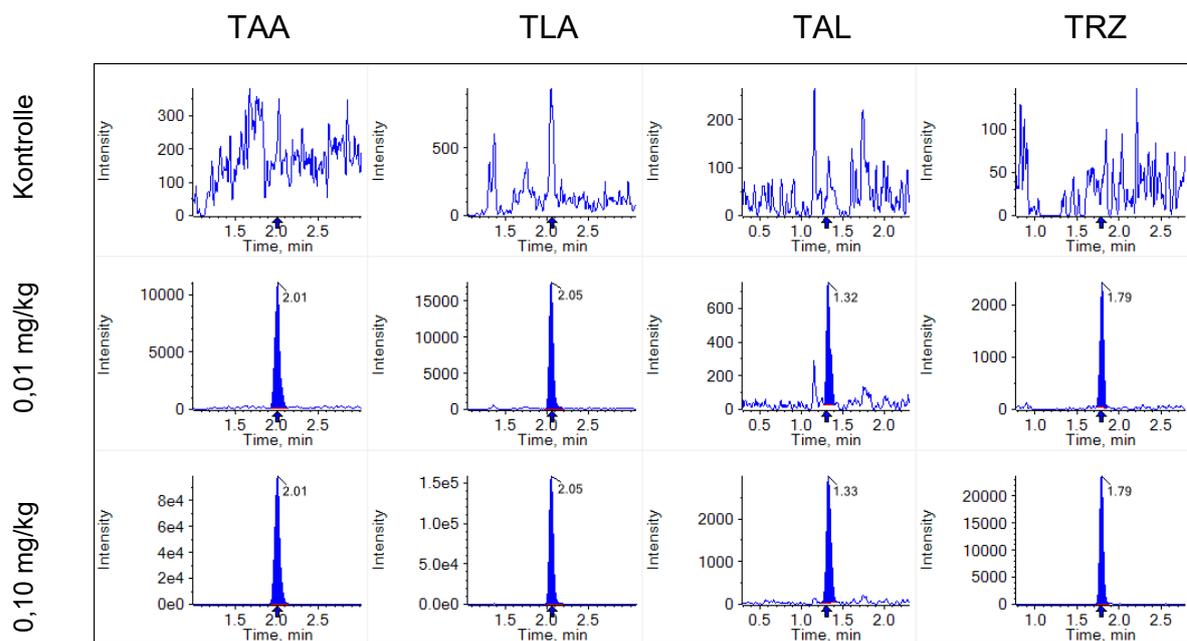


Abb. 113: Validierung LC-DMS-MS/MS für TDMs in Rübe

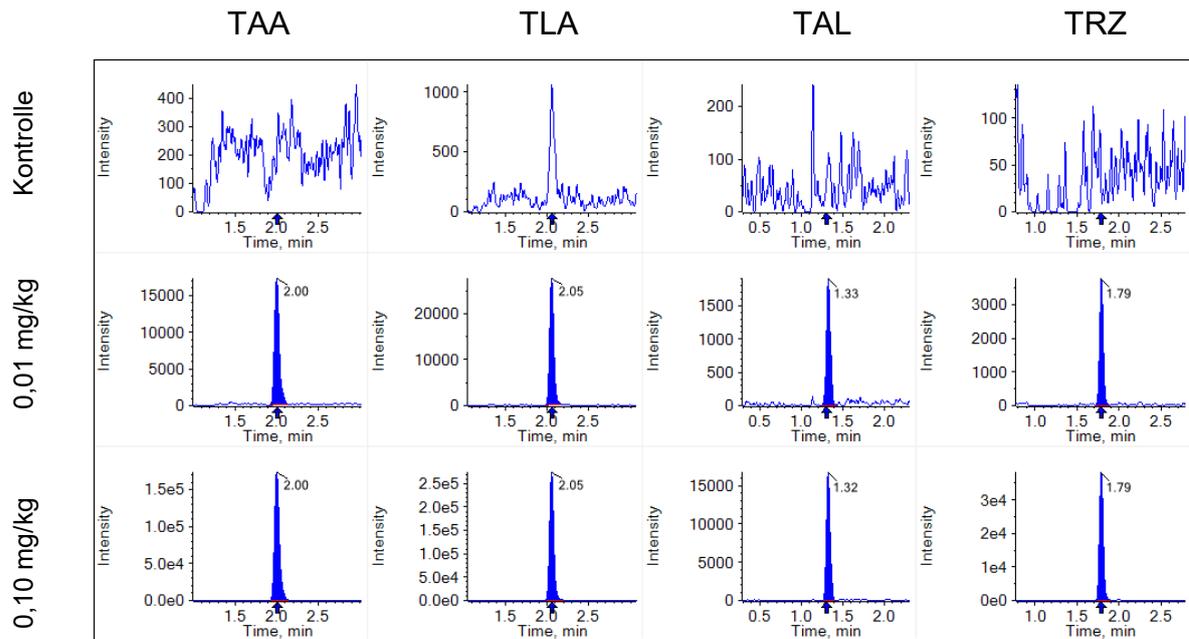


Abb. 114: Validierung LC-DMS-MS/MS für TDMs in Karotte

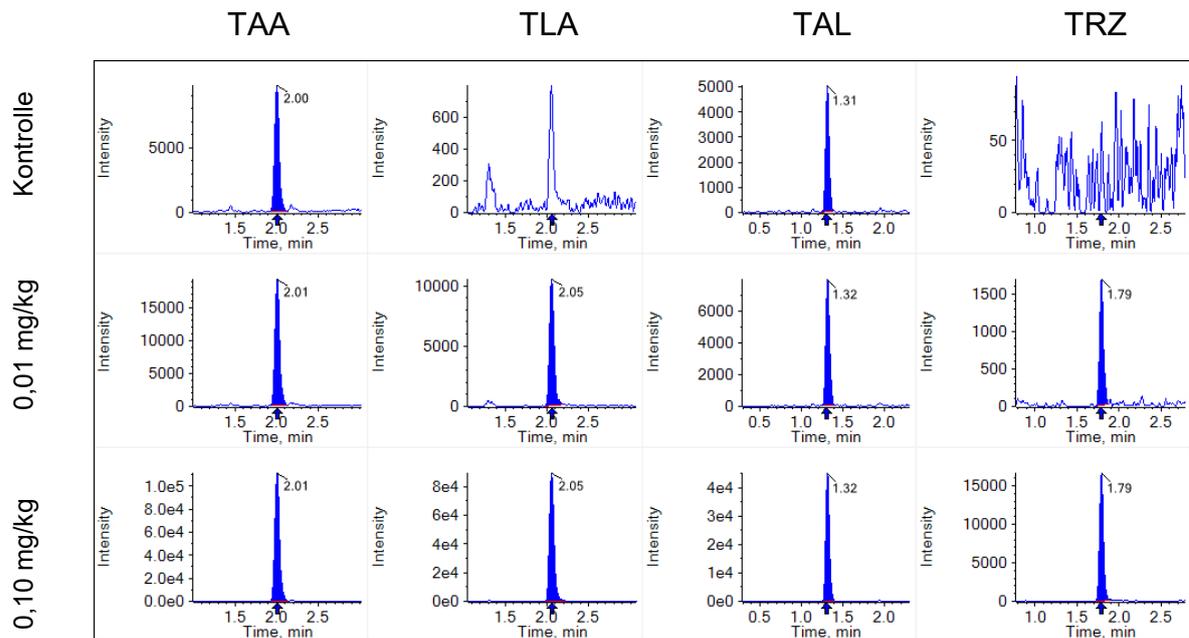


Abb. 115: Validierung LC-DMS-MS/MS für TDMs in Korn

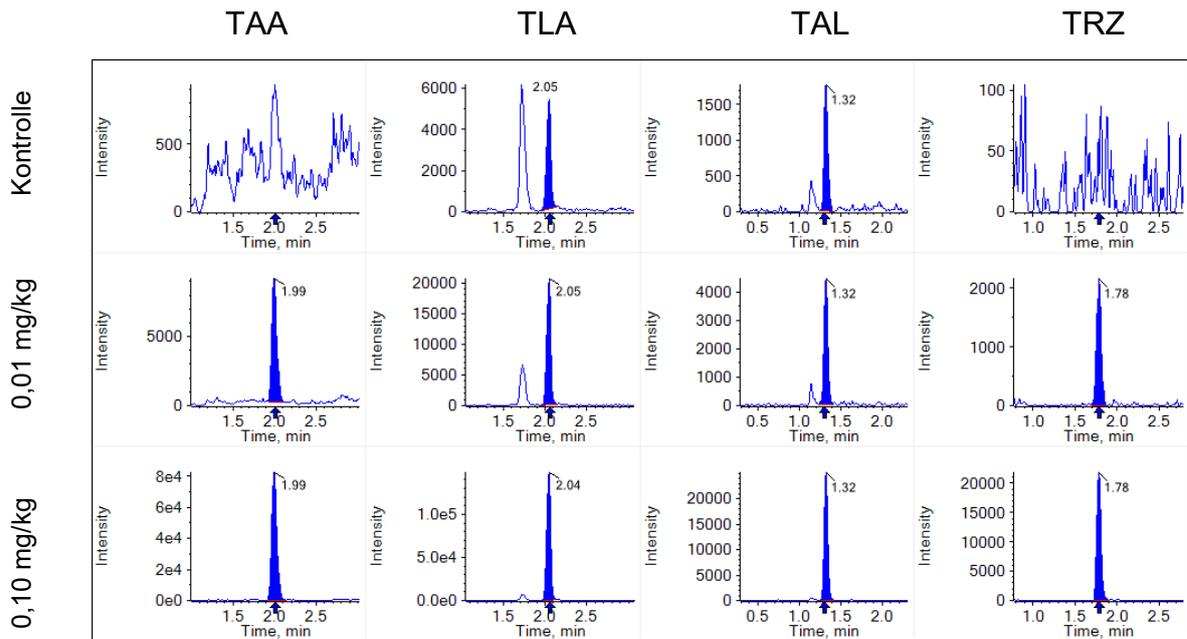


Abb. 116: Validierung LC-DMS-MS/MS für TDMs in Orange

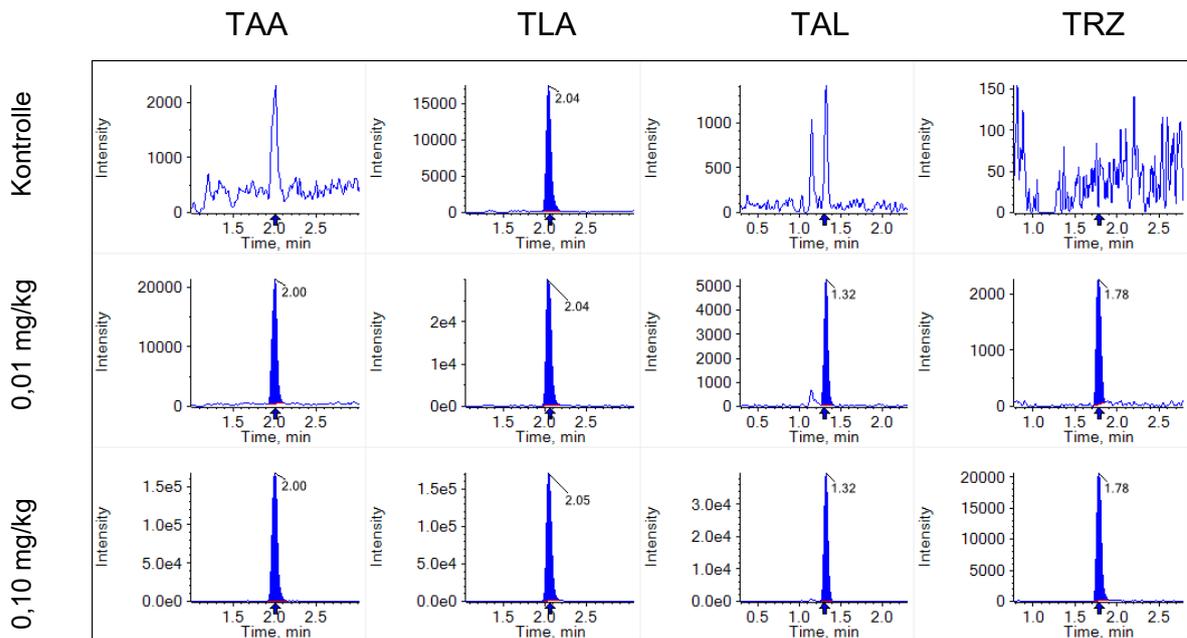


Abb. 117: Validierung LC-DMS-MS/MS für TDMs in Wein

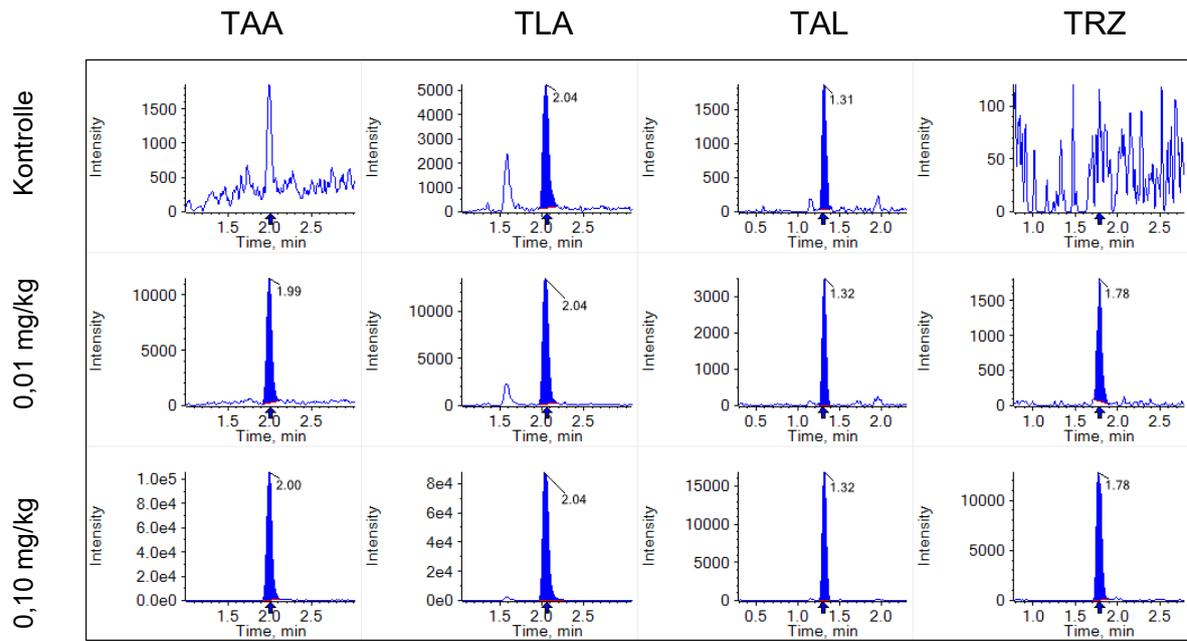


Abb. 118: Validierung LC-DMS-MS/MS für TDMs in Flachs

### 9.11.3 Validierung LC-DMS-MS/MS für DFA

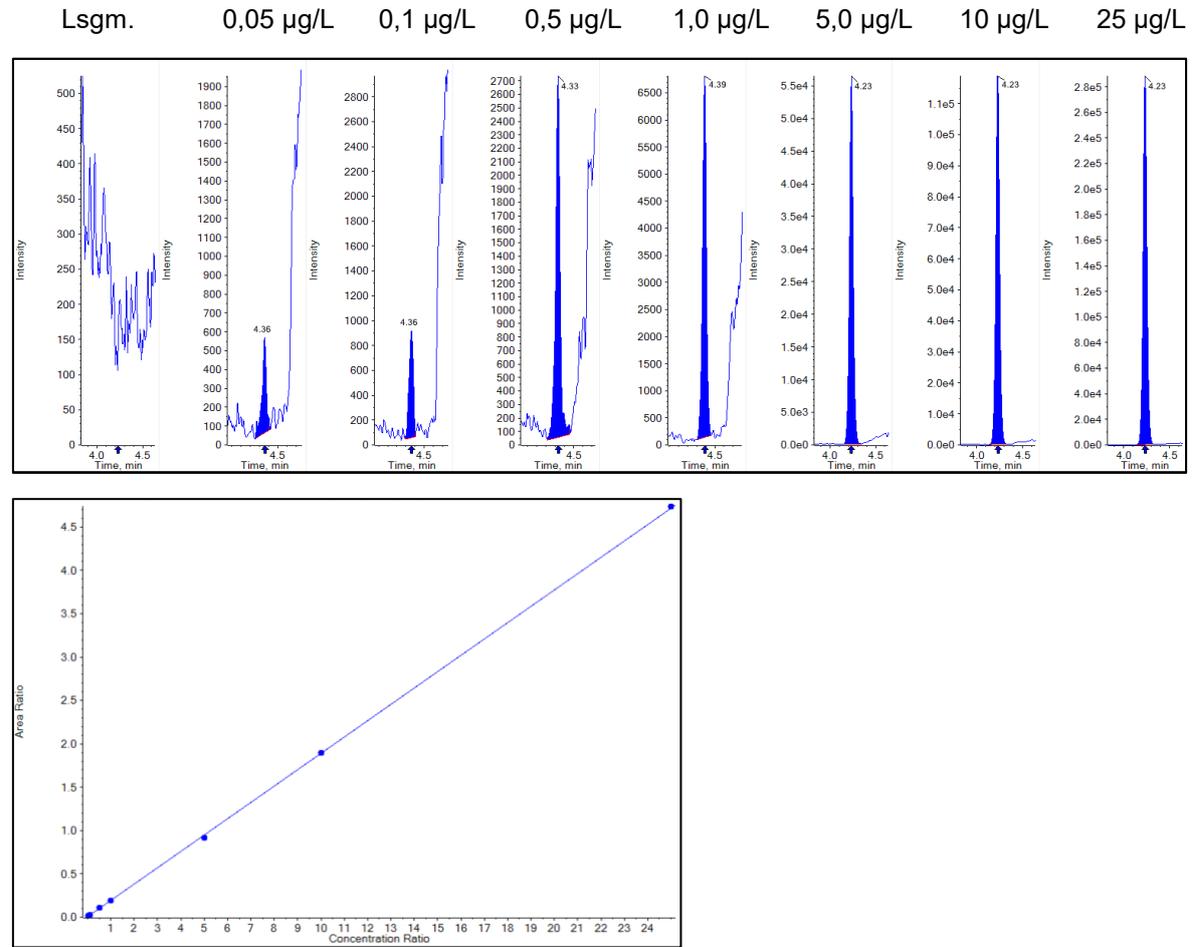


Abb. 119: Lösungsmittelstandards und Kalibrierreihe für DFA DMS-MS

Lsgm.      0,05 µg/L    0,1 µg/L    0,5 µg/L    1,0 µg/L    5,0 µg/L    10 µg/L    25 µg/L

