



UNIVERSITAT
JAUME I

Nuevas aportaciones de LC-MS
con analizadores de triple cuadrupolo y
tiempo de vuelo en el análisis de
residuos de plaguicidas y metabolitos
en alimentos de origen vegetal

Tesis Doctoral
Susana Grimalt Brea
2009



Dr. Félix Hernández Hernández, Catedrático de Química Analítica, y
Dr. Juan Vicente Sancho Llopis, Profesor Titular de Química Analítica,
de la Universitat Jaume I de Castellón,

CERTIFICAN: que la Tesis Doctoral *“Nuevas aportaciones de LC-MS con analizadores de triple cuadrupolo y tiempo de vuelo en el análisis de residuos de plaguicidas y metabolitos en alimentos de origen vegetal”* ha sido desarrollada bajo su dirección, en el área de Química Analítica, en el Instituto Universitario de Plaguicidas y Aguas, Departamento de Química Física y Analítica de la Universitat Jaume I de Castellón, por **Susana Grimalt Brea**.

Lo que certificamos para efectos oportunos en Castellón de la Plana, a 21 de Septiembre del 2009.

Fdo. Dr. Félix Hernández Hernández **Fdo.** Dr. Juan Vicente Sancho Llopis

Esta Tesis ha sido realizada, y consecuentemente será defendida, con el propósito de obtener el título de Doctorado en Química de la Universitat Jaume I.

Previamente a la defensa de la Tesis Doctoral, este trabajo ha sido evaluado por tres censoras directamente relacionadas con el área de investigación de Química Analítica, e independientes a nuestro grupo de investigación, Dra. Rosa María Marcé Recasens (*Universitat Rovira i Virgili, Departament de Química Analítica i Química Orgànica, Tarragona*), Dra. Yolanda Picó García (*Universitat de València, Departament de Medicina Preventiva i Salut Pública, Ciències de l'Alimentació, Toxicologia i Medicina Legal, Valencia*) y Dra. Immaculada Ferrer (*University of Colorado, Center for Environmental Mass Spectrometry (CEMS) Department of Civil, Environmental and Architectural Engineering, Colorado*).

Índice de contenido

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN.....	5
I.1.-Determinación de residuos de plaguicidas y metabolitos en muestras de alimentos	10
I.2.- Metodología analítica para el tratamiento de muestras de alimentos.....	12
I.3.- Cromatografía Líquida (LC)	19
I.3.1. Cromatografía líquida en fase reversa	19
I.3.2. Cromatografía líquida de compuestos iónicos	20
I.3.3. Cromatografía líquida de compuestos quirales.....	21
I.3.4. Nuevas aportaciones en el campo de la cromatografía líquida: UHPLC.....	23
I.4.- Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS)	26
I.4.1. Modos de ionización: interfases de ionización a presión atmosférica...27	
I.4.2. Analizadores de espectrometría de masas.....	32
I.4.3. Espectrometría de masas en tándem (MS/MS): modos de adquisición	35
I.4.4. Tratamiento de los datos adquiridos por LC-MS.....	41
I.5.- Problemática en la determinación de residuos de plaguicidas en muestras de alimentos por LC-MS	43
I.5.1. Efecto matriz.....	43
I.5.2. Rango de linealidad	51
I.5.3. Calibración y exactitud de masa	52
I.6.- Actividades de aseguramiento de la calidad en la determinación de plaguicidas en alimentos por LC-MS/MS	54
I.6.1. Aplicación de las Buenas Prácticas de Laboratorio	54

1.6.2. Control de calidad en el análisis de muestras reales	56
1.6.3. Confirmación de los análisis	56
1.6.- Referencias bibliográficas	59
OBJETIVOS, METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO	65
PARTE I: Analizador de triple cuadrupolo	77
Capítulo 1: Estrategias de análisis por LC-MS/MS para plaguicidas con especial dificultad analítica por GC-M	79
1.1.- Introducción capítulo 1	81
1.1.1.- Referencias bibliográficas	85
1.2.- Plaguicidas de baja estabilidad térmica: Triclorfon como caso de estudio ..87	
1.2.1.- Introducción	89
1.2.2.- Artículo científico 1: <i>Analytical Study of Trichlorfon Residue in kaki Fruit and Cauliflower Samples by Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry</i>	93
1.2.3.- Discusión de los resultados	115
1.2.4.- Referencias bibliográficas	121
1.3.- Plaguicidas de bajo peso molecular y alta polaridad: Ciromazina y su metabolito melamina como caso de estudio	123
1.3.1.- Introducción	125
1.3.2.- Artículo científico 2: <i>Residue Determination of Cyromazine and its Metabolite Melamine in Chard Samples by Ion-Pair Liquid Chromatography coupled to Electrospray Tandem Mass Spectrometry</i>	129
1.3.3.- Discusión de los resultados	145
1.3.4.- Referencias bibliográficas	149
1.4.- Plaguicidas de carácter iónico: Fosetil-Aluminio como caso de estudio ...153	
1.4.1.- Introducción	155

1.4.2.- Artículo científico 3: <i>Rapid Determination of Fosetyl-Aluminum Residues in Lettuce by Liquid Chromatography/Electrospray Tandem Mass Spectrometry ...</i>	159
1.4.3.- Discusión de los resultados	175
1.4.4.- Referencias bibliográficas	179
Capítulo 2: Estudio de la formación de aductos en interfases a presión atmosférica (ESI y APCI) para la determinación de compuestos de baja ionización. Abamectina y Azadiractina como casos de estudio	183
2.1.- Introducción capítulo 2	185
2.1.1.- Referencias bibliográficas	191
2.2.- Evaluación de las Fuentes de ionización ESI, APCI y APCI Sabre para la determinación cuantitativa y confirmativa de azadiractina.....	195
2.2.1.- Introducción	197
2.2.2.- Experimental	199
2.2.3.- Resultados y discusión	201
2.2.4.- Referencias bibliográficas	209
2.3.- Evaluación de las Fuentes de ionización ESI, APCI y APCI Sabre para la determinación cuantitativa y confirmativa de abamectina	211
2.3.1.- Introducción	213
2.3.2.- Artículo científico 4: <i>Evaluation of Different Quantitative Approaches for the Determination of Noneasily Ionizable Molecules by Different Atmospheric Pressure Interfaces used in Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry: Abamectin as Case of Study</i>	217
2.3.3.- Discusión de los resultados	241
2.3.4.- Referencias bibliográficas	247
PARTE II: Analizador de tiempo de vuelo.....	249
Capítulo 3: Potencial de TOF y QTOF en análisis de residuos de plaguicidas en muestras vegetales.....	251
3.1.- Introducción capítulo 3	253

3.1.1.- Referencias bibliográficas	261
3.2.- Estudio de la capacidad cuantitativa y confirmativa de LC-QTOF MS en análisis de residuos de plaguicidas en vegetales	263
3.2.1.- Introducción.....	265
3.2.2.- Artículo científico 5: <i>Use of Liquid Chromatography Coupled to Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry To Investigate Pesticide Residue in Fruits</i>	267
3.2.3.- Discusión de los resultados.....	293
3.2.4.- Referencias bibliográficas	301
3.3.- Estudio comparativo de las capacidades cuantitativas y confirmativas del QqQ, TOF y QTOF en análisis de residuos de plaguicidas en vegetales	305
3.3.1.- Introducción.....	307
3.3.2.- Artículo científico 6: <i>Comprehensive comparative of quantification and confirmation capabilities of UHPLC coupled to triple quadrupole and hybrid quadrupole time of flight mass spectrometry analyzers in pesticide residue analysis</i>	311
3.3.3.- Discusión de los resultados.....	357
3.3.4.- Referencias bibliográficas	371
Capítulo 4: Potencial del TOF y QTOF para la investigación de metabolitos de plaguicidas en alimentos	375
4.1.- Introducción capítulo 4.....	377
4.1.1. Referencias bibliográficas.....	383
4.2.- Investigación de metabolitos de plaguicidas en alimentos y aguas mediante LC-TOF-MS.....	385
4.2.1.- Introducción	387
4.2.2.- Artículo científico 7: <i>Investigation of pesticide metabolites in food and water by LC-TOF-MS</i>	389
4.2.3.- Discusión del artículo	415
4.2.4.- Referencias bibliográficas.....	427

4.3.- Estudio de la metodología de análisis desarrollada para la investigación de metabolitos de plaguicidas mediante LC-QTOF-MS	431
4.3.1.- Introducción	433
4.3.2.- Artículo científico 8: <i>Use of UHPLC-QTOF MS to discover the presence of pesticide metabolites in food samples</i>	437
4.3.3.- Discusión de los resultados	465
4.3.4.- Referencias bibliográficas.....	473
CONCLUSIONES	477
SUGERENCIAS DE FUTURAS LINEAS DE INVESTIGACIÓN	483
ARTÍCULOS CIENTÍFICOS PRESENTADOS EN LA TESIS DOCTORAL	487
ARTÍCULOS CIENTÍFICOS RELACIONADOS CON LA TESIS DOCTORAL	491

Índice de Figuras

Figura I.1. Método de extracción en muestras de alimentos denominado QuEChERS (Anastassiades <i>et al.</i> 2003).....	15
Figura I.2. Método de extracción basado en el uso de acetato de etilo (NFA, Pihlström <i>et al.</i> 2007).....	16
Figura I.3. Metodología de extracción aplicada para la extracción de plaguicidas y metabolitos en muestras de alimentos de origen vegetal.....	17
Figura I.4. Estructura química de cada uno de los enantiómeros de metalaxil, R-metalaxil y S-metalaxil	21
Figura I.5. Separación cromatográfica en columna Chiralcel OJ-R (a) para los enantiómeros del patrón mezcla racémica de metalaxil ((1) S-metalaxil, (2) R-metalaxil), (b) para el patrón de referencia del M-metlaxil, en extracto de acelga a 0.02 mg/kg.....	22
Figura I.6. Estructura química de cada uno de los enantiómeros del metabolito ácido del metalaxil.....	23
Figura I.7. Gráfica de van Deemter ilustrando la evolución del tamaño de partícula en las tres últimas décadas (Swartz, 2005).....	24
Figura I.8. Rango de aplicación del acoplamiento GC-MS y las diferentes interfases en el acoplamiento de LC-MS en función de la polaridad de los analitos y su masa molecular.....	31
Figura I.9. Esquema de los modos de adquisición permitidos en un instrumento QqQ	38
Figura I.10. Esquema de los modos de adquisición permitidos en un instrumento QTOF.....	39
Figura I.11. (a) TIC obtenido en full acquisition por TOF MS de un extracto de pimiento fortificado con una mezcla de patrones de plaguicidas a 10 ng/mL ; (b), (c), (d), (e) y (f) XICs obtenidos con una ventana de	

masas de ± 5 mDa, para diferentes iones protonados o iones fragmento en la fuente de los plaguicidas indicados	40
Figura I.12. Esquema de posibles mecanismos de fragmentación en una adquisición full scan en modo TOF MS con un instrumento QTOF.....	41
Figura I.13. Cromatogramas HPLC-ESI-MS/MS correspondientes (a) patrón de imazalil a 1 ng/mL en la parte inferior y patrón deuterado D5 de imazalil a 10 ng/mL en la parte superior, (b) extracto de tomate blanco fortificado a 1 ng/mL (en muestra 0.005 mg/kg) de imazalil y 10 ng/mL de patrón interno deuterado	46
Figura I.14. Cromatogramas LC-ESI-MS/MS (a) patrón de referencia de mepanipirim a 50 ng/mL en solvente, (b) patrón de mepanipirim en extracto de tomate blanco 50 ng/mL, (c) muestra blanco de tomate fortificada con mepanipirim a 0.1 mg/kg, correspondiente en extracto a 25 ng/mL. Se han seleccionado dos transiciones en QqQ: 224>106 y 224>77	47
Figura I.15. Cromatogramas HPLC-ESI-MS/MS correspondientes (a) extracto crudo de muestra de naranja fortificada a 4.5 mg/kg y (b) un patrón de fosetil preparado en extracto crudo de matriz blanco de naranja a 1130 ng/mL; (c) extracto de naranja diluido 5 veces de una muestra fortificada a 4.5 mg/kg y (d) patrón de fosetil preparado en matriz blanco de naranja a 1130 ng/mL y diluida por 5 (corresponde a una concentración de 226 ng/mL)	48
Figura I.16. Cromatogramas HPLC-ESI-MS/MS correspondientes (a) mezcla patrón de plaguicidas a 10 ng/mL en solvente, (b) extracto blanco de tomate fortificado a 10 ng/mL	50
Figura I.17. Cromatogramas UHPLC-ESI-MS/MS correspondiente (a) mezcla patrón de plaguicidas a 10 ng/mL en solvente, (b) extracto blanco de tomate fortificado a 10 ng/mL, (c) extracto blanco de pimiento fortificado a 10 ng/mL	51
Figura 1.1. Cromatogramas LC-MS/MS correspondientes a muestras fortificadas con ciromazina (parte superior) y melamina (parte inferior) a nivel de 0.05 mg/kg en las que se han añadido diferentes concentraciones de THFA en el vial: (a) sin adición de THFA, (b) 7 mM de THFA y (c) 10 mM de THFA.....	146

Figura 1.2. Valores medios de concentración de ciromazina y melamina obtenidos en los ensayos de curvas de disipación en muestras de acelga. Se llevó a cabo la recogida de acelga a los tiempos 0, 3, 7, 14 y 21 días.....	148
Figura 2.1. Estructura del insecticida azadiractina.....	197
Figura 2.2. Espectros infusión ESI-MS/MS de patrón de azadiractina de 500 ng/mL con formación de aductos y su fragmentación adicionando (a) acetato de amonio, (b.1) (b.2) acetato de litio y (c) acetato de sodio. (b.2) Espectro de fragmentación del fragmento de cono m/z 709.4 del aducto de litio.....	202
Figura 2.3. Cromatogramas LC-ESI-MS/MS para los aductos de azadiractina (a) $[M+H-H_2O]^+$, (b) $[M+Li]^+$ y (c) $[M+Na]^+$, en extracto blanco de hoja de fresno fortificada a 200 ng/mL, mediante la adición en la fase móvil de 10 μ M NH_4OAc , 50 μ M $LiOAc$ y 5 μ M de $NaOAc$, respectivamente.....	204
Figura 2.4. Cromatogramas LC-MS/MS de un extracto de naranja fortificado a 200 ng/mL para los aductos de (a) $[M+Na]^+$ y (b) $[M+NH_4]^+$. Transición de (abajo) cuantificación y (arriba) confirmación.....	206
Figura 2.5. Respuesta de abamectina y azadiractina al añadir modificador en la fase móvil para la formación de los aductos $[M+Na]^+$ en ESI y $[M+NH_4]^+$ en la fuente Ion Sabre APCI	207
Figura 3.1. Cromatogramas correspondientes a una muestra positiva de clorpirifos (0.6 mg/kg) en piel de plátano obtenidas mediante (a) LC-ESI-QqQ, (b) LC-ESI-TOF XIC y (c) LC-ESI-QTOF XIC. TOF y QTOF XICs se realizaron con ventanas de masa de ± 10 mDa	365

Índice de Tablas

Tabla 1.1. Relación de desviaciones consideradas según la decisión de la comisión 2002/657/CE para la evaluación de la confirmación	57
Tabla 2.1. Transiciones MS/MS seleccionadas para los aductos $[M+NH_4]^+$, $[M+Li]^+$ y $[M+Na]^+$ de la azadiractina	201
Tabla 2.2. Concentraciones óptimas de aditivo en la fase móvil para la formación de aductos $[M+H-H_2O]^+$, $[M+Na]^+$ y $[M+Li]^+$	203
Tabla 2.3. Cálculo de las relaciones de abundancia (<i>Ion Ratio</i> , IR) entre la transición más abundante (Q) y las de confirmación (q_1 y q_2)	204
Tabla 3.1. Relación entre la información obtenida en MS y el número de IPs obtenidos.....	257
Tabla 3.2. Relación entre la información obtenida en MS, la exactitud de masa y el número de IPs obtenidos	258

Índice de Acrónimos y Términos

AOAC	Association of Analytical Communities
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
API	Atmospheric Pressure Ionization
APLI	Atmospheric Pressure Laser Ionization
APPI	Atmospheric Pressure Photoionization
ARP	Análisis de Residuos de Plaguicidas
BPLs	Buenas Prácticas de Laboratorio
CE	Capilar Electrophoresis
CID	Collision-Induced Dissociation
DAD	Diode Array Detector
DMHA	Dimethylhexylamine
DRE	Dynamic Range Enhancement
EDC	Enhanced Duty Cycle
ESI	Electrospray Ionization
ECD	Electron Capture Dissociation
EM	Efecto Matriz
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura
FD	Fluorescence Detector
FDA	Food and Drug Administration
FWHM	Full-Width Half Maximum
GC	Gas Chromatography
GC-MS	Gas Chromatography Mass Spectrometry
HFBA	Heptafluorobutiric Acid
HILIC	Hydrophilic Interaction Chromatography

HPIC	High-Performance Ion Chromatography
HPLC	High Pressure/Performance Liquid Chromatography
HPLC-UV-Vis	High Pressure Liquid Chromatography Ultraviolet and Visible Detector
HR	High Resolution
ICR	Ion Cyclotron Resonance
IDA	Ingesta Diaria Admisible
IDA/DDA	Information/Data Dependent Acquisition
INIA	Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria de España
IP	Ion Pair
IPs	Identification Points
IP-RPLC	Ion Pair Reversed-Phase Liquid Chromatography
IR	Ion Ratio
LC	Liquid Chromatography
LC-MS	Liquid Chromatography Mass Spectrometry
LC-MS/MS	Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry
LC-QqQ	Liquid Chromatography Triple Quadrupole
LC-QTOF	Liquid Chromatography Hybrid Quadrupole Time of Flight
LC-TOF	Liquid Chromatography Time of Flight
LIT	Linear Ion Trap
LLE	Liquid-Liquid Extraction
LMR	Límite Máximo de Residuo
LOC	Limit of Confirmation
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantification
LR	Low Resolution
MAE	Microwave-Assisted Extraction
MCP	MicroChannel Plate

MMR	Método Multirresidual
MS	Mass Spectrometry
MSPD	Matrix Solid-Phase Dispersion
ND-APCI	No-Discharge Atmospheric Pressure Chemical Ionization
NFA	National Food Administration
NFPA	Nonafluoropentanoic Acid
m/z	Mass/Charge ratio
NPD	Nitrogen Phosphorous Detector
OCs	Organochlorate Compounds
OMS	Organización Mundial de la Salud
PB	Particle Beam
PCBs	Polychlorinated Biphenyl Compounds
PDFOA	Pentadecafluorooctanoic Acid
PFPA	Pentafluoropropionic Acid
PHI	Pre-Harvest Interval
PLE	Pressurized-Liquid Extraction
PSA	Primary and Secondary Amine
Q	Single Quadrupole
QC	Quality Control
QIT	Quadrupole Ion Trap
QqQ	Triple Quadrupole
QTOF	Hybrid Quadrupole Time of Flight
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe Extraction Method
RPLC	Reversed-Phase Liquid Chromatography
RSD	Relative Standard Deviation
RRHT	Rapid Resolution High Throughput
SBSE	Stir-Bar Sorptive Extraction

SFE	Supercritical-Fluid Extraction
SHWE	Super-Heated Water Extraction
SIM	Single Ion Monitoring
S/N	Signal/Noise Ratio
SPE	Solid Phase Extraction
SPME	Solid-Phase Microextraction
SRM	Selected Reaction Monitoring
SSI	Sonic Spray Ionization
TBA	Tetrabutylammonium
TEA	Triethylamine
TFA	Trifluoroacetic Acid
TFHA	Tridecafluoroheptanoic Acid
TIC	Total Ion Current
TOF	Time of Flight
TPs	Transformation Products
TrBA	Tributylamine
TSP	Termospray Interface
UFLC	Ultra Fast Liquid Chromatography
UHPLC	Ultra-High Pressure Liquid Chromatography
UPLC	Ultra-Pressure Liquid Chromatography
UV	Ultraviolet Detection
UV-Vis	Ultraviolet and Visible Detector
XIC	eXtracted Ion Chromatogram

Resumen

Uno de los aspectos más importantes en el campo de salud pública es el control de la presencia de compuestos en los alimentos que pueden resultar nocivos. Entre estos, se encuentran diversos contaminantes orgánicos y residuos, como los plaguicidas y sus metabolitos, que pueden suponer un serio riesgo toxicológico. Por esta razón, es importante evaluar los niveles de plaguicidas presentes en los alimentos, tanto para aquellos de consumo humano como de consumo animal. Además, se debe considerar el estudio de los productos de degradación o metabolitos de los plaguicidas como una parte vital de este control, pues éstos pueden mantener sus propiedades toxicológicas.

A lo largo de esta Tesis Doctoral se ha estudiado el potencial analítico del acoplamiento instrumental cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), con analizadores de triple cuadrupolo (QqQ) e híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo (QTOF), para la investigación de plaguicidas y metabolitos en muestras de alimentos de origen vegetal. En concreto el trabajo se divide en dos grandes bloques, en función del analizador utilizado.

En un primer bloque, referido al triple cuadrupolo, se han desarrollado métodos analíticos para la determinación de plaguicidas en muestras de origen vegetal. Los plaguicidas seleccionados presentan unas características físico-químicas que dificultan su determinación mediante cromatografía de gases. Se trata del triclorfon, insecticida de baja estabilidad térmica; la ciromazina y su metabolito melamina, dos moléculas de pequeño tamaño, muy polares, con una alta basicidad; el fosetil, fungicida presente en forma aniónica en las muestras. Los métodos de análisis desarrollados se han validado siguiendo los criterios actuales de las guías europeas, y posteriormente han sido aplicados para el análisis de muestras reales bajo un sistema de aseguramiento de la calidad (Buenas Prácticas de Laboratorio). Cabe destacar, que se ha prestado especial atención a la confirmación de la identidad de los positivos detectados en muestras reales, mediante la adquisición de varias transiciones en modo SRM. Dentro de esta parte también se ha estudiado las interfases típicas a presión atmosférica (ESI y APCI) que permiten el acoplamiento entre la cromatografía líquida y la espectrometría de masas. Para realizar el estudio comparativo de las fuentes de

ionización se han seleccionado dos plaguicidas modelo, abamectina y azadiractina, estudiándose tanto su ionización en positivo como en negativo. Además se ha investigado la formación de aductos, adicionando diversos aditivos en la fase móvil, como sales de metales monovalentes, con el objetivo de conocer el comportamiento en la ionización y la formación de aductos.

En el segundo bloque se han explorado las capacidades que ofrece el QTOF acoplado a LC para el análisis cuantitativo y confirmativo de plaguicidas, su aplicación para el *screening* rápido y eficiente de plaguicidas, así como para la elucidación de metabolitos de plaguicidas en alimentos. En una primera parte, se ha desarrollado un método para la determinación cuantitativa de dos insecticidas (hexitiazox y buprofezin) por QTOF, considerando también la excelente capacidad confirmativa de este instrumento en muestras complejas como alimentos vegetales. Aplicando posteriormente la metodología analítica desarrollada a casos reales, lo que ha permitido identificar un metabolito del buprofezin en plátano, el cual no había sido descrito en esta matriz hasta el momento. En segundo lugar, se ha comparado la versatilidad de los analizadores QqQ, TOF y QTOF acoplados a LC, estableciendo sus ventajas y desventajas, tanto a nivel cuantitativo como confirmativo. Además, se han desarrollado y aplicado métodos de búsqueda rápida de plaguicidas por LC-TOF tipo *screening* en muestras vegetales usando bases de datos de compuestos en masa exacta. En tercer lugar, se ha realizado una revisión de la situación actual de la técnica LC-TOF en la investigación de metabolitos de plaguicidas en alimentos y aguas. Finalmente, se han aplicado diferentes metodologías de búsqueda de metabolitos en muestras de alimentos mediante LC-QTOF, encontrándose dos metabolitos del fungicida imazalil en muestras de cítricos, dos metabolitos de clorpirifos en muestras de uva y un metabolito de fosmet en muestras de aceite de oliva.

El trabajo desarrollado en esta Tesis Doctoral ha permitido concluir que la estrategia a seguir depende principalmente del objetivo que se desea alcanzar, considerando el uso de un instrumento u otro en función de las necesidades requeridas. Así, se ha encontrado que el QqQ en modo SRM es una herramienta analítica excelente para métodos *target* de cuantificación y confirmación (con una selección previa de los compuestos de interés) ya que gracias a su alta sensibilidad y selectividad permite alcanzar bajos límites de detección aplicando procedimientos sencillos de tratamiento de muestra. La técnica LC-TOF resulta muy adecuada para la búsqueda de analitos no pre-seleccionados debido a su alta sensibilidad en modo de adquisición de espectro completo de masas con elevada resolución, permitiendo obtener el valor de la masa exacta con muy bajo error. Además, estas características resultan ideales para la búsqueda de compuestos

desconocidos, como otros plaguicidas no permitidos o metabolitos de los mismos, debido a la posibilidad de obtener la composición elemental. Por último, el QTOF tiene un extraordinario potencial para la elucidación del compuesto detectado y para establecer las rutas de fragmentación de los compuestos orgánicos debido a su alta sensibilidad y riqueza de información al trabajar en modo *full acquisition* de iones producto, con masa exacta. Por todo ello, LC-QTOF es posiblemente la mejor elección para la búsqueda y elucidación de analitos no pre-seleccionados, como suele ser el caso de los metabolitos de plaguicidas.

En esta Tesis Doctoral, se ha desarrollado y aplicado metodología de análisis altamente especializada y con equipos avanzados de LC-MS. Los métodos desarrollados presentan excelentes características analíticas y son de aplicación tanto en el análisis de rutina de plaguicidas pre-seleccionados (métodos *target*), como para la investigación y búsqueda de otros plaguicidas y sus metabolitos *non-target* en muestras de interés alimentario.

Introducción

Una de las cuestiones de mayor importancia consideradas en salud pública es el control sanitario de los alimentos, siendo uno de los puntos de mayor preocupación la presencia de contaminantes orgánicos. Los contaminantes orgánicos en alimentos proceden prácticamente en su totalidad de procesos antropogénicos en su manipulación. Dentro de esta manipulación se considera el uso de productos fitosanitarios en el cultivo, transporte, almacenamiento y procesado de alimentos de origen vegetal, uno de los más habituales. La Comisión del Codex Alimentarius es la estructura internacional, creada en 1963 desde la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO), que controla y regula entre otras cuestiones la relacionada con la política internacional de la seguridad de los alimentos para proteger la salud de los consumidores. Desde el año 2003, todos los estados miembros de la Unión Europea (UE) están adheridos a la Comisión del Codex Alimentarius, colaborando en el establecimiento de las normas de seguridad alimentaria que sirven de referencia al comercio de alimentos a nivel internacional. Uno de los principales objetivos de la legislación europea es proteger la seguridad de los alimentos derivados de vegetales y garantizar la salud y la calidad de los cultivos en todos los estados miembros, así como regular el comercio de productos vegetales tanto en el interior de la Comunidad Europea como en las importaciones de otros continentes.

Desde la organización del Codex Alimentarius se ha definido un plaguicida como cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies de plantas o animales indeseables que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos y productos agrícolas. Si nos centramos en el uso de plaguicidas, el Codex Alimentarius como entidad reguladora fija unos criterios normativos relativos a los residuos de plaguicidas a nivel internacional. Se han definido una serie de conceptos, como el Límite Máximo de Residuo (LMR) y la Ingesta Diaria Admisible (IDA), con el objetivo de homogeneizar y así poder establecer criterios de control globales. El LMR se define como el límite legal permitido de residuos de plaguicidas (expresado en mg/kg de producto) que puede permanecer en los alimentos y en

el forraje para animales. Mientras que el IDA es la cantidad máxima diaria de producto químico que se puede ingerir durante la vida de una persona sin que suponga un riesgo apreciable para su salud.

A pesar que el establecimiento de unos criterios comunes internacionales para determinar los valores de los LMR tiene como objetivo facilitar y asegurar el comercio internacional, a menudo se dan ligeras variaciones entre las referencias nacionales y los recomendados internacionales. Respecto a esto, la Comisión Europea propuso armonizar en todos los estados miembros de la UE los LMRs de productos fitosanitarios permitidos en alimentos de origen animal y vegetal, de forma que si un LMR no se especifica en concreto se establecerá un valor general por defecto de 0.01 mg/kg (Reglamento CE 299/2008). Con estos valores se pretende asegurar un valor de IDA lo suficientemente restrictivo para evitar perjuicios en la salud de los consumidores, especialmente para los bebés, niños y vegetarianos.

Desde el punto de vista analítico, supone un reto alcanzar los niveles de detección esperados a consecuencia de los cada vez más restrictivos LMR establecidos, además de la complejidad de las matrices de origen alimentario. Por lo que es imprescindible desarrollar métodos de análisis a partir de técnicas analíticas avanzadas de gran sensibilidad y especificidad. En ese sentido, en las últimas décadas se ha aprovechado el gran potencial uso del acoplamiento cromatografía-espectrometría de masas, permitiendo reducir el tratamiento de muestra, minimizando el tiempo de análisis y aumentando la sensibilidad y especificidad. Además, se ha generalizando la necesidad de implementar en los laboratorios de rutina métodos multirresiduales (MMR) de análisis capaces de abarcar una amplia cantidad de sustancias en un solo análisis. Sin embargo, todavía existen un determinado número de plaguicidas que no son incluidos en estos MMR de análisis como consecuencia de su peculiar estructura química y derivado comportamiento físico-químico. Para afrontar este problema se ha recurrido a la creación de métodos analíticos específicos que complementen a los métodos de análisis multirresidual.

Otra creciente preocupación que ha surgido en el campo de la química analítica aplicada al análisis de plaguicidas en alimentos, ha sido explorar con mayor profundidad el estudio de los productos de transformación y metabolitos derivados de los plaguicidas. Se ha encontrado que algunos plaguicidas sufren un rápido y abundante proceso de degradación, generando productos de transformación o metabolitos en algunos casos incluso más tóxicos que sus precursores. Con el objetivo de aumentar los conocimientos en esta materia,

resulta muy interesante explorar este campo basándose en el uso de los nuevos avances instrumentales aplicados en el campo de la química analítica.

Teniendo en consideración lo anteriormente comentado, se presenta esta Tesis Doctoral en la que se estudia el potencial de la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas para el estudio y determinación de residuos de plaguicidas y sus metabolitos en alimentos de origen vegetal.

I.1. Determinación de residuos de plaguicidas y metabolitos en muestras de alimentos

Como se ha comentado anteriormente, la presencia de plaguicidas y sus productos de transformación/metabolitos en alimentos pueden presentar un riesgo para la salud de los consumidores. A su vez, a nivel del comercio internacional se deben tomar decisiones importantes en función de los resultados obtenidos en estudios de análisis de residuos de plaguicidas y metabolitos en alimentos. La calidad y fiabilidad de los análisis debe ser un punto muy importante en el desarrollo del método así como en la selección de la técnica analítica, ya que la presencia de errores en los resultados presentados puede generar muchos costes por pérdidas de cosechas enteras o pérdidas económicas derivadas de litigios entre empresas. Por todas estas razones, se debe disponer de métodos de análisis adecuados a las necesidades de la realidad del problema analítico en cada caso. El uso de los nuevos avances instrumentales en química analítica se presenta como una herramienta adecuada y muy útil para afrontar la problemática del análisis de plaguicidas en muestras de alimentos.

Desde el punto de vista analítico es muy importante establecer unos criterios de elección del método analítico, así como la técnica analítica que mejor se ajuste a las necesidades del problema analítico que se desea afrontar. Tradicionalmente, se ha utilizado tanto la cromatografía líquida (*Liquid Chromatography*, LC) acoplada a detectores de ultravioleta (UV; *Diode Array Detector*, DAD) y fluorescencia (*Fluorescence Detector*, FD) para plaguicidas de alta polaridad o inestabilidad térmica; y la cromatografía de gases (*Gas Chromatography*, GC) acoplada a detectores de captura de electrones (*Electron Capture Detector*, ECD), detectores específicos de fósforo o nitrógeno (*Nitrogen Phosphorous Detector*, NPD) o espectrómetro de masas (*Mass Spectrometry*, MS), para el análisis de plaguicidas más apolares, con cierta estabilidad térmica y volatilidad. De ellas, la técnica que se ha aplicado más ampliamente ha sido GC-MS debido a su buena sensibilidad y selectividad (Bartle *et al.*, 2002; Lehotay *et al.*, 2002). Sin embargo, el desarrollo de nuevas interfases capaces de acoplar la técnica separativa LC a la MS, ha permitido su implantación progresiva en el campo del análisis de residuos de plaguicidas, llegando a alcanzar el mismo *status* de aplicación que la técnica GC-MS, especialmente porque en las últimas décadas la industria de los fitosanitarios se ha decantado más hacia el desarrollo de plaguicidas más polares e inestables térmicamente (Soler *et al.*, 2008). Por otro lado, el estudio de los metabolitos de los plaguicidas se está convirtiendo en un campo de trabajo importante dentro de la química analítica. Debido a que los

metabolitos de los plaguicidas generalmente provienen de una degradación que aumenta su polaridad y solubilidad en medios acuosos (Hernández *et al.*, 2008), resulta más adecuado el uso de la LC frente a GC para su estudio y determinación. La visión actual del desarrollo de metodología de análisis LC acoplado a MS en tándem (MS/MS), así como su aplicación en el estudio de plaguicidas y metabolitos se expondrá con mayor profundidad en cada uno de los apartados introductorios de los capítulos, dedicados a los instrumentos LC acoplados a triple cuadrupolo (*Triple Quadrupole*, QqQ) y LC acoplado a híbrido cuadrupolo tiempo de vuelo (*Hybrid Quadrupole Time of Flight*, QTOF).

I.2. Metodología analítica para el tratamiento de muestra en alimentos

A lo largo del desarrollo de un método de análisis para residuos de plaguicidas en alimentos se invierte una cantidad considerable de tiempo en la optimización del tratamiento de muestra y la extracción de los analitos, debido a que esta optimización conlleva serias dificultades por la complejidad de las matrices de alimentos y la baja concentración que suelen presentar los plaguicidas y sus metabolitos. Los típicos pasos que se incluyen en el tratamiento de muestra son el muestreo y/o homogenización, la extracción, la separación o eliminación de interferentes (denominado *clean-up* en término anglosajón) y preconcentración de los analitos de interés.

En general, se ha encontrado como métodos de extracción y tratamiento de muestra más comunes los que a continuación se clasifican (Lambropoulou et al., 2007; Hercegová et al., 2007; Ridgway et al., 2007):

- Extracción con solventes. Es la aproximación más usual como primer paso en el tratamiento de muestra, especialmente para muestras sólidas. Se han usado diversos disolventes orgánicos como el acetoneitrilo, acetato de etilo, metanol, acetona o éteres de petróleo. En el proceso de extracción con solventes se hace uso de un sistema de agitación y homogeneización entre disolvente y muestra para aumentar la efectividad de la misma. Se suele realizar mediante ultraturrax o agitación en brazos rotores, aunque en algunos casos se ha llegado a usar sistemas más agresivos como ultrasonidos. Dentro de este tipo de extracción, se puede incluir la partición o extracción líquido-líquido (*Liquid-Liquid Extraction*, LLE), más común para muestras líquidas como zumos de frutas, aunque también se puede aplicar al extracto de matriz obtenido de una primera extracción con solventes.
 - Extracción instrumental con solventes. Como alternativa a la extracción con solventes mediante métodos manuales se han desarrollado diversas técnicas, buscando generalmente la disminución del coste de procesamiento, tanto en tiempo como en cantidad de disolventes. Dentro de este grupo se pueden considerar la extracción con fluidos supercríticos (*Supercritical-Fluid Extraction* (SFE)), extracción con líquidos a alta presión (*Pressurized-Liquid Extraction* (PLE)), y extracción mediante el uso de microondas (*Microwave-Assisted Extraction* (MAE)). Otra alternativa interesante considerada
-

una variante de PLE es la extracción con agua a altas temperaturas (*Super-Heated Water Extraction, SHWE*), ya que permite la eliminación del uso de disolventes orgánicos.

- Tratamiento de muestra mediante adsorción en superficies sólidas. La aplicación de este principio generó novedosas técnicas de extracción y *clean-up* que permitió, en muchos casos, mejorar los límites de detección (LOD) establecidos para plaguicidas y metabolitos, hasta el momento, en muestras de alimentos (Ridgway *et al.*, 2007). Se distinguen la extracción en fase sólida (*Solid Phase Extraction, SPE*), la microextracción en fase sólida (*Solid-Phase Microextraction, SPME*), extracción con una barra en agitación con capacidad de adsorción (*Stir-Bar Sorptive Extraction, SBSE*) y la extracción mediante dispersión de la matriz en la fase sólida (*Matrix Solid-Phase Dispersion, MSPD*). Este tipo de extracción es la más utilizada actualmente, ya que ha presentado un gran número de ventajas frente a las anteriores.

En algunos casos la extracción y *clean-up* pueden ir ligados, como sucede con algunos métodos instrumentales de extracción con solvente (SFE) o métodos de extracción mediante sólidos (MSPD); o bien se unen en un solo paso el *clean-up* y la preconcentración de los extractos de las matrices, como suele suceder en la aplicación de la SPE.

El tratamiento de muestra que se selecciona está directamente relacionado con las características de la matriz, el tipo de analito que se desea extraer y la técnica de determinación que se pretende aplicar. La tendencia generalizada es la búsqueda de métodos de extracción capaces de abarcar el máximo número de plaguicidas de la forma más universal posible frente al tipo de muestra, esto es el desarrollo de MMR. Los primeros métodos de determinación de plaguicidas en alimentos se desarrollaron haciendo uso de la técnica de separación GC, siendo el método de Mills *et al.* (1963) el primero en presentar una capacidad de análisis multiresidual. El método de Mills se convirtió en el primer método oficial para la *Food and Drug Administration* (FDA). Se centraba únicamente en la extracción de organoclorados (OCs) y otros plaguicidas no polares mediante el uso de acetonitrilo y partición con disolventes no polares (éter de petróleo), su objetivo analítico eran los plaguicidas más importantes del momento. En la siguiente década, se implantó el uso del método de Luke (Luke *et al.*, 1975) cuyo principio se basaba en la realización de extracciones consecutivas mediante LLE con diversos disolventes orgánicos. Este método pretendía incluir plaguicidas de varios grupos (OCs, organofosforados, piretroides y *Polychlorinated*

Biphenyls (PCBs)) en un mismo procedimiento de tratamiento de muestra. El disolvente para la primera extracción se seleccionaba en función del contenido en grasa de la muestra: se extraía con acetonitrilo, las de bajo contenido, mientras que las de alto contenido en grasa se basaba en la extracción con éter de petróleo. También se han dado algunas modificaciones de este método para la aplicación en muestras vegetales, variando la mezcla de extractantes, realizando diferentes mezclas de acetona y agua. Este método fue ampliamente aplicado por la FDA (Hundley *et al.*, 1988; Luke *et al.*, 1988), y adoptado como método oficial 985.22 por la *Association of Analytical Communities* (AOAC) (Cunniff, 1997). Los siguientes pasos se dirigieron hacia la búsqueda de metodologías de extracción que permitieran abarcar mayor número de plaguicidas, especialmente de mayor polaridad. Además, se pretendía la reducción del uso de solventes orgánicos, especialmente evitando aquellos que podían ser perjudiciales para la salud por sus características tóxicas y cancerígenas, como disolventes derivados del benceno o órgano-halogenados (tolueno o diclorometano). A principio de los años 80, se comenzó a popularizar el uso de la SPE, que permitió la eliminación del procedimiento manual de LLE y disminuyó la cantidad de disolvente utilizado. La introducción de este sistema de extracción derivó en nuevas aplicaciones basadas en la adsorción de los analitos de interés en superficies sólidas, antes descritas: MSPD, SPME o SBSE. En la actualidad, el desarrollo de las aplicaciones de MMR en la extracción han divergido hacia dos metodologías sencillas y cada vez más universales: extracción con acetonitrilo (**Figura I.1**) y extracción con acetato de etilo (**Figura I.2**).

El método basado en la extracción con acetonitrilo fue etiquetado por Anastassiades *et al.* (2003) como método QuEChERS de extracción rápido, sencillo, barato, efectivo, robusto y seguro (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*, QuEChERS). En esta nueva metodología de extracción, se introdujo el uso de la SPE dispersiva, adicionando la fase sólida de aminas primaria/secundaria (*Primary and Secondary Amine*, PSA) a la mezcla de extracción, en lugar de pasar el extracto a través de un cartucho o columna empaquetada con esta fase sólida. La extracción con acetonitrilo presentó ventajas frente al uso de acetona (usado ampliamente tras la incorporación del método de Luke), siendo una de las más importantes su buena separación de la fase acuosa con la adición de una sola sal (NaCl) sin necesidad de uso de disolventes no polares, al contrario que en la acetona. El uso del método de QuEChERS se ha extendido ampliamente tanto para su aplicación en GC-MS como LC-MS (Lehotay *et al.*, 2005a; Payá *et al.*, 2007; Cajka *et al.*, 2008; Romero-González *et al.*, 2008), llegando a realizar pequeñas

variaciones del método para incluir plaguicidas más problemáticos (Lehotay *et al.*, 2005b) o muestras de alto contenido en grasa (Lehotay *et al.*, 2005c).

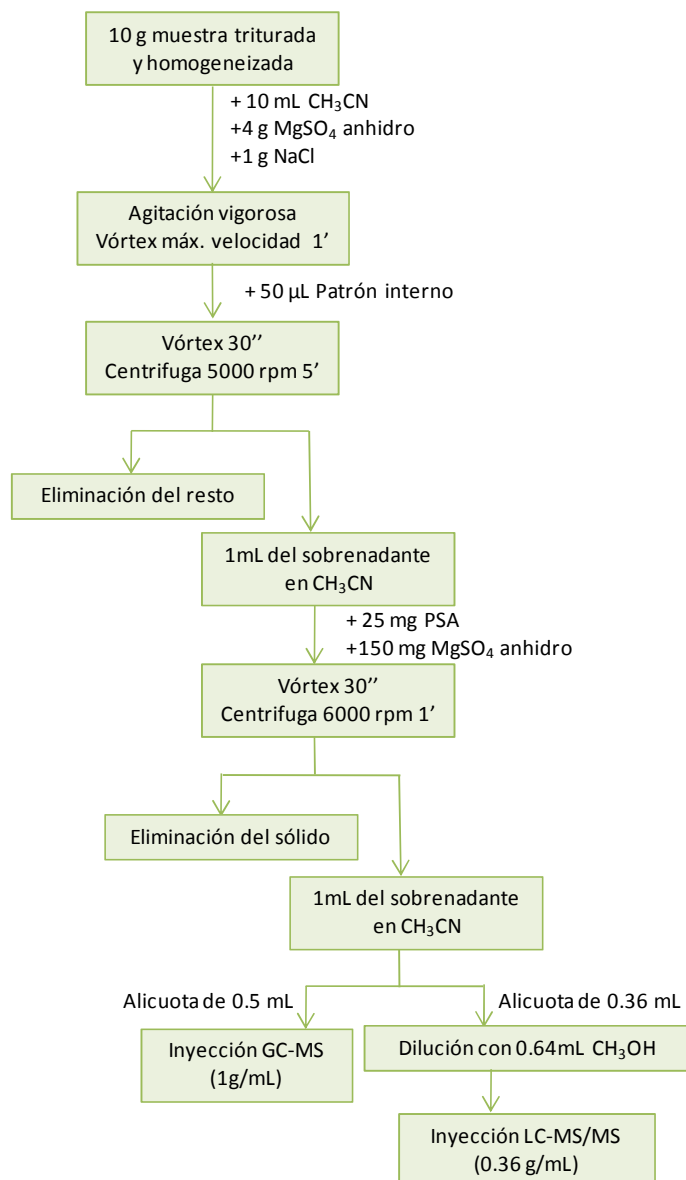


Figura I.1. Método de extracción en muestras de alimentos denominado QuEChERS (Anastassiades *et al.* 2003).

Por otro lado, la extracción con acetato de etilo también ha sido ampliamente utilizada para la extracción de residuos de plaguicidas en muestras de origen vegetal, incluso introducido como método de análisis oficial en Suecia y

España (Mol *et al.*, 2007). El uso de acetato de etilo presenta la ventaja de ser un disolvente inmisible con el agua, permitiendo la separación de ambos sin la necesidad de usar disolventes no polares. El único inconveniente de su uso es que no es capaz de extraer aquellos analitos más polares e iónicos, como ocurre con los plaguicidas fuertemente básicos en muestras de carácter ácido (Pihlström *et al.*, 2007). La extracción con acetato de etilo también ha sido aplicada a las dos técnicas de separación, GC y LC, acopladas a MS (Mol *et al.*, 2007; Pihlström *et al.*, 2007; Jansson *et al.*, 2004).

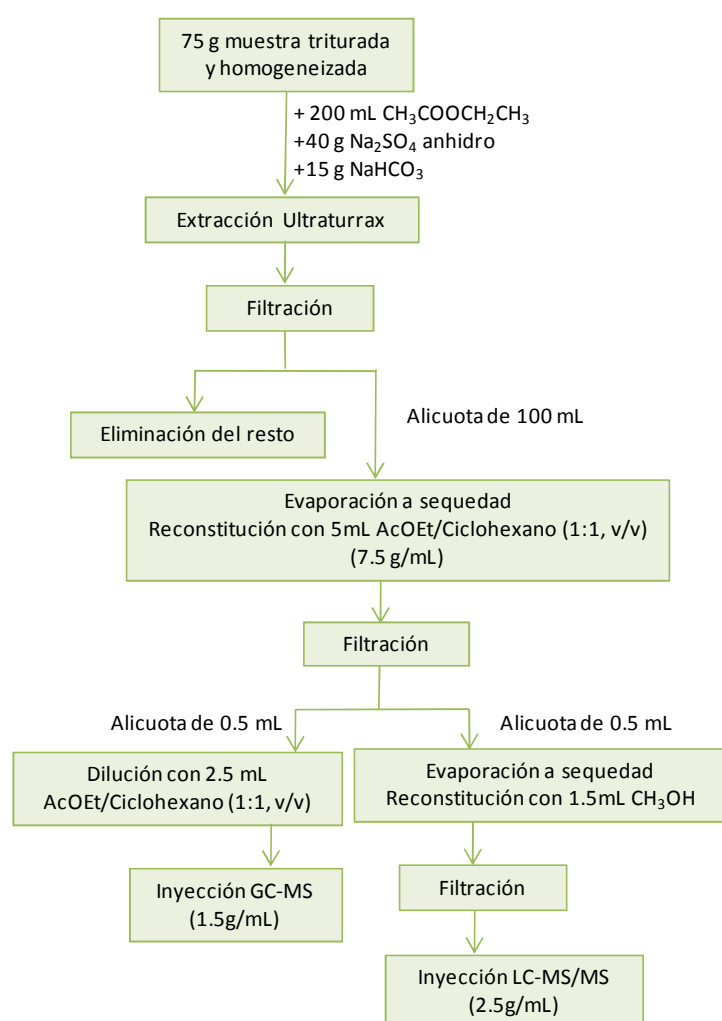


Figura I.2. Método de extracción basado en el uso de acetato de etilo (NFA, Pihlström *et al.* 2007).

Ambos métodos de extracción, reducen el tratamiento de muestra, minimizando la incertidumbre introducida en el procesamiento de muestra, pues cada paso utilizado en el método de extracción puede introducir errores del analista o del propio proceso.

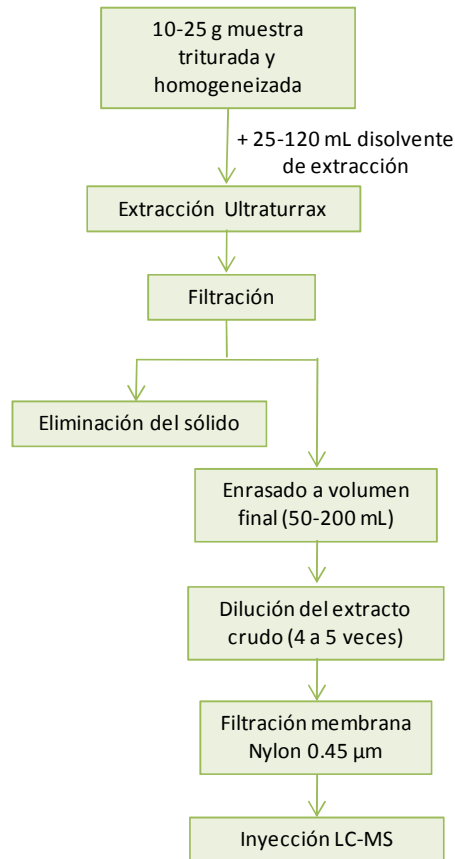


Figura I.3. Metodología de extracción aplicada para la extracción de plaguicidas y metabolitos en muestras de alimentos de origen vegetal.

En definitiva, ambos métodos de extracción pueden ser considerados como una buena estrategia para un MMR de plaguicidas en muestras de origen vegetal. Si se tiene presente que se pueden encontrar cerca de 1100 plaguicidas distintos, es importante disponer de buenas herramientas que permitan su fácil extracción, siendo todavía más interesantes si éstas son complementarias. No obstante, considerando esta ingente cantidad de analitos que deberían ser estudiados, parece casi imposible obtener un único método de extracción para

todos ellos, especialmente si nos centramos en aquellos que presentan peculiaridades en su estructura química que les confieren características físico-químicas, divergentes a la mayoría. En ese sentido, se deberían diseñar métodos de extracción específicos para ese analito, procurando que fueran tan sencillos como fuera posible. En el trabajo que se presenta a continuación se ha intentado seguir este criterio, de forma que se han desarrollado métodos de extracción lo más simples posibles. De forma generalizada, se incluye un esquema en la **Figura I.3** de los pasos comunes en todos los métodos de tratamiento de muestra utilizados para los trabajos de investigación presentados en esta Tesis Doctoral.

El disolvente de extracción se ha seleccionado siempre en función del tipo de matriz y analito que se desea extraer, lo más general ha sido el uso de mezclas de metanol y agua, o bien el uso de acetonitrilo. Sin embargo, en casos como el fosetil-aluminio o ciromazina y melamina se ha preferido el uso de agua o tampón fosfato en agua, respectivamente. Por último, es interesante comentar que se ha preferido el uso de la dilución del extracto crudo en lugar de un *clean-up* y/o preconcentración del extracto. Es una alternativa tan sencilla y que al mismo tiempo permite obtener una mayor homogeneidad entre todas las muestras, disminuyendo la presencia de matriz interferente en el extracto. Esta opción es viable en aplicaciones de LC-MS/MS, ya que presentan una alta sensibilidad y especificidad.

I.3. Cromatografía Líquida (LC)

La cromatografía líquida se define como una técnica separativa basada en la afinidad que los componentes tienen entre dos fases inmiscibles: una fase móvil líquida que fluye sobre otra estacionaria sólida empaquetada en una columna. La fase móvil se compone generalmente de una mezcla de disolventes con distinta fuerza eulotrópica. La separación es una consecuencia de la diferencia de coeficientes de distribución entre los componentes de una muestra, que produce sucesivas etapas de adsorción y desorción de los mismos a través de la fase estacionaria.

I.3.1. Cromatografía líquida en fase reversa

La clasificación de las diferentes cromatografías líquidas se centra en las variaciones de las composiciones químicas de los tipos de relleno de la fase estacionaria. Cada tipo de material de relleno tiene unas características físico-químicas que producen diferentes mecanismos de separación. Existe una gran diversidad de tipos de LC, pero en nuestro caso nos centraremos en la LC en fase reversa. El uso de LC en fase reversa se ajusta adecuadamente al análisis de analitos polares e incluso iónicos, si se hace uso de la formación de pares iónicos. El tipo de material apolar con que se rellenan las columnas de LC fase reversa suele ser sílica químicamente modificada (cadenas de C₈, C₁₈), aunque también se hace uso de otros materiales como copolímeros de estireno-divinilbenceno (XAD, PRP) o partículas de sílice-carbón (X-Terra). Como fase móvil se utilizan disolventes con cierta polaridad, generalmente combinaciones de agua con mezclas de otros disolventes orgánicos como metanol o acetonitrilo. El porcentaje y tipo de modificador orgánico en la fase móvil es el factor más determinante en la retención de los analitos polares pero no iónicos. Las interacciones entre el analito y el solvente son las que determinan la especificidad de la LC en fase reversa, ya que las interacciones del analito con la fase estacionaria son relativamente débiles, interacciones de Van der Waals no específicas. La retención disminuye en función de la polaridad del analito.

Debido a la alta volatilidad de los disolventes utilizados como fase móvil y la idoneidad de esta cromatografía para analitos polares, la LC en fase reversa se convierte en el tipo de cromatografía más ideal para el acoplamiento con la espectrometría de masas. Cabe destacar que se ha convertido en una práctica habitual, la adición de aditivos en la fase móvil como modificadores con dos finalidades: la más convencional es mejorar la forma de pico en la cromatografía de analitos ácidos o básicos; por otro lado, puede favorecer la ionización por

protonación $[M+H]^+$ o desprotonación $[M-H]^-$ del compuesto de interés. A este respecto, es muy importante hacer uso de tampones de sales volátiles, tales como acetatos, ya que en caso contrario pueden precipitar en la interfase tras la evaporación del disolvente afectando seriamente al sistema de LC-MS. Por otro lado, también se ha estudiado el uso de aditivos de amonio y de metales monovalentes para generar aductos de $[M+NH_4]^+$ o $[M+Li]^+$, con el objetivo de minimizar la formación de aductos de sodio. Este tema se tratará con mayor profundidad en el capítulo 2 de la presente tesis.

1.3.2. Cromatografía líquida de compuestos iónicos

Uno de los problemas que se plantea en LC en el análisis de plaguicidas es la obtención de una aproximación adecuada a plaguicidas de carácter iónico, ya que su retención es muy poco significativa en rellenos de tipo fase reversa. En general, el uso de columnas de intercambio iónico, con empaquetamientos de sílica modificada o copolímeros de estireno-divinilbenceno con grupos funcionales de carácter iónico diversos (n-propilamina, dietilaminopropil, alquil- $N^+(CH_3)_3$, ácido carboxílico o ácido bencensulfónico) ha sido una de las propuestas más comunes y sencillas para el análisis de analitos iónicos en diferentes tipos de detectores (Sancho *et al.*, 1996; Peeters *et al.*, 2001). Sin embargo, en el caso de la MS resulta problemático debido a la baja volatilidad que suelen presentar los modificadores añadidos en la fase móvil, ya que son necesarios modificadores con una alta fuerza iónica basada en compuestos de muy baja volatilidad.

Considerando que la fase reversa es un tipo de LC que presenta una alta compatibilidad con MS, se han encontrado las siguientes alternativas para aumentar la retención de los analitos iónicos o ionizables en la fase estacionaria. La supresión de la ionización para analitos de carácter ácido gracias a la adición de ácidos volátiles (ácido fórmico o ácido acético) que disminuyen el pH de la fase móvil inhibiendo la protólisis de los analitos. De la misma forma, para analitos básicos con tendencia a protonarse, es interesante el uso de medios básicos (acetato o carbonato amónico) que impida su protonación. En el caso de tratarse de analitos iónicos de difícil supresión, se puede llevar a cabo una cromatografía de pares iónicos. En este caso se adicionan compuestos que forman iones lipofílicos como modificadores en la fase móvil, suelen usarse sales de amonio cuaternarias o ácidos perfluoropropiónicos o butíricos de cadenas alquílicas no excesivamente largas para el análisis de ácidos o bases orgánicas, respectivamente. De esta forma se generan pares iónicos de carga neutra que se retienen en la fase estacionaria reversa. Este tipo de alternativas se han estudiado

con mayor profundidad en el caso del análisis de fosetil-aluminio, ciromazina y melamina en el capítulo 1 de la presente tesis.

Por otro lado, también es conocido el uso de cromatografía de interacciones hidrofílicas (*Hydrophilic Interaction Chromatography*, HILIC), basada en el uso de columnas de sílica no modificadas y fases móviles de mezcla agua-disolventes orgánicos. Este tipo de LC presenta un orden de retención contrario al de fase reversa, donde los compuestos de alta polaridad quedan fuertemente retenidos en la fase estacionaria. Los compuestos más básicos se pueden eluir con fase móvil ácida (Esparza *et al.*, 2009), generando iones positivos por protonación (Andersen *et al.*, 2008; Hayama *et al.*, 2008; Heller *et al.*, 2008), mientras que los analitos ácidos se eluyen a pH neutro, llegándose a cromatografiar en su forma desprotonada (Crnogorac *et al.*, 2008; Heller *et al.*, 2008).

1.3.3. Cromatografía líquida de compuestos quirales

De forma general, el uso de LC con capacidad de separación de compuestos quirales ha sido más ampliamente aplicado en el campo farmacéutico y de drogas, debido a la necesidad de separación de compuestos enantiómeros que tienen diferentes efectos en el metabolismo biológico. Sin embargo, la actividad de una gran parte de los plaguicidas con centros quirales también presenta enantioselectividad (por ejemplo: diniconazol, uniconazol o metalaxil), por lo que debería resultar interesante poder separar las formas quirales de aquellos plaguicidas que actúen como biocidas, tales como fungicidas o insecticidas.

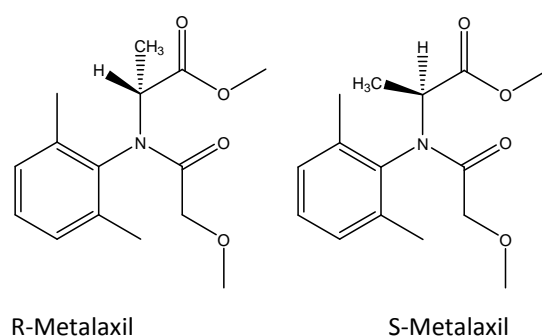


Figura 1.4. Estructura química de cada uno de los enantiómeros de metalaxil, R-metalaxil y S-metalaxil.

Para que se pueda realizar la separación cromatográfica de enantiómeros es necesario que uno de los componentes de las fases sea quiral, bien la adición de un compuesto quiral en la fase móvil, o bien que la fase estacionaria sea quiral. En general, por problemas de incompatibilidad de aditivos en la fase móvil con MS se suele preferir que la selectividad de quiralidad se encuentre en la fase estacionaria. Un ejemplo de fase estacionaria que presenta quiralidad es el relleno de silica-gel cuya cadena finaliza con el grupo funcional 3,5-dimetilfenilcarbamato (columna Chiralcel OJ-R). Esta fase estacionaria fue utilizada para la determinación del fungicida metalaxil, con el objetivo de poder estudiar la mezcla racémica, distinguiendo entre su forma R y S (**Figura I.4**).

Se ha observado que el formulado que se prepara a partir de la mezcla racémica de metalaxil se está sustituyendo por otro que tan sólo contenga el metalaxil-M, es decir el fungicida altamente enriquecido por la forma enantiómerica R, ya que es el enantiómero que posee mayoritariamente la actividad biológica.

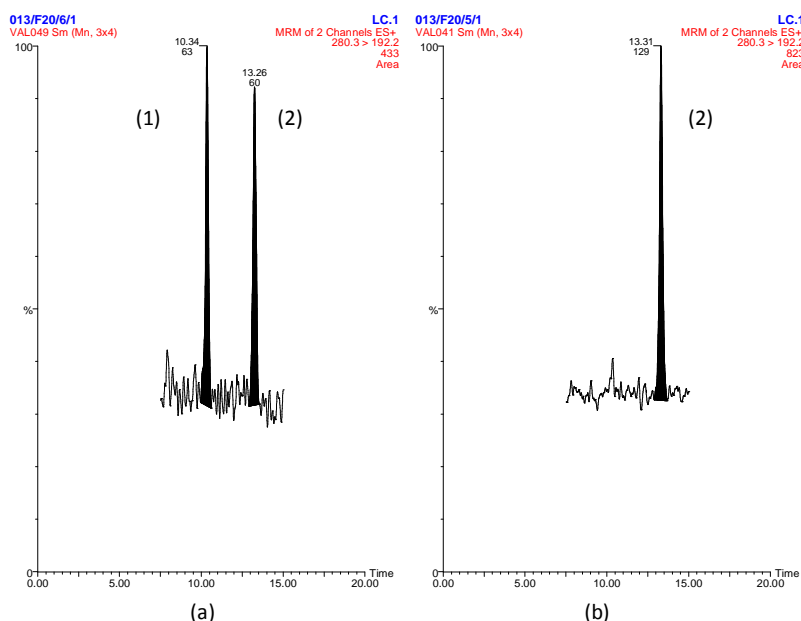


Figura I.5. Separación cromatográfica en columna Chiralcel OJ-R **(a)** para los enantiómeros del patrón mezcla racémica de metalaxil ((1) S-metalaxil, (2) R-metalaxil), **(b)** para el patrón de referencia del M-metalaxil, en extracto de acelga a 0.02 mg/kg.

Como se observa en la **Figura 1.5b**, la composición del metalaxil-M aplicado sobre acelga a un nivel de concentración bajo (0.02 mg/kg) se compone únicamente de la forma R. Se puede comprobar también que la suma de los picos de la mezcla racémica equivale prácticamente a la misma área que en el caso del metalaxil-M.

Por otro lado, se ha encontrado que la degradación del metalaxil es regioselectiva, ya que se degrada para dar el metabolito del ácido del enantiómero R o S según del que procedía, como se puede observar en la **Figura 1.6** (Buser *et al.*, 2002; Zadra *et al.*, 2002).

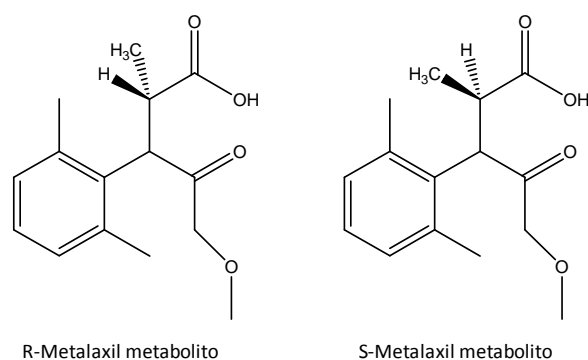


Figura 1.6. Estructura química de cada uno de los enantiómeros del metabolito ácido del metalaxil.

1.3.4. Nuevas aportaciones en el campo de la cromatografía líquida: UHPLC

Se distinguen dos factores principales que afectan directamente con la eficiencia de una columna cromatográfica, la longitud de la columna y el tamaño de partícula del empaquetamiento. De ahí, que uno de los avances que ha experimentado la cromatografía líquida en esta última década ha sido obtener un aumento de selectividad y resolución de pico mediante la disminución del tamaño de partícula a sub-2 μm . Teóricamente, según la ecuación de van Deemter (**Figura 1.7**), se ha demostrado que al disminuir el tamaño de partícula es posible aumentar y mantener el número de platos teóricos de la columna, es decir la capacidad resolutive de la columna, incluso aumentando la velocidad del flujo de la fase móvil.

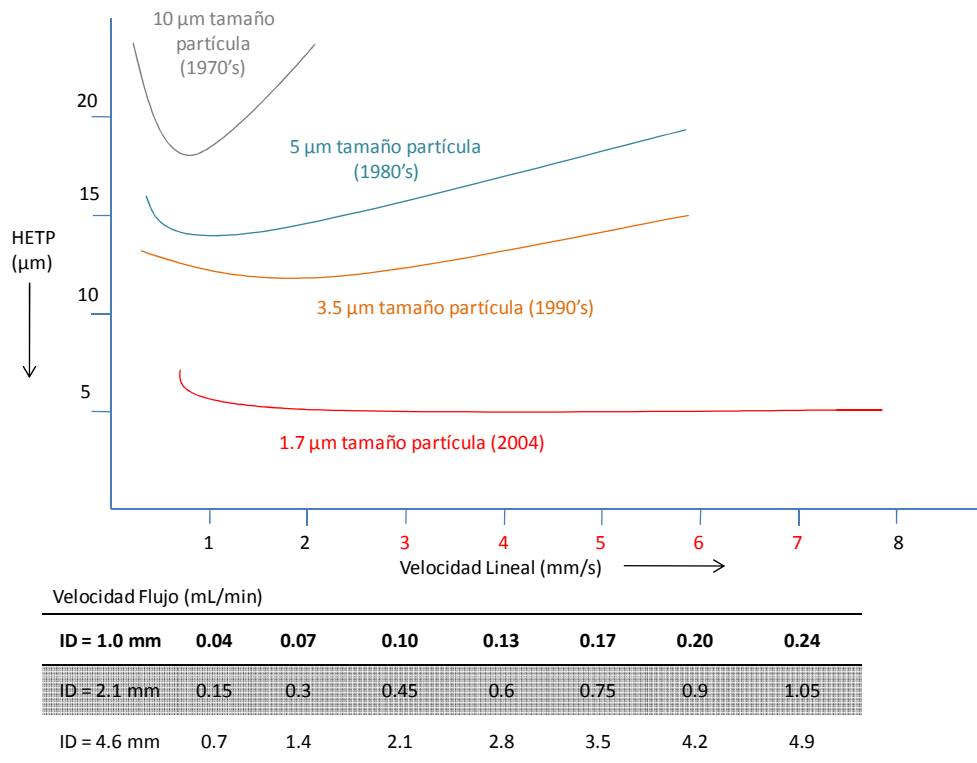


Figura I.7. Grafica de van Deemter ilustrando la evolución del tamaño de partícula en las tres últimas décadas (Swartz, 2005).

Esta nueva aplicación ha obligado a desarrollar instrumentación capaz de trabajar a las altas presiones que generan estos flujos, mayores a las comunes con columnas cromatográficas de tamaño de partícula de 5 y 3 μm ; utilizar inyectores automáticos más rápidos y detectores con mayor velocidad de captura y medida. Por otro lado, este tipo de cromatografía de alta presión ha permitido trabajar a flujos de alta velocidad sin pérdida de resolución, pudiéndose establecer flujos de 300-800 $\mu\text{L}/\text{min}$ en comparación de los tradicionales 10-300 $\mu\text{L}/\text{min}$ con interfases electrospray, disminuyendo considerablemente el tiempo de la cromatografía. Debido a estas características, se ha etiquetado de diferentes formas a esta nueva aproximación de cromatografía líquida según la casa comercial: *Ultra Performance Liquid Chromatography* o *Ultra-Pressure Liquid Chromatography* (UPLC), *Rapid Resolution High Throughput* (RRHT) o *Ultra Fast Liquid Chromatography* (UFLC); considerando finalmente como una etiqueta más imparcial y universal *Ultra-High Pressure Liquid Chromatography* (UHPLC). En definitiva, los beneficios de este tipo de cromatografía son muy interesantes y

prácticos, aumentando la resolución y sensibilidad además de disminuir el tiempo de trabajo. Por otro lado las posibilidades de mayor resolución cromatográfica que ofrece el UHPLC se presenta como una buena alternativa para la disminución de efecto matriz (se comentará más ampliamente en el apartado 1.5 de la introducción).

I.4. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS)

La espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida ha sido una de las técnicas analíticas que más se ha extendido en las últimas décadas en el campo de la química analítica aplicada al medio ambiente, alimentos y salud pública. El éxito de su aplicación es una consecuencia de la combinación de una técnica de separación (LC) que presenta una gran versatilidad y las buenas y únicas capacidades de la MS. La MS se ha presentado como la posibilidad analítica de alcanzar una elevadísima sensibilidad, incluso hasta niveles de pg/L, debido a su altísima especificidad. Además, presenta la habilidad única de medir los iones con masa exacta, proporcionando información de la composición elemental, permitiendo establecer las rutas de fragmentación. Incluso, ha sido posible aplicar todas esas cualidades en muestras de alta complejidad, alcanzando niveles de resolución inimaginables hace unos años con instrumentos considerados de alta/media resolución.

De forma muy básica se puede definir el funcionamiento de la MS en los siguientes pasos: (a) la ionización, en la que las moléculas de los analitos pasan a estado gaseoso ionizándose, adicionándose o eliminándose un electrón o un protón. El exceso de energía proporcionado en este paso también puede transformarse en una fragmentación de la molécula, generando iones fragmento. (b) El siguiente paso es la separación y el análisis de la masa de los iones moleculares y sus fragmentos cargados basándose en su relación m/z . (c) Medida, amplificación y creación de espectros de masas. Para que el segundo paso se desarrolle correctamente es necesario trabajar con alto vacío, permitiendo el movimiento libre de los iones en el espacio, sin la interferencia de otras especies con las que puedan colisionar. La colisión puede generar la fragmentación de los iones moleculares y/o producir nuevas especies por reacciones ión-molécula. Este último efecto produciría una reducción de la sensibilidad y resolución del análisis, generando resultados ambiguos o mala interpretación. Teniendo en consideración estas premisas, cabría introducir con un poco más de profundidad los componentes esenciales en cada uno de los pasos en MS. A continuación se va a exponer los modos de ionización en función de las interfases más extendidas en el acoplamiento de LC-MS para la determinación de analitos de pequeño peso molecular. También se va a tratar brevemente las características y posibilidades que presentan los analizadores más usuales en este campo. Finalmente, se comentará la MS en tándem, así como sus modos de adquisición. Sin embargo, si se desea conocer con mayor profundidad y detalle cada uno de estos puntos se puede recurrir a la literatura, con libros especializados como: “*Mass*

Spectrometry: Principles and Applications" (Hoffmann et al., 2002), "*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*" (Niessen, 2006), "*Fundamentals of contemporary Mass Spectrometry*" (Dass, 2007).

I.4.1. Modos de ionización: interfases de ionización a presión atmosférica

La clave que asegura un buen éxito en las experiencias en MS recae en gran parte en la capacidad de conseguir que los compuestos neutros se conviertan en iones moleculares o fragmentos en estado gaseoso. La ionización de los analitos es de vital importancia porque es la base de la MS, ya que controlar, separar y dirigir iones cargados resulta eficiente y sencillo mediante la aplicación de campos eléctricos y magnéticos. Conseguir este paso inicial en el acoplamiento de LC-MS fue el que limitó considerablemente su aplicación comercial de una forma robusta hasta los años 80. La principal incompatibilidad que presentaba el acoplamiento de MS con LC eran los altos flujos (alrededor de 1 mL/min) y la baja volatilidad de las fases móviles que debían evaporarse sin interferir con el alto vacío que hacía falta en el analizador de MS (normalmente entre 10^{-4} a 10^{-7} torr). En ese sentido, las primeras interfases que se desarrollaron tenían como objetivo principal la eliminación del disolvente, pretendiendo alcanzar una similitud con la técnica homóloga GC-MS e intentando conseguir moléculas de analito en fase gaseosa antes de llegar a la fuente de ionización. Una de las interfases más usadas fue el haz de partículas (*Particle-Beam*, PB), la cual era capaz de separar rápidamente y con alta eficiencia el solvente de las moléculas eluidas en la cromatografía líquida. Posteriormente, durante el desarrollo de estas fuentes se comprobó que era posible favorecer la ionización de los analitos en presencia del solvente sin perturbar al analizador de MS. Se observó que no era necesaria la presencia de un filamento para la ionización, si durante la nebulización se obtenían gotas cargadas, sobre todo para analitos de carácter básico, ácido o iónico. De esta manera, también se contempló la posibilidad de realizar la ionización de las especies a presión atmosférica. A partir de estos principios físicos básicos se comenzó a desarrollar durante los años 70 las interfases a presión atmosféricas (*Atmospheric Pressure Interface*, API), que no se presentaron comercialmente hasta finales de los 80, proceso que culminó cuando se le concedió el Premio Nobel de Química a John B. Fenn en el 2002 por el desarrollo de una de las fuentes API más versátil, la interfase y fuente de ionización electrospray.

A lo largo de estas últimas dos décadas, se ha hecho uso de diferentes técnicas para ionizar en fase líquida, en concreto se deben comentar cuatro de ellas: ionización por *Termospray* (TSP), ionización química a presión atmosférica (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, APCI), fotoionización a presión atmosférica (*Atmospheric Pressure Photoionization*, APPI) e ionización por electrospray (*Electrospray Ionization*, ESI). A continuación se comentan brevemente cada una de ellas, considerando su aplicación principal.

- *Ionización por Termospray (TSP)*

La fuente de ionización TSP fue propuesta por Blakey y Vestal en 1983, como predecesora de la interfase ESI. Resultó ser una buena interfase para el acoplamiento de MS con LC, llegando el flujo de la LC (de 0.5 a 2 mL/min) a un capilar calentado que producía un aerosol de finas gotas en una cámara de vacío. En un extremo de la cámara de vacío se encontraba un electrodo de repulsión frente a una serie de lentes de enfoque; este sistema es el que extraía los iones y los dirigía acelerándolos hacia el analizador. El proceso de ionización se basaba en reacciones ácido-base de transferencia de protones con compuestos iónicos presentes en el solvente o en el tampón comúnmente usado en la cromatografía (como por ejemplo NH_4^+ y CH_3COO^-). Aunque esta fuente fue aplicada a una amplia gama de compuestos, como péptidos, nucleótidos, plaguicidas, fármacos y contaminantes orgánicos, actualmente está en desuso.

- *Ionización por Electrospray (ESI)*

El electrospray se produce por la aplicación de un alto voltaje (3-6 kV) sobre un capilar conductor por el que circula un pequeño flujo de fase móvil de la LC a presión atmosférica. La elevada diferencia de potencial crea un campo eléctrico que induce la acumulación de cargas sobre la superficie del líquido al final del capilar, rompiéndose en pequeñas gotas de solvente cargado. Estas gotas de solvente se dispersan como consecuencia de la introducción de un flujo de gas inerte coaxial al flujo de la fase móvil, este gas también provoca la evaporación o pérdida del resto de solvente en las gotas, ya que circula a altas temperaturas. El flujo óptimo proveniente de la cromatografía líquida debe ser del orden de 2 a 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, sin embargo se han aplicado flujos mayores, de hasta 300 $\mu\text{L}/\text{min}$, empleando diseños de fuentes con energía adicional, temperatura o flujo del gas, lo que permitir una mejor dispersión de las gotas a partir del capilar. Originalmente la interfase ESI se consideró como una fuente de ionización dirigida a análisis de proteínas, pues es frecuente la formación iones con más de una carga. Por ejemplo, un compuesto de masa molecular 12000, si se adquiere 20

cargas se observará a m/z 601 ó 599 en función del tipo de ionización, positiva o negativa, respectivamente. De forma que la interfase ESI permite el análisis de macromoléculas en instrumentos MS donde su rango de masas no alcanzaría su peso molecular. De ahí que posteriormente, fue aplicada no sólo a otros polímeros o biopolímeros, sino también a moléculas polares de pequeño tamaño molecular.

Los iones que se forman en ESI pueden ser de carga positiva o negativa, generalmente se presentan como: (a) en modo positivo, iones de moléculas protonadas, aductos de sodio, potasio o amonio; (b) en modo negativo, iones moleculares desprotonados o aductos de formiato o acetato.

A principios de los años 90 se desarrolló una fuente denominada *Sonic Spray Ionization* (SSI) (Hirabayashi *et al.*, 1994 y 1995), que no fue comercializada hasta principios de esta década (van Berkel *et al.*, 2003). Este tipo de fuente está inspirada en la fuente ESI, pero se diferencia en que las gotas se cargan sin la presencia de un campo eléctrico. Su principio físico se basa en que si el flujo del gas nebulizador es suficientemente rápido la energía comunicada por la tensión superficial de las gotas al separarse hacen que se carguen. La mayor ventaja de esta fuente es que no necesita los altos voltajes y temperatura para conseguir la ionización y paso a estado gaseoso, siendo una alternativa muy interesante para aquellos compuestos inestables en ESI.

- *Ionización química a presión atmosférica (APCI)*

La APCI es una técnica de ionización a presión atmosférica que se basa en reacciones ión – molécula en fase gaseosa. Se la considera análoga a la ionización química en GC-MS, ya que se forman iones primarios mediante la descarga de una aguja corona (2-5 kV) a la salida de la interfase. Esta es aplicable a compuestos menos polares que deben ser volátiles y térmicamente estables con un rango de masas no mayor de 2000 Da, para que ésta tenga éxito. En general, se ha hecho uso de esta técnica para el análisis de esteroides, plaguicidas y fármacos. Se ha encontrado que en este modo de ionización se favorece la formación de iones protonados/desprotonados, probablemente debido a que la formación de iones primarios de las moléculas del solvente o de los aditivos introducidos en la fase móvil favorecen su interacción con las moléculas de los analitos generando iones protonados/desprotonados.

Originalmente, las fuentes a presión atmosférica ESI y APCI se diseñaron como dos interfases independientes, sin embargo, se han comenzado a

comercializar fuentes de doble función, donde son compatibles ambas ESI y APCI y se intercambian en tiempos de adquisición muy bajos. Esta doble funcionalidad abre las puertas al desarrollo de metodologías de análisis que puedan abarcar un mayor número de compuestos en un mismo método de análisis. La ionización en este modo se puede dar tanto en positivo como en negativo. Debido a que la ionización tiene lugar en medio gaseoso a presión atmosférica, se dan un gran número de interacciones entre los iones de los aditivos o moléculas de solvente de la fase móvil, y los iones del analito. En ese sentido, la ionización será positiva cuando la afinidad de las moléculas del analito por el protón sea mayor que la del resto de moléculas presentes en el medio. En modo negativo, las moléculas del analito cederán un protón a la fase gaseosa, si la acidez de ésta es mayor. Debido a que las moléculas se ionizan en fase gaseosa estas deben encontrarse en forma neutra antes de su ionización, este hecho físico justifica que la aplicación de APCI se dirija hacia moléculas menos polares que en ESI. Por otro lado, este principio también explica que se haya encontrado que la fuente de APCI presente menos efecto matriz que la fuente ESI, este punto se tratará con más detalle en el capítulo 2 de la presente tesis.

- *Fotoionización a presión atmosférica (APPI)*

Este modo de ionización es el más reciente y todavía se encuentra en expansión, desarrollada por Bruins *et al.* a principio de esta década (Robb *et al.*, 2000), ha surgido como una alternativa para la ionización de moléculas apolares y polares de bajo peso molecular. El flujo de líquido de salida se evapora nebulizándolo a alta temperatura de una forma similar a la fuente de APCI, generando una nube de gas denso con los analitos en fase gaseosa. La ionización se provoca por un haz de fotones emitida por una lámpara de ultravioleta. Se han descrito dos tipos de APPI, la directa y aquella que necesita un compuesto dopante que favorezca la ionización. En la APPI directa se ioniza las moléculas orgánicas cuando presentan su primer potencial de ionización (usualmente entre 7-10 eV) es menor al de la energía del fotón; los iones tras la absorción de un fotón cambian el estado energético de un electrón que es emitido, obteniendo cationes radicales. En el caso de APPI con dopante, son las moléculas del dopante las que absorben los fotones, para que una vez ionizados se los transmitan a las moléculas de los analitos de la muestra. Este último ha sido el más utilizado, considerando como típicos dopantes la acetona, tolueno o anisol (Raffaelli *et al.*, 2003). A pesar que la aplicación de este modo de ionización todavía no se ha popularizado, se han encontrado interesantes ventajas frente a su homóloga APCI. La posibilidad de formar cationes radicales ha permitido ampliar el potencial

de LC-MS a moléculas de muy baja polaridad; además, ha permitido reconsiderar el uso de la LC en fase normal, seleccionando disolventes que a su vez presenten buenas características como dopantes; finalmente, la energía de los fotones es menor que el típico potencial de ionización que presentan las fases móviles de fase reversa provocando una disminución del ruido químico.

Finalmente, cabe comentar la aproximación de una reciente interfase que basa la ionización en la excitación molecular producida por un flujo de fotones a una frecuencia fija de 248 nm creada por un laser, se denomina *Atmospheric Pressure Laser Ionization* (APLI) y presenta una aplicación muy interesante para el análisis de compuestos apolares como los hidrocarburos policíclicos aromáticos.

A continuación se introduce un esquema (**Figura I.8**) que ilustra la capacidad de aplicación de cada uno de las interfases de ionización comentadas anteriormente:

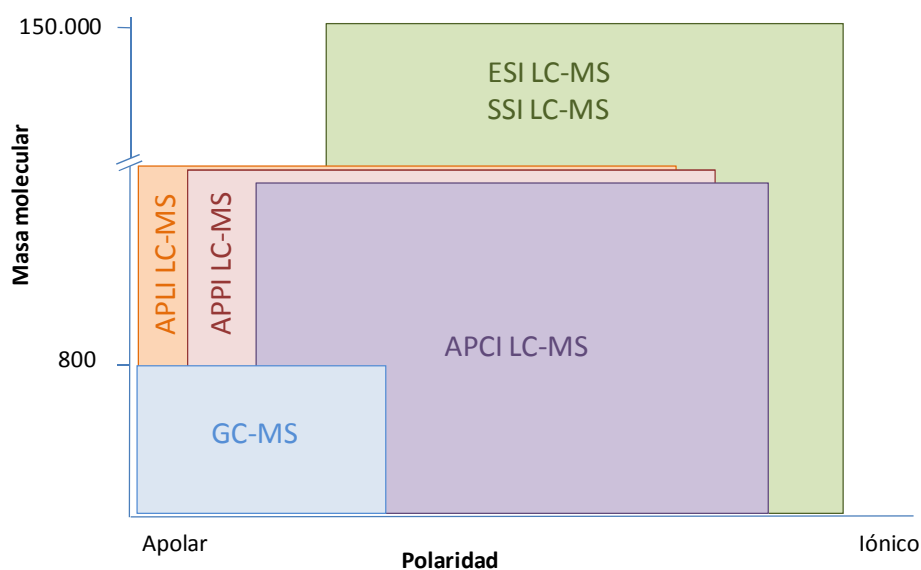


Figura I.8. Rango de aplicación del acoplamiento GC-MS y las diferentes interfases en el acoplamiento de LC-MS en función de la polaridad de los analitos y su masa molecular.

Las diferentes interfases utilizadas para la ionización y las propias diferencias en la ionización de un mismo compuesto en cada una de ellas, hace

que todavía no se haya creado librerías universales de compuestos para LC-MS como en GC-MS.