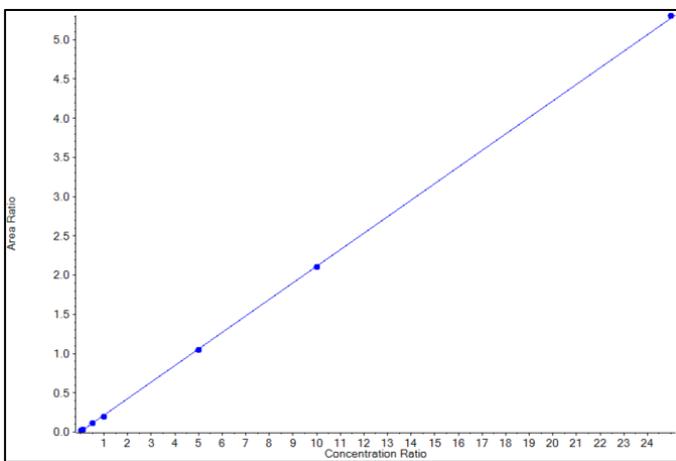
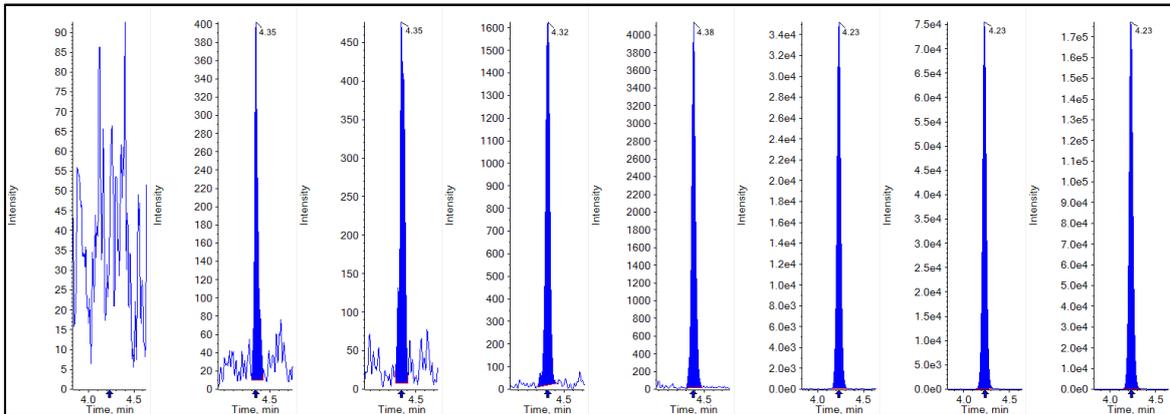


Abb. 120: Lösungsmittelstandards und Kalibrierreihe für DFA DMS-MS/MS

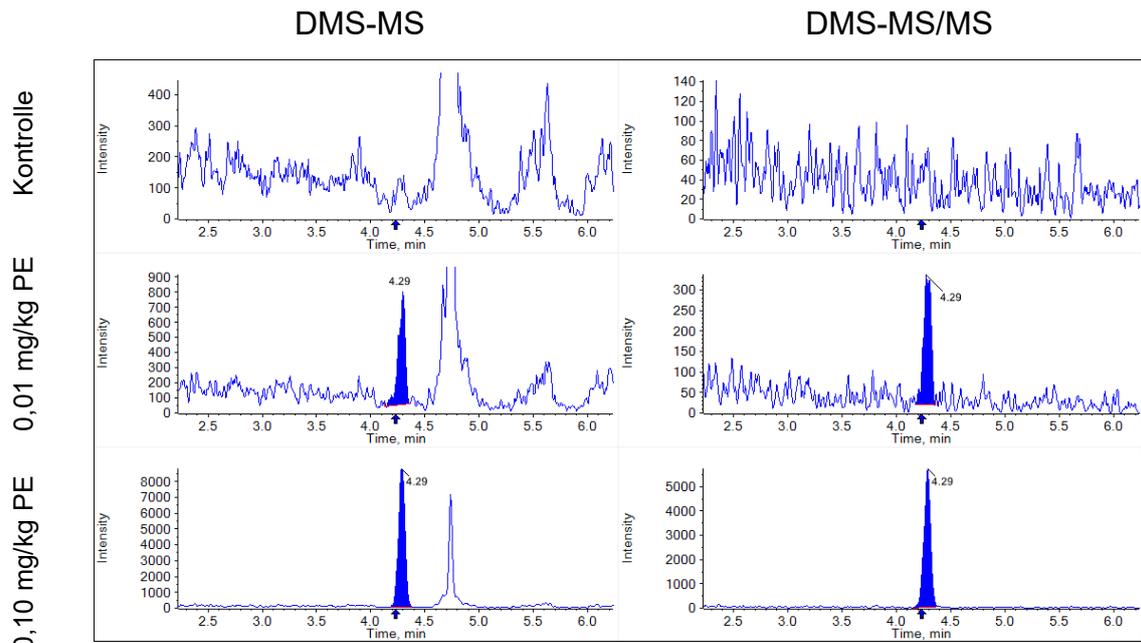


Abb. 121: Validierung LC-DMS-MS & LC-DMS-MS/MS für DFA in Salat

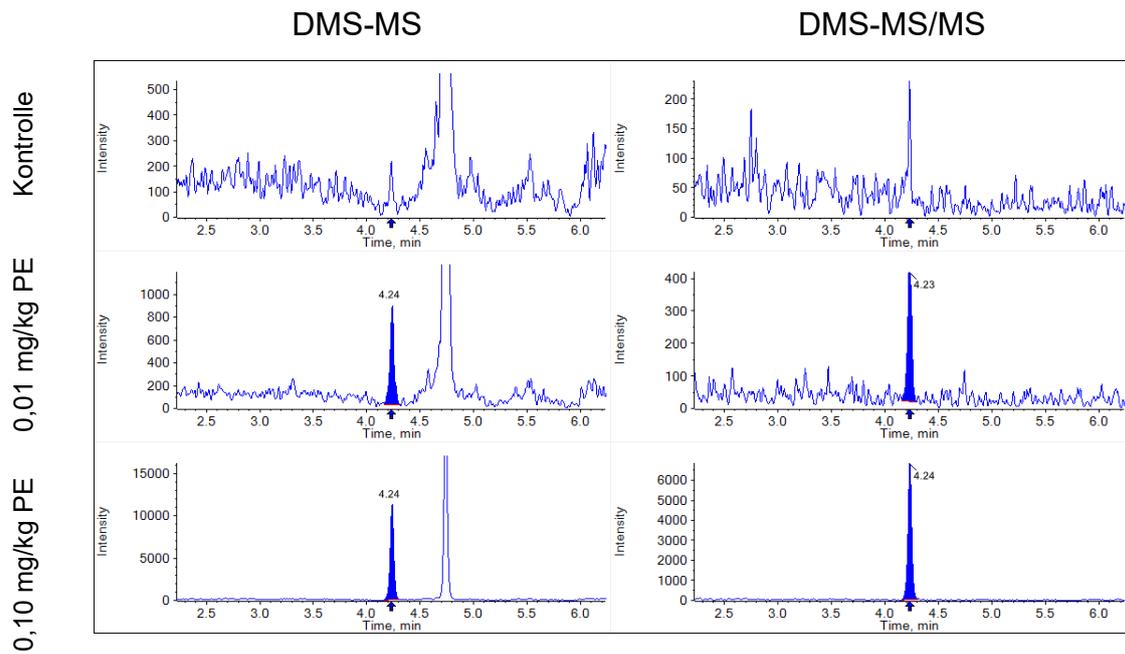


Abb. 122: Validierung LC-DMS-MS & LC-DMS-MS/MS für DFA in Soja

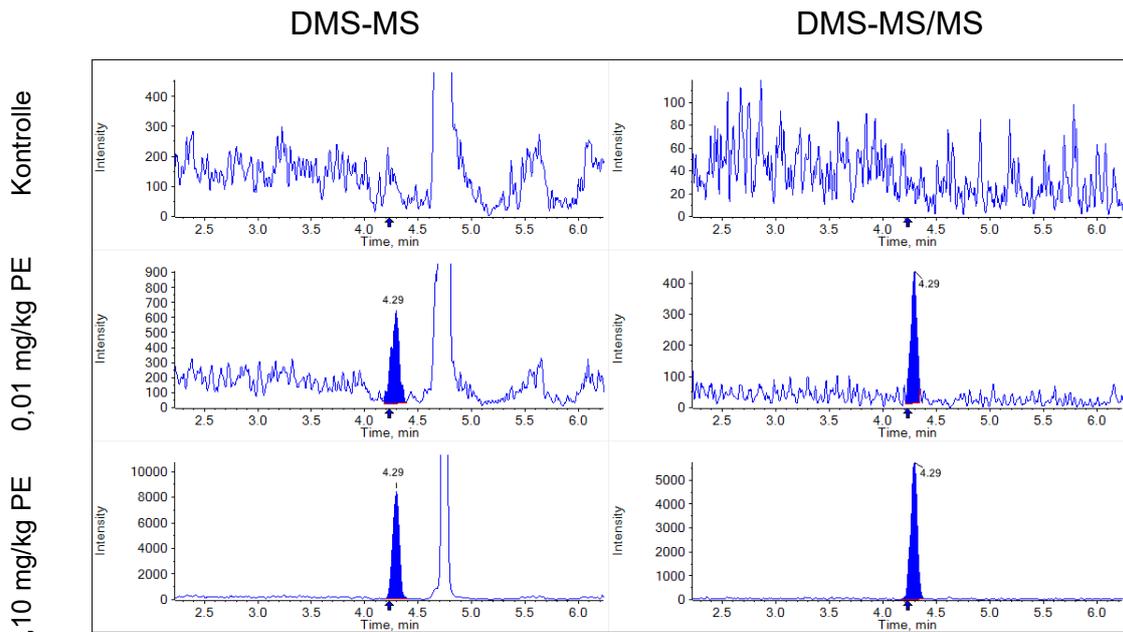


Abb. 123: Validierung LC-DMS-MS & LC-DMS-MS/MS für DFA in Rübe

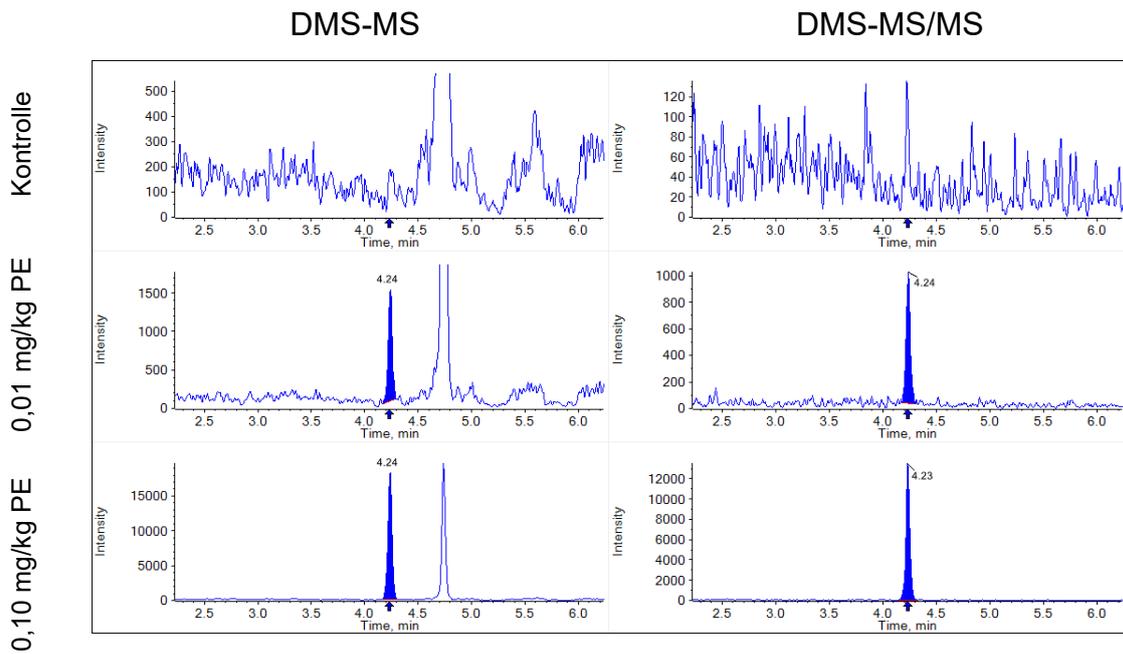


Abb. 124: Validierung LC-DMS-MS & LC-DMS-MS/MS für DFA in Korn

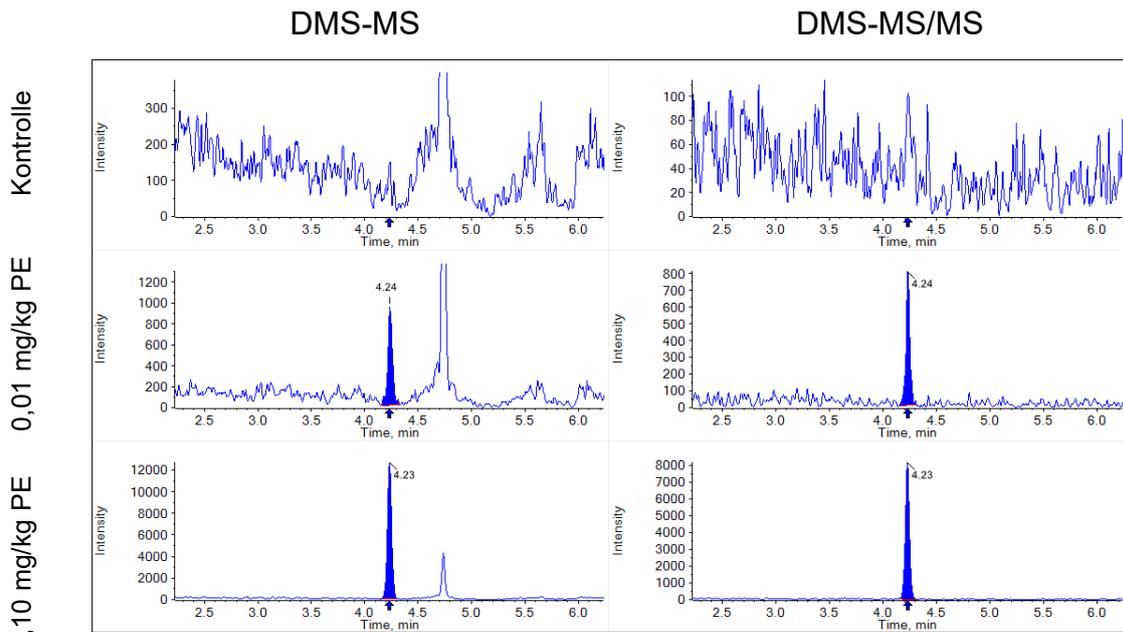


Abb. 125: Validierung LC-DMS-MS & LC-DMS-MS/MS für DFA in Orange

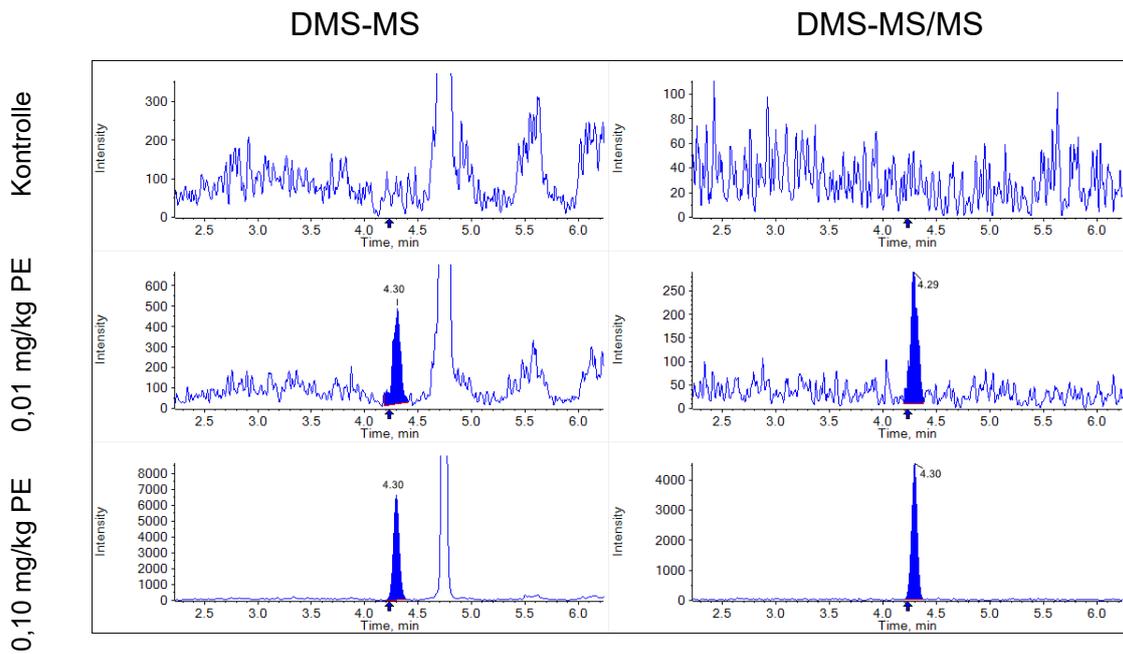


Abb. 126: Validierung LC-DMS-MS & LC-DMS-MS/MS für DFA in Hopfen

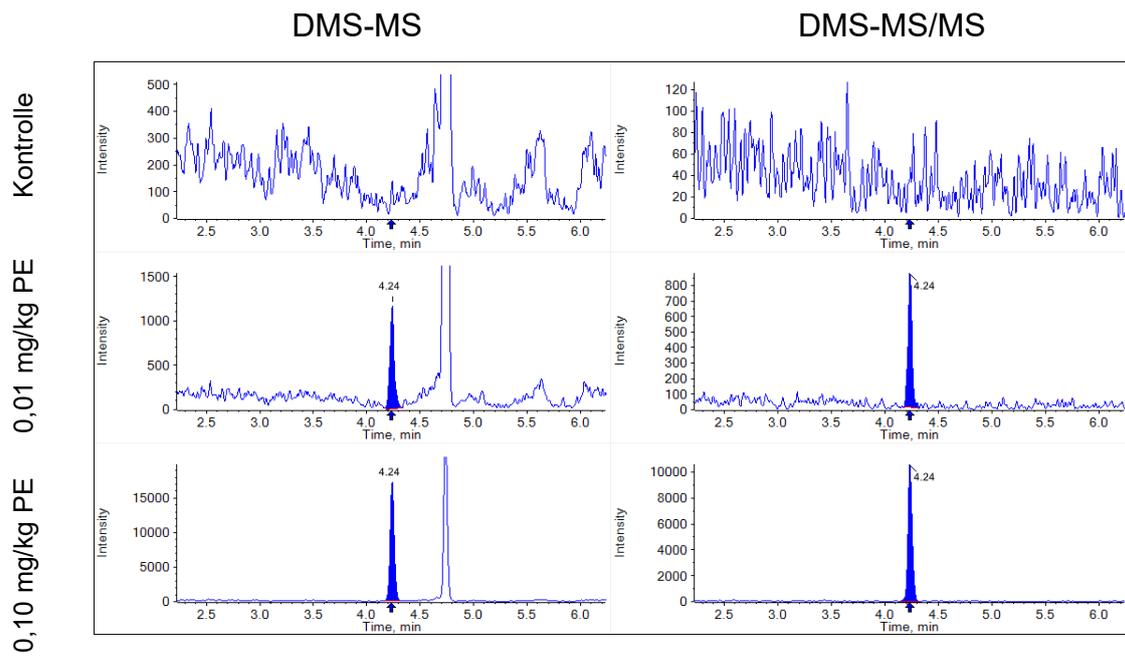


Abb. 127: Validierung LC-DMS-MS & LC-DMS-MS/MS für DFA in Raps

### 9.11.4 Validierung MRM<sup>HR</sup> für TDMs

Tab. 83: Validierungsergebnisse Analyse TDMs mittels LC-MRM<sup>HR</sup> (Aquasil C18)