I.4.2. Analizadores de espectrometría de masas

Al analizador de masas se le considera el alma del espectrómetro de masas, el principio físico en el que se basa su diseño y forma de dispersar los iones y después focalizarlos en función de la relación masa/carga (indicado comúnmente como m/q o m/z) es el que promueve, la diferencia entre los distintos instrumentos de espectrometría de masa. En el diseño de los analizadores de MS se distinguen como los más populares: cuadrupolo (*Quadrupole, Q*), trampa de iones cuadrupolares (*Quadrupole Ion Trap, QIT*), trampa de iones lineales (*Linear Ion Trap, LIT*), *Orbitrap*, resonancia de ión ciclotrón (*Ion Cyclotron Resonance, ICR*), sector magnético y TOF. La capacidad de un analizador se evalúa de forma general en base a las siguientes características: rango de masas, resolución de masa, eficiencia de transmisión de iones, exactitud de masa, rango dinámico de linealidad, velocidad de barrido y sensibilidad. Por otro lado, otros factores que también determinan la elección de un instrumento u otro son su adaptabilidad y coste económico.

De todos los analizadores citados nos centraremos en aquellos que luego se han utilizado en el desarrollo experimental de la tesis que se presenta, estos son el analizador cuadrupolo y el analizador tiempo de vuelo.

- *Analizador cuadrupolo (Q)*

Actualmente, este diseño de espectrómetro de masas es el más extendido y usado. La razón reside en el hecho que los cuadrupolos ofrecen un buen compromiso con el rango de masas (de 40 a 4000 amu), reproducibilidad y precisión para la cuantificación, además de una alta sensibilidad a un precio razonable.

Un cuadrupolo consiste en cuatro barras dispuestas en paralelo con una alta precisión, los polos se encuentran espaciados alrededor de unos ejes centrales. Las barras situadas en posición opuesta se les aplican una corriente continua (DC) y un voltaje de radiofrecuencia (RF). Los iones son introducidos en el campo cuadrupolar mediante la aplicación de un potencial, con lo que empiezan a oscilar en un plano perpendicular a las cuatro barras. De esta manera los iones describen una trayectoria que depende directamente de su relación m/z . En definitiva, la

separación de los iones de diferente relación m/z se produce por la vibración estable de los iones en un campo eléctrico de alta frecuencia generado entre los polos del cuadrupolo. De forma específica, los cuadrupolos son capaces de ajustar una radiofrecuencia para estabilizar una relación m/z concreta que es dirigida hacia el detector, descartando aquellas relaciones m/z mayores o menores a la seleccionada. El cuadrupolo actúa como un filtro de masas, de forma que de todos los iones provenientes de la fuente, sólo se van transfiriendo al detector los seleccionados, perdiéndose el resto por el camino. En ese sentido, para obtener un barrido total de masas debe ir acoplando una a una las m/z mediante la creación de campos eléctricos selectivos de cada una de ellas. En general la velocidad de escaneo suele ser de 4000-5000 amu/s.

- *Analizador tiempo de vuelo (TOF)*

El principio físico de este analizador es uno de los más sencillos, la separación de los iones la realiza en función del tiempo que tardan en atravesar un tubo de vuelo, el cual depende de la relación m/z (típico tiempo de vuelo se encuentra entre 5-100 μ s). Una de las dificultades más importantes de este tipo de instrumentos al acoplarlos con LC es que los iones que llegan continuamente de la interfase tienen que ser enviados al TOF mediante un pulso. Para obtener una buena medida del tiempo de vuelo de los iones, el tiempo al que comienza el vuelo de los iones debe estar muy bien controlado. Para obtener una eficiencia de la transmisión de los iones adecuada se ha diseñado la aceleración ortogonal de los iones procedentes de la fuente, que permite muestrear una fracción de este haz de iones continuos. De forma que el analizador TOF trabaja de forma discontinua al contrario que el analizador de cuadrupolo, ya que los iones que llegan al analizador son pulsados ortogonalmente al tubo de vuelo teniendo que esperar el tiempo necesario para que todos alcancen al detector antes de volver a lanzar otro pulso. Habitualmente la fracción de iones muestreados en el pulso es aproximadamente el 25% de los iones generados en la interfase. A pesar de esto, este porcentaje de iones es mayor que el obtenido en un cuadrupolo operando en modo barrido total de los iones (*full scan*), lo que los convierte en uno de los instrumentos más sensibles en este modo de adquisición.

Un TOF simple lineal con una longitud aproximada de un metro de tiempo de vuelo puede alcanzar un potencial de resolución de alrededor de 1000 FWHM. Si se desea alcanzar una mayor resolución sería necesaria mayor longitud del tubo de vuelo, algo que resulta poco práctico en un laboratorio de análisis. Por otro lado, iones isobáricos pueden diferir en el tiempo de localización en el espacio debido a las diferencias de energías cinéticas en su inicio, provocando que estos

iones alcancen al detector a diferentes tiempos, empobreciendo la resolución. Además, inicialmente también se encontró que debido a la energía de dispersión que los iones recibían en la fuente de ionización, iones de distinto m/z alcanzaban el detector al mismo tiempo, empeorando también la resolución. Para solucionar estos inconvenientes se han ideado el uso de los reflectrones. Un reflectrón es un sistema óptico compuesto por un conjunto de espejos de iones que son capaces de reflejar el vuelo del ión al contrario de su trayectoria. Éstos permitieron el diseño de instrumentos con un espacio de vuelo muy alto que compensaba las diferencias y la dispersión en las energías cinéticas de los iones provenientes de la interfase. De hecho, un ión con mayor energía cinética penetrará a mayor profundidad en el reflectrón que otro ión teniendo la misma m/z pero menor energía cinética. De esta forma se van generando paquetes de iones más discretos y que llegan al mismo tiempo al detector, favoreciendo considerablemente la resolución instrumental del TOF. Actualmente, la resolución de analizadores TOF se ha incrementado notablemente, llegando a valores típicos de 5.000-20.000 FWHM.

Otra característica interesante del TOF, es que su forma de trabajar es tan sencilla que no pone teóricamente limitaciones en el peso molecular de los analitos que se desean determinar. Aunque conforme aumenta la relación m/z resulta más complicado determinar el tiempo de vuelo de los iones, se suele hablar de un límite práctico de 500.000 amu. Este hecho explica que sea preferible el uso de una interfase ESI en combinación con instrumentos TOF para análisis LC-MS. No siendo una limitación del rango de masas que permite el TOF, sino una consecuencia, pues compuestos de gran tamaño molecular no volátiles que presentarán dificultad para la ionización con otros mecanismos diferentes al ESI. Por último, otra característica que diferencia claramente el analizador TOF del cuadrupolo es que el modo de adquisición siempre se realiza en barrido de masas (*scan*), por lo que siempre se obtiene un barrido de todos los iones en un rango de masas seleccionado.

Se puede concluir que las distintas características de cada analizador lo hace adecuado para unas aplicaciones y menos adecuados para otras, considerando que no existe el analizador ideal.

1.4.3. Espectrometría de masas en tándem (MS/MS): modos de adquisición

La posibilidad de poder acoplar dos analizadores de espectrometría de masa aumenta considerablemente el potencial y las posibilidades que ofrece esta técnica de LC-MS. Tradicionalmente se había trabajado con Q simples acoplados a GC, debido a que se obtenía gran cantidad de información estructural bajo una ionización por impacto electrónico. Sin embargo, el hecho que las fuentes de ionización API que permiten el acoplamiento entre LC y MS, producen una muy suave fragmentación de las moléculas ionizadas, generando muy poca información estructural, siendo muy interesante el uso de MS/MS acoplado a LC. Aunque, se puede inducir una mayor fragmentación de los iones en la fuente aumentando la energía de extracción, la información de la fragmentación obtenida suele ser complicada de interpretar. La fragmentación en la fuente suele originar una adquisición con una mayor cantidad de ruido químico. Además, que la presencia de interferentes de masas cercanas al fragmento impide una visualización clara de los espectros de los fragmentos del analito de interés.

La adquisición en tándem MS (MS/MS) ofrece una gran selectividad, ya que permite la posibilidad de aislar un ión en la celda de colisión, eliminando otros iones o fragmentos que puedan interferir. La fragmentación en este caso se produce por la colisión del ión seleccionado con moléculas de un gas inerte, recibiendo el nombre de disociación inducida por colisión (*Collision Induced Dissociation*, CID). La CID se suele dividir en dos etapas: en la primera, la energía translacional del ión se convierte en energía interna tras colisionar con la molécula de gas inerte; en la segunda, esta energía interna se transforma en energía de fragmentación, dividiéndose el ión en distintos fragmentos. Estas reacciones están ligadas directamente con la composición química y la estructura de la molécula. Tradicionalmente, la MS/MS se ha desarrollado en analizadores de tipo cuadrupolo, donde se han acoplado dos cuadrupolos (Q) mediante uno intermedio que hacía de celda de colisión (q). En el primer cuadrupolo (Q_1) se selecciona la relación m/z de interés, que se suele denominar como ión precursor, éste pasa a través de la celda de colisión (q) donde se fragmenta, los iones producto son separados por el segundo cuadrupolo (Q_2). Este tipo de instrumentos se han denominado triple cuadrupolo (QqQ). Aunque se denomine triple cuadrupolo, actualmente la celda de colisión suele ser un hexapolo u octapolo, ya que su diseño va dirigido a potenciar la eficiencia de la transmisión de los iones desde la celda de colisión hasta el Q_2 , además de presentarse como un espacio adecuado para la fragmentación. También otro tipo de analizadores

permiten el acoplamiento MS en tándem con un cuadrupolo, como las trampas de iones lineales o el tiempo de vuelo. Nos centraremos en el QTOF, cuyo diseño es muy similar al del QqQ sustituyendo el Q_2 por un analizador TOF. De esta manera, una vez ha sido fragmentado el ión precursor en la celda de colisión los iones fragmento entran en el tubo de vuelo determinándose como se ha indicado en el apartado anterior.

La MS en tándem presenta grandes ventajas prácticas frente a MS simple, ya que la calidad y la cantidad de información proporcionada por MS/MS, aumenta la selectividad y la capacidad de la técnica para la elucidación estructural. Adicionalmente, el QTOF es capaz de ofrecer la medida de los iones producto con una buena exactitud de masa, permitiendo la asignación de una fórmula empírica a cada ión, facilitando proponer una estructura química para cada ión producto, así como la ruta de fragmentación del ión precursor aislado. Por último, cabe destacar que el uso de LC-MS en tándem aumenta considerablemente la sensibilidad, especialmente en matrices complejas como extractos de origen vegetal, permitiendo la eliminación de interferentes de la matriz o de la propia fase móvil.

La adquisición mediante un QqQ ofrece una gran versatilidad (**Figura I.9**), dependiendo del modo en que opera cada uno de los dos cuadrupolos (Q_1 y Q_2). Cada uno de estos modos de adquisición presenta unas características que lo hacen idóneo para un objetivo concreto. Los modos de adquisición que se pueden aplicar son:

- *Barrido de todos los iones (full scan)*

En este modo de adquisición todas las moléculas que se ionizan en la interfase llegan al detector. En el QqQ, tanto la celda de colisión (q) como el segundo cuadrupolo (Q_2) no actúan en el proceso de selección, realizándose el barrido de iones con el primer cuadrupolo (Q_1) y obteniendo un espectro de *full scan*.

- *Adquisición de un ión seleccionado (Single Ion Monitoring, SIM)*

La adquisición SIM está dirigida a la medida de un solo ión, que es seleccionado en el primer cuadrupolo, donde la celda de colisión y el segundo cuadrupolo (Q_2) no actúan en la medida. Este tipo de adquisición deriva del uso de Q simple, y su aplicación en instrumentos QqQ no suele ser muy frecuente.

- *Barrido de iones producto (Product Ion Scan)*

El barrido de iones producto se lleva a cabo seleccionando en el primer cuadrupolo (Q_1) una m/z concreta denominado ión precursor, que se fragmenta con una energía de colisión adecuada en la celda de colisión; el segundo analizador adquiere en modo *full scan* de forma que se obtiene la medida de todos los fragmentos del ión precursor. A estos fragmentos se les denomina iones producto. Este modo de adquisición es ideal para la obtención de la máxima información estructural posible del ión precursor.

- *Adquisición de la reacción seleccionada (Selected Reaction Monitoring, SRM)*

En el modo de adquisición SRM, se selecciona un ión en el primer cuadrupolo (Q_1) denominado ión precursor; el ión precursor se fragmenta en la celda (q) de colisión en presencia de gas inerte aplicando una energía de colisión óptima; uno de los iones fragmento obtenido en q se selecciona en el segundo cuadrupolo (Q_2) etiquetándose como ión producto. La adquisición en SRM es la más utilizada en las aplicaciones analíticas cuantitativas mediante QqQ, ya que minimiza al máximo la presencia de otros interferentes y se presenta como una herramienta de alta sensibilidad y selectividad.

- *Barrido de iones precursor (Precursor Ion Scan)*

En este modo de adquisición, el primer cuadrupolo (Q_1) hace un barrido de todos los iones que provienen de la interfase en el primer cuadrupolo, fragmentándose en la celda de colisión a una energía concreta, de todos los fragmentos obtenidos sólo se selecciona uno por el segundo cuadrupolo (Q_2). El barrido de iones precursores tiene sentido en instrumentos de QqQ, debido a que se debe seleccionar un ión fragmento proveniente de la celda de colisión en el segundo analizador (Q_2). La aplicación a la que viene asociado este modo de adquisición es a un grupo de compuestos de la misma familia o a metabolitos provenientes de un mismo analito, pues el barrido de iones precursores a un ión producto común está directamente ligado a una estructura química común.

- *Barrido de pérdidas neutras (Neutral Loss Scan)*

El barrido de pérdidas neutras es un modo de adquisición muy específico de QqQ debido a que es necesario que dos analizadores trabajen coordinadamente. El primer cuadrupolo (Q_1) y el segundo cuadrupolo (Q_2) realizan un barrido en desfase, fijando un valor de masa que diferencia los iones

barridos en Q_1 y los barridos en Q_2 , una vez han sido fragmentados en la celda de colisión a una energía concreta. De esta forma, solo aquellos analitos que presenten la pérdida neutra seleccionada serán detectados. Al igual que en el barrido de iones precursores, este modo de adquisición es idóneo para la búsqueda de analitos de la misma familia o de metabolitos que comparten una estructura química común.

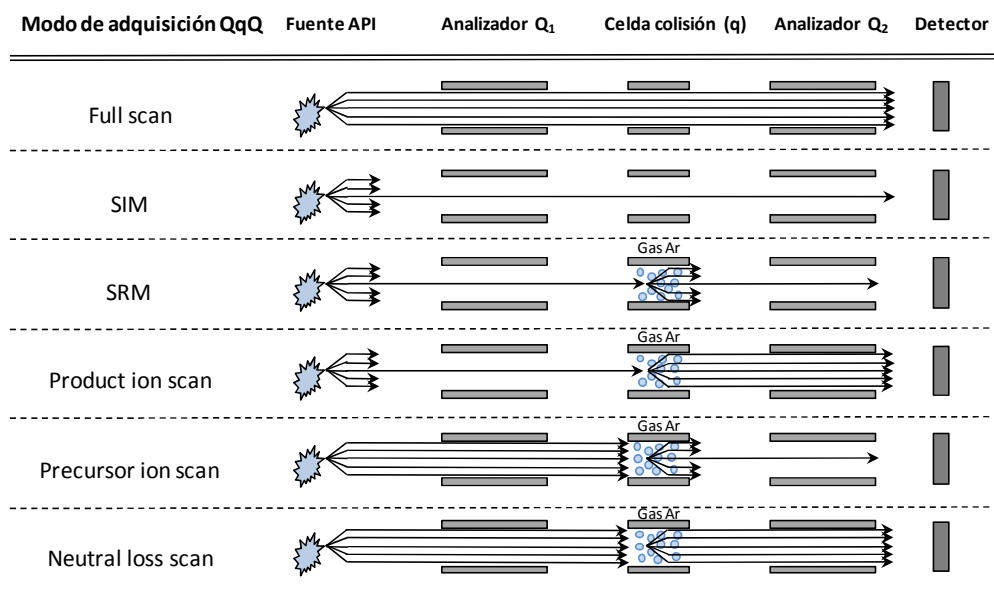


Figura I.9. Esquema de los modos de adquisición permitidos en un instrumento QqQ.

En el caso del QTOF, el acoplamiento entre los dos tipos de analizadores permite otras posibilidades diferentes a las del QqQ. Debido a que en el QTOF siempre se obtiene el espectro de *full acquisition* de todas las moléculas ionizadas en la interfase mediante la medida del analizador TOF, dependiendo de cómo actúen el cuadrupolo (Q) y la celda de colisión (q) se definirán los modos de adquisición (**Figura I.10**). Cuando el cuadrupolo y el hexapolo de la celda de colisión actúan de guías de iones únicamente, la adquisición es de barrido de iones o *full acquisition*. A diferencia con el QqQ, cabe destacar que la sensibilidad del TOF es mayor en este modo de adquisición, además de obtener la m/z con gran exactitud.

Por otro lado, si el cuadrupolo selecciona un ión precursor y este se fragmenta en la celda de colisión, el QTOF lleva a cabo un barrido de iones producto. Este modo de adquisición permite obtener las m/z de todos los iones productos con masa exacta derivado del ión seleccionado. Una ventaja que

presenta conocer la masa exacta es permitir el cálculo de la composición elemental de cada uno de los iones producto. Sin embargo, el instrumento QTOF no presenta la posibilidad de obtener un barrido de iones precursores, ya que el segundo analizador acoplado trabaja siempre en *full acquisition*. De la misma forma, no tiene sentido las adquisiciones típicas del QqQ en modo SRM y pérdidas neutras en instrumento QTOF.

Es importante comentar que también se puede hacer uso del instrumento QTOF para obtener el cromatograma correspondiente a un solo ión, como si de los modos de adquisición SIM y SRM posibles en QqQ se tratara, mediante la posterior extracción de un ión (*eXtracted Ion Chromatogram, XIC*) del cromatograma total de datos (*Total Ion Current, TIC*) obtenidos en su modo de adquisición *scan*. Tal y como se indica en la **Figura I.11**, el cromatograma obtenido al realizar un XIC de una *m/z* concreta en modo de adquisición *full scan* equivaldría al modo de adquisición en SIM en QqQ. Mientras que el cromatograma obtenido al aplicar un XIC a una determinada *m/z* de iones producto del ión precursor seleccionado en el cuadrupolo sería similar a la adquisición en SRM mediante QqQ.

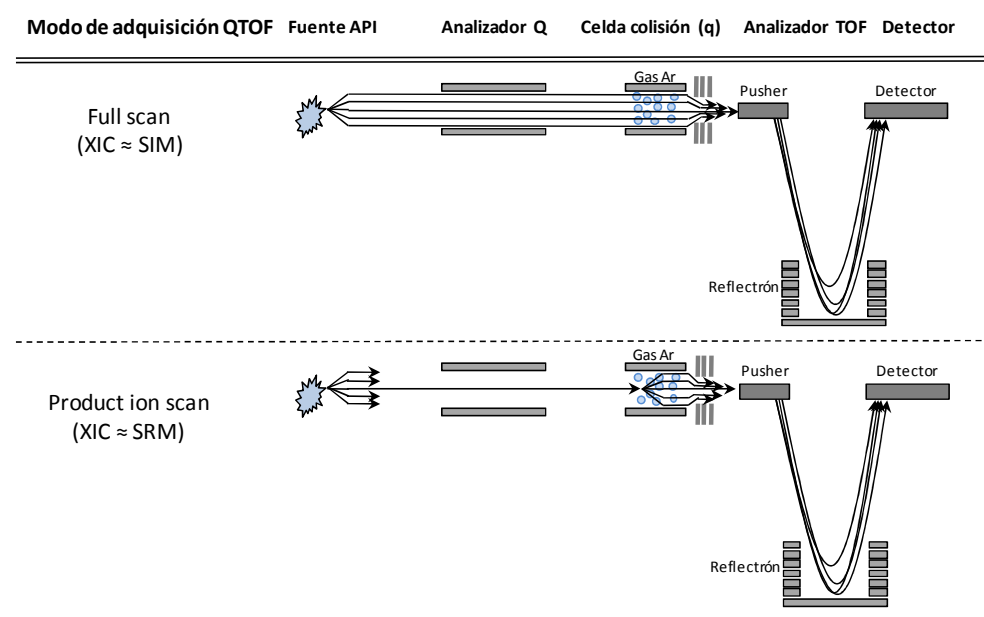


Figura I.10. Esquema de los modos de adquisición permitidos en un instrumento QTOF.

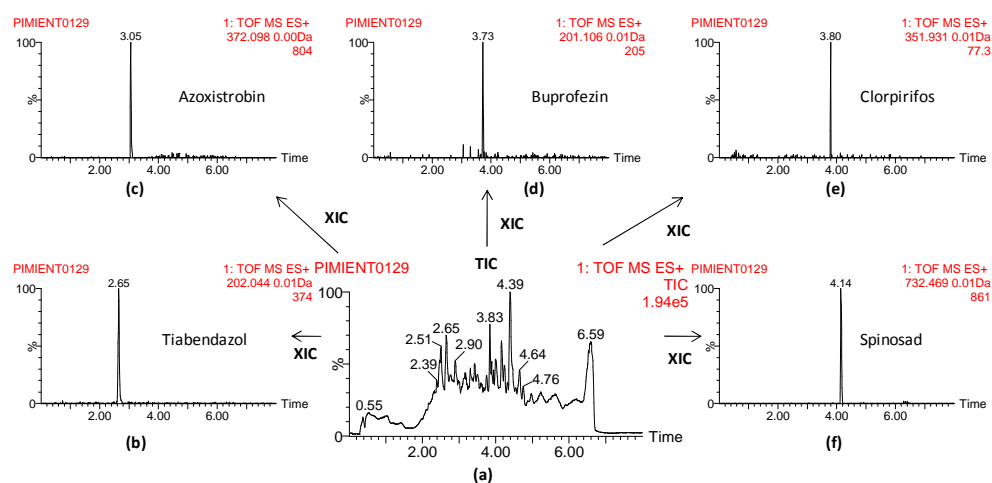


Figura I.11. (a) TIC obtenido en *full acquisition* por TOF MS de un extracto de pimienta fortificado con una mezcla de patrones de plaguicidas a 10 ng/mL ; (b), (c), (d), (e) y (f) XICs obtenidos con una ventana de masas de ± 5 mDa, para diferentes iones protonados o iones fragmento en la fuente de los plaguicidas indicados.

A primera vista parece razonable pensar que el QTOF presenta menos posibilidades que el QqQ, ya que sólo son posibles dos modos de adquisición. Sin embargo, es importante destacar que la cantidad de información, así como la calidad de la misma en modo *full scan* hace que el QTOF sea una de las herramientas de MS más idónea para los métodos *screening*.

- *Selección del modo de fragmentación en QTOF*

Una peculiaridad que presentan los nuevos instrumentos QTOF en su diseño es que siempre es necesaria una presión constante de gas inerte en la celda de colisión para mejorar la resolución, aunque se adquiere en modo *full acquisition*. Esto permite la posibilidad de alternar rápidamente entre modo TOF y QTOF en una misma secuencia sin necesidad de controlar el encendido del gas de colisión. Pero la mayor ventaja que este diseño ha proporcionado es la adquisición en modo TOF MS llevando a cabo la fragmentación de los iones obtenidos en la interfase hexapolar (i.e. celda de colisión) y no en la fuente de ionización (**Figura I.12**). Estas dos posibilidades de fragmentación se han estudiado en nuestro grupo, concluyéndose que la fragmentación en la celda de colisión permite obtener iones fragmento de los iones de la fuente de forma más robusta y con una mejor exactitud de masa. Además, resulta complicado encontrar un valor para el voltaje de cono que sea adecuado para la fragmentación de una amplia

gama de analitos al mismo tiempo en la fuente de ionización. Este sistema ha permitido la adquisición en *full scan* de forma simultánea de todos los iones provenientes de la interfase y de los iones fragmento de los mismos. Este tipo de aplicación resulta de especial interés en el estudio y búsqueda de desconocidos, como los metabolitos de los plaguicidas.

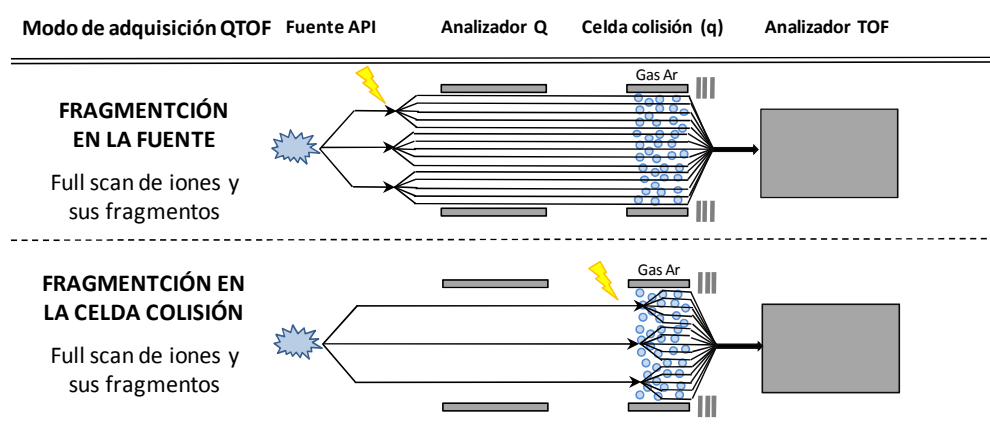


Figura I.12. Esquema de posibles mecanismos de fragmentación en una adquisición *full scan* en modo TOF MS con un instrumento QTOF.

I.4.4. Tratamiento de los datos adquiridos por LC-MS

En estos últimos años, uno de las áreas más activas en el desarrollo tecnológico de LC-MS se centra en la creación y aplicación de herramientas de *software* adecuadas para el tratamiento de toda la información obtenida. Mejoras en herramientas tradicionales como la substracción del ruido de fondo, la deconvolución del pico/espectro e incluso las búsquedas en librerías, han permitido avanzar en el desarrollo de nuevas estrategias de *screening* y búsqueda de contaminantes orgánicos y metabolitos de los mismos. La aplicación de este *software* va dirigido generalmente a instrumentos con características como el (Q)TOF, ya que es ventajosa en modos muy abiertos de adquisición, como el barrido total de iones o *full scan*.

Por otro lado, el desarrollo de nuevas aproximaciones como la denominada *Information/Data Dependent Acquisition* (IDA o DDA) resulta muy prometedor para dar un paso más en la expansión de la química analítica para la búsqueda automatizada de desconocidos mediante los datos obtenidos en la adquisición en los modos MS y MSⁿ secuencialmente en una sola inyección

cromatográfica. Se adquiere en modo *full scan* y aquellos picos que son más abundantes en el TIC o se han definido como de interés por el analista, en base a ciertos criterios como número de cargas, relación isotópica, ..., son adquiridos en modo MS/MS, obteniendo el barrido de iones producto del pico seleccionado.

Finalmente, cabe comentar que la técnica LC-MS es probablemente la técnica más potente para el estudio, búsqueda e identificación de metabolitos, creándose diversos *software* dirigidos hacia este objetivo, permitiendo el diseño de experiencias y un análisis más automatizado en este campo. Este tema se tratará con mayor profundidad en el apartado 4.3 del capítulo 4 de la presente tesis.

I.5. Problemática en la determinación de residuos de plaguicidas en muestras de alimentos por LC-MS

A la hora de desarrollar un método analítico para la determinación de plaguicidas en muestras de alimentos es importante considerar y estudiar aquellos parámetros críticos que puedan presentar posteriormente algún problema. Habitualmente se hace hincapié en los factores que más afectan a la cuantificación, como el efecto matriz, la linealidad y la sensibilidad. Por otro lado, en métodos más cualitativos como el uso de la masa exacta en la identificación de analitos mediante LC-QTOF, es de vital importancia la calibración del eje de masas y el uso de compuestos de referencia para asegurar la exactitud de masa. A continuación se tratan con mayor profundidad estos factores.

I.5.1. Efecto Matriz

Uno de los problemas más típicos que se debe evaluar cuando se desarrollan métodos cuantitativos con sistemas LC-MS es el denominado Efecto Matriz (EM). El EM es un aumento o disminución no esperada de la respuesta de los analitos de interés, que se produce por la coelución de otros componentes presentes en la matriz extraídos de la muestra. El mecanismo exacto que justifica el EM no se ha definido, sin embargo King *et al.* (2000) y Kebarle (2000) han mostrado tras una serie de experimentos, que el EM es el resultado de una competición entre los componentes no volátiles de la matriz y los iones de los analitos para acceder a la superficie de las gotas y pasar a estado gaseoso. Esta hipótesis justificaría porque se ha observado que el EM es un problema más acusado en la interfase ESI que en otras interfases. Dependiendo del ambiente en el cual tiene lugar la ionización y el proceso de evaporación del ión, la competencia de la matriz puede disminuirla sustancialmente, denominada supresión de la señal, o aumentarla, denominado exaltación de la señal. Este efecto no es universal, ya que se han descrito métodos para su determinación de una gran variedad de matrices y no se ha encontrado el mismo grado de EM en función del analito considerado. Por ejemplo, se ha observado efecto matriz para el cloromequat en peras (Castro *et al.*, 2001), sin embargo no se ha observado un EM en la determinación de paclobutrazol inyectando el extracto directamente (Sancho *et al.*, 2003). Por otro lado, el EM no depende únicamente del analito ya que se han mostrado recuperaciones para un mismo analito entre el 70 y 130 % dependiendo de la matriz extraída (Jansson *et al.*, 2004). Según estudios detallados de Matuszewski *et al.* (1998 y 2003) se ha encontrado que la supresión o exaltación de la señal va frecuentemente acompañada de un significativo deterioro de la precisión del método analítico. Por esta razón es de vital

importancia ensayar, previamente a la validación de un método analítico de cuantificación por LC-MS, el EM de cada una de las matrices de interés, y para cada uno de los analitos seleccionados.

Estudiar el EM es un proceso sencillo, siempre y cuando se disponga de matriz blanco de las mismas características que las muestras que se desean analizar. La principal estrategia utilizada para determinar el grado de EM es la extracción de muestra blanco y determinación por LC-MS tras la adición del analito post-extracción. Entonces se comparan las respuestas entre una disolución del patrón de referencia en solvente y este extracto blanco fortificado con el patrón, a la misma concentración preferiblemente. A partir de las respuestas obtenidas se puede calcular el porcentaje de respuesta del analito en la matriz estudiada frente al patrón en solvente sin matriz, como si de una recuperación se tratara. Si el porcentaje obtenido se encuentra por debajo del 100% se trata de supresión y si está por encima es una exaltación de la respuesta. Se ha estudiado el efecto matriz en análisis cuantitativo de pesticidas en muestras de origen vegetal y biológico (Kruve *et al.*, 2008; Niessen *et al.*, 2006; Sancho *et al.*, 2002) observándose que es más habitual la inhibición de la señal. Por otro lado, cabe comentar que se ha encontrado que los aditivos de la fase móvil también pueden generar EM, haciendo variar la respuesta del analito en LC-MS. De la misma forma sería de vital importancia optimizar la concentración del aditivo introducido en la fase móvil para llegar a la minimización de su EM.

Alternativamente, se han diseñado otros modos de visualización del efecto matriz, como la adición del analito post-columna o la inyección del extracto en modo *full scan*. El modo de adición del analito post-columna (Choi *et al.*, 1999) consiste en la continua adición del compuesto, o de un patrón interno, en modo post-columna mediante una bomba de jeringa mientras que el inyector automático introduce una muestra blanco, monitorizando en el detector MS la transición del analito. De esta manera, el analito se ve afectado constantemente por la matriz conforme ésta va eluyendo de la columna, dando información sobre la evolución del EM en función del tiempo. A pesar que resulta una ventaja conocer, en cada momento, de forma experimental el EM que sufre un analito en una determinada muestra, esta aproximación no proporciona ninguna información adicional sobre los interferentes causantes del efecto. La otra aproximación para visualizar el EM mediante la realización de un cromatograma en *full scan* de la matriz blanco, asume que todos los compuestos causantes del EM van a competir con el analito por la ionización, por lo tanto deben compartir el mismo modo de ionización que el analito. De forma intuitiva, cabe esperar que al

tiempo cromatográfico en el que eluyen más compuestos de la matriz, el EM será mayor. El principal inconveniente de esta aproximación es que no tiene presente que habrá otros compuestos que no se ionizan pero que si que produzcan EM. La ventaja del mismo es que es posible obtener información estructural sobre interferentes que producen dicho efecto, y por tanto, pueden dar una idea de cómo eliminarlos.

- *Alternativas para corregir el efecto matriz en la cuantificación en LC-MS*

Las alternativas que generalmente se aplican para evitar el EM van por dos vías: compensación del efecto mediante el uso de patrones internos o cuantificación mediante calibrado en matriz; eliminación de los interferentes que generan el EM mediante pretratamiento de muestra o mejora de las condiciones cromatográficas para una mejor separación entre interferentes y analitos, como el uso de columnas acopladas LC-LC o UHPLC. A continuación se comentan más detalladamente cada una de las alternativas.

- *Uso de patrones internos.* Se considera patrón interno de un analito a aquel compuesto que presente unas características físico-químicas muy similares a las del analito, es decir, que su retención en la LC, ionización en la interfase y fragmentación sea similar a la del analito. De esta forma, la estructura del patrón interno debe ser lo más parecida posible a la del analito, por ello el patrón ideal para corregir el EM es el mismo analito marcado isotópicamente. Esta alternativa tiene una gran ventaja, ya que permite la minimización de la etapa de procesamiento de la muestra, permitiendo incluso la inyección directa de extractos crudos. Sin embargo, la utilización de compuestos marcados isotópicamente como patrones internos presenta la limitación de no encontrarse en ocasiones disponible comercialmente o que su coste sea excesivamente alto, sobre todo de plaguicidas frente a otros campos como el farmacéutico.

Como ejemplo, se puede observar la **Figura I.13**, el uso de patrones externos en solvente para el cálculo de la cuantificación considerando la respuesta absoluta del analito imazalil en tomate; frente al uso de patrón interno deuterado, en el cálculo del área relativa para la misma cuantificación de imazalil. Se puede observar una exaltación de la ionización del imazalil en presencia de matriz de tomate llegando a dar respuestas del 200 %, provocando una cuantificación errónea de la concentración en valores absolutos. Sin embargo, con el uso del patrón interno para el cálculo del área relativa, se corrige totalmente la sobre-exaltación de la señal, obteniéndose valores de respuesta adecuados para la cuantificación (100%). A partir del uso

de áreas relativas mediante el uso de patrón deuterado (D5), se pudo llevar a cabo la validación de un método cuantitativo de imazalil en tomates con calibración con patrón interno.

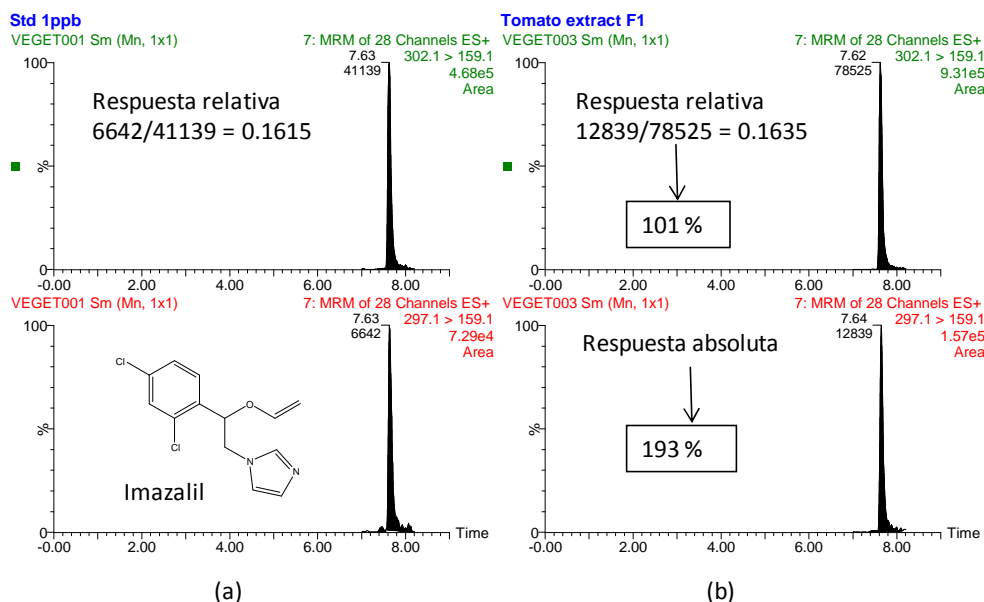


Figura 1.13. Cromatogramas HPLC-ESI-MS/MS correspondientes (a) patrón de imazalil a 1 ng/mL en la parte inferior y patrón deuterado D5 de imazalil a 10 ng/mL en la parte superior, (b) extracto de tomate blanco fortificado a 1 ng/mL (en muestra 0.005 mg/kg) de imazalil y 10 ng/mL de patrón interno deuterado.

Por otro lado, la elección del patrón interno debe hacerse adecuadamente, intentando seguir ciertas premisas, como que: el porcentaje de compuesto marcado en la naturaleza tiene que ser bajo con el fin de que no interfiera en la correcta cuantificación (como es el caso de ^{37}Cl o ^{34}S , de elevado porcentaje natural), prefiriendo compuestos marcados por ^{13}C o D; si se selecciona marcados con D, estos deben encontrarse en zonas de la estructura química estables, para evitar su pérdida o intercambio con H; si se selecciona marcados con ^{13}C , sería preferible que presenten más de un ^{13}C , ya que al ser un isótopo natural con una abundancia significativa (al 1% respecto al ^{12}C) el patrón interno pueda verse interferido por el analito en muestras positivas; tampoco sería interesante que el patrón interno presentara demasiados átomos marcados isotópicamente, ya que a mayor número de estos se va produciendo una diferencia química que afecta a su comportamiento, incluso variando el tiempo de retención o la ionización. En ese sentido sería interesante disponer de patrones internos que presenten de 2 a 5 átomos de D o ^{13}C . Otro tipo de patrones internos que se han utilizado

son análogos al analito, con una estructura muy parecida a la del analito, diferenciándose normalmente en algún grupo lejano del centro de ionización, generando una ionización y en muchos casos un tiempo de retención similar. Finalmente, cabe comentar que esta medida será útil, siempre y cuando no se produzca una disminución muy acusada de la sensibilidad, pues esta estrategia compensa el EM pero no lo elimina.

- *Calibrado en matriz.* Otra alternativa útil es la realización de calibrados en extracto blanco de la matriz. De esta forma se iguala el efecto matriz al mismo nivel en los patrones y en las muestras consiguiendo una calibración adecuada para la correcta cuantificación de la concentración en las muestras. Un inconveniente en este procedimiento es disponer de una muestra blanco que comparta las mismas características que la matriz de análisis. Este tipo de inconveniente es prácticamente insalvable en el análisis de sustancias naturales, donde siempre se encontrará presente el analito endógeno en la muestra blanco. Como ejemplo se puede observar en la **Figura I.14** la diferencia de respuesta del plaguicida mepanipirim en solvente y en un extracto de muestra de tomate, donde el área de pico casi se reduce a la mitad.

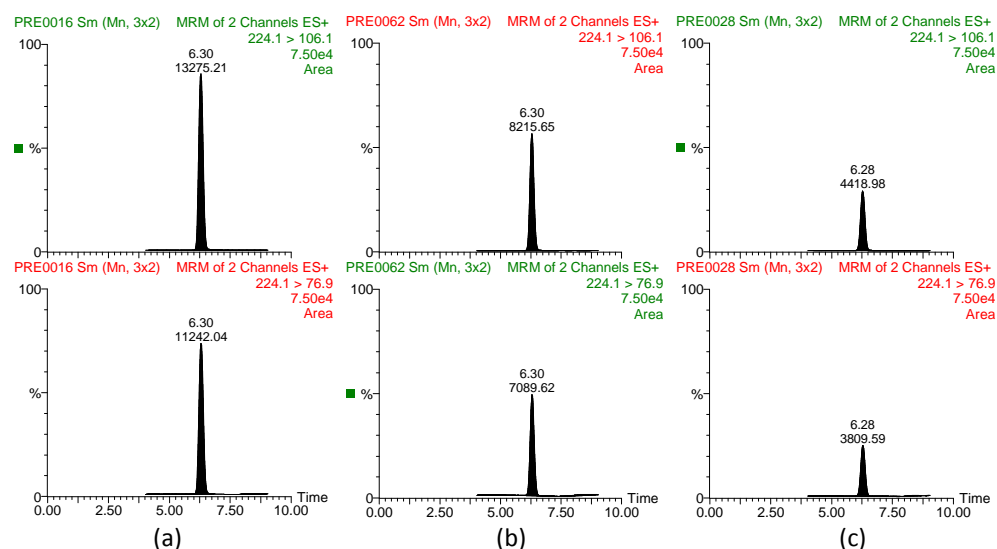


Figura I.14. Cromatogramas LC-ESI-MS/MS (a) patrón de referencia de mepanipirim a 50 ng/mL en solvente, (b) patrón de mepanipirim en extracto de tomate blanco 50 ng/mL, (c) muestra blanco de tomate fortificada con mepanipirim a 0.1 mg/kg, correspondiente en extracto a 25 ng/mL. Se han seleccionado dos transiciones en QqQ: 224>106 y 224>77.

Por otro lado, es importante tener presente que este tipo de alternativa solo corrige el EM para la correcta cuantificación, pero no lo elimina, por lo que puede ser inadecuado en casos donde se dé una supresión muy alta, generando pérdida de la sensibilidad. En el caso del mepanipirim, se puede observar una considerable pérdida de señal, sin embargo, no se presentó ninguna dificultad en alcanzar el LMR (1 mg/kg).

- *Dilución del extracto de la muestra.* Una posibilidad sencilla de disminución del EM es la dilución del extracto de la muestra. La minimización de la presencia de otros componentes de la matriz mediante su dilución en el extracto puede conseguir que estos sean comparables a los patrones en solvente en LC-MS. Además, esta dilución de la matriz puede presentar otras ventajas. Por ejemplo, en la determinación de fosetil en extracto de naranjas mediante cromatografía de pares iónicos, presentando una mejor forma de pico al diluirse cinco veces el extracto crudo, mejorando también la retención cromatográfica, ya que en este caso la formación del par iónico se veía favorecido al no encontrar tantos interferentes de la matriz (**Figura I.15**).

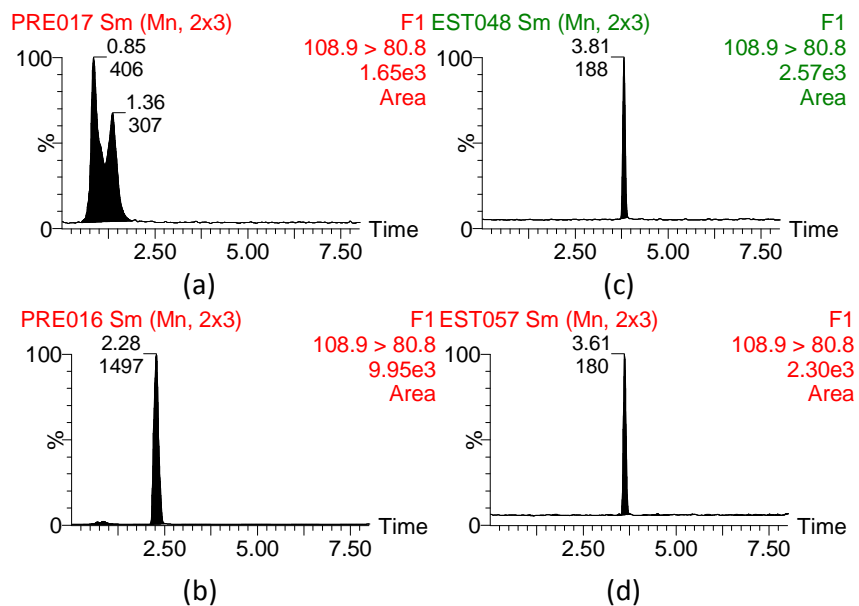


Figura I.15. Cromatogramas HPLC-ESI-MS/MS correspondientes (a) extracto crudo de muestra de naranja fortificada a 4.5 mg/kg y (b) un patrón de fosetil preparado en matriz blanco de naranja a 1130 ng/mL en extracto crudo; (c) extracto de naranja diluido 5 veces de una muestra fortificada a 4.5 mg/kg y (d) patrón de fosetil preparado en matriz blanco de naranja a 1130 ng/mL y diluida por 5 (corresponde a una concentración de 226 ng/mL).

El principal inconveniente de esta aproximación es la pérdida de sensibilidad inherente a la dilución, que lo desaconseja para análisis donde la sensibilidad requerida sea máxima.

- *Pretratamiento de la muestra.* En esta alternativa el objetivo es disminuir la presencia de posibles interferentes haciendo uso de los procedimientos de tratamiento de muestra como se indican en el *apartado 1.2* de la introducción, que purifiquen el extracto de muestra eliminando el máximo número de componentes que puedan interferir. El inconveniente que puede generar este tipo de trabajo es el gasto económico y de tiempo, además de la probabilidad de introducción de una mayor cantidad de errores. En algunos casos, en concreto en los que se desea preconcentrar el analito para aumentar la sensibilidad, se puede dar una preconcentración de interferentes de la misma magnitud que el analito generándose incluso un mayor efecto matriz.
- *Cromatografía de alta resolución.* Otro modo de eliminar interferentes que compitan con el analito en el proceso de ionización es mediante una correcta separación cromatográfica, ya que a pesar de trabajar con un sistema de detección muy específico como MS en tándem, la coelución de interferentes puede generar serios problemas de EM. En ese sentido, una correcta optimización de la LC puede ser clave en el desarrollo de un método analítico cuantitativo. Por otro lado, también se puede recurrir a una nueva aplicación cromatográfica como es el UHPLC, que puede ofrecer grandes ventajas en cuanto a la separación entre analitos y otros interferentes en la matriz. Como ejemplo se muestra a continuación las **Figuras 1.16**, y **1.17**, en las que se compara el EM en un sistema de cromatografía convencional en HPLC-MS/MS (columna X-Bridge C₁₈, 100 mm x 2.1 mm, i.d. 5.0 μm, flujo 0.2 mL/min) frente a un sistema de UHPLC-MS/MS (columna UPLC BEH C₁₈, 100 mm x 2.1 mm, i.d. 1.7 μm, flujo 0.3 ml/min), empleándose gradientes cromatográficos equivalentes en ambos sistemas. Se observa que el EM de algunos analitos (azoxistrobin, imazalil, diflubenzuron, tebufenozide y spinosad) presentan una supresión de la señal en extracto de tomate que impediría una correcta cuantificación cuando se trabaja con el sistema de HPLC-MS/MS (**Figura 1.16**). Para los tres restantes tan sólo se obtienen valores ligeramente superiores al 70%.

Sin embargo, para esta misma matriz de tomate es posible eliminar este efecto negativo de supresión mediante una cromatografía de mayor resolución, como es el caso de UHPLC (**Figuras 1.17a**, **1.17b**). Obteniendo relaciones de señal con respecto al patrón de referencia en solvente

adecuadas para todos los analitos, por lo que sería posible trabajar con un calibrado el solvente para obtener una correcta cuantificación.

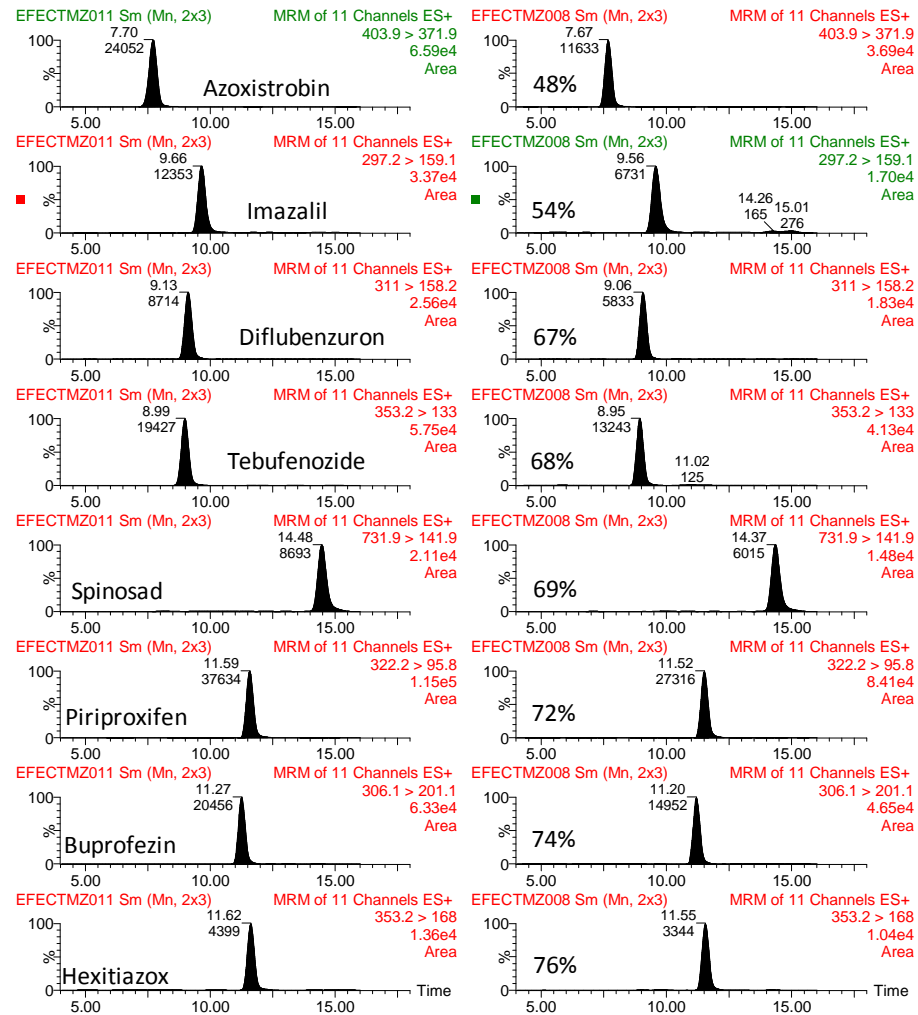


Figura I.16. Cromatogramas HPLC-ESI-MS/MS correspondientes (a) mezcla patrón de plaguicidas a 10 ng/mL en solvente, (b) extracto blanco de tomate fortificado a 10 ng/mL.

No obstante, este hecho no siempre se cumple, ya que dependerá del tipo de interferentes que contenga la matriz. De forma, que matrices con una carga más alta de otros componentes naturales de la matriz que sean co-extraídos presentará mayor complejidad, impidiendo incluso que esta alternativa sea suficiente. En este sentido, una matriz de pimienta que contiene otros componentes distintos al tomate, al ser inyectada en un sistema de UHPLC presentó considerable EM (**Figuras I.17c**) todavía para cuatro plaguicidas.

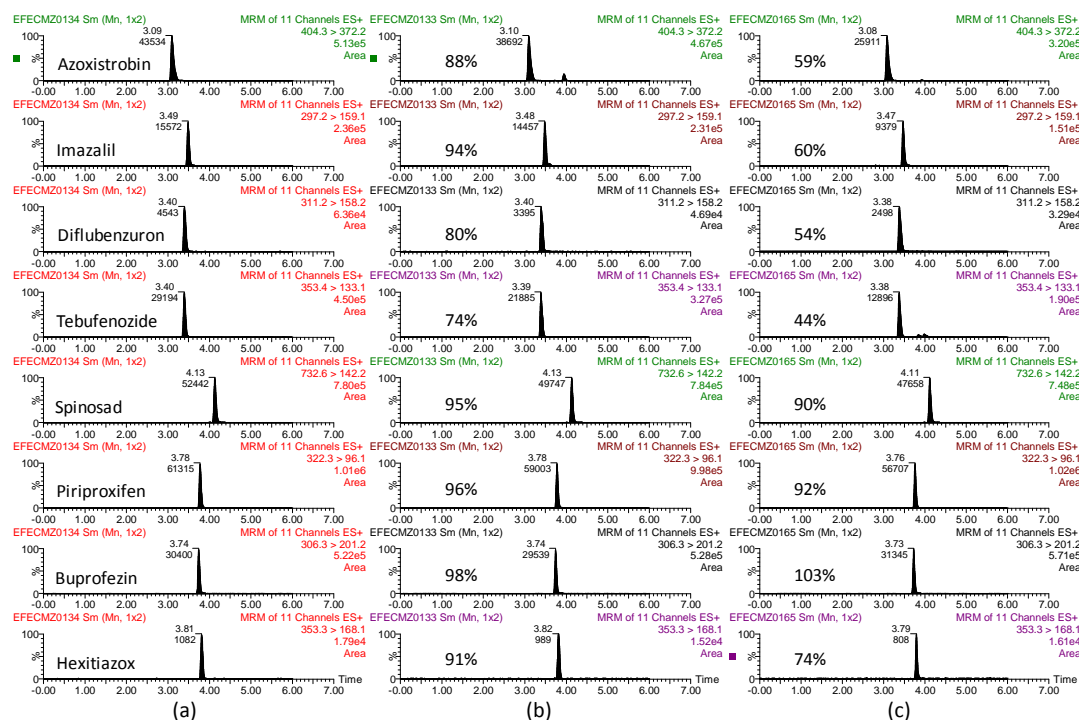


Figura 1.17. Cromatogramas UHPLC-ESI-MS/MS correspondiente (a) mezcla patrón de plaguicidas a 10 ng/mL en solvente, (b) extracto blanco de tomate fortificado a 10 ng/mL, (c) extracto blanco de pimiento fortificado a 10 ng/mL.

- *Cromatografía líquida con columnas acopladas.* Se ha aplicado la estrategia cromatográfica del acoplamiento de columnas cromatográficas en dos modalidades, SPE-LC y LC-LC (Hernández *et al.*, 2004; Hogendoorn *et al.*, 2003). Este sistema de purificación de la muestra permite un proceso automatizado y sin la introducción de errores a causa del pretratamiento manual o excesivo de muestra. Se ha demostrado la capacidad de alcanzar estas expectativas en muestras complejas como pueden ser orinas, llegando incluso a obtener resultados aceptables en la cuantificación de xenobióticos mediante el acoplamiento LC-LC a la determinación MS en tándem (Sancho *et al.*, 2002).

1.5.2. Rango de linealidad

La obtención de un correcto rango lineal es uno de los puntos más básicos para que la cuantificación pueda realizarse adecuadamente. Un rango lineal se considera adecuado para la determinación de la concentración cuando cubre al menos un valor 20% menor del mínimo valor ensayado y hasta un valor del 20%

mayor del máximo valor esperado. Por definición se suele considerar el coeficiente de correlación (r) para evaluar si se ha obtenido un ajuste adecuado de la ecuación (valores de $r > 0.99$). Además, resulta interesante considerar otros parámetros, como el valor de la ordenada de origen (significativamente no superior a cero), y los residuales en el ajuste lineal (menores del 30%).

Un efecto que se ha observado en los instrumentos de LC-MS es la deriva de la señal con el tiempo, esto puede hacer variar significativamente las respuestas de los analitos, influyendo negativamente en la cuantificación. Suele darse una curvatura de la respuesta, debido a una pérdida de la eficiencia de la ionización. Generalmente es una consecuencia de la contaminación de la interfase cuando se trabaja con muestras de alta complejidad. Como alternativa a estos efectos, se ha diseñado nueva instrumentación con interfases ortogonales al cono de entrada, además de incluir flujos de gas en sentido contrario a la entrada de los iones en el propio cono de muestreo, de forma que se elimina mayor cantidad de compuestos susceptibles de interferencias. Por otro lado, es posible realizar una eliminación de la primera fracción que eluye del sistema cromatográfico mediante la instalación de una válvula entre la columna cromatográfica y el detector de MS, generalmente denominado *solvent delay*. El *solvent delay* supone la eliminación de todos aquellos componentes de la matriz que no se retienen en la columna de fase reversa, mayoritariamente compuestos iónicos y muy polares.

Por último cabe comentar que el rango lineal que presentan los distintos instrumentos LC-MS es variable, algunos instrumentos se ven condicionados por el modo de adquisición, como ocurre con el IT o el TOF. Este hecho produce una curvatura de la respuesta debido a una saturación del detector, impidiendo conseguir rangos de linealidad muy extensos. Este tema se tratara de forma experimental en el capítulo 4 de la presente tesis.

I.5.3. Calibración y exactitud de masa

Cuando se trabaja con analizadores de MS es muy importante mantener un adecuado ajuste del eje de masas que asegure la correcta asignación de las masas espectrales, para lo que se suelen realizar calibraciones del eje de masas. La calibración del eje de masas en instrumentos de QqQ se suele realizar con menor frecuencia que otros analizadores, debido a que su resolución es más baja y se trabaja con masa nominal, es decir considerando como masa del ión la suma de los isótopos más abundante y despreciando el defecto de masa. Sin embargo,

otros analizadores como el TOF deben ser calibrados más asiduamente, con el objetivo de obtener ajustes de masas muy precisos y con ello buenos valores de masa exacta. Estas calibraciones se pueden realizar con cualquier mezcla de compuestos de masa conocida y que se encuentren a lo largo de todo el rango de masas que se desea calibrar, habitualmente se hace uso de una sustancia capaz de formar *clusters* o aductos consigo mismo como pueden ser las mezclas de CsI o HCOONa, estas mezclas son especialmente interesantes porque permiten la calibración tanto en negativo como en positivo. También es conocida la mezcla de polietilenglicoles, aunque resulta más compleja su preparación.

Además, en analizadores como TOF si se desea una alta exactitud de masa es aconsejable el uso de una sustancia de referencia que se adquiera periódicamente a lo largo del cromatograma, ya que es posible cierta desviación de la medida de la masa por pequeñas variaciones de las condiciones de trabajo como la temperatura, que pueden dilatar o contraer el tubo de tiempo de vuelo. La sustancia de referencia se denomina *lock mass* y se adiciona post-columna, mediante el uso de una vía de dos entradas, o bien mediante el uso de fuentes modificadas, como *lock spray* o *dual sprayer*. La masa conocida del *lock mass* se usa para recalcular el valor de todas las masas obtenidas durante la adquisición.

I.6. Actividades de aseguramiento de la calidad en la determinación de plaguicidas en alimentos por LC-MS/MS

Uno de los aspectos analíticos de continua actualidad en la mayoría de los laboratorios de análisis de plaguicidas es el relacionado con sistemas de garantía de calidad que aseguran la fiabilidad de los métodos de análisis aplicados y la trazabilidad de los resultados adquiridos. Desde 1998, los laboratorios oficiales de control de alimentos de todos los países de la Unión Europea están obligados a acreditarse de acuerdo con los criterios generales establecidos en la norma ISO 17025. En definitiva, la acreditación de un laboratorio de análisis de plaguicidas, por un organismo independiente, viene a ser el reconocimiento formal de que el laboratorio es competente para realizar determinados análisis.

I.6.1. Aplicación de las Buenas Prácticas de Laboratorio

Una alternativa más abierta a este sistema de acreditación son los sistemas de control de calidad denominados Buenas Prácticas de Laboratorio (BPLs). Los principios de las BPLs tienen por objeto promover la calidad de los datos de los estudios, asegurando a los clientes que cuenta con un personal competente y bien entrenado, y dispone de equipos y procedimientos normalizados de trabajo con los que puede producir resultados consistentes. Según el Real Decreto 1369/2000 (BOE núm. 173, 20 julio 2000) las BPLs se definen como un sistema de calidad relacionado con los procesos organizativos y las condiciones bajo las cuales los estudios no clínicos de seguridad sanitaria y medioambiental son planificados, realizados, controlados, registrados, archivados e informados. El campo de aplicación de las BPLs está dirigido a ensayos no clínicos de seguridad sobre productos de ensayo contenidos en productos farmacéuticos, plaguicidas, cosméticos, medicamentos veterinarios, aditivos utilizados en la alimentación humana y animal, y sustancias químicas industriales. En esencia, la aplicación de un sistema de calidad de estas características en un laboratorio de análisis de plaguicidas, permite llevar a cabo investigación analítica para el desarrollo y validación de métodos analíticos, así como su aplicación a muestras de estudio de campo y otras procedencias. Uno de los beneficios más interesantes que proporciona este entorno de trabajo es como la comparación de la calidad de estos datos, constituye la base de su aceptación mutua entre países, evitando la duplicación de estudios, ahorrando tiempo y recursos. La finalidad última es que la aplicación de estos principios debe contribuir a evitar que surjan

obstáculos técnicos para el comercio y mejorar la protección de la salud humana y el medio ambiente.

A lo largo del trabajo de la Tesis Doctoral se han realizado numerosos estudios analíticos bajo el sistema de BPLs. Se ha seleccionado, para la inclusión en la misma, aquellos estudios por LC-QqQ cuya investigación presentó especial interés. Los principios de las BPLs se aplicaron rigurosamente en el desarrollo de la fase analítica de los estudios, tanto en la validación del método analítico como en la aplicación del mismo en el análisis de muestras de un estudio de campo. Dentro de este entorno cabe comentar brevemente los criterios seguidos según el procedimiento para la validación de un método de análisis de residuos de plaguicidas. El procedimiento normalizado que describe las pautas a seguir se ha basado en la guía europea SANCO/2007/3131. De esta forma, se ha definido la validación de un método de análisis como el proceso destinado a comprobar que el método sea aceptable para el propósito para el que ha sido desarrollado. Generalmente en el procedimiento de validación se incluyen las siguientes pruebas: especificidad, linealidad, exactitud, precisión, límite de detección y límite de cuantificación. En el ensayo de exactitud y precisión se suele seleccionar un límite de cuantificación (*Limit of Quantification*, LOQ) cercano al LMR establecido para el plaguicida en la matriz en la que se está estudiando, en su defecto el valor típico es de 0.01 mg/kg.

Durante los diversos trabajos realizados para el desarrollo de un método analítico y su validación, se ha encontrado que se trata de un proceso iterativo, en el que no siempre es posible conocer si las condiciones del método desarrollado son del todo óptimas y aceptables hasta que la validación se cumple. En ocasiones ha sido necesaria la introducción de cambios en el método que ha obligado a revalidarlo con las nuevas condiciones. Finalmente se considera que un método analítico es válido si se cumplen los criterios de aceptación establecidos para cada una de las pruebas antes citadas.

Trabajar bajo un sistema de calidad, especialmente bajo un sistema de BPLs obliga a todo el personal a realizar un esfuerzo extra además de la inversión de su tiempo, sin embargo este trabajo y tiempo se ve recompensado gratamente cuando se puede asegurar las condiciones en que cada uno de los pasos seguidos en la validación y aplicación del método analítico han quedado registradas. Por un lado, esto facilita la búsqueda de la procedencia de un valor anómalo o error de análisis. Por otro lado, el mantenimiento y verificación de la instrumentación analítica disponible en el laboratorio, permite asegurar al analista si las condiciones de trabajo eran adecuadas. Este último punto es de especial interés

cuando se trabaja con instrumentación analítica delicada y de alta complejidad como puede ser LC-MS/MS.

I.6.2. Control de calidad en el análisis de muestras reales

Una vez se ha obtenido la validación de un método analítico, la funcionalidad del mismo es su aplicación para el análisis de muestras reales. En esta situación el control de calidad se puede seguir mediante el uso de los denominados *Quality Control* (QC). Se denomina QC a la aplicación del método analítico a una muestra blanco fortificada a un nivel de concentración conocido, generalmente al nivel del LOQ, ensayado en la validación del método y 10 veces dicho límite. De esta forma se pretende trabajar con QCs que estén cerca de los valores de concentración de las muestras analizadas, aún así esto no siempre es posible, en tal caso se suele diluir el extracto de la muestra.

El criterio de evaluación para los QCs establecido en las guías es el de una recuperación entre el 70-110%, además de una desviación de los valores medios no superior al 20%. Si se cumplen estas condiciones se puede asegurar que el método validado ha sido correctamente aplicado.

I.6.3. Confirmación de los análisis

La confirmación de los resultados es una parte delicada y ampliamente discutida (Lehotay *et al.*, 2008), ya que supone un punto muy importante a la hora de presentar los resultados asegurando su fiabilidad. La confirmación puede tener dos visiones, la confirmación de la identidad o la confirmación de la concentración. La confirmación de la identidad se encuentra asociado a la búsqueda de analitos no esperados o desconocidos, mientras que la confirmación de la concentración está asociada a análisis de analitos predeterminados y ya estudiados mediante el uso de patrones de referencia. En el primer caso, lo más adecuado es llevar a cabo un análisis de la muestra por varias técnicas analíticas. La aplicación de técnicas de análisis ortogonales es lo más ideal, ya que se asume que si un mismo analito se extrae y determina por métodos analíticos con características de selectividad muy diferentes asegura con una altísima probabilidad la identidad del compuesto estudiado. En el segundo caso, lo que se recomienda es el reanálisis de la muestra, de esta forma se comprueba la ausencia de errores introducidos por el analista, contaminaciones o problemas

instrumentales no controlados. La confirmación de la concentración del analito normalmente se suele combinar con una mayor especificidad del método analítico aplicado, como es la adición de nuevas transiciones de adquisición en SRM por LC-QqQ, o bien el máximo número de iones de fragmentación en LC-(Q)TOF. A partir de esta nueva información obtenida de la determinación de un analito se pueden calcular las relaciones de abundancia entre transiciones/iones fragmento, este parámetro de medida se suele denominar *Ion Ratio* (IR). Para obtener los IR se selecciona un ión de referencia, que suele ser el más abundante (Q). El cálculo se puede expresar como %, o bien como la división entre las áreas de referencia (Q) y el área del nuevo ión/transición de confirmación (q). De forma que si los valores de los IR teóricos (obtenidos a partir de patrones) y los de las muestras no se desvían por encima del porcentaje indicado en la **Tabla I.1**, establecido por la guías europeas (Decisión de la Comisión 2002/657/CE) se asegura que el ión seleccionado para confirmar cumple con el del analito.

Tabla I.1. Relación de desviaciones consideradas según la decisión de la comisión 2002/657/CE para la evaluación de la confirmación.

Intensidad relativa		Desviación permitida
% pico base	IR (Q/q)	LC-MS LC-MS ⁿ
> 50 %	1-2	± 20%
> 20%-50%	2-5	± 25%
> 10%-20%	5-10	± 30%
≤ 10%	> 10	± 50%

En la confirmación de los resultados se debe ser crítico, seleccionando aquellos casos que realmente merecen un estudio en profundidad, ya que de lo contrario se produciría un gasto económico y de tiempo desmesurado. El objetivo de la confirmación es evitar los falsos positivos y, lo que todavía sería peor, los falsos negativos. Descartar la posibilidad de dar un falso negativo, se puede realizar de una forma segura y sencilla, si en la aplicación de un método analítico validado para la matriz que se estudia no se ha encontrado residuo o este se encuentra por debajo del LOD, siempre y cuando el valor más bajo de la linealidad validado haya sido ensayado obteniendo un valor aceptable, y que los QCs al LOQ hayan presentado una recuperación y desviación adecuada.

En cuanto a lo que se refiere a los falsos positivos, lo ideal sería crear métodos de análisis lo más específicos posibles, de forma que se descarte la

posible presencia de un interferente al tiempo de retención del analito determinado. En ese sentido, LC-MS/MS o GC-MS/MS son herramientas analíticas de gran capacidad, permitiendo la adquisición en modo SRM de un gran número de transiciones adicionales a la de cuantificación. Sin embargo, aun siguiendo los criterios establecidos por las guías (2002/657/CE; SANCO/2007/3131) donde es suficiente la adquisición de dos transiciones en MS/MS para confirmar un positivo, en algunos casos muy particulares esto podría resultar en un falso positivo. Un ejemplo ilustrativo se presenta en el trabajo de Schürmann *et al.* (2009), donde se pudo haber considerado un falso positivo de sebutilazina en estragón mediante la adquisición de dos transiciones en LC-MS/MS. Sin embargo, gracias al uso de técnicas analíticas ortogonales (GC-MS/MS) y la confirmación con un analizador TOF, fue posible detectar el interferente como un compuesto endógeno de la propia hierba aromática, descartando la presencia de sebutilazina en la muestra.

El uso del (Q)TOF ha sido especialmente idóneo para la confirmación de la identidad de plaguicidas y metabolitos (Hernández *et al.*, 2005; Thurman *et al.*, 2005; Sancho *et al.*, 2006; Barceló *et al.*, 2007; Soler *et al.*, 2007 y 2008), debido a la calidad y cantidad de información que proporciona de un compuesto. Gracias a su adquisición con alta sensibilidad en modo *full scan* y su gran resolución permite obtener toda la información de los iones tanto moleculares como de fragmentación con masa exacta, además de poder considerar la relación de la abundancia isotópica en caso que esta sea discriminante (estructuras químicas con átomos con diferentes isótopos abundantes, como Cl, Br, S,...).

Por último, cabe destacar que es de vital importancia haber validado el método analítico para la matriz a la que se desea aplicar, considerando siempre que la diferencia entre matrices puede interferir seriamente en el desarrollo del método tanto al nivel de extracción y tratamiento de muestra como de determinación analítica, aumentando así la posibilidad de generar falsos negativos o positivos.

I.7.- Referencias bibliográficas

- Anastassiades, M.; Lehotay, S.J.; Štajnbaher, D.; Schenck, F.J. (2003) *Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce* J. AOAC. Int. 86, 412-431
- Andersen, W.C.; Turnipseed, S.B.; Karbiwnyk, C.M.; Clark, S.B.; Madson, M.R.; Giesecker, C.M.; Miller, R.A.; Rummel, N.G.; Reimschuessel, R. (2008) *Determination and confirmation of melamine residues in catfish, trout, tilapia, salmon and shrimp by liquid chromatography with tandem mass spectrometry* J. Agric. Food Chem. 56, 4340-4347
- Barceló, D.; Petrovic, M. (2007) *Challenges and achievements of LC-MS in environmental analysis: 25 years on* Trends Anal. Chem. 26, 2-11
- Bartle, K.D.; Myers, P. (2002) *History of gas chromatography* Trends Anal. Chem. 21, 547-557
- Blakey, C.R.; Vestal, M.L. (1983) *Thermospray interface for liquid chromatography/mass spectrometry* Anal. Chem. 55, 750-754
- Buser, H.-R.; Müller, M.D.; Poiger, T.; Balmer, M.E. (2002) *Environmental behaviour of the chiral acetamide pesticide metalaxyl: enantioselective degradation and chiral stability in soil* Environ. Sci. Technol. 36, 221-226
- Cajka, T.; Hajslova, J.; Lacina, O.; Mastovska, K.; Lehotay, S.J. (2008) *Rapid analysis of multiple pesticide residues in fruit-based baby food using programmed temperature vaporiser injection–low-pressure gas chromatography–high-resolution time-of-flight mass spectrometry* J. Chromatogr. A 1186, 281-294
- Castro, R.; Moyano, E.; Galceran, M. T. (2001) *Determination of chlormequat in fruit samples by liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry/mass spectrometry* J. AOAC Int. 84, 1903-1908
- Choi, B.K.; Gusev, A.I.; Hercules, D.M. (1999) *Postcolumn introduction of an internal standard for quantitative LC-MS analysis* Anal. Chem. 71, 4107-4110
- Crnogorac, G.; Schmauder, S.; Schwack, W. (2008) *Trace analysis of dithiocarbamate fungicide residues on fruits and vegetables by hydrophilic interaction liquid chromatography/tandem mass spectrometry* Rapid Commun. Mass Spectrom. 22, 2539-2546
- Cunniff, P. (Ed.) *Official Methods of Analyses of AOAC International*, AOAC International, Gaithersburg, 1997, p. 10, Chapter 10, method 985.22
-

Dass, C. (2007) *Fundamentals of contemporary Mass Spectrometry* Wiley-Interscience Series on Mass Spectrometry Desiderio D.M. and Nibbering N.M. Serie Editors

DECISIÓN DE LA COMISIÓN de 12 de agosto de 2002 por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. 2002/657/CE, Diario Oficial de las Comunidades Europeas, L221/8.

Esparza, X.; Moyano, E.; Galcerán, M.T. (2009) *Analysis of chlormequat and mepiquat by hydrophilic interaction chromatography coupled to tandem mass spectrometry in food samples* J. Chromatogr. A 1216, 4402-4406

Hamaya, T.; Yoshida, H.; Todoroki, K.; Nohta, H.; Yamaguchi, M. (2008) *Determination of polar organophosphorus pesticides in water samples by hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry* Rapid Commun. Mass Spectrom. 22, 2203-2210

Heller, D.N.; Nochetto, C.B. (2008) *Simultaneous determination and confirmation of melamine and cyanuric acid in animal feed by zwitterionic hydrophilic interaction chromatography and tandem mass spectrometry* Rapid Commun. Mass Spectrom. 22, 3624-3632

Hercegová, A.; Dömötöróvá, M.; Matisová, E. (2007) *Sample preparation methods in the analysis of pesticide residues in baby food with subsequent chromatographic determination* J. Chromatogr. A 1153, 54-73

Hernández, F.; Sancho, J.V. (2004) *Multidimensional liquid chromatography* Enciclopedia Anal. Sci.

Hernández, F.; Pozo, O.J.; Sancho, J.V.; López, F.J.; Marín, J.M.; Ibañez, M. (2005) *Strategies for quantification and confirmation of multi-class polar pesticides and transformation products in water by LC-MS² using triple quadrupole and hybrid quadrupole time-of-flight analyzers* Trends Anal. Chem. 24, 596-612

Hernández, F.; Sancho, J.V.; Ibañez, M.; Grimalt, S. (2008) *Investigation of pesticide metabolites in food and water by LC-TOF-MS* Trends Anal. Chem. 27, 862-872

Hirabayashi, A.; Sakairi, M.; Koizumi, H. (1994) *Sonic spray ionization method for atmospheric pressure ionization mass spectrometry* Anal. Chem. 66, 4557-4559

Hirabayashi, A.; Sakairi, M.; Koizumi, H. (1995) *Sonic spray mass spectrometry* Anal. Chem. 67, 2878-2882

Hogendoorn, E. A.; van Zoonen, P.; Hernández, F. (2003) *The versatility of coupled-column LC*. LC GC Europe 16, 44-48

- Hoffmann, E.; Stroobant, V. (2002) *Mass Spectrometry: Principles and applications. Second Edition* John Wiley and sons Ltd. Ed.
- Hundley, H.K.; Cairns, T.; Luke, M.A.; Masumoto, H.T. (1988) *Pesticide residue findings by the Luke method in domestic and imported foods and animal feeds for fiscal years 1982-1986* J. AOAC 71, 875-892
- Jansson, C.; Pihlström, T.; Österdahl, B.-G.; Markides, K.E. (2004) *A new multi-residue method for analysis of pesticide residues in fruit and vegetables using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection* J. Chromatogr. A 1023, 93-104
- Lambropoulou, D.A.; Albanis, T.A. (2007) *Methods of sample preparation for determination of pesticide residue in food matrices by chromatography-mass spectrometry-based techniques: a review* Anal. Bioanal. Chem. 389, 1663-1683
- Lehotay, S.J.; Hajšlová, J. (2002) *Applications of gas chromatography in food analysis* Trends Anal. Chem. 21, 686-697
- Lehotay, S.J.; de Kok, A.; Hiemstra, M.; van Bodegraven, P. (2005a) *Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection* J. AOAC Int. 88, 595-614
- Lehotay, S.J.; Maštovská, K.; Lightfield, A.R. (2005b) *Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables* J. AOAC Int. 88, 615-629
- Lehotay, S.J.; Maštovská, K.; Yun, S.J. (2005c) *Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes* J. AOAC Int. 88, 630-638
- Lehotay, S.J.; Maštovská, K.; Amirav, A.; Fialkov, A.B.; Alon, T.; Martos, A.; de Kok, A.; Fernández-Alba, A.R. (2008) *Identification and confirmation of chemical residues in food by chromatography-mass spectrometry and other techniques* Trends Anal. Chem. 27, 1070-1090
- Luke, M.A.; Froberg, J.E.; Masumoto, H.T. (1975) *Extraction and cleanup of organochlorine, organophosphate, organonitrogen and hydrocarbon pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography* J. AOAC. 58, 1020-1026
- Luke, M.A.; Masumoto, H.T.; Cairns, T.; Hundley, H.K. (1988) *Levels and incidences of pesticide residue in various foods and animal feeds analyzed by the Luke multiresidue methodology for fiscal years 1982-1986* J. AOAC 71, 415-433
-

- Kebarle, P. (2000) *A brief overview of the present status of the mechanism involved in electrospray mass spectrometry* J. Mass Spectrom. 35, 804-817
- King, R.; Bonfiglio, R.; Fernández-Metzler, C.; Miller-Stein, C.; Olah, T. (2000) *Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization* J. Am. Soc. Mass Spectrom. 11, 942-950
- Krueve, A.; Künnapas, A.; Herodes, K.; Leito, I. (2008) *Matrix effect in pesticide-residue analysis by liquid chromatography-mass spectrometry* J. Chromatogr. A. 1187, 58-66
- Matuszewski, B.K.; Constanzer, M.L.; Chávez-Eng, C.M. (1998) *Matrix Effect in Quantitative LC/MS/MS Analyses of Biological Fluids: A Method for Determination of Finasteride in Human Plasma at Picogram Per Milliliter Concentrations* Anal. Chem. 70, 882-889
- Matuszewski, B.K.; Constanzer, M.L.; Chávez-Eng, C.M. (2003) *Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS* Anal. Chem. 75, 3019-3030
- Mills, P.A.; Onley, J.H.; Gaither, R.A. (1963) *Rapid method for chlorinated pesticide residues in non fatty foods* J. Assoc. Off. Anal. Chem. 46, 186-191
- Mol, H.G.J.; Rooseboom, A.; van Dam, R.; Roding, M.; Arondeus, K.; Sumarto, S. (2007) *Modification and re-validation of the ethyl acetate-based multi-residue method for pesticides in produce* Anal. Bioanal. Chem. 389, 1715-1754
- Niessen, W.M.A. (2006) *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Third Edition* Chromatographic Science Series vol. 97, Ed. Taylor and Francis Group
- Niessen, W.M.A.; Manini, P.; Andreoli, R. (2006) *Matrix effects in quantitative pesticide analysis using liquid chromatography-mass spectrometry* Mass Spectrom. Reviews. 25, 881-899
- Payá, P.; Anastassiades, M.; Mack, D.; Sigalova, I.; Tasdelen, B.; Oliva, J.; Barba, A. (2007) *Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection* Anal. Bioanal. Chem. 389, 1697-1714
- Peeters, M.-C.; Defloor, I.; Coosemans, J.; Delcour, J.A.; Ooms, L.; Deliever, R.; de Vos, D. (2001) *Simple ion chromatographic method for the determination of chlormequat residues in pears* J. Chromatogr. A 920, 255-259
- Pihlström, T.; Blomkvist, G.; Friman, P.; Pagard, U.; Österdahl, B.-G. (2007) *Analysis of pesticide residues in fruit and vegetables with ethyl acetate extraction using gas and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection* Anal. Bioanal. Chem. 389, 1773-1789
-

- Polettini, A (2006) *Applications of LC-MS in Toxicology* Pharmaceutical Press Ed.
- Raffaelli, A.; Saba, A. (2003) *Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry* Mass Spectrom. Rev. 22, 318-331
- REAL DECRETO 1369/2000, de 19 de julio, por el que se modifica el Real Decreto 822/1993, de 28 de mayo, por el que se establecen los principios de buenas prácticas de laboratorio y sus aplicación en la realización de estudios no clínicos sobre sustancias y productos químicos. BOE núm. 173, jueves 20 julio 2000 (25832)
- REGLAMENTO (CE) No 299/2008 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 11 de marzo de 2008 por el que se modifica el Reglamento (CE) no 396/2005, relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal, por lo que se refiere a las competencias de ejecución atribuidas a la Comisión. Diario Oficial de la Unión Europea L97/67.
- Ridgway, K.; Lalljie, S.P.D.; Smith, R.M. (2007) *Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods* J. Chromatogr. A 1153, 36-53
- Robb, D.B.; Covey, T.R.; Bruins, A.P. (2000) *Atmospheric pressure photoionization: an ionization method for liquid chromatography/mass spectrometry* Anal. Chem. 72, 3653-3659
- Romero-Gonzalez, R.; Garrido Frenich, A.; Martínez Vidal, J.L. (2008) *Multiresidue method for fast determination of pesticides in fruit juices by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry* Talanta 76, 211-225
- Sancho, J.V.; Hernández, F. López, F.J.; Hogendoorn, E.A.; Dijkman, E.; van Zoonen, P. (1996) *Rapid determination of glufosinate, glyphosate and aminomethylphosphonic acid in environmental water samples using precolumn fluorogenic labeling and coupled-column liquid chromatography* J. Chromatogr. A 737, 75-83
- Sancho, J.V.; Pozo, O.J.; López, F.J.; Hernández, F. (2002) *Different quantitation approaches for xenobiotics in human urine samples by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry* Rapid Commun. Mass Spectrom. 16, 639-645
- Sancho, J.V.; Pozo, O.J.; Zamora, T.; Grimalt, S.; Hernández, F. (2003) *Direct determination of paclobutrazol residues in pear samples by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry* J. Agr. Food Chem. 51, 4202-4206
-

- Sancho, J.V.; Pozo, O.J.; Ibañez, M.; Hernández, F. (2006) *Potential of liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry for the determination of pesticides and transformation products in water* Anal. Bioanal. Chem. 386, 987-997
- SANCO/2007/3131, *Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed*. 31/October/2007, supersedes Document No. SANCO/10232/2006. <http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol-en.pdf>
- Soler, C.; Picó, Y. (2007) *Recent trends in liquid chromatography-tandem mass spectrometry to determine pesticides and their metabolites in food* Trends Anal. Chem. 26, 103-115
- Soler, C.; Mañes, J.; Picó, Y. (2008) *The role of the liquid chromatography-mass spectrometry in pesticide residue determination in food* Critical Review in Anal. Chem. 38, 93-117
- Schürmann, A.; Dvorak, V.; Crüzer, C.; Butcher, P.; Kaufmann, A. (2009) *False-positive liquid chromatography/tandem mass spectrometric confirmation of sebuthylazine residues using the identification points system according to EU directive 2002/657/EC due to a biogenic insecticide in tarragon* Rapid Commun. Mass Spectrom. 23, 1196-1200
- Swartz, M.E. (2005) *UPLC™: An introduction and review* J. Liquid Chromatogr. Related Technol. 28, 1253-1263
- Thurman, E.M.; Ferrer, I.; Zweigenbaum, J.A.; García-reyes, J.F.; Woodman, M.; Fernández-Alba, A.R. (2005) *Discovering metabolites of post-harvest fungicides in citrus with liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry and ion trap tandem mass spectrometry* J. Chromatogr. A 1082, 81-90
- van Berkel, G.J. (2003) *An overview of some recent development in ionization methods for mass spectrometry* Eur. J. Mass Spectrom. 9, 539-562
- Zadra, C.; Marucchini, C.; Zazzerini, A. (2002) *Behavior of Metalaxyl and its pure R-enantiomer in sunflower plants (Helianthus annuus)* J. Agric. Food Chem. 50, 5373-5377
-

Objetivos, metodología y plan de trabajo

Objetivos

El **objetivo principal** de la presente Tesis Doctoral es explorar las capacidades analíticas que la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas ofrece en la investigación y determinación de residuos de plaguicidas y sus metabolitos en muestras de origen vegetal, mediante el uso de diferentes analizadores MS: triple cuadrupolo (QqQ), tiempo de vuelo (TOF) e híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo (QTOF). El gran potencial que estos analizadores ofrecen, por su gran sensibilidad y selectividad, es idóneo para la determinación de este tipo de analitos en matrices complejas como extractos de vegetales y frutas, permitiendo minimizar el tratamiento de muestra.

La Tesis se divide en dos grandes bloques, en función del objetivo analítico y el tipo de analizador utilizado. Estos son:

- **Parte I**, donde se ha trabajado con un analizador QqQ. El objetivo principal ha sido el desarrollo de metodología analítica para la determinación cuantitativa y confirmativa de residuos de plaguicidas y metabolitos que generalmente no son incluidos en métodos de análisis multirresiduales, debido a su especial complejidad y dificultad.
- **Parte II**, donde se ha trabajado con instrumentos QTOF, lo que ha permitido explorar las capacidades de estos analizadores en modo TOF y QTOF, tanto desde un punto de vista analítico cuantitativo, como cualitativo y confirmativo, así como en la búsqueda de compuestos desconocidos, especialmente metabolitos de plaguicidas.

A partir del planteamiento del objetivo principal nos hemos propuesto alcanzar unos **objetivos concretos**, que se indican a continuación:

- Parte I. **Objetivos concretos** relacionados con la investigación desarrollada con el analizador **QqQ**:
 1. Desarrollo de metodología analítica, con mínimo tratamiento de muestra, para la determinación cuantitativa y confirmativa mediante LC-MS/MS de plaguicidas de especial dificultad analítica por GC-MS en muestras de origen vegetal, debido a su baja estabilidad térmica, bajo peso molecular y alta polaridad. Se plantea la determinación de
-

triclorfon, ciromazina y su metabolito melamina, y fosetil-aluminio como casos particulares a estudiar.

2. Evaluación del efecto matriz en muestras de origen vegetal en cada caso estudiado, considerando las diferencias entre variedades dentro de un mismo espécimen vegetal; propuesta de alternativas para su disminución, evitando en lo posible un elevado coste de tiempo o tratamiento de muestra.
 3. Optimización de la separación por cromatografía líquida en fase reversa para plaguicidas de pequeño tamaño molecular y/o carácter iónico mediante el uso de reactivos ácidos o básicos formadores de pares iónicos. Determinación de ciromazina, melamina y fosetil-aluminio como casos particulares.
 4. Evaluación de las interfases de ionización API (ESI y APCI) acopladas a MS/MS en muestras de origen vegetal para plaguicidas de difícil ionización, mediante el uso de modificadores ácidos, básicos y sales volátiles de metales monovalentes en la fase móvil para mejorar la ionización en positivo y/o negativo, así como la formación de aductos. Determinación de abamectina y azadiractina como casos particulares de estudio.
 5. Evaluación de la formación de aductos de metales frente a la protonación o desprotonación en un sistema LC-MS/MS para la mejora de la sensibilidad, y la obtención de una fragmentación abundante.
 6. Validación de toda la metodología analítica desarrollada mediante la evaluación de los parámetros analíticos establecidos por las guías oficiales SANCO de la Unión Europea. Aplicación de los principios de las Buenas Prácticas de Laboratorio en casos particulares.
 7. Análisis de muestras procedentes de estudios de campo realizados en cumplimiento con las Buenas Prácticas de Laboratorio, para la obtención de curvas de disipación para triclorfon en caqui y coliflor. Estudios de estabilidad de muestras y extractos de muestras vegetales.
 8. Análisis de muestras vegetales con residuos de triclorfon, ciromazina y melamina procedentes de estudios de campo realizados en cumplimiento con las Buenas Prácticas de Laboratorio.
-

-
9. Aplicación de criterios de confirmación de la identidad de compuestos detectados en muestras reales mediante análisis por LC-MS/MS en modo *Selected Reaction Monitoring* (SRM).
- Parte II. **Objetivos concretos** relacionados con la investigación desarrollada con los analizadores **TOF** y **QTOF**:
1. Desarrollo de metodología analítica basada en LC-QTOF MS/MS para análisis cuantitativo de plaguicidas en muestras de alimentos, aplicando los criterios de validación establecidos por guías oficiales SANCO europeas.
 2. Evaluación de aproximaciones analíticas basadas en LC-QTOF MS/MS para la confirmación de positivos encontrados en muestras de alimentos, estudiando y discutiendo los criterios de valoración establecidos.
 3. Aplicación de la metodología analítica desarrollada cuantitativa y confirmativa del analizador de espectrometría de masas QTOF en muestras reales de origen vegetal.
 4. Desarrollo de metodología analítica basada en LC-TOF para la identificación multirresidual *post-target* de residuos de plaguicidas y metabolitos de plaguicidas en muestras de alimentos.
 5. Aplicación y evaluación del potencial de la metodología analítica desarrollada en LC-TOF a muestras reales de origen vegetal de diversas procedencias, estudiando su probabilidad en la detección de falsos positivos o falsos negativos.
 6. Desarrollo de metodología analítica basada en LC-QTOF MS para la identificación y elucidación de metabolitos de plaguicidas en muestras de alimentos, usando estrategias basadas en el estudio de las rutas de fragmentación y estudio estructural de plaguicidas y sus metabolitos, así como utilizando *software* especializado de búsqueda de potenciales metabolitos desconocidos.
 7. Estudio de la fragmentación y propuesta de rutas de fragmentación de plaguicidas y metabolitos de plaguicidas a partir del cálculo de
-

composición elemental obtenida mediante las medidas de masa exacta aportadas por QTOF MS.

8. Estudio comparativo de las capacidades analíticas en el campo cualitativo y cuantitativo de los analizadores QqQ, TOF y QTOF, seleccionando ciertos plaguicidas como modelo en muestras de origen vegetal.
9. Discusión del estado actual y tendencias en el uso de la técnica LC-TOF MS para la identificación y elucidación estructural de metabolitos de plaguicidas en muestras de aguas y alimentos.

Metodología y plan de trabajo

Para el desarrollo de la parte experimental de la presente Tesis Doctoral se ha seguido una metodología capaz de afrontar cada uno de los problemas analíticos que se presentaban en el análisis de plaguicidas y sus metabolitos, seleccionando la herramienta/aproximación analítica más poderosa que pudiera aplicarse en cada caso para la creación de métodos analíticos específicos, rápidos y sensibles en muestras de alimentos. Por lo tanto, ha sido necesario valerse de diferentes metodologías en función de la aplicación que se deseaba conseguir:

• **Metodología** para el desarrollo de métodos de **análisis cuantitativo** de plaguicidas y sus metabolitos mediante las técnicas LC-QqQ y LC-QTOF:

1. Selección de los plaguicidas y metabolitos a estudiar en cada problema analítico planteado, sobre la base de su dificultad, tanto en su extracción, como en el análisis cuantitativo. La mayoría de los compuestos seleccionados no pueden incluirse en métodos multirresiduales de análisis, por sus especiales características físico-químicas, ni determinarse fácilmente por GC-MS.
 2. Estudio de las condiciones óptimas de ionización en interfases API mediante el uso de patrones, seleccionando la interfase más adecuada, ESI o APCI, el modo de ionización en positivo o negativo, así como el tipo de iones generados en función del aditivo usado en la mezcla de infusión.
 3. Estudio de las condiciones óptimas en la adquisición por MS mediante el uso de patrones. Selección del voltaje de cono para obtener la
-

mayor abundancia del ion precursor. Optimización de la fragmentación del ion precursor, seleccionando las energías de colisión más adecuadas para la obtención de iones productos específicos del analito.

4. Optimización de la separación cromatográfica mediante la inyección de patrones a las concentraciones adecuadas. Selección del modificador de la fase móvil, considerando los resultados de las experiencias realizadas en la optimización de la ionización. Creación de un gradiente cromatográfico que sea capaz de obtener picos cromatográficos y tiempos de retención adecuados. Utilización de reactivos formadores de pares iónicos en el caso de analitos con baja retención en columnas cromatográficas de fase reversa.
5. Estudio de patrones en solvente y en extractos de muestra para evaluar el efecto matriz y la sensibilidad del método de acuerdo con el tratamiento de muestra aplicado. En función del efecto matriz y la respuesta del analito se introducen modificaciones en el procedimiento con el fin de minimizar el efecto matriz con apenas manipulación de muestra, de modo que se obtengan unas condiciones adecuadas para la correcta validación.
6. Validación de los métodos analíticos optimizados basándose en los criterios de las guías SANCO de la Unión Europea, estableciendo los parámetros de linealidad, especificidad, exactitud y precisión mediante ensayos de recuperación a varios niveles, definiendo el más bajo de los niveles de concentración validados como límite de cuantificación (LOQ) objetivo.
7. Aplicación de la metodología analítica desarrollada a muestras reales y discusión de los resultados obtenidos.

• **Metodología** general para el **análisis confirmativo** de la identidad de plaguicidas y sus metabolitos detectados en muestras reales mediante las técnicas LC-QqQ y LC-QTOF:

1. Selección de transiciones SRM en LC-QqQ o de la masa exacta teórica de iones moleculares o fragmentos en LC-QTOF, evitando en lo posible aquellos fragmentos/iones que no sean suficientemente
-

específicos (pérdidas de H₂O, CH₃, CO, CO₂ ...). En el caso de adquisición en modo *full scan* se intentará obtener el mayor número de iones posibles con alta abundancia.

2. Obtención del error de masa (masa empírica *versus* masa exacta) para adquisiciones en instrumentos TOF MS; estableciendo un cierto nivel de fiabilidad en la confirmación en función del valor de la desviación, haciendo uso del sistema de puntos de identificación (IPs) de acuerdo con la decisión 2002/657/EC.
3. Obtención de las relaciones de abundancia, o *Ion Ratios* (IR) entre el ion en *full scan*/transición en SRM más abundante y cada uno de los iones extras seleccionados para la confirmación con patrones a diferentes concentraciones inyectados el mismo día que las muestras positivas a confirmar.
4. Obtención de los IR de los iones encontrados en las muestras positivas, comparándolos con los obtenidos en los patrones; cálculo de la desviación y observación de los criterios establecidos en la Unión Europea en lo relativo a máximas desviaciones aceptadas.

• **Metodología** para el desarrollo de **estrategias analíticas cualitativas** para la detección e identificación de plaguicidas y metabolitos mediante las técnicas LC-QqQ, LC-TOF y LC-QTOF:

1. Selección de estrategias adecuadas para la búsqueda de plaguicidas y metabolitos mediante analizador QTOF usando el modo de adquisición más adecuado en cada caso. Para la búsqueda tipo *screening* de plaguicidas y metabolitos mediante *full acquisition* sin energía de colisión. Mientras que en la búsqueda y elucidación de metabolitos los modos LC-(Q)TOF MS *full acquisition*, además de LC-(Q)TOF MS *full acquisition* con energía de colisión.
 2. Uso del analizador QqQ mediante adquisición en modo *precursor-ion scan* para la búsqueda de metabolitos de plaguicidas.
 3. Aplicación de *software* especializado: *ChromaLynx* en el *screening* “*post-target*” de plaguicidas y metabolitos; *MetaboLynx* en la investigación de compuestos desconocidos que no han sido
-

preseleccionados, comparando la información adquirida entre muestra blanco y muestra tratada con un plaguicida.

4. Evaluación de la información y confirmación de la identidad mediante el cálculo de la composición elemental, la desviación de la masa exacta, la abundancia de la relación isotópica y búsqueda bibliográfica.
5. Estudio de las rutas de fragmentación del plaguicida o metabolito mediante QTOF MS/MS, proponiendo y elucidando la estructura química a partir de la fórmula química calculada.
6. Aplicación de estrategias para la elucidación de metabolitos de plaguicidas basadas en el estudio de la ruta de fragmentación del plaguicida en muestras positivas mediante el uso de fragmentos comunes entre plaguicida y sus metabolitos.
7. Confirmación de la identidad del plaguicida o metabolito detectado en la muestra, bien mediante el uso de la masa exacta y la presencia de iones de abundancia isotópica característica (clorados, bromados...); o bien, mediante la inyección de patrones de referencia, siempre y cuando se encuentren disponibles: uso del tiempo de retención, espectro de fragmentación, masa exacta y abundancia isotópica relativa.

El **plan de trabajo** seguido en la Tesis Doctoral para la obtención de los objetivos enumerados anteriormente es el que se expone a continuación:

1. Revisión bibliográfica del estado actual de la determinación de residuos de plaguicidas mediante LC-MS en muestras de alimentos, centrándose en la búsqueda de aquellos plaguicidas que no pueden analizarse fácilmente por GC-MS, o que son excluidos de los métodos de análisis multirresidual por LC-MS debido a su incompatibilidad con el resto de compuestos.
 2. Selección de los compuestos objeto de estudio en la tesis sobre la base de sus mayores dificultades analíticas y de la escasez de métodos analíticos publicados hasta el momento.
-

3. Optimización de la metodología de análisis por LC-MS/MS QqQ para residuos de un plaguicida de baja estabilidad térmica (triclorfon) en muestras de origen vegetal (caqui y coliflor), haciendo hincapié en la minimización del tratamiento de muestra y la obtención de un método de cuantificación y confirmación simultánea rápido, sensible y robusto.
 4. Optimización de metodología de análisis por LC en fase reversa acoplado a MS/MS QqQ mediante el uso de pares iónicos para la determinación de residuos de plaguicidas de bajo peso molecular y alta polaridad (ciromazina y melamina), incluyendo compuestos iónicos (fosetil-Al), con mínimo tratamiento de muestra y elevada sensibilidad para el análisis en muestras de origen vegetal.
 5. Aplicación de las metodologías desarrolladas para análisis de residuos de los compuestos mencionados en los puntos 3 y 4 en muestras reales de procedencia comercial o de estudios de campo.
 6. Revisión bibliográfica de las posibilidades que las interfases API ofrecen para la determinación de plaguicidas por LC-MS, centrándose en compuestos como la abamectina y azadiractina, de difícil ionización.
 7. Estudio comparado de las fuentes de ionización ESI y APCI para plaguicidas con centros de difícil ionización mediante la aplicación de modificadores en la fase móvil para potenciar la ionización negativa o positiva, así como la formación de aductos tipo $[M+NH_4]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+Li]^+$, $[M+Ni]^+$ y $[M+Co]^+$.
 8. Estudio comparado de las posibilidades de fragmentación mediante LC-QqQ de los insecticidas abamectina y azadiractina en función de la ionización o aducto formado, $[M+NH_4]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+Li]^+$, $[M+Ni]^+$ y $[M+Co]^+$.
 9. Revisión bibliográfica sobre el uso de analizadores TOF y QTOF para análisis de residuos de plaguicidas y metabolitos en muestras de alimentos mediante LC, haciendo hincapié en las posibilidades que ofrecen para la cuantificación, identificación, confirmación y búsqueda de desconocidos.
-

-
10. Optimización de métodos de cuantificación y confirmación simultáneos de residuos de plaguicidas mediante el uso de LC-QTOF, centrándose en la explotación de la potente capacidad identificativa del QTOF en muestras complejas como las de origen vegetal.
 11. Aplicación de la metodología analítica cuantitativa y confirmativa mediante LC-QTOF en muestras reales de origen vegetal.
 12. Estudio y evaluación de la aplicación de metodología analítica *post-target* desarrollada por LC-TOF para la búsqueda de plaguicidas y sus metabolitos mediante su aplicación al análisis en muestras reales de vegetales.
 13. Desarrollo y optimización de metodología analítica para la búsqueda de metabolitos de plaguicidas.
 14. Aplicación de metodología de búsqueda e investigación de metabolitos de plaguicidas en muestras de vegetales positivas mediante el uso de LC-TOF y LC-QTOF.
 15. Estudio comparativo de las capacidades analíticas que a nivel cuantitativo, confirmativo y cualitativo ofrece cada una de las técnicas analíticas de espectrometría de masas utilizadas para el análisis de plaguicidas y metabolitos de plaguicidas en muestras de origen vegetal.
-

PARTE I:

Analizador de espectrometría de masas triple
cuadrupolo (QqQ)

Capítulo 1:

Estrategias de análisis por LC-MS/MS para plaguicidas con especial dificultad analítica por GC-MS.

1.1. Introducción Capítulo 1.

La técnica de LC ha ido paulatinamente ganando terreno a la técnica separativa GC en las dos últimas décadas; sin embargo, no ha podido aplicarse de forma exclusiva en el ámbito del análisis de residuos de plaguicidas (ARP) debido a la amplia variedad de estructuras químicas y propiedades físico-químicas que presentan estos compuestos. Teniendo en cuenta sus características, las técnicas de LC y GC deben considerarse complementarias, de forma que ambas son actualmente necesarias para abordar la problemática de la determinación de residuos de plaguicidas. En este sentido, los MMR más recientes de análisis de plaguicidas en alimentos por MS se basan tanto en acoplamientos con LC (Hernández *et al.*, 2006; Hiemstra *et al.*, 2007; Romero-González *et al.*, 2008) como con GC (Cajka *et al.*, 2008; Moreno *et al.*, 2008). Las tendencias actuales en los laboratorios más modernos de ARP van hacia la aplicación de un único tratamiento de muestra, lo más sencillo posible, y posterior análisis del extracto, tanto por GC-MS como LC-MS (Pihlström *et al.*, 2007; Lehotay *et al.*, 2005 y 2007). Una de las aproximaciones analíticas más atractiva es la usada por el *National Food Administration* (NFA) de Uppsala (Suecia), consistente en una única extracción de la muestra con acetato de etilo y posterior análisis por triple cuadrupolo, tanto GC-MS/MS como LC-MS/MS (Pihlström *et al.*, 2007). A pesar de que el propósito de los MMR de plaguicidas es abarcar el máximo número de analitos, estos métodos se ven limitados por la dificultad que presentan algunos analitos, especialmente cuando se realizan análisis por GC, en los que no es posible incluir plaguicidas de baja estabilidad térmica, alta polaridad y bajo peso molecular. El primer inconveniente que presentan estos compuestos es el desarrollo de un método de extracción adecuado, que no suele resultar compatible con otros analitos. En segundo lugar, se debe desarrollar un método analítico que se adapte a las características físico químicas del compuesto, optimizando y explotando en el mayor grado posible la selectividad y sensibilidad del mismo. En muchos casos, la manera más adecuada para enfocar la problemática de este tipo de plaguicidas es desarrollar un método individual de análisis, al quedar fuera de los grupos generales de analitos incluidos en los MMR.

A modo de ejemplo, se han desarrollado métodos de análisis individuales para analitos que presentan una alta polaridad. Ese es el caso de MCPA, MCPB o 2,4-D (Pozo *et al.*, 2001; Schaner *et al.*, 2007), que presentan un alto carácter

ácido; del etefon (Marín *et al.*, 2006); del glufosinato, glifosato y su metabolito de degradación AMPA (Granby *et al.*, 2003; Ibañez *et al.*, 2005); así como, los compuestos de la familia de los quats (Castro *et al.*, 2001), que se encuentran en forma iónica.

1.1.1. Referencias bibliográficas

- Cajka, T.; Hajslova, J.; Lacina, O.; Mastovska, K.; Lehotay, S.J. (2008) *Rapid analysis of multiple pesticide residues in fruit-based baby food using programmed temperature vaporiser injection-low-pressure gas chromatography-high-resolution time-of-flight mass spectrometry* J. Chromatogr.A 1186, 281-294
- Castro, R.; Moyano, E.; Galceran, M.T. (2001) *Determination of quaternary ammonium pesticides by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry* J. Chromatogr.A 914, 111-121
- Granby, K.; Johannesen, S.; Vahl, M. (2003) *Analysis of glyphosate residues in cereals using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS)* Food Addit. and Contam. 20, 692-698
- Ibañez, M.; Pozo, O.J.; Sancho, J.V.; López, F.J.; Hernández, F. (2005) *Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry* J. Chromatogr. A 1081, 145-155
- Hernández, F.; Pozo, O.J.; Sancho, J.V.; Bijlsma, L.; Barreda, M.; Pitarch, E. (2006) *Multiresidue liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of 52 non gas chromatography-amenable pesticides and metabolites in different food commodities* J. Chromatogr. A 1109, 242-252
- Hiemstra, M.; de Kok, A. (2007) *Comprehensive multi-residue method for the target analysis of pesticides in crops using liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J. Chromatogr. A 1154, 3-25
- Lehotay, S.J.; de Kok, A.; Hiemstra, M.; van Bodegraven, P. (2005) *Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection*. J. AOAC Int. 88, 595-614
- Lehotay, S.J.; O’Neil, M.; Tully, J.; García, A.V.; Contreras, M.; Mol, H.; Heinke, V.; Anspach, T.; Lach, G.; Fussell, R.; Mastovska, K.; Poulsen, M.E.; Brown, A.; Hammack, W.; Cook, J.M.; Alder, L.; Lindtner, K.; Vila, M.G.; Hopper, M.; De Kok, A.; Hiemstra, M.; Schenck, F.; Williams, A.; Parker, A. (2007) *Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: Collaborative study*. J. AOAC Int. 90, 485-520
-

- Marín, J.M.; Pozo, O.J.; Beltrán, J.; Hernández, F. (2006) *An ion-pairing liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of ethephon residues in vegetables* Rapid Commun. Mass Spectrom. 20, 419-426
- Moreno, J.L.F.; Frenich, A.G.; Bolaños, P.P.; Vidal, J.L.M. (2008) *Multiresidue method for the analysis of more than 140 pesticides residues in fruits and vegetables by gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry* J. Mass Spectrom. 43, 1235-1254
- Pihlström, T.; Blomkvist, G.; Friman, P.; Pagrad, U.; Österdahl, B.-G. (2007) *Analysis of pesticides residues in fruit and vegetables with ethyl acetate extraction using gas and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection* Anal. Bional. Chem. 389, 1773-1789
- Pozo, O.; Pitarch, E.; Sancho, J.V.; Hernández, F. (2001) *Determination of the herbicide 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid and its main metabolite, 4-chloro-2-methylphenol in water and soil by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry* J. Chromatogr. A 923, 75-85
- Romero-González, R.; Frenich, A.G.; Vidal, J.L.M. (2008) *Multiresidue method for fast determination of pesticides in fruit juices by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*, Talanta 76, 211-225
- Schaner, A.; Konecny, J.; Luckey, I.; Hickey, H. (2007) *Determination of chlorinated acid herbicides in vegetation and soil by liquid chromatography/electrospray-tandem mass spectrometry* J. AOAC Int. 90, 1402-1410
-

1.2. Plaguicidas de baja estabilidad térmica: Triclorfon como caso de estudio.

1.2.1. Introducción

En los MMR desarrollados por GC-MS suelen incluirse un gran número de compuestos termoestables y volátiles, especialmente organoclorados, organofosforados y piretroides, así como otros compuestos con cierto carácter apolar (Mezcua *et al.*, 2007; Tahboud *et al.*, 2005). Sin embargo, la inestabilidad térmica de algunos compuestos, como el triclorfon del grupo de los organofosforados, no facilita su determinación en los métodos tradicionales por GC (López-Avila *et al.*, 1998; Podhorniak *et al.*, 2001; Ueno *et al.*, 2003; Jiménez *et al.*, 2004; Garrido *et al.*, 2005). En general, cuando se lleva a cabo la determinación de triclorfon por GC se suele optar por una cuantificación alternativa, efectuándose la determinación indirecta de un compuesto derivado de la degradación del plaguicida, en este caso el diclorvos. Esto puede llevar a errores en los análisis, debido a que, el diclorvos presente en la muestra puede proceder tanto de la degradación en el sistema de inyección del cromatógrafo de gases, como derivado de otras causas: (i) procesos de degradación del propio triclorfon en las muestras, considerándose entonces como producto de transformación o metabolito del triclorfon; (ii) su presencia en la muestra como impureza del formulado, proveniente de la síntesis, del proceso de almacenamiento o de la aplicación de la sustancia; e incluso, (iii) presencia de otro plaguicida que presenta la misma fórmula y estructura molecular que el producto de degradación, como es el caso del propio insecticida organofosforado diclorvos. En tal caso, la técnica de separación LC puede ser considerada como una alternativa idónea para una determinación del triclorfon sin que se produzca transformación por degradación en el sistema de análisis. Además, la técnica LC permitiría una separación de los posibles productos de transformación e impurezas, entre ellas el diclorvos, presentes en la muestra objeto de análisis.

Por otro lado, la MS aplicada como técnica de detección en cromatografía destaca por su selectividad y especificidad, que le confiere a su vez una alta sensibilidad. En general, el analizador de MS es capaz de distinguir, los distintos analitos en función de su diferente m/z , incluso si se produce coelución de los compuestos en el sistema de separación. Sin embargo, la coelución de ciertos compuestos presentes en la matriz extraída de la muestra puede provocar diferencias en la ionización del analito en la fuente de ionización, originando el denominado efecto matriz. Para poder prevenir los posibles problemas de cuantificación debidos al efecto matriz se han propuestos diferentes alternativas (ya comentadas en la introducción), entre las cuales destaca el calibrado en matriz, cuando no hay disponibilidad comercial de un patrón marcado isotópicamente. Por otro lado, se puede producir la coelución de compuestos

isobáricos con el analito, lo cual podría traducirse en un falso positivo o una respuesta sobrevalorada del analito. Para evitar este posible problema es necesario explotar al máximo las características de selectividad de las técnicas analíticas aplicadas, en nuestro caso LC-MS. En primer lugar, una buena separación cromatográfica podría evitar la coelución de otros compuestos de la matriz con el analito, especialmente aquellos que resultaran ser isobáricos. En segundo lugar, se puede llegar a conseguir una mayor discriminación de los interferentes, que aún siendo isobáricos presenten diferencias considerables en la composición química y estructura molecular, mediante el uso de tándem MS (LC-MS/MS).

Otro punto esencial en la aplicación de un método analítico es su robustez, especialmente cuando se desea aplicar de forma rutinaria en uno o varios laboratorios. Para evaluar este aspecto, se hace uso de parámetros que permiten estimar la calidad y validez de los resultados analíticos, como es el uso de *Quality Control* (QC). Habitualmente se utiliza como QC una muestra blanco fortificada a un nivel conocido, que es extraída junto con la secuencia de muestras objeto de análisis. Se suele seleccionar uno o varios niveles de concentración para los QCs, a ser posible cercanos a los esperados en las muestras reales. Las recuperaciones obtenidas para los QCs permiten estimar la robustez del método analítico.

Otro parámetro que se debería tener en cuenta es la posible tendencia o labilidad de un analito a ser degradado en el proceso de almacenamiento y extracción de la muestra. En este punto, hay que destacar la importancia de efectuar un estudio de estabilidad del analito, tanto en la muestra como en el medio de extracción, a lo largo de su periodo de almacenamiento y análisis. Esto es especialmente importante en casos como el triclorfon, debido a la conocida inestabilidad térmica del analito.

El objetivo del trabajo que se presenta a continuación ha sido desarrollar un método analítico mediante la técnica de LC-MS/MS para la determinación del triclorfon en muestras vegetales. Para ello se ha llevado a cabo una validación del método analítico siguiendo las guías europeas (SANCO/3029/99 y SANCO/10476/2003), considerando como parámetros esenciales de validación el rango de linealidad, la exactitud y precisión así como la especificidad del método. Además, se ha establecido el LOQ y se ha estimado el LOD. Para la cuantificación se ha usado calibrado en matriz, con el fin de corregir la inhibición de la ionización del triclorfon en la fuente de ESI.

Una vez validado el método analítico se llevaron a cabo análisis de 216 muestras vegetales (piel y pulpa de caqui y coliflor) durante un período de dos años, procedentes de estudios de campo realizados por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria de España (INIA). Se analizaron muestras tomadas a diferentes tiempos tras la aplicación de un formulado que contenía triclorfon como materia activa. Uno de los objetivos principales del estudio fue obtener las curvas de disipación y el plazo de seguridad (*Pre-Harvest Interval*, PHI), así como, establecer los límites máximos de residuos para triclorfon en caqui y coliflor. El análisis de las muestras se realizó, de la misma forma que el desarrollo y validación del método analítico, en cumplimiento con los principios de las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL). Para ello, se introdujeron QCs a dos niveles de fortificación en el análisis de las muestras reales, las cuales permitieron evaluar la exactitud y robustez del método analítico.

Además, se llevó a cabo un estudio de estabilidad del triclorfon tanto en muestras de caqui (piel y pulpa) y coliflor, como en sus correspondientes extractos crudos en acetonitrilo.

1.2.2. Artículo Científico 1:

Analytical Study of Trichlorfon Residues in Kaki and Cauliflower Samples by Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry.

S. Grimalt, J.V. Sancho, O.J. Pozo, J.M. García-Baudin, M.L. Fernández-Cruz, F. Hernández

Journal of Agricultural and Food Chemistry **2006**, 54, 1188-1195

1188 J. Agric. Food Chem. 2006, 54, 1188–1195

Analytical Study of Trichlorfon Residues in Kaki Fruit and Cauliflower Samples by Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry

Susana Grimalt¹, Juan V. Sancho¹, Óscar J. Pozo¹, J. M. García-Baudin², M. L. Fernández-Cruz², and Félix Hernández¹

⁽¹⁾ *Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, E-12071 Castellón, Spain, and* ⁽²⁾ *Crop Protection Department, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Carretera de la Coruña km 7.5, 28040 Madrid, Spain*

*Author to whom correspondence should be addressed, telephone +34 964 728100; fax +34 964 728066; e-mail hernandf@exp.uji.es. ⁽¹⁾ University Jaume I. ⁽²⁾ INIA.

Received for review November 4, 2005. Revised manuscript received December 19, 2005. Accepted December 19, 2005. The Quattro Micro LC-MS/MS was funded by the European Union (Fondos Feder-Reino de España, Ministerio de Ciencia y Tecnología, Ref. UNJM-E004).

Abstract

A detailed analytical study on trichlorfon residues in selected vegetables samples has been carried out, focused on the reliable quantification and confirmation of this compound, and on stability of residues under storage. As a consequence, a rapid and sensitive LC-ESI-MS/MS method has been developed for the determination of residues of this insecticide in kaki fruit (flesh and peel) and cauliflower samples. Extraction was performed with acetonitrile using a high-speed blender. After 4-fold dilution of the extract with water, 20 μ L was directly injected in the LC-ESI-MS/MS system (triple quadrupole), using matrix-matched standards calibration for quantification. Under optimized MS/MS conditions, limit of detections between 0.006 and 0.013 mg/kg were reached, and a limit of quantification of 0.05 mg/kg was established, with a runtime of only 15 min. Recoveries from spiked blank samples at 0.05 and 0.5 mg/kg were in the range 83–101% with relative standard deviations lower than 10%. The method was applied to treated and untreated samples collected from field residues trials, using quality control samples analysis for the evaluation of the method. Despite the acquisition of two MS/MS transitions in selected reaction monitoring mode, the analysis of treated samples revealed the presence of a chromatographic peak close to the analyte that corresponded to a trichlorfon isobaric compound that shared the same MS/MS transitions. This unusual situation in LC-MS/MS-based procedures required the application of an efficient chromatographic separation to avoid this interference. All experiments have been made in compliance with the principles of Good Laboratory Practices (GLP) and following the European SANCO guidelines for pesticides residue analysis (PRA).

Keywords: Trichlorfon; pesticide residues; vegetable samples; liquid chromatography; tandem mass spectrometry; triple quadrupole

INTRODUCTION

Kaki fruit (*Diospyros kaki* L.f.) and cauliflower (*Brassica oleracea* convar. *Botrytis* L.) are extensively consumed commodities and are important products for the economy and export trade of several countries particularly in the Mediterranean area where these crops are well adapted to climatic conditions. However, to obtain a high-quality and healthy crop at harvest, the use of pesticides is normally required, but always under strict regulations. Trichlorfon (dimethyl 2,2,2-trichloro-1-hydroxyethylphosphonate) is widely applied as an insecticide in these crops. This compound is an inhibitor of cholinesterase activity, possibly due to in vivo conversion to dichlorvos (1). In the European Community, the maximum residue limit (MRL) allowed for trichlorfon in brassica vegetables and miscellaneous fruits is 0.5 mg/kg (2). Analytical methods allowing the reliable determination of concentrations at least 5-fold lower than MRL are advisable to be confident about the reported data.

Trichlorfon residues in fruits and vegetables have been determined until now by gas chromatography (GC) with flame photometric detection (FPD) (3, 4) and electron capture detection (ECD) (5). Recently, the use of GC coupled to mass spectrometry (MS) has been considered a suitable approach to improve selectivity and sensitivity (6, 7). Although GC can be an adequate technique for the determination of trichlorfon residues, the trichlorfon instability at high temperature has been reported (4, 6-8). The thermal degradation of trichlorfon in the injection port of the GC to dichlorvos can hinder a correct quantification, due to other amounts of dichlorvos that could come from the formulation manufacturing and degradation product from trichlorfon (6). To minimize these problems, liquid chromatography (LC) appears as a suitable alternative to GC. Recently, one method has been reported for trichlorfon in oranges using LC-APCI-MS. In this application, the determination of trichlorfon at 0.12 mg/kg, among other pesticides, is described, after performing the extraction by matrix solid-phase dispersion, obtaining recoveries between 68% and 74% (9).

An increased number of papers have been published in the last 5 years dealing with the use of LC-MS/MS in pesticide residue analysis, demonstrating the great potential of this technique in this field. The excellent sensitivity of LC-MS/MS allows in many cases one to reduce the sample pretreatment, even facilitating the direct injection of the extracts (10-12). However, one of the main drawbacks of LC-MS/MS methods is the matrix effect in the ionization source, producing an inhibition or enhancement of the MS signal (13-15). Different

possibilities to compensate for this undesirable effect have been proposed as: (i) the use of labeled internal standard (16) being the most easy and convenient way although with the limitations of the commercial availability, price, and/or purity of reference standard; (ii) the simple dilution of the extract to give a signal comparable to standard solutions (17), with the drawback of the unavoidable loss in sensitivity; and (iii) the quantification with matrix-matched standard calibration (18-20), which compensates the matrix effect, with the drawback of finding a real representative blank sample and of assuming that all samples present similar matrix effects. In some cases, a combination of two of these approaches is applied, for example, dilution of sample extract and matrix-matched standard calibration (21-23).

Although LC-MS/MS presents high specificity, it is still possible to report false positive findings. The European Union (24) has established confirmation criteria using mass spectrometry based on the collection of identification point (IPs), where a minimum of 4 IPs is required for confirmation of banned compounds and 3 IPs for authorized compounds. Using triple quadrupole analyses (QqQ) in selected reaction monitoring mode (SRM), a minimum of 4 IPs is reached acquiring two MS/MS transitions. Although this European decision is related to products of animal origin, nowadays several examples can be found in the literature making use of more than one transition for the confirmation of positive data, also in products of plant origin (10, 22, 23, 25-27).

The aim of this work is to develop a rapid, sensitive, and selective method for the quantification and confirmation of trichlorfon residues in kaki fruit (flesh and peel) and cauliflower samples, minimizing the sample pretreatment and reducing in this way the risks of analytical errors associated with this step. A detailed study on potential interferents and on stability of samples under storage is performed as well.

EXPERIMENTAL PROCEDURE

Reagents and Chemicals. Trichlorfon reference standard was purchased from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). HPLC-grade acetonitrile and methanol were purchased from ScharLab (Barcelona, Spain). LC-grade water was obtained by purifying demineralized water in a Nanopure II system (Barnstead Newton, MA).

Stock standard solution of trichlorfon was prepared by dissolving 50 mg of powder, accurately weighted, in 100 mL of acetonitrile, obtaining a final concentration of 500 µg/mL, that was stored at -20 °C. Working solutions, used

for LC-MS/MS analysis or for sample fortification, were obtained by diluting stock solution with acetonitrile.

Instrumentation. A HPLC system Waters Alliance 2795 (Waters, Milford, MA) was interfaced to a Quattro micro triple quadrupole mass spectrometer (Waters) using an orthogonal Z-spray-electrospray interface (ESI). The LC separation was performed injecting 20 μ L and using a Discovery C₁₈ column (50 \times 2.1 mm i.d., 5 μ m) (Supelco, Bellefonte, PA), at a flow rate of 300 μ L/min. The mobile phase used was a water-methanol gradient where the percentage of methanol was changed linearly as follows: 0 min, 5%; 7 min, 5%; 12 min, 50%; 13 min, 50%; 15 min, 5%. Drying gas as well as nebulizing gas was nitrogen generated from pressurized air in a high-purity nitrogen generator NM30LA 230Vac Gas Station from Peak Scientific (Inchinnan, Scotland). The desolvation gas flow and cone gas flow were selected as 600 and 60 L/h, respectively. Infusion experiments were performed using the built-in syringe pump directly connected to the interface.

For operation in MS/MS mode, the collision gas was argon 99.995% (Carbueros Metálicos, Valencia, Spain) with a pressure of 3×10^{-3} mbar in the collision cell. Capillary voltages of 3.5 kV were used in positive ionization mode. The interface temperature was set to 350 °C, and the source temperature was set to 120 °C. Dwell times of 0.5 s/scan were chosen for each transition. A solvent delay of 7.5 min was selected to give an additional cleanup using the built-in divert valve controlled by the Masslynx NT v.4.0 software. The quantification (*Q*) and confirmation (*q*) transitions are 257>109 and 259>109, respectively, both optimized at a cone voltage of 30 V and a collision energy of 15 eV. The application manager QuanLynx was used to process the quantitative data obtained from calibration standards and from crop samples.

Sample Preparation. Three types of samples were analyzed: cauliflower and peel and flesh of the kaki fruit. The samples were cut into small pieces without any pretreatment and were triturated with a chopper K55E (Dito Sama, Aubusson, France). An aliquot of homogenized sample (20 g for cauliflower and kaki flesh, and 10 g for kaki peel) was accurately weighted (precision 0.1 mg) and mixed with 60 mL of acetonitrile. After extraction for 2 min with a high-speed blender Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel GmbH & Co., Staufen, Germany) at 8000 rpm, the entire extract was filtered through a 25-30 μ m filter paper (Filtros ANOIA S. A., Barcelona, Spain) using a vacuum pump, washed with 10 mL of acetonitrile,

1188 J. Agric. Food Chem. 2006, 54, 1188–1195

and the volume was adjusted to 100 mL with acetonitrile. Finally, the extract was 4-fold diluted, taking an aliquot of 2.5 mL and diluting with LC-grade water up to 10 mL.

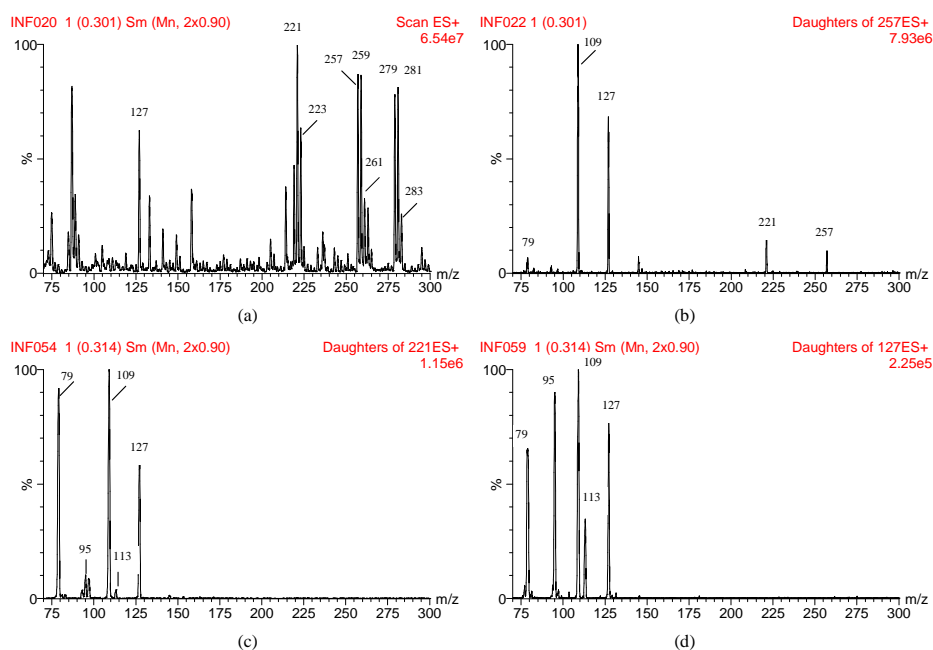


Figure 1. (a) Positive ion electrospray full scan mass spectrum of trichlorfon acquired by infusion of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ standard solution, at cone voltage of 30 V. (b) Product ion spectrum of $m/z = 257$ at cone voltage and collision energy of 30 V and 15 eV, respectively. (c) Product ion spectrum for in-source fragment $m/z = 221$ at cone voltage and collision energy of 40 V and 25 eV, respectively. (d) Product ion spectrum for in-source fragment $m/z = 127$ at cone voltage and collision energy of 50 V and 20 eV, respectively.

To remove solid particles, an aliquot of diluted extract was passed through a 0.45 μm Nylon syringe filter (Scharlab, Barcelona, Spain). Next, 20 μL of extract was directly injected in the LC-MS/MS system.

Fortification of samples was performed delivering 1 mL (0.5 mL for kaki peel) of trichlorfon standard solutions of 10 and 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in acetonitrile to 20 g of homogenized sample (10 g for kaki peel) to obtain 0.5 and 0.05 mg/kg, respectively. These samples were equilibrated, under room conditions, for 1 h prior to extraction.

Validation Study. Three validation data sets were obtained for each type of sample, kaki flesh, kaki peel, and cauliflower, following the spirit of the European Union SANCO working documents (28, 29).

The calibration curve was obtained by analyzing nine matrix-matched standard solutions at concentrations between 0.5 and 250 ng/mL. Acceptance criteria were that the correlation coefficient was higher than 0.99 and the linearity residuals were lower than 30%.

The accuracy and the precision were obtained by analyzing trichlorfon in kaki and cauliflower blank samples spiked at two concentration levels (0.05 and 0.5 mg/Kg) and were evaluated within 1 day in quintuplicate at each concentration level. Acceptance criteria for accuracy were that recovery fit between 70 and 110% and for precision that relative standard deviation (RSD) was lower than 20% (29).

The limit of detection (LOD), defined as the lowest concentration that the analytical process can reliably differentiate from background levels, was estimated for a signal-to-noise ratio of 3 from the chromatograms at the lowest analyte concentration tested. The limit of quantitation (LOQ) was established as the lowest concentration tested, which gave acceptable recoveries and precision.

To evaluate the ability of the analytical procedure to give a selective measurement for the analyte, a specificity study was carried out including the analysis of a procedure blank, a sample blank, and a blank sample spiked at the LOQ level. The response should not exceed 30% of that of LOQ to consider the method to have satisfactory specificity.

Stability Study. Two different stability studies were performed to ensure the adequate preservation of samples and processed sample extracts.

The stabilities of diluted sample extracts for the three type of matrixes, fortified at 0.1 µg/mL (0.5 mg/kg in sample) and stored at 4 and -18 °C, were evaluated for 2 months, by analyzing three replicates (injection in duplicate) at 0, 6, 15, and 60 days.

The stability of blank samples fortified at 0.5 mg/kg and stored 1 year at -18 °C was also studied, by analyzing four replicates (injection in duplicate).

During these experiments, a blank sample fortified at 0.5 mg/kg was used as quality control (QC) and analyzed together with the stability samples. Results were accepted if QC gave acceptable recoveries (70-110%) and the deviation between stability samples and QC concentrations was lower than 15%.

Data Evaluation. For quantification of trichlorfon in samples collected from field residue trials, an external matrix-matched standard calibration curve was used in every set of samples analyzed with, at least, three points within the calibration range. To ensure the quality of the analysis, at least two QC (0.5 and 0.05 mg/kg) values were also included in each batch of samples. The quantification of the sample list was considered acceptable if QC recoveries were between 70% and 110%. Every sample extract was injected in duplicate.

The use of MS/MS detection easily allows one to improve the specificity of the method, due to the possibility of confirmation of the analyte identity by acquiring a second transition, to obtain 4 or 5 IPs depending on the precursor and the product ions selected (24). According to this, confirmation was performed in positive samples by acquisition of two MS/MS transitions: the most intense used for quantification (Q) and the other used for confirmation (q). Apart from the retention time criteria, positive findings were confirmed by comparison of the Q/q intensity ratios. The average Q/q calculated for all standards injected in a sequence was taken as the theoretical ion ratio, and Q/q values calculated for positive findings in samples were compared to the theoretical one. Confirmation was considered reliable if the deviation of both standard and sample ion ratios was lower than 15% (24).

RESULTS

MS Optimization Experiments. The full-scan mass spectrum and selected MS/MS spectra of trichlorfon are shown in **Figure 1**. They were obtained from infusion of 5 $\mu\text{g/mL}$ standard solutions (50:50 acetonitrile:water) at a flow rate of 10 $\mu\text{L/min}$. As a result of the basic character of the phosphonic ester group, trichlorfon shows positive ionization. The full scan mass spectrum presents three peaks at m/z 257, 259, and 261 corresponding to the protonated molecular ion $[\text{M} + \text{H}]^+$ with the characteristic isotopic pattern (3:3:1) that confirms the presence of three chlorine atoms (**Figure 1a**). The MS spectrum for protonated trichlorfon was optimized at a cone voltage of 30 V. **Figure 1a** also shows three peaks at m/z 279, 281, and 283 corresponding to the $[\text{M} + \text{Na}]^+$ adduct. Despite their similar sensitivity, the use of $[\text{M} + \text{Na}]^+$ as precursor ions was avoided due to their poor fragmentation, as has been proved for other pesticides (26).

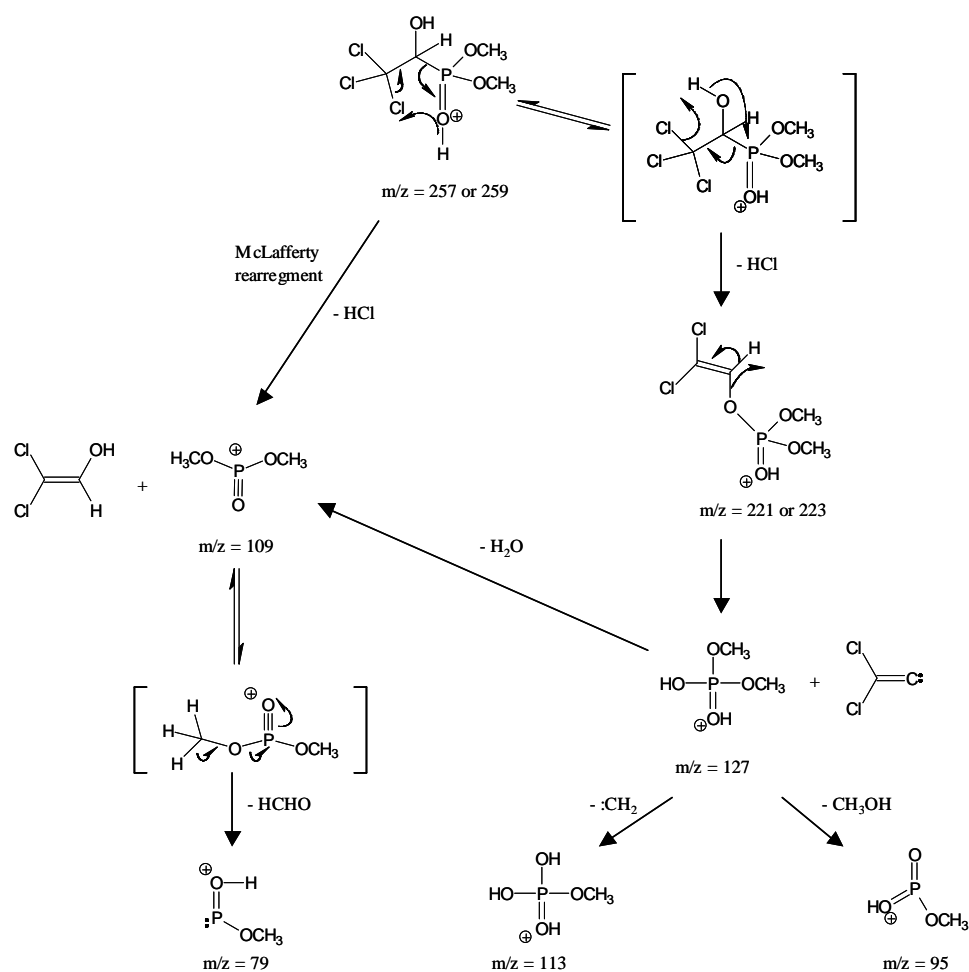


Figure 2. Fragmentation pathway proposed for trichlorfon.

Next, MS/MS spectra were optimized selecting the most abundant ions (m/z 257 and 259) as precursor ions, showing in both cases an important fragment at m/z 109 optimized at a collision energy of 15 eV (**Figure 1b**). Another abundant ion at m/z 221 (precursor ion 257) or m/z 223 (precursor ion 259) was also obtained; meanwhile, the less abundant fragments at m/z 127 and 79 were observed independently of the precursor ion selected. A possible explanation for the formation of these ions is illustrated in the fragmentation pathway shown in **Figure 2**. The ions 221/223 can be explained by a neutral loss of HCl ; the presence of the remaining two chlorine atoms in the fragment leads to two different product ions depending on the precursor ion selected. The posterior neutral loss of $\text{Cl}_2\text{C}=\text{C}:$ would explain the fragment at m/z 127, which is independent of the precursor ion selected due to the absence of chlorine atoms in its structure. The

main product ion at m/z 109 may be obtained from any of the precursor ions, after a McLafferty rearrangement or after a neutral loss of water from the ion at m/z 127. Finally, the product ion at m/z 79 would be obtained by a neutral loss of acetaldehyde from the m/z 109 ion. To support this fragmentation pathway, different MS spectra of trichlorfon were acquired modifying the cone voltage to obtain optimum in-source fragmentation for the most abundant product ions. Thus, by increasing the cone voltage up to 60 V, abundant in-source fragment ions at m/z 221 and 127 were obtained. The MS/MS spectra of these in-source fragment ions were also acquired (**Figure 1c** and **d**, respectively), obtaining the same ions (m/z 127, 109, 79), and supporting the fragmentation pathway suggested in **Figure 2**. Additionally, two ions at m/z 113 and 95 were observed in the product ion spectra of 127 and with less abundance in that of 221. These ions might be explained from the ion at m/z 127 after losses of :CH_2 and methanol, respectively (see **Figure 2**).

With all of this information, up to 18 MS/MS transitions could be selected for the confirmation of trichlorfon if necessary, using m/z 257, 259, 221, 223, and 127 as precursor ions.

Method Optimization. Although the ultimate confirmation of trichlorfon could be achieved by the acquisition of up to 18 different transitions, only two are, in principle, sufficient to obtain a safe confirmation. Thus, the two most sensitive transitions $257>109$ and $259>109$ were selected for quantification (Q) and confirmation (q) purposes, respectively. Both transitions were optimized at a cone voltage of 30 V and 15 eV of collision energy. The simultaneous acquisition of these two transitions in the SRM mode allowed one to quantify and to confirm the presence of trichlorfon in one unique injection. As stated in the previous section, due to the presence of 3 chlorine atoms in the molecule, both selected transitions presented approximately the same sensitivity; therefore, the ion intensity ratio was around 1, and this allowed the confirmation of positive samples even at the LOD level.

Regarding sample procedure, one of the goals of the method was to simplify the sample pretreatment, and therefore the direct injection of sample extracts was evaluated. As trichlorfon is very soluble in polar organic solvents, an extraction with acetonitrile or methanol was checked. Matrix effect was evaluated for both extractants and was higher for methanol than acetonitrile, which is in accordance with results previously reported for pesticide determination in fruits (12). Next, extraction with acetonitrile was selected, although some matrix effects

still remained. To compensate this matrix effect, and because of the absence of commercial available isotopic labeled trichlorfon, a matrix-matched calibration was performed. The application of this approach was feasible because of the availability of nontreated samples (blank samples) coming from the same orchard as treated samples. However, the direct injection of 20 μ L of acetonitrile sample extracts produced a poor peak shape, and a 4-fold dilution with water was necessary to improve the chromatographic behavior. Because of the high sensitivity of the method, the LOQ objective (0.05 mg/kg) was still achievable despite the 4-fold dilution. The sample dilution presents additional advantages such as the lower amount of matrix loaded in the column, the decrease of ionization suppression, and the compensation of possible variability between samples from different origin or variety. This last advantage can be of great importance when no ideal blank samples are available, as reported for fosetyl-aluminum in lettuce from different origin and variety (17).

Finally, mobile phase additives such as formic acid or ammonium acetate were tested to improve the trichlorfon response, but not increase was observed. So, a water/methanol gradient was optimized using a short Discovery C₁₈ column. The retention time of trichlorfon under these conditions was around 11.2 min, which allowed one to select a solvent delay of 7.5 min, giving an additional cleanup step that avoided the overload of the interface with early-eluting interferences that could affect the analyte ionization.

Validation Results. Calibration curves showed a good adjustment to a second-order equation between 0.5 and 250 ng/mL, with a correlation coefficient higher than 0.995 in all cases, and residuals lower than 28%.

The method presented satisfactory recoveries and excellent precision (**Table 1**) with average recoveries between 83% and 101%, for the two levels assayed in peel and flesh kaki fruit and cauliflower, and RSD always lower than 7%.

LODs of 0.013 mg/kg for peel kaki and cauliflower and 0.006 mg/kg for flesh kaki were estimated from the chromatograms at the 0.05 mg/kg level. As expected, higher LODs were obtained for peel kaki because of the lower sample amount processed in this method. However, despite using the same amount of sample (20 g) for cauliflower and flesh kaki, the LOD for cauliflower was higher, which indicates an upper ionization suppression produced by cauliflower matrix. Despite this, the use of matrix-matched calibration compensated this matrix effect, obtaining satisfactory results for both recoveries and precision.

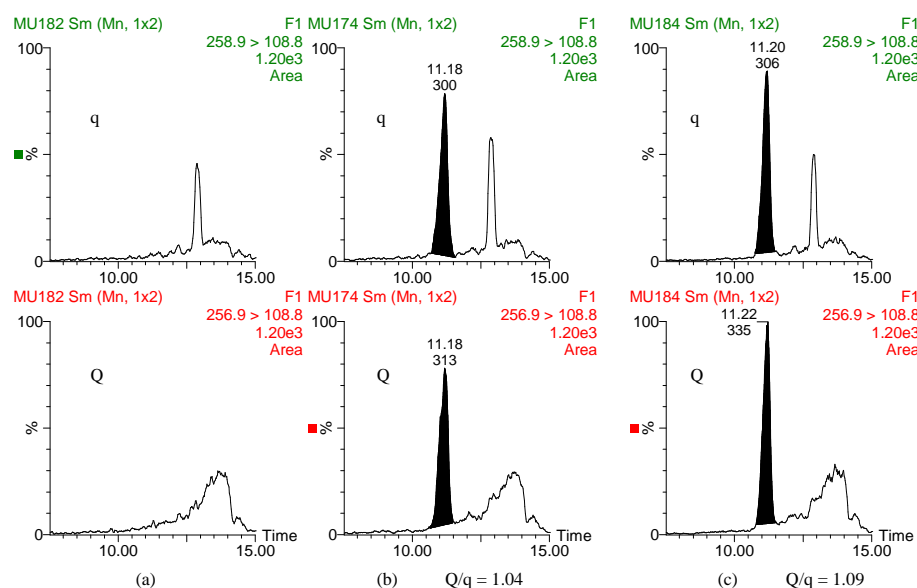


Figure 3. LC-ESI-MS/MS chromatograms for (a) blank cauliflower sample, (b) standard (2.5 µg/L), and (c) cauliflower sample fortified at 0.05 mg/kg with trichlorfon. Top, confirmation channel (*q*, 259>109); bottom, quantification channel (*Q*, 257>109).

The LOQ for the three studied matrixes was fixed to the lowest fortification level tested, that is, 0.05 mg/kg, because satisfactory recovery and adequate precision were obtained. In this way, the reliable quantification at the 0.05 mg/kg level is clearly demonstrated, according to the European SANCO guidelines (28, 29). The specificity of the procedure was also evaluated, and no responses were detected for neither the procedure blank nor the peel and flesh kaki fruit or cauliflower sample blank. Therefore, the method was formally specific.

Table 1. Recoveries and Relative Standard Deviations (RSD) at Two Concentration Levels for Trichlorfon in Spiked Peel and Flesh Kaki and Cauliflower (*n* = 5)

matrix	level of fortification (mg/kg)		LOD ^a (mg/kg)
	0.05 (RSD)	0.5 (RSD)	
cauliflower	83 (3)	84 (2)	0.013
kaki peel	98 (4)	101 (6)	0.013
kaki flesh	98 (7)	97 (3)	0.006

^a Limits of detection (LOD).

Typical LC-MS/MS chromatograms of standard solutions and sample extracts (blank and fortified at 0.05 mg/kg) are shown in **Figure 3**. They were

obtained after direct injection of the 4-fold diluted sample extract. As can be seen, the total chromatographic run was 15 min; the high sensitivity of the method using the selected transitions allows the quantification and confirmation of trichlorfon at the LOQ level with Q/q ratios close to 1. The absence of any peak in the blank sample at the expected retention time shows the specificity of the method.

Table 2. Sample Stability under Storage

	fortified extract						fortified sample
	0.5 mg/kg ($n = 3$)			0.5 mg/kg ($n = 4$)			
temperature storage:	4°C			-18°C			-18°C
analysis time (days):	6	15	60	6	15	60	365
cauliflower	99 (7) ^a	97 (8)	88 (7)	99 (6)	104 (5)	108 (6)	96 (6)
kaki peel	84 (6)	93 (9)	99 (3)	89 (6)	95 (8)	102 (7)	95 (8)
kaki flesh	101 (12)	120 (11)	106 (1)	113 (6)	119 (3)	131 (7)	107 (9)

^a Mean recovery (%) and RSD (%) in brackets

Stability of Samples. The stability study (see **Table 2**) in fortified diluted extracts was satisfactory at the temperatures tested, obtaining recovery values between 84% and 120% (4 °C) and 89% and 131% (-18 °C) over 2 months. On the other hand, the stability study in homogenized (trituated) fortified samples stored at -18 °C was also successful, with recovery values between 95% and 107% after 1 year of storage. Thus, the stability of trichlorfon in frozen samples and in refrigerated extracts was demonstrated, during at least 1 year and 2 months, respectively.

Application of the Method to Field Samples. The method developed was applied, over 2 years, to 216 samples: 72 from each matrix (peel and flesh of kaki fruit and cauliflower). In every set of samples analyzed (typically 6-8 samples), two quality controls (QCs) were included (one at the LOQ level and the other at the 10×LOQ level), obtaining average recoveries between 82% and 106% (**Table 3**). Up to 115 QCs were analyzed during the 2 years period, obtaining a RSD ≤ 20% (0.05

1188 J. Agric. Food Chem. 2006, 54, 1188–1195

mg/kg) and RSD \leq 12% (0.5 mg/kg). These data demonstrate the robustness of the method and the reproducibility over a wide range of time.

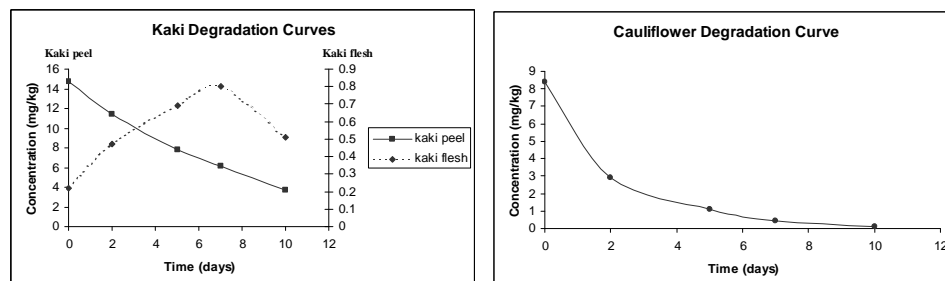


Figure 4. Degradation curves for trichlorfon in kaki fruit and cauliflower.

Table 3. Robustness and Reproducibility of the Method over 2 Years of Analysis^a

matrix	QC (0.05 mg/kg)	<i>n</i>	QC (0.5 mg/kg)	<i>n</i>
cauliflower	84 (8)	24	84 (3)	24
kaki peel	106 (20)	14	93 (7)	18
kaki flesh	82 (18)	17	89 (12)	18

^a Recoveries (%) and relative standard deviations (RSD %) for quality control samples (QC) analyzed in every type of sample matrix.

Trichlorfon was not detected in any blank sample, while treated samples presented different concentration levels according to the collection day after last application (DALA) and sample type. As **Figure 4** shows, 10 days after application the trichlorfon level in kaki peel decreased down to 30% of the initial concentration at day 0, while kaki flesh showed a smooth increase in trichlorfon concentration, and a subsequent decrease after 7 days. The cauliflower degradation curve shows a notable decrease in pesticide concentration after 2-5 days of the application. These data show the behavior of trichlorfon in treated field samples under Mediterranean conditions. Obviously, pesticide residue levels in fruit depend on many variables such as application rate and collection day after last application, but also climate, variety of fruit, environmental conditions, and fertilization regime. **Figure 5** shows the chromatograms obtained for several samples of peel kaki collected at different times and illustrates the decrease in the concentration of trichlorfon over time.

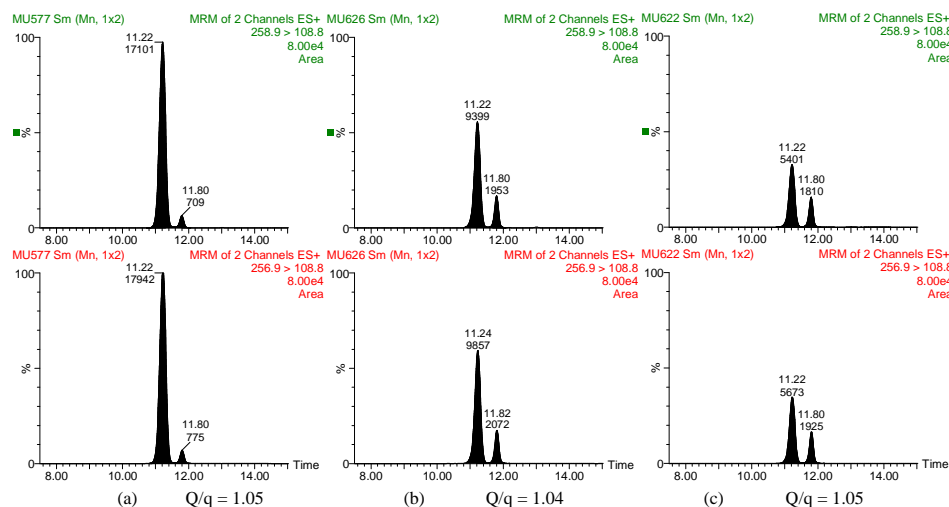


Figure 5. LC-ESI-MS/MS chromatograms for peel kaki samples: (a) sample collected at 2 DALA (11.6 mg/kg), (b) sample collected at 5 DALA (5.5 mg/kg), and (c) sample collected at 10 DALA (3.0 mg/kg). Top, confirmation channel (q , 259>109); bottom, quantification channel (Q , 257>109).

Regarding confirmation of positive samples, in all analyses performed, both standards in solvent and spiked blank samples showed Q/q ratios within the expected tolerance (ion ratio around 1 with deviation lower than 15%), using the transition 257>109 for quantification and 259>109 for confirmation. All positive real samples were confirmed, obtaining ion ratio deviations lower than 6%, as can be seen in **Figure 5** where the Q/q ratios obtained were 1.04 and 1.05. No false positives were found in any of the samples. As a summary, **Table 4** shows the average deviations for Q/q ratios in the samples and QC from each matrix type.

It is interesting to point out the occurrence of an additional peak at a retention time close to the analyte (**Figure 5**). This peak might reveal either the existence of other compounds in the test substance applied or a trichlorfon transformation product, as it was present in all treated sample analyzed. However, this peak was not detected either in blank samples or in the QCs. This compound has to be isobaric with trichlorfon and possibly structural isomeric, as it shares both selected transitions with similar ion ratios. Thus, the similar intensity of both selected transitions suggested the presence of three chlorine atoms in the molecule. Different potential structures for this compound are proposed in **Figure 6**. Jimenez *et al.* (6) also found an interference in trichlorfon analysis, which was elucidated as compound C or D of **Figure 6** according to its GC-MS behavior. In the present work, the concentration of this interference

increased over time; meanwhile, trichlorfon concentration decreased according to DALA. This fact supports the hypothesis that the unknown compound is an isomeric transformation product from trichlorfon. The detection of a small peak in the treated samples at 0 DALA suggests that this compound could be also present at small concentration in the test substance applied in the residue trials.

Table 4. Confirmation of Trichlorfon in Samples^a

matrix	QC (0.05 mg/kg)	QC (0.5 mg/kg)	Samples (0.05-0.5 mg/kg)	Samples (0.5 mg/kg)
cauliflower	4.9	3.1	3.7	3.3
kaki peel	6.2	2.8	2.9	3.8
kaki flesh	4.5	2.6	3.4	1.5

^a Average *Q/q* ratio deviations (%) for QC and samples analyzed that contained trichlorfon at different ranges of concentrations.

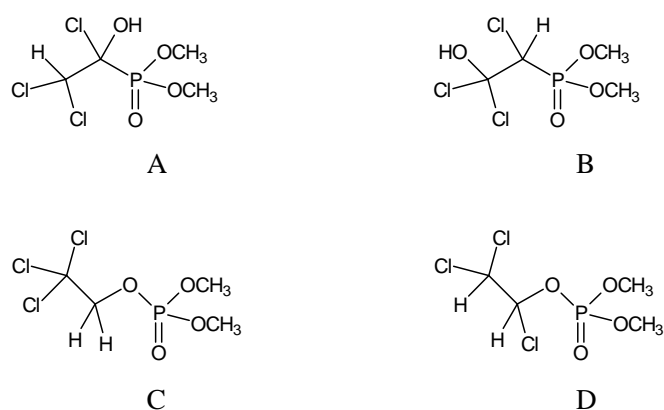


Figure 6. Proposed structures for the interference peak observed in the determination of trichlorfon.

The presence of this isobaric interference reveals an important fact that, when using LC coupled to tandem MS, is normally underestimated: the possibility of finding an interference that shares with the analyte both the quantification and the confirmation transitions, with the same ion ratio. This fact is not frequent at all, but certainly illustrates the importance of an efficient chromatographic separation to avoid the reporting of false positives. In the case that both peaks were not correctly resolved, the interference would be reported as trichlorfon as all of the confirmation parameters (retention time and ion ratio for two selected transitions) would fit with those previously established as confirmation criteria.

Conclusion. This work has shown that LC-ESI-MS/MS is a powerful analytical technique that allows the rapid and reliable determination of trichlorfon residues in kaki and cauliflower samples. The high selectivity and sensitivity of LC-MS/MS allows the direct injection of the diluted sample extract, achieving a detection limit 50 times (cauliflower and peel kaki) and 100 times (flesh kaki) lower than the MRL in these crops. A methanol:water gradient separation using a Discovery C₁₈ column permits a correct separation between the analyte and one isobaric interference that shared the same MS/MS transitions. Matrix-matched standard calibration together with a 4-fold dilution of the extracts compensated and minimized the matrix effect observed that produced ionization suppression. The method was validated at the 0.05 and 0.5 mg/kg levels, and its applicability was checked by analysis of a large number of field samples over 2 years, demonstrating its speediness and robustness, and suitability for routine analysis of trichlorfon in vegetable samples.

LITERATURE CITED

- (1) *The Pesticide Manual*, 13th ed.; British Crop Protection Council, 2004.
 - (2) Teruel Muñoz, V. Límites Máximos de Residuos de Productos Fitosanitarios.
<http://www.mapya.es/agricultura/pags/fitos/registro/lmrs/pdf/LMRS.pdf>, July, 2005.
 - (3) Lee, W. O.; Law, M. L. M.; Wong, S. K. Determination of Methamidophos Residues in Food Remnants. *Food Addit. Contam.* **1996**, *13*, 687-693.
 - (4) Podhorniak, L. V.; Negron, J. F.; Griffith, F. D. Gas Chromatography with Pulsed Flame Photometric Detection Multiresidue Method for Organophosphate Pesticides and Metabolite Residues at the Parts-Per-Billion Level in Representative Commodities of Fruit and Vegetables Crop Groups. *J. AOAC Int.* **2001**, *84*, 873-890.
 - (5) Brito, N. M.; Navickiene, S.; Polese, L.; Jardim, E. F. G.; Abakerli, R. B.; Ribeiro, M. L. Determination of Pesticide Residues in Coconut Water by Liquid-Liquid Extraction and Gas Chromatography with Electron-capture plus Thermionic Specific Detection and Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection. *J. Chromatogr., A* **2002**, *957*, 201-209.
 - (6) Jiménez, J. J.; Bernal, J. L.; del Nozal, M. J.; Toribio, L.; Bernal, J. Determination of Impurities in Pesticides and their Degradation Products formed during the Wine-making Process by Solid-phase Extraction and Gas Chromatography with Detection by Electron Ionization Mass Spectrometry. II. Bromopropylate, Trichlorphon, Parathion-methyl and Tebuconazole. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18*, 2629-2636.
 - (7) Garrido, A.; González-Rodríguez, M. J.; Arrebola, F. J.; Martínez, J. L. Potentiality of Gas Chromatography-Triple Quadrupole Mass Spectrometry in Vanguard and Rearguard Methods of Pesticides Residues in Vegetables. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 4640-4648
 - (8) López-Avila, V.; Benedicto, J.; Bauer, K. M. Stability of Organochlorine and Organophosphorus Pesticides when Extracted from Solid Matrixes with Microwave Energy. *J. AOAC Int.* **1998**, *81*, 1224-1232.
-

1188 J. Agric. Food Chem. **2006**, 54, 1188–1195

- (9) Blasco, C.; Font, G.; Picó, Y. Comparison of Microextraction Procedures to Determine Pesticides in Oranges by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Chromatogr., A* **2002**, 970, 201-212.
 - (10) Sancho, J. V.; Pozo, O. J.; Zamora, T.; Grimalt, S.; Hernández, F. Direct Determination of Paclotrazol Residues in Pear Samples by Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 4202-4206.
 - (11) Hogenboom, A. C.; Hofman, M. P.; Kok, S. J.; Niessen, W. M. A.; Brinkman, U. A. Th. Determination of Pesticides in Vegetables using Large-Volume Injection Column Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr., A* **2000**, 892, 379-390.
 - (12) Pozo, O. J.; Marín, J. M.; Sancho, J. V.; Hernández, F. Determination of Abamectin and Azadirachtin Residues in Orange Samples by Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr., A* **2003**, 992, 133-140.
 - (13) Matuszewski, B. K.; Constanzer, M. L.; Chavez-Eng, C. M. Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS. *Anal. Chem.* **2003**, 75, 3019-3030.
 - (14) Antignac, J. P.; de Wasch, K.; Monteau, F.; De Brabander, H.; Andre, F.; le Bizec, B. The Ion Suppression Phenomenon in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and its Consequences in the Field of Residue Analysis. *Anal. Chim. Acta* **2005**, 529, 129-136.
 - (15) Hernández, F.; Sancho, J. V.; Pozo, O. J. Critical Review of the Application of Liquid Chromatography/Mass Spectrometry to the Determination of Pesticide Residues in Biological Samples. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, 382, 934-946.
 - (16) Choi, B. K.; Gusev, A. I.; Hercules D. M. Quantitative LC-ESI-MS analysis for pesticides in complex environmental matrix using external and internal standards. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **2000**, 77, 305-322.
 - (17) Hernández, F.; Sancho, J. V.; Pozo, O. J.; Villaplana, C.; Ibañez, M.; Grimalt, S. Rapid Determination of Fosetyl-Aluminium Residues in Lettuce by Liquid Chromatography/Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *J. AOAC Int.* **2003**, 86, 832-838.
-

1188 J. Agric. Food Chem. **2006**, 54, 1188–1195

- (18) Jansson, C.; Pihlström, T.; Österdahl, B. G.; Markides, K. E. A new Multi-Residue Method for Analysis of Pesticide Residues in Fruit and Vegetables using Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometric Detection. *J. Chromatogr., A* **2004**, 1023, 93-104.
 - (19) Sannino, A.; Bolzoni, L.; Bandini, M. Application of Liquid Chromatography with Electrospray Tandem Mass Spectrometry to the Determination of a new Generation of Pesticides in Processed Fruits and Vegetables. *J. Chromatogr., A* **2004**, 1036, 161-169.
 - (20) Agüera, A.; López, S.; Fernández-Alba, R.; Contreras, M.; Crespo, J.; Piedra, L. One-year Routine Application of a new Method Based on Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry to the Analisis of 16 Multiclass Pesticidas in Vegetable Samples. *J. Chromatogr., A* **2004**, 1045, 125-135.
 - (21) Taylor, J. C.; Hird, S. J.; Sykes, M. D.; Startin, J. R. Determination of Residues of Propamocarb in Wine by Liquid Chromatography-Electrospray Mass Spectrometry with Direct Injection. *Food Addit. Contam.* **2004**, 21, 572-577.
 - (22) Sancho, J. V.; Ibañez, M.; Grimalt, S.; Pozo, O. J.; Hernández, F. Residue Determination of Cyromazine and its Metabolite Melamine in Chard Samples by Ion-Pair Liquid Chromatography Couples to Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2005**, 530, 237-243.
 - (23) Hetherington, C. L.; Sykes, M. D.; Fussell, R. J.; Goodall, D. M. A Multi-Residue Screening Method for the Determination of 73 Pesticides and Metabolites in Fruit and Vegetables using High-Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, 18, 2443-2450.
 - (24) Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002, implementing Council Directive 96/23/EEC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Official Journal of the European Communities L221, C(2002)3044, pp 0008-0036.
 - (25) Ortelli, D.; Edder, P.; Corvi, C. Multiresidue Analysis of 74 Pesticides in Fruits and Vegetables by Liquid Chromatography-Electrospray-Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2004**, 520, 33-45.
 - (26) Grimalt, S.; Pozo, O. J.; Marín, J. M.; Sancho, J. V.; Hernández, F. Evaluation of Different Quantitative Approaches for the
-

- Determination of Noneasily Ionizable Molecules by Different atmospheric Pressure Interfaces Used in Liquid chromatography Tandem Mass Spectrometry: Abamectine as Case of Study. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, *16*, 1619-1630.
- (27) Zamora, T.; Pozo, O. J.; López, F. J.; Hernández, F. Determination of Tridemorph and other Fungicide Residues in Fruit Samples by Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr., A* **2004**, *1045*, 137-143.
- (28) European Commission, Directorate General Health and Consumer Protection, Residues: Guidance for generating and reporting methods of analysis in support of pre-registration data requirements for Annex II (part A, Section 4) and Annex III (part A, section 5) of Directive 91/414. Document SANCO/3029/99 rev.4 of July 2000.
- (29) European Commission, Directorate General Health and Consumer Protection, Quality Control Procedures for pesticide residues analysis. Document SANCO/10476/2003 of February 2004.
-

1.2.3. Discusión de los resultados

Uno de los puntos importantes en el desarrollo de un método de análisis por LC-MS/MS para triclorfon en muestras vegetales ha sido aplicar un tratamiento de muestra lo más sencillo posible, con el objetivo de minimizar los posibles errores en la manipulación y extracción de la muestra. Así pues, en nuestro trabajo el tratamiento de muestra se ha reducido a una homogeneización y trituración, seguida de una extracción sencilla por ultraturrax. Posteriormente, se inyectó en el sistema de LC-MS/MS 20 μ L de extracto crudo diluido 4 veces, obteniendo la sensibilidad suficiente para establecer un LOQ común en todas las matrices de 0.05 mg/kg, llegando a estimar LODs de 0.013 mg/kg en coliflor y en piel de caqui y 0.006 mg/kg en pulpa de caqui. Con esta filosofía de trabajo, se tiende a hacer lo contrario que en una preconcentración y 'clean-up' típicos, especialmente en métodos de GC, ya que se diluye la concentración original del extracto en lugar de preconcentrarlo. La dilución de la muestra puede ser interesante cuando se combina con técnicas de análisis de alta sensibilidad como es el acoplamiento MS/MS, de forma que sean capaces de compensar dicha dilución. Con ello, se contribuye a disminuir el efecto matriz y compensar la variabilidad entre distintas muestras, incluso de la misma especie, como se observó en el caso del fosetyl-aluminio en muestras de lechuga (Hernández *et al.*, 2003). En este sentido, el sencillo tratamiento de muestra aplicado en nuestro trabajo contrasta con los tratamientos realizados en métodos basados en GC, que son más tediosos e incluyen una mayor manipulación de la muestra (Podhorniak *et al.*, 2001; Brito *et al.*, 2002), no llegándose a alcanzar LODs inferiores a 0.5 mg/kg. En otros trabajos, como en el de Garrido *et al.* (2005) se ha incluido el triclorfon dentro de un método *screening* multirresidual, estableciéndose un límite de confianza de 0.01 mg/kg, en el que se asegura la obtención del positivo mediante el análisis GC-MS/MS. Para obtener este nivel de confianza se ha llevado a cabo un tratamiento de muestra sencillo en el que se preconcentra 5 veces la presencia de los analitos en la matriz. Por otro lado, se han desarrollado otros dos métodos MMR por LC acoplado a un detector de MS de simple cuadrupolo (Blasco *et al.* 2002 y 2006) en los que se incluye el triclorfon. En el tratamiento de muestra se lleva a cabo una preconcentración por 5 desde el peso de la muestra hasta el extracto final, efectuándose los ensayos de recuperación a niveles de 0.1 mg/kg. Cabe destacar que en nuestro trabajo, el método se validó al nivel de 0.05 mg/kg, estableciéndose este valor como LOQ, que fue el valor de concentración más bajo para el cual el método demostró tener exactitud y precisión satisfactorias. Con toda seguridad, se hubieran podido cuantificar

niveles de concentración inferiores a 0.05 mg/kg, si hubiera sido necesario, dada la buena calidad e intensidad de los picos cromatográficos.

- *Validación y aplicación del control de calidad*

Otra característica del método analítico desarrollado ha sido su robustez y buena reproducibilidad. La validación del método analítico, se realizó en tres matrices (piel y pulpa de caqui y coliflor) y se obtuvieron valores satisfactorios de recuperación a los dos niveles de concentración estudiados (entre 83 y 110%), así como una excelente precisión (con RSD siempre inferior al 7%). El análisis de muestras reales fue satisfactorio, confirmándose la robustez del método mediante el uso de QCs. Se analizaron un total de 216 muestras reales (72 muestras para cada una de las matrices) en diferentes periodos de análisis a lo largo de dos años. En cada secuencia de análisis se incluyeron 2 QCs a los niveles de 0.05 y 0.5 mg/kg, en tandas de 6 a 8 muestras por secuencia. En total se llegaron a analizar 115 QCs, cuyos valores de recuperación estuvieron entre 82% y 106%. Las RSD a lo largo de estos dos años fueron inferiores al 20% y 12%, para los niveles de 0.05 y 0.5 mg/kg, respectivamente.

- *Confirmación de la Identidad*

Además de los parámetros de calidad comentados, se estudió con detalle la confirmación de la presencia del triclorfon en las muestras reales. Para ello, se estudiaron los diferentes iones producto obtenidos en la fragmentación por MS/MS. Como se puede observar en la *Figura 1(a) del artículo científico 1*, el triclorfon presenta tres iones a m/z 257, 259 y 261 correspondientes a $[M+H]^+$, donde la abundancia de 257 y 259 es igual como consecuencia de la distribución isotópica resultante de la presencia de los 3 átomos de cloro en la estructura molecular del triclorfon. En el estudio de fragmentación se comprobó que para los dos iones precursores 257 y 259 había un mismo fragmento de m/z 109, que era el más abundante. El ion producto m/z 109 es común a ambos debido a la pérdida de los átomos de cloro, como se puede ver en la ruta de fragmentación propuesta para el trichorfon en la *Figura 2 del artículo científico 1*. Con el objetivo de obtener la máxima sensibilidad, se seleccionaron las transiciones 257>109 y 259>109 para la cuantificación (Q) y confirmación (q), respectivamente. Debido a que la intensidad de los picos cromatográficos es idéntica para ambas transiciones el cálculo de la relación entre las áreas de los picos fue prácticamente igual a la unidad. Esta característica del método analítico le dio la capacidad de confirmar los positivos al mismo nivel que la cuantificación, llegando a alcanzar 5 puntos de identificación (IPs) (Decision 2002/657/EC), 2 más de los exigidos en la UE para compuestos regulados.

- *Estudio de Especificidad*

Por otro lado, se estudió la especificidad de estas dos transiciones, comparando el cromatograma de una muestra blanco con el de otra fortificada al nivel de 0.05 mg/kg. Tal como se puede ver en la *Figura 3 del artículo científico 1*, no se observó ningún interferente de la matriz que presentara un pico en las transiciones de cuantificación y confirmación, indicando que el método presenta alta especificidad. La especificidad conseguida con las dos transiciones seleccionadas y los criterios de confirmación aplicados (evaluación de las relaciones Q/q) nos permitieron desarrollar un método de análisis con la fiabilidad suficiente para evitar los falsos positivos.