Matrix	Level [mg/kg]	TAA		TLA		TRZ		TAL	
		WF * [%]	CV [%]	WF * [%]	CV [%]	WF * [%]	CV [%]	WF * [%]	CV [%]
Salat	0,01	90	5,5	120	6,0	90	15,1	90	25,8
	0,10	94	3,4	102	3,6	91	11,9	85	7,5
Tomate	0,01	90	6,6	70	10,3	90	12,1	80	12,4
	0,10	104	5,3	71	8,7	88	5,3	100	17,1
Brokkoli	0,01	80	6,9	110	17,0	80	16,6	- <sup>2</sup>	- <sup>2</sup>
	0,10	88	5,4	86	5,3	84	11,3	75 <sup>1</sup>	15,2
Bohne	0,01	100	5,8	110 <sup>1</sup>	28,6	80	11,1	<LOQ	<LOQ
	0,10	90	3,8	97	9,0	98	7,8	101	21,2
Soja	0,01	80 <sup>1</sup>	10,6	90 <sup>1</sup>	12,7	110	11,2	<LOQ	<LOQ
	0,10	94	7,5	99	15,6	98	7,7	97	29,5
Rübe	0,01	90	5,2	90	6,2	100	16,5	100	44,1
	0,10	106	3,2	84	9,1	85	5,8	89	5,7
Karotte	0,01	80	4,8	100	6,4	100	21,8	90	29,1
	0,10	83	2,9	96	5,4	98	6,4	95	18,6
Korn	0,01	69 <sup>1</sup>	6,8	99	3,9	110	6,7	62 <sup>1</sup>	8,7
	0,10	86	4,7	71	2,2	85	4,2	73	1,9
Orange	0,01	100	7,8	110 <sup>1</sup>	14,0	90	17,5	<LOQ	<LOQ
	0,10	98	5,8	102	7,3	89	7,3	68	8,8
Wein	0,01	100	8,0	90 <sup>1</sup>	7,6	100	11,9	70	11,3
	0,10	99	2,3	80	4,6	95	0,7	87	17,7
Flachs	0,01	90	6,1	110 <sup>1</sup>	16,9	100	17,2	70 <sup>1</sup>	2,0
	0,10	81	5,1	105	9,3	94	5,1	61	4,8
<b>Mittelwert</b>	<b>0,01</b>	<b>88</b>	<b>6,7</b>	<b>100</b>	<b>11,8</b>	<b>95</b>	<b>14,3</b>	<b>80</b>	<b>19,0</b>
	<b>0,10</b>	<b>93</b>	<b>4,5</b>	<b>90</b>	<b>7,3</b>	<b>91</b>	<b>6,7</b>	<b>85</b>	<b>13,4</b>

\* ... Mittelwert der Fünffachbestimmung, Matrixeffekte korrigiert mittels interner Standardsubstanzen

<sup>1</sup> ... Blindwertkorrektur wurde durchgeführt

<sup>2</sup> ... Kein adäquates Material für die Validierung war verfügbar

Tab. 84: Validierungsergebnisse Analyse TDMs mittels LC-MRM<sup>HR</sup> (Hypercarb)

Matrix	Level [mg/kg]	TAA		TLA		TRZ		TAL	
		WF * [%]	CV [%]	WF * [%]	CV [%]	WF * [%]	CV [%]	WF * [%]	CV [%]
Salat	0,01	107	3,9	79	6,7	79	7,5	89	8,3
	0,10	94	0,9	86	2,5	79	1,7	91	2,2
Tomate	0,01	97	5,1	116	14,9	98	11,6	102	5,0
	0,10	88	4,8	108	4,9	93	4,7	87	2,3
Brokkoli	0,01	84	3,5	46	1,7	86	9,9	- <sup>2</sup>	- <sup>2</sup>
	0,10	88	1,5	16	0,6	74	7,5	96 <sup>1</sup>	6,8
Bohne	0,01	80	6,1	70 <sup>1</sup>	5,9	86	13,0	97 <sup>1</sup>	6,7
	0,10	93	3,4	45	1,4	81	8,6	90	5,4
Soja	0,01	88 <sup>1</sup>	4,6	74 <sup>1</sup>	4,7	108	5,3	78 <sup>1</sup>	8,8
	0,10	99	3,3	91	5,6	119	2,0	84	4,0
Rübe	0,01	87	5,6	81	4,5	73	14,1	82	7,6
	0,10	94	4,9	88	10,1	76	2,8	97	3,7
Karotte	0,01	82	2,1	91	8,4	88	4,3	89	4,1
	0,10	96	1,6	61	1,1	90	3,7	87	1,6
Korn	0,01	92 <sup>1</sup>	6,7	106	5,0	107	4,9	68 <sup>1</sup>	17,1
	0,10	82	4,0	70	2,2	105	9,1	72	6,1
Orange	0,01	94	3,6	87 <sup>1</sup>	7,9	109	17,0	87 <sup>1</sup>	18,7
	0,10	100	2,4	95	2,6	101	5,0	88	2,1
Wein	0,01	78	6,8	92 <sup>1</sup>	8,0	92	15,7	93	5,4
	0,10	86	4,8	101	8,3	100	3,4	86	3,5
Flachs	0,01	82	8,3	66 <sup>1</sup>	15,0	103	11,4	71 <sup>1</sup>	11,1
	0,10	85	3,7	89	5,8	92	6,3	71	2,8
<b>Mittelwert</b>	<b>0,01</b>	<b>88</b>	<b>5,1</b>	<b>82</b>	<b>7,5</b>	<b>93</b>	<b>10,4</b>	<b>86</b>	<b>9,3</b>
	<b>0,10</b>	<b>91</b>	<b>3,2</b>	<b>76</b>	<b>4,1</b>	<b>92</b>	<b>5,0</b>	<b>86</b>	<b>3,7</b>

\* ... Mittelwert der Fünffachbestimmung, Matrixeffekte korrigiert mittels interner Standardsubstanzen

<sup>1</sup> ... Blindwertkorrektur wurde durchgeführt

<sup>2</sup> ... Kein adäquates Material für die Validierung war verfügbar

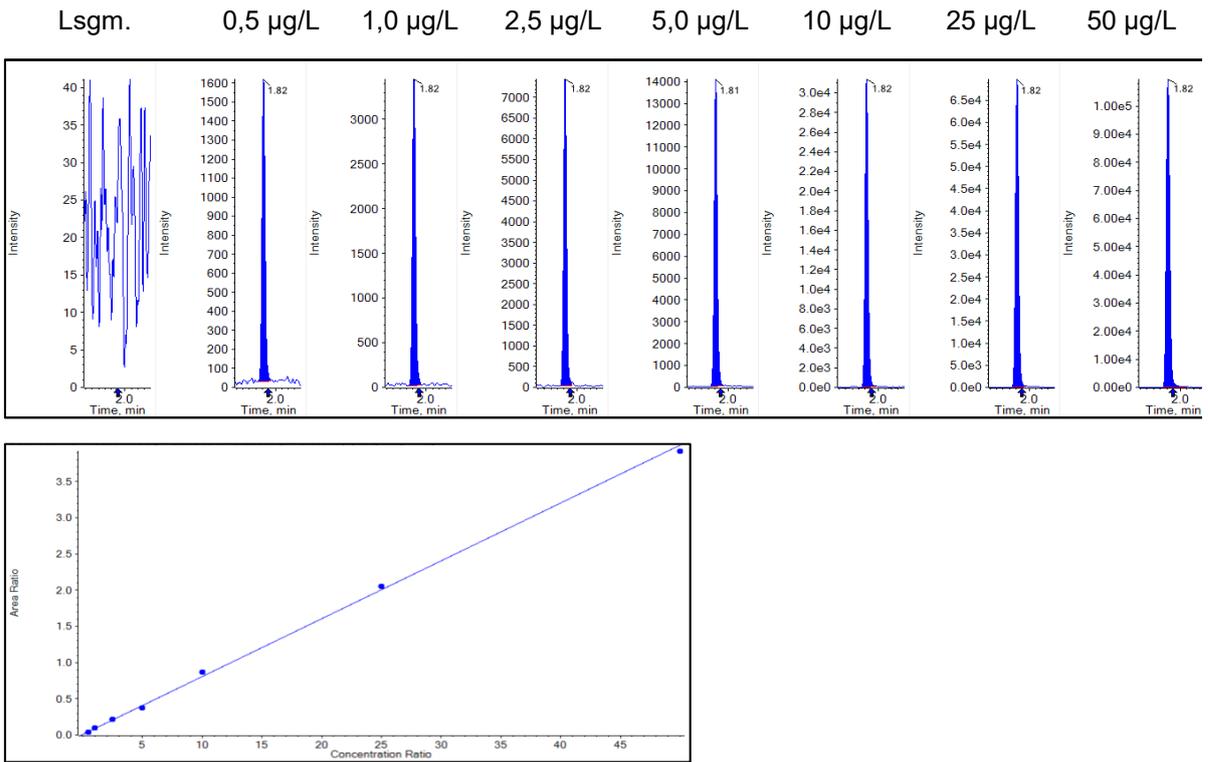


Abb. 128: Lösungsmittelstandards und Kalibrierreihe für TAA (Aquasil C18)

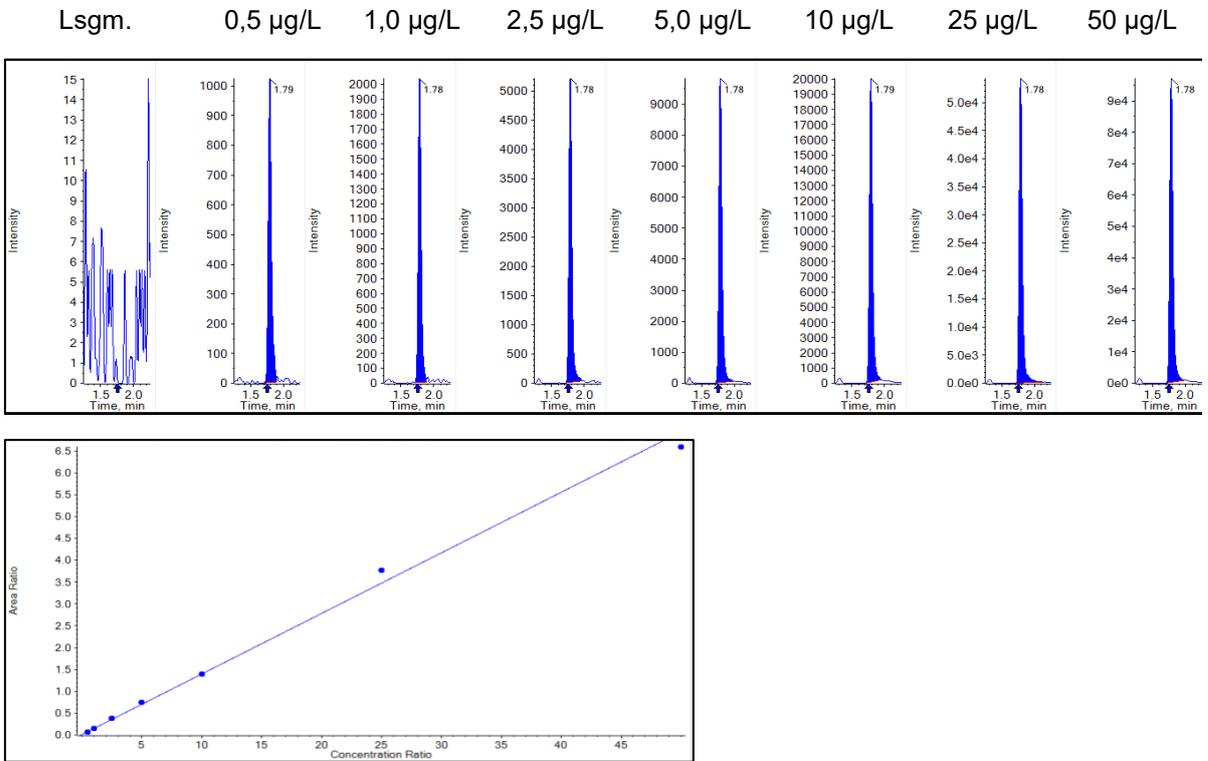
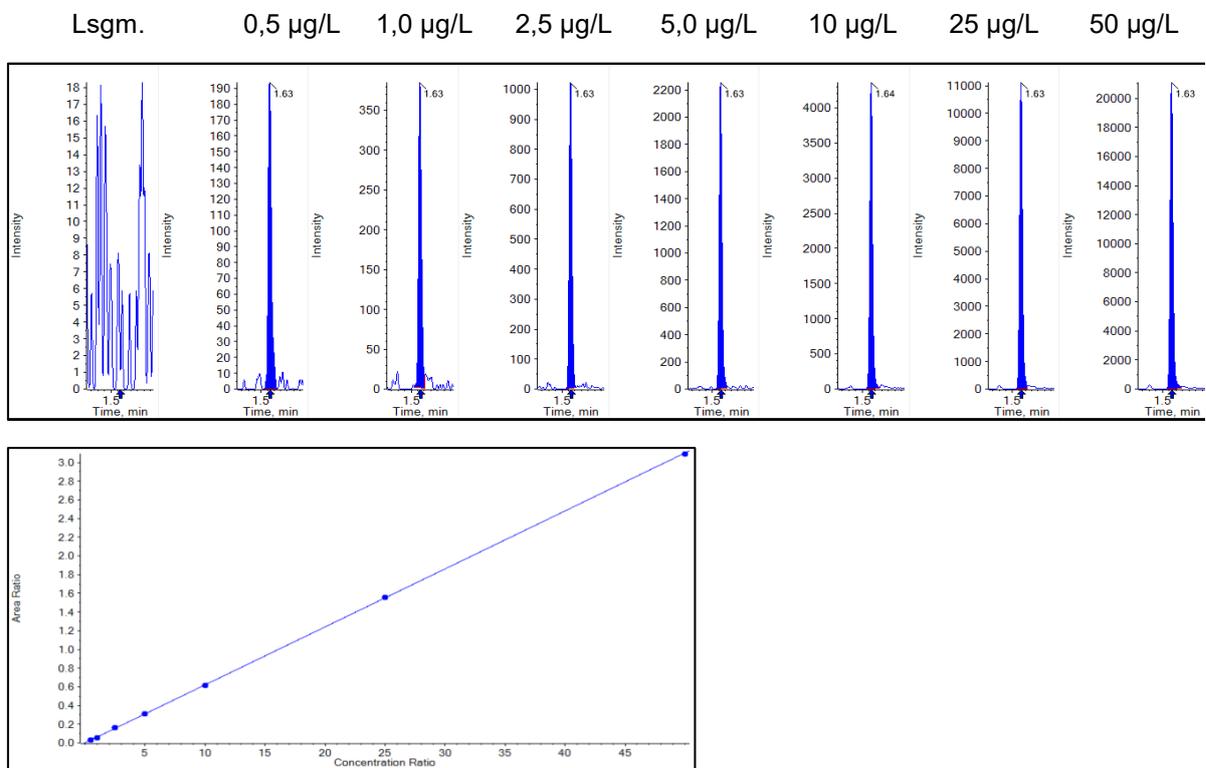
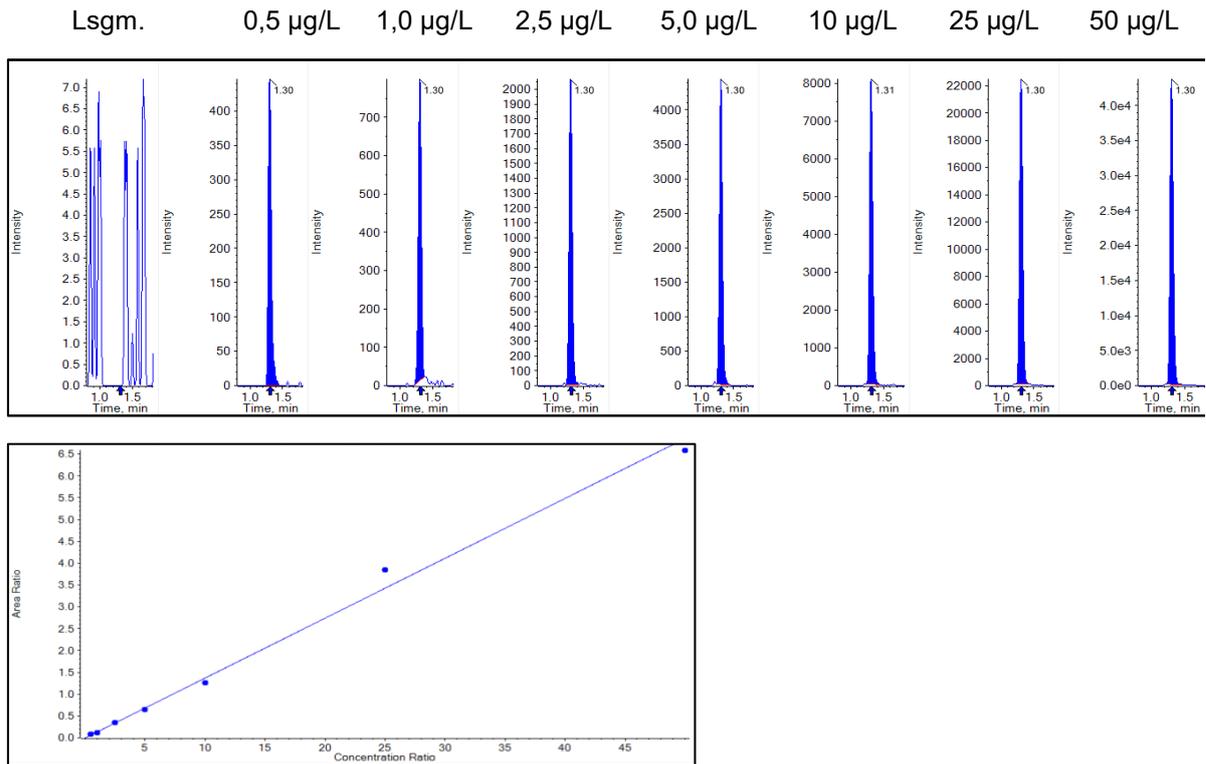


Abb. 129: Lösungsmittelstandards und Kalibrierreihe für TLA (Aquasil C18)