- *Estudio de la Estabilidad*

Dada la inestabilidad térmica de triclorfon, se consideró necesario realizar un estudio de estabilidad del analito tanto en las muestras como en sus extractos con el fin de dar mayor validez a los resultados obtenidos. La estabilidad del triclorfon se estudió fortificando muestras blanco de cada uno de los tipos de matriz al nivel de 0.5 mg/kg; se almacenaron a -18 °C (de la misma forma que las muestras reales) y se analizaron después de un año. Por otro lado, se almacenaron extractos fortificados también a 0.5 mg/kg de los diferentes tipos de muestras a 4 °C y -18 °C a lo largo de 2 meses, analizándose a los 0, 6, 15 y 60 días. El análisis de estas muestras se realizó mediante la comparación con QCs al mismo nivel preparados en el momento del análisis, esperando que entre las muestras del ensayo de estabilidad y los QCs la desviación no fuera superior al $\pm 15\%$. En ambos estudios se obtuvieron resultados satisfactorios, con valores de recuperación entre 95% y 107% para las muestras. Para los extractos se obtuvieron recuperaciones del 84% y 102%, cuando se conservaron a a 4 °C, y del 89% y 131%, conservadas a temperaturas de -18 °C. De esta forma, se comprobó la buena conservación de las muestras si se almacenaban a -18 °C durante un año, además de asegurar la estabilidad en muestra extraída mantenida a 4 °C (sistema de inyección LC con bandeja de auto muestrea refrigerada) y/o -18 °C en caso de guardarse los extractos para un posterior análisis, lo que resultaba especialmente interesante cuando se analizaban muestras muy concentradas, que requerían un reanálisis posterior, previa dilución.

- *Aplicación a muestras reales*

Las muestras analizadas correspondieron a un estudio de campo del INIA, y fueron recogidas a los tiempos: t(0-), antes de aplicación del formulado; t(0+), tomadas 2-3 horas después de la aplicación; t(2), t(5), t(7) y t(10) tomadas en los días 2, 5, 7 y 10 siguientes a la aplicación, respectivamente. Los estudios de

campo se realizaron por cuadruplicado, aplicándose el producto formulado en cuatro campos distintos; además, se tomaron muestras control en dos parcelas en las que no se había aplicado el producto. A partir de los resultados obtenidos, se calcularon valores de concentración medios para obtener las curvas de disipación para cada una de los tipos de muestra vegetal. Los resultados se muestran en la *Figura 4 del artículo científico 1*. En los tres tipos de matriz ensayados se observó una disminución de la concentración de residuo de triclorfon a los 10 días, y en ningún caso se encontraron residuos de triclorfon en muestras blanco procedentes de las parcelas control. Después de 10 días de aplicación en caqui, el nivel de triclorfon en piel había disminuido hasta un 30 %, mientras que en pulpa se observó un ligero aumento de la concentración de triclorfon hasta los 7 días, seguida de una disminución siempre a niveles muy inferiores a los correspondientes en piel. La disipación del triclorfon en coliflor fue más acusada que en caqui, disminuyendo hasta un 15 % en 5 días, para llegar prácticamente al 100 % de degradación a los 10 días. Estas curvas de disipación son representativas de ensayos de campo bajo las condiciones de clima mediterráneo. Se debe considerar que el comportamiento del triclorfon después de su aplicación en frutas o vegetales dependerá de muchas variables, desde la dosis de aplicación, el clima y la variedad de fruta o vegetal hasta del régimen de fertilización. Además de las curvas de disipación, en un segundo ensayo se realizaron estudios de cosecha; en este caso sólo se tomaron muestras a t(0+) y t(10). Estos ensayos también se realizaron por cuadruplicado. A partir de los datos de residuos encontrados y del plazo de seguridad establecido, se pudo estimar un valor de LMR (Fernández-Cruz *et al.*, 2006), que finalmente fue establecido en 0.5 mg/kg para los dos tipos de productos vegetales.

Durante el proceso de análisis de las muestras reales nos encontramos con un hecho de interés analítico, la aparición de un pico adicional cuyo tiempo de retención era cercano al del triclorfon. Este pico era detectado en todas las muestras, tanto al usar la transición de cuantificación como la de confirmación, manteniendo incluso la misma relación de intensidades (Q/q ratios) a la calculada para el triclorfon (ver *Figura 5 del artículo científico 1*). Sin embargo, este pico no apareció en las muestras blanco analizadas, por lo que conducía a pensar que se trataba de un compuesto isobárico asociado al fórmulato de triclorfon. Debido a que presentaba los mismos iones precursores e iones producto y la misma relación isotópica, se consideró que la estructura molecular correspondía a un isómero del triclorfon. Por otro lado, el pico del posible isómero del triclorfon no disminuía con el paso del tiempo tras haber aplicado el fórmulato en la muestra, al contrario del triclorfon. Esto indicaría que la degradación era más lenta, o que

parte del triclorfon se degradaba por una vía que pasaba por este intermedio, isómero estructural.

Este caso poco frecuente ilustra la importancia de una buena separación cromatográfica, ya que de no haber realizado una correcta separación por LC, se podría haber convertido en un falso positivo, que incluso hubiera sido confirmado por presentar la misma relación de abundancia que el triclorfon.

Aunque este no era el objetivo del estudio realizado, sería de gran interés elucidar la estructura del nuevo analito encontrado como posible impureza del fórmulado o como producto de transformación del triclorfon en las muestras de campo. El uso de otras técnicas de MS, tal como el QqIT y/o (Q)TOF, posiblemente permitiría estudiar y proponer una ruta de fragmentación del compuesto isomérico, y compararlo con la ruta de fragmentación del triclorfon. En el caso de que presentara fragmentos distintos a los obtenidos para el triclorfon podría considerarse como un isómero estructural. En función de los fragmentos observados se podría elucidar cuál de los propuestos en la *Figura 6 del artículo científico 1* correspondería al compuesto detectado en las muestras. Además, el uso de técnicas MS de alta resolución como el (Q)TOF ayudaría a confirmar la estructura de cada uno de los fragmentos gracias a su capacidad de medida de masa exacta.

1.2.4. Referencias bibliográficas

- Blasco, C.; Font, G.; Picó, Y. (2002) *Comparision of Microextraction Procedures to Determine pesticides in Oranges by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*. J. Chromatogr. A 970, 201-212
- Blasco, C.; Font, G.; Picó, Y. (2006) *Evaluation of 10 pesticide residues in oranges and tangerines from Valencia (Spain)*. Food Control 17 841-846
- Brito, N.M.; Navickiene, S.; Polese, L.; Jardim, E.F.G.; Abakerli, R.B.; Riberiro, M.L. (2002) *Determination of pesticide residues in coconut water by liquid-liquid extraction and gas chromatography with electron-capture plus thermionic specific detection and solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection*. J. Chromatogr. A 957, 201-209
- Comisión Europea, Decisión 2002/657/CE del 12 de agosto de 2002. Directiva 96/53/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados.
- European Commission, Directorate General Health and Consumer Protection, Residues: Guidance for generating and reporting methods of analysis in support of pre-registration data requirements for Annex II (part A, Section 4) and Annex III (part A, section 5) of Directive 91/414. Document SANCO/3029/99 rev. 4 of July 2000
- European Commission, Directorate General Health and Consumer Protection, Quality Control Procedures for pesticide residues analysis. Document SANCO/10476/2003 of February 2004
- Fernández-Cruz, M.L.; Grimalt, S.; Villarroya, M.; López, F.J.; Llanos, S.; García-Baudín, J.M. (2006) *Residue levels of captan and trichlorfon in field-treated kaki fruits, individual versus composite samples, and after household processing*. Food Addit. and Contam. 23, 591-600
- Garrido, A.; González-Rodríguez, M.J.; Arrebola, F.J.; Martínez, J.L. (2005) *Potentiality of Gas Chromatography-Triple Quadrupole Mass Spectrometry in Vanguard and Rearguard Methods of Pesticides Residues in Vegetables*. Anal. Chem. 77, 4640-4648
- Hernández, F.; Sancho, J.V.; Pozo, Ó.J.; Villaplana, C.; Ibañez, M.; Grimalt, S. (2003) *Rapid determination of fosetyl-aluminum residues in lettuce by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry*. J. AOAC Int. 86, 832-838
-

- Jiménez, J.J.; Bernal, J.L.; del Nozal, M.J.; Toribio, L.; Bernal J. (2004) *Determination of Impurities in Pesticides and their Degradation Products forms during the Wine-making Process by Solid-phase Extraction and Gas Chromatography with detection by Electron Ionization Mass Spectrometry. II Bromopropylate, Trichlorphon, Parathion-methyl and Tebuconazole*. Rapid Commun. Mass Spectrom. 18, 2629-2636
- López-Ávila, V.; Benedicto, J.; Bauer, K.M. (1998) *Stability of Organochlorine and Organophosphorus Pesticide when Extracted from Solid Matrixes with Microwave Energy*. J. AOAC Int. 81, 1224-1232
- Mezcua, M.; Repetti, M.R.; Agüera, A.; Ferrer, C.; García-Reyes, J.F.; Fernández-Alba, A.R. (2007) *Determination of pesticides in milk-based infant formulas by pressurized liquid extraction followed by gas chromatography tandem mass spectrometry*. Anal. Bional. Chem. 389, 1833-1840
- Podhorniak, L.V.; Negron, J.F.; Griffith, F.D. (2001) *Gas chromatography with Pulsed Flame Photometric Detection Multiresidue Method for Organophosphate Pesticides and Metabolite Residues at Parts-Per-Billion Level in Representative Commodities of Fruit and Vegetables Crop Groups*. J. AOAC Int. 84, 873-890
- Tahboud, Y.R.; Zaater, M.F.; Al-Talla, Z.A. (2005) *Determination of the limits of identification and quantification of selected organochlorine and organophosphorous pesticide residues in surface water by full-scan gas chromatography/mass spectrometry*. J. Chromatogr. A 1098, 150-155
- Ueno, E.; Oshima, H.; Saito, I.; Matsumoto H.; Nakazawa, H. (2003) *Determination of Organophosphorus Pesticide Residues in Onion and Welsh Onion by Gas Chromatography with Pulsed Flame Photometric Detector*. J. Pest. Sci. 28, 422-428
-

- 1.3. Plaguicidas de bajo peso molecular y alta polaridad: ciromazina y su metabolito melamina como caso de estudio.
-

1.3.1. Introducción

La ciromazina pertenece a la familia de las triazinas, las cuales comparten una estructura común correspondiente al anillo 1,3,5-triazínico. En general, los plaguicidas de la familia de las triazinas presentan propiedades herbicidas. Suelen tener sustituciones de grupo alquilo-aminas secundarias en las posiciones 2 y 4, además de otro hetero-sustituyente en posición 6 como: cloro (-azina), metoxido (-tona) o tiometilo (-etrina). Sin embargo, la ciromazina presenta una peculiaridad frente a este grupo, ya que se encuentra sustituido por dos aminas primarias en 6 y 2, lo que le confiere su propiedad insecticida inhibidora de la síntesis de quitina y proteínas cuticulares (Bel *et al.*, 2000). La ciromazina puede degradarse fácilmente a melamina, como producto mayoritario de transformación (Cook *et al.*, 1981), de forma que un análisis conjunto de ambos analitos sería de gran interés. Por otro lado, debe considerarse que la melamina es un compuesto químico de alta reactividad, de uso frecuente en la fabricación de polímeros y derivados, tales como resinas de melamina-formaldehído, así como, producto de carácter ignífugo o retardante de llama (Fredenhagen, 2004).

La ciromazina no se suele incluir en los MMR dentro de la familia de las triazinas (Tadeo *et al.*, 2000; Dean *et al.*, 1996), debido a que sus características físico-químicas (alta polaridad) hacen que se desvíe del comportamiento general del resto de plaguicidas incluidos en los MMR. En este sentido, cuando la ciromazina se ha incluido en algún MRM ha presentado ciertos problemas en la extracción, como es el caso de Hernández-Borges *et al.* (2005) donde la ciromazina no podía ser extraída por el procedimiento combinado de microextracción en línea con electroforesis capilar; o bien, problemas de sensibilidad mediante el análisis por GC-MS para alcanzar el LOD necesario para cumplir con los criterios de EU para un correcto análisis cuantitativo (Mol *et al.*, 2007); o también, por problemas de recuperación a causa de la baja eficiencia del método de extracción para la determinación del analito por LC-MS/MS (Mol *et al.*, 2007). Además, en ninguno de los MMR comentados se ha incluido la melamina como producto mayoritario de degradación de la ciromazina. Considerando estas limitaciones de los métodos MMR, parece interesante desarrollar un método de análisis para la ciromazina y su principal metabolito melamina, que sea selectivo, sensible y robusto.

En lo relativo a métodos específicos para ciromazina y melamina se han encontrado algunas referencias en la bibliografía. En análisis de alimentos, como carnes de ave de corral y huevos, se ha aplicado la técnica de HPLC-UV-Vis con columnas NH₂, alcanzando un LOD de 0.02 mg/kg (Chou *et al.*, 2003); en este

trabajo además de columnas NH₂ se probaron columnas en fase reversa C₈ y C₁₈, sin obtener una buena resolución cromatográfica. Yokley *et al.* (2000) también han aplicado la técnica de HPLC-UV-Vis para determinar ciromazina y melamina en suelos, obteniendo un LOQ de 0.01 mg/kg. Tanto en el trabajo de Chou *et al.* (2003), como en el de Yokley *et al.* (2000) fue necesario un costoso tratamiento de la muestra, incluyendo SPE de intercambio iónico, con el fin de eliminar la mayor cantidad de interferentes que pueden coeluir con el analito y enmascarar su determinación mediante UV-Vis. También en ambos trabajos se llevó a cabo una posterior confirmación de las muestras positivas por GC-MS. En la bibliografía se ha encontrado otro método analítico anterior, también con un complicado procesamiento y *clean-up* de muestra, llevándose a cabo la determinación por GC-NPD en col china y llegándose a LOD de 0.1 mg/kg (Bardalaye *et al.*, 1987). Por otro lado, se han descrito estudios comparativos de separación cromatográfica entre los analitos ciromazina y melamina por HPLC-UV-Vis mediante columnas de intercambio iónico y de fase reversa (Cabras *et al.*, 1990), además de por GC-MS (Toth *et al.*, 1987).

En general, parece más adecuada la separación cromatográfica de estos compuestos mediante LC, debido a su pequeño tamaño molecular y baja volatilidad. Por otro lado, el acoplamiento de LC a MS resultará más selectivo que el acoplamiento con UV-Vis, permitiendo disminuir el tratamiento de muestra, y a su vez aumentar la sensibilidad. Considerando la alta basicidad de la ciromazina y melamina, estos pueden encontrarse ya en forma catiónica a un pH neutro, por lo que los mecanismos de retención cromatográfica más idóneos serían la cromatografía iónica, o bien la formación de pares iónicos en cromatografía de fase reversa. En el caso de la cromatografía de intercambio iónico sería necesario trabajar con tampones de alta fuerza iónica, tales como hidróxidos o fosfatos, los cuáles presentan baja volatilidad. En este sentido, si se lleva a cabo el acoplamiento con MS los tampones de baja volatilidad resultarían perjudiciales para la interfase de electrospray, produciendo una supresión de la señal (King *et al.*, 2000), e incluso, precipitando en el propio sistema. Una alternativa más interesante para LC-MS ha sido la formación de pares iónicos en fase reversa (ion-pair reversed-phase liquid chromatography, IP-RPLC), la cuál ha sido aplicada tanto en el campo medioambiental (Barceló *et al.*, 1991; Castro *et al.*, 2001a), como en seguridad alimentaria (Castro *et al.*, 2001b; Hernández *et al.*, 2003; Aramendía *et al.*, 2006; Calbani *et al.*, 2007), o en bioanálisis (Gustavsson *et al.*, 2001; Petritis *et al.*, 2002a; Tak *et al.*, 2007). Tradicionalmente, para evitar la supresión de la señal debido a la adición de aditivos no volátiles, especialmente ácidos alquilsulfónicos, en la fase móvil, se ha recurrido al uso en línea de

membranas ion-supresoras a la salida de la columna cromatográfica (Gardner *et al.*, 2000); o bien, a columnas intercambiadoras de iones entre la interfase y la columna cromatográfica (Forngren *et al.*, 1999). Estas estrategias pueden ser adecuadas pero presentan algunos inconvenientes, como la pérdida de resolución cromatográfica, la necesidad de regenerar las resinas a intervalos regulares, además de una instrumentación más compleja y costosa. Una aproximación más sencilla en la formación de IP en RPLC acoplada con MS es el uso de compuestos de mayor volatilidad como reactivos formadores de pares iónicos, como es el caso de los ácidos carboxílicos perfluorados: ácido trifluoroacético (TFA), ácido pentafluoropropiónico (PFPA), ácido heptafluorobutírico (HFBA), ácido nonafluoropentanóico (NFPA), ácido tridecafluoroheptanóico (TFHA) y ácido pentadecafluorooctanóico (PDFOA). Petritis *et al.* (2002b) han estudiado la volatilidad de los ácidos perfluorados, así como su compatibilidad con otros ácidos o bases, concluyendo que en volatilidad disminuye con el aumento de la cadena alquílica de forma que THFA y PDFOA presentan una volatilidad más baja, recomendando concentraciones inferiores a 5 mM para una adecuada retención en RPLC de compuestos catiónicos. Las concentraciones de modificadores formadores de pares iónicos en la fase móvil suelen ser de 1 a 3 mM (Gustavsson *et al.*, 2001).

La finalidad del trabajo aquí presentado ha sido desarrollar un método analítico por LC-MS/MS para la determinación conjunta de dos compuestos, cirmazina y melamina, que presentan cierta complejidad (pequeño tamaño molecular y elevado carácter básico) y que resultan de especial interés dentro del campo de los plaguicidas en alimentos. Para una correcta extracción, se ha considerado el pH de la mezcla de extracción como uno de los puntos críticos para aumentar la eficiencia de la misma. Otro parámetro importante ha sido el estudio del comportamiento cromatográfico de ambos compuestos en RPLC en forma de pares iónicos con ácidos carboxílicos perfluorados, estudiándose a su vez la adición del reactivo tanto en la fase móvil como en el vial.

Para efectuar una correcta cuantificación, se ha estudiado el efecto matriz, evaluándose diferentes porcentajes de dilución del extracto de la muestra, además de llevarse a cabo un calibrado en matriz, con el fin de compensar la influencia de la matriz en la ionización de los analitos en la fuente ESI. Se ha validado el método analítico a dos niveles de concentración, al nivel de LOQ y 10 veces el nivel de LOQ. Se ha estimado un LOD para ambos compuestos considerando la especificidad del método por LC-MS/MS.

Una vez desarrollado y validado el método analítico, se han analizado muestras reales de acelga correspondientes a estudios de campo, utilizando para ello QC's a dos niveles de concentración para el control de calidad. Tanto en la validación del método analítico como en el análisis de muestras reales, se ha trabajado bajo un sistema de calidad de BPLs, siguiendo la filosofía propuesta en las guías europeas (SANCO/825/00; SANCO/10476/2003).

1.3.2. Artículo científico 2:

Residue determination of cyromazine and its metabolite melamine in chard samples by ion-pair liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry.

J.V. Sancho, M. Ibañez, S. Grimalt, O.J. Pozo, F. Hernández

Analytica Chimica Acta **2005**, 530, 237-243

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Analytica Chimica Acta 530 (2005) 237–243

ANALYTICA
CHIMICA
ACTAwww.elsevier.com/locate/aca

Residue determination of cyromazine and its metabolite melamine in chard samples by ion-pair liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry

J.V. Sancho, M. Ibáñez, S. Grimalt, Ó.J. Pozo and F. Hernández

Analytical Chemistry, Experimental Sciences Department, University Jaume I, Avda Vicente Sos Baynat, s/n E-12071, Castellón, Spain

Received 22 June 2004; revised 15 September 2004; accepted 15 September 2004. Available online 8 December 2004.

Abstract

A method has been developed for the sensitive and selective determination of cyromazine and its metabolite melamine in chard samples. Both compounds are small polar basic molecules, making their determination at residue levels complicated. The method involves an extraction procedure with phosphate buffer and methanol using high-speed blender, the addition of tridecafluoroheptanoic acid (TFHA) as ion-pair reagent and the injection of the five-fold diluted extract on liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry (LC–ESI–MS/MS). The method has been validated for chard samples, spiked at 0.05 and 0.5 mg·kg⁻¹. Quantification was carried out by using matrix-matched standards calibration and recoveries were satisfactory, with mean values for cyromazine of 103% and 93%, and relative standard deviations lower than 7%. In the case of melamine, recoveries were 89% and 86%, with relative standard deviations lower than 13%. A limit of quantification of 0.05 mg·kg⁻¹ was obtained for both compounds, with the limit of detection below 0.01 mg·kg⁻¹. The method, with very little sample handling and good sensitivity, was applied to the rapid determination of low residue levels of these compounds in chards from field residue trials. All the quality controls included during the analysis were satisfactory with average recoveries of 92% and 78% for cyromazine and melamine, respectively.

Keywords: Cyromazine; Melamine; Pesticide residues; Vegetables; Liquid chromatography; Tandem mass spectrometry

1. Introduction

Cyromazine (*N*-cyclopropyl-1,3,5-triazine-2,4,6-triamine) is a triazine pesticide used for fly control in cattle manure, field crops, vegetables and fruits, by inhibiting insect growth. Cyromazine can be hydrolysed at extreme pH or photodegraded leading to the stable heterocyclic structure melamine (1,3,5-triazine-2,4,6-triamine). It can also be metabolized via dealkylation reactions in both plants and animals and undergoes environmental degradation to form melamine [1]. Melamine is also routinely used in the manufacture of plastics that are molded into tableware and cups and it can migrate from these house-hold items into food at higher temperatures and acidic pH [2].

Traditionally, triazines and their metabolites have been analysed in vegetable samples and food by gas chromatography (GC) mainly employing electron capture detection (ECD) and nitrogen–phosphorus detection (NPD), or by high-performance liquid chromatography (HPLC) with UV detection [3]. Usually, they are extracted from foods by mechanical shaking or homogenisation with organic solvents, like methanol or acetonitrile, often in mixture with water, dichloromethane or ethyl acetate, and sometimes at acidic pH. Clean-up of extracts is often required, mostly by column chromatography on Florisil, silica or alumina. The purification of extracts by cation-exchange columns or cartridges is sometimes used [3].

Although cyromazine is a triazine, its chemical properties (such as ionic behaviour) are quite different to those of triazines. As a consequence, few analytical methods for cyromazine and melamine have been reported. A laborious method by GC–NPD for Chinese cabbage was published fifteen years ago, which involved heat under reflux, a liquid partition and an ion-exchange SPE (SCX), in order to obtain a limit of detection (LOD) of $0.1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ [4]. More recently, a laborious and time-consuming method has been applied in soil. Samples were extracted twice via mechanical shaking, each time with acetonitrile:0.05 M ammonium carbonate 70:30 (v/v) for 30 min, and an aliquot was adjusted to $\text{pH} \leq 2$ and subjected to strong cation-exchange purification. Clean-up was necessary in order to obtain a limit of quantification (LOQ) of $0.01 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ by LC–UV detection. Confirmatory analyses were performed using GC–MS detection [2]. Using these techniques it was necessary to perform one or more clean-up steps to decrease interferences, as well as the preconcentration of extracts in order to obtain adequate detection levels. Moreover, the low sensitivity and selectivity of

conventional detectors does not favour residue level determination of cyromazine and melamine in complex matrices.

In recent years, the use of liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS) in pesticide residue analysis has experienced important growth [5], [6] and [7]. A few applications deal with the use of tandem mass spectrometry (MS/MS) in the target analysis of different pesticides in fruit and vegetables [8] and [9], even without the need of clean-up steps [10] and [11]. The inherent selectivity and sensitivity of this technique allows the determination of pesticides and their metabolites at the residue level reaching limits of quantification that satisfy regulatory levels. In the case of cyromazine, the European Union establishes a maximum residue level (MRL) of $0.05 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ in chard (*Beta vulgaris*) samples. Due to its classification as a non-carcinogen in humans, melamine is no longer included as a part of the tolerance for cyromazine residues [2].

Chromatographic separation of small polar basic compounds, like cyromazine and melamine, can be achieved by different retention mechanisms, mainly ion-exchange and ion-pair reversed-phase liquid chromatography (IP-RPLC). In general, the ion-exchange approach is not very suited to the electrospray interface (ESI) due to the use of buffers with high ionic strength, while ion-pair can provide satisfactory results, but depending heavily on the ion-pairing reagent characteristics, mainly the volatility. Commonly used reagents in IP-RPLC with conventional detectors have low volatility, and therefore they can destabilise the electrospray process and contaminate the interface, causing ion suppression. Some approaches have been described for polar basic compounds using IR-RPLC coupled to MS. Thus, Petritis *et al.* [12] and [13] tested several acidic and basic ion-pairing reagents into ES interface showing the suitability of some of them, such as pentafluoropropionic, heptafluorobutyric, nonafluoropentanoic and tridecafluoroheptanoic acids at low concentrations.

In this paper, we investigate the use of ion-pair LC for the adequate retention of cyromazine and melamine in a C_{18} chromatographic column previously to their MS/MS (ESI) determination. Then, the possibility of performing direct injection of chard extracts, chosen as a model sample, into the LC–ESI–MS/MS system is investigated with the aim of minimizing the sample pre-treatment, leading to the rapid determination of residues at the low $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ level.

2. Experimental

2.1. Reagents and chemicals

Cyromazine reference standard (96.5%) was purchased from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany) and melamine reference standard (99%) was kindly provided by Syngenta Agro SA. Tridecafluoroheptanoic acid (TFHA, 97%) was purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). LC-grade potassium dihydrogen phosphate (99.5%), *ortho*-phosphoric acid (85%) and reagent-grade formic acid (98–100%) were supplied by Scharlab (Barcelona, Spain). LC-grade acetonitrile and LC-grade methanol were also purchased from Scharlab (Barcelona, Spain). LC-grade water was obtained by purifying demineralised water in a Nanopure II system (Barnstead Newton, MA, USA).

Standard stock solutions of both analytes were prepared dissolving approximately 50 mg powder, accurately weighted, in 100 mL acetonitrile/water 1% formic acid (75:25) obtaining a final concentration of 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Mixture standard solutions were prepared in water by mixing and diluting the individual standard stock solutions.

Standard working solutions for LC–MS/MS analysis and for fortification of samples were prepared by dilution of the mixture solution with water.

TFHA was prepared dissolving 0.94 g powder in 10 mL of acetonitrile:water (50:50) obtaining a final concentration of 250 mM.

Phosphate buffer pH 2 was prepared by dissolving 3.4 g potassium dihydrogen phosphate powder and adding 2.7 mL of *ortho*-phosphoric acid, diluting with water to a final volume of 1000 mL.

2.2. Instrumentation

An LC system Waters Alliance 2795 (Waters, Milford, MA, USA) was interfaced to a triple quadrupole mass spectrometer. The LC separation was performed using a Discovery C₁₈ 5 μm , 50 mm \times 2 mm i.d. (Supelco, Bellefonte, PA, USA) at a flow rate of 300 $\mu\text{L}/\text{min}$. The mobile phase used was a water 0.5 mM TFHA/methanol gradient where the percentage of methanol was changed linearly as follows: 0 min, 5%; 3 min, 5%; 6 min, 50%; 7 min, 50%; 8 min, 95%; 12min, 5%.

A Quattro Micro API (quadrupole–hexapole–quadrupole) mass spectrometer with an orthogonal Z-spray-electrospray interface (Waters, Milford, MA, USA) was used. Drying gas as well as nebulising gas was nitrogen generated from pressurised air in a high purity nitrogen generator NM30LA 230Vac Gas

Station from Peak Scientific (Inchinnan, Scotland). The desolvation gas flow and cone gas flow were selected to 600 and 60 L/h, respectively. Infusion experiments were performed using the built-in syringe pump.

For operation in MS/MS mode, collision gas was argon 99.995% (Carbueros Metalicos, Valencia, Spain) with a pressure of 3×10^{-3} mbar in the collision cell. Capillary voltages of 3.5 kV were used in positive ionisation mode. The interface temperature was set to 350 °C and the source temperature to 120 °C. Dwell times of 0.5 s/scan were chosen. A solvent delay of 5.5 min was selected to give an additional clean-up using the built-in divert valve controlled by the Masslynx NT v.3.5 software. The application manager Quanlynx was used to process the quantitative data obtained from calibration standards and from chard samples.

A laboratory centrifuge Consul Orto-Alresa (Alvarez Redondo S.A., Madrid, Spain) was used to centrifuge the samples.

2.3. Sample procedure

Homogenised chard samples (20 g) were accurately weighed (precision 0.1 mg) and blended with 120 mL of phosphate buffer at pH 2 for 8 min. Then 30 mL of methanol were added, and blended again for 5 min more. Sample extracts were centrifuged at 3000 rpm for 15 min, filtered under vacuum, and adjusted to a final volume of 200 mL with methanol. Afterwards, the extract was diluted five-fold with LC-grade water, taking an aliquot of 5 mL and diluting to 25 mL, and filtered through a 0.45 μm syringe filter. Then, 50 μL of 250 mM TFHA solution were added to a 2 mL-vial that contained 1 mL of the five-fold diluted chard extract. Finally, 20 μL were injected in the LC–ESI–MS/MS.

Calibration was performed using matrix-matched standards prepared from a five-fold diluted blank chard extract.

Fortification of samples for recovery experiments was performed by delivering 1 mL of 1 or 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ mixture solutions to 20 g homogenised blank chard sample in order to yield fortification levels of 0.05 or 0.5 mg kg^{-1} , respectively. These fortified samples were equilibrated for 1 h prior to extraction.

2.4. Validation study

Linearity of the method was evaluated taking at least six standard solutions which were analysed in triplicate.

Precision (repeatability, expressed as relative standard deviation, in %) and recoveries were determined within-day by analysing fortified chard samples in quintuplicate. This experiment was performed at two spiking levels, 0.05 and 0.5 mg kg⁻¹.

The limit of quantification (LOQ) was established as the lowest concentration assayed, which gave satisfactory recovery (70–110%) and precision (<15% R.S.D.).

The specificity of the method was evaluated by analysing a blank procedure, a processed blank sample and a blank sample spiked at the LOQ level.

The limit of detection (LOD), defined as the lowest concentration for which a signal-to-noise ratio of three is obtained, was estimated from chromatograms of fortified samples at the lowest concentration assayed, i.e. 0.05 mg kg⁻¹.

3. Results and discussion

3.1. MS optimisation

The positive electrospray full-scan mass spectra and the MS/MS spectra of cyromazine and melamine are shown in Fig. 1. All spectra were obtained from infusion of 0.5 µg mL⁻¹ standard solution of each compound in acetonitrile:water (50:50, v:v) at a flow rate of 10 µL/min. As can be seen in Fig. 1a, the positive electrospray full scan spectrum of cyromazine at a cone of 40 V (bottom) shows a peak at m/z 167.1 corresponding to the $[M + H]^+$ ion for cyromazine. The MS/MS spectrum at 18 eV (top) shows an important fragment at m/z 84.8, due to the loss of H₂NCN and the cyclopropyl group. On the other hand, the positive electrospray full scan spectrum of melamine (Fig. 1b), at a cone of 40 V, shows a peak at m/z 127.0 corresponding to the protonated molecule $[M + H]^+$. The MS/MS spectrum (collision energy of 18 eV) shows the same fragment at m/z 84.8, due to the loss of H₂NCN. The selected reaction monitoring (SRM) transitions chosen were 167.1 > 84.8 and 127.0 > 84.8 for cyromazine and melamine respectively, both of them optimised at a cone of 40 V and a collision energy of 18 eV. As MS/MS spectra show, other additional transitions could be selected for confirmatory purposes, if necessary.

3.2. Method optimisation

Cyromazine and melamine are highly polar basic compounds, being normally difficult to obtain enough retention in a C₁₈ column to separate analytes

from salts and polar matrix components, which could interfere by decreasing the MS analyte response [14]. In order to improve retention for cyromazine and melamine in a C₁₈ column, ion-pair reagents could be used. The use of non-volatile substances is not recommended because non-volatile ion-pair reagents destabilize the electrospray process and contaminate the interface, causing ion suppression [15]. Therefore volatile ion-pair reagents have to be used. Thus, the presence of different perfluorinated carboxylic acids [16] in the mobile phase was tested in order to have enough retention time for polar amino analytes. The acidic properties of these ion-pair reagents would reduce the peak tailing, obtaining good peak shape [17]. However, in some cases, the addition of the modifier into the mobile phase was unsatisfactory, producing ion suppression. This occurrence had already been observed in the determination of fosetyl-Al in vegetables [10], where the ion-pair reagent was added only into the vial containing the final solution to be injected into the LC–MS/MS system.

In the present paper, the use of 0.5 mM TFHA in the mobile phase allowed satisfactory chromatographic behaviour of the analytes and the ionisation of cyromazine and melamine in the electrospray source (positive mode) was favoured by the presence of small amounts of acidic modifier (as TFHA) due to the basic character of these analytes. Although the amount of modifier added in mobile phase (0.5 mM) was enough for standard solutions, it was insufficient for a good shape peak in the samples. So, the effect of adding TFHA to the vial on both, analyte response and retention time, was studied. The addition of THFA to the vial seemed to be necessary in order to obtain satisfactory chromatographic behaviour in the analysis of chard samples. The optimum concentration that yielded the best signal with enough retention time and good peak shape was set up at 10 mM. The final approach was to add TFHA to both the vial (10 mM) and the mobile phase (0.5 mM) in order to ensure the ion-pair formation TFHA-cyromazine and TFHA-melamine avoiding other competitive processes that could occur with matrix coextracted compounds.

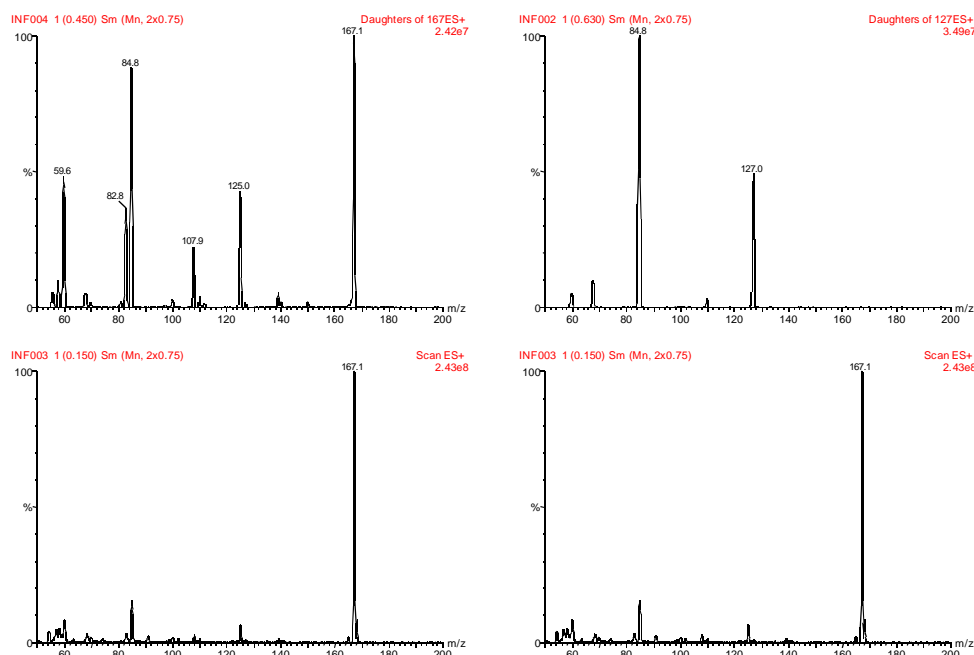


Fig. 1. The positive ion electrospray full scan mass spectrum (bottom) and product ion spectra (top) of (a) cyromazine and (b) melamine, acquired by infusion of $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ standard solution.

Although cyromazine and melamine are both polar organic compounds, quite soluble in water, the extraction was performed with an acidic solvent in order to promote their protonation, increasing in this way the extraction efficiency. In this work, 120 mL of phosphate buffer at pH 2 followed by 30 mL of methanol were used, based on the extraction procedure supplied by the manufacturer.

As regards sample analysis, low recoveries were obtained using external calibration with aqueous standards, as a result of ionisation suppression by the co-extracted components of the matrix. To reduce this matrix effect by injecting cleaner extracts, different dilutions of the raw chard extract with LC grade water were tested, trying to achieve similar signal response between diluted extracts and aqueous standards. The results (see Table 1) showed that minimising the signal inhibition by the matrix components, required at least a 10-fold dilution of the sample extract leading to an important loss of sensitivity. A five-fold dilution was selected as a compromise between sensitivity and cleanness of the extract, and matrix-matched external standard calibration using blank diluted chard extracts was applied to compensate the matrix effects.

Table 1. Recoveries and MS/MS response after different dilution experiments for a chard extract fortified at the $0.25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ level

Dilution factor	Cyromazine		Melamine	
	Response	Recovery (%) ^a	Response	Recovery (%) ^a
–	1035	31	552	28
2	742	62	310	33
5	464	73	226	64
10	261	94	175	95

^a Calculated using aqueous external standards.

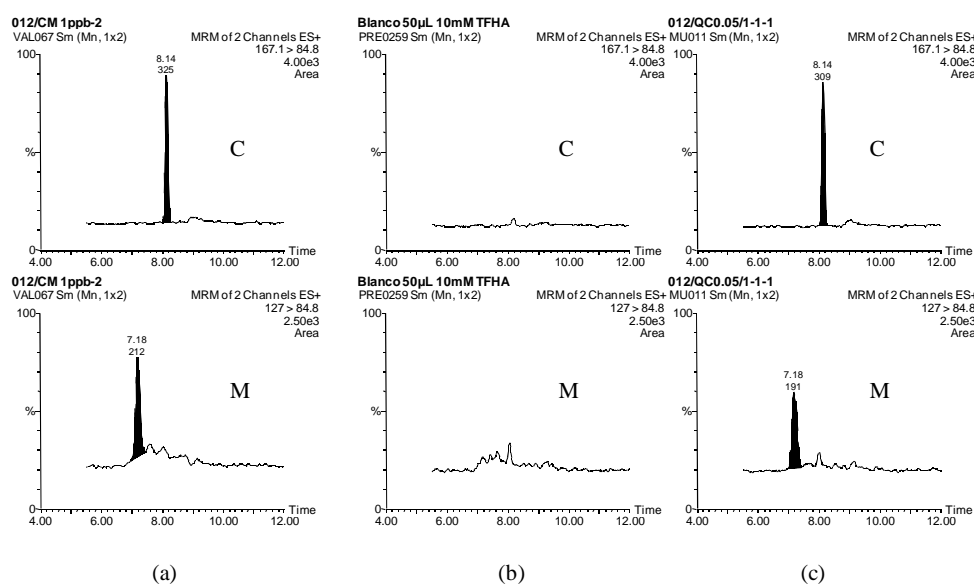
3.3. Method validation

The optimised method described above was validated before its application to real-world samples. Quadratic and linear calibration curves were obtained for cyromazine and melamine, respectively, in the range $0.5\text{--}100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, obtaining a correlation coefficient (r) of 0.9998 in both cases. Precision and accuracy (expressed as recovery) are reported in Table 2. The method was found to be precise (R.S.D. < 13%) and accurate, for both compounds at the two concentration levels assayed, with satisfactory recoveries (86–103%). Consequently, the limit of quantification (LOQ) was set at the lowest concentration level satisfactorily validated, i.e. $0.05 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ for both cyromazine and melamine. The limits of detection (LOD) were estimated to be 0.0025 and $0.01 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ for cyromazine and melamine, respectively. However, in spite of the satisfactory recoveries and precision obtained it would not be recommendable to quantify samples below $0.1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ for melamine, as the specificity test was not satisfactory for a LOQ of $0.05 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (blank sample gave a signal slightly higher than 30% of LOQ signal). This was due to the presence of a small peak sharing the same transition as melamine in the blank samples. This peak could possibly be due to contamination derived from the material used during sample storage and processing, as even the procedure blank presented this small peak, assigned to melamine. Then, it would not be a problem of specificity but a problem of contamination from materials used in the laboratory. All attempts to solve this problem were not satisfactory. This situation had already been reported in the case of soil analysis [2].

Table 2. Validation of the developed LC–MS/MS procedure for the determination of cyromazine and melamine residues in chard samples ($n = 5$)

	$0.05 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$		$0.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	
	Recovery (%)	R.S.D. (%)	Recovery (%)	R.S.D. (%)
Cyromazine	103	6	93	7
Melamine	89	13	86	4

Typical LC–MS/MS chromatograms for standard solutions and chard samples (blank and spiked at the lowest level assayed) are shown in Fig. 2. The chromatograms were obtained after direct injection of the five-fold diluted extracts. The total chromatographic run time was around 12 min.

**Fig. 2.** SRM chromatograms of (a) matrix matched standard of $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, (b) blank chard sample and (c) blank chard sample spiked at $0.05 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. C: cyromazine, M: melamine.

3.4. Application to field treated samples

The optimised procedure was applied to the analysis of approximately 20 samples from field residue trials. With each batch of samples analysed, a calibration curve at concentrations between 0.5 and $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ was injected before and after the sample extracts. In addition, two quality control (QC) samples were injected in every batch of samples. QC consisted of untreated (blank) chard samples fortified at the LOQ and $10\times$ LOQ concentration levels. In all cases, the individual QC recoveries were satisfactory (between 72% and 106%), showing the

robustness of the procedure. This allowed us to estimate the reproducibility of the method by using the QC recovery values obtained in the analysis of samples for approximately one month. The results obtained were satisfactory for both cyromazine (92% of average recovery and 10% of R.S.D.) and melamine (78% of average recovery and 8% of R.S.D.). All samples and standards were injected in duplicate.

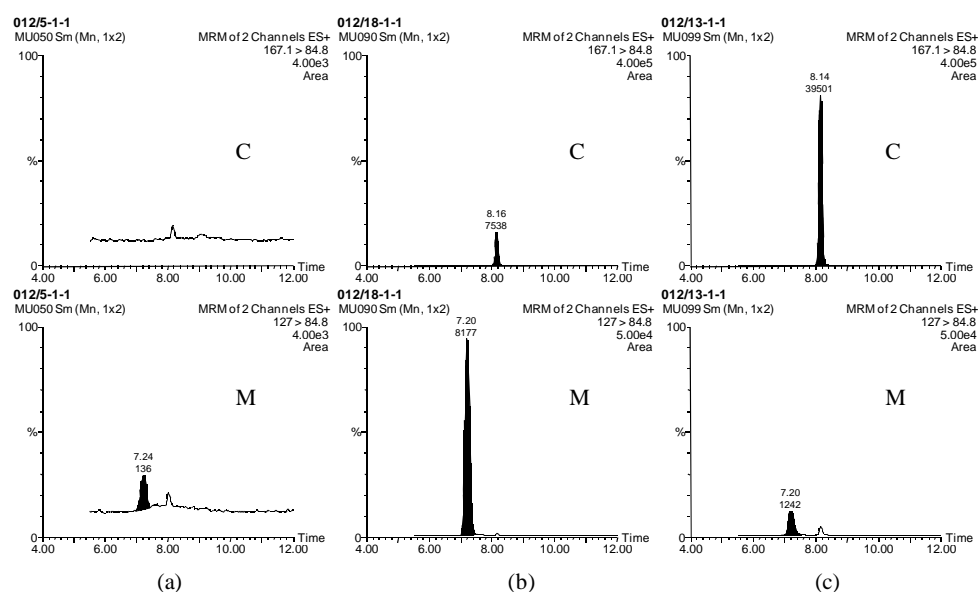


Fig. 3. SRM chromatograms of field chard samples (a) untreated (b) treated with cyromazine and collected just after application ($0.37 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ of melamine and $7.17 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ of cyromazine) and (c) treated with cyromazine and collected 21 days after application ($2.76 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ of melamine and $1.16 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ of cyromazine). C: cyromazine, M: melamine.

Fig. 3 shows typical chromatograms for one untreated sample and two samples treated with cyromazine and collected just after application and 21 days later. It can be seen that the amount of cyromazine in the treated sample decreased after 21 days while the amount of melamine increased, showing the cyromazine degradation in this crop gives melamine as the main metabolite product.

4. Conclusion

This paper has demonstrated that LC–ESI–MS/MS is a sensitive and selective technique for the determination of cyromazine and melamine residues in chard samples at low $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ level. As both analytes are found as cationic

species in aqueous solutions, the addition of an ion-pair reagent, as TFHA, is required for their adequate retention on reverse-phase liquid chromatography. The method developed allows short chromatographic run time (around 12 min) and fast and simple sample pre-treatment compared with previous methods available in the literature. The raw sample extracts were simply diluted five-fold with water, as a compromise between cleaner sample injection and sensitivity, and matrix-matched standards calibration was used to obtain satisfactory quantification. The developed procedure has been successfully applied to field treated samples, demonstrating good sensitivity and robustness.

Acknowledgements

The authors are very grateful to Syngenta S.A. (Madrid, Spain) for financial support and providing chard samples and melamine standard. The Quattro Micro LC–MS was founded by the European Union (Fondos Feder-Reino de España, Ministerio de Ciencia y Tecnología, Ref.: UNJM-E004).

References

- [1] A.M. Cook and R.S. Hutter, *J. Agric. Food Chem.* **29** (1981), p. 1135.
 - [2] R.A. Yokley, L.C. Mayer, R. Rezaaiyan, M.E. Menuli and M.W. Cheung, *J. Agric. Food Chem.* **48** (2000), p. 3352.
 - [3] J.L. Tadeo, C. Sánchez-Brunete, R.A. Pérez and M.D. Fernández, *J. Chromatogr. A* **882** (2000), p. 175.
 - [4] P.C. Bardalaye, W.B. Wheeler and C.W. Meister, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **70** (1987), p. 455.
 - [5] S. Barrek, O. Paisse and M.F. Grenier-Loustalot, *Anal. Bioanal. Chem.* **376** (2003), p. 157.
 - [6] S. Barrek, O. Paisse and M.F. Grenier-Loustalot, *Anal. Bioanal. Chem.* **376** (2003), p. 355.
 - [7] Y. Pico, G. Font, J.C. Molto and J. Manes, *J. Chromatogr. A* **882** (2000), p. 153.
 - [8] C. Jansson, T. Pihlström, B.-G. Österdahl and K-E. Markides, *J. Chromatogr. A* **1023** (2004), p. 93.
 - [9] J. Klein and L. Alder, *J. AOAC Int.* **86** (2003), p. 1015.
 - [10] J.V. Sancho, O.J. Pozo, T. Zamora, S. Grimalt and F. Hernández, *J. Agric. Food Chem.* **51** (2003), p. 4202.
 - [11] F. Hernandez, J.V. Sancho, O.J. Pozo, C. Villaplana, M. Ibáñez and S. Grimalt, *J. AOAC Int.* **86** (2003), p. 832.
-

-
- [12] K. Petritis, H. Dessana, C. Elfakir and M. Dreux, *LC–GC* **15** (2002), p. 98.
- [13] K. Petritis, S. Brussaux, S. Guenu, C. Elfakir and M. Dreux, *J. Chromatogr. A* **957** (2002), p. 173.
- [14] F. Hernandez, J.V. Sancho and O.J. Pozo, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **16** (2002), p. 1766.
- [15] R.B. Geerdink, W.M.A. Niessen and U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* **970** (2002), p. 65
- [16] S.A. Gustavsson, J. Samskog, K.E. Markides and B. Långström, *J. Chromatogr. A* **937** (2001), p. 41.
- [17] T. Reemtsma, *J. Chromatogr. A* **1000** (2003), p. 477.
-

1.3.3. Discusión de los resultados

- *Optimización del método de extracción*

El desarrollo del método de determinación simultánea de ciromazina y melamina por LC-MS/MS presentó una especial problemática debida a la alta polaridad y basicidad de estos compuestos, así como su pequeño tamaño molecular. Debido a estas características se prestó una especial atención a la optimización, tanto del método de extracción como de determinación por LC-MS/MS. Gracias a la alta solubilidad de la ciromazina y melamina en disolventes próticos (13 g/L en H₂O y 22 g/L en CH₃OH at 25°C), la extracción de las muestras vegetales resultó ser adecuada mediante un tampón ácido fosfórico/dihidrogenofosfato potásico (H₃PO₄/H₂PO₄⁻ pH ≈ 2), seguida de una adición de CH₃OH hasta el 35% del volumen de extracción (200 mL). El medio ácido permite la protonación de los grupos amino produciendo un aumento de la eficiencia de la extracción con respecto a medios a pH neutro.

- *Optimización de la Cromatografía Líquida*

Por otro lado, se realizó una optimización del método de separación de cromatografía líquida en RPLC (C₁₈) siguiendo como estrategia el uso de pares iónicos, debido a que ambas aminas primarias se encontraban en forma protonada a consecuencia del medio ácido en la extracción (pH 2). Se probaron diferentes ácidos carboxílicos perfluorados en la fase móvil como reactivos formadores de pares iónicos (Petritis *et al.*, 2002b), seleccionándose como el más adecuado el TFHA. El TFHA formaba pares iónicos con la ciromazina y la melamina, aumentando la retención en la fase reversa, al mismo tiempo que mejoraba la forma de pico. Se estudió la adición del reactivo tanto en la fase móvil como directamente en el vial de inyección de LC-MS/MS. En la adición de THFA en la fase móvil se ensayaron diferentes concentraciones (desde 0.1 a 2 mM) para llegar a un compromiso entre el aumento del tiempo de retención y la mejora de la forma de pico, frente al efecto matriz producido por el propio modificador, llegándose a un valor de 0.5 mM de THFA en la fase acuosa como el más adecuado. Después de esta primera aproximación con disoluciones patrón, se observó que la cantidad de THFA en extractos vegetales no era suficiente para obtener una buena forma de pico, siendo necesaria la adición de THFA además en el vial. De forma ilustrativa, en la **Figura 1.1** se observa cómo la ciromazina no presenta problemas de forma de pico, mientras que la melamina sí muestra un pico partido cuando no se añadió THFA en el vial. También se observa que la adición de concentraciones más elevadas de THFA en el vial no se traducen en una diferencia significativa de sensibilidad, por lo que se decidió trabajar a una

concentración de 10 mM en vial, considerando que sería suficiente para obtener una buena forma de pico en todos los tipos de extractos.

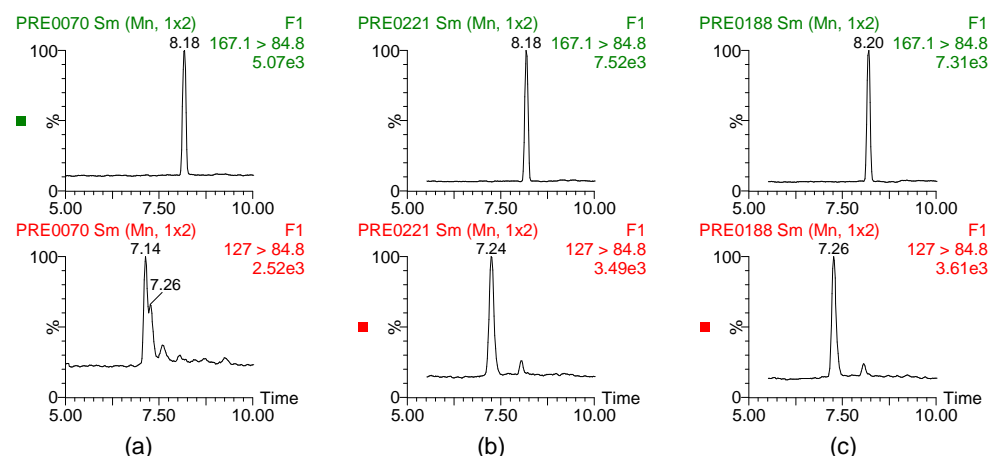


Figura 1.1. Cromatogramas LC-MS/MS correspondientes a muestras fortificadas con ciromazina (parte superior) y melamina (parte inferior) a nivel de 0.05 mg/kg en las que se han añadido diferentes concentraciones de THFA en el vial: (a) sin adición de THFA, (b) 7 mM de THFA y (c) 10 mM de THFA.

- *Estudio del Efecto Matriz*

Una vez optimizada la extracción de la muestra y el método de medida por LC-MS/MS, seleccionando como transiciones de cuantificación 167>85 y 127>85 para la ciromazina y la melamina, respectivamente, se estudió el efecto de la matriz del extracto de acelga en la ionización de los analitos comprobándose que se producía una supresión de la señal para ambos compuestos. Con el objetivo de disminuir el efecto matriz y poder trabajar con calibración externa, ya que no se disponía de patrón interno marcado, se probaron diferentes diluciones del extracto de muestra (diluciones por 2, por 5 y por 10). Conforme se producía un aumento de la dilución el comportamiento de los analitos en el extracto se asemejaba más al del patrón, permitiendo una cuantificación correcta con patrones en solvente. Sin embargo, un aumento excesivo de la dilución iba en detrimento de la sensibilidad, como se muestra en los resultados de la *Tabla 1 del artículo científico 2*. En la dilución por 10 era posible una cuantificación correcta con patrones en solvente; sin embargo, la disminución de la respuesta no permitía alcanzar los LOQs deseados. Así que, finalmente, se seleccionó como compromiso entre la disminución de la sensibilidad y el efecto matriz una dilución por 5, realizándose un calibrado externo en matriz blanco para igualar el efecto de matriz entre muestras y patrones.

- *Validación del método analítico*

Se obtuvo una respuesta lineal adecuada en el rango de 0.5 a 100 ng/mL, con coeficiente de correlación por encima de 0.999 para ambos analitos. La validación se llevó a cabo para ambos analitos a los niveles de fortificación de 0.05 y 0.5 mg/kg, obteniéndose recuperaciones satisfactorias, entre el 86% y 103% (*Tabla 2 del artículo científico 2*), con una precisión por debajo del 13% de RSD. Además, se estimaron los LODs en 0.0025 y 0.01 mg/kg para ciromazina y melamina, respectivamente.

A pesar de que la melamina presentó un LOD de 0.01 mg/kg y se obtuvo buena precisión y recuperación para el LOQ de 0.05 mg/kg, no se recomendaba la cuantificación por debajo de 0.1 mg/kg para las muestras estudiadas, debido a que en el ensayo de especificidad (inyección de una muestra blanco y otra fortificada al nivel de 0.05 mg/kg) se obtuvo una señal ligeramente por encima del 30%. Este ensayo se repitió con sumo cuidado, considerando todas las posibles fuentes de contaminación de la melamina, pero no fue posible eliminar el pico residual en ninguna de las muestras blanco. Probablemente el pico de melamina derivase de una contaminación por los materiales utilizados en el proceso de almacenamiento y/o tratamiento de la muestra, ya que la melamina es un compuesto que puede proceder de las síntesis poliméricas y se encuentra en gran cantidad de materiales de uso común, como plásticos (Fredenhagen, 2004).

- *Aplicación del método analítico a muestras*

Una vez validado el método analítico, se aplicó a 20 muestras reales de acelgas, procedentes de ensayos de campo. Para asegurar la calidad de los análisis se inyectaron junto con las muestras dos QCs, a nivel de 0.05 y 0.5 mg/kg, en cada una de las secuencias. Las recuperaciones de los QCs fueron satisfactorias en todas las secuencias inyectadas, obteniéndose valores medios de 98% (RSD 10%) y 78% (RSD 8%) para ciromazina y melamina, respectivamente. La aplicación del método analítico a las muestras reales permitió comprobar su robustez y buena reproducibilidad.

Se realizaron dos estudios de campo con aplicación del formulado cosechando a 21 días, además de dos estudios de curvas de disipación hasta 21 días (cosechando a 0, 3, 7, 14 y 21 días). Según se puede observar en las curvas del gráfico de la **Figura 1.2**, los niveles de ciromazina en acelga van disminuyendo paulatinamente durante los 21 días hasta llegar a un valor del 20% con respecto al momento de aplicación (tiempo cero, donde se toma la muestra a las pocas horas de haber realizado la aplicación); sin embargo, la melamina parece estar presente

a una concentración constante durante todo el ensayo, sufriendo un ligero aumento a los 21 días.

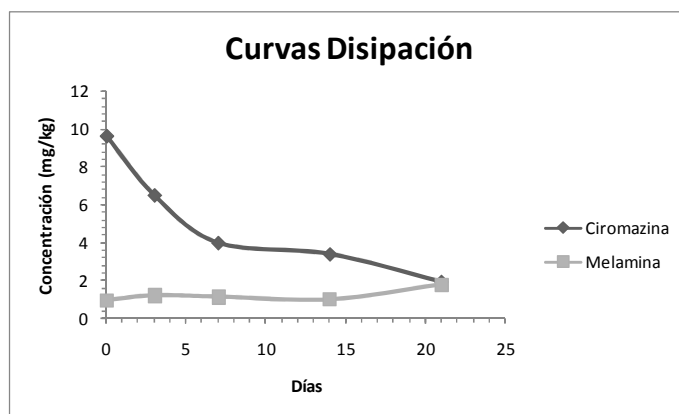


Figura 1.2. Valores medios de concentración de ciromazina y melamina obtenidos en los ensayos de curvas de disipación en muestras de acelga. Se llevó a cabo la recogida de acelga a los tiempos 0, 3, 7, 14 y 21 días.

Se puede concluir que se ha desarrollado un método analítico por LC-ESI-MS/MS sensible, selectivo y robusto para la determinación conjunta de ciromazina y melamina, consiguiendo la simplificación en el tratamiento de muestra mediante una extracción en medio ácido al estar los analitos en forma catiónica. Cabe destacar que el uso de pares iónicos ha conducido a resultados satisfactorios para estos analitos, presentes en forma iónica, llevando a cabo la separación cromatográfica por RPLC.

1.3.4. Referencias bibliográficas

- Aramedía, M.A.; Borau, V.; Lafont, F.; Marinas, A.; Marinas, J.M.; Moreno, J.M.; Porras, J.M.; Urbano, F.J. (2006) *Determination of diquat and paraquat in olive oil by ion-pair liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (MRM)* Food Chem. 97, 181-188
- Barceló, D.; Durnad, G.; Vreeken, R.J.; De Jong, G.J.; Lingeman, H.; Brinkman Th., U.A. (1991) *Evaluation of eluents in thermospray liquid chromatography-mass spectrometry for identification and determination of pesticides in environmental samples* J. Chromatogr. 553, 311-328
- Bardalaye, P.C., Wheeler, W.B.; Meister, C.W. (1987) *Gas-chromatographic determination of cyromazine and its degradation product, melamine, in Chinese cabbage* J. Assoc. Off. Anal. Chem. 70, 455-457
- Bel, Y.; Wiesner, P.; Kayser, H. (2000) *Candidate Target Mechanisms of the growth inhibitor cyromazine: studies of phenylalanine hydroxylase, puparial amino acids, and dihydrofolate reductase in dipteran insects* Arch. Insect Biochem. Physiol. 45, 69-78
- Cabras, P.; Meloni, M.; Spanelda, L. (1990) *High-performance liquid-chromatographic separation of cyromazine and its metabolite melamine* J Chromatogr. 505, 413-416
- Calbiani, F.; Careri, M.; Elviri, L.; Mangia, A.; Zagnoni, I. (2007) *Validation of an ion-pair liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry method for the determination of heterocyclic aromatic amines in meat-based infant foods* Food Addit. Contam. 24, 833-841
- Castro, R.; Moyano, E.; Galceran, M.T. (2001a) *Determination of quaternary ammonium pesticides by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry* J. Chromatogr. A 914, 111-121
- Castro, R.; Moyano, E.; Galceran, M.T. (2001b) *Determination of chlormequat in fruit samples by liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry/mass spectrometry* J. AOAC Int. 84, 1903-1908
- Chou, S.-S.; Hwang, D.-F.; Lee, H.-F. (2003) *High performance liquid chromatographic determination of cyromazine and its derivative melamine in poultry meats and eggs* J. Food Drug Anal. 11, 290-295
-

- Cook, A.M.; Hütter, R.S. (1981) *s-Triazines and nitrogen sources for bacteria* J. Agric. Food Chem. 29, 1135-1143
- Dean, J.R.; Wade, G.; Barnabas, I.J. (1996) *Determination of triazine herbicides in environmental samples* J. Chromatogr. A 733, 295-335
- European Commission, Directorate General Health and Consumer Protection, Residues: Guidance document on residue analytical methods. Document SANCO/825/00 rev. 6 of June 2000
- European Commission, Directorate General Health and Consumer Protection, Quality Control Procedures for pesticide residues analysis. Document SANCO/10476/2003 of February 2004
- King, R.; Bonfiglio, R.; Fernández-Metzler, C.; Miller-Stein, C.; Olah, T. (2000) *Mechanistic investigation of Ionization Suppression in Electrospray Ionization* J. Am. Soc. Mass Spectrom. 11, 942-950
- Forngren, B.H.; Smaskog, J.; Gustavsson, S.Å.; Tyrefors, N.; Markides, K.E.; Långström, B. (1999) *Reversed-phase ion-pair chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry by on-line removal of the counter-ions* J. Chromatogr. A 854, 155-162
- Fredenhagen, A. (2004) *Radiochemical analysis of the polar agrochemicals validamycin and the metabolite melamine by ion-exchange chromatography* J. Radioanal. Nucl. Chem. 261, 249-253
- Gardner, M.S.; Voyksner, R.D.; Haney, C.A. (2000) *Analysis of pesticides by LC-electrospray-MS with postcolumn removal of nonvolatile buffers* Anal. Chem. 72, 4659-4666
- Gustavsson, S.A.; Samskog, J.; Markides, K.E.; Långström, B. (2001) *Studies of signal suppression in liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry using volatile ion-pairing reagents* J. Chromatogr. A 937, 41-47
- Hernández-Borges, J.; Cifuentes, A.; García-Montelongo, F.J.; Rodríguez-Delgado, M.A. (2005) *Combining solid-phase microextracion and on-line preconcentration-capillary electrophoresis for sensitive analysis of pesticides in foods* Electrophoresis 26, 980-989
- Hernández, F.; Sancho, J.V.; Pozo, O.J.; Villaplana, C.; Ibañez, M.; Grimalt, S. (2003) *Rapid determination of fosetyl-aluminum residues in lettuce by liquid*
-

chromatography/electrospray tandem mass spectrometry J AOAC Int. 86, 832-838

Mol, G.J.H.; Rooseboom, A.; van Dam, R.; Roding, M.; Arondeus, K.; Sunarto, S. (2007) *Modification and re-validation of the ethyl acetate-based multi-residue method for pesticides in produce* Anal. Bional. Chem. 389, 1715-1754

Petritis, K.; Brussaux, S.; Guenu, S.; Elfakir, C.; Dreux, M. (2002a) *Ion-pair reversed-phase liquid chromatography-electrospray mass spectrometry for the analysis of underivatized small peptides* J Chromatogr. A 957, 173-185

Petritis, K.; Dessans, H.; Elfakir, C.; Dreux, M. (2002b) *Volatility evaluation of mobile-phase/electrolyte additives for mass spectrometry* LC-GC Eur. 15, 98-102

Tadeo, J.L.; Sánchez-Brunete, C.; Pérez, R.A.; Fernández, M.D. (2000) *Analysis of herbicide residues in cereals, fruits and vegetables* J. Chromatogr. A 882, 175-191

Tak, V.; Kanaujia, P.K.; Pardasani, D.; Kumar, R.; Srivastava, R.K.; Gupta, A.K.; Dubey, D.K. (2007) *Application of Doehlert design in optimizing the determination of degraded products of nerve agents by ion-pair liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry* J Chromatogr. A 1161, 198-206

Toth, J.P.; bardalaye, P.C. (1987) *Capillary gas-chromatographic separation and mass-spectrometric detection of cyromazine and its metabolite melamine* J. Chromatogr. 408, 335-340

Yokley, R.A.; Mayer, L.C.; Rezaaiyan, R.; Manuli, M.E.; Cheung, M.W. (2000) *Analytical method for the determination of cyromazine and melamine residues in soil using LC-UV and GC-MSD* J. Agric. Food Chem. 48, 3352-3358

1.4. Plaguicidas de carácter iónico: Fosetil-aluminio como caso de estudio.

1.4.1. Introducción

Durante los últimos 30 años, se ha extendido el uso de las sales de ácido fosfórico y potasio, así como los éteres de etil-fosfonatos de aluminio para proteger a los cultivos de los hongos *Phytophthora sp.*. En concreto el fosetil-aluminio es un fungicida clasificado dentro de la familia de los organofosforados como fosfonato. Este, presenta la peculiaridad de encontrarse en forma iónica, de pequeño tamaño molecular, que le permite formar la sal con aluminio, con una relación 3:1 fosetil:aluminio. Los plaguicidas organofosforados en muestras de alimentos han sido tradicionalmente analizados por GC acoplado a NPD y ECD (Juhler *et al.* 1997; Kumari *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2008) y MS (Lambropoulou *et al.*, 2003; Rissato *et al.*, 2007). Muchos de ellos también han sido incluidos en métodos de análisis por LC acoplado a MS (Mol *et al.*, 2003; Blasco *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005). Sin embargo, dentro del grupo de los fungicidas organofosforados, tanto el fosetil-Al como el ampropilfos, que comparte esta peculiaridad de carácter aniónico, no están incluidos en los MMR anteriormente citados. En este sentido, resulta de gran interés el desarrollo de un método individual para el organofosforado fosetil-Al, compuesto que entraña una gran dificultad analítica, como se desprende de la bibliografía especializada.

La correcta separación cromatográfica mediante RPLC representa un reto para el fosetil-Al, al ser una molécula iónica de bajo peso molecular. Además, no presenta absorción en UV-Vis ni propiedades fluorescentes, por lo que en general, se ha utilizado GC acoplada a detector de nitrógeno-fósforo (Pelegrí *et al.*, 1993) o fotométrico de llama (Pelegrí *et al.*, 1993; Malusà *et al.*, 2005). En la determinación de fosetil por GC se presentan dos inconvenientes serios: el primero es la dificultad de una correcta extracción y *clean-up* para conseguir una mayor discriminación del fosetil con respecto a otros componentes de la matriz, impidiendo la correcta determinación debido a las interferencias y a los efectos de la matriz; en segundo lugar, es necesaria una derivatización previa del fosetil, como la diazotación con dizametano (Pelegrí *et al.*, 1993; Malusà *et al.*, 2005). Por otro lado, debido a una mayor compatibilidad, se ha tendido a utilizar la técnica separativa LC de intercambio iónico (High-Performance Ion Chromatography, HPIC) acoplada a un detector de conductividad (Ouimette *et al.*, 1988 y 1989; Fenn *et al.*, 1988; CIPAC, 1995); o bien, acoplada a una técnica más reciente como es la MS/MS, mediante una interfase de APCI (Poustka *et al.*, 2003). Como alternativa a la HPIC, se ha hecho uso de microcolumnas de cromatografía líquida y electroforesis capilar (CE) acopladas a un detector fotométrico de llama (Hooijschuur *et al.*, 2001). Como es conocido, el uso de detectores de menor especificidad como el detector de conductividad (Ouimette *et al.*, 1988 y 1989;

Fenn *et al.*, 1988; CIPAC, 1995) conlleva que otros compuestos cargados no separados en el tratamiento previo de muestra o en la cromatografía puedan ser medidos como fosetyl. Además, la sensibilidad es insuficiente para ser utilizado en análisis de residuos. Otra opción ha sido la determinación indirecta de fosetil mediante el Al por espectroscopía de absorción atómica con llama (Giordano *et al.*, 1995). Sin embargo, este método no es fiable, pues las muestras podrían contener Al procedente de otras fuentes distintas al fosetil-Al.

Aunque HPIC es una buena técnica de separación para el fosetil, su acoplamiento a MS presenta ciertos problemas de compatibilidad con la interfase por el uso de sales no volátiles, lo que queda patente en el trabajo de Poustka *et al.* (2003), donde sólo pudo llegarse a un LOD de 1 mg/kg en muestras de lúpulo seco. En este sentido, el uso de pares iónicos en RPLC en el acoplamiento de MS/MS se presenta como una buena alternativa.

La estrategia de los pares iónicos ha sido utilizada en otros alquilfosfatos (Black *et al.*, 1998; Lamouroux *et al.*, 2000; Hernández *et al.*, 2002; Cordell *et al.*, 2008) y en alquilfosfonatos (Nowack *et al.*, 1997), usando como pares iónicos el tetrabutilamonio (TBA) y dimetilhexilamina (DMHA). En general, la formación de pares iónicos en RPLC se ha conseguido gracias a compuestos amoniados como TBA, trietilamina (TEA), tributilamina (TrBA) y DMHA. De todos ellos, los más habitualmente usados son TBA (Escott *et al.*, 1991; Abidi *et al.*, 1996; Socher *et al.*, 2001) y TEA en medio ácido (Abidi *et al.*, 1996; Balinova, 1996; Alonso *et al.*, 1999; Petrović *et al.*, 2000; Fox *et al.*, 2005). En general, los trabajos encontrados añaden una concentración de modificador en fase móvil entre 5 y 10 mM, incluso en algunos casos se llega a concentraciones de 30 mM (Socher *et al.*, 2001), siendo necesario el uso de post-columnas de intercambio iónico para evitar una cantidad alta de sales en la interfase de electrospray. El uso de reactivos en la fase móvil tiene dos efectos contrarios: por un lado, son beneficiosos para mejorar la cromatografía y la ionización de los analitos en la fuente de ionización; y por otro lado, en concentraciones altas generan supresión de la ionización, especialmente en la fuente ESI, disminuyendo la sensibilidad (Apfelthaler *et al.*, 2008). En el caso de los pares iónicos en RPLC, su presencia es imprescindible para la retención del analito iónico en la fase estacionaria. El modificador en la fase móvil también es necesario, en algunas ocasiones, para obtener una ionización reproducible y robusta del compuesto protonado $[M+H]^+$, desprotonado $[M-H]^-$ o del aducto formado. Una alternativa en la formación de pares iónicos sería la adición del reactivo formador en el vial, de forma que si el par iónico se formase con una interacción suficientemente intensa, se podría cromatografiar correctamente sin afectar negativamente a la ionización, al no haberlo añadido en la fase móvil.

En el trabajo que se expone a continuación, se lleva a cabo la determinación del fungicida fosetil-Al en muestras de lechuga mediante la formación de pares iónicos con TBA en RPLC acoplado a MS/MS. En primer lugar, se ha optimizado un método de extracción sencillo para la separación del fosetil en forma iónica. En segundo lugar, se estudia la concentración y modo de adición, en el vial o en la fase móvil, del reactivo formador de pares iónicos para obtener una correcta retención y forma de pico en RPLC, tanto en patrones como en muestras. El método analítico ha sido validado siguiendo las recomendaciones de las guías europeas (SANCO/825/00), analizando 5 réplicas al nivel del LOQ objetivo y de 10 veces el LOQ para el estudio de la exactitud y la precisión del método. Así mismo, se ha estimado el valor del LOD. La cuantificación en las muestras se ha realizado mediante patrón interno, además del calibrado en matriz; también se ha estudiado el efecto de la dilución de la matriz cruda sobre el efecto matriz. Finalmente, se ha aplicado el método analítico validado a muestras de lechuga haciendo uso de dos QCs en cada una de las secuencias inyectadas en el sistema LC-MS/MS.

1.4.2. Artículo Científico 3:

Rapid Determination of Fosetyl-Aluminum Residues in Lettuce by Liquid Chromatography/Electrospray Tandem Mass Spectrometry.

F.Hernández, J.V. Sancho, O.J. Pozo, C. Villaplana, M. Ibañez, S. Grimalt

Journal of AOAC International **2003**, 86, 832-838

HERNÁNDEZ ET AL.: JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL VOL. 86, NO. 4, 2003

RESIDUES AND TRACE ELEMENTS

Rapid Determination of Fosetyl-Aluminum Residues in Lettuce by Liquid Chromatography/Electrospray Tandem Mass Spectrometry

FÉLIX HERNÁNDEZ, JUAN V. SANCHO, ÓSCAR J. POZO, CARMÉ VILLAPLANA, MARÍA IBÁÑEZ, and SUSANA GRIMALT

University Jaume I, Experimental Sciences Department, Analytical Chemistry, E-12071, Castellón, Spain

Received December 3, 2002. Accepted by JS March 5, 2003. Corresponding author's e-mail: hernandf@exp.uji.es

This paper describes a new method for the sensitive and selective determination of fosetyl-aluminum (Al) residues in vegetable samples. The method involves extraction with water by using a high-speed blender and subsequent injection of the 5-fold diluted extract into the liquid chromatograph. Fosetyl-Al is determined by liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry after the addition of tetrabutylammonium acetate as the ion-pairing reagent. The method has been used to assay lettuce samples spiked at 2 and 0.2 mg/kg. Recoveries were satisfactory, with mean values of 98 and 106%, respectively, and relative standard deviations were <10%. The limit of quantitation was 0.2 mg/kg, and the limit of detection was as low as 0.05 mg/kg. Matrix-matched calibration was used for quantitation, and the addition of an internal standard improved repeatability. The developed method allows the accurate and rapid determination of low levels of fosetyl-Al residues in lettuce with very little sample handling and good sensitivity; it was shown to be robust by the analysis of al- most 100 samples.

Introduction

Fosetyl-Al, aluminium tris(O-ethyl phosphonate), is a fungicide used worldwide to control diseases caused by members of the Feronosporales, especially root and crown rots caused by various *Fhytophthora* species and foliar diseases caused by some downy mildews (1). Although the mode of action of fosetyl-Al still remains controversial, it is probable that its breakdown product, the phosphonate anion, produces a direct antifungal effect on disease control, inhibiting growth and sporulation of a pathogen such as *Fhytophthora* (2).

Because of its chemical characteristics (low molecular mass, ionic structure, and lack of UV absorption or fluorescence), fosetyl-Al is rather difficult to determine by conventional (reversed-phase) liquid chromatography (LC); therefore, it has been traditionally separated by high-performance ion chromatography (1–4), gas chromatography after derivatization (5), or microcolumn LC (6) and measured by using conductivity detection (1–4) or flame photometric detection (FPD; 5, 6).

When plant materials are analyzed, the complexity of the matrix necessitates a cleanup step, which is usually based on solid-phase extraction (1–3) or a derivatization step (5).

In addition, the low sensitivity and selectivity of conductivity detectors do not favor the determination of fosetyl-Al at residue levels in complex matrixes. In spite of the inherent higher selectivity of FPD, the determination of fosetyl-Al by coupling a flame photometric detector to a gas chromatograph or a liquid chromatograph requires a derivatization step (5) or microcolumn LC (6), respectively. Detection limits between 0.5 and 8 mg/kg have been proposed for the above-mentioned conventional techniques.

In recent years, the use of LC/mass spectrometry (LC/MS) for pesticide residue analysis of foods and vegetables has experienced significant growth due to its inherent selectivity and sensitivity. Moreover, when LC with tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) is used, the initially formed precursor ion undergoes selective fragmentation achieved by collision-induced dissociation, which results in improved selectivity and sensitivity that make this technique quite adequate for analysis at residue levels (7). This trace-level detection is important in order to reach limits of quantitation that satisfy the regulatory requirements. In the case of fosetyl-Al, the European Union has established a maximum residue level (MRL) of 2 mg/kg in lettuce samples. Ideally, analytical methods with quantitation limits of

>10 times lower than the MRL would be advisable to evaluate samples for compliance with the MRL.

Several recently published papers have described the use of MS/MS in target analyses for different pesticides by direct injection of a vegetable extract (8–10). Also, a few LC/MS/MS methods have been used to determine organic anions chemically similar to fosetyl, such as phosphonates (11), dibutyl phosphate (12), and alkyl phosphates (13), in complex matrixes. The high polarity of the alkyl phosphates required the use of an ion-pairing reagent to obtain sufficient retention time and allow the separation of highly polar interferences (salts) and analytes. Thus, a volatile ion-pairing reagent, tetrabutylammonium (TBA) acetate, was selected to prevent interface blockage (13).

In this work, we investigated the direct injection of vegetable extracts by using LC with electrospray interface (ESI)–MS/MS with very little sample pretreatment for the rapid determination of fosetyl-Al residues in lettuce at the low mg/kg levels. After the method was validated, its applicability and robustness were checked by analysis of a large number of real samples.

Experimental

Reagents and Chemicals

(a) *Fosetyl-Al reference standard (83%)*.—Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany).

(b) *Diethyl phosphate (DEP)*.—Used as the internal standard (IS; Suppelco, Bellefonte, PA).

(c) *TBA acetate*.—98%; Sigma (St. Louis, MO).

(d) *Acetonitrile*.—LC grade; Scharlab (Barcelona, Spain).

(e) *Water*.—LC grade; obtained by purifying demineralized water in a Nanopure II system (Barnstead, Newton, MA).

(f) *Standard stock solution of fosetyl-Al*.—Prepared by dissolving 59.9 mg reference standard powder, accurately weighed, in 100 mL water to obtain a final fosetyl-Al concentration of 497 µg/mL.

(g) *Standard working solutions for the LC–MS/MS analysis and for fortification of samples*.—Prepared by diluting the stock solution with water.

(h) *Ion-pairing reagent*.—Prepared by dissolving 1.55 g TBA acetate powder in 10 mL water to obtain a final TBA acetate concentration of 500 mM.

(i) *Standard stock solution of DEP.*—Prepared by dissolving 25 mg IS powder, accurately weighed, in 50 mL acetonitrile to obtain a final DEP concentration of 500 µg/mL.

(j) *Standard solutions containing DEP at 100 and 5 µg/mL.*—Prepared by diluting the stock solution with water.

Instrumentation

(a) *LC system.*—A Waters Alliance 2690 LC system (Waters, Milford, MA) was interfaced to a Quattro LC triple-quadrupole mass spectrometer (Micromass, Manchester, UK).

(b) *Column.*—Supelco Discovery C₁₈ (5 µm, 2.1 x 50 mm); used for the LC separation at a flow rate of 300 µL/min. The mobile phase was a water–acetonitrile gradient in which the percentage of acetonitrile was changed linearly as follows: 0 min, 5%; 4.6 min, 15%; 4.7 min, 60%; 7 min, 60%; 7.1 min, 5%; and 11 min, 5%.

(c) *Mass spectrometer.*—Quattro LC (quadrupole-hexapole-quadrupole) mass spectrometer with an orthogonal Z-spray- electrospray interface (Micromass). For operation in the MS/MS mode, the collision gas was argon, 99.995% (Carbueros Metalicos, Valencia, Spain) with a pressure of 2×10^{-3} mbar in the collision cell. Capillary voltages of 3.0 kV were used in the negative ionization mode. The interface temperature was set to 350°C, and the source temperature, to 120°C. Dwell times of 0.2 s/scan were chosen. A solvent delay of 2.25 min was selected to give an additional cleanup using the built-in divert valve controlled by Masslynx NT v.3.5 software. This software was also used to process the quantitative data obtained from the calibration standards and from lettuce samples.

(d) *Nitrogen generator.*—NG-7 (Aquila, Etten-Leur, The Netherlands). Drying gas, as well as nebulizing gas, was nitrogen generated from pressurized air in a nitrogen generator. The nebulizer gas flow was set to ca 80 L/h, and the desolvation gas flow to 900–1000 L/h.

(e) *Single syringe pump.*—Directly connected to the interface; Model 11 (Harvard Apparatus, Holliston, MA); used to perform infusion experiments.

Procedure

A 25 g portion of homogenized lettuce was accurately weighed (precision of 0.1 mg) and mixed with 60 mL LC grade water after the addition of 0.5 mL DEP solution at 100 µg/mL as the IS. The mixture was extracted for 2 min with a high-

speed Ultra-Turrax T25 blender (Janke & Kunkel GmbH & Co., Staufen, Germany) at 8000 rpm and filtered by using a vacuum pump; the solid material was washed, and the filtrate was diluted with water to a final volume of 100 mL. If necessary, samples were centrifuged for 15 min to remove possible solid particulates, and finally they were diluted 5-fold, i.e., a 5 mL aliquot was diluted to 25 mL with LC grade water. Before analysis, 75 μ L 0.5M TBA acetate solution was added to a 2 mL vial containing 1.5 mL diluted extract.

Matrix-matched standards were used for calibration. A blank lettuce sample was extracted with water, and the extract was diluted to 100 mL. A 5 mL aliquot was transferred to a 25 mL volumetric flask, and 5 mL standard solution (containing fosetyl-Al at 25–5000 μ g/L) and 0.5 mL DEP solution at 5 μ g/mL were added. Finally, the volume was diluted to 25 mL with water. As described for the samples, 75 μ L 0.5M TBA acetate solution was added to a 2 mL vial containing 1.5 mL matrix-matched standard. Fosetyl-Al was determined by injecting a 20 μ L aliquot into the LC-MS/MS system under the experimental conditions described in the Instrumentation section.

Samples for recovery experiments were fortified by adding 1 mL standard solution containing fosetyl-Al at 5 or 50 μ g/mL to each 25 g portion of homogenized lettuce as described above to obtain a fortification level of 0.2 or 2 mg/kg, respectively. These fortified samples were equilibrated for 1 h before extraction.

Validation Study

The linearity of the method was evaluated by using the ratio of the areas obtained for the analyte standard and the IS for ≥ 8 standard solutions that were analyzed in duplicate.

Precision (repeatability), expressed as percent relative standard deviation (RSD), and recoveries were determined within-day by analyzing fortified lettuce samples in quintuplicate. This experiment was performed at 2 spiking levels, 0.2 and 2 mg/kg.

The limit of quantitation (LOQ) was established as the lowest concentration giving satisfactory recoveries (70–110%) and precision (<15%).

The limit of detection (LOD), defined as the lowest concentration producing a signal-to-noise ratio of 3, was estimated from chromatograms of fortified samples at the lowest concentration assayed.

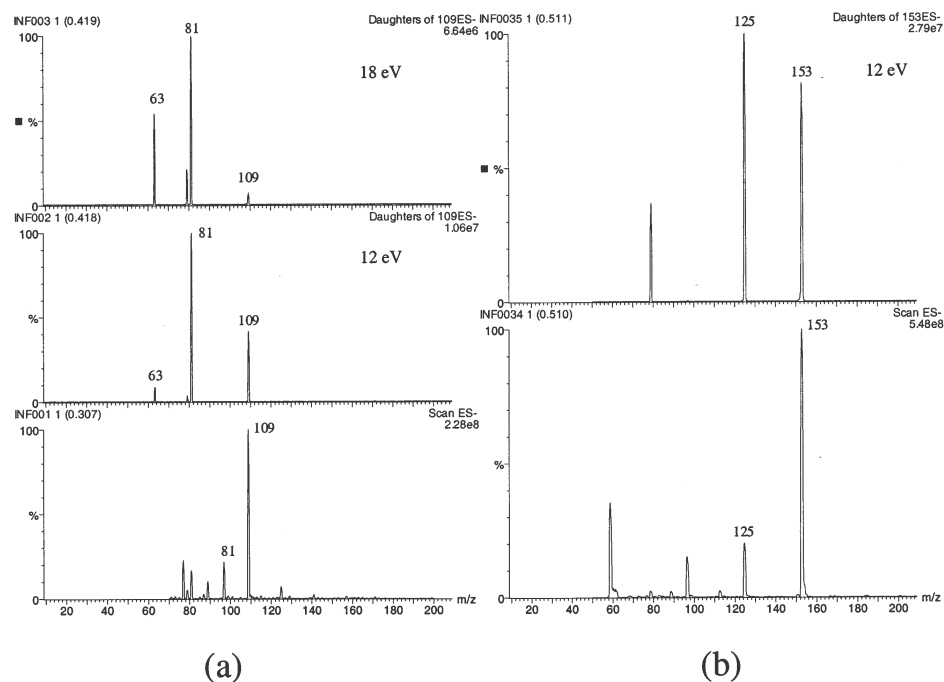


Figure 1. The negative-ion electrospray full-scan mass spectrum (bottom) and product-ion spectra (middle and top) of (a) fosetyl and (b) DEP, acquired by infusion of a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ standard solution.

Results and Discussion

MS Optimization

The negative-ion electrospray full-scan mass spectra and the MS/MS spectra of fosetyl and DEP are shown in Figure 1. All spectra were obtained from infusion, at a flow rate of 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, of each compound at 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in acetonitrile–water (50 + 50, v/v). The negative-ion electrospray full-scan spectrum of fosetyl (Figure 1a, bottom) at a cone of 25 V shows a peak at m/z 109, corresponding to the molecular weight of the fosetyl anion. The MS/MS spectrum at 12 eV (Figure 1a, middle) shows an important fragment at m/z 81, the product of a McLafferty rearrangement. By increasing the collision energy to 18 eV (top), a minor fragment, at m/z 63, due to the loss of ethanol was obtained. In contrast, the negative-ion electrospray full-scan spectrum of DEP (Figure 1b), at a cone of 20 V, shows a peak at m/z 153, corresponding to the deprotonated molecule $[\text{M}-\text{H}]^-$. The MS/MS spectrum (collision energy of 12 eV) shows an important fragment at m/z 125 produced by a McLafferty rearrangement. The fragmentation

pathways of these molecules are depicted in Figure 2. The selected reaction monitoring (SRM) transitions chosen for the determination of fosetyl-Al are shown in Table 1.

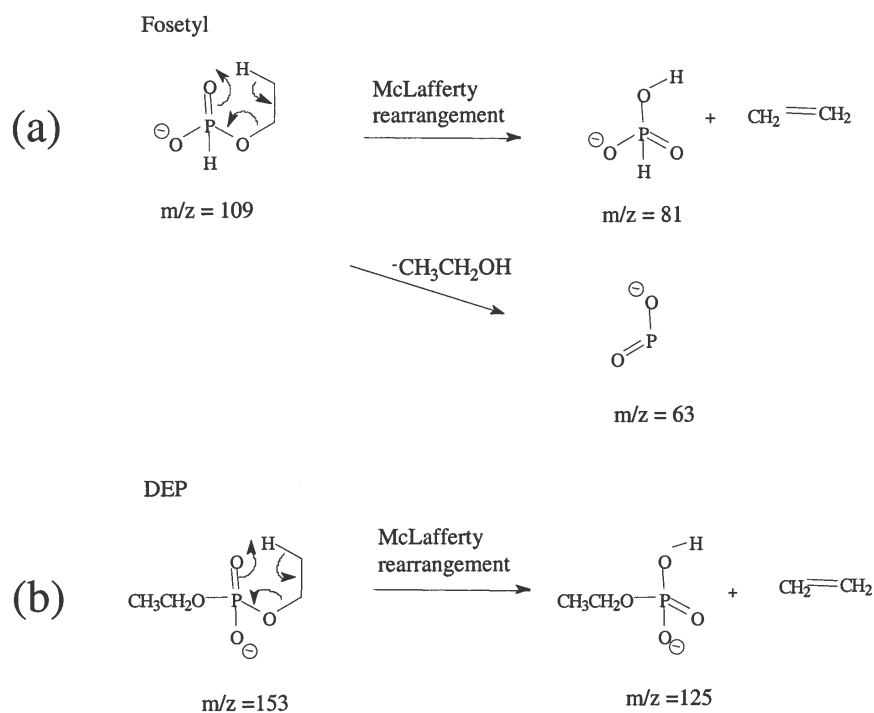


Figure 2. Fragmentation pathways of (a) fosetyl and (b) DEP.

Table 1. Optimized MS parameters for the determination of fosetyl-Al.

Compound determined	Precursor ion, m/z	Cone, V	Collision energy, eV	Product ion, m/z
Fosetyl-Al ^a	109	25	12	81
DEP ^b	153	20	12	125

^a Transition used for quantification.

^b Internal standard

LC Optimization

Fosetyl-Al is a highly polar compound; thus, it is difficult to obtain enough retention in a C₁₈ column to remove salts and polar matrix components, which could interfere by decreasing the response of the MS analyte (13). Several

solutions to this problem have been described, such as applying a specific column that allows the use of 100% aqueous solutions (14) or using ion-pair chromatography (15, 16). However, the use of nonvolatile substances is not recommended because nonvolatile ion-pairing reagents destabilize the electrospray process and contaminate the interface (14). In the present work, the selected option was the formation of an ion pair by using TBA acetate, which is the most common volatile ion-pairing reagent for LC/MS (13, 17). In some cases, the use of 1mM TBA acetate in the mobile phase has been a good solution as, for example, in the determination of alkyl phosphates in urine samples (13). However, this option was found to be unsatisfactory for the determination of fosetyl-Al in lettuce extracts because of the loss of sensitivity, which prevented us from achieving the expected LOD values.

Thus, the effect on both the response of the analyte and the retention time was studied by adding different concentrations of TBA acetate directly to the vial containing the solution to be injected into the LC/MS/MS system. The optimum concentration that yielded the best signal with enough retention and good peak shape was 25 mM. This was obtained by the addition of 75 μ L 500 mM TBA acetate solution to 1.5 mL sample extract.

Table 2. Results of the dilution study for the determination of fosetyl-Al in 10 individual lettuce samples spiked at 0.2 mg/kg

Extraction	Recovery, % ^a	RSD, % ^b	RSD (IS), % ^c	Absolute signal
Without dilution	21	57	38	2350
2-fold dilution	29	32	27	2100
5-fold dilution	64	12	6	1800
10-fold dilution	84	7	6	1350

a Calculated by external calibration with aqueous standards.

b RSD = Relative standard deviation.

c IS = Internal standard.

We checked that the TBA-fosetyl formed eluted as an ion pair through the column without any TBA acetate in the mobile phase because no chromatographic differences (retention time and peak shape) were obtained with respect to the data when TBA acetate was added to the mobile phase. The main reason for the removal of TBA acetate from the mobile phase was to improve sensitivity.

Method Optimization

With regard to sample analysis, after direct injection of an aliquot of the 100 mL lettuce extract and external calibration with aqueous standards, a recovery of only 21% was obtained. This low recovery was the result of ionization suppression from the coextracted components of the matrix. Nevertheless, the sensitivity obtained was still sufficient to achieve the required MRL; therefore, matrix-matched external standard calibration was a feasible approach to obtain acceptable recoveries. This approach assumes homogeneity between the blank matrix and samples containing unknown levels of analyte. To confirm this homogeneity, 10 lettuce samples of different origins and varieties were fortified at the 0.2 mg/kg level and analyzed. The response variation, expressed as RSD, was as high as 57%, making the procedure unfeasible.

To reduce the differences between matrixes, the dilution of lettuce extracts with LC grade water was tested as a fast and simple way to improve homogeneity and minimize matrix interferences. The results in Table 2 show that the higher the dilution, the lower the RSD that was obtained, indicating gradual matrix homogenization with dilution improves recovery. According to the RSD results, both 10- and 5-fold dilution would be adequate for accurate quantitation by matrix-matched calibration (RSD < 15%).

Table 3. Validation results for the developed LC/MS/MS procedure for the determination of fosetyl-Al residues in lettuce

Fortification level, mg/kg	Recovery, % ^a	RSD, % ^b
0,2	106	10
2	98	2

a n = 5.

b RSD = Relative standard deviation

Table 2 also shows the relationship between dilution and absolute response obtained in the determination of fosetyl-Al. Unexpectedly, the absolute response did not decrease significantly after dilution. A possible cause of this effect could be matrix ion suppression caused by compounds coextracted with the analyte. These interferences would be minimized by sample dilution, and analyte ionization would be improved; therefore, a higher-than-expected response would be obtained, depending on the dilution factor. Matrix-matched calibration with a 5-fold diluted matrix was selected as a compromise between repeatability and

sensitivity. On the other hand, recovery values obtained by external calibration with aqueous standards gradually increased with matrix dilution, and quantitative values (84%) were obtained with a 10-fold dilution. In this way, external calibration with aqueous standards could be used, but only after the lettuce matrix is diluted by a factor of 10, and with a significant loss of sensitivity.

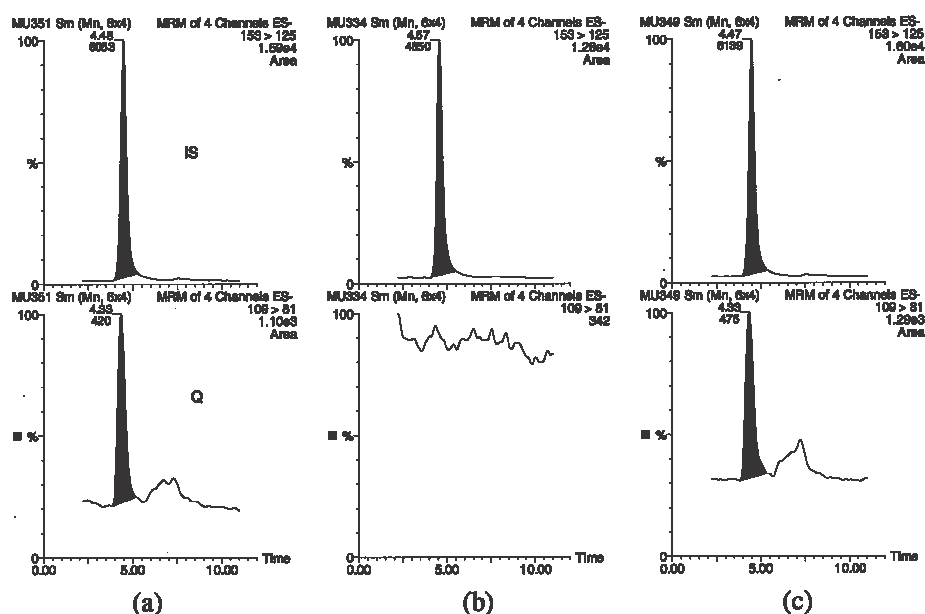


Figure 3. SRM chromatograms of (a) a matrix-matched standard of fosetyl-Al (50 ng/mL), (b) a blank, and (c) a lettuce extract spiked at 0.2 mg/kg. IS = DEP; Q = quantitative transition of fosetyl.

To achieve accurate quantitation without a decrease in sensitivity, the use of an IS was also checked. Because of the unavailability of a labeled IS, an analogue compound, DEP, was assayed. In this case, the coelution of the IS and analyte would be advisable (18); this was achieved by applying an LC gradient. As Table 2 shows, the rather high matrix content still present in the nondiluted and 2-fold diluted lettuce extracts could enhance the ionization differences between the analyte and the IS, as well as the chromatographic differences. Under these conditions, the use of the analogue IS was not adequate for the accurate quantitation because matrix effects were not compensated for.

However, a 5-fold dilution produced an adequate RSD. Consequently, a 5-fold dilution for both samples and matrix-matched standards was chosen, with the addition of DEP as the IS. Because DEP is one of the metabolic products of

organophosphorus pesticides, samples were not treated with any pesticide that could be metabolized as DEP before this method was applied.

Method Validation

The optimized method described above was validated before it was applied to real-world samples. Linear calibration curves were obtained for both aqueous and matrix-matched standards in the range 5–1000 µg/L, with a correlation coefficient $r = 0.9993$. Precision and accuracy (expressed as recovery) are reported in Table 3. The method was found to be precise (RSD < 10%) and accurate, with satisfactory recoveries (98–106%), an LOQ of 0.2 mg/kg, and an estimated LOD of 0.05 mg/kg.

Typical chromatograms for standard solutions and lettuce samples (blank and spiked at the lowest level assayed) are shown in Figure 3. The chromatograms were obtained after direct injection of the 5-fold diluted solutions/extracts. The total chromatographic run time was about 11 min.

Application to Field-Treated Samples

The optimized procedure was applied to the analysis of about 80 samples from field residue trials. With each batch of 6–10 samples, a calibration curve was prepared for analyte concentrations between 5 and 1000 µg/L by injections before and after those of the sample extracts. In addition, 2 quality control (QC) samples were injected in every batch of samples. The QC samples were blank lettuce samples fortified at the LOQ level and at 10 times the LOQ level. In all cases, the individual QC recoveries were satisfactory (between 70 and 110%), showing the robustness of the procedure. These results allowed us to estimate the reproducibility of the method by using the QC recovery values obtained in the analysis of samples over a period of approximately 4 months. The results obtained were satisfactory both at the LOQ level (98% average recovery and 13% RSD) and at 10 times the LOQ level (99% average recovery and 8% RSD). All samples and standards were injected in duplicate. Levels of the fosetyl-Al residues were consistent with the elapsed time between application and collection of samples.

Figure 4 shows typical chromatograms for one untreated sample and one sample treated with fosetyl-Al and collected 7 days after the application.

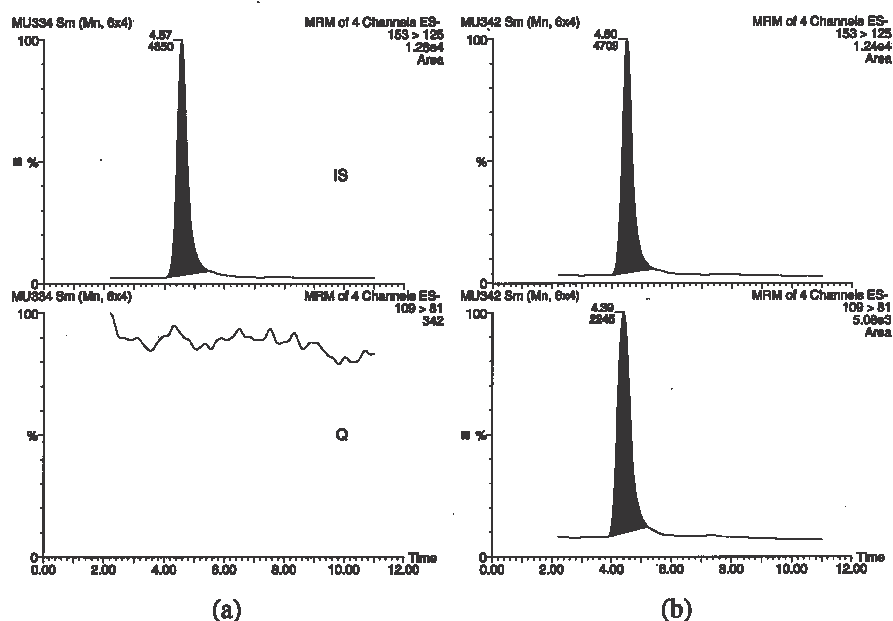


Figure 4. SRM chromatograms of field lettuce samples (a) untreated and (b) treated with fosetyl-AI and containing fosetyl-AI at 2.22 mg/kg. IS = DEP; Q = quantitative transition of fosetyl.

Conclusions

This work has demonstrated that LC/ESI-MS/MS is a sensitive and selective technique for the determination of fosetyl-AI residues in vegetable samples at sub-ppm levels. Because fosetyl is found as an anionic species in aqueous solutions, the addition of an ion-pairing reagent such as TBA acetate is required for its sufficient retention on a reversed-phase LC column. The developed method described in this paper allows a short chromatographic run time (about 11 min) and fast and simple sample pretreatment, compared with previous methods reported in the literature.

When applied to lettuce samples, matrix calibration with raw extracts was shown to be an insufficiently robust approach to obtain satisfactory results when lettuce samples from different origins and varieties were analyzed. However, divergences were corrected by simply diluting the samples with water. In addition, dilution of samples did not lead to an important loss of absolute response, allowing the analysis of 5-fold diluted extracts without significant loss of sensitivity. The use of an analogue IS, such as DEP, although not compulsory, allowed the analytical characteristics of the method, mainly repeatability, to

improve. The developed method was satisfactorily applied to field-treated samples, and its suitability and robustness were demonstrated.

Acknowledgments

We are very grateful to Probelte SA (Murcia, Spain) for financial support and for providing the lettuce samples, and to Serveis Centrals d'Instrumentació Científica (SCIC) of University Jaume I for the use of the Quattro LC triple-quadrupole mass spectrometer.

References

- (1) Ouimette, D.G., & Coffey, M.D. (1988) *Phytopathology* 78, 1150–1155
 - (2) Ouimette, D.G., & Coffey, M.D. (1989) *Plant Dis.* 73, 212–215
 - (3) Fenn, M.E., & Coffey, M.D (1989) *Phytopathology* 79, 76–82
 - (4) Giordano, R., Ciaralli, i., Ciprotti, M., Camoni, I., & Constantini, S. (1995) *Microchem. J.* 52, 68–76
 - (5) Pelegri, R., Gamon, M., Coscoll, R., Beltrán, V., & Cunat, A. (1993) *J. Festic. Sci.* 39, 319–323
 - (6) Hooijschuur, E.W.J., Kientz, C.E., Dijksman, J., & Brinkman, U.A.T. (2001) *Chromatographia* 54, 295–301
 - (7) Hernández, F., Sancho, J.V., Pozo, O.J., Lara, A., & Pitarch, E. (2001) *J. Chromatogr. A* 939, 1–11
 - (8) Pozo, O.J., Marín, J.M., Sancho, J.V., & Hernández, F. (2003) *J. Chromatogr. A* 992, 133–140
 - (9) Hogenboon, A.C., Hofman, M.P., Kok, S.J., Niessen, W.M.A., & Brinkman, U.A.T. (2000) *J. Chromatogr. A* 892, 379–390
 - (10) Hernández, F., Hidalgo, C., Grimalt, S., & Sancho, J.V. (2001) *Quim. Anal.* 20, 81–91
 - (11) Black, R.M., & Read, R.W. (1998) *J. Chromatogr. A* 794, 233–244
 - (12) Lamouroux, C., Virelizier, H., Moulin, C., Tabet, J.C., & Jankowski, C.K. (2000) *Anal. Chem.* 72, 1186–1191
 - (13) Sancho, J.V., Pozo, O.J., & Hernández, F. (2002) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16, 1–8
-

- (14) Ingelse, B.A., van Dam, R.C.J., Vreeken, R.J., Mol, H.G.J., & Steijger, O.M. (2001) *J. Chromatogr. A* 918, 67–78
 - (15) Rundlett, K.i., & Armstrong, D.W. (1996) *Anal. Chem.* 68, 3493–3497
 - (16) Crescenzi, C., Di Corcia, A., Marchese, S., & Samperi, R. (1995) *Anal. Chem.* 67, 1968–1975
 - (17) Alonso, M.C., Castillo, M., & Barceló, D. (1999) *Anal. Chem.* 71, 2586–2593
 - (18) Sancho, J.V., Pozo, O.J., López, F.J., & Hernández, F. (2002) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16, 639–645
-

1.4.3. Discusión de los resultados

El fosetil-Al es un fungicida iónico constituido por aniones fosfonatos conjugados con aluminio. Debido a estas características iónicas presenta una alta dificultad para su determinación mediante RPLC acoplada a MS/MS. En nuestro trabajo se ha seleccionado la detección del anión fosfonato mediante ionización negativa (ESI-).

- *Optimización Cromatográfica: Pares Iónicos en RPLC*

Uno de los primeros inconvenientes que planteó el desarrollo del método fue obtener una correcta retención cromatográfica del ión fosetil en fase reversa. Esto se consiguió mediante la formación de pares iónicos con TBA, de forma que el fosetil formaba una interacción (par iónico) con alquilamonio consiguiendo una buena retención en la fase estacionaria C₁₈. La adición del TBA se estudió tanto en la fase móvil como en el vial. Se probó la adición del par iónico en la fase móvil a diferentes concentraciones (entre 0.1 y 1 mM), sin llegar a obtener una sensibilidad adecuada para alcanzar el LOD deseado, con la retención y forma de pico adecuada. Se decidió adicionar el TBA en el propio vial, considerando que la interacción del par iónico formado en el vial se podría mantener durante la cromatografía. Se estudiaron distintas concentraciones de TBA y se consideró como valor óptimo 25 mM, con el que se obtenía una buena forma de pico y un tiempo de retención suficiente (4.5 min) para una adecuada separación del par iónico respecto a otros componentes de la matriz. Este ensayo se realizó en un primer estadio con patrones de fosetil-Al, pero para llegar a la optimización final se estudió una vez más en matriz a diferentes diluciones, ya que en la propia matriz podían encontrarse otros compuestos que compitieran por la formación de pares iónicos con el TBA. Finalmente, adicionar TBA en el vial se presentó como la alternativa más interesante y novedosa, ya que permitía una correcta cromatografía al mismo tiempo que se evitaba la pérdida de sensibilidad por la continua entrada en la interfase del modificador en la fase móvil.

- *Estudio del Efecto Matriz*

En segundo lugar, se estudió el efecto matriz observado en distintas variedades de lechuga. Sorprendentemente, se observó una gran variabilidad entre cada una de las especies dentro de la familia de lechugas (*Lactuca savita*), obteniéndose en algunos casos recuperaciones del 21% debida a la supresión de la ionización por los componentes de la matriz. Con el objetivo de corregir la baja recuperación del analito, se llevó a cabo la cuantificación haciendo uso de calibrado en matriz, obteniéndose resultados viables. Sin embargo, la alta

variabilidad (RSD superior al 57% entre 10 muestras distintas fortificadas a 0.2 mg/kg) de las especies vegetales no permitía obtener una cuantificación robusta, ya que resultaba casi obligatorio preparar un calibrado en matriz para cada tipo de muestra. Entonces, se plantearon como posibles medidas la dilución de los extractos crudos y/o la adición de un patrón interno.

Para el estudio por dilución, se inyectaron diluciones con agua HPLC a la mitad, un quinto y un décimo del extracto crudo de la matriz, cuantificándose con calibrados externos. Se observó una disminución de las respuestas que no era proporcional a su dilución (*Tabla 2 del artículo científico 3*). Este curioso comportamiento podía derivarse del efecto producido por la propia matriz, debido a que la supresión de la ionización disminuía con la dilución compensando la posible pérdida de sensibilidad producida por la propia dilución. En el caso de la dilución por 2, la respuesta absoluta de la señal apenas sufría variación con respecto a la inyección del extracto crudo, sin embargo el valor de la RSD (32%) todavía era muy alto para una cuantificación adecuada. Si se llegaba a una dilución por 10 de la muestra se obtenía una recuperación media del 84%, dentro de los límites deseados (70-120%), además de una buena RSD (6%) entre las diferentes muestras, aunque con una pérdida considerable de sensibilidad. Finalmente, se decidió considerar la dilución por 5 junto con el calibrado en matriz como un compromiso entre sensibilidad y robustez del método (RSD 12%).

Por otro lado, se estudió el uso de un patrón interno como alternativa para una correcta cuantificación. Debido a que no se encontraba disponible comercialmente el marcado del fosetil, se buscó como patrón interno un compuesto que presentara un comportamiento similar al fosetil, tanto en la extracción como en la separación cromatográfica. De esta manera, se seleccionó el dietil fosfato (DEP) como patrón interno, cuyo tiempo de retención era prácticamente el mismo (4.3 min) que para el ión del fosetil (4.5 min), como se puede observar en la *Figura 3 del artículo científico 3*. Se esperaba un efecto matriz similar para fosetil y DEP, de forma que el DEP podría corregir las desviaciones entre las distintas matrices y las bajas recuperaciones en la cuantificación. Sin embargo, tal y como se muestra en la *Tabla 2 del artículo científico 3* la variabilidad entre matrices también afectaba al patrón interno, sin ser capaz de proporcionar una medida robusta en el extracto crudo y en la dilución por 2. Finalmente, una dilución por 5 presentaba una buena RSD (6%) entre matrices y permitía llevar a cabo una cuantificación apropiada usando calibrado en matriz.

- *Validación del método analítico*

Una vez optimizado el método analítico, se validó con 5 réplicas al nivel de 0.2 mg/kg, considerándolo como LOQ objetivo. De forma que se obtuvo un método analítico sensible, y con buena precisión y exactitud utilizando la dilución por 5 del extracto crudo junto con la adición del DEP como patrón interno y la cuantificación con calibrado en matriz, capaz de llevar a cabo la determinación del fosetil-Al 10 veces por debajo del MRL establecido por la Unión Europea (2 mg/kg para el Fosetil-Al en lechugas). Se estableció un rango de linealidad amplio entre 5-1000 µg/L con un coeficiente de correlación superior a 0.99. A partir del primer punto del calibrado se estimó el LOD del fosetil-Al en diferentes variedades de lechugas en 0.05 mg/kg.

- *Aplicación del método analítico a muestras*

El método analítico ya validado se aplicó a 80 muestras reales de lechuga procedentes de un estudio de campo durante un periodo de 4 meses. En el análisis de las muestras se realizó un control de calidad para asegurar la fiabilidad de los resultados mediante el uso de dos QC en cada una de las secuencias, uno al nivel de LOQ y otro a 10 veces el LOQ. Se analizaron entre 6 y 10 muestras en cada secuencia, a las que se sumaban los QCs. Los resultados obtenidos para los QCs fueron satisfactorios, obteniendo valores medios de recuperación del 98% (RSD 13%) y 99% (RSD 8%) para el caso del nivel al LOQ y 10 veces el LOQ, respectivamente. Durante el periodo de tiempo de 4 meses se comprobó la reproducibilidad y robustez del método analítico desarrollado para el análisis de fosetil-Al.

Este método presenta un inconveniente a tener en consideración, ya que el DEP como patrón interno sólo se puede utilizar para aquellas muestras que no hubieran sido tratadas con pesticidas organofosforados, ya que éstos se podrían metabolizar a DEP afectando a la correcta cuantificación. Lo ideal sería disponer de un patrón de fosetil marcado isotópicamente.

1.4.4. Referencias bibliográficas

- Abidi, S.L.; Mounts, T.L. (1996) *Reversed-phase high-performance liquid chromatography of molecular species of phospholipid derivatives* J. Chromatogr. A 741, 213-222
- Alonso, M.C.; Castillo, M.; Barceló, D. (1999) *Solid-phase extraction procedure of polar benzene- and naphthalenesulfonates in industrial effluents followed by unequivocal determination with ion-pair chromatography/electrospray-mass spectrometry* Anal.Chem. 71, 2586-2593
- Apfeltheler, E.; Bicker, W.; Lämmerhofer, M.; Sulyok, M.; Krska, R.; Lindner, W.; Schuhmavher, R. (2008) *Retention pattern profiling of fungal metabolites on mixed-mode reversed-phase/weak anion exchange stationary phases in comparison to reversed-phase and weak anion exchange separation materials by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry* J. Chromatogr. A 1191, 171-181
- Balinova, A.M. (1996) *Analysis of fenoxaprop-ethyl and fenoxaprop in drinking water using solid-phase extraction and ion-pair HPLC* Pestic. Sci. 18, 219-223
- Blasco, C.; Fernández, M.; Picó, Y.; Font, G. (2004) *Comparison of solid-phase microextraction and stir bar sorptive extraction for determining six organophosphorus insecticides in honey by liquid chromatography-mass spectrometry* J. Chromatogr. A 1030, 77-85
- Black, R.M.; Read, R.W. (1998) *Analysis of degradation products of organophosphorus chemical warfare agents and related compounds by liquid chromatography-mass spectrometry using electrospray and atmospheric pressure chemical ionization* J. Chromatogr. A 794, 233-244
- CIPAC Handbook, Vol. 1G, Collaborative International Pesticides Analytical Council Ltd, 1995, p.82
- Cordell, R.L.; Hill, S.J.; Ortori, C.A.; Barrett, D.A. (2008) *Quantitative profiling of nucleotides and related phosphate-containing metabolites in cultured mammalian cells by liquid chromatography tandem electrospray mass spectrometry* J. Chromatogr. A 871, 115-124
- Escott, R.E.A.; McDowell, P.G.; Porter, N.P. (1991) *Use of non-volatile ion-pairing agents for liquid chromatographic-mass spectrometric analyses with a moving-belt interface* J. Chromatogr. 554, 281-292
-

- European Commission, Directorate General Health and Consumer Protection, Residues: Guidance document on residue analytical methods. Document SANCO/825/00 rev. 6 of June 2000
- Fenn, M.E.; Coffey, M. D. (1988) *Quantification of phosphonate and ethyl phosphonate in tobacco and tomato tissues and significance for the mode of action of two phosphonate fungicides* Phytopathology 79, 76-82
- Fox, S.D.; Roman, J.M.; Cizza, G.; Veenstra, T.D.; Issaq, H.J. (2005) *Quantitative determination of antalarmin, a novel corticotrophin-releasing hormone receptor-1 antagonist, in canine plasma by HPLC-MS* J. Sep. Sci. 28, 332-336
- Giordano, R.; Ciaralli, L.; Ciprotti, M.; Camoni, I.; Costantini, S. (1995) *Applicability of high-performance ion chromatography (HPIC) to the determination of fosetyl-aluminium in commercial formulations* Microchem. 52, 68-76
- Hernández, F.; Sancho, J.V.; Pozo, O.J. (2002) *Direct determination of alkyl phosphates in human urine by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry* Rapid Commun. Mass Spectrom. 16, 1766-1773
- Hooijschuur, E.W.J.; Kientz, Ch. E.; Dijksman, J.; Brinkman, U.A.Th. (2001) *Potential of microcolumn liquid chromatography and capillary electrophoresis with flame photometric detection for determination of polar phosphorus-containing pesticides* Chromatographia 54, 295-301
- Juhler, R.K. (1997) *Optimized method for the determination of organophosphorus pesticides in meat and fatty matrices* J. Chromatogr. A 786, 145-153
- Kumari, B.; Madan, V.K.; Kumar, R.; Kathpal, T.S. (2002) *Monitoring of seasonal vegetables for pesticide residues* J. Environ. Monit. Asses. 74, 263-270
- Lambropoulou, D.A.; Albanis, T.A. (2003) *Headspace solid-phase microextraction in combination with gas chromatography-mass spectrometry for the rapid screening of organophosphorus insecticide residues in strawberries and cherries* J. Chromatogr. A 993, 197-203
- Lamouroux, C.; Virelizier, H.; Moulin, C.; Tabet, J.C.; Jankowski, C.K. (2000) *Direct determination of dibutyl and monobutyl phosphate in a tributyl phosphate/nitric aqueous-phase system by electrospray mass spectrometry* Anal. Chem. 72, 1186-1191
-

- Liu, M.; Hashi, Y.; Song, Y.; Lin, J.-M. (2005) *Simultaneous determination of carbamate and organophosphorus pesticides in fruits and vegetables by liquid chromatography-mass spectrometry* J. Chromatogr. A 1097, 183-187
- Malusà, E.; Tosi, L. (2005) *Phosphorous acid residues in apples after foliar fertilization: Results of field trials* Food Addit. and Contamin. 22, 541-548
- Mol, H.G.J.; van Dam, R.C.J.; Steijger, O.M. (2003) *Determination of polar organophosphorus pesticides in vegetables and fruits using liquid chromatography with tandem mass spectroemtry: selection of extraction solvent* J. Chromatogr. A 1015, 119-127
- Nowack, B. (1997) *Determination of phosphonates in natural waters by ion-pair high-performance liquid chromatography* J. Chromatogr. A 773, 139-146
- Ouimette, D.G.; Coffey, M.D. (1988) *Quantitative analysis of organic phosphonates, phosphonate, and other inorganic anions in plants and soil by using high-performance ion chromatography* Phytopathology 78, 1150-1155
- Ouimette, D.G.; Coffey, M.D. (1989) *Phosphonate levels in avocado (Persea americana) seedlings and soil following treatment with fosetil-Al or potassium phosphonate* Plant Dis. 73, 212-215
- Pelegrí, R.; Gamón, M.; Coscollá, R.; Beltrán, V.; Cuñat, P. (1993) *The metabolism of fosetil-aluminium and the evolution of residue levels in oranges and tangerines* J. Pestic. Sci. 39, 319-323
- Petrović, M.; Barceló, D. (2000) *Determination of anionic and nonionic surfactants, their degradation products, and endocrine-disrupting compounds in sewage sludge by liquid chromatography/mass spectrometry* Anal. Chem. 72, 4560-4567
- Poustka, J.; Hajšlová, J.; Holadová, K.; Nováková, K. (2003) *Potential of liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry for determination of fosetil-aluminium residues in dried hops* Czech J. Food Sci. 22, 24-28
- Rissato, S.R.; Galhiane, M.S., de Almeida, M.V.; Gerenutti, M.; Apon, B.M. (2007) *Multiresidue determination of pesticides in honey samples by gas chromatography-mass spectrometry and application in environmental contamination* Food Chem. 101, 1719-1726
-

Socher, G.; Nussbaum, R.; Rissler, K.; Lankmaryr, E. (2001) *Analysis of sulfonated compounds by reverser-phase ion-pair chromatography-mass spectrometry with on-line removal of non-volatile tetrabutyl ammonium ion-pairing agents* *Cromatographia* 54, 65-70

Wang, L.; Liang, Y.; Jiang, X. (2008) *Analysis of eight organophosphorus pesticide residues in fresh vegetables retailed in agricultural product markets of Nanjing, China* *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 81, 377-382

Capítulo 2:

Estudio de formación de aductos en interfases a presión atmosférica (ESI y APCI) para la determinación de compuestos de baja ionización. Abamectina y Azadiractina como casos de estudio.

2.1. Introducción Capítulo 2.

Desde que en los años 80 se introdujo la fuente API en el acoplamiento LC-MS, ésta se ha extendido ampliamente en numerosos campos de aplicación analítica (Niessen, 1999), como son el campo medioambiental (Richardson, 2008), seguridad alimentaria (Zöllner *et al.*, 2006; Soler *et al.*, 2008), farmacéutico (Prakash *et al.*, 2007) y bioanalítico (Kyranos *et al.*, 2001; Gao *et al.*, 2005). Dentro de las interfases de API acopladas a MS, la interfase ESI es una buena elección para moléculas polares y/o iónicas de un limitado tamaño molecular, como son la gran mayoría de plaguicidas. Sin embargo, en algunos casos nos encontramos con moléculas de baja ionización, como son los compuestos polioxigenados sin centros ácidos y/o básicos, para los que el uso de APCI resulta más adecuado para su mejor ionización (Niessen, 1999; Schug *et al.*, 2002).

Tanto en la interfase ESI como en APCI, resulta interesante estudiar la formación de iones protonados/desprotonados así como aductos, ya que en algunos casos, puede generar iones más abundantes y/o una mayor especificidad y mejor confirmación. La formación de aductos en la interfase depende de muchas variables, de las cuales resultan más críticas la estructura molecular del analito, las características del solvente de la fase móvil y los modificadores añadidos en la misma. Pero, por lo general, la formación de aductos está más favorecida en fuentes ESI que en APCI. La forma más cómoda de favorecer la formación de aductos es añadiendo modificadores en la fase móvil. De hecho, es común la adición de modificadores ácidos (ácido fórmico o acético) o básicos (aminas terciarias) para favorecer la forma iónica de los grupos funcionales de la molécula que presentan cierta capacidad para protonarse ($[M+H]^+$) o desprotonarse ($[M-H]^-$), respectivamente. Sin embargo, en la fuente ESI suele darse la formación de otros aductos no deseados, especialmente $[M+Na]^+$ y $[M+K]^+$, como consecuencia de la presencia de sales de sodio o potasio en las fases móviles, en el medio de extracción, en la propia muestra, o en el sistema de determinación (Jemal *et al.*, 1997; Leitner *et al.*, 2007).

La formación de aductos con sodio se consideró inicialmente como una alternativa a los aductos $[M+H]^+$, sobre todo para alcoholes y lactonas que presentan poca capacidad de protonación (Jemal *et al.*, 1997; Boersen *et al.*, 2007). Así, el uso de aductos $[M+Na]^+$ en carbohidratos resultó ser positivo, proporcionando más sensibilidad y mayor información estructural (Harvey, 2000a), incluso permitió discernir isómeros en oligosacáridos de ácidos grasos (Pérez-Victoria *et al.*, 2008). Sin embargo, en otros estudios de compuestos polioxigenados, el espectro de fragmentación de $[M+Na]^+$ presentaba menos iones producto, además de una menor reproducibilidad tal como se observó en la determinación de antibióticos tipo políeter (Volmer *et al.*, 1998, Harris *et al.*, 1998; Lopes *et al.*, 2002), simvastatin y su hidroxí-ácido (Zhao *et al.*, 2002), paclitaxel (Mortier *et al.*, 2004), poliglicoles (Chen *et al.*, 2001) o cerebrósidos en hongos (Leverly *et al.*, 2000). Con el objetivo de evitar o disminuir la formación de estos aductos sodiados se han planteado diferentes estrategias. La más común ha sido la adición de modificadores volátiles en la fase móvil para formar otros aductos que desplacen la formación del aducto sodiado; otra posibilidad es la adición de sales como el cloruro de rutenio (III), o agentes complejantes de sodio, como éteres corona (Lopes *et al.*, 2002), que al presentar más afinidad por el sodio que el analito rebajan la concentración de sodio y disminuyen la formación de su aducto.

La formación de aductos de amonio ($[M+NH_4]^+$) suele ser la opción más extendida como alternativa a $[M+Na]^+$, proporcionando en la mayoría de los casos una fragmentación más abundante (Volmer *et al.*, 1998; Mortier *et al.*, 2004; Mortier *et al.*, 2005; Guan *et al.*, 2005), debido a la formación de interacciones iónicas más débiles que con iones de metales alcalinos como el sodio o potasio (Jonkers *et al.*, 2005). Una ventaja de este tipo de aductos es la posibilidad de ser utilizados en los dos tipos de interfases ESI y APCI (Kuورانne *et al.*, 2000; Byrdwell *et al.*, 2002; Mortier *et al.*, 2005). Por otro lado, un fenómeno añadido que presenta el uso de una sal de amonio (acetato o formiato de amonio) en la fase móvil es la formación del ión protonado del analito, debido al posible mecanismo disociativo de $[M+NH_4]^+$ a $[M+H]^+$ y NH_3 que tiene lugar durante el proceso de electrospray (Mortier *et al.*, 2005).

Otra alternativa a los aductos de sodio es el uso de otros metales monocargados como Li^+ (Volmer *et al.*, 1998; Harvey, 2000a; Levery *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2001, Bruggink *et al.*, 2005; D'Alexandri *et al.*, 2006; Bennion *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2007), Cs^+ (Volmer *et al.*, 1998; Harvey, 2000b; Chen *et al.*, 2001), Rb^+ (Harvey, 2000b), Ag^+ (Marwah *et al.*, 2002; Harvey, 2005) y doblemente cargados como Ca^{2+} (Harvey, 2001), Mg^{2+} (Harvey, 2001), Co^{2+} (Harvey, 2001; Leavell *et al.*, 2001), Zn^{2+} (Gaucher *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2001; Leavell *et al.*, 2001), Cu^{2+} (Leavell *et al.*, 2001) o Ni^{2+} (Chen *et al.*, 2001; Leavell *et al.*, 2001). Todos estos cationes suponen una interesante alternativa en la caracterización de macromoléculas polioxigenadas, pero no se han usado de forma rutinaria en aplicaciones cuantitativas. Sólo los aductos $[\text{M}+\text{Li}]^+$ se han utilizado para aplicaciones cuantitativas en los trabajos de Volmer *et al.* (1998) y Bruggink *et al.* (2005), y de forma semicuantitativa en el trabajo de D'Alexandri *et al.* (2006).

2.1.1. Referencias bibliográficas

- Bennion, B.; Dasgupta, S.; Hogan, E.L.; Levery, S.B. (2007) *Characterization of novel myelin components 3-O-acetyl-sphingosine galactosylceramides by electrospray ionization Q-TOF MS and MS/CID-MS of Li⁺ adducts* J. Mass Spectrom. 42, 598-620
- Boernsen, K. O.; Egge-Jacobsen, W.; Inverardi, B.; Strom, T.; Streit, F.; Schiebel, H.-M.; Benet, L.Z.; Cristians, U. (2007) *Assessment and validation of the MS/MS fragmentation patterns of the macrolide immunosuppressant everolimus* J. Mass Spectrom. 42, 793-802
- Bruggink, C.; Maurer, R.; Herrmann, H.; Cavalli, S.; Hoefler, F. (2005) *Analysis of carbohydrates by anion exchange chromatography and mass spectrometry* J. Chromatogr. A 1085, 104-109
- Byrdwell, W.C.; Neff, W.E. (2002) *Dual parallel electrospray ionization and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (MS), MS/MS, and MS/MS/MS for the analysis of triacylglycerols and triacylglycerol oxidation products* Rapid. Commun. Mass Spectrom. 16, 300-319
- Chen, R.; Li, L. (2001) *Lithium and transition metal ions enable low energy collision-induced dissociation of polyglycols in electrospray ionization mass spectrometry* J. Am. Soc. Mass Spectrom. 12, 832-839
- D'Alexandri, F.L.; Gozzo, F.C.; Eberlin, M.N.; Katzin, A.M. (2006) *Electrospray ionization mass spectrometry analysis of polyisoprenoid alcohols via Li⁺ cationization* Anal. Biochem. 355, 189-200
- Gao, S.; Zhang, Z.-P.; Karnes, H.T. (2005) *Sensitivity enhancement in liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry using derivatization and mobile phase additives* J. Chromatogr. A, 825, 98-110
- Gaucher, S.P.; Leary, J.A. (1998) *Stereochemical differentiation of mannose, glucose, galactose and talose using zinc (II) diethylenetriamine and ESI-ion trap mass spectrometry* Anal. Chem. 70, 3009-3014
- Guan, F.; Uboh, C.E.; Soma, L.R.; Luo, Y.; Rudy, J.; Tobin, T. (2005) *Detection, quantification and confirmation of anabolic steroids in equine plasma by liquid chromatography and tandem spectrometry* J. Chromatogr. B 829, 56-68
-

- Harris, J.A.; Russell, A.L.; Wilkins, J.P.G. (1998) *The characterization of polyether ionophore veterinary drugs by HPLC-electrospray MS* Analyst 123, 1625-1628
- Harvey, D.J. (2000a) *Electrospray mass spectrometry and fragmentation of N-linked carbohydrates derivatized at the reducing terminus* J. Am. Soc. Mass Spectrom. 11, 900-915
- Harvey, D.J. (2000b) *Collision-Induced fragmentation of underivatized N-linked carbohydrates ionized by electrospray* J. Mass Spectrom 35, 1178-1190
- Harvey, D.J. (2001) *Ionization and collision-induced fragmentation of N-linked and related carbohydrates using divalent cations* J. Am. Soc. Spectrom. 12, 926-937
- Harvey, D.J. (2005) *Ionization and fragmentation of N-linked glycans as silver adducts by electrospray mass spectrometry* Rapid Commun. Mass Spectrom. 19, 484-492
- Jemal, M.; Almond, R.B.; Teitz, D.S. (1997) *Quantitative bionalysis utilizing high-performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry via selected-ion monitoring of the sodium ion adduct $[M+Na]^+$* Rapid Commun. Mass Spectrom. 11, 1083-1088
- Jonkers, N.; Govers, H.; de Voogt, P. (2005) *Adduct formation in LC-ESI-MS of nonylphenol ethoxylates: mass spectrometrical, theoretical and quantitative analytical aspects* Anal. Chim. Acta 531, 217-228
- Kuuranne, T.; Vahermo, M.; Leinonen, A.; Kostianen, R. (2000) *Electrospray and atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometric behavior of eight anabolic steroid glucuronides* J. Am. Soc. Mass Spectrom. 11, 722-730
- Kyranos, J. N.; Cai, H.; Wei, D.; Goetzinger, W.K. (2001) *High-throughput high-performance liquid chromatography/mass spectrometry for modern drug discovery* Anal. Biotechnol. 12, 105-111
- Leavell, M.D.; Leary, J.A. (2001) *Stabilization and linkage analysis of metal-ligated sialic acid containing oligosaccharides* J. Am. Soc. Mass Spectrom. 12, 528-536
-

- Leitner, A.; Emmert, J.; Boerner, K.; Lindner, W. (2007) *Influence of solvent additive composition on chromatographic separation and sodium adduct formation of peptides in HPLC-ESI MS* Chromatographia 65, 649-653
- Leverly, S.B.; Toledo, M.S.; Doong, R.L.; Straus, A.H.; Takahashi, H.K. (2000) *Comparative analysis of ceramide structural modification found in fungal cerebroside by electrospray tandem mass spectrometry with low energy collision-induced dissociation of Li⁺ adduct ions* Rapid Commun. Mass Spectrom. 14, 551-563
- Leverly, S.B.; Toledo, M.S.; Straus, A.H.; Takahashi, H.K. (2001) *Comparative analysis of Glycosylinositol Phosphorylceramides from Fungi by electrospray tandem mass spectrometry with low-energy collision-induced dissociation of Li⁺ adduct ions* Rapid Commun. Mass Spectrom. 15, 2240-2258
- Lin J.-T.; Arcinas, A. (2007) *Regiospecific analysis of ciricinoeoylacylglycerols in Castor (Ricinus communis L.) Oil by electrospray ionization-mass spectrometry* J. Agric. Food Chem. 55, 2209-2216
- Lopes, N.P.; Stark, C.B.W.; Gates, P.J.; Staunton, J. (2002) *Fragmentation studies on monensin A by sequential electrospray mass spectrometry* Analyst 127, 503-506
- Marwah, A.; Marwah, P.; Lardy, H. (2002) *Analysis of ergosteroids VIII: enhancement of signal response of neutral steroidal compounds in liquid chromatographic-electrospray ionization mass spectrometric analysis by mobile phase additives* J. Chromatogr. A 964, 137-151
- Mortier, K.A.; Zhang, G.-F.; van Peteghem, C.H.; Lambert, W.E. (2004) *Adduct formation in quantitative bioanalysis: effect of ionization conditions on paclitaxel* J. Am. Soc. Spectrom. 15, 585-592
- Mortier, K.A.; Renard, V.; Verstraete, A.G.; Van Gussem, A.; Van Belle, S.; Lambert, W.E. (2005) *Development and validation of liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for the quantification of docetaxel and paclitaxel in human plasma and oral fluid* Anal. Chem. 77, 4677-4683
- Niessen, W.M.A. (1999) *State-of-the-art in liquid chromatography-mass spectrometry* J. Chromatogr. A 856, 179-197
-

- Pérez-Victoria, I.; Zafra, A.; Morales, J.C.; *Positive-ion ESI mass spectrometry of regioisomeric nonreducing oligosaccharide fatty acid monoesters: In-source fragmentation of sodium adducts* J. Mass Spectrom. 43, 633-638
- Prakash, C.; Shaffer, C.L.; Nedderman, A. (2007) *Analytical strategies for identifying drug metabolites* Mass Spectrom. Rev. 26, 340-369
- Richardson, S.D. (2008) *Environmental Mass Spectrometry: Emerging Contaminants and Current Issues* Anal. Chem. 80, 4373-4402
- Schug, K.; McNair, H.M. (2002) *Adduct formation in electrospray ionization. Part 1: Common acidic pharmaceuticals* J. Sep. Sci. 25, 760-766
- Soler, C.; Mañes, J.; Picó, Y. (2008) *The role of the liquid chromatography-mass spectrometry in pesticide residue determination in food* Crit. Rev. Anal. Chem. 38, 93-117
- Volmer, D.A.; Lock, C.M. (1998) *Electrospray ionization and collision-induced dissociation of antibiotic polyether ionophores* Rapid Commun. Mass Spectrom. 12, 157-164
- Zhao, J.J.; Yang, A.Y.; Douglas Rogers, J. (2002) *Effects of liquid chromatography mobile phase buffer contents on the ionization and fragmentation of analytes in liquid chromatographic/ion spray tandem mass spectrometric determination* J. Mass Spectrom. 37, 421-433
- Zöllner, P.; Mayer-Helm, B. (2006) *Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmospheric pressure ionization mass spectrometry* J. Chromatogr. A 1136, 123-169
-

2.2. Evaluación de las fuentes de ionización ESI, APCI y APCI Sabre para la determinación cuantitativa y confirmativa de azadiractina.

2.2.1. Introducción

La azadiractina (*Azadirachtin indica A*) (**Figura 2.1**) es un insecticida natural extraído del aceite de semilla del árbol de *neem*, su aplicación en larvas causa la mortalidad a diferentes estadios de su desarrollo, así como malformaciones y reducción de la fertilidad y longevidad de los adultos (Barrek *et al.*, 2004). Se han realizado varios trabajos para la caracterización de azadiractina y sus metabolitos, ya que es un compuesto de alta termolabilidad (Schaaf *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2003; Barrek *et al.*, 2004). En la caracterización de azadiractina A por LC-MS se ha encontrado que se ioniza para la formación del ion protonado $[M+H]^+$ en ESI positivo, así como para la formación de aductos de $[M+Na]^+$ (Sharma *et al.*, 2003; Barrek *et al.*, 2004) y $[M+K]^+$ (Sharma *et al.*, 2003). Barrek *et al.* (2004) también ha podido caracterizar mediante ESI-MS/MS en modo negativo la azadiractina, seleccionando como ion precursor el $[M-H]^-$ (m/z 719). Mientras que su ionización en APCI se ha descrito como $[M-H_2O+H]^+$ en positivo y $[M-H]^-$ en negativo (Barrek *et al.*, 2004). En estos trabajos de caracterización se han encontrado otros compuestos de la familia de la azadiractina que también pueden presentar actividad insecticida, estos se han etiquetado como azadiractina B, H, D e I, así como salanina, desacetilsalanina, nimbina y desacetilnimbina.

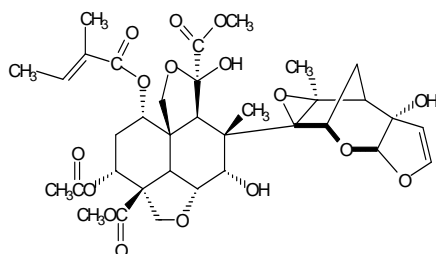


Figura 2.1. Estructura del insecticida azadiractina.

Por otro lado, se han desarrollado métodos de determinación de azadiractina por LC-ESI-MS/MS en muestras de origen vegetal (melocotón, fresa y tomate) seleccionando como ion precursor el $[M+Na]^+$ y estimando LOD de 0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tras una preconcentración de 25 veces (Caboni *et al.*, 2006; Sarias *et al.*, 2008). En el trabajo de Sarias *et al.* (2008), se seleccionó como ion producto para la cuantificación una pérdida de H_2O del aducto sodiado. Este tipo de transiciones con pérdida de baja selectividad, como molécula de agua, se consideran poco

específicas. Sin embargo, en un trabajo anterior del mismo grupo (Caboni *et al.*, 2006) se estudió la fragmentación de la azadiractina A, considerando también el ion protonado y el potasiado en ESI positivo de azadiractina, así como diversos iones producto de mayor selectividad ($[M-2H_2O-TFA]^+$ y $[M-3H_2O-TFA]^+$). Además, en nuestro grupo (Pozo *et al.*, 2003) se ha desarrollado un método de análisis conjunto de abamectina y azadiractina en muestras de naranja mediante LC-ESI-MS/MS en modo positivo, seleccionando como ion precursor $[M+Na]^+$, y aplicando un método de tratamiento de muestra mínimo, se alcanza un LOQ de 0.01 mg/kg y un LOD estimado de 0.002 mg/kg.

El objetivo del trabajo que se presenta a continuación es el estudio del comportamiento de la azadiractina en fuentes tipo API, tales como ESI, APCI y APCI Sabre, en la técnica LC-MS/MS. Además, se evalúa la formación de los diferentes aductos en modo positivo mediante la adición de diferentes aditivos en la fase móvil e incluso en el vial. El objetivo es alcanzar las condiciones de ionización más adecuadas para obtener una mayor sensibilidad y reproducibilidad en el desarrollo de métodos analíticos para la determinación de azadiractina en muestras de origen vegetal. Se han seleccionado como ejemplos, hojas de fresno y naranjas.

Para la matriz de hoja de fresno, se ha estudiado la formación de los aductos derivados de la adición de iones NH_4^+ , Na^+ y Li^+ exclusivamente en la fase móvil en la interfase ESI en modo positivo, mediante el uso de sus sales de acetato. Mientras que en el caso de muestras de naranja, se ha evaluado la formación de los aductos amoniados frente a los sodiados en las tres fuentes de ionización (ESI, APCI, APCI Sabre), en ausencia y presencia de modificador acetato de amonio o de sodio, tanto en el vial como en la fase móvil. En ambos casos la meta final era valorar la sensibilidad, la precisión y la especificidad de las transiciones de cuantificación y confirmación como parámetros clave.

2.2.2. Experimental

• *Reactivos*

El patrón de referencia de azadiractina (pureza reactivo técnico) fue adquirido de *Chem Service* (West Chester, PA, EEUU). Acetato de litio dihidratado ($\text{LiOAc} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, > 63%), acetato de cobalto tetrahidratado ($\text{CoOAc} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, > 98%) y la trietilamina ($(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$ (TEA), > 99%) se adquirieron en Sigma (St. Louis, MO, EEUU). Acetato de níquel ($\text{NiOAc} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, > 98%) se obtuvo de Panreac (Barcelona, España). Acetato de sodio anhidro (NaOAc , >99 %), acetato de amonio (NH_4OAc , > 98%), acetonitrilo y metanol grado HPLC, además de la acetona grado análisis de residuos fue suministrado por Scharlab (Barcelona, España). Agua HPLC se purificaba mediante el sistema de Milli-Q Gradient A10 (Millipore, Billerica, MA, EEUU).

Las disoluciones patrón se obtenían por dilución de la disolución madre de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, preparada a partir del patrón sólido tomando 10 mg y llevándolos a un volumen de 50 mL con acetona mediante material volumétrico. Estas disoluciones patrón se diluían a partir de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en acetonitrilo.

Las sales se prepararon por separado disolviendo la cantidad correspondiente en 25 mL para obtener una concentración de 500 mM (1.04 g de NaOAc , 2.02 g de $\text{LiOAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 3.18 g de $\text{CoOAc} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.98 g de NH_4OAc , 1.28 g de TEA, y 3.17 g de $\text{NiOAc} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$).

• *Instrumentación*

Sistema de LC Waters Alliance 2795 (Waters, Milford, MA, EEUU) acoplado a un triple cuadrupolo de MS. La separación cromatográfica fue llevada a cabo mediante una columna 5 μm Supelcosil ABZ+PLUS 10 cm x 2.1 mm de diámetro interno (d.i.) (Supelco, Bellefonte, PA, EEUU) a un flujo de 0.3 mL/min para la interfase ESI, mientras que la columna utilizada para APCI fue C_{18} 5 μm X-Terra 50 x 4.6 mm d.i. con flujo de 0.8 mL/min. Las fases móviles utilizadas se han basado en mezclas de H_2O y MeOH HPLC, a las que se les ha añadido diferentes concentraciones de aditivos, siguiendo el gradiente cromatográfico que corresponde a la variación lineal de la concentración de solvente orgánico metanol: 0 min, 35%; 2 min, 35%; 5 min, 90%; 7 min, 90%; 7.1 min, 35%; 12.0, 35%, en el caso de ESI; y a 0 min, 35%; 2 min, 35%; 7 min, 90%; 8 min, 90%; 8.1 min, 35%, 14 min, 35%, en APCI.

Como instrumento de MS se ha hecho uso de un Quattro Micro API (cuadrupolo-hexapolo-cuadrupolo) con tres fuentes de ionización ESI, APCI y APCI Sabre (Waters). Como gas de nebulización se ha utilizado gas nitrógeno obtenido de un generador de nitrógeno NM30LA *Gas Station de Peak Scientific* (Inchinnan,

Escocia). Para la fuente ESI los flujos utilizados de gas de desolvatación y gas de cono fueron de 600 L/h y 60 L/h, respectivamente. Para las fuentes APCI y APCI Ion Sabre, los flujos de gas de desolvatación y gas de cono fueron respectivamente 200 L/h y 40 L/h.

Las experiencias de infusión se realizaron mediante con una bomba de jeringa a un flujo de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ por ESI, y la bomba Alliane 2795 a un flujo de 0.8 mL/min para APCI.

En el caso de trabajar en modo MS/MS se introduce gas argón 99.995% (Carbuos Metalicos, Valencia, España) en la celda de colisión a una presión de $3 \cdot 10^{-3}$ mbar. El voltaje del capilar en ESI era de 3.5 kV y la intensidad de corriente para el caso de APCI fue de 25 μA . La temperatura de desolvatación y la temperatura de la fuente en el caso de ESI fueron de 350 $^{\circ}\text{C}$ y 120 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente; en el caso de APCI, éstas fueron de 450 $^{\circ}\text{C}$ y 130 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Se seleccionaron valores de *dwell* de 0.2 s/scan. Se establecieron valores de *solvent delay* de 4 min (ESI) y 5 min (APCI) con la intención de obtener un *clean-up* adicional mediante una válvula de 6 vías controlada por el *software* Masslynx NT v. 4.0 (Waters). Para procesar y cuantificar de forma automática los datos adquiridos se hizo uso del *software* *QuanLynx application manager* (Waters).

• **Tratamiento de muestra**

El estudio de azadiractina se realizó en dos matrices diferentes: naranja y hojas de fresno. Las matrices se trataron con métodos de extracción diferentes. En el caso de naranja, el tratamiento de muestra utilizado fue pesar 25 g (precisión 0.1 mg) de naranja triturada y homogeneizada se mezclaron con 80 mL de acetonitrilo HPLC. La extracción se realizó con un agitador de alta velocidad Ultraturax T25 (Janke & kunkel, Staufen, Alemania) a 8000 rpm durante 2 min. El extracto se filtró a través de un filtro de pliegues, lavándolo con acetonitrilo HPLC. Finalmente, el volumen fue ajustado a 100 mL con acetonitrilo HPLC mediante material volumétrico.

En el caso de hojas de fresno, se tomó 1 g (precisión 0.1 mg) de hojas trituradas y homogeneizadas, a las que se les añadió 5 mL de acetonitrilo HPLC y 400 mg de MgSO_4 anhidro. La muestra se extrajo mediante un agitador ultraturax a 8000 rpm durante 1 min, seguida de una centrifugación de 5 min a 3500 rpm para descartar la fase sólida. El extracto líquido se enraso hasta un volumen final de 10 mL con acetonitrilo HPLC.

La fortificación de los extractos se realizó después de la extracción a una concentración de 200 ng/mL. Una vez fortificado el extracto se pasó por un filtro de Nylon de 0.45 μm para eliminar las posibles partículas en suspensión que

podieran afectar a las columnas cromatográficas. Los análisis del extracto de naranja y del extracto de hojas de fresno se realizaron mediante la inyección de 10 μL y 50 μL para LC-ESI-MS/MS y LC-APCI-MS/MS, respectivamente.

2.2.3. Resultados y Discusión

• Optimización de las condiciones de MS

En primer lugar, se obtuvieron los espectros en MS *scan* y los espectros de iones producto en MS/MS *scan* mediante infusión en ESI positivo, adicionando los modificadores de acetato de amonio, de litio y de sodio. Se seleccionaron tres transiciones para cada uno de los aductos $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, $[\text{M}+\text{Li}]^+$ y $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (**Figura 2.2**), tal como se muestra en la **Tabla 2.1**. En la selección del ion precursor para la azadiractina en medio amoniado, se obtenía el propio ion $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ (m/z 738.3) pero también se observó el ion $[\text{M}+\text{NH}_4-\text{NH}_3-\text{H}_2\text{O}]^+$ (m/z 703.2, que se puede simplificar de la forma $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$), más abundante, por lo que fue seleccionado como precursor. De la misma forma, para el aducto litiado se produce una pérdida de una molécula de agua (m/z 709.4) de la estructura molecular del mismo con facilidad y gran abundancia en la fuente de ionización, haciéndolo propicio para ser seleccionado como ion precursor.

Tabla 2.1. Transiciones MS/MS seleccionadas para los aductos $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, $[\text{M}+\text{Li}]^+$ y $[\text{M}+\text{Na}]^+$ de la azadiractina.

Aducto	Transición MS/MS	Cono (V)	Colisión (eV)
$[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$	703.2 > 567.1 (Q)	20	15
	703.2 > 585.1 (q_1)	20	15
	703.2 > 685.2 (q_2)	20	10
$[\text{M}+\text{Li}]^+$	727.4 > 709.4 (Q)	30	25
	709.4 > 649.7 (q_1)	60	35
	709.4 > 549.4 (q_2)	60	40
$[\text{M}+\text{Na}]^+$	743.3 > 725.4 (Q)	60	40
	743.3 > 665.4 (q_1)	60	35
	743.3 > 625.4 (q_2)	60	30

En la **Tabla 2.1** se han ordenado las transiciones en función de su sensibilidad, etiquetándose como $Q > q_1 > q_2$. De forma que la de mayor sensibilidad

se aplicará con fines cuantitativos (Q), mientras que las otras dos se utilizarán con fines confirmativos (q_1 y q_2).

Se llevó a cabo la infusión de la azadiractina con acetato de níquel y cobalto sin obtener formación de iones aducto de interés, por lo que no se ha incluido en la **Tabla 2.1**. Cabe comentar que también se realizaron experiencias de infusión en ESI en modo negativo sin obtener buenos resultados, incluso adicionando una base fuerte como la trietil amina. Por lo que la ionización por desprotonación en negativo tanto por ESI como APCI no ha sido considerada en este estudio.

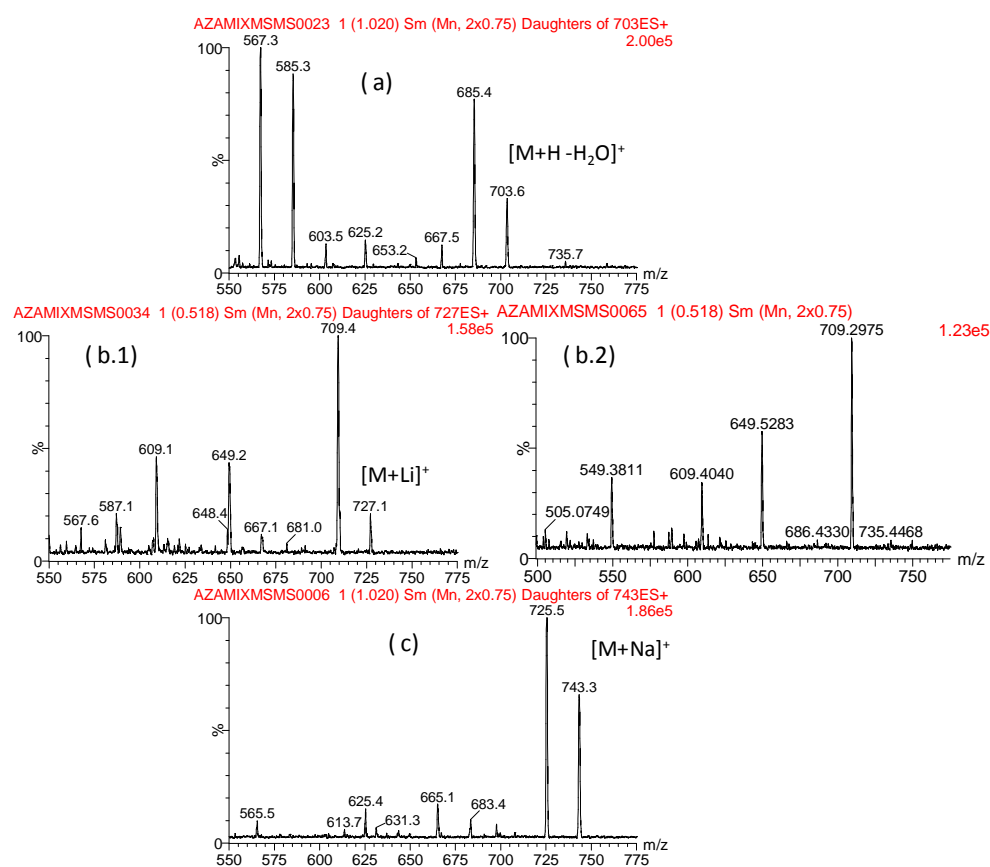


Figura 2.2. Espectros infusión ESI-MS/MS de patrón de azadiractina de 500 ng/mL con formación de aductos y su fragmentación adicionando (a) acetato de amonio, (b.1) (b.2) acetato de litio y (c) acetato de sodio. (b.2) Espectro de fragmentación del ión de cono m/z 709.4 ($[M+Li-H_2O]^+$) del aducto de litio.

- **Optimización de la señal en matriz cruda de hojas de fresno.**

Parámetros cromatográficos.

Teniendo en cuenta los tres tipos posibles de ionización en ESI+ para la molécula de azadiractina, y después de haber optimizado las condiciones MS para la transición más sensible de cada uno de ellos, resultó interesante estudiar la concentración adecuada de los distintos aditivos en la fase móvil para la obtención de la máxima sensibilidad. Dependiendo del aducto deseado, se utilizó un modificador u otro, como se indica a continuación:

- $[M+H-H_2O]^+$, se estudió la ionización sin adición de modificadores en la fase móvil, además de los aditivos HCOOH y NH_4OAc a los intervalos de concentración de 0.001–0.1% y 5–500 μM , respectivamente.
- $[M+Na]^+$, también se estudio la formación del mismo sin la adición de aditivo, debido a que la presencia de sodio es muy habitual como impureza en los disolventes y en la propia muestra. Además, se estudio la adición de los aditivos HCOOH y NH_4OAc y NaOAc a las concentraciones 0.001–0.1 %, 5–500 μM y 1–50 μM , respectivamente.
- $[M+Li]^+$, en este caso fue necesaria la adición de un modificador en las fases móviles para su formación, ya que a diferencia del sodio el litio es poco abundante de manera natural, este fue LiOAc en concentraciones 1–100 μM .

Para cada uno de los aductos se llegó a unas condiciones de máxima sensibilidad, que se indican en la **Tabla 2.2**, para la cual se realizó una estimación del LOD en extracto de matriz de hoja de fresno a partir del fortificado al nivel de 200 ng/mL. Este valor de LOD se obtuvo como valor medio a partir de la estimación en 6 réplicas. En dicha tabla no se han incluido los valores obtenidos para los casos en que se ha ensayado la ionización sin adición del modificador en la fase móvil, ya que no resultó ser la opción más satisfactoría.

A partir de los valores estimados de los LOD en la **Tabla 2.2.**, se puede concluir que las condiciones de mayor sensibilidad para la determinación de azadiractina en hojas de fresno es la adición de 50 μM de LiOAc en la fase móvil.

Tabla 2.2. Concentraciones óptimas de aditivo en la fase móvil para la formación de aductos $[M+H-H_2O]^+$, $[M+Na]^+$ y $[M+Li]^+$.

Aducto	Transición MS/MS	Aditivo	LOD ($\mu\text{g/L}$)
$[M+Li]^+$	727>709	50 μM LiOAc	0.6
		5 μM NaOAc	0.8
$[M+Na]^+$	743>725	10 μM NH_4OAc	1.7
		0.001% HCOOH	2.5
$[M+H-H_2O]^+$	703>567	100 μM NH_4OAc	1.2
		0.01% HCOOH	1.8

Sin embargo, si se estudian también las otras transiciones optimizadas con el objetivo de conocer la capacidad confirmativa para crear un método analítico más completo en la identificación del analito, se puede observar que la relación de abundancias entre el pico más abundante y los dos siguientes optimizados pueden variar considerablemente entre los tres aductos (**Tabla 2.3**).

Tabla 2.3. Cálculo de las relaciones de abundancia (*Ion Ratio*, IR) entre la transición más abundante (Q) y las de confirmación (q_1 y q_2).

Aducto	Q/ q_1	IR ₁	Q/ q_2	IR ₂
$[M+H-H_2O]^+$	703>567/703>585	1.4	703>567/703>685	1.4
$[M+Li]^+$	727>709/709>649	8.8	727>709/709>549	10.3
$[M+Na]^+$	743>725/743>625	10.4	743>725/743>665	11.1

A partir de la **Tabla 2.3**, se puede concluir que a pesar que la sensibilidad de Q para el aducto $[M+H-H_2O]^+$ sea menor, su capacidad confirmativa se encuentra en valores de detección muy cercanos al de su capacidad de cuantificación, por lo que se podría estimar que a concentraciones cercanas a 2 $\mu\text{g/L}$ de azadiractina en extracto sería posible confirmar su presencia sobradamente con dos transiciones adicionales. En la **Figura 2.3** se puede apreciar las diferentes abundancias de cada una de las transiciones optimizadas para cada uno de los aductos.

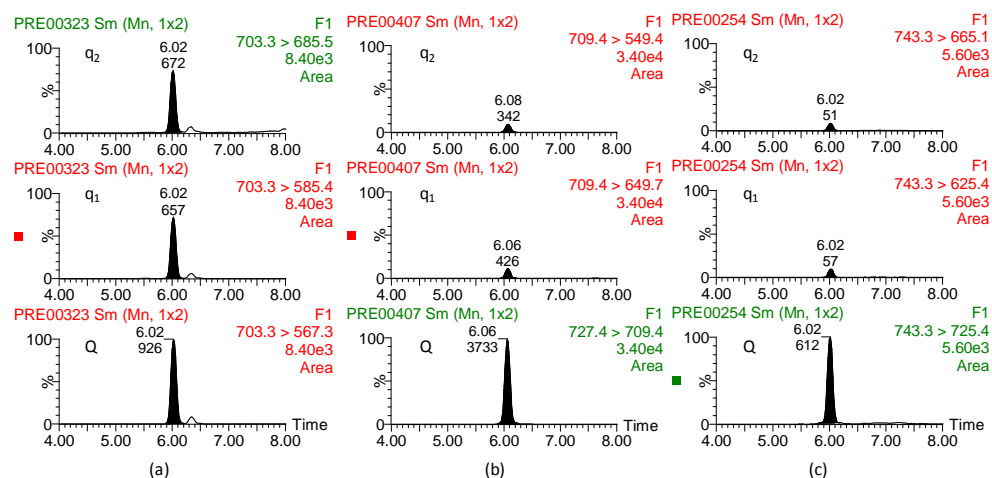


Figura 2.3. Cromatogramas LC-ESI-MS/MS para los aductos de azadiractina (a) $[M+H-H_2O]^+$, (b) $[M+Li]^+$ y (c) $[M+Na]^+$, en extracto blanco de hoja de fresno fortificada a 200 ng/mL, mediante la adición en la fase móvil de 10 μ M NH_4OAc , 50 μ M $LiOAc$ y 5 μ M de $NaOAc$, respectivamente.

Otra conclusión que se puede extraer del estudio de fragmentación de los diferentes aductos, así como de la relación de abundancia de las diferentes transiciones, es que la fragmentación de los aductos obtenidos por ionización con metales monocargados como el sodio y litio es menor y menos abundante.

• *Experiencias con Azadiractina en extracto de naranja*

Por otro lado, se llevaron a cabo experiencias en LC con extractos de naranja fortificados a 200 ng/mL para cada una de las interfases ESI, APCI e Ion Sabre APCI en modo positivo. En este caso no se estudio el aducto litiado como en el caso de las hojas de fresno. Por lo que el estudio se centró en los aductos de sodio ($[M+Na]^+$) y amonio ($[M+NH_4-NH_3-H_2O]^+$, que se puede simplificar de la forma $[M+H-H_2O]^+$).

De las tres transiciones, se seleccionaron como transición de cuantificación (Q) y de confirmación (q_1 y q_2) las tres más sensibles (**Tabla 2.1**). El aducto de sodio no se llegó a observar en las fuentes de APCI, mientras que el aducto amoniado ($[M+H-H_2O]^+$) presentaba el siguiente orden de sensibilidad en las diferentes fuentes API: APCI < ESI < Ion Sabre APCI. La fuente Ion Sabre APCI permitió aumentar la sensibilidad para el aducto amoniado en unas 10 veces con respecto a la fuente APCI tradicional, mientras que con la fuente de ESI la abundancia sólo aumentó en un 25%. Por ello, se estudió con más detalle el

efecto de la adición de modificador, tanto en la fase móvil como en el vial, en los dos casos más favorables para cada uno de los aductos ($[M+Na]^+$ en ESI y $[M+H-H_2O]^+$ en Ion Sabre APCI).

La repetibilidad de la formación del aducto se estudió considerando dos opciones, la adición del modificador en la fase móvil o la adición en el vial. Cada uno de los ensayos se realizó para $n = 10$ réplicas, inyectando un extracto de naranja fortificado a 200 ng/mL.

En el caso del aducto $[M+Na]^+$, la opción más satisfactoria fue la adición de acetato de sodio en el vial (60 mM), frente a la adición en la fase móvil, obteniendo RSD % menores del 10%. Por otro lado, en el caso del aducto $[M+H_2O-H]^+$, la adición del modificador acetato de amonio a una concentración 5 mM en la fase móvil resultó una opción adecuada para obtener una reproducibilidad (RSD 12%) satisfactoria. Pero, la formación de este aducto todavía mejoraba más (RSD < 5%) si se adicionaba el acetato de amonio tanto en el vial (60 mM NH_4OAc) como en la fase móvil (5 mM NH_4OAc).

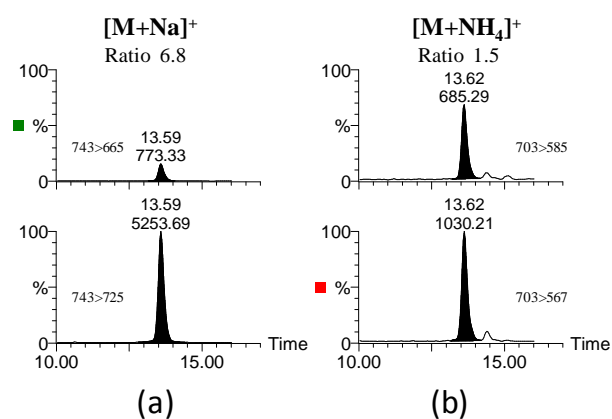


Figura 2.4. Cromatogramas LC-MS/MS de un extracto de naranja fortificado a 200 ng/mL para los aductos de (a) $[M+Na]^+$ y (b) $[M+NH_4]^+$. Transición de (abajo) cuantificación y (arriba) confirmación.

Por otro lado, cabe destacar que en ambos casos se comprobó que si no se adicionaba ningún modificador que favoreciese la formación de aductos se obtenía una RSD mayor del 20%. En definitiva, se consideró como estrategia más adecuada para la determinación de azadiractina en naranjas, la adición de acetato amónico en la fase móvil y en el vial (5 mM y 60 mM, respectivamente) adquiriendo las transiciones seleccionadas para el aducto $[M+H-H_2O]^+$, mientras

que en el caso de $[M+Na]^+$ sólo se adicionaba en el vial (60 mM). Alcanzándose LOQs del orden de 0.01 mg/kg en las dos opciones, suficientes para el control al nivel del LMR (0.5 mg/kg).

A pesar de que la sensibilidad para el aducto $[M+Na]^+$ fue mayor, la especificidad de la transición de cuantificación no se consideró adecuada, ya que se trataba de una deshidratación del ion sodiado. Por otro lado y al igual que en el caso de la matriz de hoja de fresno, la relación de abundancia entre las transiciones de cuantificación y confirmación ($Q/q_1 = 6.8$, **Figura 2.4a**) fue mucho mayor que para el aducto de amonio ($Q/q_1 = 1.5$, **Figura 2.4b**). Este hecho corrobora la dificultad que los aductos de sodio presentan en la fragmentación, tal como se ha comentado en el caso de su determinación en hojas de fresno.

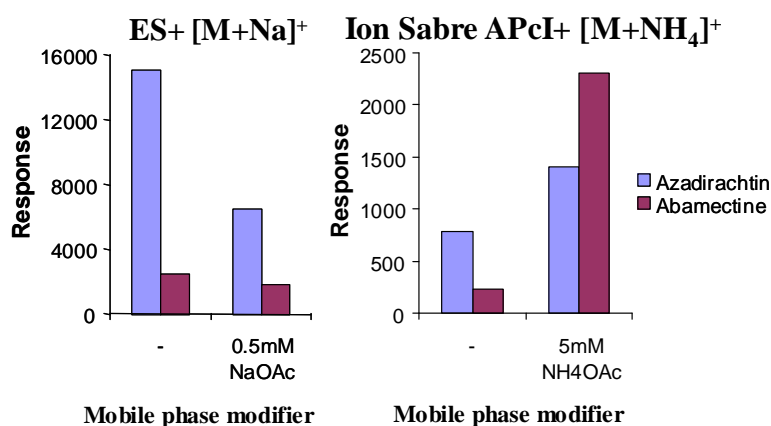


Figura 2.5. Respuesta de abamectina y azadiractina al añadir modificador en la fase móvil para la formación de los aductos $[M+Na]^+$ en ESI y $[M+NH_4]^+$ en la fuente Ion Sabre APCI.

Finalmente, resulta interesante comentar la **Figura 2.5**, donde se presentan los resultados obtenidos del estudio de la azadiractina y abamectina en la matriz de naranja, que sirve a su vez de introducción para el apartado que se presenta a continuación. En esta figura se observa el comportamiento de abamectina y azadiractina en las interfases conforme se adiciona modificador en la fase móvil. En el caso de ESI, se produce una disminución de la sensibilidad en ambos compuestos, incluso del 50% para la azadiractina, al adicionar 0.5 mM de acetato sódico en la fase móvil. Este hecho singular se debe a la supresión de la señal provocado por la introducción del propio modificador en la fase móvil. Sin embargo, en la fuente Ion Sabre APCI se produce el efecto contrario, ya que se observa un aumento considerable de la sensibilidad al añadir 5 mM de acetato

amónico en la fase móvil, llegando incluso a incrementos del orden de 10 veces en el caso de la abamectina. A diferencia de la fuente ESI, la fuente APCI presenta la característica singular de no verse afectada de forma tan acusada por el efecto matriz, permitiendo la adición de mayor concentración de aditivos en la fase móvil. A partir de estas experiencias se deduce que resulta importante llegar a un compromiso en la concentración de modificador en la fase móvil para obtener una buena reproducibilidad de la señal, sin llegar a perder demasiada sensibilidad por efecto matriz del propio modificador.

Se puede concluir que se han desarrollado diferentes estrategias para el análisis de azadiractina en matrices de hoja de fresno y naranja con niveles adecuados de sensibilidad para su determinación a nivel de residuos. En ambos casos, la formación de aductos amoniados ha sido la opción más adecuada para un análisis sensible, robusto, y con capacidad confirmativa.

2.2.4. Referencias bibliográficas

- Barrek, S.; Paisse, O.; Grenier-Loustalot, M.-F. (2004) *Analysis of neem oils by LC-MS and degradation kinetics of azadirachtin-A in a controlled environment. Characterization of degradation products by HPLC-MS-MS* Anal. Bional. Chem. 378, 753-763
- Caboni, P.; Sarias, G.; Angioni, A.; Garcia, A.J.; Lai, F.; Dedola, F.; Cabras, P. (2006) *Residue and persistence of Neem formulations on strawberry after field treatment* J. Agric. Food Chem. 54, 10026-10032
- Pozo, O.J.; Marin, J.M.; Sancho, J.V.; Hernández, F. (2003) *Determination of abamectin and azadirachtin residues in orange samples by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry* J. Chromatogr. A 992, 133-140
- Sarias, G.; Caboni, P.; Sarritzu, E.; Russo, M.; Cabras, P. (2008) *A simple and selective method for measurement of Azadirachtin and related azadirachtoid levels in fruits and vegetables using liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry* J. Agric. Food Chem. 56, 2939-2943
- Schaaf, O.; Jarvis, A.P.; van der Esch, S.A.; Giagnacovo, G.; Oldham, N.J. (2000) *Rapid and sensitive analysis of azadirachtin and related triterpenoids from Neem (Azadirachta indica) by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry* J. Chromatogr. A, 886, 89-87.
- Sharma, V.; Walia, S.; Kumar, J.; Nair, M.G.; Parmar, B.S. (2003) *An efficient method for the purification and characterization of Nematicidal Azadirachtins A, B and H, using MPLC and ESIMS* J. Agric. Food Chem. 51, 3966-3972
-

2.3. Evaluación de las fuentes de ionización ESI, APCI y APCI Sabre para la determinación cuantitativa y confirmativa de abamectina.

2.3.1. Introducción

La abamectina es un insecticida y antiparásito de la familia de avermectinas dentro de los insecticidas tipo lactonas macrocíclicas. Se obtiene de forma natural a partir de cultivos de la bacteria *Streptomyces avermitilis*, obteniéndose una mezcla de compuestos homólogos (80% de avermectina B_{1a} y 20% de avermectina B_{1b}). Los métodos desarrollados para el análisis de abamectina por LC con FD en muestras vegetales han necesitado una derivatización, generalmente con anhídrido de trifluoroacético y N-metilimidazol (Diserens *et al.*, 1999; Valenzuela *et al.*, 2001; Hernández Borges *et al.*, 2008), alcanzándose LOQ de 0.002 mg/kg en frutas y tomates y de 0.0005 mg/kg en naranjas y 0.003 mg/kg en aguacate, respectivamente. Considerando que el LMR más bajo en vegetales para la abamectina es de 0.01 mg/kg siguiendo los criterios de la Unión Europea, en todos los casos se pudo llegar a determinar correctamente el analito. En el estudio comparativo para la determinación de abamectina en naranjas mediante LC-UV, LC-FD y LC-MS realizado por Valenzuela *et al.* (2001), se consideró que el método desarrollado por LC-UV era el menos ventajoso y se seleccionó el LC-FD como el más sensible e instrumentalmente más económico. Sin embargo, en el análisis por LC-FD era necesario un tratamiento previo de la muestra por SPE (Diserens *et al.*, 1999; Hernández Borges *et al.*, 2008), o bien por MSPD (Valenzuela *et al.*, 2001), con el objetivo de eliminar la máxima cantidad de interferentes. En el trabajo de Pozo *et al.* (2003) se ha llevado a cabo la determinación de abamectina en naranja mediante LC-MS/MS sin tratamiento previo de la muestra, inyectando directamente en el sistema el extracto crudo de la muestra, disminuyendo así posibles fuentes de error o pérdidas de analito.