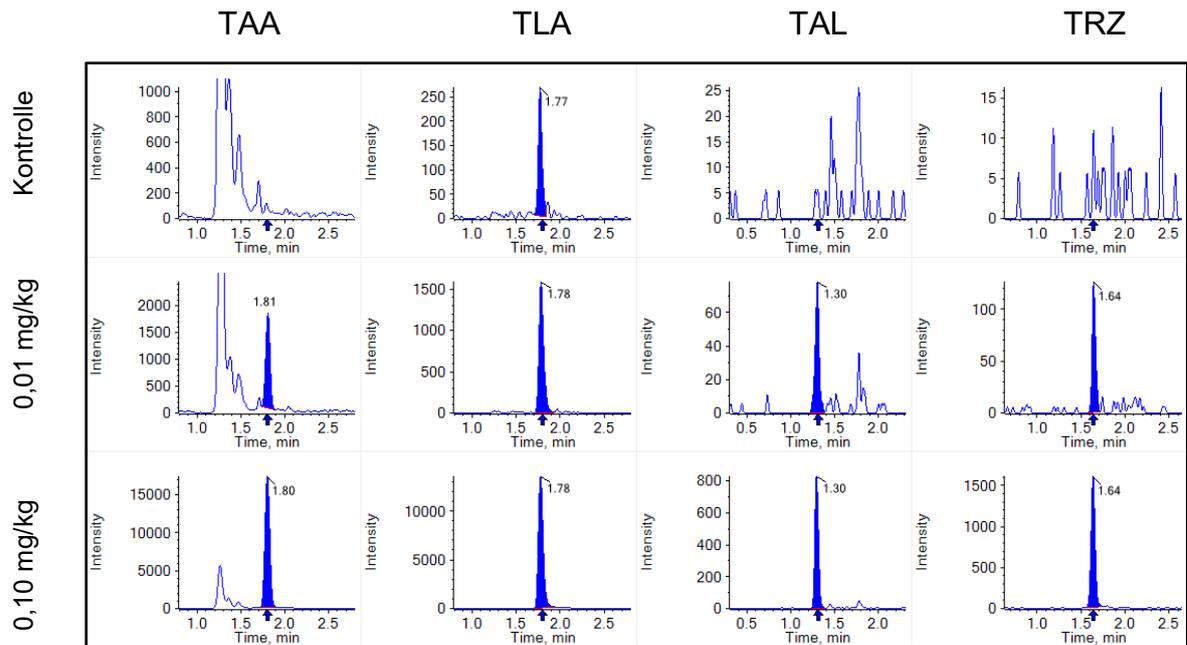


Abb. 132: Validierung LC-MRM<sup>HR</sup> für TDMs in Salat (Aquasil C18)

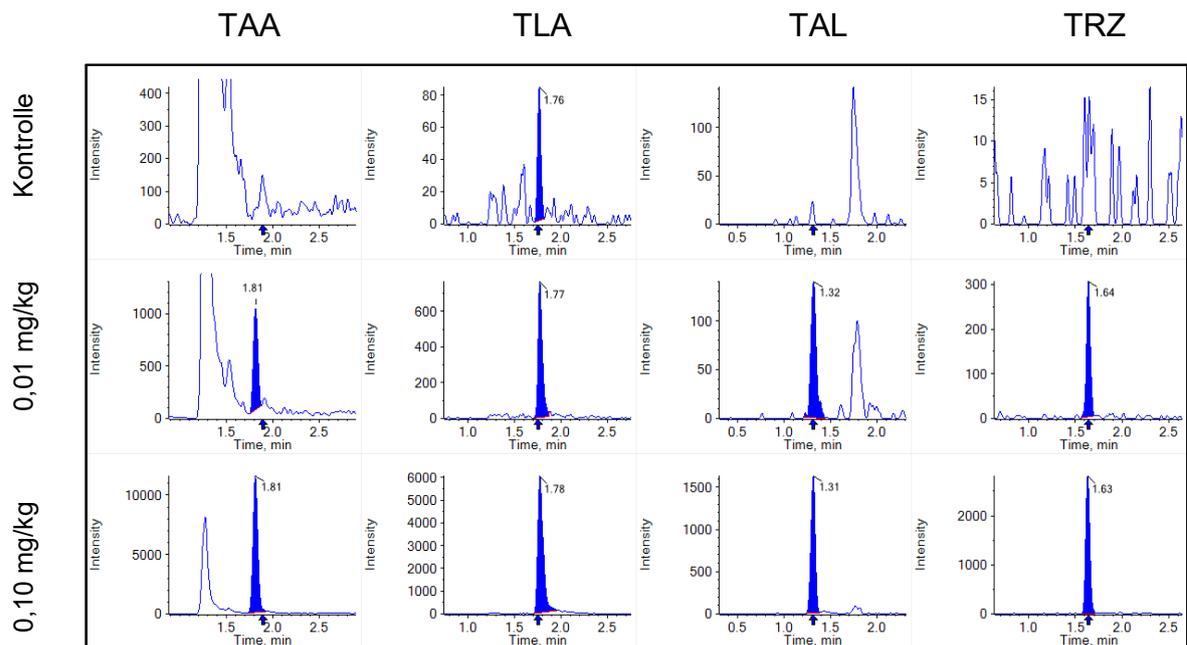


Abb. 133: Validierung LC-MRM<sup>HR</sup> für TDMs in Tomate (Aquasil C18)

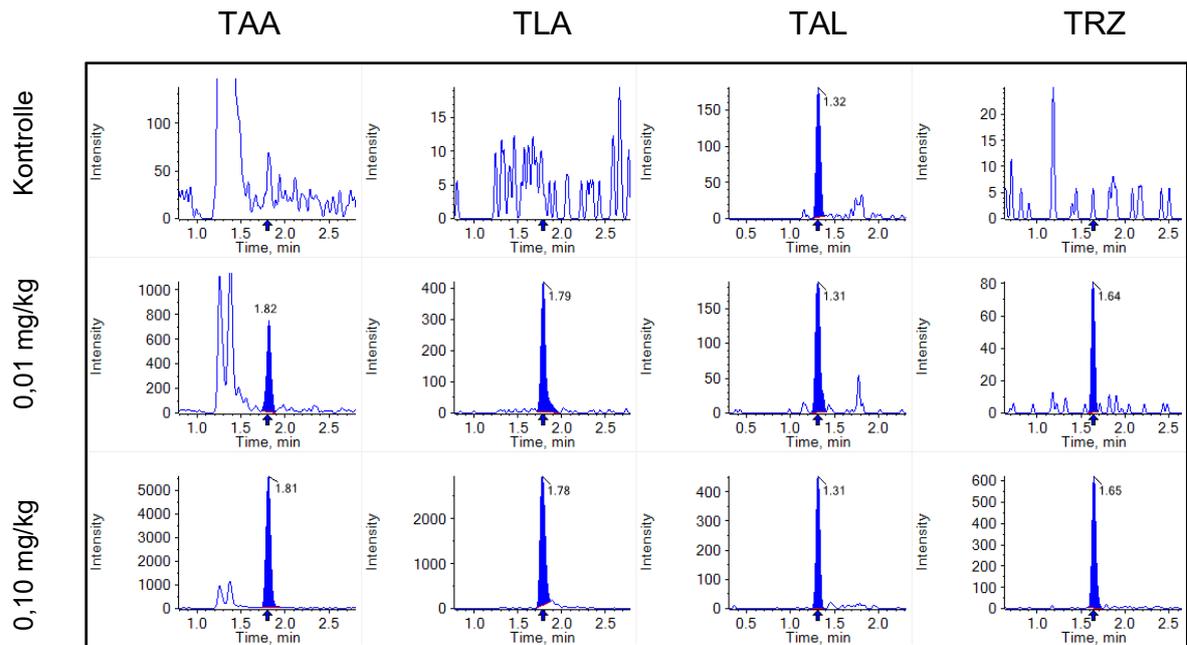


Abb. 134: Validierung LC-MRM<sup>HR</sup> für TDMs in Brokkoli (Aquasil C18)

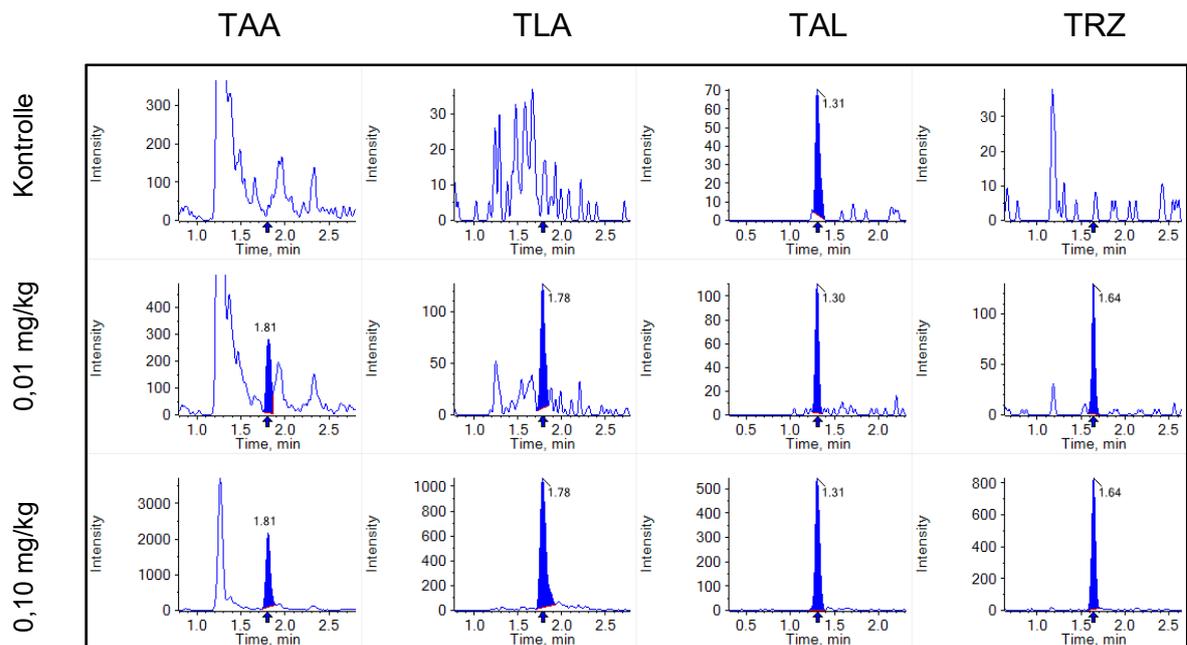


Abb. 135: Validierung LC-MRM<sup>HR</sup> für TDMs in Bohne (Aquasil C18)

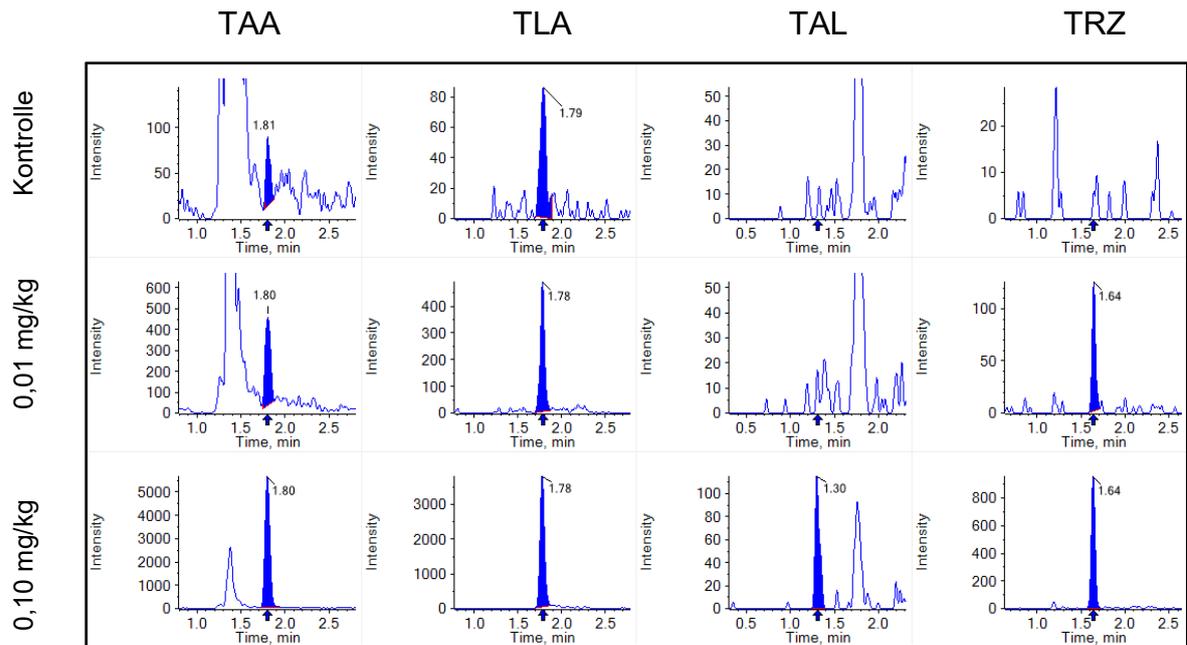


Abb. 136: Validierung LC-MRM<sup>HR</sup> für TDMs in Soja (Aquisil C18)

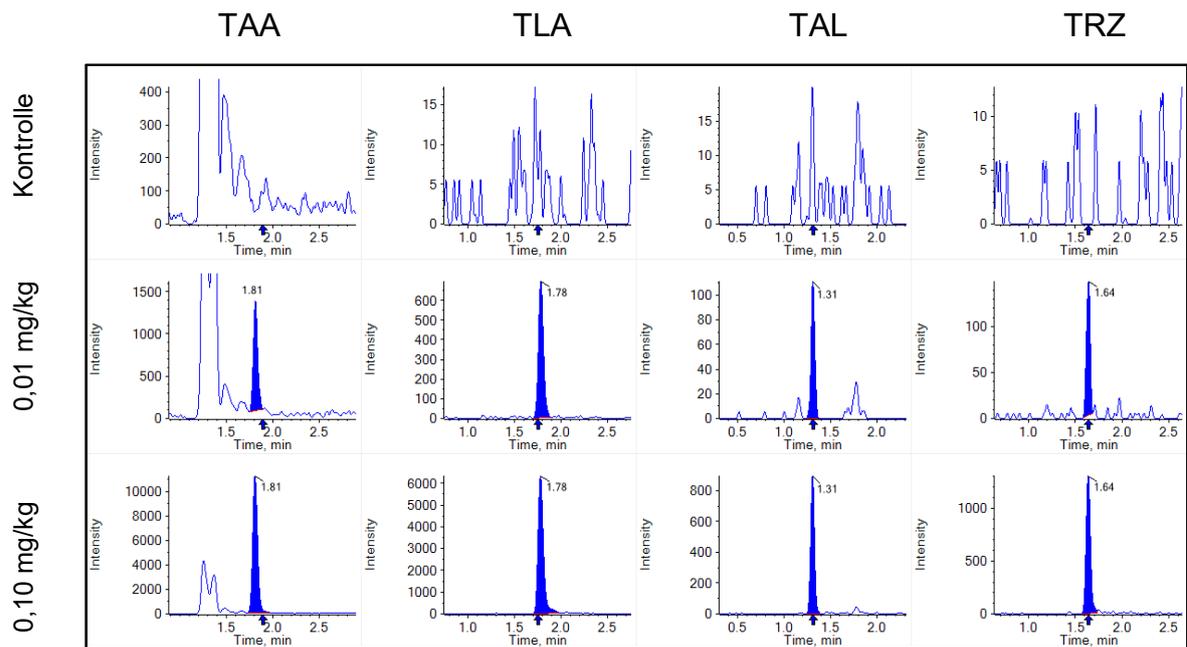


Abb. 137: Validierung LC-MRM<sup>HR</sup> für TDMs in Rube (Aquisil C18)

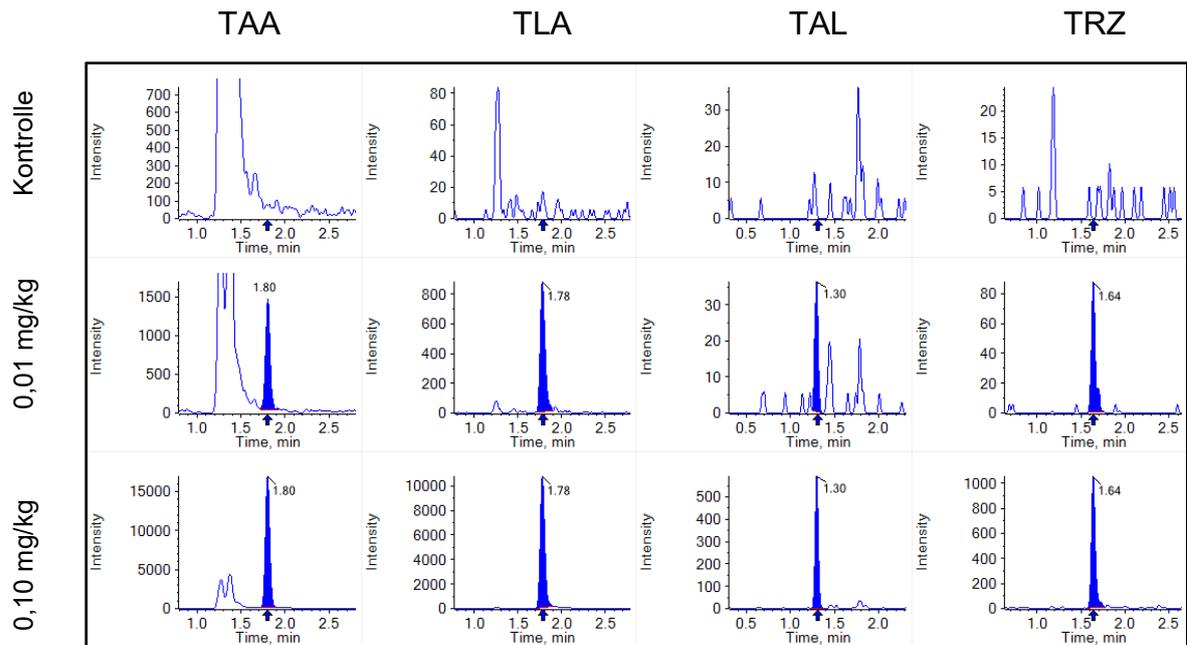


Abb. 138: Validierung LC-MRM<sup>HR</sup> für TDMs in Karotte (Aquisil C18)

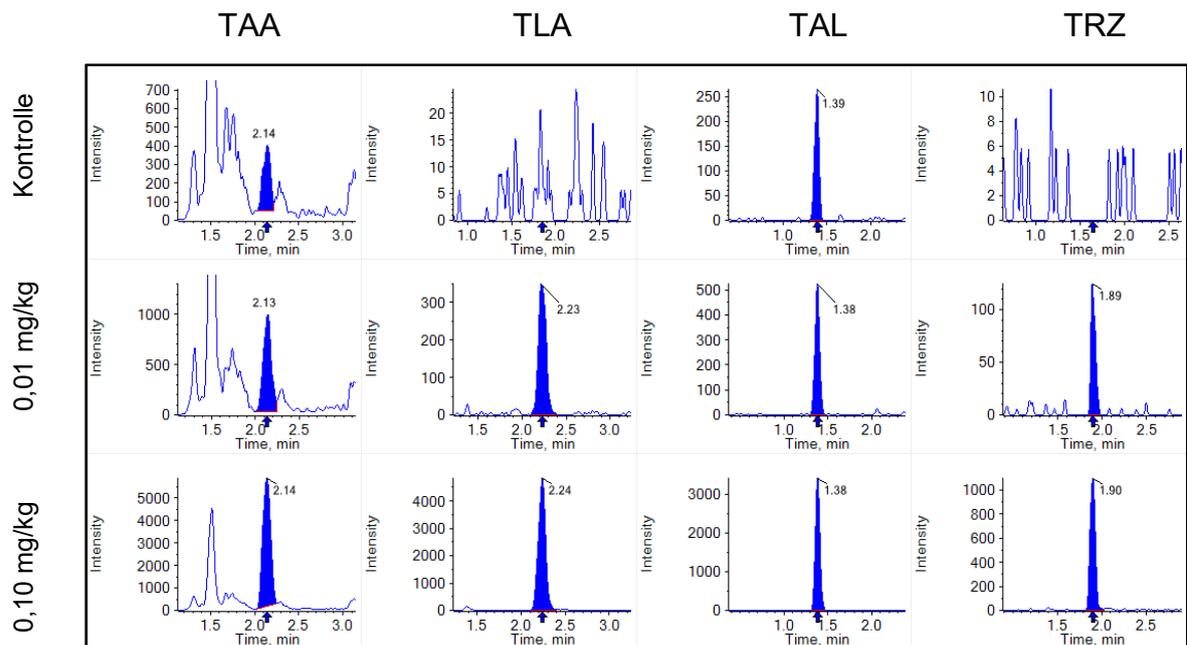


Abb. 139: Validierung LC-MRM<sup>HR</sup> für TDMs in Korn (Aquisil C18)

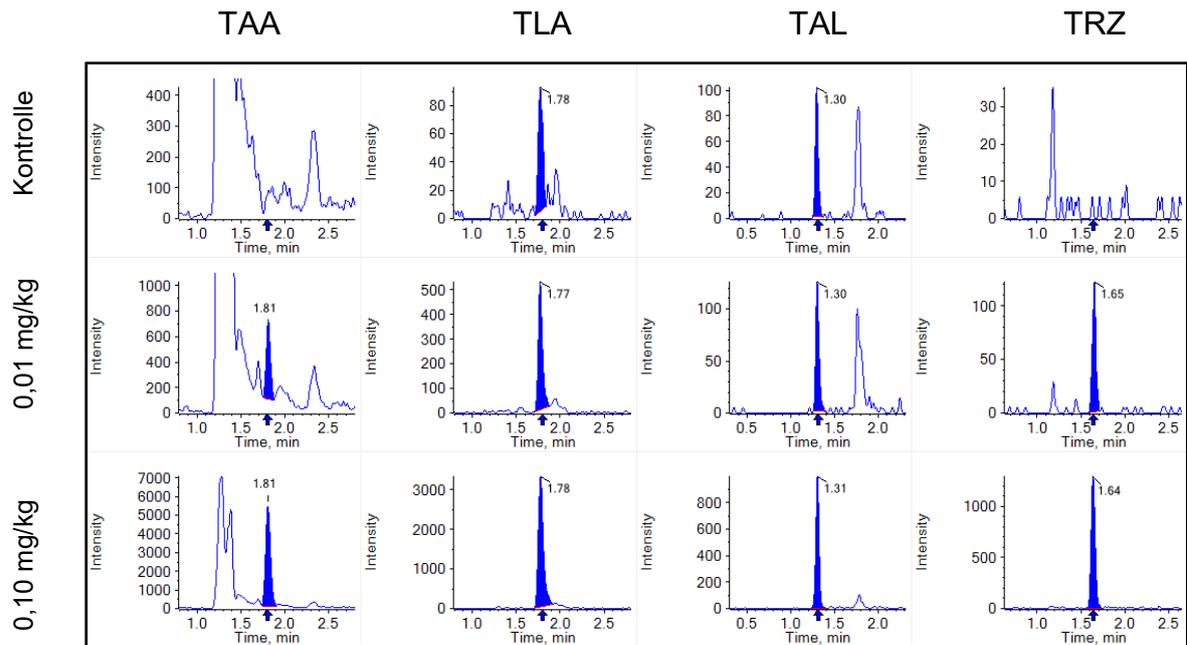


Abb. 140: Validierung LC-MRM<sup>HR</sup> für TDMs in Orange (Aquisil C18)

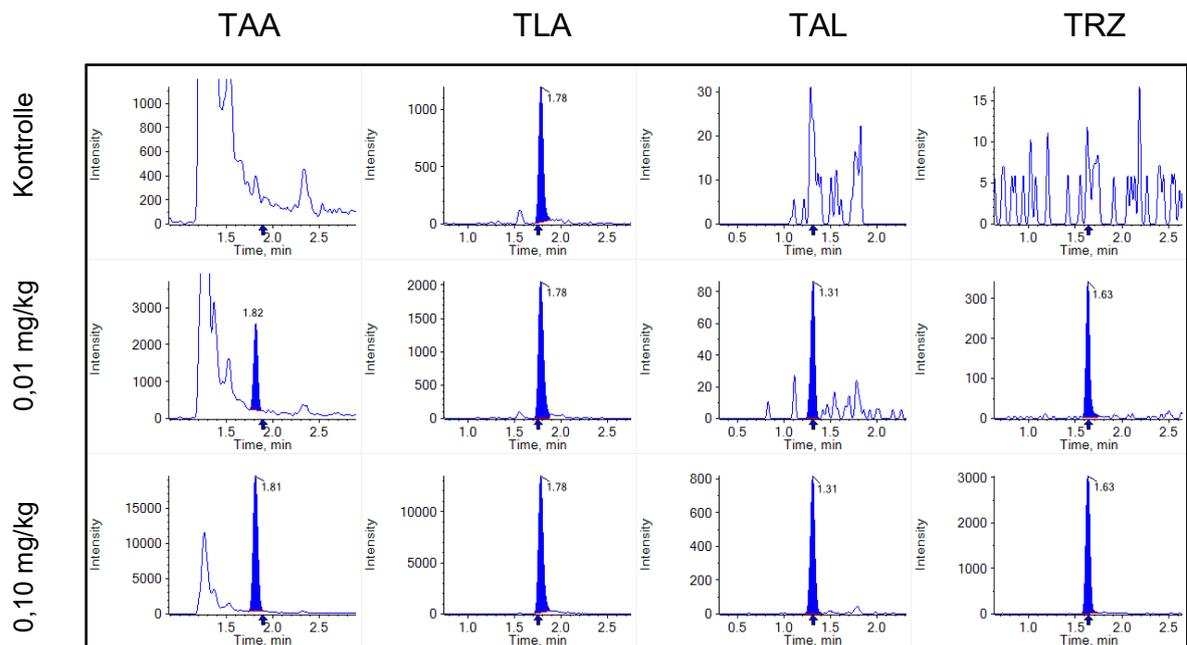


Abb. 141: Validierung LC-MRM<sup>HR</sup> für TDMs in Wein (Aquisil C18)

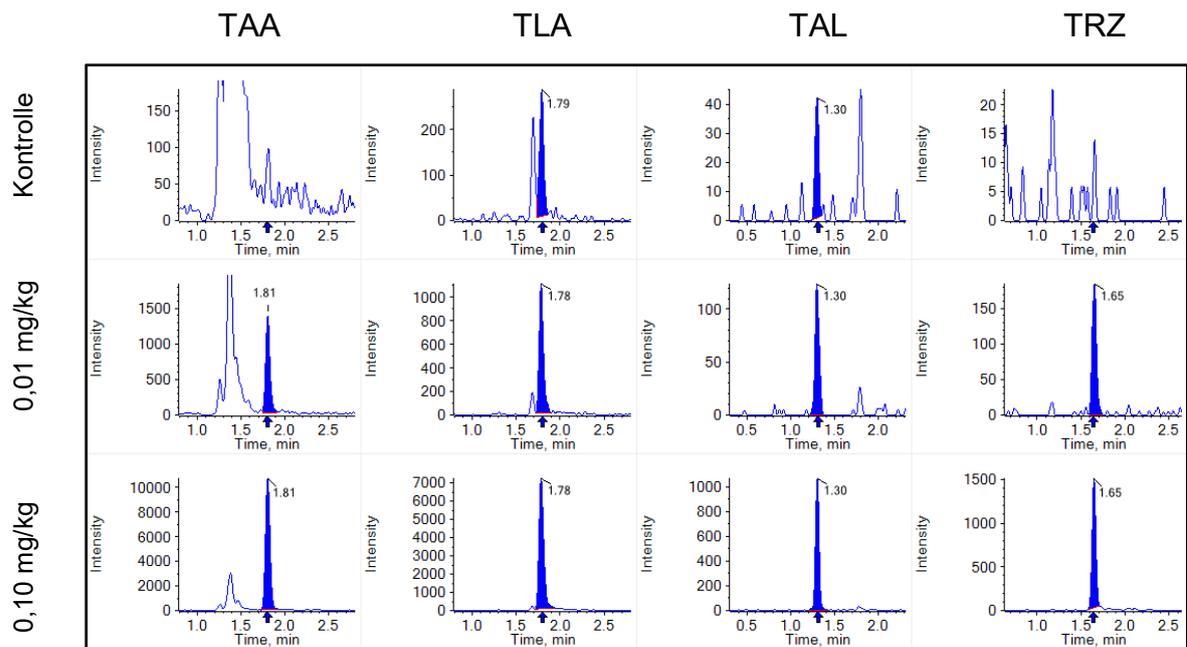


Abb. 142: Validierung LC-MRM<sup>HR</sup> für TDMs in Flachs (Aquisil C18)

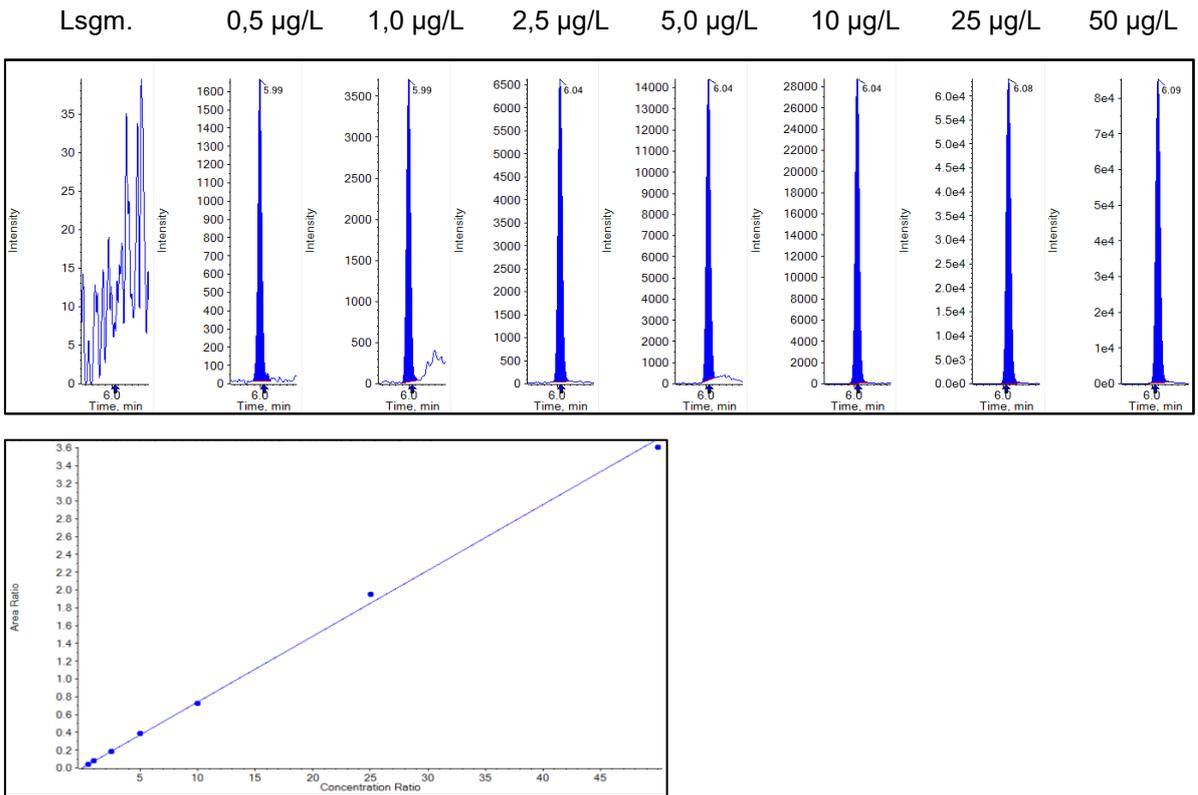


Abb. 143: Lösungsmittelstandards und Kalibrierreihe für TAA (Hypercarb)

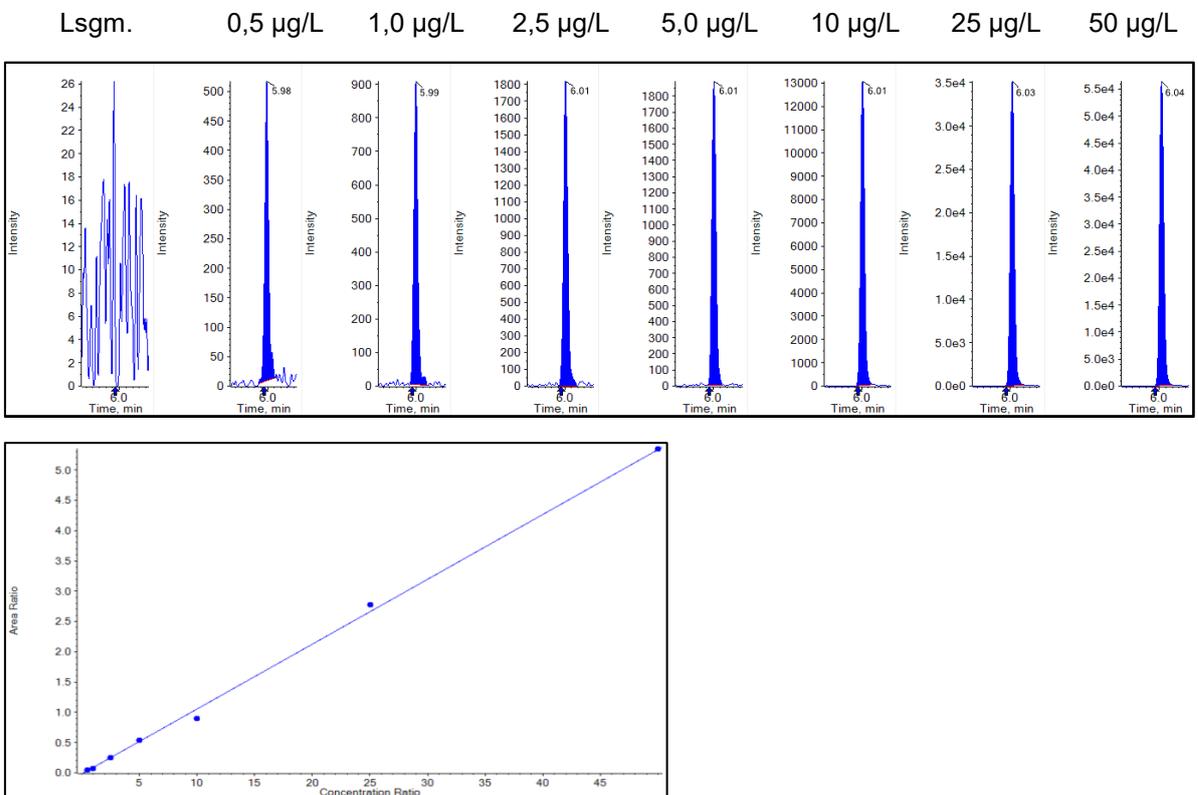


Abb. 144: Lösungsmittelstandards und Kalibrierreihe für TLA (Hypercarb)

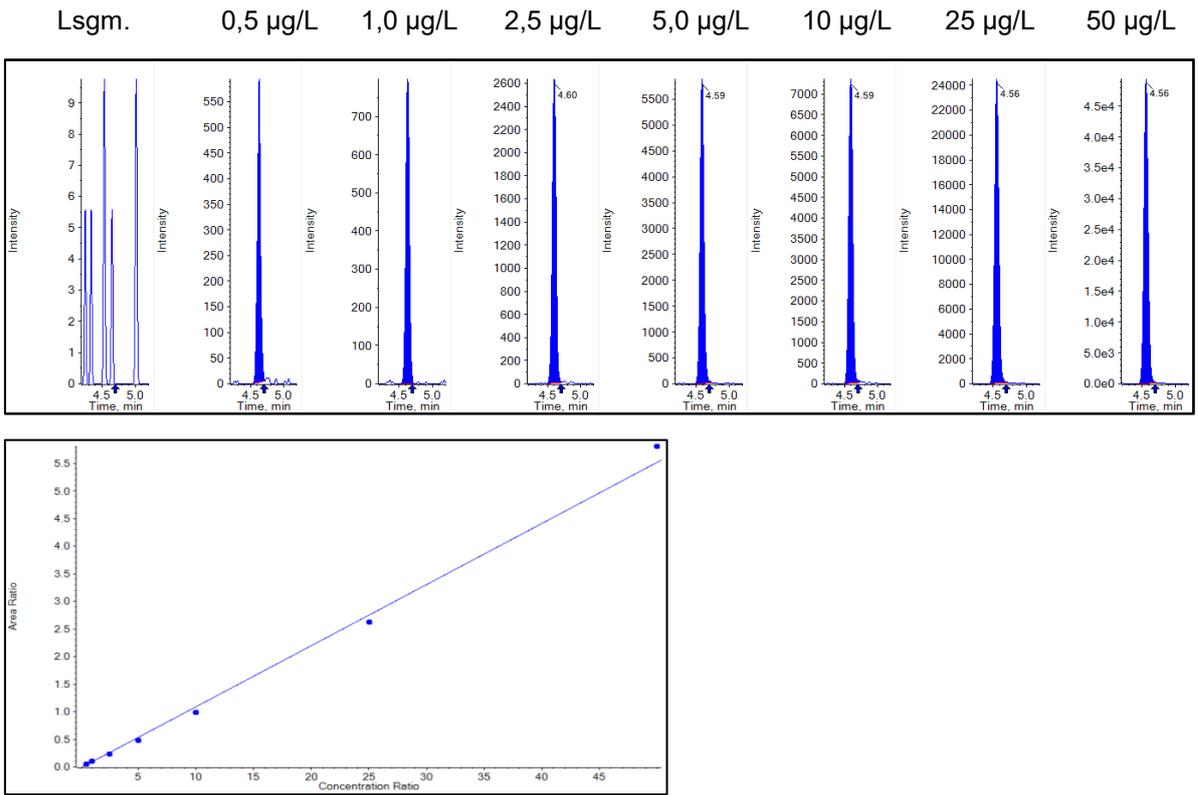


Abb. 145: Lösungsmittelstandards und Kalibrierreihe für TAL (Hypercarb)