En la bibliografía se ha reportado la determinación de abamectina en vegetales mediante LC-MS/MS, utilizando tanto interfase ESI como APCI. En general, se ha utilizado más frecuentemente la fuente ESI, obteniendo la ionización de la abamectina en positivo mediante la formación de $[M+NH_4]^+$ (Zywitz *et al.*, 2004) o de $[M+Na]^+$ (Valenzuela *et al.*, 2000; Pozo *et al.*, 2003). También se ha hecho uso de la fuente APCI en positivo previa la formación de aductos $[M+NH_4]^+$ (Hegel *et al.*, 2008). Por otro lado, se han desarrollado métodos analíticos cuantitativos (Wu *et al.*, 2001) y confirmativos (Turnipseed *et al.*, 1999; Howells *et al.*, 2001) para la determinación de avermectinas en muestras de origen animal mediante APCI en modo negativo, $[M-H]^-$. El grupo de Turnipseed *et al.* (2006) también ha llevado a cabo un estudio comparativo entre las fuentes ESI y APCI para drogas de origen veterinario en muestras animales. En este trabajo se utilizó una fuente APCI con descarga eléctrica, donde la corona actúa en la

ionización mediante una corriente del orden de unidades de μA ; y también una fuente APCI sin corona, denominando *No-discharge* APCI (ND-APCI). Estas experiencias se realizaron añadiendo ácido fórmico en la fase móvil y se encontró que las interfases ESI y ND-APCI daban lugar a la formación de los mismos aductos. En concreto para la abamectina, en ambas fuentes predominaba el aducto $[\text{M}+\text{Na}]^+$, siendo la interfase ESI más sensible que ND-APCI, mientras que en modo APCI no llegó a detectarse dicho aducto.

El objetivo del trabajo que se presenta a continuación es estudiar el efecto de la adición de diferentes modificadores en la fase móvil para obtener una ionización reproducible y robusta mediante las fuentes ESI, APCI y Ion sabre APCI en el análisis por LC-MS/MS de analitos que presentan problemas de ionización, habiendo escogido la abamectina como caso de estudio. Se pretende obtener de ese modo un método analítico fiable y reproducible a nivel cuantitativo y confirmativo para residuos de abamectina en muestras de vegetales.

Además de la clásica APCI se ha hecho uso de la APCI Sabre (Waters), un nuevo diseño de fuente API que presenta mejoras en la forma de distribuir el calor así como un flujo de gas de soporte adicional al convencional, permitiendo una mejor vaporización y por tanto trabajar a flujos de cromatografía más altos sin pérdida de sensibilidad.

Se ha estudiado la sensibilidad y la reproducibilidad en modo de ionización negativo por la desprotonación de los grupos hidroxilo, así como en modo de ionización positivo por la formación de diferentes aductos de Na^+ , NH_4^+ , Li^+ , Ni^{2+} y Co^{2+} , mediante la adición de sus correspondientes sales volátiles de acetato en las fases móviles a diferentes concentraciones. Se han optimizado los parámetros MS para cada una de las interfases API, buscando en todo caso las condiciones cromatográficas óptimas para que los resultados sean comparables. Para la fuente de ESI se ha utilizado una columna de fase reversa C_{18} de 1 mm de diámetro interno con un tamaño de partícula de $3.5 \mu\text{m}$, con una velocidad de flujo de $60 \mu\text{L}/\text{min}$ y un volumen de inyección de muestra de $3 \mu\text{L}$. Mientras que en las interfases APCI y Ion Sabre APCI se ha realizado la cromatografía en una columna de fase reversa C_{18} de 4.6 mm de diámetro interno con un tamaño de partícula de $5 \mu\text{m}$, con una velocidad de flujo de $800 \mu\text{L}/\text{min}$ y un volumen de inyección de muestra de $50 \mu\text{L}$.

Se ha empleado un método de extracción de la muestra sencillo y rápido, sin llevar a cabo tratamientos previos de purificación. Se han calculado los LODs para los casos más favorables de cada uno de los aductos. También se ha considerado los iones producto obtenidos en la fragmentación para ser usados

con fines cuantitativos y confirmativos. Finalmente se han comparado las condiciones óptimas de cada una de las configuraciones y para la formación de aductos.

2.3.2. Artículo científico 4:

Evaluation of Different Quantitative Approaches for the Determination of Noneasily Ionizable Molecules by Different Atmospheric Pressure Interfaces Used in Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry: Abamectin as Case of Study.

S. Grimalt, O.J. Pozo, J.M. Marín, J.V. Sancho, F.Hernández

Journal of American Society for Mass Spectrometry **2005**, 16, 1619-1630

GRIMALT ET AL.

J Am Soc Mass Spectrom 2005, 16, 1619–1630

Evaluation of Different Quantitative Approaches for the Determination of Noneasily Ionizable Molecules by Different Atmospheric Pressure Interfaces Used in Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry: Abamectin as Case of Study

Susana Grimalt, Óscar J. Pozo, Jose M. Marín, Juan V. Sancho and Félix Hernández

Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, E-12071, Castellón, Spain

Received 14 December 2004; revised 3 June 2005; accepted 3 June 2005.
Available online 22 August 2005.

The liquid chromatography tandem mass spectroscopy residue determination of compounds without any acidic or basic centers such as abamectin has been investigated. Several approaches regarding the interface used and adduct formation have been compared. The low acidity of the hydroxyl groups only made deprotonation feasible using the atmospheric pressure chemical ionization (APCI) interface. To obtain sufficient sensitivity for residue analysis, the Ion Sabre APCI interface was necessary. However, the sensitivity attained was lower than for monitoring adducts in positive ion mode. Using electrospray ionization, different adducts with Na^+ , NH_4^+ , and Li^+ were tested and compared. The best results were obtained for the ammoniated adduct in electrospray ionization (ESI) because of its high sensitivity and the presence of several product ions with similar abundance. The highest sensitivity was reached using an in-source fragment as precursor ion, leading to a limit of detection (LOD) of 2 $\mu\text{g/L}$ with low relative standard deviation. The relatively high abundance of other transitions allowed abamectin confirmation at concentrations close to the LOD (6 $\mu\text{g/L}$). Alkali ions were found to be a suitable alternative to determine and confirm abamectin at residue levels. The $[\text{M} + \text{Na}]^+$ also presented various product ions with similar abundance, which allowed confirmation at LOD levels. However, this LOD was found to be almost four times higher than with $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ because of the poor sensitivity of the transitions obtained. Although the use of Li^+ facilitated the fragmentation of the adduct $[\text{M} + \text{Li}]^+$, with similar sensitivity to $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$, this fragmentation preferentially generated only one product ion, which did not allow confirmation at concentration levels lower than 15 $\mu\text{g/L}$. The use of APCI for monitoring adducts was also feasible, but with less sensitivity. The sensitivity increased with the Ion Sabre APCI, although it was still five times lower than with ESI. Other adduct formers such as Co^{2+} and Ni^{2+} also were tested with unsatisfactory results.

Introduction

The atmospheric pressure ionization (API) interface development for liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC/MS) is an important advance for residue determination in analytical chemistry. This powerful analytical tool provides a solution for determining many compounds that are not amenable to analysis by gas chromatography (GC) as a result of their thermal instability and polarity [1]. In some cases, the use of LC with conventional detectors (UV, fluorescence or electrochemical detection) could be an alternative, but it frequently lacks sufficient selectivity and sensitivity for residue determination in complex matrices.

Two API interfaces, atmospheric pressure chemical ionization (APCI) and electrospray ionization (ESI), have been widely used in the last 5 years [2] in the biochemical, biotechnological [3], and environmental fields [1, 4 and 5]. These interfaces have allowed the development of methods for determination of compounds that present physicochemical characteristics incompatible with other analytical techniques, such as GC-MS or LC-UV. However, the use of API interfaces has drawbacks that are related mainly to the need for basic or acidic centers in the analyte. The absence of these can hinder the ionization necessary for obtaining a satisfactory quantitative analytical method. This is the case with compounds such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) or organochlorinated (OC) or polyoxygenated compounds. Although GC-MS is a suitable technique for the selective and sensitive determination of PAHs [6] and OCs [7 and 8], the high molecular mass, polarity, and low volatility of polyoxygenated compounds prevents the use of this approach [9].

LC-API-MS appears to offer the best option for the quantification and confirmation of low levels of polyoxygenated compounds, in spite of the absence of an acidic or basic center. The presence of hydroxyl groups in some analytes could make deprotonation possible in the negative APCI mode, because of its efficient ionization of compounds with low polarity [10, 11 and 12]. But the more general choice is adduct formation by the addition of different types of additives in the mobile phase, because this approach allows the use of both APCI and ESI interfaces.

Adduct ion formation generally is favored more in ESI than in APCI. The most common ions for adduct formation in the ESI source are alkali metal ions,

such as sodium and potassium. These exhibit strong affinity to oxygenated centers (ether, ester, carboxylic, or alcohol groups) and frequently are present as impurities in the mobile phase, the extraction solvents, or even in the determination system. Although these ions can generate valuable information in qualitative applications [13], their use in quantitative methods is highly restricted due to insufficient fragmentation and poor reproducibility. Thus, $[M + Na]^+$ used to be discarded when developing quantitative methods [14]. The most valuable alternative to $[M + Na]^+$ is the use of ammonium adducts after adding volatile ammonium salts as an additive in the mobile phase. Ammonium adducts present several advantages including usually easier fragmentation [15] and the possibility of using both API interfaces [16, 17 and 18]. Different primary amines also have been tested for this purpose [16].

Other alternatives to the use of $[M + Na]^+$ have been tested that favor the formation of adducts with monocharged metals such as $[M + Li]^+$ [19, 20, 21 and 22], $[M + Cs]^+$ [19, 21 and 22], $[M + Rb]^+$ [22], or $[M + Ag]^+$ [23] and doubly charged metals such as calcium [24], magnesium [24], cobalt [24 and 25], zinc [21, 25 and 26], copper [25], or nickel [21 and 25]. Through these approaches valuable conclusions have been obtained in qualitative applications but their use for quantitative purposes still is very limited.

Macrocyclic lactones can be included within the polyoxygenated compound group. Abamectin is an insecticide that belongs to the macrocyclic lactone class of avermectins and consists of a mixture of two homologous compounds, avermectin B_{1a} (>80%) and avermectin B_{1b} (<20%) [27]. Some LC-MS and liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) methods have been published for abamectin, using both ESI and APCI sources. Most were based on adduct formation by ESI in positive mode, mainly ammonium [28 and 29] or sodium [27, 30 and 31] adducts. Some authors have developed quantitative [11] and confirmatory [10, 11 and 12] analytical methods for avermectins, measuring the deprotonated compounds in negative mode using APCI. Others [32] developed methods using APCI in positive mode, based on $[M + NH_4]^+$ formation. The fact that abamectin is not easily ionizable has resulted in different approaches being used, and no agreement exists on the best way to determine this compound at low concentration levels. Other interesting approaches such as $[M + Li]^+$ still have not been tested.

Our objective in this study is to give a comprehensive overview on the critical influence of the use of different ions or adducts to achieve reproducible ionization. Reproducible ionization would allow the development of sensitive analytical methods based on LC-MS/MS. For this purpose, we evaluated different ionization parameters and API sources (ESI, APCI and the Ion Sabre APCI). The deprotonation of hydroxyl groups as well as the formation of different adducts are compared for the determination of abamectin. The use of various mobile-phase additives is considered to promote adduct molecule ions, with the purpose of providing the basis for a robust, reproducible, quantitative, and confirmative method at residue level in citrus fruits.

Experimental Procedures

Reagents and Chemicals

Abamectin analytical reference standard was purchased from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). Lithium acetate dihydrate ($\text{LiOAc} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, >63%), cobalt(II) acetate tetrahydrate ($\text{CoOAc} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, >98%), and triethylamine ($(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$, >99%) were obtained from Sigma (St. Louis, MO). Nickel acetate ($\text{NiOAc} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, >98%) was obtained from Panreac (Barcelona, Spain). Sodium acetate anhydrous (NaOAc , >99%), ammonium acetate (NH_4OAc , >98%), high-performance liquid chromatography (HPLC)-grade acetonitrile and HPLC-grade methanol were supplied by ScharLab (Barcelona, Spain). LC-grade water was obtained by purifying demineralized water in a Nanopure II system (Barnstead, Newton, MA).

Standard stock solution was prepared by dissolving abamectin in acetonitrile to a final concentration of 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. For both LC-MS analysis and sample fortification, the stock solution was diluted with acetonitrile.

Salts were prepared separately dissolving the necessary amount in 25 mL of water to obtain a final concentration of 500 mM (1.04 g of NaOAc , 2.02 g of $\text{LiOAc} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3.18 g of $\text{CoOAc} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 0.98 g of NH_4OAc , 1.28 g of $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$, and 3.17 g of $\text{NiOAc} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$).

Instrumentation

An LC system Waters Alliance 2795 (Waters, Milford, MA) was interfaced to a triple quadrupole mass spectrometer. The LC separation was performed using two X-Terra columns (both from Waters) with different dimensions depending on the interface: an X-Terra MS C₁₈, 5 µm, 50 × 4.6-mm inner diameter (i.d.) for APCI and Ion Sabre APCI at a flow rate of 0.8 mL/min; and an X-Terra MS C₁₈, 3.5 µm, 50 × 1.0-mm i.d. for ESI at a flow rate of 60 µL/min. The mobile phases used were an HPLC water/HPLC methanol gradient, both containing an additive when necessary, where the percentage of organic solvent changed linearly as follows: 0 min, 35%; 2 min, 35%; 7 min, 90%; 14 min, 90%; 14.1 min, 35%, in ESI, and 0 min, 35%; 2 min, 35%; 7 min, 90%; 8 min, 90%; 8.1 min, 35%, in APCI.

A Quattro Micro API (quadrupole-hexapole-quadrupole, Waters) mass spectrometer with three different interfaces was used; ESI, APCI and an Ion Sabre APCI (Waters). Drying gas as well as nebulizing gas was nitrogen generated from pressurized air in a high-purity nitrogen generator NM30LA Gas Station from Peak Scientific (Inchinnan, Scotland). For ESI, the desolvation gas flow and cone gas flow were selected 600 and 60 L/h, respectively. For APCI and Ion Sabre, the desolvation gas and cone gas were set at a flow of 200 and 40 L/h, respectively.

Infusion experiments were performed using the built-in syringe pump at a flow rate of 10 µL/min for ESI and the Alliance 2795 at a flow rate of 0.8 mL/min for APCI.

To operate in MS/MS mode, collision gas was Argon 99.995% (Carbueros Metalicos, Valencia, Spain) with a pressure of $3 \cdot 10^{-3}$ mbar in the collision cell. Capillary (ESI) voltages of 3.5 kV and current intensity in Corona (APCI) of 25 µA were used. The desolvation temperature for ESI was set to 350 °C and the source temperature was set to 120 °C, and in the case of APCI, source temperature was selected at 130 °C and APCI probe temperature was set at 450 °C. Dwell times of 0.2 s/scan were chosen. Solvent delay was selected at 9 min (ESI) and 5 min (APCI) to give an additional cleanup using the built-in divert valve controlled by the Masslynx NT v. 4.0 software (Waters). The Quanlynx application manager (Waters) was used to process the quantitative data obtained from calibration standards and from orange samples.

Sample Procedure

Whole orange samples were cut into small pieces without any pretreatment and were triturated. Homogenized orange sample (25 g) was accurately weighted (precision, 0.1 mg) and mixed with 80 mL of HPLC acetonitrile. After extraction for 2 min with a high-speed blender Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel, Staufen, Germany) at 8000 rpm, the entire extract was filtered through a filter paper and washed with HPLC acetonitrile. Finally, the volume was adjusted to 100 mL with HPLC acetonitrile. Fortification of the extracts was performed after the extraction procedure at the 200- $\mu\text{g/L}$ concentration level. Analyses were performed using the LC-ESI-MS/MS system described previously, by direct injection of orange extracts: 3 μL for ESI and 50 μL for APCI and Ion Sabre APCI.

Results and Discussion

Optimization of MS Conditions

Different hydroxy-macrocyclic lactones have been determined either by negative ionization mode, especially for phenolic compounds [11 and 12], or by positive ionization mode, when an amine group was present [33]. For abamectin, its chemical structure made its deprotonation feasible due to the presence of three hydroxyl groups and therefore its determination by negative ionization was possible. The absence of basic centers prevents the direct determination of abamectin as a protonated ion. Therefore, the use of triethylamine (Et_3N) as a proton scavenger was tested in negative ionization mode whereas the formation of adducts with sodium, ammonium, lithium, nickel, and cobalt was promoted in positive ionization mode by the addition of their acetate salts in the infusion solution (Figure 1). Results regarding ionization and fragmentation were compared and discussed. Additionally, possible fragmentation pathways have been proposed (Figure 2, Figure 3 and Figure 4), although these hypotheses would need to be supported by isotope labeling, MS^n , or theoretical calculations.

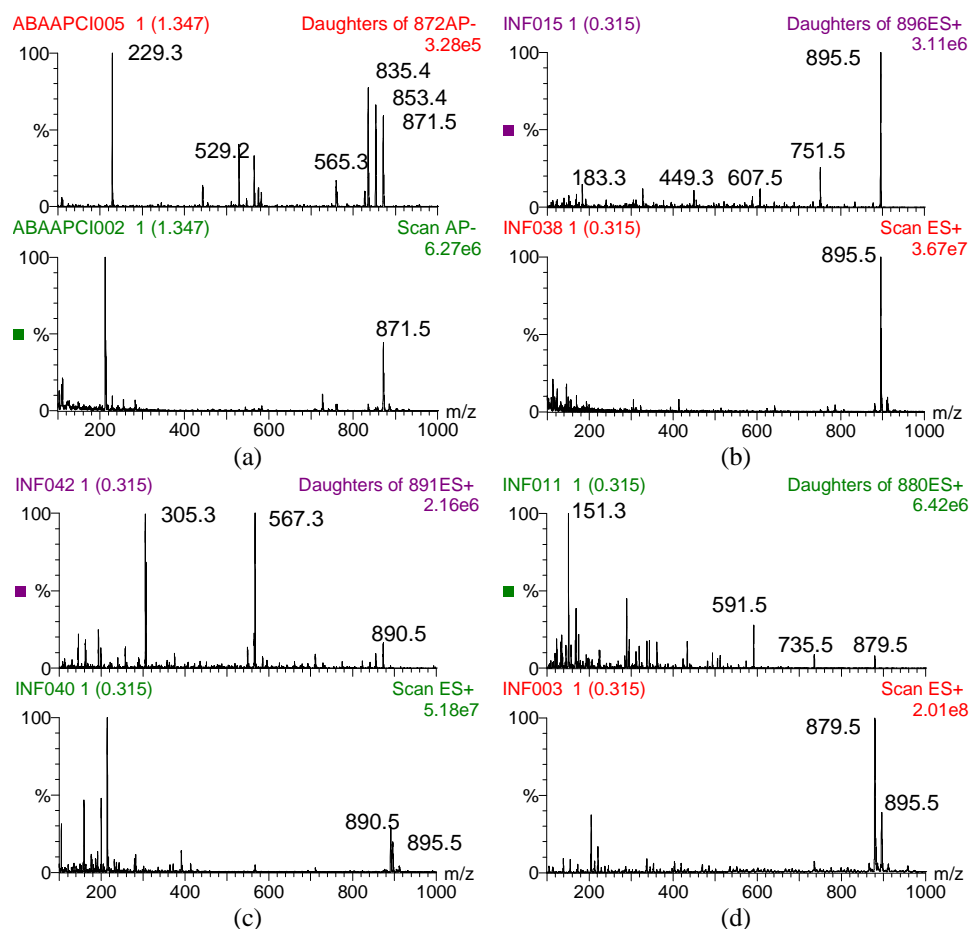


Figure 1. Full scan mass spectrum (bottom) and product ion spectra (top) of abamectin in different conditions acquired by infusion of 4.5 $\mu\text{g/mL}$ of standard solution. (a) Negative Ion Sabre APCI 5-mM Et_3N , (b) positive ESI without any additive, (c) positive ESI 1-mM NH_4Oac , and (d) positive ESI 1-mM LiOAc .

Chromatographic Signal Optimization

To make all the chromatographic experiences comparable, two X-Terra columns were used with internal diameter, flow rate, and injection volume optimized for ESI and APCI, respectively. These columns allowed us to use all additives tested, including the relatively basic Et_3N , because of their high-working pH. Although a comparison between ESI and APCI, regarding differences in absolute sensitivity, could have been performed in terms of picograms on column,

the aim of this study was to compare both interfaces from a practical point of view and therefore we used injected concentration ($\mu\text{g/mL}$) for the comparison.

Table 1. Optimization of the mobile-phase buffer for each species studied

API interface	Species	Mobile phase conditions (μM)	LOD ^(a) ($\mu\text{g/L}$)	
APCI- ion Sabre	[M-H] ⁻	10 Et ₃ N	67	
		100 Et ₃ N	37	
		500 Et ₃ N	29	
		5,000 Et ₃ N	36	
		10,000 Et ₃ N	nd*	
ESI+	[M+Na] ⁺	1 NaOAc	22	
		10 NaOAc	7	
		50 NaOAc	10	
	[M+NH ₄] ⁺	10 NH ₄ OAc	3	
		100 NH ₄ OAc	2	
		500 NH ₄ OAc	3	
		5,000 NH ₄ OAc	9	
	[M+Li] ⁺	5 LiOAc	13	
		10 LiOAc	3	
		50 LiOAc	4	
	APCI+ ion Sabre	[M+NH ₄] ⁺	10 NH ₄ OAc	30
			100 NH ₄ OAc	14
500 NH ₄ OAc			10	
5,000 NH ₄ OAc			12	

* *nd = not detected*

(a) LOD estimated for the most sensitive transition: 871.5 > 229.3 for [M-H]⁻, 895.5 > 751.3 for [M+Na]⁺, 567.3 > 307.3 for [M+NH₄]⁺ and 879.5 > 151.3 for [M+Li]⁺.

When working with adduct formation in API interfaces, two opposite effects must be considered. On one hand, the presence of small amounts of adduct cation in the mobile phase is necessary to promote the formation of the [M + X]⁺. But on the other hand, the presence of these salts in the mobile phase can produce ionization suppression, drastically reducing the sensitivity of the method. Therefore, the additive concentration in the mobile phase has to be optimized to balance both effects. Results obtained for this optimization, in all approaches tested in the spiked orange extract, are shown in Table 1.

To obtain a quantitative and confirmative method, the following aspects have to be taken into account: (i) possible matrix effect produced by co-eluted components of the matrix, (ii) the reproducibility of the method, and (iii) the possibility of recording more than one sensitive transition to confirm positive samples. In the case of abamectin residue determination in orange samples, no

appreciable matrix effect was observed (recoveries were between 80 and 110%) and, therefore, this effect has not been discussed here. This study focused on sensitivity, reproducibility, and the possibility of confirming positives in samples. To confirm the identity of an analyte, a minimum of two transitions needs to be acquired [34]: a quantitative transition (Q) and at least one confirmative transition (q). A ratio calculation between quantitative and confirmative transition intensities was made by dividing the responses of Q by q . Similar sensitivity for both transitions (Q and q) is desirable for confirmation at low concentrations, preferably at the limit of detection (LOD) level. Table 2 shows the relative standard deviation (RSD) and the average Q/q ratio ($n = 10$) obtained for all approaches tested in orange extracts spiked with abamectin at 200 $\mu\text{g/L}$ level. The closer the Q/q value is to one, the better the method for confirmative purposes at low residue levels.

Table 2. Repeatability and ion ratios for the optimal LC-MS/MS conditions

API interface/mobile phase	Quantification (Q)/confirmation (q) transitions	Q/q Ratio	RSD (%) ($n = 10$)
APCI–/500 μM Et ₃ N	871.5 > 229.3/871.5 > 565.3	1.7	9
ESI+/10 μM NaOAc	895.5 > 751.3/895.5 > 449.3	1.5	14
ESI+/100 μM NH ₄ OAc	567.3 > 307.3/890.5 > 567.3	2.9	7
APCI+/500 μM NH ₄ OAc	567.3 > 307.3/890.5 > 567.3	3.3	9
ESI+/10 μM LiOAc	879.5 > 151.3/879.5 > 735.5	4.7	9

Negative Ionization

When checking ESI in negative ionization mode no $[\text{M} - \text{H}]^-$ was obtained even after addition of Et₃N. Only a weak peak corresponding to the acetate adduct ($[\text{M} + \text{CH}_3\text{COO}]^-$) was obtained after adding ammonium acetate, but the low intensity of this peak made it unadvisable to use this for quantitative analysis at the residue level.

On the other hand, although the use of conventional APCI allowed the deprotonation of abamectin, the sensitivity was not enough for residue determination, necessitating the use of Ion Sabre APCI to obtain satisfactory results. Figure 1a shows Ion Sabre APCI spectra for abamectin in mass spectrometry (bottom) and MS/MS (top) mode by infusion of 4.5 $\mu\text{g/mL}$ of standard

solution. The mass spectrometry spectrum presents an abundant peak at m/z 871.5, corresponding to the $[M - H]^-$ ion optimized at a cone voltage of 35 V. This peak was optimized by addition of 10 mM of Et_3N to increase the deprotonation, confirming the low acidity of these hydroxyl groups. Regarding the MS/MS spectrum, five important product ions were obtained. Two of them (m/z 853.4 and 835.4, optimized at a collision energy of 20 eV) presented low specificity for the determination because they can be assigned to the neutral losses of one and two water molecules, respectively ($[M - H - H_2O]^-$ and $[M - H - 2H_2O]^-$), as can be seen in Figure 2. The other product ions showed higher specificity because they may imply the loss of monosaccharides (fragments at m/z 565.3 and 529.2 optimized at 30 eV and 25 eV, respectively) or even the rupture of the lactone ring (m/z 229.2 optimized at 30 eV). This higher specificity suggested the use of the last three transitions to develop quantitative methods.

When applying this approach after chromatography, a peak was obtained without adding any additive in the mobile phase (estimated LOD of 100 $\mu\text{g/L}$). The sensitivity increased around three times after Et_3N addition although it was still lower than in other approaches tested (Figure 5a). The optimum concentration of Et_3N was found to be 500 μM (Table 1). As can be seen in Table 2, satisfactory RSD values were obtained and a Q/q ratio of around two was achieved with this approach, facilitating the confirmation of positive samples at concentrations near the LOD of the method (around 30 $\mu\text{g/L}$). The low sensitivity in negative mode also has been addressed by Zywitz et al. [28], who did not consider this approach for residue determination of abamectin. The results of our work show that the use of the Ion Sabre APCI interface together with the addition of Et_3N improved the method sensitivity, although this approach is still inadequate for abamectin residue determination without a preconcentration step during sample treatment.

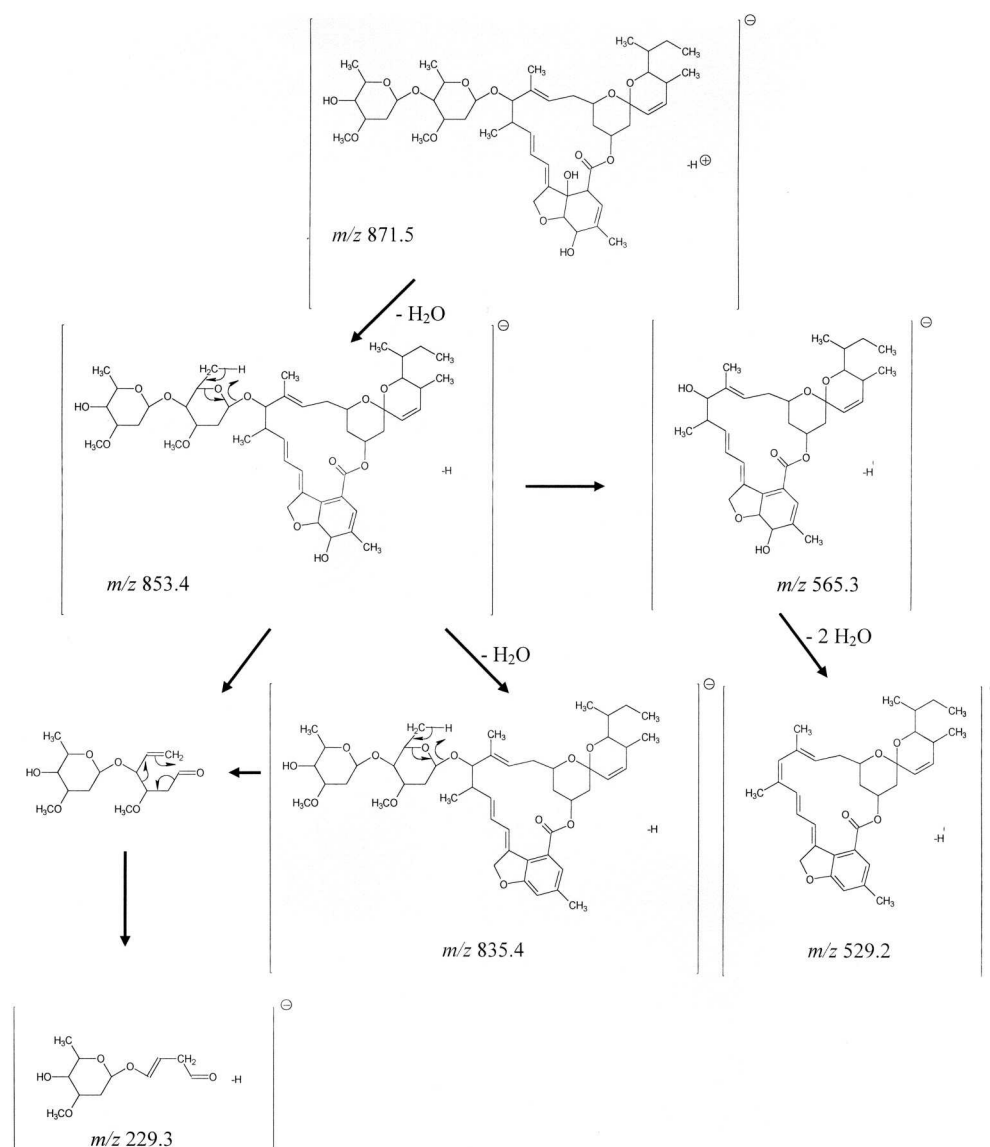


Figure 2. Proposed fragmentation pathway for abamectin in negative APCI.

Sodium Adducts

Sodium adducts are the most commonly formed in LC-MS-based methods. Their presence in spectra is frequent even without adding any additive in the infusion solution, possibly because of small amounts of this cation in solvents, pipettes, etc. This was the case for abamectin, where the high affinity of the

polyoxygenated structure for sodium allowed us to optimize MS conditions without using any additive. Figure 1b shows the mass spectrometry and the MS/MS ESI spectra for abamectin. In the mass spectrometry spectrum, an abundant $[M + Na]^+$ ion was observed at m/z 895.5, with infusion in a methanol/water medium optimized at high cone voltage (90 V). The high intensity of the $[M + Na]^+$ ion can make the use of these adducts for quantitative determination advisable. However, when MS/MS experiments were performed, poor fragmentation was observed (Figure 1b, top) with low abundance of product ions, which would decrease the sensitivity of the method. This poor fragmentation could be explained by the relatively large size of the sodium cation and its strong interaction with oxygen atoms, which makes the transfer of the cation from one part of the molecule to another difficult. This transfer step is necessary in several fragmentation mechanisms. A possible interpretation of the $[M + Na]^+$ fragmentation is shown in Figure 3, where all product ions (m/z 751.3, 607.5, and 449.3 optimized at 45eV, and m/z 183.3 optimized at 55 eV) lost at least one monosaccharide group, enhancing selectivity for quantitative determination.

Although no sodium additives were required to obtain the $[M + Na]^+$ ion in infusion experiments, when performing chromatography, the peak obtained for the sodium adduct without using any additive into the mobile phase was smaller than when using the Ion Sabre APCI in negative mode. Thus, it seems that small amounts of Na have to be added to the chromatographic mobile phase to promote efficient $[M + Na]^+$ formation. These results contrast with previously reported methods [27, 30 and 31], wherein only one method [27], the adduct formation, was favored by adding sodium acetate to the vial, but sodium salts were not used as additives in the mobile phase in any of them. As Table 1 shows, the optimum concentration of sodium acetate in the mobile phase was as low as 10 μ M because higher additive concentrations led to significant ionization suppression produced by the Na^+ itself.

Under optimum conditions, an LOD of around 7 μ g/L was obtained, significantly increasing the sensitivity compared with APCI in negative ionization (Figure 5a, b). The repeatability of this method was worse than with other approaches tested, although it was still acceptable (14%; Table 2). The Q/q ratio was close to one, that is, different product ions can be obtained with similar sensitivity, and, therefore, confirmation of positive samples can be performed

around the LOD level. These characteristics make this approach suitable for the direct determination of abamectin at the residue level.

No sodium adduct was observed using APCI interfaces, even after the addition of sodium acetate in the infusion solution.

Ammonium Adducts

Ammonium adducts were obtained by the addition of 5 mM of ammonium acetate into the infusion solution. Under these conditions, a peak at m/z 890.5 corresponding to $[M + NH_4]^+$ was optimized at 25 V in the ESI interface. The higher affinity of polyoxygenated compounds for Na^+ than NH_4^+ , gave an abundant $[M + Na]^+$ signal at m/z 895.5 that was even present after addition of ammonium acetate (Figure 1c). The $[M + NH_4]^+$ ion was around five times less sensitive than $[M + Na]^+$; however, the MS/MS spectra of $[M + NH_4]^+$ presented two abundant fragments (m/z 567.3 and 305.3 optimized at 15 and 25eV, respectively) with higher relative intensities than those obtained from the sodium adduct. In this case, the lower affinity of the analyte for NH_4^+ may facilitate the fragmentation increasing the sensitivity of the product ions. A possible fragmentation pathway of $[M + NH_4]^+$ is shown in Figure 4.

When using ammonium adducts it is relevant that their easy fragmentation allows carrying out in-source fragmentation of the $[M + NH_4]^+$ ion by increasing the cone voltage up to 35 V. Under these conditions, an in-source fragment at m/z 567.3 was obtained, which can be used as precursor ion generating a product ion at m/z 307.3 (collision energy of 10 eV). It is remarkable that the product ion at m/z 305.3 was not observed under these conditions, supporting the hypothesis that both product ions (m/z 305.3 and 307.3) are obtained from different fragmentation pathways (Figure 4). This in-source fragmentation was found to be the most sensitive approach when using chromatography, as can be seen by comparison between Figure 5c, d, allowing a LOD of 2 $\mu\text{g/L}$ (Table 1) to be reached. The good sensitivity obtained together with satisfactory precision (Table 2) make this approach ideal for development of quantitative methods, the only objection being that confirmation would only be possible at concentrations three times higher than the LOD (Q/q around three).

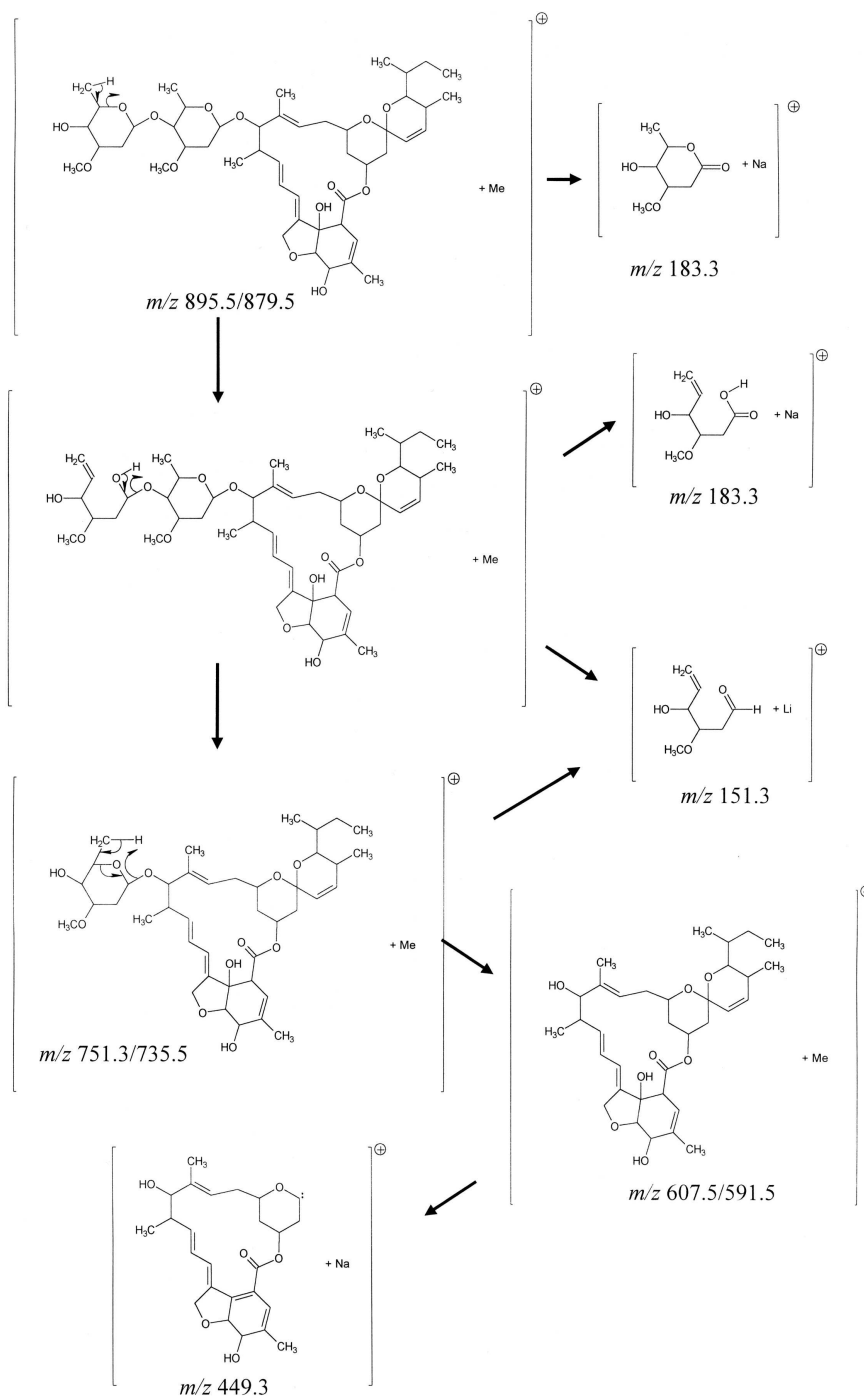


Figure 3. Proposed fragmentation pathway for abamectin in positive ESI with metal adducts (Me = Na⁺ or Li⁺).

Other authors [28] used several transitions using the parent adduct as precursor ion, with more favorable Q/q ratios, although with lower sensitivity than when using in-source fragmentation.

As opposed to sodium adducts, the $[M + \text{NH}_4]^+$ ion also can be formed in the APCI interface. As expected, mass spectrometry conditions, precursor, and product ions were identical to those obtained using the ESI interface. Data obtained with the Ion Sabre APCI allowed us to estimate a sensitivity around 10 times higher than with APCI but still lower (around fivefold less) than with ESI (Figure 5d, e). These data agree with other studies regarding sensitivity obtained with both interfaces, where ESI is preferred because of the better sensitivity reached [28, 29 and 32].

As can be seen in Table 1, the optimum concentration of ammonium acetate in the mobile phase was higher than with the sodium adduct because of the higher volatility of ammonium cation. Furthermore, the optimum concentration was higher in APCI (500 μM) than in ESI (100 μM), which could be related with the fact that ESI is more affected by ion suppression than APCI [2 and 35]. Much higher concentrations of ammonium acetate (up to 50 mM) were used in our previous work [27], this possibly being the reason for the unsatisfactory results obtained with ammonium adducts.

Lithium Adducts

The formation of lithium adducts was promoted by the addition of 1 mM of lithium acetate in the infusion solution. Under these conditions, an abundant $[M + \text{Li}]^+$ signal at m/z 879.5 was observed at a cone voltage of 65 V, although the presence of $[M + \text{Na}]^+$ ion still was significant (Figure 1d). At low collision energy (lower than 35 eV) the product ion spectrum of the $[M + \text{Li}]^+$ presented the same behavior as the sodium adduct, showing only a small fragment at m/z 735.5. However, for the $[M + \text{Na}]^+$ no more abundant fragments were obtained after increasing the collision energy; in the case of $[M + \text{Li}]^+$, two fragments at m/z 591.5 and 151.3 were obtained at a collision energy of 45 and 50 eV, respectively. These fragments, especially the lighter one at m/z 151.3, were more abundant and therefore more suitable for use in a quantitative method for abamectin residue determination. Li^+ transfer might be favored more than Na^+ transfer because of

their different size as well as the different affinity of the monosaccharide to both cations. Figure 3 shows a possible explanation of the fragments obtained.

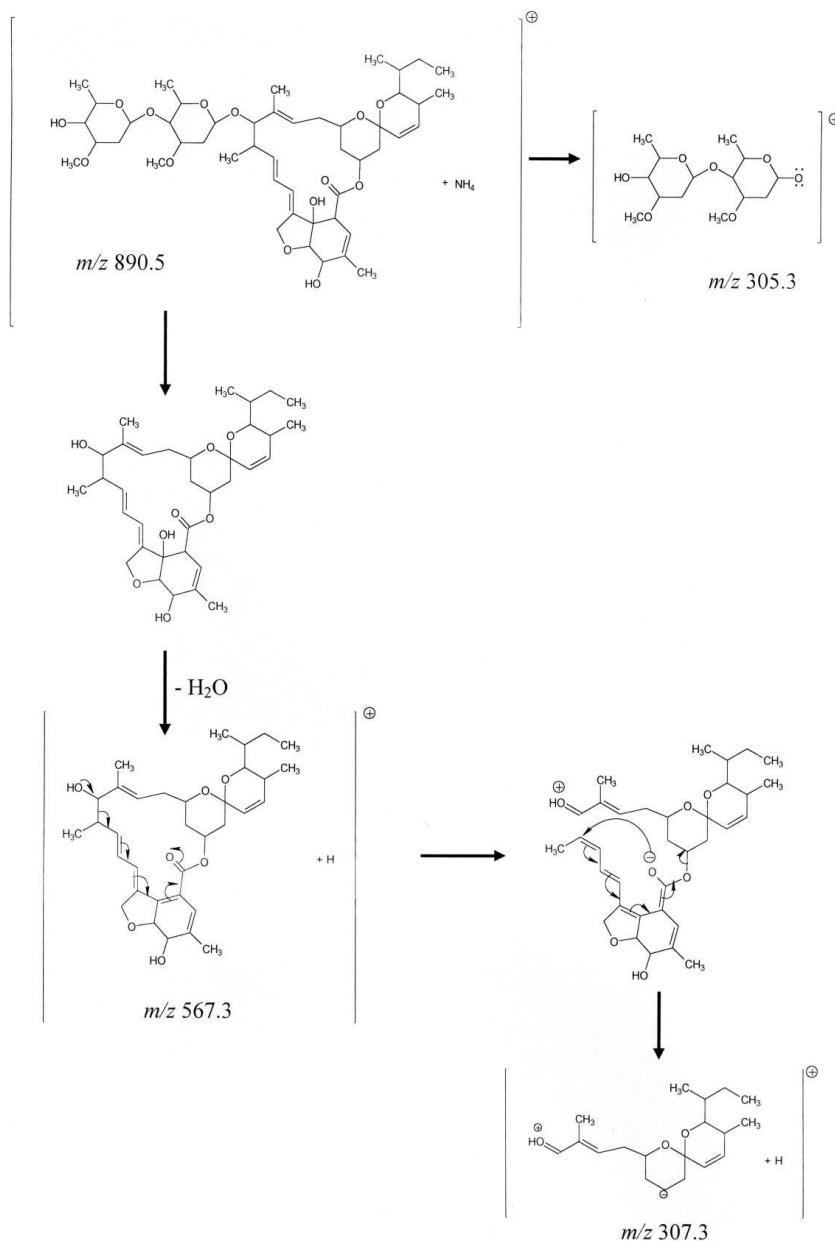


Figure 4. Proposed fragmentation pathway for abamectin in positive ESI with ammonium adducts.

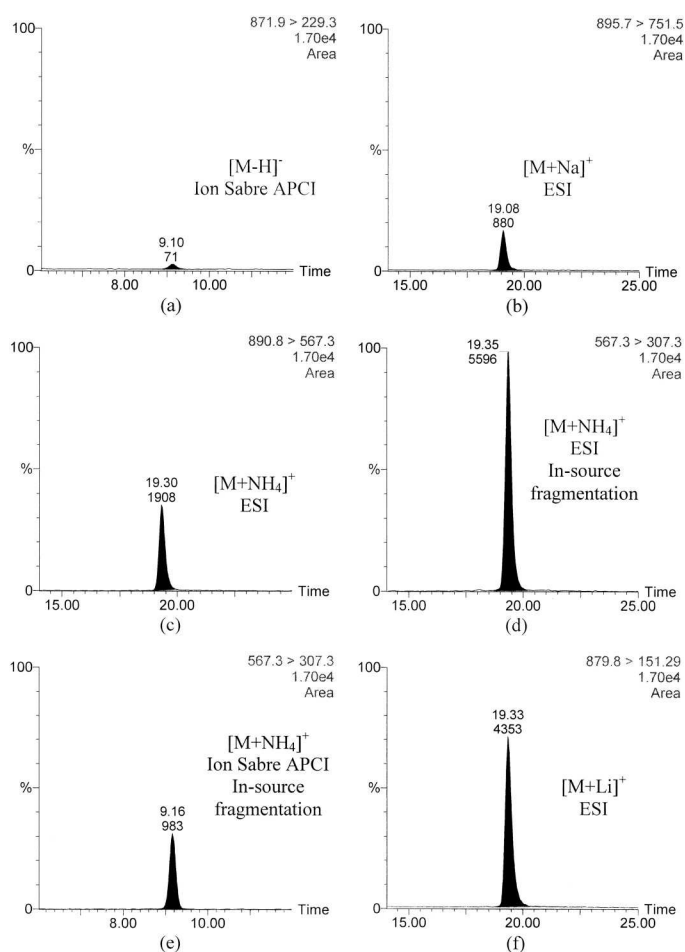


Figure 5. LC-MS/MS chromatograms for the determination of abamectin in the orange sample extract at 200 $\mu\text{g/L}$ in different conditions. (a) $[\text{M} - \text{H}]^-$ in negative Ion Sabre APCI 500- μM Et_3N , (b) $[\text{M} + \text{Na}]^+$ in positive ESI 10- μM NaOAc , (c) $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ in positive ESI 100- μM NH_4OAc using parent adduct as precursor ion, (d) $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ in positive ESI 100- μM NH_4OAc using an in-source fragment as precursor ion, (e) $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ in positive Ion Sabre APCI 500- μM NH_4OAc using an in-source fragment as precursor ion, and (f) $[\text{M} + \text{Li}]^+$ in positive ESI 10- μM LiOAc .

When applying this approach after LC, the optimal response was obtained after adding 10 μM of LiOAc in the mobile phase achieving an LOD of 3 $\mu\text{g/L}$. The sensitivity was found to be similar to that obtained using ammonium adducts and was notably better to that obtained with sodium adduct (Figure 5f). To our knowledge, there are no quantitative methods developed for the determination of polyoxygenated compounds using lithium adducts. According to our data, the

sensitivity achieved, together with satisfactory precision (9% RSD), show the suitability of using this kind of adduct for this purpose. As in the case of $[M + \text{NH}_4]^+$, the main drawback of this approach would come from the confirmatory point of view because the Q/q ratio was around five (Table 2), that is, the confirmation only would be possible at concentrations five times higher than the LOD.

As in the case of sodium adduct, no $[M + \text{Li}]^+$ signal was obtained by ionization with the APCI interfaces.

Nickel and Cobalt Adducts

In our search for an alternative to conventional adducts, we checked the use of nickel and cobalt acetate to promote the respective transition-metal adducts. In both cases the results were not satisfactory and no signal was obtained in the ESI source. The formation of these adducts might be explained by the loss of a proton and additional oxygen-metal interactions, generating the species $[M + \text{Me} - \text{H}]^+$, where Me corresponds to the transition metal [21 and 25]. In the case of abamectin, the absence of the $[M + \text{Me} - \text{H}]^+$ ion might be due to the low acidity of the hydroxyl groups as well as to the low conformational flexibility of the macrocyclic structure, which could reduce the oxygen-metal interactions.

Conclusion

Residue determination of abamectin in complex matrices, such as orange samples, can be performed using different approaches despite the difficulties of abamectin ionization in the API interfaces, although satisfactory results for sensitivity are obtained only after adduct formation.

For sensitivity, two effects have to be taken into account, the affinity of the ions for adduct formation and the abundance of product ions. In this regard the following order was determined: $[M + \text{NH}_4]^+ > [M + \text{Li}]^+ > [M + \text{Na}]^+$. Thus, the best approach seems to be the determination of ammonium adduct by ESI using an in-source fragment as a precursor ion. Similar results were obtained for $[M + \text{Li}]^+$, showing the applicability of lithium adducts for efficient quantitative analysis. The optimization of additive concentration was of major importance for achieving maximum sensitivity. To perform confirmative methods, at least two transitions should be monitored. Thus, when fragmentation is focused on a predominant

product ion, one transition is notably more sensitive than the others. Under these conditions, the confirmation is troublesome at concentrations close to the LOD of the method. This is the case for $[M + Li]^+$ and $[M + NH_4]^+$, where the experimental Q/q ratios obtained were around five and three, respectively. In regard to sodium adducts, the confirmation was possible close to LOD level (Q/q ratio around one), although the sensitivity of the quantitative method was lower. Combining sensitivity of the method and Q/q ratio values, the ammonium adduct allowed confirmation of residues at the lowest concentration levels. Moreover, the use of the Ion Sabre APCI notably increased the sensitivity against conventional APCI, being almost comparable with ESI. ESI was still found to be the most sensitive and therefore more adequate for abamectin residue determination. Owing to the ionization difficulties of this analyte, other interfaces such as atmospheric pressure photoionization (APPI) might be useful for adequate determination. This study shows the versatility and applicability of adduct formation for the determination of noneasily ionizable molecules because up to three reliable methods could be applied to the residue determination of a difficult compound such as abamectin. While with other problematic analytes, each has to be considered individually to achieve the optimum experimental conditions, the results found here provide an interesting possibility for the investigation of analytical solutions.

Acknowledgments

The Quattro Micro LC-MS/MS was funded by the European Union (Fondos Feder-Reino de España, Ministerio de Ciencia y Tecnología, Ref. UNJM-E004). The authors are grateful to Ramesh Rao (Waters) for his valuable comments. They also thank the two anonymous reviewers, whose comments greatly improved this work.

References

1. M. Careri and A. Mangia, Multidimensional Detection Methods for Separations and Their Application in Food Analysis, *Trends. Anal. Chem.* **15** (1996), pp. 538–550.
 2. E.M. Thurman, I. Ferrer and D. Barceló, Choosing between Atmospheric Pressure Chemical Ionization and Electrospray Ionization Interfaces for the HPLC/MS Analysis of Pesticides, *Anal. Chem.* **73** (2001), pp. 5441–5449.
-

GRIMALT ET AL.

J Am Soc Mass Spectrom 2005, 16, 1619–1630

3. W.M.A. Niessen, State-of-Art in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, *J. Chromatogr. A* **856** (1999), pp. 179–197.
 4. D. Barceló, *Applications of LC-MS in Environmental Chemistry*, Elsevier Science B.V, Amsterdam (1996).
 5. Y. Picó, G. Font, J.C. Moltó and J. Mañes, Pesticide Residue Determination in Fruit and Vegetables by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, *J. Chromatogr. A* **882** (2000), pp. 153–173.
 6. S. Moret and L.S. Conte, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Edible Fats and Oils Occurrence and Analytical Methods, *J. Chromatogr. A* **882** (2000), pp. 245–253.
 7. G.R. Van der Hoff and P. van Zoonen, Trace Analysis of Pesticides by Gas Chromatography, *J. Chromatogr. A* **843** (1999), pp. 301–322.
 8. E. Pitarch, R. Serrano, F.J. López and F. Hernández, Rapid Multiresidue Determination of Organochlorine and Organophosphorus Compounds in Human Serum by Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* **376** (2003), pp. 189–197.
 9. C.T. Elliott, D.G. Kennedy and W.J. Mc Caughey, Methods for the Detection of Polyether Ionophore Residues in Poultry, *Analyst* **123** (1998), pp. 45R–56R.
 10. S.B. Turnipseed, J.E. Roybal, H.S. Rupp, S.A. Gonzales, A.P. Pfenning and J.A. Hurlbut, Confirmation of Avermectin Residues in Food Matrices with Negative-ion Atmospheric Pressure Chemical Ionization Liquid Chromatography/Mass Spectrometry, *Rapid. Commun. Mass. Spectrom* **13** (1999), pp. 493–499.
 11. Z. Wu, J. Li, L. Zhu, H. Luo and X. Xu, Multi-Residue Analysis of Avermectins in Swine Liver by Immunoaffinity Extraction and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, *J. Chromatogr. A* **755** (2001), pp. 361–366.
 12. L. Howells and M.J. Sauer, Multi-Residue Analysis of Avermectins and Moxidectin by Ion-Trap LC-MSⁿ, *Analyst* **126** (2001), pp. 155–160.
 13. D.J. Harvey, Electrospray Mass Spectrometry and Fragmentation of N-Linked Carbohydrates Derivatized at the Reducing Terminus, *J. Am. Soc. Mass Spectrom* **11** (2000), pp. 900–915.
 14. N.P. Lopes, C.B.W. Stark, H. Hong, P.J. Gates and J. Staunton, Fragmentation Studies on Monesin A by Sequential Electrospray Mass Spectrometry, *Analyst* **127** (2002), pp. 503–506.
-

15. J.A. Harris, C.A.L. Russell and J.P.G. Wilkins, The Characterization of Polyether Ionophore Veterinary Drugs by HPLC-Electrospray MS, *Analyst* **123** (1998), pp. 2625–2628.
 16. K.A. Mortier, G.F. Zhang, C.H. Van Peteghem and W.E. Lambert, Adduct Formation in Quantitative Bioanalysis Effect of Ionization Conditions on Placlitaxel, *J. Am. Soc. Mass Spectrom* **15** (2004), pp. 585–592.
 17. T. Kuuranne, M. Vahermo, A. Leinonen and R. Kostainen, Electrospray and Atmospheric Pressure Chemical Ionization Tandem Mass Spectrometric Behavior of Eight Anabolic Steroid Glucuronides, *J. Am. Soc. Mass Spectrom* **11** (2000), pp. 722–730.
 18. W.C. Byrdwell and W.E. Neff, Dual Parallel Electrospray Ionization and Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry (MS), MS/MS, and MS/MS/MS for the Analysis of Triacylglycerols and Triacylglycerol Oxidation Products, *Rapid. Commun. Mass Spectrom* **16** (2002), pp. 300–319.
 19. D.A. Volmer and C.M. Lock, Electrospray Ionization and Collision-induced Dissociation of Antibiotic Polyether Ionophores, *Rapid. Commun. Mass Spectrom* **12** (1998), pp. 157–164.
 20. S.B. Levery, M.S. Toledo, A.H. Straus and H.K. Takahashi, Comparative Analysis of Glycosylinositol Phosphorylceramides From Fungi by Electrospray Tandem Mass Spectrometry With Low-Energy Collision-Induced Dissociation of Li^+ Adduct Ions, *Rapid. Commun. Mass Spectrom* **15** (2001), pp. 2240–2258.
 21. R. Chen and L. Li, Lithium and Transition Metal Ions Enable Low Energy Collision-Induced Dissociation of Polyglycols in Electrospray Ionization Mass Spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom* **12** (2001), pp. 832–839.
 22. D.J. Harvey, Collision-Induced Fragmentation of Underivatized N-Linked Carbohydrates Ionized by Electrospray, *J. Mass Spectrom* **35** (2000), pp. 1178–1190.
 23. D.J. Harvey, Ionization and Fragmentation of N-Linked Glycans as Silver Adducts by Electrospray Mass Spectrometry, *Rapid. Commun. Mass Spectrom* **19** (2005), pp. 484–492.
 24. D.J. Harvey, Ionization and Collision-induced Fragmentation of N-Linked and Related Carbohydrates Using Divalent Cations, *J. Am. Soc. Mass Spectrom* **12** (2001), pp. 926–937.
 25. M.D. Leavell and J.A. Leary, Stabilization and Linkage Analysis of Metal-Ligated Sialic Acid Containing Oligosaccharides, *J. Am. Soc. Mass Spectrom* **12** (2001), pp. 528–536.
-

26. S.P. Gaucher and J.A. Leary, Stereochemical Differentiation of Mannose, Glucose, Galactose, and Talose Using Zinc (II) Diethylenetriamine and ESI-Ion Trap Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* **70** (1998), pp. 3009–3014.
 27. O.J. Pozo, J.M. Marin, J.V. Sancho and F. Hernández, Determination of Abamectin and Azadirachtin Residues in Orange Samples by Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry, *J. Chromatogr. A* **992** (2003), pp. 133–140.
 28. D. Zywitz, M. Anastassiades and E. Scherbaum, Simultaneous Determination of Macrocyclic Lactone Insecticides in Fruits and Vegetables using LC-MS/MS, *Deutsche. Lebensmittel-Rundschau* **100** (2004), pp. 140–150.
 29. T. Pereira and S.W. Chang, Semi-Automated Quantification of Ivermectin in Rat and Human Plasma Using Protein Precipitation and Filtration With Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry, *Rapid. Commun. Mass Spectrom* **18** (2004), pp. 1265–1276.
 30. S. Croubels, S. De Baere, M. Cherlet and P. De Backer, Determination of Ivermectin B_{1a} in Animal Plasma by Liquid Chromatography Combined With Electrospray Ionization Mass Spectrometry, *J. Mass Spectrom* **37** (2002), pp. 840–847.
 31. A.I. Valenzuela, M.J. Redondo, Y. Picó and G. Font, Determination of Abamectin in Citrus Fruits by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry, *J. Chromatogr. A* **871** (2000), pp. 57–65.
 32. M.S. Ali, T. Sun, G.E. Mc Leroy and E.T. Phillippo, Confirmation of Eprinomectin, Moxidectin, Abamectin, Doramectin, and Ivermectin in Beef Liver by Liquid Chromatography/Positive Ion Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry, *J. AOAC Int.* **83** (2000), pp. 39–52.
 33. J.M. Ballard, L.D. Payne, R.S. Egan and T.A. Wehner, Development and Validation of an HPLC/MS/MS Method for the Confirmation of Eprinomectin Marker Residue in Bovine Liver Tissue, *J. Agric. Food. Chem.* **45** (1997), pp. 3507–3510.
 34. Commission Decision 2002/657/CE of 12 August 2002.
 35. B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer and C.M. Chavez-Eng, Matrix Effect in Quantitative LC/MS/MS Analyses of Biological Fluids A Method for Determination of finasteride in Human Plasma at Picogram Per Milliliter Concentration, *Anal. Chem.* **70** (1998), pp. 882–889.
-

2.3.3. Discusión de los resultados

La investigación centrada en la abamectina, en muestras de naranja, basándonos en el método previamente desarrollado por Pozo *et al.*, (2003), que ya se validó a dos niveles de fortificación, 0.1 y 0.01 mg/kg, obteniendo recuperaciones entre 80 y 96% con buena RSD (<10%) y alcanzando un LOD de 0.007 mg/kg en matriz de naranja.

Después de ajustar los parámetros de la cromatografía y de cada una de las interfases con disoluciones patrón, se pasó a estudiar el comportamiento frente a la ionización de la abamectina en muestras de naranja en función del aditivo en la fase móvil. En primer lugar, se seleccionó el modo de ionización negativo y se estudió en las tres fuentes (ESI, APCI y APCI sabre) la capacidad de los grupos hidróxilo a ser desprotonados mediante la adición de una base fuerte (TEA) como modificador en la fase móvil. Por otro lado, se probó la ionización en modo positivo mediante la formación de los aductos $[M+Na]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M+Li]^+$, $[M+Ni]^{2+}$ y $[M+Co]^{2+}$ favorecida por la adición de sus correspondientes acetatos en la fase móvil. De todos estos, la adición de acetatos de cobalto y níquel en la fase móvil no promovió la formación de sus correspondientes aductos, al contrario que en el resto. Para cada uno de los aditivos se probaron diferentes concentraciones, como se puede observar en la *Tabla 1 del artículo científico 4*. La adición del modificador puede generar un doble efecto: a bajas concentraciones tiene una acción positiva, promoviendo la formación del aducto; al mismo tiempo, su presencia puede resultar negativa, provocando una supresión de la ionización, que a concentraciones mayores pueda afectar seriamente a la sensibilidad en la determinación del analito.

A continuación, se discute la formación de cada uno de los aductos estudiados mediante infusión directa en el sistema de MS y MS/MS y mediante el uso de la LC acoplada a MS/MS, con un enfoque dirigido hacia parámetros de interés analítico, tanto cuantitativos como confirmativos, teniendo en cuenta la reproducibilidad y robustez en su aplicación a muestras reales. La confirmación se realiza a partir de la relación (Q/q) entre las áreas de los picos correspondientes a la transición de cuantificación (Q) y a la de confirmación (q), calculada con 10 réplicas al nivel de concentración de 200 µg/L de abamectina.

- *Ionización negativa*

Al infundir abamectina en ESI en modo negativo, no se observó el ión $[M-H]^-$, a pesar de la adición de la base TEA. En el caso de APCI e Ion Sabre APCI en

modo negativo, se observó un pico de dicho ion (m/z 871.5) a una concentración de TEA de 10 mM, siendo más abundante en el caso de Ion Sabre APCI. Se obtuvieron cinco iones producto en los ensayos MS/MS; dos de ellos presentaban menor especificidad debido a pérdidas neutras de una (m/z 853.4) y dos moléculas (m/z 835.4) de H_2O , mientras que a colisiones más altas se obtuvieron otros dos iones productos más específicos (m/z 565.3, 30 eV; 529.2, 25 eV) tras la pérdida de monosacáridos, además de una última fragmentación debida a la ruptura del anillo de la lactona (m/z 229.2, 30 eV). De esta manera, se propusieron dos transiciones selectivas para la cuantificación y confirmación, 871.5>229.3 (Q) y 871.5>565.3 (q), respectivamente. A partir de los fragmentos observados se propuso una ruta de fragmentación, según se muestra en la *Figura 2 del artículo científico 4*.

Cuando se realizaron las experiencias en LC, para favorecer la desprotonación de la abamectina se adicionaron diferentes concentraciones de TEA (de 10 a 10^4 μ M) en la fase móvil, considerando finalmente 500 μ M como la concentración óptima de TEA. A partir de las transiciones Q y q propuestas en las experiencias en infusión, se calcularon las relaciones Q/q para 10 réplicas y se obtuvieron valores de RSD del 9% con un LOD estimado, ya a nivel confirmativo, de 30 μ g/L. A pesar de que la configuración Ion Sabre APCI presentaba mayor sensibilidad para la abamectina en modo negativo, no fue suficiente para alcanzar el LMR en naranjas de 0.01 mg/kg. El LOD en muestra correspondería a 0.12 mg/kg, sin considerar que para el correcto desarrollo de un método analítico se debería referir al LOQ y no al LOD (generalmente ensayado a niveles de concentración superiores de entre 3 y 10 veces mayor al LOD estimado). En esta situación, si se deseara trabajar en estas condiciones sería necesario llevar a cabo un tratamiento de muestra con preconcentración. Debido a que el objetivo de este estudio no era la optimización y validación de un método analítico de determinación de abamectina en naranjas, sino estudiar su comportamiento en la ionización en API, el método de extracción considerado ha sido sencillo y rápido, en el que se ha inyectado directamente el extracto crudo de la muestra. Además en este método se ha diluido la concentración de abamectina respecto a la muestra 4 veces, pues se han tomado 25 g de muestra y se han llevado a un volumen de extracto final de 100 mL.

- *Ionización positiva*

- *Aductos de sodio*

La formación de aductos de sodio es la más frecuente en compuestos polioxigenados, incluso sin la adición del sodio en el medio de infusión o en LC. En

nuestro caso, la abamectina presentó un ion en ESI (m/z 895.5) correspondiente al $[M+Na]^+$, mientras que en el caso de las interfases APCI, no se pudo observar.

Mediante experiencias de infusión en ESI se optimizó la formación de iones producto a partir del aductos $[M+Na]^+$ sin adicionar ningún modificador sodiado en el medio. Tal como se observa en los espectros de la *Figura 1b del artículo científico 4*, el ion a m/z 895.5 conduciría *a priori* a una alta sensibilidad a nivel cuantitativo; sin embargo, su fragmentación generaba un pequeño número de iones producto poco abundantes (m/z 751.3, 607.5, 449.3 y 183.3), aunque con buena especificidad. La ruta de fragmentación propuesta para la abamectina aparece en la *Figura 3 del artículo científico 4*. Se seleccionaron las transiciones más sensibles, 895.5>751.3 (Q) y 895.5>449.3 (q), para la cuantificación y confirmación, respectivamente.

Las experiencias de LC se realizaron adicionando diferentes concentraciones de acetato sódico en las fases móviles (desde 1 a 50 μ M), seleccionándose como la más óptima 10 μ M. En estas condiciones se llegó a estimar un LOD de 7 μ g/L, con desviaciones en la relación Q/q superiores a las de otros aductos (RSD 14%), aunque todavía adecuadas.

- Aductos amoniados

La formación de aductos $[M+NH_4]^+$ (m/z 890.5) fue observada en los tres tipos de fuentes, ESI, APCI e Ion Sabre APCI. Para la optimización mediante infusión en ESI se añadió 5 mM de NH_4OAc al medio de infusión. A pesar de ello, se formaban aductos de $[M+Na]^+$ en una proporción 5 veces mayor que $[M+NH_4]^+$, probablemente por la presencia de impurezas de Na^+ tanto en las fases móviles como en el propio acetato de amonio, además de una menor afinidad de la abamectina por el ion NH_4^+ frente al Na^+ . La fragmentación del $[M+NH_4]^+$ presentó dos iones producto de gran abundancia (m/z 567.3 y 305.3). Un aspecto diferencial del aducto amoniado respecto al resto de aductos fue su labilidad, lo que condujo a la fácil fragmentación del ion precursor m/z 890.5 en la propia interfase, dando lugar al ion m/z 567.3 con una alta sensibilidad. Dicho ion se obtenía aumentando la energía del cono de entrada de 25 V a 35 V, y, a su vez, este ión se fragmentaba en la celda de colisión para dar m/z 307.3, consiguiéndose una pseudo- MS^3 . Esta fragmentación característica (*Figura 4 del artículo científico 4*) conduciría a un método de determinación más selectivo y específico que con el resto de aductos. Se seleccionaron como transiciones de cuantificación y confirmación 567.3>307.3 y 890.5>567.3, respectivamente.

Para el estudio previo LC en las distintas interfases, se ensayaron diferentes concentraciones de acetato amónico en la fase móvil. Las

concentraciones óptimas de dicho modificador para APCI y ESI fueron de 500 μM y 100 μM , respectivamente. El hecho de que la interfase APCI soporte una concentración más elevada de modificador está en concordancia con el menor efecto matriz o supresión de la ionización normalmente descrito frente a la interfase ESI. En la ionización por APCI, la interfase tradicional presentaba una sensibilidad 10 veces inferior a la Ion Sabre APCI, pero aún así ésta era menos sensible que la fuente ESI. Finalmente se llegó a un LOD de 2 $\mu\text{g/L}$ (0.008 mg/kg en muestra) en muestra de naranja. Sin embargo, la transición MS/MS de confirmación no presentó la misma sensibilidad que la de cuantificación, siendo la relación Q/q del orden de 3, aunque con buena reproducibilidad, tanto en ESI como en Ion Sabre APCI (7 y 9%, respectivamente).

- Aductos de litio

En la infusión de la abamectina en un medio 1 mM de acetato de litio se observaron los iones precursores $[\text{M}+\text{Li}]^+$ (m/z 879.5) y $[\text{M}+\text{Na}]^+$, aunque en esta ocasión la abundancia del $[\text{M}+\text{Li}]^+$ era mayor que la del aducto sodiado. De la misma forma que en el caso del aducto sodiado, no se observó la formación de aducto en las interfases APCI, por lo que se llevó a cabo la optimización únicamente en la fuente ESI.

Se observaron pocos iones fragmento del aducto $[\text{M}+\text{Li}]^+$ pero a diferencia de $[\text{M}+\text{Na}]^+$ presentaron mayor sensibilidad, especialmente los iones producto m/z 591.5 y 151.3. Se propusieron las transiciones 879.5>151.3 y 879.5>735.5 para la cuantificación y confirmación, respectivamente. A partir de los fragmentos obtenidos, se propuso una ruta de fragmentación para el aducto litiado de la abamectina (*Figura 3 del artículo científico 4*).

En las experiencias en LC-ESI-MS/MS con distintas concentraciones de acetato de litio (5 a 50 μM) se seleccionó como más adecuada 10 μM . En estas condiciones el LOD estimado fue de 3 $\mu\text{g/L}$ en extractos de naranja (0.012 mg/kg en muestra). La sensibilidad con estos aductos era mayor que con los correspondientes sodiados, sin embargo a nivel confirmativo no era posible llegar hasta ese LOD, ya que la intensidad de la transición de confirmación era 5 veces menor. En este caso la reproducibilidad de la relación Q/q (4.7) también se encontró satisfactoria (RSD 9%). Cabe destacar que el uso de los aductos litiados no había sido explorado como estrategia analítica para los compuestos polioxigenados que presentan problemas de ionización y tendencia a sodiarse.

A partir de los datos obtenidos y dado que la reproducibilidad de la formación de los aductos en todos los casos fue adecuada, desde el punto de vista

analítico la sensibilidad resulta ser uno de los parámetros clave en la determinación de abamectina. En este sentido, se pueden tener en cuenta dos aspectos importantes en la formación de los aductos: la afinidad del analito por el catión y la abundancia de los iones producto. En nuestro caso, se asignó el siguiente orden atendiendo a la sensibilidad: $[M+NH_4]^+ > [M+Li]^+ > [M+Na]^+$. De las tres aproximaciones, la que presentó mayores ventajas fue la formación del aducto amoniado y su correspondiente fragmentación mediante pseudo-MS³ en la fuente ESI. La formación de los aductos de litio como alternativa a los sodiados también es más ventajosa, ya que a nivel cuantitativo es posible llegar a LOD más bajos. Sin embargo, en ninguno de estos dos casos, $[M+NH_4]^+$ y $[M+Li]^+$, se encontró una transición de confirmación tan sensible como la de cuantificación, al contrario que en aductos $[M+Na]^+$. Pero aun presentando esta desventaja a nivel confirmativo, la configuración ESI y formación de aductos amoniados fue todavía más sensible para la abamectina a nivel de cuantificación y confirmación.

Se puede concluir que se han desarrollado diferentes estrategias para el análisis de abamectina en matriz de naranja con niveles adecuados de sensibilidad para su determinación a niveles de residuos. Siendo la formación de aductos amoniados la opción más adecuada para un análisis sensible, robusto, y con capacidad confirmativa.

Por otro lado, se ha comprobado que la fuente Ion Sabre APCI presenta mayor sensibilidad que la fuente convencional de APCI, llegando a ser similar a la de la fuente ESI. Además se puede concluir que la formación de aductos abre una puerta a nuevas estrategias de análisis para aquellos analitos que no presenten una buena capacidad de ionización ácido-base tradicional por protonación o desprotonación.

Por último, cabe incluir la posibilidad usar otras fuentes de ionización, tal como la interfase a presión atmosférica de fotoionización (APPI), como alternativa a las consideradas en este estudio.

2.3.4. Referencias bibliográficas

- Diserens, H.; Henzelin, M. (1999) *Determination of abamectin residues in fruits and vegetables by high-performance liquid chromatography* J. Chromatogr. A 833, 13-18
- Hengel, M.J.; Miller, M. (2008) *Analysis of pesticides in dried hops by liquid chromatography-tandem mass spectrometry* J. Agric. Food Chem. 56, 6851-6856
- Hernández Borges, J.; Ravelo-Pérez, L.M.; Hernández-Suárez, E.M.; Carnero, A.; Rodríguez-Delgado, M.A. (2008) *Determination of abamectin residues in avocados by microwave-assisted extraction and HPLC with fluorescence detection* Chromatographia 67, 69-75
- Howells, L.; Sauer, M.J. (2001) *Multi-residue analysis of avermectins and moxidectin by ion-trap LC-MSⁿ* Analyst 126, 155-160
- Pozo, O.J.; Marin, J.M.; Sancho, J.V.; Hernández, F. (2003) *Determination of abamectin and azadirachtin residues in orange samples by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry* J. Chromatogr. A 992, 133-140
- Turnipseed, S.B.; Roybal, J.E.; Rupp, H.S.; Gonzales, S.A.; Pfenning, A.P.; Hurlbut, J.A. (1999) *Confirmation of avermectin residues in food matrices with negative-ion atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography/mass spectrometry* Rapid Commun. Mass Spectrom. 13, 493-499
- Turnipseed, S.B.; Roybal, J.E.; Rupp, H.S.; Gonzales, S.A.; Pfenning, A.P.; Hurlbut, J.A. (2006) *Confirmation of avermectin residues in food matrices with negative-ion atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography/mass spectrometry* Rapid Commun. Mass Spectrom. 13, 493-499
- Valenzuela, A.I.; Redondo, M.J.; Picó, Y.; Font, G. (2000) *Determination of abamectin in citrus fruits by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry* J. Chromatogr. A 871, 57-65
- Valenzuela, A.I.; Popa, D.S.; Redondo, M.J.; Mañes, J. (2001) *Comparison of various liquid chromatographic methods for the analysis of avermectin residues in citrus fruits* J. Chromatogr. A 918, 59-65
-

Wu, Z.; Li, J.; Zhu, L.; Luo, H.; Xu, X. (2001) *Multi-residue analysis of avermectins in swine liver by immunoaffinity extraction and liquid chromatography-mass spectrometry* J. Chromatogr. A 755, 361-366

Zywitz, D.; Anastasiades, M.; Scherbaum, E. (2004) *Simultaneous determination of macrocyclic lactone insecticides in fruits and vegetables using LC-MS/MS* Deutsche. Lebensmittel-Rundschau 100, 140-150

PARTE II:

Analizador de espectrometría de masas
tiempo de vuelo (TOF)

Capítulo 3:

Potencial de TOF y QTOF en el análisis de residuos de plaguicidas en muestras vegetales.

3.1. Introducción Capítulo 3.

El ARP en muestras de alimentos supone uno de los campos de interés más relevantes de la química analítica. En la mayoría de los casos, se buscan métodos analíticos con alta sensibilidad, que sean capaces de cuantificar de modo fiable y robusto niveles de concentración del orden de 0.05 mg/kg en vegetales (European Commission Directive 2003/60/EC), o incluso 0.01 mg/kg en alimentos para niños (European Commission Directive 2006/125/EC). En el desarrollo de métodos para residuos de plaguicidas se debe tener presente el amplio rango de estructuras químicas de las diferentes familias de plaguicidas, que se traduce en considerables diferencias en sus características físico químicas, diferente polaridad, volatilidad, y estabilidad. Esta gran variedad de analitos obliga a trabajar con instrumentación robusta, moderna y complementaria capaz de ofrecer una alta selectividad y sensibilidad, teniendo en cuenta que no existen métodos universales de análisis y que, muchas veces, es necesario aplicar varios métodos para abarcar los compuestos que potencialmente podrían encontrarse en la muestra.

Mientras que tradicionalmente GC-MS ha sido la técnica analítica más aplicada, en la última década el uso de LC-MS ha tenido una creciente aplicación, especialmente para el análisis de plaguicidas con una mayor polaridad e inestabilidad térmica. En un principio se aplicó la aproximación de cuadrupolo simple (Q); sin embargo, rápidamente se comprobó que este analizador no ofrecía las prestaciones esperadas (a diferencia de GC-MS), principalmente por el alto ruido de fondo obtenido al acoplarlo con LC. Fue el uso de analizadores, que permiten trabajar en tándem MS, el que se impuso con claridad, debido a la excelente sensibilidad y selectividad alcanzadas. Las diferentes combinaciones de analizadores han permitido el trabajo MS en tándem, obteniendo los instrumentos de triple cuadrupolo (QqQ), híbrido cuadrupolo-trampa de iones lineal (QqLIT) e híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo (QTOF). Esta versatilidad instrumental ha abierto numerosas posibilidades, de forma que hoy en día se puede seleccionar un instrumento u otro ajustándose a los objetivos del análisis.

En general, se pueden distinguir dos objetivos básicos en ARP: análisis cuantitativo y análisis cualitativo. Mayoritariamente, el trabajo suele ir dirigido a análisis cuantitativo, en el que no siempre se presta suficiente atención al

cuantitativo. Es decir, el principal objetivo de la mayoría de laboratorios es desarrollar métodos analíticos multiresiduales *target* tratando de incluir el máximo número de plaguicidas, donde estos son cuantificados a niveles de residuos y no siempre bien identificados. Sin embargo, el análisis cualitativo es tan importante o más que el cuantitativo, pues una incorrecta identificación del analito puede dar lugar a falsos positivos o negativos, craso error que no puede medirse en términos de porcentaje. Resulta fundamental el desarrollo de métodos *screening* con fines cualitativos, así como profundizar en los criterios usados para la correcta identificación de los compuestos detectados. Así mismo, la química analítica está interesada en el desarrollo de metodología de búsqueda de contaminantes orgánicos no esperados y/o desconocidos en muestras de alimentos. Es en esta rama donde cobran gran interés las aplicaciones cualitativas, en métodos de *screening* o metodologías analíticas *non-target*, campos en los que los analizadores TOF MS ofrecen excelentes prestaciones.

Una vez se ha detectado la presencia de un plaguicida en una muestra, resulta de vital importancia confirmar su detección, bien a nivel identificativo o bien como confirmación de la concentración encontrada, especialmente si se superan los límites máximos legales. La correcta confirmación de la presencia de un analito puede evitar dar falsos positivos en nuestros análisis. La Comisión de la Unión Europea ha elaborado un documento guía para poder llevar a cabo la validación de un método analítico en la determinación de residuos de plaguicidas (Document N° SANCO/2007/3131), en el cuál se sugieren unas reglas para la correcta confirmación de un positivo. Se propone la adquisición de más de un ión, además de estudiar la relación de abundancia entre ellos, estableciendo un criterio de tolerancia de la variabilidad entre patrón y muestra. Esta guía está enfocada hacia instrumentación de rutina de laboratorio para métodos multiresiduales *target*, por lo que no hace referencia al uso de instrumentos de alta resolución. Por otro lado, existen otras guías, como la emitida por la Decisión 2002/657/CE (L221/8, 2002/657/EC), en la que se establecen criterios de evaluación de la confirmación más detallados y centrados en MS. En esta guía se establece el uso de diferentes grados de puntuación en función del tipo de ion adquirido (MS o MSⁿ), así como la resolución del instrumento utilizado. De forma que se definen los puntos de identificación (Identification Points, IPs) para evaluar el grado de fiabilidad en la identificación. Se establece el número de IPs que se obtienen en un análisis en función de si el ión es precursor o producto, y también en función de si han sido adquiridos por un instrumento de baja o alta resolución (Low Resolution (LR); High Resolution (HR)). Estos valores se indican en la **Tabla 3.1**, que se adjunta a continuación:

Tabla 3.1. Relación entre la información obtenida en MS y el número de IPs obtenidos.

Técnica MS	Puntos de identificación (IPs)
Espectrometría de masas de baja resolución (LR)	1.0
Ion precursor LR-MSⁿ	1.0
Ion producto LR-MSⁿ	1.5
Espectrometría de masas de alta resolución (HR)	2.0
Ion precursor HR-MSⁿ	2.0
Ion producto HR-MSⁿ	2.5

La correcta identificación de los compuestos detectados en las muestras ha sido el tema central de serios debates (Reemtsma, 2003; Till, 2005), especialmente cuando se tratan los criterios relacionados con los instrumentos de HR. Según Decisión 2002/657/CE, un instrumento de espectrometría de masas de alta resolución se caracteriza por presentar una resolución de masa de 10.000 al 10% de valle. El criterio del 10% de valle se originó con los instrumentos GC/HRMS de doble enfoque hace ya tiempo. Sin embargo, se han diseñado nuevos instrumentos de espectrometría de masas como el TOF, resonancia de ion ciclotrón (Ion Cyclotron Resonance, ICR) y Orbitrap, para los cuales la resolución se define en sus especificaciones como la anchura total a mitad de pico (Full Width at Half Maximum, FWHM), que suele corresponder habitualmente con el doble que al 10% de valle (se requerirían instrumentos de 20.000 FWHM para ser considerados de HRMS) (Nielen *et al.*, 2007). De este modo, instrumentos de alta/media resolución como el (Q)TOF Premier (17.500 FWHM), que no llegan a la resolución estipulada para ser incluidos como instrumentos de HRMS, sí son sin embargo, capaces de proporcionar una muy buena exactitud de masa. De acuerdo con este criterio, el (Q)TOF debería considerarse como un instrumento de baja resolución, con lo que se equipararía con equipos que trabajan en masa nominal como cuadrupolo, triple cuadrupolo o trampa de iones, asignándole el mismo número de IPs. Cabría preguntarse si lo que realmente debería evaluarse en la confirmación de la identidad de un analito es la resolución instrumental o la masa exacta de los iones adquiridos. En este sentido, en nuestro grupo (Hernández *et al.*, 2004) hemos propuesto asignar el número de IPs en función de la masa exacta, evaluando así el grado de confianza de un ion obtenido con instrumentos TOF MS. Para establecer el número de IPs hemos seleccionado tres intervalos de error de masa exacta en valor absoluto (mDa), con la intención de evitar que el

error de masa no aumente con la m/z (si se considera en ppm). A continuación, se muestra la **Tabla 3.2** con los IPs propuestos en nuestro trabajo (Hernández *et al.*, 2004).

Tabla 3.2. Relación entre la información obtenida en MS, la exactitud de masa y el número de IPs obtenidos.

Exactitud de Masa	Ion adquirido	Puntos de identificación (IPs)
Error mayor a 10 mDa	Ion simple (MS)	1.0
	Ion precursor (MS/MS)	1.0
	Ion producto (MS/MS)	1.5
Error entre 2 y 10 mDa	Ion simple (MS)	1.5
	Ion precursor (MS/MS)	1.5
	Ion producto (MS/MS)	2.0
Error menor a 2 mDa	Ion simple (MS)	2.0
	Ion precursor (MS/MS)	2.0
	Ion producto (MS/MS)	2.5

De esta forma, se considera que si la masa experimental de un ion se desvía más de 10 mDa del valor teórico exacto, los datos proporcionados por el instrumento no tienen la calidad suficiente, independientemente de la resolución instrumental que disponga. En este caso, el instrumento se trata como si fuera de baja resolución y la medida de masa fuera nominal (Q, QqQ, IT). En aquellos casos en los que el analizador MS sea capaz de proporcionar buenos valores de exactitud de masa, su confirmación será más fiable y el equipo se trata como si fuera de alta resolución. Lo que es indudable es que la masa exacta de un compuesto es fundamental desde el punto de vista identificativo.