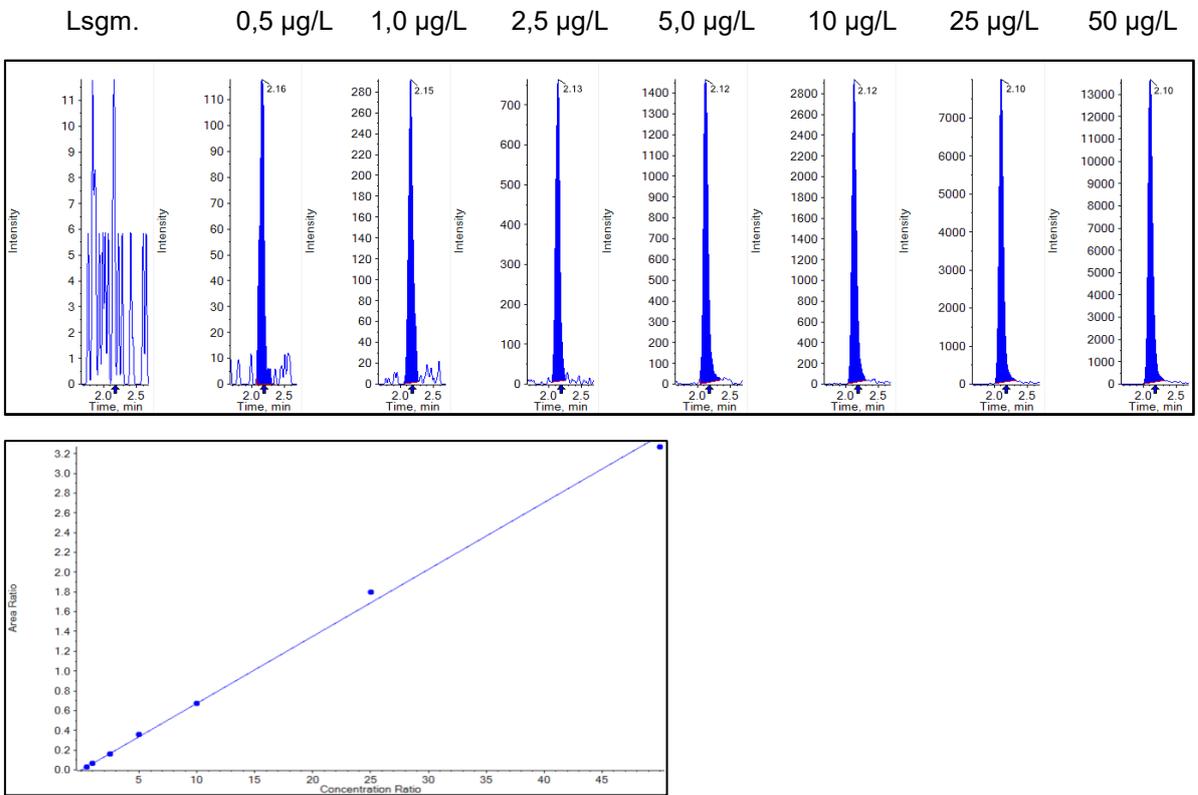


Abb. 146: Lösungsmittelstandards und Kalibrierreihe für TRZ (Hypercarb)

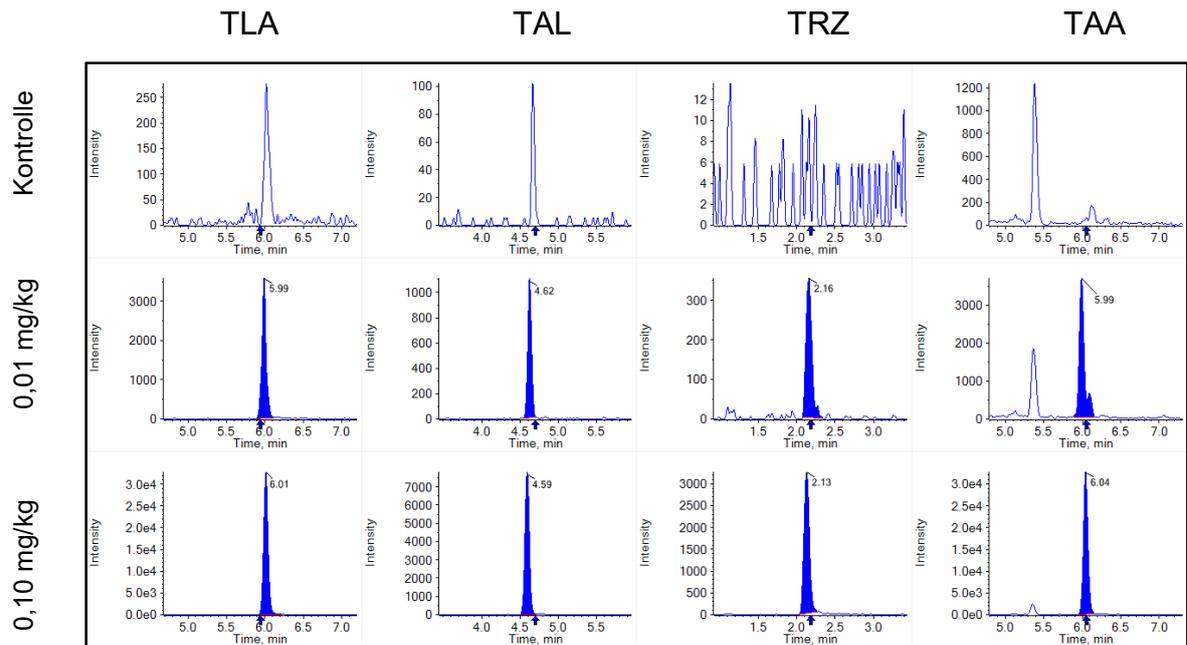


Abb. 147: Validierung LC-MRM<sup>HR</sup> für TDMs in Salat (Hypercarb)

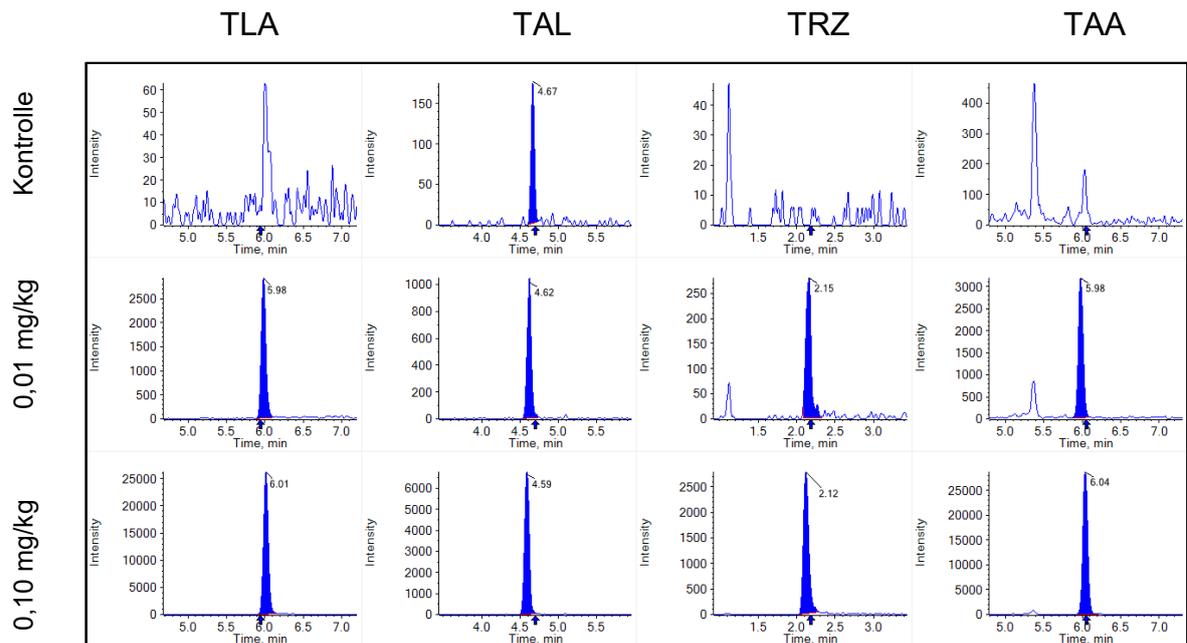


Abb. 148: Validierung LC-MRM<sup>HR</sup> für TDMs in Tomate (Hypercarb)

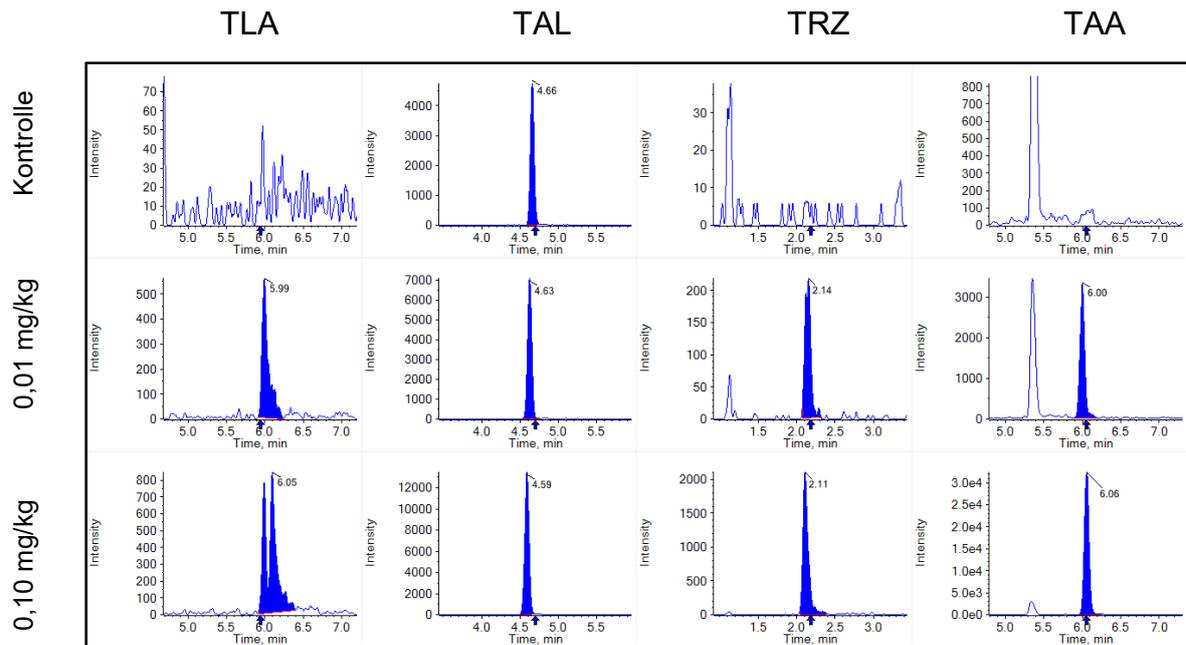


Abb. 149: Validierung LC-MRM<sup>HR</sup> für TDMs in Brokkoli (Hypercarb)

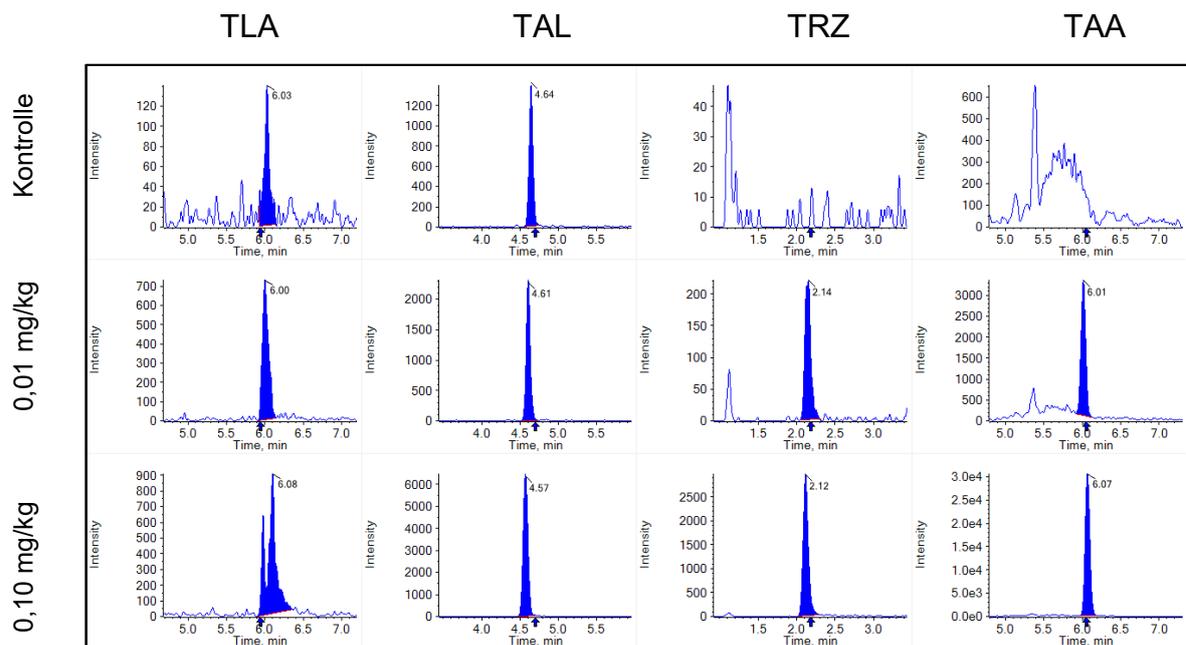


Abb. 150: Validierung LC-MRM<sup>HR</sup> für TDMs in Bohne (Hypercarb)

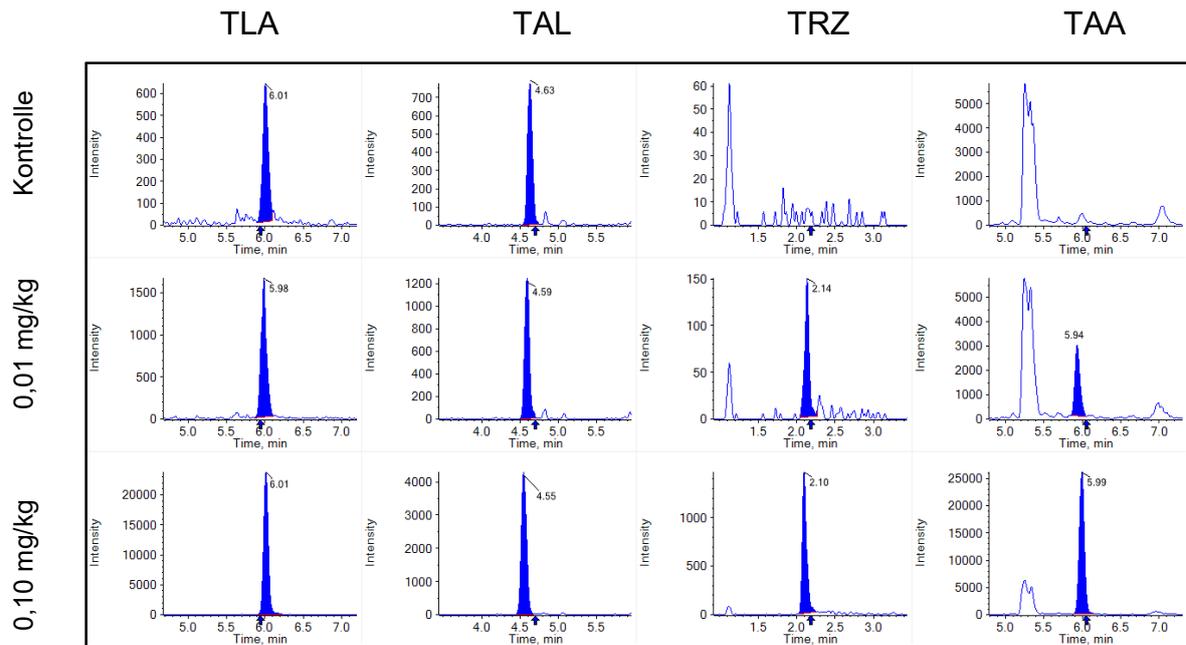


Abb. 151: Validierung LC-MRM<sup>HR</sup> für TDMs in Soja (Hypercarb)

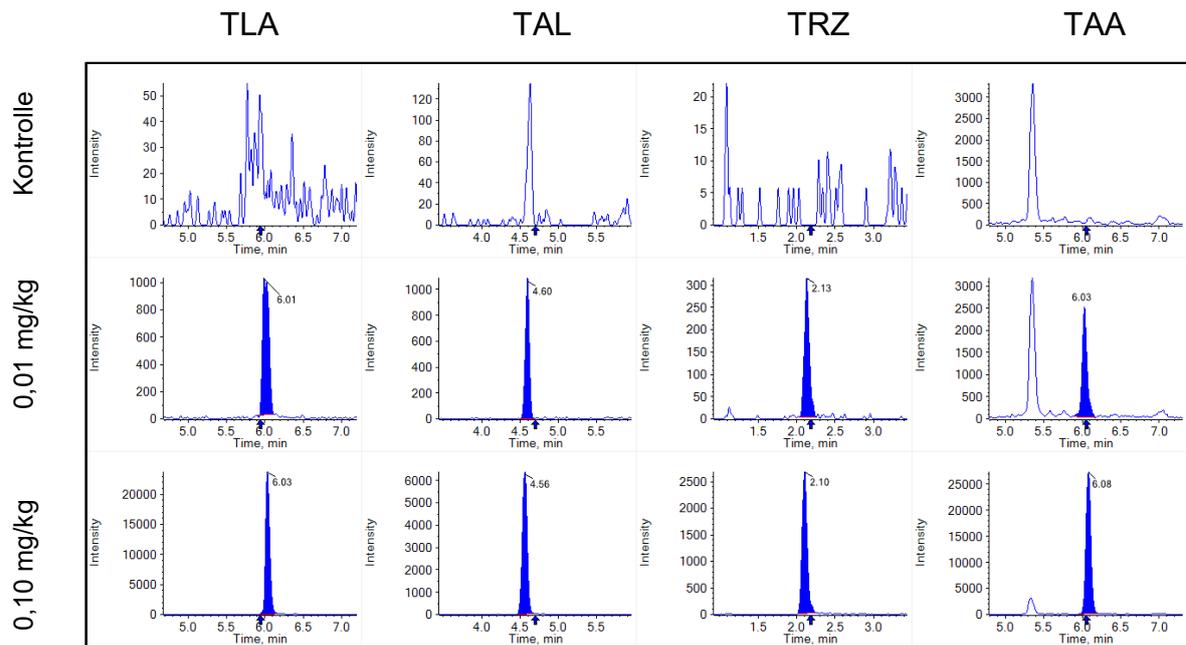


Abb. 152: Validierung LC-MRM<sup>HR</sup> für TDMs in Rübe (Hypercarb)

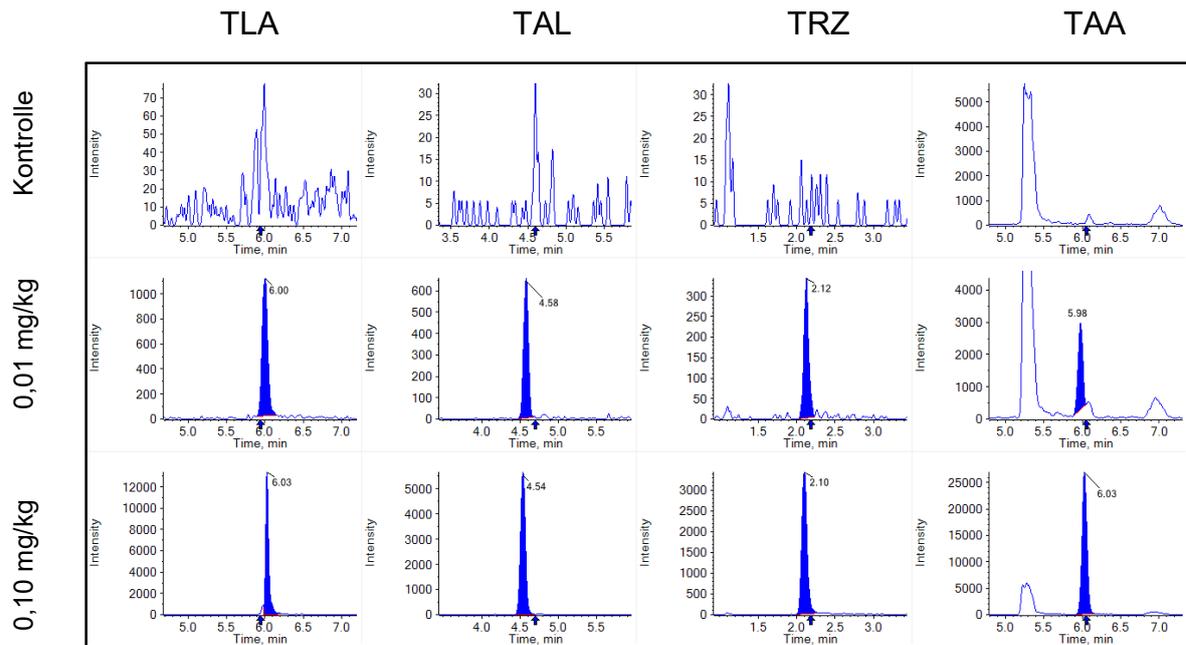


Abb. 153: Validierung LC-MRM<sup>HR</sup> für TDMs in Karotte (Hypercarb)

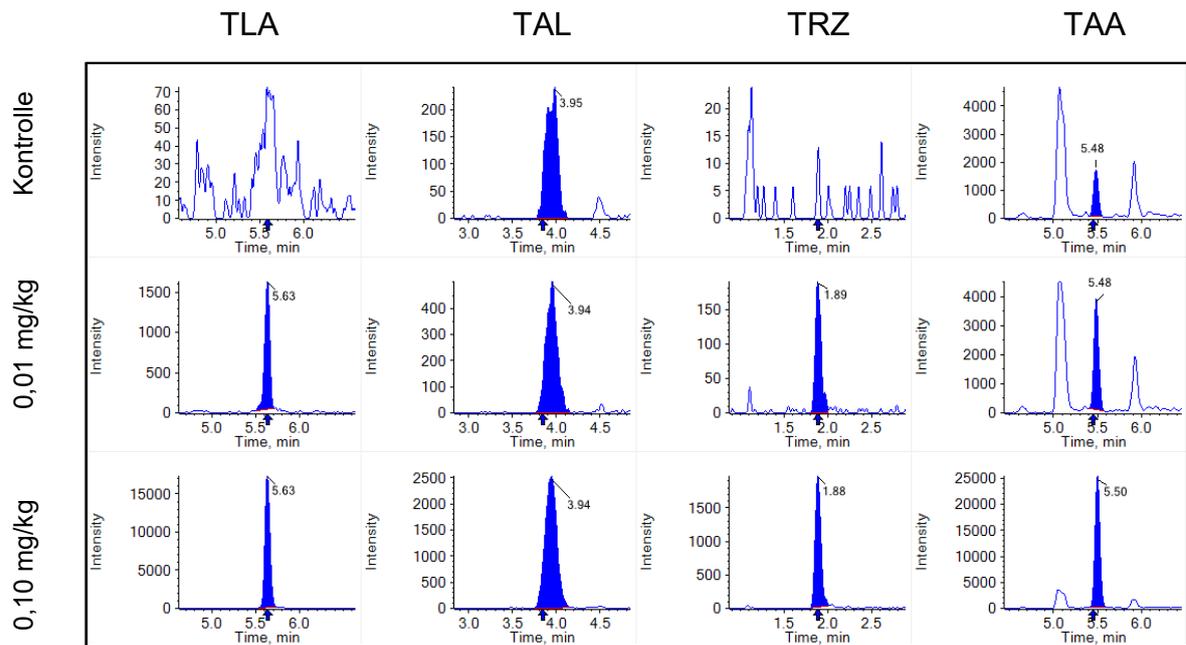


Abb. 154: Validierung LC-MRM<sup>HR</sup> für TDMs in Korn (Hypercarb)

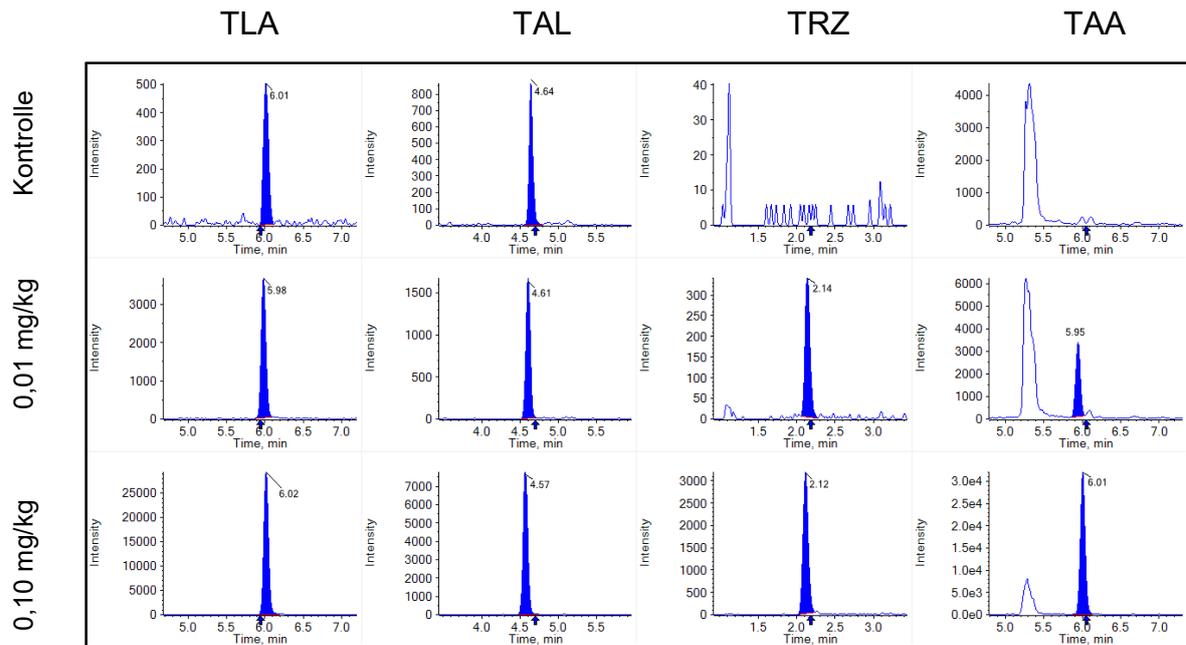


Abb. 155: Validierung LC-MRM<sup>HR</sup> für TDMs in Orange (Hypercarb)

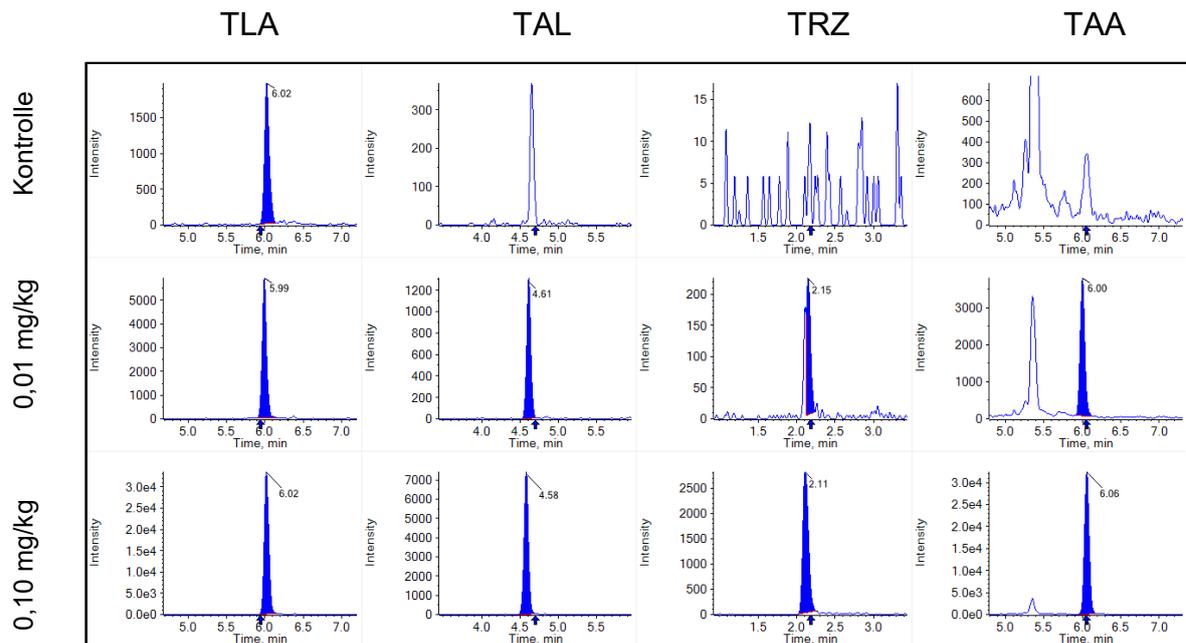


Abb. 156: Validierung LC-MRM<sup>HR</sup> für TDMs in Wein (Hypercarb)

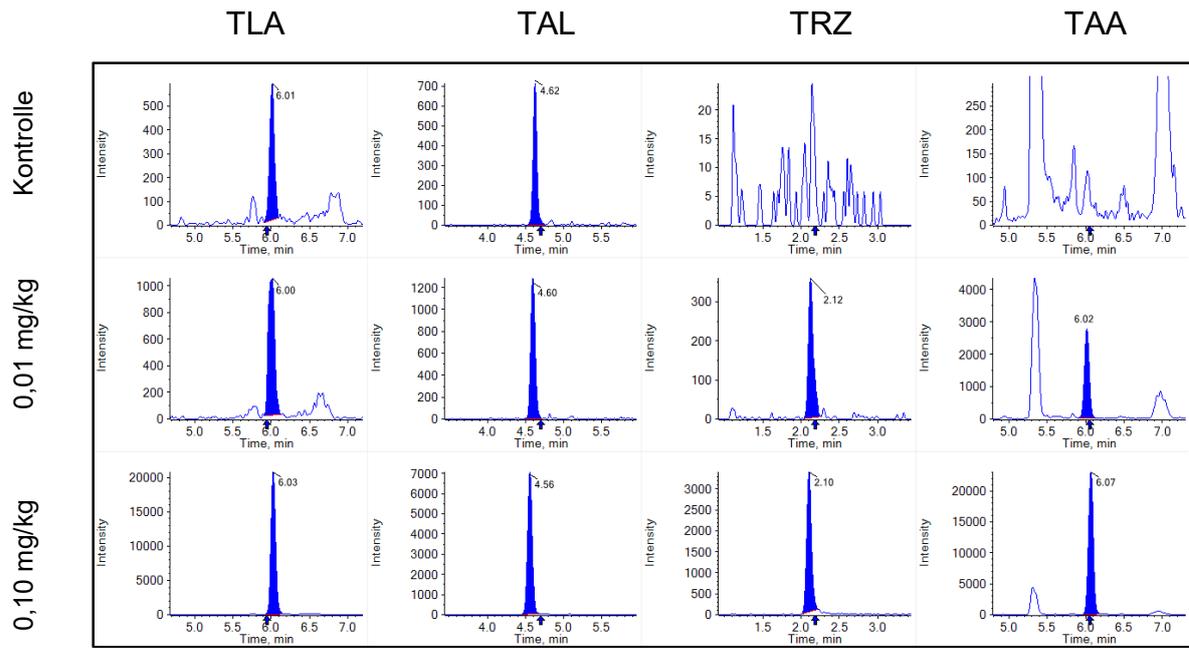


Abb. 157: Validierung LC-MRM<sup>HR</sup> für TDMs in Flachs (Hypercarb)

## 10 Literaturverzeichnis

- [1] Industrieverband Agrar e.V. (iva)  
<http://www.iva.de>
- [2] Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL)  
<http://www.bvl.bund.de>
- [3] M. Petz: DGE-Stellungnahme - Objektive Darstellung der Rückstandsbelastung von Obst und Gemüse  
Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 104. Jahrgang, Heft 1, 2008, 6-14
- [4] W. Schwack, M. Anastassiades, E. Scherbaum: Multimethoden versus Wirkstoffvielfalt - Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln  
Chem. Unserer Zeit, Heft 37, 2003, 324-335
- [5] VO (EG) Nr. 1107/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 21. Oktober 2009 über das Inverkehrbringen von Pflanzenschutzmitteln und zur Aufhebung der Richtlinien 79/117/EWG und 91/414/EWG des Rates  
Stand: 24.11.2009
- [6] Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV)  
<http://www.bmelv.de>
- [7] Informationsbroschüre der Bayer CropScience AG, Standort Monheim
- [8] Richtlinie des Rates vom 15. Juli 1991 über das Inverkehrbringen von Pflanzenschutzmitteln (91/414/EWG)  
Stand: 01.04.2010
- [9] Gesetz zum Schutz der Kulturpflanzen (Pflanzenschutzgesetz)  
Stand: 06.02.2012
- [10] [http://europa.eu/legislation\\_summaries/food\\_safety/plant\\_health\\_checks/l21289\\_de.htm](http://europa.eu/legislation_summaries/food_safety/plant_health_checks/l21289_de.htm)
- [11] F.-X. Reichl: Taschenatlas der Toxikologie, 2. Auflage, 2002, Georg Thieme Verlag Stuttgart
- [12] G. Eisenbrand, M. Metzler, F. J. Hennecke: Toxikologie für Naturwissenschaftler und Mediziner, 3. Auflage, 2005, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA Weinheim

- [13] VO (EG) Nr. 396/2005 des Europäischen Parlaments und des Rates 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  
Stand: 07.11.2009
- [14] J. Hajšlová, J. Zrostlíková: Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices  
Journal of Chromatography A, 1000 (2003), 181-197
- [15] D. Zimmer: Introduction to Quantitative Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS-MS)  
Chromatographia Supplement Vol. 57, 2003, 325-332
- [16] F. Ikegami, Y. Komada, M. Kobori, D. R. Hawkins, I. Murakoshi: Biosynthesis of  $\beta$ -(1,2,4-Triazol-1-yl)alanine in Higher Plants  
Phytochemistry 29 (1990), 2507-2508  
[http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422\(90\)85176-G](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422(90)85176-G)
- [17] U.S. Environmental Protection Agency (2006) DP No. 322215  
[http://www.epa.gov/pesticides/chem\\_search/cleared\\_reviews/csr\\_PC-PC-600011\\_7-Feb-06\\_a.pdf](http://www.epa.gov/pesticides/chem_search/cleared_reviews/csr_PC-PC-600011_7-Feb-06_a.pdf)
- [18] W. Krämer, U. Schirmer: Modern Crop Protection Compounds Volume 1 - 3, 2007, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA Weinheim
- [19] The Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (JMPR) 2009  
FAO Plant Protection Paper 193 (2009)  
[http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests\\_Pesticides/JMPR/JMPRReport08.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/JMPRReport08.pdf)
- [20] Commission Implementing Directive 2011/56/EU (2011)  
<http://www.eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:108:00030:0033:EN:PDF>
- [21] EFSA  
2008 Annual Report on Pesticide Residues according to Article 32 of Regulation (EC) No 396/2005  
<http://www.efsa.europa.eu/de/efsajournal/doc/1646.pdf>
- [22] P.G. Schermerhorn, P.E. Golden, A.J. Krynitsky, W.M. Leimkuehler: Determination of 22 Triazole Compounds Including Parent Fungicides and Metabolites in Apples, Peaches, Flour, and Water by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry  
J. AOAC Int. 88, 1491–1502 (2005)
- [23] C. Philipowski, U. Kuppels, K. Schmeer, W.M. Leimkuehler: Enhanced Through-Put in 1,2,4-Triazole-Analysis by Microwave-Assisted Derivatization  
European Pesticide Workshop 2008, Berlin, Germany

- [24] G.L. Westberg: Determination of 1,2,4-Triazole, Triazole Alanine and Triazole Acetic Acid Residues in Plant and Animal Matrices, Morse Laboratories, Inc., Analytical Method 160 (2005)  
[http://ir4.rutgers.edu/Other/Analytical\\_Methods/triazol\\_metabolite-011.pdf](http://ir4.rutgers.edu/Other/Analytical_Methods/triazol_metabolite-011.pdf)
- [25] C.E. Wujcik, T.M. Cahill, J.N. Seiber: Extraction and Analysis of Trifluoroacetic Acid in Environmental Waters  
*Anal. Chem.*, 70, 4074-4080 (1998)
- [26] H. Frank, D. Renschen, A. Klein, H. Scholl: Trace Analysis of Airborne Haloactates  
*J. High Resolut. Chromatogr.*, 18, 83-88 (1995)
- [27] K. Hettiarachchi, S. Ridge: Capillary electrophoretic determination of acetic acid and trifluoroacetic acid in synthetic peptide samples  
*Journal of Chromatography A*, 817, 153-161 (1998)
- [28] M.A. Strege, W.G. Mascher: Analysis of trifluoroacetic acid in lyophilized natural products by capillary electrophoresis  
*Journal of Chromatography B*, 697, 255-257 (1997)
- [29] S. Kim, L.B. Collins, G. Boysen, J.A. Swenberg, A. Gold, L.M. Ball, B.U. Bradford, I. Rusyn: Liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry analysis method for simultaneous detection of trichloroacetic acid, dichloroacetic acid, S-(1,2-dichlorovinyl)glutathione and S-(1,2-dichlorovinyl)-L-cysteine  
*Toxicology*, 262, 230-238 (2009)
- [30] A.D. Delinsky, D.C. Delinsky, S. Muralidhara, J.W. Fisher, J.V. Bruckner, M.G. Bartlett: Analysis of dichloroacetic acid in rat blood and tissues by hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry  
*Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19, 1075-1083 (2005)
- [31] C. Chen, S. Chang, G. Wang: Determination of ten haloacetic acids in drinking water using high-performance and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry  
*Journal of Chromatographic Science*, 47, 67-74 (2009)
- [32] BVL Pflanzenschutzverzeichnis 2011 Teil 1 + 2, 59. Auflage 2011, Braunschweig
- [33] BVL Pflanzenschutzverzeichnis 2013 Teil 1 + 2, 61. Auflage 2013, Braunschweig
- [34] Royal Society of Chemistry  
<http://www.rsc.org/pdf/general/17etheph.pdf>