A pesar de que se le debe dar importancia a la exactitud de masa frente a la resolución especificada como criterio para valorar la capacidad confirmativa, recientemente en el mercado han comenzado a aparecer instrumentos (Q)TOF de altísima resolución, incluso llegando a 40.000 y 50.000 FWHM (40.000 FWHM para QTOF Synapt G2 (Waters), 50.000 FWHM para UHR-TOF maXis (Bruker Daltonics)). En este sentido llegamos a unas condiciones en las que se puede considerar que el TOF entra dentro de los instrumentos de alta resolución.

Por otro lado, también se debería considerar el grado de especificidad que se obtiene en la fragmentación de un ion. El número de IPs asignados sólo depende de si es un ión adquirido en un analizador de MS, o si es un ión precursor o producto adquirido en un instrumento MSⁿ. En métodos MS/MS no es lo mismo que el ión producto proceda de la pérdida poco específica de H₂O, CO₂ o un halógeno, o que surja de pérdidas más específicas relacionadas con la estructura de la molécula. El tema de la importancia de la especificidad a la hora de escoger el ión producto ha sido ampliamente tratado por nuestro grupo de investigación (Hernández *et al.*, 2005; Pozo *et al.*, 2006).

También sería interesante diferenciar el ion producto en función del tipo de adquisición MSⁿ. Así, se podría discutir el número de IPs asignados a un ion producto cuando se obtiene en una segunda fragmentación en MS³, ya que esta fragmentación es más selectiva que la de un ion producto generado en MS². En general, cabe esperar que la especificidad obtenida en MSⁿ⁺² siempre fuera más valiosa para la confirmación de la identidad de un compuesto, al mismo tiempo que ofrezca información de gran calidad para proponer la ruta de fragmentación del mismo. En este tipo de análisis destacarán los analizadores de trampa de iones, tanto en configuración sencilla como participando en instrumentos híbridos, como el QqLIT o LIT-Orbitrap.

En este capítulo se explora en detalle la capacidad confirmativa del analizador (Q)TOF. A continuación, se incluyen dos artículos en los que se estudia en profundidad el potencial del QTOF para ARP en modo *target* y *non-target*, así como para la investigación de metabolitos de plaguicidas en muestras vegetales.

3.1.1.- Referencias bibliográficas

Commission Directive 2002/657/EC, COMMISSION DECISION of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (L221/8)

Commission Directive 2003/60/EC of 18 June 2003, amending the Annexes to Council Directives 76/895/EEC, 86/362/EEC, 86/363/EEC and 90/642/EEC as regards the fixing of maximum levels for certain pesticide residues in and on cereals, foodstuffs of animal origin and certain products of plant origin, including fruit and vegetables

Commission Directive 2006/125/EC of 5 December 2006 on processed cereal-based foods and baby foods for infants and young children

European Commission, Directorate General Health and Consumer Protection, Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed, Document N^o SANCO/2007/3131, 31 October 2007 (Supersedes Document No. SANCO/10232/2006 (http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf))

Hernández, F.; Ibáñez, M.; Sancho, J.V.; Pozo, Ó.J. (2004) *Comparison of different mass spectrometric techniques combined with liquid chromatography for confirmation of pesticides in environmental water based on the use of identification points* Anal. Chem. 76, 4349-4357

Hernández, F.; Sancho, J.V.; Pozo, Ó.J. (2005) *Critical review of the application of liquid chromatography/mass spectrometry to the determination of pesticide residues in biological samples* Anal. Bioanal. Chem. 382, 934-946

Nielen, M.W.F.; van Engelen, M.C.; Zuiderent, R.; Rmaker, R. (2007) *Screening and confirmation criteria for hormone residue analysis using liquid chromatography accurate mass time-of-flight, Fourier transform ion cyclotron resonance and orbitrap mass spectrometry techniques* Anal. Chim. Acta 586, 122-129

Pozo, O.J.; Sancho, J.V.; Ibáñez, M.; Hernández, F.; Niessen, W.M.A. (2006) *Confirmation of organic micropollutants detected in environmental samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry: Achievements and pitfalls* Trends Anal. Chem. 25, 1030-1042

Reemtsma T. (2003) *Comparison of tandem-in-space and tandem-in-time mass spectrometry in gas chromatography determination of pesticides:*

Application to simple and complex food samples J. Chromatogr. A 1000, 477-501

Till A.E. (2005) *Multiresidue liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of 52 non gas chromatography-amenable pesticides and metabolites in different food commodities* Sci. Total Environ. 350, 273-275

3.2. Estudio de la capacidad cuantitativa y confirmativa de LC-QTOF MS en análisis de residuos de plaguicidas en vegetales.

3.2.1. Introducción

En las dos últimas décadas el ARP en alimentos ha sufrido un gran avance gracias al notable aumento de sensibilidad y selectividad de las técnicas aplicadas. El uso de LC-MS, cada vez más frecuente, se ha realizado mayoritariamente como métodos *target*, utilizando principalmente MS en tándem con analizadores QqQ. En los últimos años, se ha potenciado el uso de analizadores de mayor resolución como el TOF. En este sentido, el uso del híbrido cuadrupolo acoplado a tiempo de vuelo (QTOF) presenta un gran potencial debido a la alta resolución del analizador TOF, así como su capacidad de realizar experiencias en modo MS/MS. Una de las capacidades más interesantes que el QTOF ofrece es la posibilidad de adquirir en *scan* con masa exacta de los iones productos obtenidos a partir de un ion precursor, aumentando considerablemente la selectividad del método analítico, además de proporcionar gran cantidad de información estructural de buena calidad del ion precursor seleccionado. Por otro lado, los nuevos avances tecnológicos que han sufrido estos analizadores están permitiendo que el QTOF pueda también usarse como una herramienta capaz de realizar análisis cuantitativos en métodos *target*. Pero sin duda el mayor potencial de este analizador se encuentra en el campo de la elucidación y confirmación de analitos por el gran número de IPs que puede llegar a proporcionar en una sola adquisición (Richardson, 2008). Incluso se ha considerado una herramienta adecuada para análisis *non-target* (Ibáñez *et al.*, 2005).

El uso del QTOF se ha extendido en campos como la investigación farmacéutica o biomédica. Sin embargo, apenas han sido exploradas sus capacidades cuantitativas en muestras de alimentos hasta estos dos últimos años (Soler *et al.*, 2007; Picó *et al.*, 2007a y 2008a; Wang *et al.*, 2009), mientras que el TOF se ha explorado más ampliamente, aplicándose especialmente para fines de *screening* en muestras de alimentos (Lacorte *et al.*, 2006; Thurman *et al.*, 2006; Ferrer *et al.*, 2005 y 2007; García-Reyes *et al.*, 2007a y 2008; Gilbert-López *et al.*, 2007; Mezcuca *et al.*, 2009). De la misma forma ocurre en análisis *non-target* o en la investigación de metabolitos de plaguicidas en alimentos, donde se ha aplicado más ampliamente TOF (Thurman *et al.*, 2005a y 2005b; García-Reyes *et al.*, 2005, 2007b y 2007c; Hernández *et al.*, 2008; Picó *et al.*, 2008b) frente al QTOF (Picó *et al.*, 2007a, 2007b y 2008a).

El trabajo que se presenta en este capítulo tiene el objetivo principal de explorar el potencial del QTOF para ARP en muestras de alimentos, considerando básicamente el análisis *target* de tipo cuantitativo y confirmativo. Para ello, se seleccionaron dos insecticidas como modelos de trabajo (buprofezin y

hexythiazox). Se estudió la ruta de fragmentación de ambos analitos mediante experiencias MS y MS/MS con el QTOF, obteniendo las masas exactas y estructuras químicas de cada uno de los fragmentos. Se seleccionó el ion producto más abundante para la cuantificación y el resto de iones se consideraron para evaluar la capacidad confirmativa. La confirmación se llevó a cabo estudiando las relaciones de abundancia de cada uno de los iones producto con respecto al más abundante. Se desarrolló un método de análisis en seis tipos de matrices de frutas (piel y pulpa de naranja, piel y pulpa de plátano, fresa y pera) por LC-QTOF MS/MS; validándose a tres niveles de concentración: 0.1, 1 y 5 mg/kg. Se evaluó la exactitud y precisión para los tres niveles de concentración ensayados, extrayendo los XICs del TIC a diferentes ventanas de extracción (ventanas de masa de ± 25 y ± 100 mDa). En el estudio de validación, también se obtuvo el rango de linealidad del analizador QTOF, desde 1 a 750 ng/mL; se calculó el LOD para ambos analitos en cada uno de los tipos de matriz; y, se alcanzó un LOQ objetivo de 0.1 mg/kg para todas las matrices. El método analítico de ARP desarrollado por LC-QTOF fue aplicado a muestras reales de plátano, obtenidas de un ensayo de campo. Las mismas muestras también se analizaron mediante otra técnica LC-MS/MS (QqQ) que permitió comparar los resultados de cuantificación obtenidos.

Como segundo objetivo se exploró la capacidad del QTOF para la elucidación de compuestos desconocidos, análisis *non-target* de productos de transformación de los plaguicidas modelo seleccionados para el estudio. Para ello, se realizaron adquisiciones TOF-MS de las diferentes muestras no tratadas y tratadas procedentes de ensayos de campo realizados con muestras de plátano. Para la búsqueda de los metabolitos de buprofezin o hexythiazox se hizo uso de un *software* especializado, capaz de comparar las adquisiciones obtenidas para cada uno de los tipos de muestras de plátano (tratadas frente a no tratadas). De manera que se llegó al descubrimiento de un metabolito de buprofezin, correspondiente a la oxidación del mismo, que gracias al uso del QTOF fue posible elucidar correctamente.

3.2.2. Artículo Científico 5:

Use of Liquid Chromatography Coupled to Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry To Investigate Pesticide Residues in Fruits.

S. Grimalt, O.J. Pozo, J.V. Sancho, F. Hernández

Analytical Chemistry **2007**, 79, 2833-2843

Anal. Chem., **79** (7), 2833 -2843, 2007

Use of Liquid Chromatography Coupled to Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry To Investigate Pesticide Residues in Fruits

Susana Grimalt, Óscar J. Pozo, Juan V. Sancho, and Félix Hernández*

Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, E-12071 Castellón, Spain

Received for review July 7, 2006. Accepted January 12, 2007.

Web Release Date: February 20, 2007

Copyright © 2007 American Chemical Society

Abstract:

In this paper, the potential of coupling liquid chromatography with hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-QTOF) for the determination of pesticides in a variety of fruit samples (orange peel and flesh, banana skin and flesh, strawberry and pear) has been explored. The quantitative application at residue levels has been proven for two insecticides (buprofezin and hexythiazox), which were satisfactorily determined at three concentration levels, 0.1, 1, and 5 mg/kg, obtaining a suitable linearity range (correlation coefficient > 0.99) of more than 2 orders of magnitude. Satisfactory recoveries have been obtained for both compounds at the three levels tested in all sample matrices, with lowest calibration levels (LCL) of 0.075 and 0.01 mg/kg. The excellent potential of QTOF for identification purposes is illustrated by the high number of identification points (IPs) earned, up to 21, at the highest concentration of 5 mg/kg, or between 11 and 21 at the 0.1 and 1 mg/kg levels. The application of LC-QTOF MS to real samples revealed the presence of several positives at concentrations close to the LCL, all of which were confirmed with more than 11 IPs. The potential of QTOF for elucidation of nontarget analytes has also been demonstrated by the finding of one transformation product (TP) of buprofezin in a banana skin sample. This TP was identified by obtaining the full scan product ion spectra at different collision energies with acceptable accurate mass deviation. The work performed in this paper illustrates the suitability and excellent confirmatory potential of LC-QTOF MS for pesticides residues analysis in food samples.

INTRODUCTION

Pesticide residue analysis (PRA) in food commodities is an important field of modern analytical chemistry. Nowadays, the reliable determination of pesticide residues is a challenge for analytical chemists. Methods applied have to achieve the high sensitivity required (in many cases residues have to be accurately determined at levels close to 0.05 mg/kg in vegetables,¹ or 0.01 mg/kg in baby food²) for a wide variety of analyte/matrix combinations, and for compounds from different chemical families with quite distinct physicochemical characteristics. Additionally, foodstuffs are complex matrix samples, which makes the selectivity of the method very important. Thus, to develop suitable and robust methods in PRA, powerful analytical techniques able to offer the high selectivity and sensitivity needed for a wide range of analyte polarities are required.

Gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) has usually been the technique of choice for this purpose. However, in the past 10 years there has been a clear trend to use liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS)³ as a powerful and effort saving technique for PRA. This trend can be explained by continuous technical improvements and by the excellent analytical characteristics of LC-MS, mainly for the determination of polar, nonvolatile analytes. Although some MS analyzers such as single quadrupole (Q) in selected ion monitoring (SIM) mode,^{4,5} and ion trap (IT) in scan mode^{6,7} have been applied, these methods present some limitations, mainly regarding sensitivity and/or specificity. Two alternatives have typically been considered to minimize these limitations: the use of tandem mass spectrometry, such as IT in MSⁿ mode⁸ or triple quadrupole (QqQ),^{9,10} and the use of medium/high-resolution mass spectrometry, such as time-of-flight (TOF).^{11,12} These techniques have allowed a significant advance in PRA, mainly due to the notable increase in method sensitivity and selectivity. Within this field, hybrid quadrupole time-of-flight (QTOF) offers strong potential, because it combines the high resolution of TOF analyzers with the capability to perform MS/MS experiments. Thus, one of the most attractive characteristics of QTOF is the possibility of acquiring full scan spectra of product ions with accurate mass, which drastically increases the selectivity of the method due to the high amount and quality of the structural information produced.

In addition to the sensitivity and accuracy needed for quantification, an evident analytical requirement is to provide reliable information for a confirmation of the identity of the pesticide detected to avoid reporting false

positives. The correct identification of organic pollutants has become a serious and debatable subject.^{13,14} Recently, several guidelines consider confirmation as a required parameter before reporting positive findings in real-world samples. Thus, the European SANCO Document on Quality Control Procedures for PRA¹⁵ proposes confirmation principles, although mainly based on data obtained by GC-MS analysis with electron ionization (EI). Although it opens up the possibility of using other ionization processes, such as chemical ionization (or atmospheric pressure ionization (API) in LC-MS based methods), or other MS approaches, such as high-resolution MS or tandem MS, no detailed mass spectrometric criteria are given for confirmation that take into account the different approaches used nowadays in PRA. A more detailed guideline regarding confirmation comes from the European Commission Decision 2002/657/EC, used for identification and quantification of organic residues and contaminants in foodstuffs of animal origin.¹⁶ It is based on earning Identification Points (IPs) to evaluate the results of confirmation, as previously discussed by André et al.¹⁷ Confirmative criteria based on IPs have been studied in depth and applied at our laboratory in environmental samples,^{18,19} where QTOF has shown its great potential for confirmation of organic pollutants. As a consequence of its excellent capability to acquire wide structural information, the use of QTOF is an increasing trend for elucidation and compound confirmation (a high number of IPs can be reached), as recognized in a recent review on environmental MS.²⁰ The valuable structural information provided by this technique may even allow the elucidation of nontarget compounds.²¹

Although LC-TOF MS has been investigated in PRA of food samples,^{11,12} the use of hybrid QTOF remains almost unexplored in this field in spite of its high potential. Most QTOF applications have been directed toward other fields such as pharmaceutical or biomedical research, with very few applications to food analysis,²² and some work focused on environmental pollution.^{23,24}

The goal of this work is to show the potential of QTOF for PRA in food samples in regard to quantification and confirmation of target analytes. In addition, the capability of QTOF for elucidation of unknowns, such as other nontarget pesticides or transformation products (TPs), and the use of the accurate mass data provided by this instrument to establish fragmentation pathways have also been explored. As an illustrative case study, two insecticides, hexythiazox and buprofezin, have been investigated in different fruit commodities.

EXPERIMENTAL SECTION

Reagents and Chemicals. Hexythiazox and buprofezin reference standards were purchased from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). HPLC grade methanol, residue analysis grade acetone, and reagent grade formic acid were purchased from ScharLab (Barcelona, Spain). LC grade water was obtained by purifying demineralized water in a Nanopure II system (Barnstead Newton, MA).

Stock standard solutions of hexythiazox and buprofezin were prepared by dissolving 50 mg powder, accurately weighted, in 100 mL acetone, obtaining a final concentration of 500 µg/mL. These solutions were stored at -20 °C. Working solutions, used for LC-QTOF MS analysis or sample fortification, were obtained by diluting the stock solutions with acetone.

Instrumentation. A hybrid quadrupole time-of-flight (QTOF) mass spectrometer provided with an orthogonal Z-spray-electrospray interface (ESI) (Waters, Milford, MA) was interfaced to an HPLC system, Waters Alliance 2695 (Waters) quaternary pump, for the chromatographic separation. Drying gas as well as nebulizing gas was nitrogen, generated from pressurized air in a nitrogen generator from Peak Scientific (Inchinnan, Scotland, U.K.). The nebulizer gas flow was set to approximately 15 L/h and the desolvation gas flow to 700-800 L/h. A cone voltage of 30 V and a capillary voltage of 3.5 kV were used in both positive and negative ionization modes. The nitrogen desolvation temperature was set to 350 °C and the source temperature to 120 °C. TOF MS resolution was approximately 5000 (fwhm). MS and MS/MS spectra were acquired over an *m/z* range 50-650. For MS/MS operation, argon (99.995%, Carburos Metálicos, Valencia, Spain) was used as a collision gas with a pressure of approximately 2×10^{-5} mbar in the collision cell. Collision energies of the different product ions were chosen depending on the method purpose. Thus, for quantification, only one collision energy was considered (20 eV), while for confirmation, three collision energies were selected (10, 20, and 30 eV). The MCP detector potential was set to 2900 V. Scan times of 1 s/spectrum were chosen. A suitable MS profile was used. Data station operating software was MassLynx v 4.0.

Mobile phases consisted of mixtures of 0.01% HCOOH in methanol/0.01% HCOOH in water, and an injection volume of 25 µL was used. For quantification purposes, the separation was performed on a short Discovery C₁₈ column (50 mm × 2.1 mm, i.d. 5 µm) (Supelco, Bellefonte, PA) using gradient elution at a flow rate of 0.3 mL/min. The percentage of methanol was changed as follows: 0.0 min, 55%; 3.0 min, 55%; 4.0 min, 90%; 6.1 min, 55%; 10.0 min, 55%. For confirmation

Anal. Chem., **79** (7), 2833-2843, 2007

purposes, a Discovery C₁₈ column (50 mm × 2.1 mm, i.d. 5 μm) was also used, but by performing a shallow gradient where the percentage of methanol changed as follows: 0.0 min, 20%; 2.0 min, 20%; 2.1 min, 60%; 17.0 min, 80%; 17.1 min, 80%; 20.0 min, 20%. Flow rate was also selected at 0.3 mL/min. Finally, for elucidation purposes, a long X-Terra C₁₈ column (250 mm × 2.1 mm, i.d. 5 μm) (Waters) was used, at a flow of 0.2 mL/min with a gradient where the percentage of methanol varied as follows: 0.0 min, 5%; 20.0 min, 95%; 23.0 min, 95%; 24.0 min, 5%; 35 min, 5%. A solvent delay of 3 min was applied in the analysis.

Calibration of the *m/z*-axis was performed daily using a Model 11 single syringe pump (Harvard Instruments, Holliston, MA), directly connected to the interface. Calibration in both positive and negative ESI mode was conducted from *m/z* 50-650 with a 1:1 mixture of 0.1 M NaOH/10% HCOOH diluted (1:25) with acetonitrile/water (80:20), at a flow rate of 20 μL/min.

Sample Procedure. Six types of samples were analyzed: orange peel and flesh, banana skin and flesh, strawberry and pear. Banana samples corresponded to field residue trials, while the rest were collected from the market. Samples were cut into small pieces without any pretreatment and were triturated with a chopper K55E (Dito Sama, Aubusson, France). An aliquot of 10 g homogenized chopped sample was accurately weighted (precision 0.1 mg) and mixed with 70 mL acetone. After extraction for 2 min with high-speed blender Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel GmbH & Co., Staufen, Germany) at 8000 rpm, the entire extract was filtered through a 25-30 μm filter paper (filtros ANOIA S.A., Barcelona, Spain) and washed with 10 mL of acetone, and the volume was adjusted to 100 mL with acetone. An aliquot of the raw extract was passed through a 0.45 μm Nylon syringe filter (ScharLab, Barcelona, Spain) to remove solid particles. Then, 25 μL filtered extract was directly injected in the LC-QTOF system.

Fortification of samples was performed by delivering 1 mL mixed standard solutions of 1, 10, or 50 μg/mL in acetone to 10 g homogenized sample to obtain 0.1, 1, and 5 mg/kg levels, respectively. These samples were equilibrated, under room conditions, for 1 h prior to extraction.

MS and MS/MS Experiments. Obtaining accurate mass measurements for product ions is very helpful to establish the fragmentation pathway of the selected precursor ion. First, full scan experiments in positive ionization mode at different cone voltages, using the first quadrupole only as a RF-guide, were performed to establish the optimum cone voltage for each compound. Second, QTOF experiments at different collision energies were performed in order to obtain the more sensitive response for each product ion. At each collision energy

tested, a product ion with both known exact mass and suitable abundance was selected as lock mass in order to maintain accurate mass measurements for the rest of the product ions. The accurate mass obtained for each product ion was used to confirm the proposed fragmentation pathway. Additionally, relative intensity abundances were evaluated.

Validation of the Quantitative Method. Different validation data sets were obtained for each type of sample, following the European Union SANCO working documents.¹⁵

The calibration curve was obtained by injecting, in triplicate, standard solutions at 12 concentration levels between 1 and 750 ng/mL. The selected calibration points were the following: 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500, and 750 ng/mL. Linearity acceptance criterion was that correlation coefficients were higher than 0.99.

The accuracy and the precision were calculated by analyzing blank samples spiked at three concentration levels (0.1, 1, and 5 mg/kg) and were evaluated within-day in quintuplicate at each concentration level. Acceptance criteria for accuracy were that recoveries fall between 70% and 110% and for precision that relative standard deviation (RSD) was lower than 20%.

The limit of detection (LOD), defined as the lowest concentration that analytical process can reliably differentiate from background levels, was estimated for a signal-to-noise ratio of 3 from the chromatograms of samples spiked at the lowest analyte concentration tested.

Two mass windows (i.e., 50 and 200 mDa) were tested during mass chromatogram extraction in order to have the most reliable quantitative method.

Confirmation Study. The confirmation capability of QTOF was explored and discussed on the basis of the number of Identification Points (IPs) earned, in the line of the European Commission Guideline for residue contaminants in products of animal origin.¹⁶ A confirmation method for hexythiazox and buprofezin was applied to samples spiked at three concentrations (0.1, 1, and 5 mg/kg) in order to evaluate the QTOF confirmatory capabilities at both low and high residue levels. The relative abundance of each ion was calculated by measurement of peak areas in its eXtracted Ion Chromatogram (XIC). Theoretical abundance data were obtained as mean relative abundances calculated from the standard solutions (at different concentration levels) injected in each sample batch. The experimental value for each ion in the sample investigated was then compared with the theoretical one. Every ion, whose relative abundance fulfilled EU criteria,¹⁶ was considered as acceptable for confirmative purposes, and the

Anal. Chem., **79** (7), 2833-2843, 2007

adequate number of IPs was then assigned. Experimental accurate mass values were obtained by combination of all spectra across the chromatographic peak.

Although the higher the IPs reached the more reliable the confirmation, a detected analyte can be considered as positive if, at least, 3 IPs are obtained, in the case of regulated compounds such as the majority of pesticides. For nonregulated banned compounds, a minimum of 4 IPs is required.¹⁶

Elucidation Study. In order to detect the presence of possible pesticide TPs in real samples, the instrument was operated first in TOF mode. To maintain mass accuracy along the time, 1 $\mu\text{g/mL}$ solution of 3,5-diiodo-L-tyrosine (Sigma, Louis, MO) in methanol was used as lock mass, and introduced postcolumn using a model 2150 isocratic HPLC pump (LKB, Bromma, Sweden) at a flow rate of 100 $\mu\text{L/min}$ by means of a PEEK T-union. To obtain accurate mass measurements, 15 spectra were combined, and an N_p value of 0.6 was used. The mass data were centered using peak areas at 80% of centroid top.

The methodology applied was based on the comparison between a positive sample and a blank sample. Data were acquired in continuum mode, and subsequently centered and corrected by lock mass measurement. Differences between both samples were highlighted by means of the MetaboLynx application manager (Waters). The unknown chromatographic peaks found during this procedure might be considered, in principle, as potential TPs peaks. Their molecular formulas were calculated from their accurate mass and isotopic pattern.

Subsequently, the product ion spectrum for each presumptive TP peak was obtained operating in QTOF mode. In this case, the precursor ion, or one of the product ions at higher m/z , was used as a lock mass for accurate mass measurement, centering and correcting data acquisition. Possible neutral losses were evaluated as well, in order to elucidate the TP structure.

RESULTS AND DISCUSSION

MS and MS/MS Experiments. In MS experiments performed in TOF full scan mode, the best sensitivity for both compounds was obtained at a cone voltage of 30 V. In QTOF experiments, we selected the protonated molecule ($[M + H]^+$) as precursor ion (m/z 353 for hexythiazox and m/z 306 for buprofezin), and its product ion spectra were acquired at 10, 20, and 30 eV collision energies.

Data obtained after MS/MS experiments allowed us to propose the fragmentation pathways for both compounds. The pathway proposed for hexythiazox (Figure 1) starts with a McLafferty rearrangement from the precursor

ion **a** to give the product ion **b** after a loss of cyclohexene. A subsequent McLafferty rearrangement leads to **c**, after a neutral loss of HNCO. From ion **c**, two possible ways of fragmentation may be considered: one to obtain **d**, after the neutral loss of H₂S, and the other, by consecutive losses of SCO and NH₃, to obtain **e** and **f**, respectively.

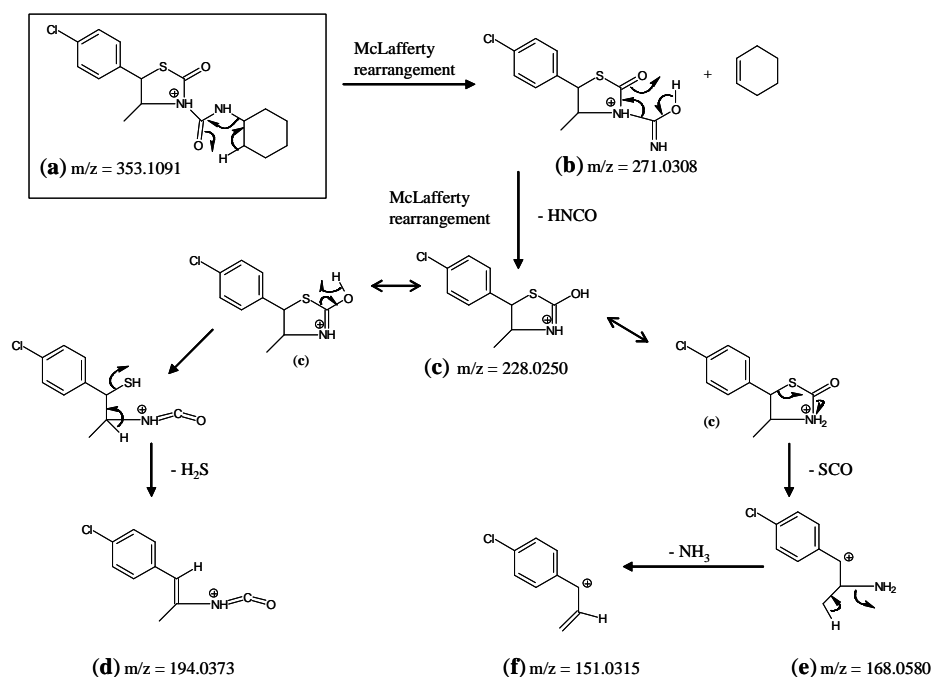


Figure 1. Fragmentation pathway proposed for hexythiazox.

Figure 2 shows the proposed buprofezin fragmentation pathway, where three possible routes are considered from the precursor ion **g**. One of them includes two consecutive McLafferty rearrangements to obtain the product ions **h** and **i**, after neutral losses of propene and isobutene, respectively. Another route is proposed by a retro Diels-Alder (**g**) to generate **j** and **m**. Then, the neutral loss of (CH₃)₂CHNCO from product ion **j** generates the ion **l**. From **j**, the product ions **k** and **n** are obtained by two McLafferty rearrangements with neutral losses of isobutene and SCNH, respectively. In another fragmentation route the product ion **o** is obtained directly from the precursor ion **g**.

The use of accurate mass has been reported as a useful tool to avoid misinterpretations in MS/MS fragmentation pathways.²⁵ In order to obtain reliable mass accuracy in TOF instruments, a reference ion with known exact mass is necessary within the spectrum. In QTOF experiments, this lock mass can be the

surviving precursor ion. In our case, this approach was used at low collision energies, i.e., when the precursor ion was still present. However, at higher collision energies, the absence of precursor ion forced us to select some product ions (228.0250 for hexythiazox and 201.1062 for buprofezin) as lock mass. Using this approach, the deviations of the experimental masses from the theoretical ones were in most cases lower than 2.0 mDa (Table 1). Therefore, the proposed fragmentation pathways (Figures 1 and 2) are supported by the accurate masses obtained. The only exception was found to be the hexythiazox product ion (**f**) (deviation 3.3 mDa), probably due to its low relative abundance.

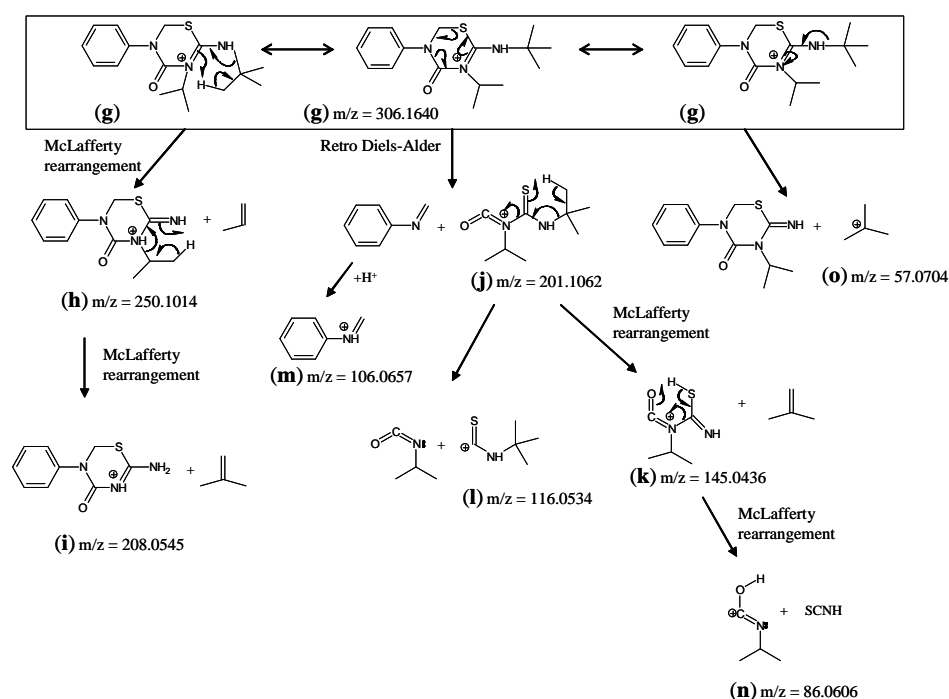


Figure 2. Fragmentation pathway proposed for buprofezin.

In general, both hexythiazox and buprofezin product ions at higher m/z presented optimum collision energy of 20 eV, while for lower m/z values 30 eV was necessary to maximize abundance. For hexythiazox, the most abundant product ion was **c**, m/z 228.0250, while for buprofezin the highest abundance was obtained for **j**, m/z 201.1062, both optimized at 20 eV. Although the number of product ions observed was higher in the case of buprofezin, most of them presented relative abundances lower than 10% making their potential use for confirmative purposes troublesome in samples at concentration levels close to the LOD. Three hexythiazox ions (**b**, **c**, and **e**) exhibited relative abundances higher

than 20%, facilitating their use at low analyte concentrations. It is remarkable that these relative abundances may vary depending on some parameters, such as the quantity of argon in the collision cell. Therefore, checking abundances is recommended before using them for confirmative purposes in real samples.

Table 1. Product Ions for Hexythiazox and Buprofezin

analyte	product ion	theoretical <i>m/z</i>	experimental <i>m/z</i>	deviation (mDa)	abundance		
					10 eV	20 eV	30 eV
hexythiazox	C ₁₇ H ₂₂ N ₂ O ₂ SCl ⁺ (a)	353.1091			74	15	
	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂ SCl ⁺ (b)	271.0308	271.0328	2.0	13	26	4
	C ₁₀ H ₁₁ NO ₂ SCl ⁺ (c)	228.0250	228.0250	0.0	36	100	48
	C ₁₀ H ₉ NOCl ⁺ (d)	194.0373	194.0391	1.8		2	17
	C ₆ H ₁₁ NCl ⁺ (e)	168.0580	168.0564	1.6	1	5	46
	C ₉ H ₈ Cl ⁺ (f)	151.0315	151.0282	3.3		0.4	2
buprofezin	C ₁₆ H ₂₄ N ₃ OS ⁺ (g)	306.1640			12	6	0.1
	C ₁₂ H ₁₆ N ₃ OS ⁺ (h)	250.1014	250.0998	1.6	1.1	4	1.4
	C ₉ H ₁₀ N ₃ OS ⁺ (i)	208.0545	208.0527	1.8	0.1	1.1	3
	C ₉ H ₁₇ N ₂ OS ⁺ (j)	201.1062	201.1045	1.7	67	100	9
	C ₅ H ₉ N ₂ OS ⁺ (k)	145.0436	145.0447	1.1	0.4	5	9
	C ₅ H ₁₀ NS ⁺ (l)	116.0534	116.0520	1.4	5	26	32
	C ₇ H ₈ N ⁺ (m)	106.0657	106.0657	0.0	0.6	5	12
	C ₄ H ₈ NO ⁺ (n)	86.0606	86.0611	0.5		0.3	2
	C ₄ H ₉ ⁺ (o)	57.0704	57.0716	1.2		1.0	2

^a Abundances at different collision energies and deviations of experimental *m/z* values from the theoretical ones.

Quantification. After MS/MS optimization, five and eight possible product ions were plausible for determination of hexythiazox and buprofezin, respectively. For quantitative purposes, only the most sensitive product ion was selected. Thus, the method included two functions, one for buprofezin (product ions from *m/z* 353) and the other for hexythiazox (product ions from *m/z* 306), both at a cone voltage of 30 V and collision energy of 20 eV. Both compounds were quantified using different XICs at the most sensitive product ions, i.e., 228.0250 (hexythiazox) and 201.1062 (buprofezin).

Quantification was performed at two mass extraction windows (50 and 200 mDa) and at different levels of fortification in each sample type, with the aim of establishing the most suitable quantitative approach. As can be seen in Table 2, data were similar at 1 and 5 mg/kg spiking levels independently on the mass windows used. However, at 0.1 mg/kg quantitative data obtained with a microwindow XIC of 50 mDa were clearly poorer than those of 200 mDa. Although some recoveries could be considered satisfactory, relative standard deviations at this low level were unacceptable, especially when decreasing the mass window. This fact could be explained by the need to use, as lock mass, a known ion present

Anal. Chem., **79** (7), 2833 -2843, 2007

in the spectrum different from the quantitative one in order to calculate accurate mass. This ion is normally less abundant and, at low concentrations, can remain almost undetectable, making the assignment of accurate mass unreliable. Under these circumstances, the deviation in the measurement of each ion substantially increases, especially at mass windows lower than 200 mDa. Although this situation was only observed at the lowest concentration tested, a mass window of 200 mDa was selected for the overall concentration range to perform quantitative applications.

Table 2. Quantification of Hexythiazox and Buprofezin in Several Sample Types Using Two Mass Windows

recovery (%)	50 mDa			200 mDa		
	0.1 mg/kg	1 mg/kg	5 mg/kg	0.1 mg/kg	1 mg/kg	5 mg/kg
	Hexythiazox					
orange peel	125(35)	103(17)	90(19)	95(10)	108(19)	83(17)
orange flesh	130(145)	104(6)	114(6)	97(39)	110(7)	110(7)
banana skin	117(39)	93(19)	120(6)	127(31)	110(11)	114(4)
banana flesh	119(81)	98(23)	110(8)	114(10)	97(20)	105(9)
strawberry	122(129)	79(20)	94(12)	104(27)	88(18)	91(3)
pear	147(19)	112(16)	86(3)	109(12)	109(13)	84(5)
	Buprofezin					
orange peel	51(31)	78(5)	75(6)	57(18)	78(5)	75(6)
orange flesh	91(8)	102(4)	99(4)	93(8)	102(3)	99(5)
banana skin	84(15)	101(4)	97(2)	86(4)	101(4)	98(2)
banana flesh	90(3)	89(14)	97(3)	97(8)	93(7)	97(3)
strawberry	76(16)	82(6)	88(5)	81(11)	82(6)	89(4)
pear	79(8)	86(4)	87(5)	83(9)	86(3)	87(5)

^a Mean recoveries and relative standard deviations (in brackets) at three concentration levels ($n = 6$, each).

Traditionally, QTOF has found its main applications in qualitative analysis, as has been described in environmental analysis.²⁴ The main limitation for quantitative purposes comes from its low linear dynamic range. However, some authors have found satisfactory quantitative applications of TOF analyzers in the determination of pesticides in vegetable samples.^{11,12} In the present work, calibration linearity was studied considering different types of adjustments. Standards for calibration were adjusted to first- and second-order equations, obtaining in both cases calibration curves about 2 (hexythiazox) or 3 (buprofezin) orders of magnitude with satisfactory correlation coefficient (higher than 0.99). When studying the tendency of both adjustments, the second-order equation fit better than the first-order one, and the estimated variance of residuals for the adjustment was lower (1.7 compared to 3.0 for hexythiazox, and 61 compared to 322 for buprofezin). Due to this behavior, a second-order adjustment was found to be more suitable, and it was finally applied for quantitative purposes.

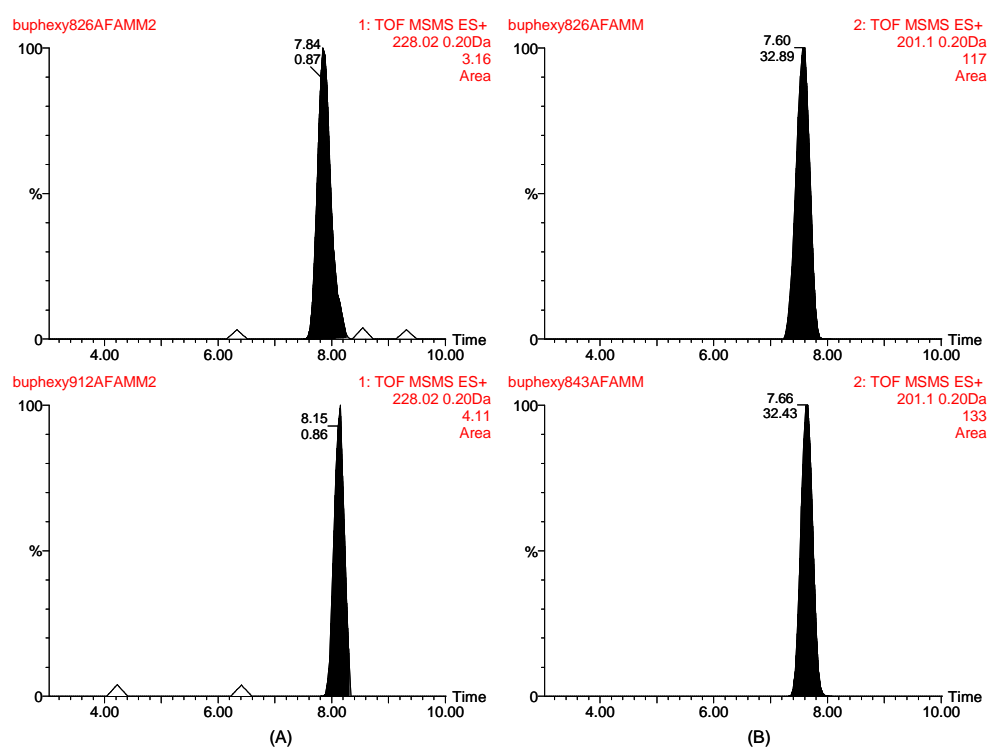


Figure 3. LC-ESI-QTOF XIC chromatograms of (A) 10 ng/mL hexythiazox standard solution (top) and pear sample fortified at 0.1 mg/kg (bottom), and (B) 10 ng/mL buprofezin standard solution (top) and orange flesh sample fortified at 0.1 mg/kg (bottom).

The quantitative method led to satisfactory recoveries for both analytes in the sample matrices tested. Therefore, no relevant ionization suppression due to matrix components^{26,27} was observed, even after the direct injection of the raw extracts. Relative standard deviations were typically lower than 20%, except for hexythiazox at 0.1 mg/kg in some matrices, which was assumed to be due to the lower sensitivity for this compound, together with the loss of mass accuracy explained above.

The LOD estimation may sometimes be ambiguous, due to the nonpractical existence of chemical noise in the chromatogram (Figure 3). We have used the lowest calibrated level (LCL) instead, i.e., the lowest concentration that fulfills the calibration range, which was found to be 7.5 ng/mL (hexythiazox) and 1 ng/mL (buprofezin). Thus, the reliable determination of hexythiazox and buprofezin could be made at levels down to 0.075 and 0.01 mg/kg, respectively, in samples. Although the analytes were in fact detected at concentrations lower

Anal. Chem., **79** (7), 2833-2843, 2007

than LCL, quantification was not considered reliable, as occasionally there may be interference from little spikes of electronic noise appearing at the analytes' retention time.

Confirmation. The developed quantitative method could be taken also as confirmative due to the additional information obtained from the product ion full scan acquired at one collision energy. From a strict point of view, confirmation requires the reanalysis of the sample, by which the second result "confirms" the first. Obviously, a second independent analysis would be preferable for more reliable confirmation, in order to rule out possible sample contamination, carry-over, mislabeled samples, or another kind of human error, this being the approach typically applied when dealing with regulatory purposes, ideally using an analytically orthogonal approach.

In the present paper, we have explored the extraordinary potential of QTOF within this field, and confirmation has been made by performing a second injection in the QTOF instrument, acquiring the complete product ion spectrum, and using a more gradual mobile phase gradient. We have adopted the criterion based on the number of IPs as a simple way to compare the amount and quality of information provided in confirmatory analyses.¹⁶ Interesting confirmation guidelines in PRA have been proposed by the U.S. Department of Agriculture²⁸ and by the European Union.²⁹ The use of IPs as confirmatory criterion is subject to controversies and has no jurisdiction in PRA in fruits and vegetables. However, it is being increasingly applied by many authors in different fields, as it is easy to apply and is a suitable way to compare confirmation capabilities between different instruments.

The number of IPs earned per measured ion has been established according to instrumental resolution, i.e., 1.0 and 2.0 IPs for a precursor ion at low resolution (LR) and high resolution (HR), respectively, and 1.5 and 2.5 IPs for a product ion at LR and HR, respectively.^{16,17} HR is defined as 10000 resolution at 10% valley, while the resolution in TOF instruments is usually expressed at 50% valley. Strictly, this means that TOF analyzers with 20000 resolution would be required to be considered as HR instruments. In spite of this, the number of IPs commonly assigned to TOF MS is the same as that of a traditional HR instrument (i.e., magnetic sector). In our opinion, the use of mass accuracy provided by TOF MS seems a more appropriate criterion for a reliable confirmation rather the instrumental resolution specifications,¹⁸ this being surely the reason for several authors to assign the same number of IPs to TOF and to HR instruments. It is desirable that mass accuracy is also considered in future guidelines for

identification/confirmation criteria due to the outstanding importance of this parameter. Although a different number of IPs has been assigned to TOF instruments depending on the experimental mass accuracy obtained,¹⁸ the approach adopted in the present paper for QTOF measurements has been to assign 1.0 for precursor ion (isolation by the first quadrupole, at nominal mass) and 2.5 IPs for each product ion (measured with accurate mass) in order to use a homogeneous system according to previous data available in the literature. With few exceptions, in most of the examples shown in this paper, mass accuracies better than 2 mDa were obtained (5 ppm for 400 Da mass) in accordance with the specifications of our QTOF instrument. It is noteworthy that better mass accuracy could be easily observed with the new generations of QTOF instruments available at present.

A high number of IPs leads, in principle, to a satisfactory confirmation. This can be faced by different ways, such as considering complementary analysis by two techniques (for example, LC-MS and GC-MS), or the same technique but using its maximum potential (for example, LC-MS/MS). When using QTOF as the only technique, as in this paper, acquiring the complete product ion spectrum at accurate mass gives an extraordinary potential for identification purposes, as no ion shopping is required oppositely to tandem MS methods based on QqQ in SRM mode. The consequence is the earning of a high number of IPs when performing a confirmative method by QTOF. In the examples shown in this paper, we observed 5 and 8 product ions for hexythiazox and buprofezin (see Table 3), which would lead up to 13.5 and 21 IPs, respectively. To achieve the maximum intensity for each product ion, three collision energies per compound were selected. The acquisition of these six overlapped functions (three for each analyte) generated bad peak shape with the chromatographic separation employed in the quantitative method, due to the low number of points per peak when acquiring at 1 scan/s. The reduction of the scan speed produced better peak shape but involved a drastic loss in sensitivity. Therefore, a slower chromatographic gradient was optimized in order to chromatographically resolve both peaks, obtaining a suitable number of points per peak for each analyte. Finally, two groups of three functions, each in MS/MS mode continuum acquisition channels (10, 20, and 30 eV per product ion), were selected with a chromatographic run time of 16 min. This problem could be solved in our case as only two analytes were involved; however, the use of relatively slow scan rates (1 scan/s) would become a limitation in the development of multiresidue methods.

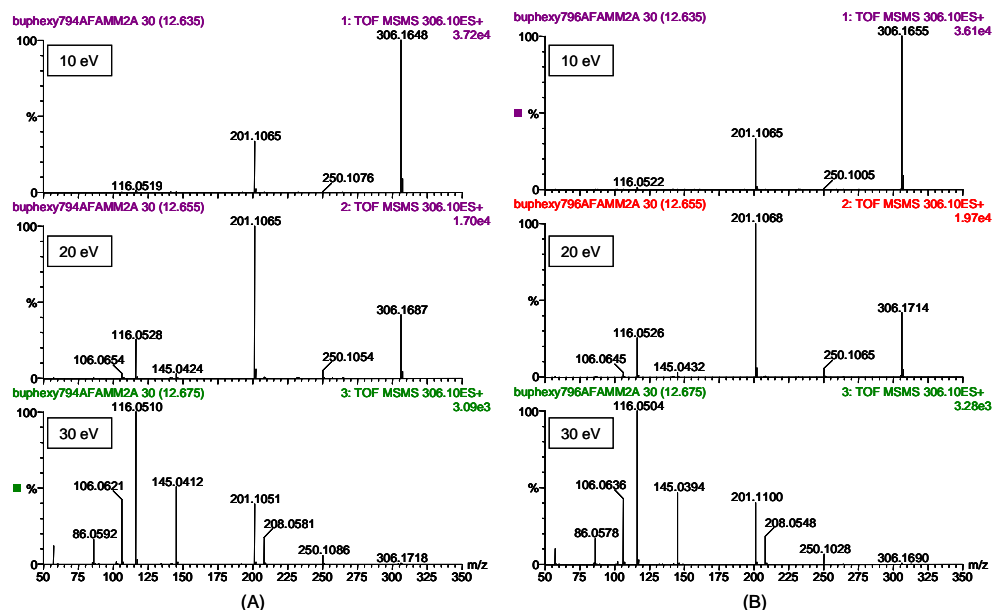


Figure 4. LC-ESI-QTOF product ion spectra used for confirmation of buprofezin (precursor ion m/z 306): (A) reference standard at 0.5 $\mu\text{g/mL}$ and (B) orange peel sample fortified at 5 mg/kg .

The evaluation of the confirmation potential was performed on the basis of the number of IPs earned at the three concentration levels tested. The results shown in Table 3 were obtained as an average for all matrices at each level. At high analyte concentration, data for accurate mass and abundance were very satisfactory. The maximum theoretical number of IPs (13.5 and 21 for hexythiazox and buprofezin, respectively) was earned, although two product ions (m/z 271.0346, hexythiazox, and m/z 57.0738, buprofezin) presented a slight deviation from the theoretical exact mass due to their low abundance (Table 3). The number of IPs decreased at lower concentrations as a consequence of the nondetection of some (less sensitive) product ions. Despite this limitation, a notable number of IPs was reached, allowing the reliable confirmation of the presence of target compounds at all concentrations tested.

It is interesting to comment on precision of the measurement of mass abundances from data shown in Table 3. These data were obtained as an average of 30 analyses (5 replicates in 6 different matrices). Meanwhile, at high concentrations the RSDs were normally $<15\%$ for the measurement of the experimental ions abundance; at 0.1 mg/kg the RSD values increased up to 30%.

Table 3. Relative Abundance and Accurate Mass Parameters for Each Product Ion Obtained in the Confirmation of Hexythiazox and Buprofezin at a Mass Window of 200 mDa^a

Theoretical m/z (Da)	0.1 mg/kg						1 mg/kg					5 mg/kg							
	accurate mass		abundance				IPs	accurate mass		abundance			IPs	accurate mass		abundance			IPs
	Abun. (%)	m/z exptl (Da)	deviation (mDa)	exptl (%)	deviation (RSD (%))	deviation (%)		m/z exptl (Da)	deviation (mDa)	exptl (%)	deviation (RSD (%))	deviation (%)		m/z exptl (Da)	deviation (mDa)	exptl (%)	deviation (RSD (%))	deviation (%)	
353	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a.	1	n.a	n.a	n.a	n.a	1	n.a	n.a	n.a	n.a	1			
271.0308	20.5	271.0415	10.7	23.4(31)	14	2.5	271.0327	1.9	20.4(12)	0	2.5	271.0346	3.8	22.1 (7)	8	2.5			
228.0250	100.0	228.0280	3.0	100.0	n.a.	2.5	228.0258	0.8	100.0	n.a.	2.5	228.0268	1.8	100.0	n.a	2.5			
194.0373	9.7	194.0288	8.6	8.3(31)	14	2.5	194.0417	4.4	9.2(12)	6	2.5	194.0365	0.8	12.1(6)	20	2.5			
168.0580	42.0	168.0497	8.3	48.4(25)	15	2.5	168.0593	1.3	43.7(9)	4	2.5	168.0576	0.4	45.7(3)	9	2.5			
151.0315	2.0	-	-	n.d.	-	0	-	-	n.d.	-	0	151.0308	0.7	2.2(12)	12	2.5			
						11^b					11^b					13.5^b			
306	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a.	1	n.a	n.a	n.a	n.a	1	n.a	n.a	n.a	n.a	1			
250.1014	4.3	-	-	n.d.	-	0	250.1007	0.7	4.4(10)	3	2.5	250.1010	0.4	4.6(5)	9	2.5			
208.0545	2.9	-	-	n.d.	-	0	208.0567	2.2	2.9(14)	2	2.5	208.0542	0.3	3.1(2)	9	2.5			
201.1062	100.0	201.1005	6	100.0	n.a.	2.5	201.1053	0.9	100.0	n.a	2.5	201.1045	1.7	100.0	n.a	2.5			
145.0436	8.8	145.0424	1.2	9.4(28)	7	2.5	145.0423	1.3	8.8(8)	0	2.5	145.0424	1.2	8.8(3)	0	2.5			
116.0534	26.1	116.0507	2.7	30.7(27)	18	2.5	116.0512	1.5	26.4(3)	1	2.5	116.0520	1.4	26.0(2)	0	2.5			
106.0534	7.8	106.0719	6.3	6.7(28)	14	2.5	106.0633	2.4	7.4(8)	5	2.5	106.0646	1.1	8.1(4)	4	2.5			
86.0606	2.1	-	-	n.d.	-	0	86.0587	1.9	2.0(14)	7	2.5	86.0599	0.7	2.7(6)	25	2.5			
57.0704	1.6	-	-	n.d.	-	0	57.0730	2.6	1.3(20)	19	2.5	57.0738	3.4	2.0(6)	22	2.5			
						11^b					21^b					21^b			

^a Number of identification points (IPs) earned by acquiring every ion at different concentration levels. N.a. indicates not applicable; n.d. indicates not detectable. For optimized collision energies, see Table 1. ^b Total IPs.

Anal. Chem., **79** (7), 2833–2843, 2007

This poor precision can affect the confirmation of an individual sample at low concentrations as relative abundance may substantially vary from the theoretical one.

As an example of the confirmation potential, Figure 4 shows the spectra for a buprofezin standard and a spiked orange peel sample, both acquired at three collision energies. The unequivocal confirmation of buprofezin in the sample is guaranteed by the suitable relative abundance of the monitored product ions and their accurate mass values.

Table 4. Quantitative Data for Hexythiazox and Buprofezin in Real Positive Banana Samples Analyzed by LC-QTOF and LC-QqQ ($n = 2$ Each)

analyte	sample	LC-QTOF (mg/kg)	LC-QqQ (mg/kg)
hexythiazox	banana skin 1	0.078	0.062
	banana skin 2	0.131	0.092
buprofezin	banana skin 3	1.110	0.960
	banana skin4	0.280	0.260
	banana flesh 1	0.019	0.012

Application to Real Samples. Several banana samples from field residue trials, previously analyzed at our laboratory by LC-MS/MS with QqQ and being positives by either buprofezin or hexythiazox, were also analyzed by LC-QTOF. Quantitative data are shown in Table 4, where good agreement can be seen between values obtained by both techniques, even at low concentration levels (e.g., 0.02 mg/kg buprofezin).

Table 5. LC-QTOF Confirmation of Hexythiazox in a Positive Banana Skin Sample (Concentration 0.1 mg/kg) by Measurement of Abundance and Accurate Mass of Each Product Ion ($n = 2$).

quality control at 0.1 mg/kg		banana skin sample 2				
m/z (Da)	abundance (%)	abundance		accurate mass		IPs ^a
		experimental (%)	deviation (%)	m/z experimental	deviation (mDa)	
353	n.a. ^b	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	1
271.0308	32	28.5	11	271.0298	1.0	2.5
228.0250	100	n.a.	n.a.	228.0259	0.9	2.5
194.0373	12	14.0	17	194.0318	5.5	2.5
168.0580	58	55.5	4	168.0565	1.5	2.5

^a Total IPs: 11. ^b N.a. indicates not applicable.

The confirmation of the analyte identity was performed in the samples previously quantified, obtaining good values of deviation in both ion abundances and accurate masses. As an example, data on confirmation of hexythiazox in the banana skin 2 sample are shown in Figure 5 and Table 5. Abundance deviations varied between 4% and 17% and were calculated using quality control samples (nontreated samples spiked at 0.1 mg/kg) as reference. The experimental accurate masses were really satisfactory, with deviations lower than 2 mDa (except 5.5 mDa in the case of 194.0373 product ion). Under these circumstances, 11 IPs were reached, confirming the presence of hexythiazox in the sample. Figure 5 shows the XIC chromatograms for every ion selected (precursor ion and the four product ions that could be detected), each one at its optimized collision energy to give maximum sensitivity. This figure also shows the MS/MS spectra (precursor ion m/z 353) at the three collision energy values tested. An interfering compound with nominal mass m/z 354 seemed to coelute with hexythiazox. The presence of this interference was a consequence of the wide isolation window used in the quadrupole (about 2 Da).

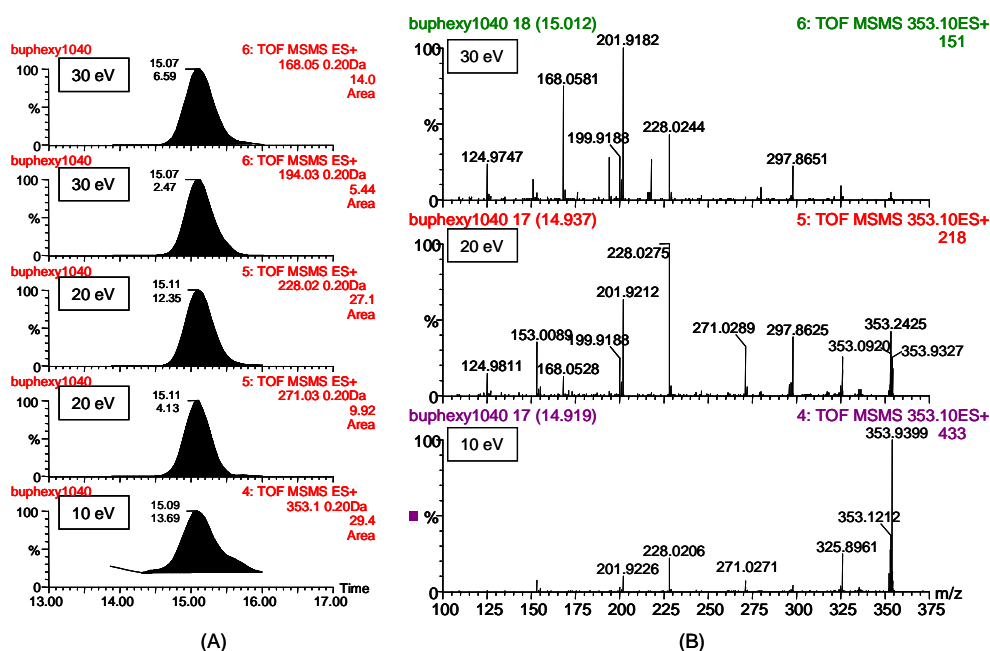


Figure 5. Confirmation of hexythiazox in banana samples by LC-ESI-QTOF: (A) XIC chromatograms at the optimized collision energy for each ion and (B) MS/MS spectra from real banana skin sample 2 containing hexythiazox (0.1 mg/kg).

Anal. Chem., **79** (7), 2833-2843, 2007

For this reason, the MS/MS spectra presented several additional product ions (297.8, 201.9, and 124.9), although none of them overlapping with those from hexythiazox. Correct confirmation could be easily made because an extract ion mass window of 0.2 Da was selected obtaining satisfactory chromatographic peaks, as shown in Figure 5.

Elucidation. In addition to the determination of the target analytes, the presence of nontarget TPs was also investigated. Several positives and their corresponding blank samples were selected after application of the previously described methodology. First, an acquisition in TOF mode was performed in full scan MS at a cone of 30 V. The continuum spectra data obtained for each sample were compared by MetaboLynx software obtaining the unknown relevant peaks in positive samples that were not present in the blank samples. Using this methodology, an unknown chromatographic peak was found in banana skin samples that contained buprofezin. Accurate mass of this extra peak (322.1589) corresponded to an oxidized TP of buprofezin ($C_{16}H_{24}N_3SO_2$). Additionally, the isotopic pattern obtained supported this formula. After a bibliographic search, two possible oxidized TPs, phenol (**p**) and sulfoxide (**q**), were plausible³⁰ (structures shown in Figure 6). Both compounds have the exact same mass, and therefore, they would be indistinguishable by TOF instruments. Thus, the use of QTOF was essential to establish the correct chemical structure. For this purpose, the product ion full scan spectrum of the precursor ion m/z 322 was acquired at three collision energies (10, 20 and 30 eV) and compared with that of the parent buprofezin.

The previous study of the buprofezin fragmentation pathway (see Figure 2) may help to predict the feasible, differential product ions from both possible TPs. Figure 6 shows the suggested fragmentation pathways for the phenolic (Figure 6A) and the sulfoxide (Figure 6B) TPs. Regarding the phenolic one, its product ions that conserve the benzene ring present the additional value of the oxygen (15.9949) in their accurate mass (compounds **r**, **s**, and **t**). In the sulfoxide TP, the mass increment is observed in those product ions where the sulfur atom is conserved, such as **u**, **v**, **w**, **x**, and **y**. The MS/MS spectrum of Figure 6D shows that the differential product ions corresponding to the phenolic TP (i.e., **r**, **s**, and **t**) are present in the banana skin sample. Besides, other product ions from buprofezin (**j**, **k**, **l**, **n**, and **o**) were also observed, assuring the presence of the phenolic TP. Mass errors observed for the remaining precursor ion and for product ions appearing in the spectrum (Figure 6D) were considerable, up to 6 mDa, surely due to the use a light product ion (m/z 201) as lock mass. This TP has been reported in the

leaf/stem and root extracts of tomato samples after hydroponics' treatment, but it has not been found after foliar treatment.³⁰ In order to fully verify the structure of the TP found, its chemical synthesis and further analysis by LC-QTOF MS would be helpful.

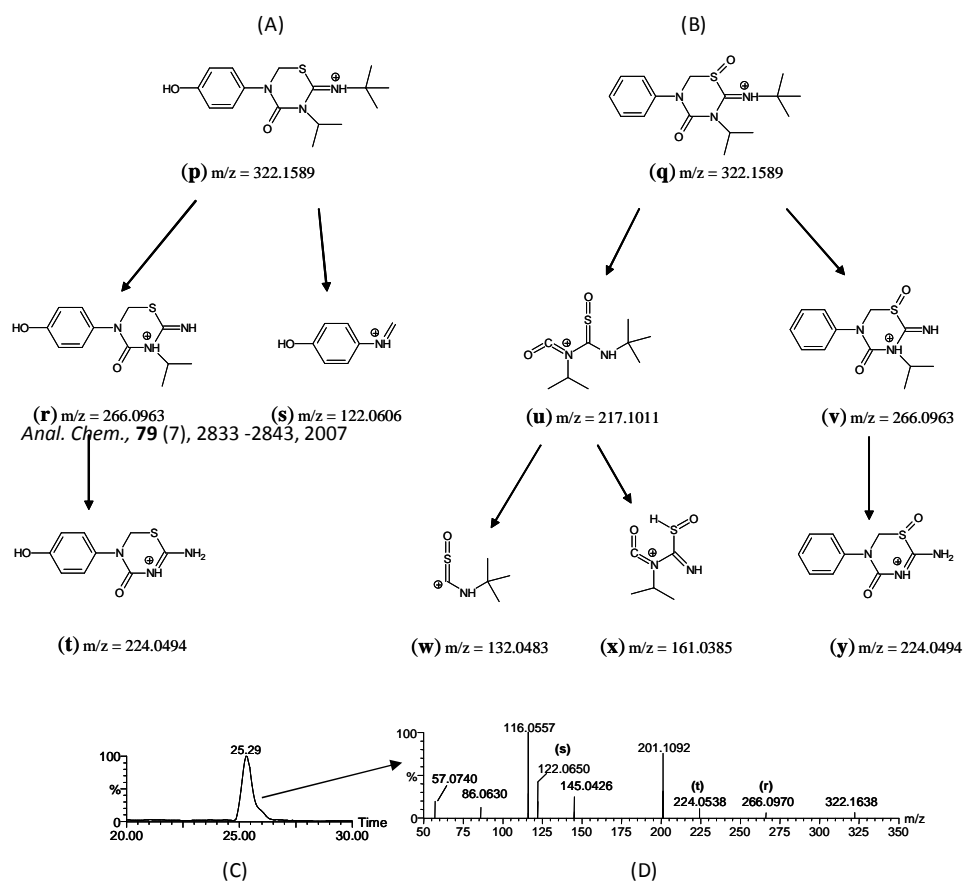


Figure 6. Suggested fragmentation pathway for (A) phenolic and (B) sulfoxidic metabolites of buprofezin. (C) LC-ESI-QTOF chromatogram and (D) MS/MS spectrum (precursor ion m/z 322) from a positive buprofezin banana skin sample (0.28 mg/kg) containing the phenolic metabolite.

CONCLUSIONS

QTOF has strong potential in pesticide residue analysis of food samples. Besides its capability to develop quantitative, but especially confirmative,

Anal. Chem., **79** (7), 2833–2843, 2007

methods for target compounds, QTOF is very helpful in the elucidation of nontarget analytes as well as in the proposal of fragmentation pathways.

The study performed using two model insecticides, buprofezin and hexythiazox, in six different fruit matrices has shown that QTOF can be used for quantification purposes with sufficient dynamic linear range and satisfactory sensitivity, comparable to that obtained with TOF analyzers¹¹ although still lower than that of QqQ instruments in SRM mode, where no preconcentration is normally needed to reach low limits of detection.³¹ Thus, at present LC-QqQ far surpasses LC-QTOF for quantification analysis. The most valuable added characteristic of QTOF is undoubtedly its strong potential for unequivocal confirmation of the analyte identity, as it combines the capabilities of accurate mass measurements and the use of tandem mass spectrometry. As a consequence, a high number of IPs is earned, unachievable by other mass analyzers such as TOF, QqQ, or IT.

Hybrid QTOF also has strong potential for elucidation of unknown (nontarget) compounds, such as most pesticide TPs in real samples. This potential has been highlighted in this paper by the differentiation of isobaric compounds which would probably be indistinguishable by the use of a TOF instrument. The measurement of accurate mass for product ions also provides valuable information to establish fragmentation pathways, demonstrating the improved characteristics of QTOF in comparison to QqQ instruments, where unequivocal assignments are more difficult to be made.

Some drawbacks observed in this paper in the use of QTOF for PRA, such as the need for selecting a lock mass coming from the analyte in MS/MS mode or the high scan time (1 scan/s), will be surely overcome in new QTOF instrument generations. Considering the present state-of-the-art within LC-MS techniques, it is reasonable to expect that QTOF will become one of the most valuable tools in PRA in the near future.

ACKNOWLEDGMENT

The authors are very grateful to Serveis Centrals d'Instrumentació Científica (SCIC) of University Jaume I for the use of the QTOF hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometer. This instrument was bought thanks to European FEDER Funds. This work forms a part of the research Project Ref: GV06/110, developed under financial support of the Generalitat Valenciana, Spain.

REFERENCES

- (1) European Commission Directive 2003/60/EC, 18 June 2003.
 - (2) European Commission Directive 1999/39/EC, 6 May 1999.
 - (3) Picó, Y.; Blasco, C.; Font, G. *Mass Spectrom. Rev.* **2004**, *23*, 45-85.
 - (4) Di Corcia, A.; Crescenzi, C.; Lagana, A. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 1930-1938.
 - (5) Liu, M.; Hashi, Y.; Song, Y.; Lin, J. M. *J. Chromatogr., A* **2005**, *1097*, 183-187.
 - (6) Blasco, C.; Fernández, M.; Picó, Y.; Font, G. *Anal. Chim. Acta* **2002**, *461*, 109-116.
 - (7) Hiemstra, M.; de Kok, A. *J. Chromatogr., A* **2002**, *972*, 231-239.
 - (8) Blasco, C.; Font, G.; Mañes, J.; Picó, Y. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 3606-3615.
 - (9) Hetherington, C. L.; Sykes, M. D.; Fussell, R. J.; Goodall, D. M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18*, 2443-2450.
 - (10) Hernández, F.; Pozo, O. J.; Sancho, J. V.; Bijlsma, L.; Barreda, M.; Pitarch, E. *J. Chromatogr., A* **2006**, *1109*, 242-252.
 - (11) Ferrer, I.; Thurman, E. M.; Fernández-Alba, A. R. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 2818-2825.
 - (12) Ferrer, I.; García-Reyes, J. F.; Mezcua, M.; Thurman, E. M.; Fernández-Alba, A. R. *J. Chromatogr., A* **2005**, *1082*, 81-90.
 - (13) Reemtsma, T. *J. Chromatogr., A* **2003**, *1000*, 477-501.
 - (14) Till, A. E. *Sci. Total Environ.* **2005**, *350*, 273-275.
 - (15) European Commission, Document SANCO/10476/2003, February 2004.
 - (16) European Commission Decision 2002/657/EC, August 2002.
 - (17) André, F.; De Wasch, K. K. G.; De Brabander, H. F.; Impens, S. R.; Stolker, L. A. M.; van Ginkel, L.; Stephany, R. W.; Schilt, R.; Courtheyn, D.; Bonnaire, Y.; Fürst, P.; Gowik, P.; Kennedy, G.; Kuhn, T.; Moretain, J. P.; Sauer, M. *Trends Anal. Chem.* **2001**, *20*, 435-445.
 - (18) Hernández, F.; Ibáñez, M.; Sancho, J. V.; Pozo, O. J. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 4349-4357.
 - (19) Pozo, O. J.; Sancho, J. V.; Ibáñez, M.; Hernández, F.; Niessen, W. M. A. *Trends Anal. Chem.* **2006**, *25*, 1030-1042.
-

Anal. Chem., **79** (7), 2833-2843, 2007

- (20) Richardson, S. D. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 4021-4046.
 - (21) Ibáñez, M.; Sancho, J. V.; Pozo, O. J.; Niessen, W. M. A.; Hernández, F. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, *19*, 169-178.
 - (22) Calbiani, F.; Careri, M.; Elviri, L.; Mangia, A.; Zagnoni, I. *J. Chromatogr., A* **2004**, *1058*, 127-135.
 - (23) Ferrer, I.; Thurman, E. M. *Liquid Chromatography/Mass Spectrometry, MS/MS and Time of Flight MS: Analysis of Emerging Contaminants*; American Chemical Society Symposium Series 850; American Chemical Society: Washington, DC, 2003; p 96.
 - (24) Sancho, J. V.; Pozo, O. J.; Ibáñez, M.; Hernández, F. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *386*, 987-997.
 - (25) Núñez, O.; Moyano, E.; Galcerán, M. T. *J. Mass Spectrom.* **2004**, *39*, 873-883.
 - (26) Alder, L.; Lüderitz, S.; Lindtner, K.; Stan, H. J. *J. Chromatogr., A* **2004**, *1058*, 67-79.
 - (27) Grimalt, S.; Pozo, O. J.; Marín, J. M.; Sancho, J. V.; Hernández, F. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, *16*, 1619-1630.
 - (28) <http://www.ams.usda.gov/science/pdp/SOPs.htm>. (accessed 02/08/07).
 - (29) European Commission, Document SANCO/10232/2006, March 2006.
 - (30) Roberts, T. R.; Hutson, D. H.; Jewess, P. J.; Lee, P. W.; Nicholls, P. H.; Plimmer, J. R. *Metabolic Pathways of Agrochemicals. Part 2: Insecticides and Fungicides*; The Royal Society of Chemistry: London, U.K., 1999; pp 734-737.
 - (31) Sancho, J. V.; Pozo, O. J.; Zamora, T.; Grimalt, S.; Hernández, F. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 4202-4206.
-

3.2.3. Discusión de los resultados

Dentro del trabajo analítico que hemos realizado con QTOF-MS/MS destaca el desarrollo de métodos de cuantificación para plaguicidas en muestras de origen vegetal. Se ha realizado una validación del método analítico para dos analitos, y se ha evaluado su capacidad confirmativa. En este sentido cuando realizamos este trabajo no se había publicado previamente ningún estudio sobre la capacidad de cuantificación de un analizador QTOF para ARP en alimentos. Por otro lado, se ha trabajado también en modo TOF-MS y QTOF MS/MS con fines *non-target* en la búsqueda de metabolitos de hexitiazox y buprofezin en muestras positivas que contienen estos plaguicidas.

• Experimentos MS y MS/MS

Se realizó un estudio de la fragmentación de los analitos hexitiazox y buprofezin en modo MS y MS/MS mediante QTOF con el objetivo de proponer sus rutas de fragmentación, las cuales se muestran en las *Figuras 1 y 2 del artículo científico 5*. En modo TOF-MS se evaluaron y seleccionaron los iones precursores de hexitiazox y buprofezin, siendo $[M+H]^+$ el más abundante y específico en ambos casos. De forma que se aislaban en el primer cuadrupolo (voltaje de cono 30 V) las m/z en nominal 353 y 306, respectivamente, para su posterior fragmentación en la celda de colisión a diferentes energías de colisión (10, 20 y 30 eV). Una de las capacidades más interesantes del QTOF fue la obtención de la masa exacta de los iones producto, lo que fue de gran utilidad para evitar una mala interpretación de la propuesta de las fórmulas empíricas de cada ion producto y con ello de la ruta de fragmentación. Se seleccionaron como iones producto para la cuantificación los más abundantes y específicos, siendo estos m/z 228.0250 y 201.1062 para el hexitiazox y buprofezin, respectivamente. Los restantes 5 y 8 iones productos obtenidos para los respectivos analitos, se utilizaron para el desarrollo de un método de confirmación (*Tabla 1 del artículo científico 5*). El estudio de fragmentación de cada uno de los analitos también fue dirigido hacia la evaluación de la abundancia de los iones producto en función de la energía de colisión con la que fue adquirido, indicando su abundancia relativa respecto al de cuantificación. Debido a que los cromatogramas obtenidos en una adquisición por QTOF son la suma de todos los barridos realizados en el rango de m/z 50-650, resulta necesario realizar la extracción de la m/z del ion producto de interés, lo cual se indica abreviadamente como XIC según la denominación anglosajona, *extracted Ion Chromatogram*. Los XICs para cada uno de los iones producto, tanto para la cuantificación como para la confirmación, se realizaron

con ventanas de extracción de 50 y 200 mDa (equivalente a los intervalos de ± 25 y ± 100 mDa).

- **Validación del método analítico de cuantificación**

- *Optimización del tratamiento de muestra*

Se desarrolló un método para análisis de hexitiazox y buprofezin en seis matrices vegetales, aplicando un tratamiento de muestra muy sencillo, con el objetivo de minimizar la introducción de errores, así como agilizar el proceso de análisis. Se aplicó un método de extracción sencillo de las muestras con 70 mL de acetona mediante ultraturax durante aproximadamente 2 minutos a 8000 rpm. El extracto se filtró bajo gravedad por un filtro de pliegues, ajustando el volumen a 100 mL con acetona. Se tomó una alícuota del extracto crudo final y se pasó por un filtro de nylon de 0.45 μm , obteniendo ya la muestra para su inyección en el sistema LC-QTOF. Cabe destacar de este procedimiento de extracción sencillo que se está diluyendo la concentración de los analitos de la muestra al extracto, ya que se extraen tan solo 10 g de muestra y se llevan a un volumen final de 100 mL.

- *Rango de linealidad*

Se obtuvo una adecuada linealidad de la curva de calibración mediante el uso del patrón externo, considerando 12 puntos, entre 1 y 750 ng/mL. El objetivo de seleccionar tantos puntos de la curva de calibrado fue obtener el máximo número de órdenes de magnitud sin pérdida de la linealidad, ya que una de las limitaciones que tradicionalmente ha presentado el analizador TOF es su bajo rango de linealidad (Ferrer *et al.*, 2005). En este sentido, se obtuvieron buenos ajustes considerando una ecuación cuadrática para ambos compuestos, consiguiendo un rango de linealidad de 2 y 3 órdenes de magnitud para hexitiazox y buprofezin, respectivamente.

- *Exactitud y precisión*

Se estudiaron 3 niveles de fortificación, 0.1, 1 y 5 mg/kg, con 5 réplicas de cada uno de ellos. Tal y como se muestra en la *Tabla 2 del artículo científico 5*, los valores de exactitud y precisión para los niveles de 1 y 5 mg/kg fueron muy similares, independientemente de su nivel de fortificación y de la ventana de extracción (± 25 ó ± 100 mDa). Sin embargo, la extracción del ion producto usado para la cuantificación al nivel de 0.1 mg/kg, obtenido con la ventana de 50 mDa, presentaba valores mucho peores que con una ventana de extracción de 200 mDa, especialmente en lo relativo a las desviaciones estándar relativas (RSD). Este

resultado era una consecuencia de la limitación de este modelo de instrumento, ya que al no presentar un sistema de *lock-spray* automático no fue posible la introducción del *lock-mass* a diferentes energías de cono y colisión sin que se fragmentara. Esto obligó a hacer uso de otros iones que siempre se encontraran presentes en el espectro de adquisición; en nuestro caso seleccionamos los iones producto 228.0250 para el hexitiazox y 201.1062 para el buprofezin. Esta limitación repercutió de forma negativa, aumentando puntualmente los errores de masa máximos, incluso por encima de una ventana de extracción de ± 100 mDa, ya que la poca abundancia del ion de referencia a bajas concentraciones impedía un correcto ajuste de la masa. En cualquier caso, se seleccionó la ventana de mayor rango, para llevar a cabo aplicaciones cuantitativas.

A la hora de considerar la sensibilidad, se debe tener presente el efecto de la matriz sobre la respuesta del analito. En general, no se encontró una supresión elevada de la ionización para ninguna de las diferentes matrices a los tres niveles de cuantificación. De esta forma, los valores de recuperación y de RSD fueron adecuados para los tres niveles en casi todas las matrices efectuando el calibrado con patrones en solvente. Excepcionalmente, el hexitiazox presentó RSDs un poco por encima del 20% en la matriz de fresa al nivel de 0.1 mg/kg, probablemente debido a una cuestión de baja sensibilidad. Por otra parte, aunque todos los valores de RSD fueron adecuados para el buprofezin, éste presentó una baja recuperación a nivel bajo en piel de naranja, a causa del notable efecto matriz de este tipo de muestra.

· Estimación del LOD

La estimación de los límites de detección (LOD) resultó complicada, debido a la casi inexistencia de ruido en los XICs a las m/z de los iones producto, por lo que se decidió trabajar, en su lugar, con el menor nivel de calibración (*Lowest Calibration Level*, LCL). El LCL supone el valor más bajo de concentración incluido en la curva de calibrado con un correcto rango de linealidad. En este sentido, aunque el analito sea detectable a niveles inferiores no se puede considerar desde el punto de vista cuantitativo. Los LCL obtenidos para el hexitiazox y buprofezin fueron de 7.5 y 1 ng/mL, respectivamente. Estos valores de concentración en extracto se pudieron traducir a niveles de cuantificación de 0.075 y 0.01 mg/kg en muestra. Estos límites de concentración fueron adecuados para la cuantificación de los analitos de acuerdo con los límites máximo de residuos (LMR) propuestos por la Unión Europea en estas 6 matrices (Commission Directive 2003/60/EC).

• **Confirmación de la identidad**

En una segunda etapa, se evaluó la capacidad confirmativa del método, llevando a cabo una segunda inyección en el QTOF. El criterio utilizado para evaluar la capacidad confirmativa fue los puntos de identificación, IPs. El número de IPs asociados a un ion precursor en masa nominal correspondía a 1.0, mientras que para un ion producto cuando el error de la masa exacta fue bajo era de 2.5 IPs. Tal y como se puede observar en la *Tabla 3 del artículo científico 5*, el máximo número teórico de IPs obtenidos para el hexitiazox y el buprofezin en las condiciones de trabajo fue de 13.5 y 21 IPs, respectivamente. Sin embargo, cabe comentar que dos de los iones producto presentaban una ligera desviación con respecto a su masa exacta, a consecuencia de su baja abundancia. Estos son el m/z 271.0346 (3.8 mDa) en el caso del hexitiazox, y el m/z 57.0738 (3.4 mDa) para el buprofezin. En este mismo sentido, cuando se ensayaron niveles de concentración más bajos, al disminuir la abundancia de los iones menos sensibles, también se observaron mayores desviaciones con respecto a la masa exacta, tanto para el hexitiazox como para el buprofezin, disminuyendo el número de IPs hasta 11 en el nivel de 0.1 mg/kg.

Otro parámetro estudiado fue la precisión de la medida de la relación de abundancias, IR, cuya precisión se evaluó con la RSD, calculada a partir de 30 análisis (5 réplicas en 6 matrices diferentes). Según se observa en la *Tabla 3 del artículo científico 5*, el valor de la RSD se encontraba por debajo del 15% a concentraciones de 1 y 5 mg/kg. Sin embargo, para el nivel de 0.1 mg/kg se obtuvieron valores incluso mayores del 30% en algunos casos. Esta imprecisión puede afectar a la confirmación de una muestra individual a bajas concentraciones, ya que la abundancia relativa podría variar substancialmente con respecto a la teórica.

En general, la confirmación inequívoca del buprofezin y hexitiazox estaba garantizada por la medida de IR para los iones monitorizados, así como por el valor de sus masas exactas. Como ejemplo se muestra en la *Figura 4 del artículo científico 5* los espectros de masas para las 3 energías de colisión adquiridas para un patrón de 0.5 µg/mL y una muestra de piel de naranja al nivel de 5 mg/kg.

• **Aplicación del método analítico desarrollado a muestras reales**

Una vez desarrollado y validado el método analítico tanto a nivel de cuantificación como de confirmación mediante LC-QTOF, se aplicó al análisis de muestras reales. Se analizaron numerosas muestras de piel y pulpa de plátano,

que provenían de un estudio de residuo en campo. Estas muestras habían sido previamente analizadas mediante triple cuadrupolo acoplado a cromatografía líquida, dando positivos en varios casos a buprofezin y hexitiazox. Desde el punto de vista cuantitativo (*Tabla 4 del artículo científico 5*) se observó una buena concordancia entre ambas técnicas (QqQ y QTOF) en el valor de la concentración obtenido para todas las muestras. Esta concordancia fue adecuada incluso a valores bajos, como el caso de 0.02 mg/kg de buprofezin en pulpa de plátano.

Por otro lado, la confirmación de las muestras reales se realizó para todas aquellas muestras previamente cuantificadas. Se obtuvieron en todos los casos bajas desviaciones en las relaciones de las abundancias de los iones, así como en las masas exactas. Como ejemplo, en la *Figura 5 y la Tabla 5 del artículo científico 5* se muestran los valores obtenidos para la confirmación de un positivo de hexitiazox en piel de plátano (0.13 mg/kg). Las desviaciones de las relaciones de abundancia de iones fueron entre 4% y 17%; estas fueron calculadas por comparación con un control de calidad (fortificado al nivel de 0.1 mg/kg) inyectado en la misma secuencia. Las desviaciones de las masas con respecto a los valores exactos fueron adecuados, por debajo de 2 mDa, a excepción del ion de m/z 194.0373 (5.5 mDa). En base a estos resultados se pudo confirmar la presencia de hexitiazox a ese nivel de concentración con un total de 11 IPs. A la izquierda de la *Figura 5 del artículo científico 5*, se pueden observar los cromatogramas que se obtienen para la extracción de cada uno de los iones seleccionados a partir del TIC. Los XICs se realizaron para una ventana de masas de ± 100 mDa; de esta forma, se eliminaron los posibles interferentes que coeluían al mismo tiempo y que estaban presentes en modo *full scan* de iones producto.