- [35] BfR-Datensammlung von Rückstandsdefinitionen für Pflanzenschutzmittelwirkstoffe (Rückstandsdefinitionen für die Überwachung und die Risikobewertung)  
Stand: 30.06.2009
- [36] EU Pesticides Database Regulation (EC) No 396/2005  
Stand: 18.04.2014  
[http://ec.europa.eu/sanco\\_pesticides/public/index.cfm?event=homepage&CFID=47339&CFTOKEN=59463540&jsessionid=08a0be912bf8c9b8ba283c567e575475ef52TR](http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm?event=homepage&CFID=47339&CFTOKEN=59463540&jsessionid=08a0be912bf8c9b8ba283c567e575475ef52TR)
- [37] Extension Toxicology Network  
<http://extoxnet.orst.edu/pips/ethephon.htm>
- [38] BfR: Gesundheitliche Bewertung von Ethephon-Rückständen in Paprika, Stellungnahme Nr. 001/2011, 19.01.2011
- [39] S. Krautz, G.Hanika: Eine einfache und schnelle gaschromatographische Bestimmung von Ethephon in Obst, Gemüse und Getreide mittels Head-space-Analyse  
Molecular Nutrition & Food Research, 34, 569-570 (1990)
- [40] J. Hurter, M. Manser, B. Zimmerli: A rapid and simple method for the determination of residues of 2-chloroethylphosphonic acid (ethephon) in tomatoes, cherries, and apples  
J. Agric. Food Chem., 26, 472–475 (1978)
- [41] J. Efer, S. Müller, W. Engewald, T. Knobloch, K. Levsen: Indirect GC determination of ethephon in drinking water by a combination of reactive headspace sampling with adsorptive enrichment/thermal desorption  
Chromatographia, 37, 361-364 (1993)
- [42] W.P. Cochrane, R. Greenhalgh, N.E. Looney: Gas-liquid chromatographic analysis of ethephon and fenoprop residues in apples and their decline before and after harvest  
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 59, 617-621 (1976)
- [43] S. Takenaka: New Method for Ethephon ((2-Chloroethyl)phosphonic Acid) Residue Analysis, and Detection of Residual Levels in the Fruit and Vegetables of Western Japan  
J. Agric. Food Chem., 50, 7515–7519 (2002)
- [44] Z. Guo, Q. Cai, Z. Yang: Ion chromatography/inductively coupled plasma mass spectrometry for simultaneous determination of glyphosate, Glufosinat, fosamine and ethephon at nanogram levels in water  
Rapid Commun Mass Spectrom., 21, 1606-1612 (2007)

- [45] M. Dusek, P. Cuhra, S. Barsova: Use of ion chromatography-electrospray mass spectrometry for the determination of glyphosate, Glufosinat and ethephon in foods of plant origin European Pesticide Workshop 2010, Strasbourg, Germany
- [46] E.W.J. Hooijschuur, C.E. Kientz, J. Dijkman, U. A. T. Brinkman: Potential of microcolumn liquid chromatography and capillary electrophoresis with flame photometric detection for determination of polar phosphorus-containing pesticides *Chromatographia*, 54, 295-301 (2001)
- [47] J.M. Marín, O.J. Pozo, J. Beltrán, F. Hernández: An ion-pairing liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of ethephon residues in vegetables *Rapid Commun Mass Spectrom.*, 20, 419-426 (2006)
- [48] EFSA Scientific Report 54, 1-79 (2005)  
<http://www.efsa.europa.eu/de/efsajournal/doc/54r.pdf>
- [49] EFSA Statement on the dietary risk assessment for proposed temporary maximum residue levels (t-MRLs) for Fosetyl-Al in certain crops *EFSA Journal* 12(5):3695 (2014)  
<http://www.efsa.europa.eu/de/efsajournal/doc/3695.pdf>
- [50] J.P. Mercier, P. Chaimbault, P. Morin, M. Dreux, A. Tambute: Identification of phosphonic acids by capillary electrophoresis-ionspray mass spectrometry *Journal of Chromatography A*, 825, 71-80 (1998)
- [51] J.-P. Mercier, P. Morin, M. Dreux: Combination of LC-MS and CE-MS Analysis for the Separation and the Identification of Phosphonic Acids *Chimia*, 53, 511-514 (1999)
- [52] C. Cox: Herbicide Factsheet Glufosinat *Journal of Pesticide Reform*, 16 (4) (1996)
- [53] The Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (JMPR) 2012 *FAO Plant Production and Protection Paper* 215 (2012)  
<http://www.google.de/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0CC4QFjAB&url=http%3A%2F%2Fapps.who.int%2Fpesticide-residues-jmpr-database%2FDocument%2F61&ei=gMrzU4qwGln9ywPo8oLICw&usg=AFQjCNGREgAw2JP-LoCqNXxl1U4UficCOw&bvm=bv.73231344,d.bGQ>

- [54] BfR: Fragen und Antworten zu Spuren von gentechnisch verändertem Reis in Lebensmitteln (FAQ vom 06. Oktober 2006)  
[http://www.bfr.bund.de/de/fragen\\_und\\_antworten\\_zu\\_spuren\\_von\\_gentechnisch\\_veraendertem\\_reis\\_in\\_lebensmitteln-8368.html](http://www.bfr.bund.de/de/fragen_und_antworten_zu_spuren_von_gentechnisch_veraendertem_reis_in_lebensmitteln-8368.html)
- [55] Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL): Änderung der Zulassung des Pflanzenschutzmittels Basta  
[http://www.bvl.bund.de/DE/04\\_Pflanzenschutzmittel/05\\_Fachmeldungen/2013/2013\\_11\\_08\\_Fa\\_%C3%84nderung\\_Zulassung\\_Pflanzenschutzmittel\\_Basta.html](http://www.bvl.bund.de/DE/04_Pflanzenschutzmittel/05_Fachmeldungen/2013/2013_11_08_Fa_%C3%84nderung_Zulassung_Pflanzenschutzmittel_Basta.html)
- [56] Durchführungsverordnung (EU) Nr. 365/2013 der Kommission vom 22. April 2013 zur Änderung der Durchführungsverordnung (EU) Nr. 540/2011 hinsichtlich der Bedingungen für die Genehmigung des Wirkstoffs Glufosinat  
 Stand: 23.04.2013
- [57] The Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (JMPR) 1999  
 FAO Plant Production and Protection Paper 157 (1999)  
[http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests\\_Pesticides/JMPR/Evaluation99/19Glufosinat.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Evaluation99/19Glufosinat.pdf)
- [58] A.E. Smith: Transformation of the herbicide [<sup>14</sup>C]Glufosinat in soils  
*J. Agric. Food Chem.*, 37, 267–271 (1989)
- [59] M. Tsuji, Y. Akiyama, M. Yano: Simultaneous Determination of Glufosinat and Glyphosate in Crops  
*Analytical Sciences*, 13, 283-286 (1997)
- [60] A. Royer, S. Beguin, H. Sochor, P.-Y. Communal: Determination of Glufosinat Ammonium and Its Metabolite (AE F064619 and AE F061517) Residues in Water by Gas Chromatography with Tandem Mass Spectrometry after Ion Exchange Cleanup and Derivatization  
*J. Agric. Food Chem.*, 48, 5184–5189 (2000)
- [61] S. Watanabe: Simultaneous Analysis of Glyphosate and Glufosinat in Vegetables and Fruits by GC-FPD  
*Journal of the Food Hygienic Society in Japan*, 45, 38-43 (2004)
- [62] H. Kataoka, S. Ryu, N. Sakiyama, M. Makita: Simple and rapid determination of the herbicides glyphosate and Glufosinat in river water, soil and carrot samples by gas chromatography with flame photometric detection  
*Journal of Chromatography A*, 726, 253-258 (1996)
- [63] N. Tsunoda: Simultaneous determination of the herbicides glyphosate, Glufosinat and bialaphos and their metabolites by capillary gas chromatography-ion-trap mass spectrometry  
*Journal of Chromatography A*, 637, 167-173 (1993)

- [64] C.D. Stalikas, C.N. Konidari: Analytical methods to determine phosphonic and amino acid group-containing pesticides  
Journal of Chromatography A, 907, 1-19 (2001)
- [65] J.V. Sancho, F.J. López, F. Hernández, E.A. Hogendoorn, P. van Zoonen: Rapid determination of Glufosinat in environmental water samples using 9-fluorenylmethoxycarbonyl precolumn derivatization, large-volume injection and coupled-column liquid chromatography  
Journal of Chromatography A, 678, 59-67 (1994)
- [66] J.V. Sancho, F. Hernández, F.J. López, E.A. Hogendoorn, E. Dijkman: Rapid determination of Glufosinat, glyphosate and aminomethylphosphonic acid in environmental water samples using precolumn fluorogenic labeling and coupled-column liquid chromatography  
Journal of Chromatography A, 737, 75-83 (1996)
- [67] R.J. Vreeken, P. Speksnijder, I. Bobeldijk-Pastorova, Th.H.M. Noij: Selective analysis of the herbicides glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water by on-line solid-phase extraction–high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry  
Journal of Chromatography A, 794, 187-199 (1998)
- [68] L. Goodwin, J.R. Startin, B.J. Keely, D.M. Goodall: Analysis of glyphosate and Glufosinat by capillary electrophoresis-mass spectrometry utilizing a sheathless microelectrospray interface  
Journal of Chromatography A, 1004, 107-119 (2003)
- [69] T. Asami, H. Imura, A. Ohashi, K. Ohashi, T. Ishiwata: Absolute Determination Method Using Chirality for Glufosinat and Bialaphos by  $\gamma$ -Cyclodextrin Modified Capillary Zone Electrophoresis  
Analytical Science, 21, 31-35 (2005)
- [70] S.Y. Chang, C. Liao: Analysis of glyphosate and aminomethylphosphonic acid by capillary electrophoresis with indirect fluorescence detection  
Journal of Chromatography A, 959, 309-315 (2002)
- [71] M. Molina, M. Silva: In-capillary derivatization and analysis of amino acids, amino phosphonic acid-herbicides and biogenic amines by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection  
Electrophoresis, 23, 2333-2340 (2002)
- [72] Modulare Multimethode zur Bestimmung von Pflanzenschutzmittelrückständen in Lebensmitteln  
Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG, L00.00-34, November 1999, Beuth Verlag Berlin

- [73] J. Klein, L. Alder: Applicability of Gradient Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry to the Simultaneous Screening for About 100 Pesticides in Crops  
Journal of AOAC International, Vol. 86, No. 5, 2003, 1015-1037
- [74] M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Štajnbaher, F.J. Schenk: Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the Determination of Pesticide Residues in Produce  
Journal of AOAC International, Vol. 86, No. 2, 2003, 412-431
- [75] Pflanzliche Lebensmittel - Bestimmung von Pestizidrückständen mit GC-MS und/oder LC-MS(/MS) nach Acetonitril-Extraktion/Verteilung und Aufreinigung mit dispersiver SPE  
DIN EN 15662, Entwurf, Juni 2007
- [76] K. Camman: Instrumentelle Analytische Chemie - Verfahren, Anwendungen, Qualitätssicherung, 1. Auflage, 2001, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin
- [77] M. Anastassiades, J. Hepperle, D. Roux, I. Sigalov, D. Mack: Extractability of Incurred Residues using QuEChERS  
European Pesticide Workshop 2010, Strasbourg, France
- [78] J. Cook, M.P. Beckett, B. Reliford, W. Hammock, M. Engel: Multiresidue Analysis of Pesticides in Fresh Fruits and Vegetables Using Procedures Developed by the Florida Department of Agriculture and Consumer Services  
Journal of AOAC International, Vol. 82, No. 6, 1999, 1419-1435
- [79] C. Ferrer, A. Lozano, A. Agüera, A.J. Girón, A.R. Fernández-Alba: Overcoming Matrix Effects Using the Dilution Approach in Multiresidue Methods For Fruits And Vegetables  
5th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis 2011, Prague, Czech Republic
- [80] H. Sun, Z. Yang, K. Wang: Evaluation of Matrix Effects for Dilute-and-Shoot LC-MS/MS Analysis of Carbendazim in Orange Juice and Wine  
American Society for mass Spectrometry, 2013, Minneapolis, USA
- [81] H.-J. Hübschmann: Handbuch der GC/MS, 1996, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA Weinheim
- [82] U. Beyer: ABC der Probenvorbereitung (2) - (11)  
[http://www.analytik-news.de/Fachartikel/Volltext/ABC\\_Probenvorbereitung\\_2.pdf](http://www.analytik-news.de/Fachartikel/Volltext/ABC_Probenvorbereitung_2.pdf)  
[http://www.analytik-news.de/Fachartikel/Volltext/ABC\\_Probenvorbereitung\\_3.pdf](http://www.analytik-news.de/Fachartikel/Volltext/ABC_Probenvorbereitung_3.pdf)  
[http://www.analytik-news.de/Fachartikel/Volltext/ABC\\_Probenvorbereitung\\_4.pdf](http://www.analytik-news.de/Fachartikel/Volltext/ABC_Probenvorbereitung_4.pdf)

- [http://www.analytik-news.de/Fachartikel/Volltext/ABC\\_Probenvorbereitung\\_5.pdf](http://www.analytik-news.de/Fachartikel/Volltext/ABC_Probenvorbereitung_5.pdf)  
[http://www.analytik-news.de/Fachartikel/Volltext/ABC\\_Probenvorbereitung\\_6.pdf](http://www.analytik-news.de/Fachartikel/Volltext/ABC_Probenvorbereitung_6.pdf)  
[http://www.analytik-news.de/Fachartikel/Volltext/ABC\\_Probenvorbereitung\\_7.pdf](http://www.analytik-news.de/Fachartikel/Volltext/ABC_Probenvorbereitung_7.pdf)  
[http://www.analytik-news.de/Fachartikel/Volltext/ABC\\_Probenvorbereitung\\_8.pdf](http://www.analytik-news.de/Fachartikel/Volltext/ABC_Probenvorbereitung_8.pdf)  
[http://www.analytik-news.de/Fachartikel/Volltext/ABC\\_Probenvorbereitung\\_9.pdf](http://www.analytik-news.de/Fachartikel/Volltext/ABC_Probenvorbereitung_9.pdf)  
[http://www.analytik-news.de/Fachartikel/Volltext/ABC\\_Probenvorbereitung\\_10.pdf](http://www.analytik-news.de/Fachartikel/Volltext/ABC_Probenvorbereitung_10.pdf)  
[http://www.analytik-news.de/Fachartikel/Volltext/ABC\\_Probenvorbereitung\\_11.pdf](http://www.analytik-news.de/Fachartikel/Volltext/ABC_Probenvorbereitung_11.pdf)
- [83] <https://www.merckmillipore.com/DE/de/analytics-and-sample-preparation/sequant/what-is-hilic/lh2b.qB.xfgAAFFw6lcWdZp,nav?bd=1>
- [84] ChemIDplus Advanced  
<http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>
- [85] <http://www.chemie.de/lexikon/Henderson-Hasselbalch-Gleichung.html>
- [86] SANTE/11813/2017  
Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed  
Stand: 21.-22.1.2017 Revision 0
- [87] OECD ENV/JM/ ENV/JM/MONO(2007)17  
OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 72 and Series on Pesticides No. 39  
Guidance Document on pesticide residue analytical methods  
Stand: 13.08.2007
- [88] K.-H. Büchel, K.-J. Reubke, E. Schaumann, H. Dehne: Houben-Weyl Methods of Organic Chemistry Vol. E 8d, 4. Auflage, 1994, Georg Thieme Verlag Stuttgart
- [89] Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB)  
Stand: 01.09.2005
- [90] R. Matissek, G. Steiner: Lebensmittelanalytik, 3. Auflage, 2006, Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- [91] Chemgapedia  
<http://www.chemgapedia.de/>

- [92] W. Baltes, L.W. Kroh: Schnellmethoden zur Beurteilung von Lebensmitteln und ihren Rohstoffen, 3. Auflage, 2004, B. Behr's Verlag GmbH und Co. KG Hamburg
- [93] D.N. Heiger: High Performance Capillary Electrophoresis - An Introduction, 2. Auflage, 1992, Hewlett-Packard GmbH Waldbronn
- [94] H. Budzikiewicz: Massenspektrometrie - Eine Einführung, 4. Auflage, 1998, Verlag GmbH & Co. KGaA Weinheim
- [95] B.B. Schneider, T.R. Covey, S.L. Coy, E.V. Krylov, E.G. Nazarov: Planar differential mobility spectrometer as a pre-filter for atmospheric pressure ionization mass spectrometry  
International Journal of Mass Spectrometry, Vol. 298, 2010, 45-54
- [96] B.B. Schneider, T.R. Covey, S.L. Coy, E.V. Krylov, E.G. Nazarov: Control of chemical effects in the separation process of a differential mobility mass spectrometer system  
European Journal of Mass Spectrometry, Vol. 16, 2010, 57-71
- [97] B.B. Schneider, T.R. Covey, S.L. Coy, E.V. Krylov, E.G. Nazarov: Chemical Effects in the Separation Process of a Differential Mobility / Mass Spectrometer System  
Anal. Chem., Vol. 82, 2010, 1867-1880
- [98] ChemSpider Datenbank  
<http://www.chemspider.com/>
- [99] B. Fonslow, S. Lock, W. Hall, S. Walse: Improving Identification and Quantification of Polar Herbicides by CESI-MS  
AB SCIEX Publication Number RUO-MKT-07-4555-A
- [100] D. Jensen: Analytik von stark polaren und/oder ionischen Pestiziden per IC-MS/MS  
Langenauer Wasserforum 2017, Langenau, Deutschland
- [101] J. Jasak, D. Kühne, A. Lagojda, G. Ross, K. Speer, P. Billian, R.M. Schöning: Residue Analysis of Highly Polar Pesticide Compounds / Appropriate Separation Techniques  
6th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis 2012, Prague, Czech Republic
- [102] J. Jasak, K. Speer, P. Billian, S. Stuke, R.M. Schöning: Using High Sensitive but Non-Selective Mass Transitions for the Residue Analysis with Quadrupole-Time-of-Flight  
5th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis 2011, Prague, Czech Republic

- [103] D.I. Ströher Kolberg, C. Wildgrube, D. Mack, E. Scherbaum, M. Anastassiades: Determination of Triazole Derivative Metabolites in Fruits and Vegetables  
Using the QuPPE Method and Differential Mobility Spectrometry (DMS)  
European Pesticide Workshop 2014, Dublin, Ireland

## 11 Versicherung und Erklärung gemäß §5 der Promotionsordnung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die praktischen Arbeiten wurden bei der Bayer CropScience AG unter Betreuung von Herrn Dr. Patrick Billian und Herrn Ralf M. Schöning durchgeführt. Die wissenschaftliche Betreuung erfolgte durch Herrn Prof. Dr. Karl Speer (Professur für spezielle Lebensmittelchemie und Lebensmittelproduktion, Technische Universität Dresden).

Dresden, den 19.07.2018

Julia Jasak