• **Análisis non-target: investigación de metabolitos de hexitiazox y buprofezin en las muestras**

Finalmente, se investigó la posible presencia de metabolitos en las muestras analizadas. Para ello, se adquirió en modo *full scan* TOF MS muestras blanco (no habían sido tratadas en el estudio de campo) y muestras tratadas con buprofezin y hexitiazox. A partir de las adquisiciones en *full scan* se aplicó un *software* especializado (*MetaboLynx*), capaz de comparar los cromatogramas/espectros de las muestras blanco y las tratadas. Las diferencias observadas entre la muestra tratada con respecto al blanco se considerarían como potencial metabolito o producto de transformación del plaguicida. Usando esta metodología se encontró un pico de un compuesto desconocido en una muestra de piel de plátano positiva a buprofezin. Se extrajo como masa exacta el

valor de 322.1589, y calculando su composición elemental se obtuvo la fórmula molecular $C_{16}H_{24}N_3SO_2$, para la cual la relación isotópica concordaba con el espectro MS. Considerando la fórmula molecular de buprofezin, se propuso que el compuesto desconocido correspondía a un producto de oxidación del plaguicida. Al realizar una búsqueda bibliográfica de los productos de transformación del buprofezin, se encontraron dos posibles metabolitos descritos que encajaban con esta fórmula molecular: una oxidación en el anillo aromático, fenol; o bien, una oxidación en el azufre del anillo de heteroátomos, sulfóxido (*Figura 6 del artículo científico 5*). Como presentaban la misma fórmula molecular, la masa exacta del ion molecular de ambos metabolitos era también la misma, lo cual impedía conocer la verdadera transformación que había sufrido el buprofezin. El uso del QTOF en modo MS/MS fue esencial, ya que permitió la elucidación de la estructura del metabolito. Se llevó a cabo una adquisición en modo *full scan* de iones producto de m/z 322. Según se propone en las rutas de fragmentación de la *Figura 6 del artículo científico 5*, los iones obtenidos en la fragmentación determinaron la verdadera procedencia de la oxidación del buprofezin. Tal y como se observó en el espectro combinado procedente del pico cromatográfico del metabolito detectado, los iones fragmento obtenidos encajaban con las masas exactas de la estructuras propuestas para la oxidación fenólica del buprofezin. Para una confirmación inequívoca del metabolito se debería llevar a cabo la inyección del patrón de referencia, lo cual obligaría a sintetizar este producto de transformación, pues no se encuentra disponible comercialmente.

El estudio realizado demostró que el QTOF presenta un gran potencial en el análisis de residuos de plaguicidas en muestras de alimentos, con una buena capacidad a nivel de cuantificación, y excelentes prestaciones a nivel cualitativo. Además, se comprobó que es una herramienta fundamental para la investigación y elucidación de compuestos *non-target*, en particular para la identificación / elucidación de metabolitos de plaguicidas. En concreto el QTOF fue capaz de distinguir entre dos posibles estructuras isobáricas para el metabolito oxidado de buprofezin, cuya identificación no hubiera sido posible por TOF MS. A su vez, disponer de la masa exacta de los iones producto permitió proponer una ruta de fragmentación que justificaba la presencia del metabolito en la muestra. Sin embargo, se observaron algunos inconvenientes asociados a este instrumento, tales como la necesidad de seleccionar un ion producto como *lock mass* en modo MS/MS, o el alto tiempo de *scan* (1 s/scan) que impidió llevar a cabo la adquisición de más de una función por cada uno de los analitos y así obtener un método de análisis más corto en la confirmación. Debido a que estas limitaciones son una consecuencia del diseño de instrumentos de primera generación, se

espera que en versiones posteriores de equipos estos problemas se vean solventados, estableciéndose el QTOF como una herramienta muy poderosa en el análisis de residuos de plaguicidas en muestras de alimentos en un futuro próximo.

3.2.4. Referencias bibliograficas

- Ferrer, I.; García-Reyes, J.F.; Mezcua, M.; Thurman, E.M.; Fernández-Alba, A.R. (2005) *Multi-residue pesticide analysis in fruits and vegetables by liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry* J. Chromatogr. A 1082, 81-90
- Ferrer, I.; Thurman, E.M.; Fernández-Alba, A.R. (2005) *Quantitation and accurate mass analysis of pesticides in vegetables by LC/TOF-MS* Anal. Chem. 77, 2818-2825
- Ferrer, I.; Thurman, E.M. (2007) *Multi-residue method for the analysis of 101 pesticides and their degradates in food and water samples by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry* J. Chromatogr. A 1175, 24-37
- García-Reyes, J.F.; Ferrer, I.; Thurman, E.M.; Molina-Díaz, A.; Fernández-Alba, A.R. (2005) *Searching for non-target chlorinated pesticides in food by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry* Rapid Commun. Mass Spectrom. 19, 2780-2788
- García-Reyes, J.F.; Hernando, M.D.; Ferrer, C.; Molina-Díaz, A.; Fernández-Alba, A.R. (2007a) *Large scale pesticide multiresidue methods in food combining liquid chromatography - Time-of-flight mass spectrometry and tandem mass spectrometry* Anal. Chem. 79, 7308-7323
- García-Reyes, J.F.; Hernando, M.D.; Molina-Díaz, A.; Fernández-Alba, A.R. (2007b) *Comprehensive screening of target, non-target and unknown pesticides in food by LC-TOF-MS* Trends Anal. Chem. 26, 828-841
- García-Reyes, J.F.; Molina-Díaz, A.; Fernández-Alba, A.R. (2007c) *Identification of pesticide transformation products in food by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry via "fragmentation- degradation" relationships* Anal. Chem. 79, 307-321
- García-Reyes, J.F.; Gilbert-López, B.; Molina-Díaz, A.; Fernández-Alba, A.R. (2008) *Determination of pesticide residues in fruit-based soft drinks* Anal. Chem. 80, 8966-8974
- Gilbert-López, B.; García-Reyes, J.F.; Ortega-Barrales, P.; Molina-Díaz, A.; Fernández-Alba, A.R. (2007) *Analyses of pesticide residues in fruit-based*
-

baby food by liquid chromatography/electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry Rapid Commun. Mass Spectrom. 21, 2059-2071

Hernández, F.; Sancho, J.V.; Ibáñez, M.; Grimalt, S. (2008) *Investigation of pesticide metabolites in food and water by LC-TOF-MS* Trends Anal. Chem. 27, 862-872

Ibáñez, M.; Sancho, J.V.; Pozo, O.J.; Niessen, W.; Hernández, F. (2005) *Use of quadrupole time-of-flight mass spectrometry in the elucidation of unknown compounds present in environmental water* Rapid Commun. Mass Spectrom. 19, 169-178

Lacorte, S.; Fernández-Alba, A.R. (2006) *Time of flight mass spectrometry applied to the liquid chromatographic analysis of pesticides in water and food* Mass Spectr. Reviews. 25, 866-880

Mezcua, M.; Malato, O.; García-Reyes, J.F.; Molina-Díaz, A.; Fernández-Alba, A.R. (2009) *Accurate-mass databases for comprehensive screening of pesticide residues in food by fast liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry* Anal. Chem. 81, 913-929

Picó, Y.; Farré, M.I.; Soler, C.; Barceló, D. (2007a) *Confirmation of fenthion metabolites in oranges by IT-MS and QqTOF-MS* Anal. Chem. 79, 9350-9363

Picó, Y.; Farré, M.I.; Soler, C.; Barceló, D. (2007b) *Identification of unknown pesticides in fruits using ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Imazalil as a case study of quantification* J. Chromatogr. A 1176, 123-134

Picó, Y.; Farré, M.I.; Tokman, N.; Barceló, D. (2008a) *Rapid and sensitive ultra-high-pressure liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry for the quantification of amitraz and identification of its degradation products in fruits* J. Chromatogr. A 1203, 36-46

Picó, Y.; Barceló, D. (2008b) *The expanding role of LC-MS in analyzing metabolites and degradation products of food contaminants* Trends Anal. Chem. 27, 821-835

Richardson, S.D. (2008) *Environmental Mass Spectrometry: Emerging Contaminants and Current Issues* Anal. Chem. 80, 4373-4402

- Soler, C.; Hamilton, B.; Furey, A.; James, K.J.; Mañes, J.; Picó, Y. (2007) *Liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry analysis of carbosulfan, carbofuran, 3-hydroxycarbofuran, and other metabolites in food* Anal. Chem. 79, 1492-1501
- Thurman, E.M.; Ferrer, I.; Zweigenbaum, J.A.; García-Reyes, J.F.; Woodman, M.; Fernández-Alba, A.R. (2005a) *Discovering metabolites of post-harvest fungicides in citrus with liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry and ion trap tandem mass spectrometry* J. Chromatogr. A 1082, 71-80
- Thurman, E.M.; Ferrer, I.; Fernández-Alba, A.R. (2005b) *Matching unknown empirical formulas to chemical structure using LC/MS TOF accurate mass and database searching: Example of unknown pesticides on tomato skins* J. Chromatogr. A 1067, 127-134
- Thurman, E.M.; Ferrer, I.; Malato, O.; Fernández-Alba, A.R. (2006) *Feasibility of LC/TOFMS and elemental database searching as a spectral library for pesticides in food* Food Add. Contam. 23, 1169-1178
- Wang, J.; Leung, D. (2009) *Applications of ultra-performance liquid chromatography electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry on analysis of 138 pesticides in fruit- and vegetable-based infant foods* J. Agric. Food Chem. 57, 2162-2173
-

3.3. Estudio comparativo de las capacidades cuantitativas y confirmativas del QqQ, TOF y QTOF en análisis de residuos de plaguicidas en vegetales.

3.3.1. Introducción

Como se ha comentado en la introducción general de este capítulo, un método analítico puede tener diferentes objetivos. En el análisis *target* se aplican métodos específicamente desarrollados para determinados analitos. Mientras que si el objetivo es la búsqueda compuestos desconocidos que no han sido previamente seleccionados, entonces se trata de métodos *non-target*. Estos últimos resultan más complejos y conllevan una mayor dificultad para el analista. En el trabajo que se presenta a continuación, se realiza un estudio comparativo de las capacidades analíticas que muestran diferentes instrumentos de MS acoplados a LC en el desarrollo de métodos de análisis *target*, centrándose en su capacidad cuantitativa y confirmativa. Dentro de un análisis *target*, se puede considerar dos matices dependiendo de si se ha inyectado previamente el patrón de referencia del analito o no. Cuando se lleva a cabo un estudio previo de las condiciones de análisis para el compuesto de interés mediante la inyección de su patrón de referencia, se podría etiquetar como un método *pre-target*. En un método *pre-target* se conoce el tiempo de retención, y se puede estudiar la fragmentación en modo MS/MS. Esta metodología ofrece una alta especificidad, ya que permite seleccionar los iones más abundantes correspondientes a las fragmentaciones más específicas para cada analito. Además, con instrumentos QqQ se pueden crear métodos tándem MS en el modo de adquisición SRM, que se caracterizan por su alta sensibilidad y selectividad. La gran mayoría de métodos de ARP para LC-MS publicados en la literatura científica son métodos *pre-target*, cuyo objetivo principal es la cuantificación a bajos niveles de concentración. Se trata de métodos que han sido validados a distintos niveles de fortificación, y que muestran recuperaciones y RSDs satisfactorias. Además, son métodos desarrollados y validados para unos cuantos analitos seleccionados, pero que normalmente no son capaces de detectar cualquier otro plaguicida que estuviera presente en la muestra si no forma parte de la lista de compuestos seleccionados.

Un modo de trabajo alternativo es el análisis *post-target*, en el que los analitos se seleccionan *a posteriori*, una vez se han adquirido los datos MS. En este caso, es necesario trabajar en modo *full scan*. Los métodos de análisis *post-target* se suelen utilizar para la búsqueda rápida de plaguicidas, es decir como métodos de *screening* rápidos, en los que el número de analitos a investigar puede llegar a ser muy elevado.

Teniendo en consideración los criterios expuestos antes, se puede hacer uso de un instrumento u otro en función del tipo de análisis que se desea realizar. Tradicionalmente, se ha hecho uso del QqQ para análisis *pre-target* mediante la

adquisición en modo SRM (Hernández *et al.*, 2006; Garrido Frenich *et al.*, 2008), el cual permite la adquisición de múltiples transiciones al mismo tiempo. Sin embargo, es interesante conocer el potencial de otros analizadores como el QLIT, TOF o QTOF, ya que debido a los nuevos avances tecnológicos son capaces de llevar a cabo análisis de estas características. Por otro lado, las posibilidades de un QqQ se ven claramente superadas en análisis *post-target* por otros analizadores, capaces de proporcionar una mayor sensibilidad en modo de espectro completo, como el LIT o el TOF (Thurman *et al.*, 2006). La combinación de dos analizadores de MS, con diseños basados en diferentes principios físicos, ofrece una gran versatilidad, pues permite aprovechar las propiedades de cada uno de sus analizadores por separado, así como la combinación de los mismos. En este sentido, híbridos como el QLIT, QTOF o LIT-Orbitrap son instrumentos con un alto potencial para la elucidación y confirmación en la identificación de compuestos desconocidos (Barceló *et al.*, 2007).

El grupo de trabajo de Yolanda Picó (Soler *et al.*, 2005, 2006 y 2007) ha publicado tres trabajos en los que utilizan diferentes analizadores en el campo del ARP en alimentos. En ellos se ha comparado diferentes analizadores (analyzer Q de MS simple, así como analizadores QqQ, QIT y QTOF de MS/MS) desde un punto de vista cuantitativo en el diseño de métodos *target*, evaluando sus características en cuanto a rango lineal, sensibilidad, selectividad, precisión y robustez. Como conclusiones, se puede decir que el analizador simple MS se encuentra en desventaja frente a los de MS/MS (Soler *et al.*, 2006). Además, se confirma que QqQ es el instrumento con mejores sensibilidades para los plaguicidas seleccionados, permitiendo alcanzar los LMR establecidos para todas las matrices de frutas y vegetales ensayadas (Soler *et al.*, 2005, 2006 y 2007); a diferencia de los analizadores QIT y QTOF que presentaban para ciproconazol y buprofezin en algunas de las matrices vegetales LOQ mayores a los LMR establecidos, así como para los piretroides λ -cialotrin y fluvalinato (compuestos típicamente analizados mediante GC) (Soler *et al.*, 2007). Para evaluar la capacidad confirmativa de cada instrumento se hizo uso de los IPs, observándose que el analizador QTOF presentaba una mejor capacidad confirmativa, siempre y cuando su sensibilidad lo permitiese. En la comparación entre QTOF y QIT (Soler *et al.*, 2007), se hizo un estudio de su aplicación en análisis *non-target* para la búsqueda de metabolitos de los plaguicidas estudiados. En general, concluyen que las diferentes técnicas son complementarias y que cada una de ellas presenta unas mejores cualidades para un cierto tipo de análisis. No obstante, los instrumentos comparados presentaban diferentes diseños de fuentes de ionización. Además, se seleccionaron diferentes modos de ionización en una misma comparativa (APCI en

QIT y *TurbolonSpray* en QqQ y QTOF (Soler *et al.*, 2006)), por lo que parte de las diferencias de sensibilidad, así como abundancias de determinados iones, podían estar asociadas al tipo de fuente de ionización, o al modo de ionización.

La última generación de instrumentos (Q)TOF presenta nuevas funciones que mejoran sus capacidades con respecto a los anteriores. Por ejemplo, una de las ventajas de los nuevos instrumentos (Q)TOF es su mayor velocidad de adquisición (20 scan/s), lo que permite reducir el tiempo de barrido de iones, sin pérdida de sensibilidad. Además, para casos particulares también es posible aumentar la sensibilidad del analizador mediante el uso del llamado *Enhanced Duty Cycle* (EDC), realmente útil en la determinación de residuos de contaminantes, como es el caso de metabolitos de plaguicidas (se hace uso de esta funcionalidad en el capítulo 4). Otra de las nuevas aplicaciones es la posibilidad de obtener rangos de linealidad mayores, mediante el llamado *Dynamic Range Enhancement* (DRE). Mientras que en LC, uno de los últimos avances ha sido el uso de columnas cromatográficas con un empaquetamiento de partículas del orden de sub-2 μm , dando lugar a lo que se conoce con el término genérico UHPLC, que en nuestros equipos se ha comercializado como UPLC. Este tipo de cromatografía permite una drástica reducción del tiempo de análisis sin pérdida de resolución cromatográfica.

Por otro lado, analizador TOF se ha utilizado con éxito en análisis *target* multirresidual de plaguicidas (Lacorte *et al.*, 2006; Thurman *et al.*, 2006; Ferrer *et al.*, 2005 y 2007; García-Reyes *et al.*, 2007; Gilbert-López *et al.*, 2007; Mezcua *et al.*, 2009).

En definitiva, resulta interesante realizar una comparativa de los tres analizadores de MS (QqQ, TOF y QTOF) más usados en ARP para el desarrollo de métodos multirresiduales en alimentos, considerando, a su vez, los nuevos avances y aplicaciones tanto en MS como en LC. El objetivo principal del trabajo que se presenta a continuación es la comparación de los tres analizadores QqQ, TOF y QTOF en métodos multirresiduales de análisis, seleccionando 11 plaguicidas y validándose tanto a nivel cuantitativo como confirmativo. También se han estudiado las posibilidades de análisis *post-target* con el analizador TOF, gracias a su alta sensibilidad en *full scan*. Una consideración que se ha tenido presente para obtener una comparación lo más real posible es la homogeneización de las variables que afectan a los resultados, por lo que las fuentes de ionización corresponden a un mismo diseño de (Z-spray), el modo de ionización (ESI) aplicado es el mismo, incluso se han usado equipos de la misma casa comercial.

En primer lugar, se realizó una optimización de las condiciones más sensibles y selectivas de adquisición para cada uno de los analitos mediante experiencias MS y MS/MS con cada uno de los analizadores. Para ello se utilizaron modos de adquisición específicos, tales como *full scan*, *full scan* de iones producto y SRM. Se estudió el efecto matriz para los nueve tipos de muestra seleccionados (piel y pulpa de naranja, piel y pulpa de plátano, fresa, tomate, uva, pepino y pimiento). En el desarrollo del método *pre-target* de los 11 analitos se validaron los tradicionales parámetros cuantitativos (document SANCO 2007/3131): la linealidad entre 0.01 y 1000 ng/mL, mediante el uso de patrones en solvente, la exactitud y la precisión mediante la inyección de 3 réplicas de cada una de las matrices fortificadas a tres niveles de concentración (0.01, 0.05 y 0.1 mg/kg). También se establecieron los LOQs objetivos a los niveles de concentración ensayados en los que se obtuvieron resultados de validación satisfactorios. A su vez, se estimaron LODs para los analitos en cada una de las matrices. Posteriormente, se realizó una evaluación de la capacidad confirmativa de cada analizador mediante el uso de los IPs, de acuerdo con la guía europea para contaminantes en alimentos de origen animal (Decision 2002/657/EC). Se estableció un límite de confirmación (Limit of Confirmation, LOC), como el valor para el cual la relación de las abundancias de los iones es adecuada y la señal/ruido es mayor de 3. Finalmente, para explorar las posibilidades que la adquisición en *full scan* del TOF ofrece, se aplicó un método *post-target* a muestras comerciales adquiridas en el mercado utilizando un *software* de búsqueda especializado (*ChromaLynx XS*) que se basó en un listado de m/z teórico en masa exacta de los iones moleculares de 423 compuestos entre plaguicidas y productos de transformación.

3.3.2. Artículo Científico 6:

Comprehensive comparative of quantification and confirmation capabilities of UHPLC coupled to triple quadrupole and hybrid quadrupole time of flight mass spectrometry analyzers in pesticide residue analysis.

S. Grimalt, J.V. Sancho, O.J. Pozo, F. Hernández

Journal of Mass Spectrometry **2009**, submitted

Comprehensive comparative of quantification and confirmation capabilities of UHPLC coupled to triple quadrupole and hybrid quadrupole time of flight mass spectrometry analyzers in pesticide residue analysis

S. Grimalt^a, J.V. Sancho^a, O.J. Pozo^{a,b}, F. Hernández^a

(a) *Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, E-12071 Castellón, Spain*

(b) *DoCoLab, UGent, Department of Clinical Chemistry, Microbiology and Immunology, Technologiepark 30, B-9052 Zwijnaarde, Belgium*

Abstract

The potential of three mass spectrometry (MS) analyzers (triple quadrupole, QqQ; time of flight, TOF; and quadrupole time of flight, QTOF) has been investigated and compared for quantification and confirmation purposes in pesticide residue analysis in vegetable and fruit samples. A multiresidue UHPLC method of analysis for 11 pesticides has been developed and validated for all three mass analyzers. All instruments presented a similar limit of quantification around 0.01 mg/kg, fulfilling the most restrictive case as baby-food analysis. Regarding absolute sensitivity, the lower limits of detection were obtained, as expected, for QqQ (100 fg), whereas similar slightly higher limits (300 fg) were obtained for both TOF and QTOF. Confirmative capacity of each instrument was studied for each analyte based on the identification points (IPs) criteria, useful for a comprehensive comparison. QTOF mass analyzer showed the highest confirmatory capacity although QqQ presented typically sufficient IPs even at lower concentration levels. Regarding screening purposes, TOF mass analyzer has revealed as an attractive tool for identification of untargeted pesticides. This process is readily boosted when combined with specialized software packages, like ChromaLynx application manager, together with theoretical exact mass database. Following this strategy, two pesticides (carbendazim in citrus and indoxacarb in grape) were discovered. Further confirmation of the identity was performed using reference standard and/or QTOF MS/MS acquisitions.

Keywords: Triple Quadrupole, Time of Flight, Quadrupole Time of Flight, Pesticide Residues, Food Analysis

1. INTRODUCTION

From 90s to nowadays, a broad instrumental implementation of liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) has been made in most of analytical areas, from biomedical to environmental research. Single MS analyzers were normally used in a first step, but a quickly change towards tandem MS/MS has been observed when facing to analysis of organic contaminants and residues in different applied fields. Regarding evolution of different analyzer designs, such as quadrupole (Q), time of flight (TOF) and ion trap (IT), combinations of these MS analyzers to achieve tandem instruments as triple quadrupole (QqQ), hybrid quadrupole linear ion trap (QqLIT) and quadrupole time of flight (QTOF) have been appeared to increase versatility and to allow multiple experiments unachievable by only one instrument. These tandem MS analyzers are gaining popularity due to their excellent analytical characteristics and to the great amount of useful information for identification and elucidation purpose. Therefore, considering the properties of each mass analyzer and depending on application, an ideal configuration would be selected to reach the best performance characteristics, fitting the initial objectives [1-4]. Previous comparatives of specific MS analyzers applied to pesticide residue analysis (PRA) in food samples have been recently reported [5-7] by the same group (Soler and Picó *et al.*). In this series of papers different analyzers have been compared, studying Q, IT and TOF analyzers for single MS instruments as well as QqQ, QqLIT and QTOF analyzers for tandem MS instruments. Considering that different analyzer will be selected depending on the analytical purposes, the comparisons are mainly focused in target method analysis [6, 7], and only when comparing QqLIT and QTOF, a non-target methodology was discussed [5].

In this sense, analytical purpose could be directed to target analytes or non-target compounds. Target analytes always are known substances and with a high expected possibility to be present in the samples under study. On the other hand, the investigation of unknown compounds in a sample has been considered a non-target analysis. This approach is not directly treated in this work but it has been already discussed in previous work by our group [8], and specific application for non-target metabolite identification in PRA in food samples can also be found elsewhere [9-10]. PRA in food target-methods include typically non-banned pesticides and then pre-selected analytes are considered. This type of approach could be labeled as pre-target [11-20]. In pre-target methods analytes standards have been previously injected to optimize chromatographic and mass spectrometric parameters in order to obtain a suitable analytical method for

quantification and confirmation of pre-selected analytes in real samples. Therefore, to obtain the maximum sensitivity and selectivity, selected reaction monitoring (SRM) is usually applied with triple quadrupole mass analyzers (QqQ) [11-19]. However, other possible MS configurations have been also considered to perform this pre-target approach, such as IT [21-24], QqLIT [25], TOF [20, 26-28] and QTOF [9]. A second approach involves a post-selection of the compounds of interest after MS acquisition, this type of analysis has been usually considered as post-target analysis. Therefore, in this case, for a successful screening of analytes, mass analyzers with adequate full spectrum acquisition capabilities, such as IT and TOF [20, 29-30] are required. Availability of suitable software packages for searching the possible presence of known compounds in the food samples would also be required. Sometimes additional standard injections could be necessary for a semi-quantitative and/or confirmative method.

Regarding the interesting comparison that has been made in previously cited works [5-7], the use of different atmospheric pressure ionization sources, and consequently different optimal conditions, could give a non realistic comparison between mass analyzers [6]. Moreover, new functionalities and advanced technologies both in LC and MS have appeared in the market. The last generation of (Q)TOF analyzers presented numerous developments that improved their capabilities. Faster acquisition speed allows reducing scan time without affecting sensitivity. Another functionality that could be cited was the use of reference sprayers, such as lock-spray, for providing robust mass accuracy along time. One of the most interesting advances has been to extend the dynamic linear range in TOF analyzers using time-to-digital converter (TDC) detectors, thanks to the so-called dynamic range enhancement (DRE). On the other hand, the high acquisition speed of mass analyzers could be fully used with recent Ultra High Pressure Liquid Chromatography (UHPLC) systems, using columns packed with sub-2 μm particles. These chromatographic systems reduce run times without losing separation efficiency. Several applications of UHPLC in PRA in food show an increase in the sample throughput, obtaining narrower peaks and improving confirmation for targeted pesticides [16-18].

The goal of this work is to make a detailed study of the analytical capabilities of three current mass analyzers, QqQ, TOF and QTOF considering, both quantitative and qualitative applications. PRA in food samples has been selected as a case of study, as we have wide experience on this subject and because of the importance of pesticide residues and their metabolites in environment, public health and food safety fields. Specifically, 11 pesticides and 9

vegetable and fruit matrices have been selected in order to investigate the potential of each analyzer in quantification and confirmation issues in target methods, using both pre-target and post-target approach.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Reagents and Chemicals

Azoxystrobin, buprofezin, chlorpyrifos, diflubenzuron, hexythiazox, imazalil, imidachlorpid, pyriproxyfen, tebufenozide, thiabendazole and spinosad reference standards were purchased from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). HPLC-grade methanol, residue analysis grade acetone and reagent grade ammonium acetate were purchased from ScharLab (Barcelona, Spain). LC-grade water was obtained by purifying demineralized water in a Milli-Q Gradient A10 (Millipore, Billerica, MA, USA).

Stock standard solutions of each compound were prepared by dissolving 50 mg of powder, accurately weighted, in 100 mL acetone, obtaining a final concentration of ca. 500 µg/mL. These solutions were stored at -20 °C. Working solutions, used for injection in LC systems or raw extract fortification, were obtained by diluting the stock solutions with a solvent mixture methanol : water (80:20, v/v).

2.2. Instrumentation

A triple quadrupole (TQD) mass spectrometer and a hybrid quadrupole time-of-flight (QTOF Premier) mass spectrometer, both provided with an orthogonal Z-spray-electrospray interface (ESI) (Waters, Milford, MA, USA) and interfaced to an UPLC system, Acquity (Waters) were used in this work. Drying gas as well as nebulising gas nitrogen was generated from pressurized air in a nitrogen generator N2 LCMS-0 from Claind (Lenno, Italy). The desolvation gas flow was set to approximately 600L/h and the cone gas flow to 50L/h. The nitrogen desolvation temperature was set to 350°C and the source temperature to 120°C. Capillary voltage of 3.5 kV was used in positive ionization mode in both instruments, and the cone voltage was selected depending on the analyte. As collision gas argon (99.995% Praxair, Madrid, Spain) was used in the collision cell with a flow of approximately 0.10 mL/min and 0.50 mL/min in the case of QqQ and QTOF instruments, respectively. In QTOF Premier, for both MS and MS/MS operation, argon was always on. Collision energies for the different product ions were

chosen depending on the precursor ion. The gain of the detector in QqQ was of 1.0 a.u., and in the case of QTOF the MCP detector was set to 1750 V. An auto MS profile was used. Data station operating software was MassLynx v 4.1.

TOF MS resolution was approximately 10000 (FWHM) at m/z 556. MS and MS/MS spectra were normally acquired over a m/z range of 50 to 1000. Calibration of the m/z axis was performed using the built-in single syringe pump, directly connected to the interface. Calibration was conducted from m/z 50 to 1000 with a 1:1 mixture of 0.1 M NaOH: 10% HCOOH diluted (1:25) with acetonitrile : water (80:20), at a flow rate of 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. For automated accurate mass measurement, the lock-spray probe was used, using as lockmass a solution of leucine enkephaline 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in acetonitrile : water (50:50) at 0.1% HCOOH pumped at 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ through the lock-spray needle using a Reagent Delivery Module from Waters. The protonated molecule of leucine enkephaline at m/z 556.2771 was used for recalibrating the mass axis and ensuring a robust accurate mass measurement along time.

Mobile phases consisted of mixtures of 0.5 mM NH_4OAc in methanol/0.5 mM NH_4OAc in water, and injection volume of 20 μL was used in both instruments. Separation was performed on an Acquity UPLC BEH C18 column (50 mm x 2.1 mm, i.d. 1.7 μm) (Waters) using a gradient elution at a flow rate of 0.3 mL/min. The percentage of methanol was changed as follows: 0.0 min, 10%; 1.0 min, 10%; 2.0 min, 60%; 3.0 min, 90%; 6.0 min, 90%; 6.1 min, 10%; 8.0 min, 10%.

2.3. Sample procedure

Nine samples types were analyzed: orange peel and flesh, banana peel and flesh, strawberry, tomato, grape fruit, cucumber and pepper. The samples were cut into small pieces without any pretreatment and were triturated with a chopper K55E (Dito Sama, Aubusson, France). A 10 g aliquot of homogenized chopped sample was accurately weighted (precision 0.1 mg) and mixed with 25 mL methanol : water (80:20, v/v). After extraction for 2 minutes with high-speed blender Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel GmbH & Co., Staufen, Germany) at 8000 rpm, the entire extract was filtered through a 25-30 μm filter paper (ANOIA S.A., Barcelona, Spain), washed with 10 mL of extraction solvent, and the volume adjusted to 50 mL with the same extraction solvent. An aliquot of the raw extract was passed through a 0.22 μm Nylon syringe filter (SharLab, Barcelona, Spain) to remove solid particles. Then, 20 μL were directly injected into the LC system studied.

Fortification of raw extract was performed delivering 1 mL of mixed standard solution at 0.1, 0.5 and 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in methanol : water (80:20, v/v) to 10 g of homogenized sample to obtain 0.01, 0.05 and 0.1 mg/kg fortification levels, respectively. These samples were equilibrated, under room conditions, for 1 hour prior to extraction.

2.4. MS and MS/MS Experiments

Two mass spectrometry instruments (QqQ and QTOF) have been employed in this work to study the ionization and fragmentation of the 11 selected compounds, in order to compare three mass analyzers (QqQ, TOF and QTOF). These processes were optimized for each analyte in full acquisition by (Q)TOF working in TOF mode, full product ion scan in QTOF MS/MS and SRM acquisition by QqQ MS/MS.

The optimization step was performed with standards by infusion of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ standard solutions (methanol : water, 80:20 (v/v)) using the built-in single syringe pump directly connected to the interface, at a flow rate of 10 $\mu\text{L}/\text{min}$.

2.5. Validation of the Quantitative Parameters

Validation data set for each pesticide/matrix/analyzer combination were obtained following the European Union SANCO working documents^[31].

Method linearity was studied injecting standard solutions at concentrations between 0.01 and 1000 $\mu\text{g}/\text{L}$. Calibration curves used in recoveries experiments were obtained by injecting, in triplicate, matrix-matched standard solutions at 10 concentration values between 0.1 and 100 $\mu\text{g}/\text{L}$. Acceptance criterion for linearity was a correlation coefficient higher than 0.99 and residuals lower than 30%.

Accuracy and precision were calculated by analyzing blank samples, obtained from ecological agriculture, spiked at three levels (0.01, 0.05 and 0.1 mg/kg) and analyzed in triplicate at each concentration level. Acceptance criteria for accuracy recoveries fall between 70% and 110%, and for precision that relative standard deviation (RSD) was lower than 20%.

The limit of detection (LOD), defined as the lowest concentration that the analytical process can reliably differentiate from background levels, was estimated for a signal-to-noise ratio of 3 from the chromatograms at the lowest analyte concentration tested. The limit of quantification (LOQ) objective was

taken as the lowest concentration tested, which gave acceptable recoveries and precision.

In the case of TOF and QTOF acquisition, narrow mass window extracted ion chromatograms (nw-XIC) were used for quantification. An extraction mass window of ± 10 mDa was selected in both cases.

2.6. Validation of the Confirmative Parameters

In order to evaluate the confirmative capabilities of the mass analyzers, the Identification Points (IPs) approach (Decision 2002/657/EC)^[32] was taken, as in our previous works^[9, 33]. The study was performed at the three concentration levels tested (0.01, 0.05 and 0.1 mg/kg). Ion ratios were calculated taking the peak area of the most abundant ion, used for quantification, and the peak area for each confirmative ion selected. As mentioned above an extraction mass window of ± 10 mDa was selected for TOF and QTOF analyzers. Experimental ion-ratio in samples was compared with those of reference standards (calculated as average value, obtained from the different standard solutions injected in each sample batch) and the deviation (relative errors) evaluated. Accurate mass measurements in TOF and QTOF experiments were obtained by combining all mass spectra across the chromatographic peak.

Similarly to LOD in the quantification process, a limit of confirmation (LOC) was established to evaluate the sensitivity in the confirmation process. LOC could be defined as the lowest concentration that the analytical process can reliably differentiate from background levels, estimated for a (signal-to-noise ratio of 3), from the chromatograms corresponding to the confirmative ions or transitions at the lowest analyte concentration tested.

2.7. Screening Methodology

To take advantage of the full qualitative capability, an approach other than (pre)target analysis of the 11 compounds selected was considered, the searching of a huge number of pesticides in samples after MS acquisition, in a post-target way^[34-35]. This was only feasible in the case of full spectrum TOF MS acquisitions, not in QqQ working in SRM mode. To perform this screening, a methodology of automated nw- XICs was applied making use of the application manager *ChromaLynx 4.1 (Waters)*. The main parameters considered were the exact mass of $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ and/or $[M+NH_4]^+$ and the mass extraction

window, selecting ± 10 mDa. Other parameters selected to improve the chromatographic peak extraction were a peak width at 5 % height of 10 seconds, a peak-to-peak baseline noise of 12 counts and a noise elimination level of 6 counts. A useful characteristic of ChromaLynx software for accelerating to facilitate the searching process is the use of colored codes to easy visualize the presence of potential positives based on the measured mass error.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. MS and MS/MS experiments

The precursor ion chosen was predominantly the protonated molecule ($[M+H]^+$) in both QqQ and QTOF experiments. **Table 1** shows cone voltages and collision energies selected for each analyte. Regarding TOF experiments, a single acquisition function, using a voltage ramp from 20 to 70 V, was finally selected in order to promote in-source fragmentation. This allowed enough in-source fragmentation for most analytes while maintaining the protonated molecular ion with sufficient abundance with satisfactory number of data points per chromatographic peak. However, when working in QTOF mode, as different cone voltage and collision energy ramps were selected for each pesticide (**Table 1**), individual acquisition functions per analyte were used, except for tebufenozide and hexythiazox that share same nominal precursor ion (m/z 353), resulting in this case in lower data points per chromatographic peak. Accurate mass measurements in MS and MS/MS QTOF experiments allow to obtain the molecular formula of each precursor and product ion, and facilitate the proposal of a fragmentation pathway for each analyte, which is much helpful to select confirmatory ions of higher specificity.

In the case of QqQ, some in-source fragments were selected as precursor ions (see **Table 1**), because of individual cone voltages could be used for each SRM transition within the same function. However, in hybrid QTOF, a full product ion scan was acquired per function selecting only one precursor ion at fixed cone voltage. The selection of different precursor ions in QTOF would have involved the use of different functions affecting negatively at the chromatographic peak shape due to the decrease of data points rate. This did not occur in QqQ, where low dwell times (0.005-0.025 s) per SRM transition could be used, facilitating the isolation of more than one precursor ion per compound within the same function, without loss of sensitivity. In the other hand, to avoid including too many SRM

transitions in the same function or overlapping functions, the SRM transition were distributed along chromatographic time in order to maintain the number of overlapping transitions below 15-25. Taking into account the inter-channel and inter-scan time (0.005 s and 0.01 s, respectively) as well as the dwell time selected (0.025 s), a total cycle time of 0.455-0.755 s was achieved, requiring chromatographic peaks 5-8 seconds wide at the base for proper peak shape.

Table 1. Cone voltage and collision energies established in QqQ and QTOF analyzers for each pesticide.

Analyte	QqQ					QTOF	
	Q	q ₁	q ₂	q ₃	q ₄	Cone Voltage (V)	Collision Energy Ramp (eV)
Azoxystrobin	372>329 60V 25eV	372>344 60V 20eV	404>372 30V 15eV	372>172 60V 45eV	372>156 60V 45eV	20	5-50
Buprofezin	201>57 40V 15eV	306>57 40V 25eV	306>201 40V 10eV	306>106 40V 25eV	201>116 40V 10eV	20	5-30
Chlorpyrifos	350>97 35V 30eV	350>198 35V 25eV	350>125 35V 20eV	350>153 35V 15eV	350>322 35V 10eV	20	5-40
Diflubenzuron	311>158 20V 10eV	311>141 20V 35eV	311>113 20V 50eV	311>63 20V 60eV	158>63 40V 40eV	20	5-60
Hexythiazox	353>228 30V 15eV	353>168 30V 25eV	353>194 30V 45eV	353>151 30V 35eV	353>271 30V 15eV	20	5-45
Imazalil	297>41 40V 25eV	297>159 40V 25eV	297>109 40V 20eV	297>201 40V 20eV	297>255 40V 20eV	30	5-30
Imidachlorprid	256>175 30V 20eV	256>209 30V 15eV	256>210 30V 10eV	256>84 30V 15eV	256>128 30V 15eV	20	5-20
Pyriproxyfen	322>96 35V 15eV	322>78 35V 55eV	322>77 35V 45eV	322>185 35V 25eV	322>227 35V 15eV	20	5-55
Spinosad	732.6>142.2 50V 30eV	142.2>98.1 80V 15eV	732.6>98.1 50V 65eV	142.2>70.1 80V 30eV	754.6>142.2 90V 45eV	50	5-70
Tebufenozide	297>133 35V 15eV	353>133 20V 20eV	297>105 35V 40eV	353>297 20V 10eV	353>105 20V 45eV	20	5-45
Thiabendazole	202>175 50V 25eV	202>131 50V 35eV	202>65 50V 45eV	202>92 50V 35eV	202>104 50V 40eV	40	5-45

A scan time of 0.2 s and inter-scan time of 0.02 s were selected in full spectrum acquisition of both TOF and QTOF analyzers. So, the total cycle time was of 0.22 s in TOFMS, as only one single function was acquired. However, in the case of QTOF measurements, several functions were overlapping, increasing considerably the cycle time (about 1.76 s for eight functions) and decreasing the total number of points across the chromatographic peak. Therefore, the number of points obtained per peak in the case of TOF was slightly higher than for QqQ but considerably higher than for QTOF. On the contrary, TOF presented lower fragment ions per analyte due to in-source CID instead of collision cell fragmentation like in QTOF and QqQ. As a compromise, in order to compare the

results obtained by the three analyzers, only 5 SRM transitions or fragment ions were selected as confirmatory ions/transitions.

3.2. Quantification comparative study

The most abundant m/z ion (product ion in MS/MS experiments) was monitored for quantitative purposes (**Table 2**). To evaluate potential of each mass analyzer for quantification of target analytes, several relevant parameters were compared: linearity, matrix effect, recoveries and LOD, in a wide variety of food matrices: orange peel and flesh, banana peel and flesh, strawberry, tomato, grape fruit, cucumber and pepper. A great number of data were obtained difficult to summarize in this paper. So, to make this information friendlier to the reader, only data for a representative matrix, strawberry, are shown in **Table 2** to illustrate the work performed.

3.2.1. Linear dynamic range

Traditionally, lower linear dynamic ranges have been assigned to TOF and QTOF analyzer as one of the handicaps in quantitative analysis. Nevertheless, some PRA applications in food have been developed showing sufficient linearity for a suitable quantification^[9, 27], thanks in part to recent improvements in these analyzers rendering new TOF generation instruments able to come close to typical linearity ranges achievable by QqQ instruments.

One of these advanced functionalities is the Dynamic Range Enhancement (DRE) approach, which allows enhancing linearity by physical “dilution” of the number of ions measured by the MCP detector.

In order to study the linearity range in the mass analyzers tested, a wide range of standards (sixteen concentration levels from 0.01 to 1000 $\mu\text{g/L}$) were injected. **Figure 1a** shows the benefits of using DRE on imazalil linearity when in TOF MS analysis with satisfactory linearity from 0.25 to 1000 $\mu\text{g/L}$ (more than 3 orders of magnitude). However, the lower sensitivity of QTOF against TOF allows achieving a good linearity up to 1000 $\mu\text{g/L}$ without DRE option (**Figure 1b**). This behavior could be generalized for most of the studied analytes. When using QqQ, linearity for imazalil showed 4 orders of magnitude, from 0.01 to 100 $\mu\text{g/L}$.

Figure 1c summarizes the results obtained for two representative selected analytes, thiabendazole (higher sensitivity) and hexythiazox (lower sensitivity). The widest linearity ranges were found for both compounds in QqQ. The benefits of using DRE on TOF and QTOF measurements were only evident in the most sensitive analysis (thiabendazole) and it allowed to get a linear range close to QqQ. No clear advantages were observed for the DRE approach for the less

sensitive analyte (hexythiazox), which could be related with the higher concentration tested (1000 ng/mL). **Figure 1d** shows the lowest calibrated level (LCL) for hexythiazox when using QqQ, TOF and QTOF MS. The absence of background noise in the QTOF chromatograms makes problematic the evaluation of the LCL value. This fact will be discussed again when in the LOD section.

Table 2. Quantification parameters to evaluate the three MS analyzers (QqQ, TOF and QTOF). Recovery mean value for strawberry matrix has been obtained from 5 replicates at each concentration level.

QqQ						
Analyte	MS/MS Transition or Theoretical m/z	Recovery ((RSD) (%))			Instrumental LOD (pg)	Linearity Range (ng/mL)
		0.01 mg/kg	0.05 mg/kg	0.1 mg/kg		
Azoxystrobin	404>372	83 (8)	77 (5)	79 (5)	0.22	0.1-100
Buprofezin	201>57	86 (15)	75 (6)	75 (9)	0.25	0.25-100
Chlorpyrifos	350>97	99 (6)	82 (5)	79 (4)	0.68	0.25-100
Diflubenzuron	311>158	73 (2)	71 (5)	70 (13)	0.78	0.5-100
Hexythiazox	353>228	98 (4)	79 (8)	80 (7)	0.32	0.25-100
Imazalil	297>41	85 (7)	74 (7)	77 (9)	0.19	0.1-100
Imidachlorprid	256>175	76 (8)	77 (8)	70 (7)	1.32	0.25-100
Pyriproxyfen	322>96	95 (4)	84 (3)	81 (9)	0.39	0.1-100
Spinosad	732.6>142.2	134 (3)	96 (5)	86 (8)	0.17	0.25-100
Tebufenozide	297>133	87 (5)	78 (4)	76 (7)	0.35	0.1-100
Thiabendazole	202>175	106 (13)	79 (14)	80 (15)	0.09	0.1-100
TOF						
Azoxystrobin	372.0984	83 (12)	77 (9)	85 (5)	0.44	0.1-100
Buprofezin	306.1640	98 (12)	84 (2)	91 (4)	2.50	0.5-100
Chlorpyrifos	197.9280	67 (13)	93 (18)	78 (9)	5.00	1-100
Diflubenzuron	311.0399	110 (3)	75 (18)	98 (7)	8.75	2.5-100
Hexythiazox	228.0250	82 (7)	78 (3)	79 (5)	7.50	1-100
Imazalil	297.0561	78 (10)	79 (7)	87 (6)	0.28	0.25-100
Imidachlorprid	256.0601	146 (12)	76 (10)	75 (2)	8.42	1-100
Pyriproxyfen	96.0449	80 (6)	82 (8)	89 (5)	7.5	1-100
Spinosad	732.4687	134 (11)	96 (16)	95 (10)	0.75	0.25-100
Tebufenozide	297.1603	85 (9)	83 (5)	88 (12)	3.75	0.5-100
Thiabendazole	202.0439	54 (6)	60 (14)	90 (11)	2.5	0.5-100
QTOF						
Azoxystrobin	404>372.0984	67 (15)	73 (2)	80 (8)	0.75	0.1-100
Buprofezin	306>201.1062	90 (19)	70 (5)	74 (10)	0.47	0.5-100
Chlorpyrifos	350>197.9280	106 (17)	84 (7)	91 (5)	6.96	1-100
Diflubenzuron	311>158.0417	118 (5)	89 (13)	107 (3)	4.69	2.5-100
Hexythiazox	353>228.0250	86 (16)	83 (5)	102 (2)	9.67	1-100
Imazalil	297>297.0561	185 (14)	116 (5)	103 (9)	0.31	0.25-100
Imidachlorprid	256>209.0594	140 (12)	65 (8)	77 (1)	12.5	2.5-100
Pyriproxyfen	322>96.0449	96 (9)	88 (5)	88 (9)	3.75	0.5-100
Spinosad	732.6>732.4687	165 (9)	117 (22)	123 (14)	7.5	1-100
Tebufenozide	353>133.0653	98 (32)	104 (3)	105 (12)	1.25	0.5-100
Thiabendazole	202>202.0439	66 (3)	82 (8)	96 (8)	2.5	0.5-100

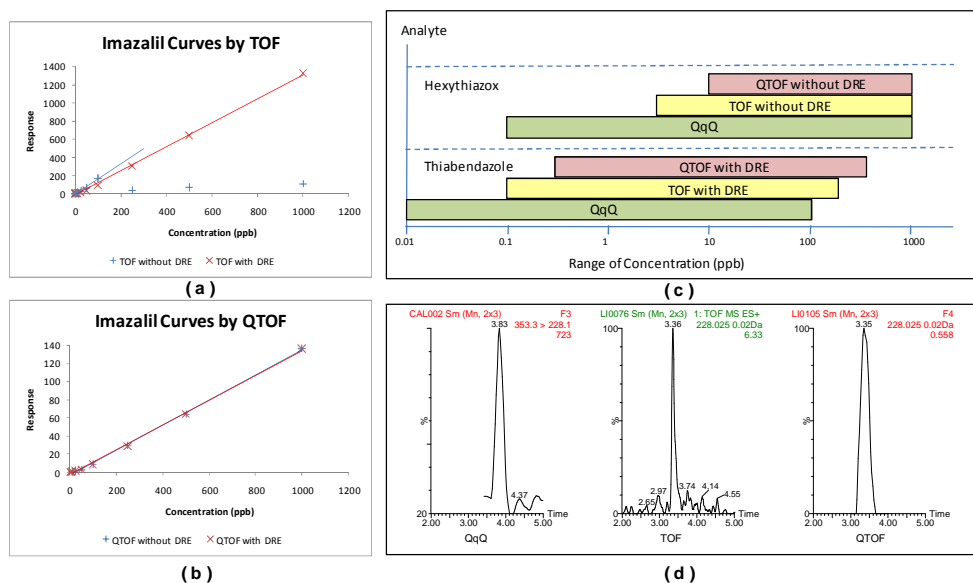


Figure 1. Linearity range graphic of imazalil solvent standards by (a) TOF and (b) by QTOF. (c) Graphic showing the linearity range for hexythiazox and thiabendazole for three analyzers tested. (d) Chromatograms for the lowest calibration level for hexythiazox (QqQ, 0.1 µg/L; TOF, 5 µg/L; QTOF, 10 µg/L) (XICs at ± 10 mDa).

3.2.2. Matrix effects

Matrix effect was evaluated to test if substantial differences were observed depending on the instrument electrospray source. To study matrix effects, standard solutions prepared in solvent and in blank matrix extract at the same level were injected by duplicate in QqQ (10 µg/L) and in TOF and QTOF (100 µg/L). Matrix effect was evaluated by the ratio matrix-matched standard peak area/solvent standard peak area, expressed as percentage. Values higher than 100% indicate ionization enhancement, while below 100% indicate ionization suppression^[36] (see Figure 1, Supplementary Information). We observed a similar behavior of the three mass analyzers as regards matrix effects. Analytes with lower retention time, such as imidachlorprid (2.3 min) or thiabendazole (2.6 min), were affected by higher suppression effect in all food matrices, suggesting that most of co-extracted interferences eluted at the beginning of the chromatogram. On the other hand, pepper and orange peel matrices presented normally more ionization suppression for all analytes tested. In general, no significant signal enhancement was observed for any analyte/matrix combination.

When facing with some complex matrices, TOF MS analyses may be more affected by matrix interferences than in tandem MS. Thus in pepper samples, the use of a narrow mass window of ± 10 mDa (m/z 306) was not enough to solve matrix interferences in the TOF analyzer, as shown in **Figure 2c** for buprofezin analysis. Therefore, nw-XICs at lower mass windows (± 5 and ± 2.5 mDa) were successfully evaluated, trying to remove these isobaric compounds present in the pepper matrix. In TOF acquisition a robust accurate mass measurement along the entire chromatographic peak of buprofezin was essential to extract very narrow mass windows (2.5 mDa mass error) with a satisfactory peak shape for quantification and confirmation purpose.

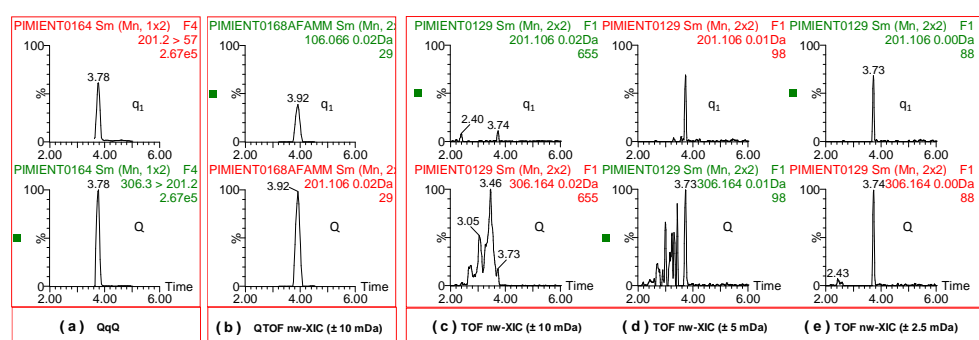


Figure 2. Chromatograms for a pepper matrix-matched buprofezin standard of 10 $\mu\text{g/L}$ (a) LC-ESI-QqQ, (b) LC-ESI-QTOF nw-XIC (± 10 mDa) and LC-ESI-TOF nw-XIC (c) ± 10 mDa, (d) ± 5 mDa and (e) ± 2.5 mDa. (See Table 2 and Table 3 for Q and q_1 values, respectively)

3.2.3. Accuracy and precision

After studying the sensitivity and matrix effect for all analytes/matrix/mass analyzers combinations, matrix-matched calibration was selected (from 0.1 to 100 $\mu\text{g/L}$) in the validation study to compensate the different matrix effects observed

As illustrative example, **Table 2** shows linearity ranges obtained for each analyte in a strawberry matrix. In general, QqQ presented a wider linear range than TOF and QTOF, and higher sensitivity. Calibrations curves were satisfactory, obtaining correlation coefficients higher than 0.995 and residuals lower than 30% in all cases.

Recovery experiments were performed by spiking different blank samples (orange peel and flesh, banana peel and flesh, strawberry, tomato, grape fruit, cucumber and pepper) at 0.01, 0.05 and 0.1 mg/kg. As before, in order to perform

an easier comparison between instruments, only a representative matrix, strawberry, is shown in **Table 2**.

Recoveries and precision were satisfactory for all instruments and analytes at 0.1 and 0.05 mg/kg. However for the lowest level tested, 0.01 mg/kg, only QqQ analyzer showed successful results for all analytes, except spinosad (134%). At this level, TOF and QTOF mass analyzers led to recoveries out of the range 70-110% for several pesticides, surely due to their lower sensitivity.

3.2.4. Limits of Detection

In order to compare the sensitivity attainable for each instrument, LOD values were estimated from standard solutions and expressed as absolute instrumental values in picograms. The lowest LODs for all analytes were obtained with QqQ, as **Table 2** shows, ranging from 0.1 pg (thiabendazole) to 1.3 pg (imidachlorprid). (De aquí en adelante ya no lo ha leído F) In the case of the TOF analyzer, the LODs generally increased in relation to QqQ values, but ranging from only twofold (imazalil and azoxystrobin) to more than twentyfold (pyriproxyfen, hexythiazox and thiabendazole). Comparatively QTOF and TOF presented similar sensitivity, with the only exceptions of buprofezin (fivefold more sensitive) and spinosad (tenfold less sensitive). The LOD estimation for QTOF was, sometimes, ambiguous due to the non practical existence of background noise in the nw-XIC chromatogram. As **Figure 1d** shows, QTOF chromatogram seems to lack noise against TOF and QqQ chromatograms. This make difficult to establish realistic LOD values. In general, the analytes diflubenzuron and imidachlorprid presented the poorer sensitivity in the three instruments tested.

3.3. Confirmation in Target Method

Another characteristic, compared between these three mass analyzers, was their confirmatory capabilities. A previous optimization based on confirmative purposes has been applied in all three cases, especially for TOF and QTOF, where a common cone voltage ramp and collision energy ramp, respectively, have been applied in order to obtain, in a single acquisition function, the protonated molecular ion and its fragment ions for every analyte. To evaluate the amount and quality of their confirmative capabilities the criterion based on the number of IPs has been adopted^[32]. The number of IPs earned per measured ion has been established according to instrumental resolution, i.e. 1.0 and 2.0 IPs for a precursor ion at low resolution (LR) and high resolution (HR), respectively, and 1.5 and 2.5 IPs for a product ion at LR and HR, respectively^[32]. Traditionally, HR is defined as 10000 resolution at 10% valley, while the resolution in TOF and QTOF instruments is usually expressed at 50% valley. Then TOF analyzers must

present a resolution of 20000 FWHM to be considered as HR. In our opinion, the use of mass accuracy provided by TOF MS and QTOF MSMS seems a more appropriated criterion for a reliable confirmation rather the instrumental resolution specifications. In this sense IPs assignation could be associated to mass errors as stated in a previous work^[33]. Then for ions measured by TOF and QTOF if it is a single or precursor ion 1.0, 1.5 and 2.0 IPs can be earned, but if it is a product ion 1.5, 2.0 and 2.5 IPs can be considered depending on the mass error: higher than 10 mDa, between 2 and 10 mDa and below 2 mDa, respectively. These criteria were applied for collecting IPs in **Table 3**.

Besides considering resolution and mass accuracy as analytical confirmatory parameters, the ion ratio deviation must also be calculated. In order to compare ion-ratios, a wider number of ions (5) have been selected, as **Table 3** shows, in spite of just 2 ions to measure at least one ion ratio^[32]. In this sense, the fragmentation capabilities of each analyte both in the source and in the collision cell are decisive for achieving the expected number of five measurable ions.

Based on their fragmentation capabilities we can classify the selected pesticides in three groups. The first one, fragments easily both in the source and in the collision cell, and comprises azoxystrobin, hexythiazox, chlorpyrifos and imazalil. The second group, difficult to fragment in the source but not in the collision cell, includes buprofezin, pyriproxyfen, thiabendazole, diflubenzuron and imidachlorprid. Finally, the compounds difficult to fragment, even in the collision cell, form the third group, namely spinosad and tebufenozide. In order to compare the confirmatory capabilities of the different mass analyzers only representative compounds were shown in **Table 3** (rest of analyte are detailed in **Table 1** of *Supplementary Information*).

Furthermore, another analytical parameter shown in **Table 3** is the Limit of Confirmation (LOC), which tries to estimate at which concentration level any specific ion could be reliably used for confirmatory purposes.

3.3.1. QqQ

The higher sensitivity in SRM acquisition mode, allows QqQ analyzer to evaluate all 4 ion ratios in every case. Therefore, the number of IPs obtained when using QqQ is very stable across analytes with values around 9, high enough for a safe confirmation.

Table 3. Confirmative parameters to evaluation the three analyzers (QqQ, TOF and QTOF). Ion ratio and limit of confirmation (LOC) values were obtained as an average of every mean values of each matrix. (1)Precursor ion mass selected in the QTOF analyzer.

Analyte	QqQ				TOF					QTOF				
	MS/MS Transition	Ion ratio (Deviation (%))	LOC (µg/kg)	IPs	Theoretical m/z	Ion ratio (Deviation (%))	m/z deviation (mDa)	LOC (µg/kg)	IPs	Theoretical m/z	Ion ratio (Deviation (%))	m/z deviation (mDa)	LOC (µg/kg)	IPs
Imazalil	297>41	-	-	2.5	297.0561	-	2.4	-	1.5	297.0561 ⁽¹⁾	-	2.3	-	1.5
	297>159	1.6 (3)	1.1	1.5	299.0562	1.5 (4)	0.4	3.2	2.0	158.9768	5.4 (22)	0.9	16.7	2.5
	297>109	3.2 (12)	5.0	1.5	158.9768	8.0 (12)	0.3	14.4	2.0	255.0092	15.1 (54)	1.1	91.7	2.5
	297>201	3.8 (5)	3.6	1.5	255.0092	10.8 (2)	0.4	13.8	2.0	200.9874	17.1 (56)	1.3	141.7	2.5
	297>255	4.8 (5)	5.6	1.5	200.9874	19.4 (5)	2.1	14.1	1.5	109.0766	28.3 (72)	0.9	213.9	2.5
	Total IPs			8.5	Total IPs				9.0	Total IPs				11.5
Chlorpyrifos	350>97	-	-	2.5	197.9280	-	0.6	-	2.0	197.9280	-	1.5	-	2.5
	350>198	1.6 (5)	2.1	1.5	199.9251	1.0 (7)	0.3	4.1	2.0	96.9513	2.5 (19)	1.5	13.0	2.5
	350>125	2.0 (5)	2.4	1.5	351.9312	5.6 (24)	1.1	11.1	2.0	124.9826	4.5 (20)	1.8	15.2	2.5
	350>153	2.4 (6)	3.8	1.5	349.9341	6.1 (12)	2.3	11.1	1.5	321.9028	8.1 (48)	2.3	32.9	2.0
	350>322	4.8 (8)	5.7	1.5	321.9028	11.0 (27)	2.9	25.9	1.5	153.0139	12.2 (45)	2.8	36.7	2.0
	Total IPs			8.5	Total IPs				9.0	Total IPs				11.5
Buprofezin	306>201	-	-	2.5	306.1640	-	1.6	-	2.0	201.1062	-	1.4	-	2.5
	201>57	1.6 (8)	1.1	2.5	201.1062	1.6 (11)	2.4	8.9	1.5	106.0657	2.8 (13)	0.8	9.9	2.5
	306>57	1.8 (11)	1.1	1.5	106.0657	1.8 (5)	1.3	10.0	2.0	306.1640 ⁽¹⁾	2.1 (9)	2.3	11.4	1.5
	201>116	1.8 (8)	1.3	1.5	-	-	-	-	-	145.0436	12.0 (50)	2.7	83.6	2.0
	306>106	2.4 (9)	1.3	1.5	-	-	-	-	-	86.0606	19.3 (59)	1.4	105.6	2.5
	Total IPs			9.5	Total IPs				5.5	Total IPs				11.0
Diflubenzuron	311>158	-	-	2.5	311.0399	-	1.6	-	2.0	158.0417	-	2.4	-	2.0
	311>141	1.0 (5)	2.6	1.5	158.0417	nd	nd	125	-	141.0152	1.3 (12)	1.2	38.9	2.5
	311>113	2.6 (8)	5.2	1.5	141.0152	nd	nd	250	-	311.0399 ⁽¹⁾	14.2 (59)	2.7	175	1.5
	311>63	3.7 (7)	6.4	1.5	-	-	-	-	-	113.0203	23.9 (27)	2.0	170	2.5
	158>63	4.9 (12)	14.4	2.5	-	-	-	-	-	63.0246	nd	-	-	-
	Total IPs			9.5	Total IPs				2.0	Total IPs				8.5
Spinosad	732.6>142.2	-	-	2.5	732.4687	-	1.2	-	2.0	732.4687 ⁽¹⁾	-	2.8	-	1.5
	142.2>98.1	4.4 (10)	0.8	2.5	142.1232	1.2 (10)	1.3	6.4	2.0	142.1232	1.6 (8)	0.8	10.6	2.5
	732.6>98.1	7.9 (3)	6.3	1.5	746.4843	4.6 (22)	2.8	6.8	1.5	98.0970	24.6 (37)	1.6	113.9	2.5
	142.2>70.1	31.1 (8)	11.4	1.5	142.1232	6.0 (21)	0.4	12.3	2.0	-	-	-	-	-
	746.6>142.2	85.4 (17)	45.0	2.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Total IPs			10.5	Total IPs				7.5	Total IPs				6.5

The LOC levels obtained showed that all analytes could be confirmed at 1-2 µg/kg level, allowing confirmation at low residue level. Depending on the fragmentation capabilities of each analyte, additional confirmation could be performed at similar levels, i.e. LOCs values very stable, like buprofezin. However, in the case of spinosad, the LOC values increased steadily when selecting additional product ions for improved confirmation, reaching in the worst case LOC 50 times higher.

3.3.2. TOF

The poorest confirmation capacity was found in TOF instrument, as a consequence of the low ability of some compounds to fragment in the source. In these cases, the number of measurable ions decreases, allowing obtaining about 5.5 IPs, as for buprofezin. Moreover, when combined with low ionization efficiency, the number of IPs gets even lower, like for diflubenzuron, where only 2 IPs are obtained, and hampering correct confirmation.

Regarding LOC values, typically are about three times higher than using QqQ. But, in some cases, as commented above, for low ionization efficiencies and/or poor in-source fragmentation, the LOC values could be even 100 times higher than QqQ.

3.3.3. QTOF

The highest confirmation capacity was generally found in the QTOF instrument, as a consequence of the high efficient fragmentation attainable in the collision cell as well as the accurate mass offered by the second mass analyzer. However, in the case of analytes with low ionization (diflubenzuron) or fragmentation (spinosad) efficiency, its lower sensitivity against QqQ in SRM mode, made the last approach obtain higher number of IPs.

Regarding LOCs, the lower sensitivity of QTOF mass analyzers working in full product ion scan makes that the values obtained are typically one order of magnitude higher than with QqQ in SRM mode. This fact counterbalances the higher confirmatory capacity of QTOF, making the use of QqQ in SRM mode an interesting alternative for obtaining more than enough IPs at LOCs values closer to LOQ ones.

3.4. Quantification and confirmation in real samples

44 commercial samples of several types, collected at different markets, were analyzed by the three configurations (QqQ, TOF and QTOF). Examples of positive samples for almost all analytes are included in **Table 4**. Quantitative data

for the three analyzers are in accordance, even at low concentration levels, such as azoxystrobin and hexythiazox in grape sample and thiabendazole in orange peel. In the cases of extremely low concentration levels, only QTOF instrument could not be able to identify the analyte. As an example, azoxystrobin in orange peel, QqQ and TOF instrument were able to quantify and even confirm the presence of this analyte at levels at 0.01 mg/kg. However, only QqQ could offer a satisfactory estimation of concentration level and adequate confirmation for an even lower level (0.005 mg/kg) of chlorpyrifos in tomato sample.

Simultaneous confirmation of the analyte identity was also considered; measuring ion ratio and accurate m/z deviations, in order to calculate IPs (see *Table 2, Supplementary Information*, for details). Although the confirmation process should be performed on a new processed sample aliquot^[31], in this study, as stated above, a simultaneous confirmation was carried out, enough for mass analyzers comparison.

The theoretical IPs showed in **Table 3** and *Table 1 (Supplementary Information)* were accomplished in every positive sample in the case of QqQ mass analyzer, except for very low concentration level, as chlorpyrifos in tomato or for complex matrices like orange peel in the case of azoxystrobin. For TOF analyzer, the number of theoretical IPs is more variable, from 2 to 10 IPs. Therefore, for low concentration positive samples, such as azoxystrobin in grape, pyriproxyfen in green pepper and thiabendazole in orange peel, not all theoretical IPs could be obtained in TOF instrument. However, in the case of chlorpyrifos, the relatively high concentration found in the banana peel improves mass accuracy for low abundant in-source fragment, obtaining more IPs than expected. Regarding QTOF acquisition, despite its lower sensitivity than QqQ which prevented achieving the total theoretical IPs in every positive sample, all detected analytes by QTOF presented higher number of IPs than QqQ and TOF, except for hexythiazox in grape sample.

Figure 3a, 3b and **3c** shows the chromatograms for confirmation of the hexythiazox positive grape sample (0.025 mg/kg) by QqQ, TOF and QTOF mass analyzers. As can be seen in this figure, all five product ions could be usable when QqQ was employed, whereas only four ions are available when TOF acquisition was performed. However, in the case of QTOF analyzer, the low amount of hexythiazox made only two product ions visible, reducing significantly in this specific case the number of IPs collected.

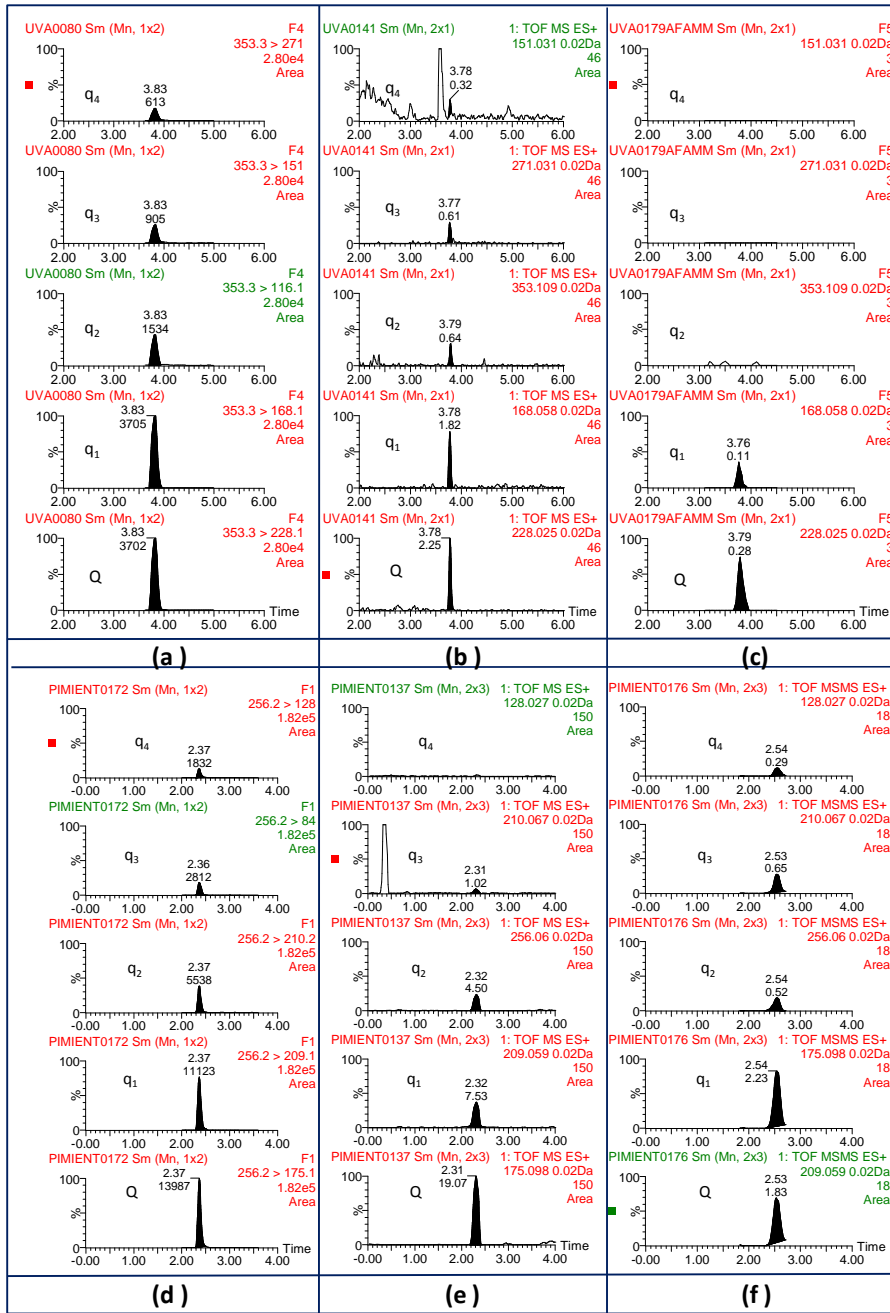


Figure 3. Chromatograms for grape sample positive to hexythiazox (a, b and c) and pepper sample positive to imidachlorprid (d, e and f) obtained by QqQ(left), TOF (center) and QTOF (right). Q, quantitation ion; q₁, first confirmative ion; q₂, second confirmative ion; q₃, third confirmative ion; q₄, fourth confirmative ion.

Table 4. Results for quantification and confirmation methods applied to positive real samples by QqQ, TOF and QTOF.

Positive Target Analyte	Sample Type	Quantification (mg/kg)			Confirmation IPs		
		QqQ	TOF	QTOF	QqQ	TOF	QTOF
Chlorpyrifos	Banana peel	0.601	0.655	0.405	8.5	10.0	11.5
Imidachlorprid	Red Pepper	0.324	0.488	0.339	8.5	6.0	11.5
Buprofezin	Tomato	0.057	0.065	0.072	9.5	5.5	11.5
Pyriproxyfen	Green Pepper	0.050	0.052	0.040	8.5	4.0	11.5
Azoxystrobin	Grape	0.025	0.025	0.020	9.5	7.0	10.5
Hexythiazox	Grape	0.026	0.024	0.025	8.5	7.5	3.5
Thiabendazole	Orange peel	0.013	0.012	0.015	8.5	2.0	9.0
Azoxystrobin	Orange peel	0.009	0.011	-	6.5	3.5	-
Chlorpyrifos	Tomato	0.005	-	-	4.0	-	-

On the other hand, for relatively high concentration positive samples, such as imidachlorprid in red pepper (0.3 mg/kg), theoretical IPs are easily achieved for all mass analyzers, as can be seen in **Figure 3d, 3e** and **3f**. In this case, all five product ions could be visible for both tandem mass instruments, QqQ and QTOF, respectively. For TOF acquisition, only the fourth in-source fragment ion cannot be usable, as expected.

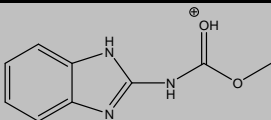
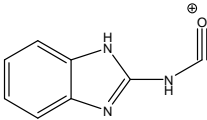
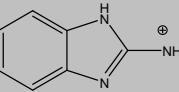
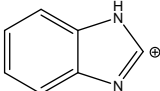
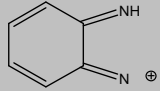
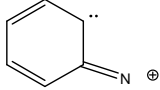
The problem of low in-source fragmentation could be solved when the analyte offered an abundant isotopic distribution, such as chlorpyrifos. A poor in-source fragmentation can be compensated selecting several isotopic ions and its fragments to obtain an increased confirmation power. Although, in-source CID fragmentation has been selected for TOF acquisitions in order to be comparable with single TOF instruments, the equipment used in this work is really a QTOF, but operated in TOF mode. This instrument always measures with collision gas on regarding the acquisition was in TOF MS or TOF MS/MS mode. Therefore, the fragmentation can be also promoted inside the collision cell, achieving a higher fragmentation efficiency^[10] and surely a higher number of IPs, filling the gap between single TOF and tandem mass spectrometers (QqQ and QTOF).

3.5. Application of the screening method to real samples

In addition to the comparison in quantification and confirmation capacity of three analyzers for pre-selected analytes, the possible presence of other pesticides and described pesticide TPs in real samples could be also investigated in TOF analyzer as a consequence of the full spectrum acquisition mode. TOF analyzer presented the advantage for screening unlimited number of known analytes, if enough information is available, such as exact mass or fragmentation behavior. In this sense, a new application to investigate the presence of other analytes could be performed without a new injection. The total of 44 commercial

samples injected were investigated using ChromaLynx XS application manager (see Table 3 in *Supplementary Information* for list of selected pesticides), obtaining some possible positives (> 100), but only some of them has been selected as examples to study the advantage and drawbacks of this post-target method.

Table 5. Exact masses of protonated carbendazim and its major product ions; m/z deviations obtained for both standard and citrus sample. Empirical formula obtained by elemental composition calculator and chemical structures proposed.

Exact mass	Standard m/z deviation (mDa)	Sample m/z deviation (mDa)	Molecular formula	Chemical Structure
192.0773	0.3	0.9	C ₉ H ₁₀ N ₃ O ₂	
160.0511	0.2	0.0	C ₈ H ₆ N ₃ O	
132.0562	0.2	0.6	C ₇ H ₆ N ₃	
117.0453	0.3	0.5	C ₇ H ₅ N ₂	
105.0456	0.3	1.4	C ₆ H ₅ N ₂	
90.0344	0.3	0.1	C ₆ H ₄ N	

One of the most illustrative and representative example as positive post-target pesticide identification was the case of carbendazim in a citrus sample. An important peak at 3.97 min was obtained for exact m/z 192.0773, with a mass deviation of 0.2 mDa, from the previous TOF MS acquired injection during the pre-target study. A combined spectrum of this peak, obtained automatically using ChromaLynx processing, revealed a second abundant peak at m/z 160.0511. Applying the elemental composition calculator restricting with the same atoms than carbendazim gave only one chemical formula, C₈H₆N₃O with m/z deviation of 0.6 mDa. This fragment has already been reported in literature together with 132 as typical carbendazim fragment ion in LC-QqQ^[37]. Due to the reference standard was available in our laboratory an ultimate confirmation was carried out. First,

retention time was determined to confirm the potential positive, in our case, the deviation between both retention time of standard and the samples was lower than 0.7 %. Therefore, a second step was to compare the fragmentation behavior of the sample with the reference standard by QTOF MS/MS acquisitions. As **Figure 4** shows, when selecting m/z 192 as precursor ion, the same fragments were found for reference standard and sample, as well as abundance distribution. In order to achieve a total confirmation, empirical formula for each ion were obtained from accurate mass by elemental composition calculator, obtaining error masses lower than 1.4 mDa as presented in **Table 5**. In this table a chemical structure were proposed for each empirical formula, in accordance with carbendazim structure.

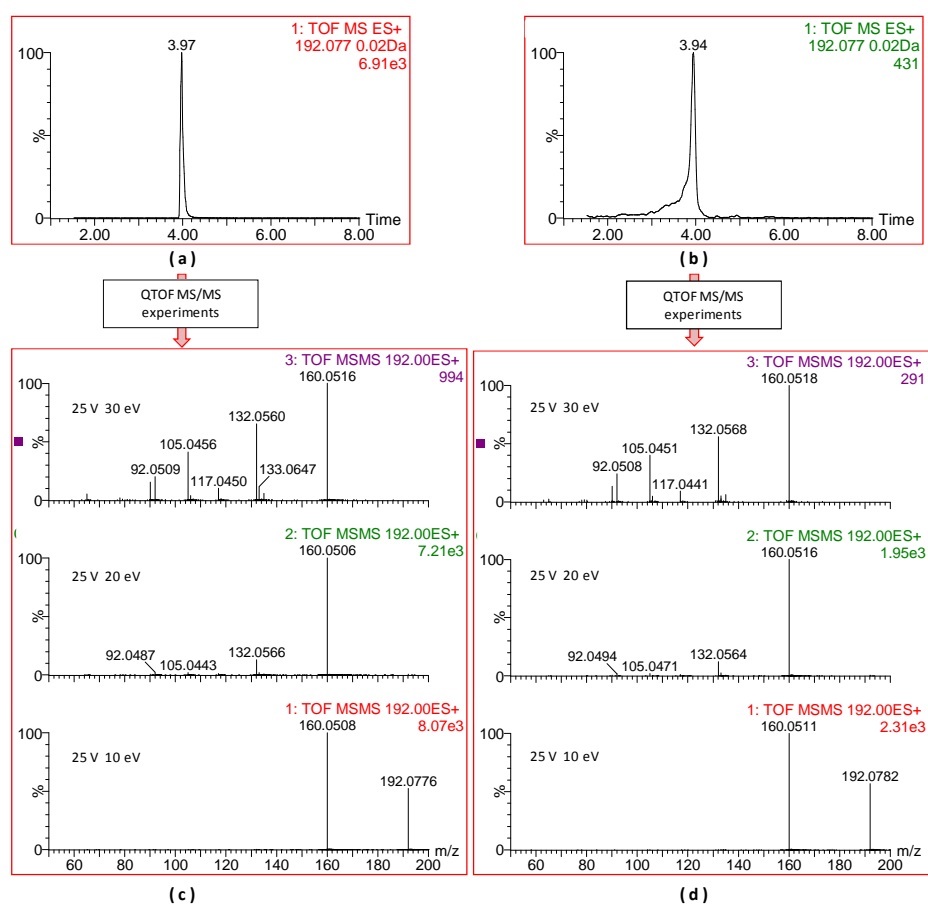


Figure 4. UHPLC-ESI-TOF (nw-XIC \pm 10 mDa) chromatograms for (a) carbendazim standard at 100 ng/mL and (b) citrus sample positive to carbendazim. Combined spectrum at different collision energies by QTOF MS/MS for carbendazim peak for (c) standard at 100 ng/mL and (d) citrus sample.

In order to test the correct operation of post-target method, pre-target analytes were also included in the list. Two potential false positive for bupropfen and hexythiazox could have been reported. In both cases unexpected retention time was found; furthermore m/z deviation in the case of hexythiazox was higher than 5 mDa. As **Figure 5a** and **5b** show, the real time of bupropfen optimized in the developed pre-target analysis was 3.71 min, while the chromatographic peak extracted by the post-target method was 2.13 min. Other potential positive obtained in post-target method was tebufenpyrad, which chemical formula ($C_{18}H_{24}ClN_3O$) presented a chlorine atom. Therefore combined spectra from the extracted chromatographic peak must present the characteristic isotope-print coming from the natural relation of chlorine isotopes ^{35}Cl and ^{37}Cl . No peak at m/z 336 for ^{37}Cl was showed (**Figure 5c** and **5d**). In addition the high m/z deviation makes it not considering as a tebufenpyrad positive.

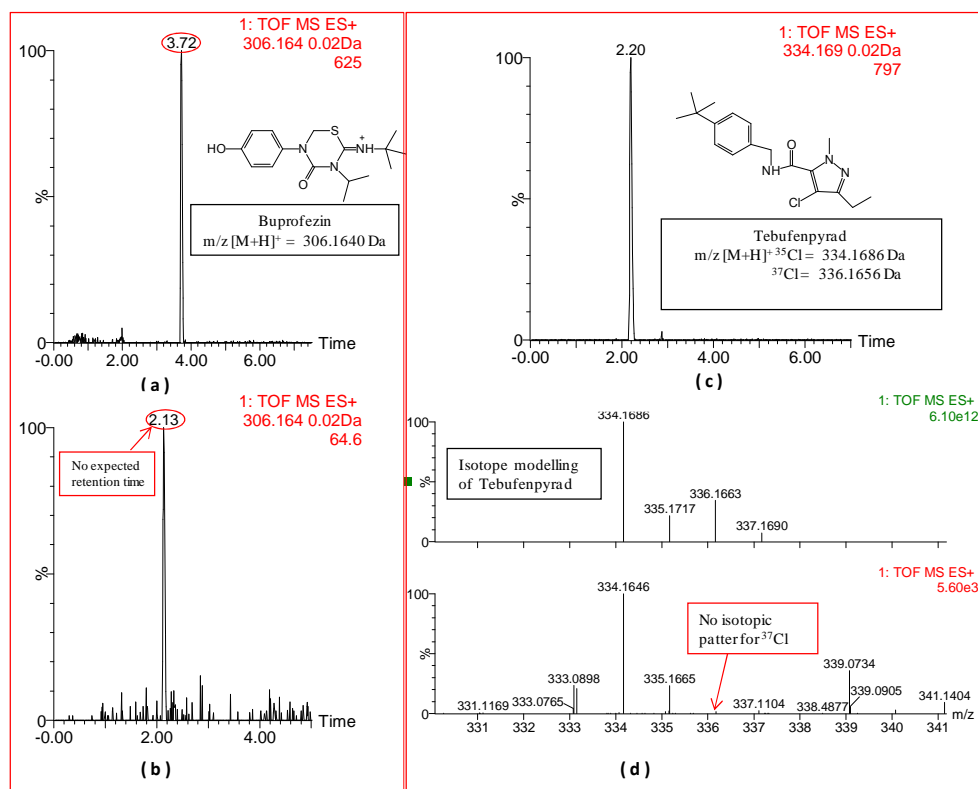


Figure 5. UHPLC-ESI-TOF (nw-XIC \pm 10 mDa) chromatograms of (a) bupropfen standard at 10 ng/mL and (b) potential orange sample positive to bupropfen. (c) UHPLC-ESI-TOF (nw-XIC \pm 10 mDa) chromatogram for potential orange peel sample positive to tebufenpyrad. (d) Theoretical mass spectrum for protonated tebufenpyrad ($C_{18}H_{25}ClN_3O$) and empirical combined spectra obtained from peak at 2.20 min.

One drawback that the post-target method may present is the presence of more than one chromatographic peak in the nw-XIC, such as the case of etoprophos in **Figure 6**. In this case, accurate mass measurement obtained by TOF could give an adequate approximation to potential positive analyte. m/z deviations of 3.3, 1.9 and 0.0 mDa were calculated for three chromatographic peaks, being the later one the more plausible. Nevertheless, the establishment of a positive or negative finding will not be possible without a reference standard.

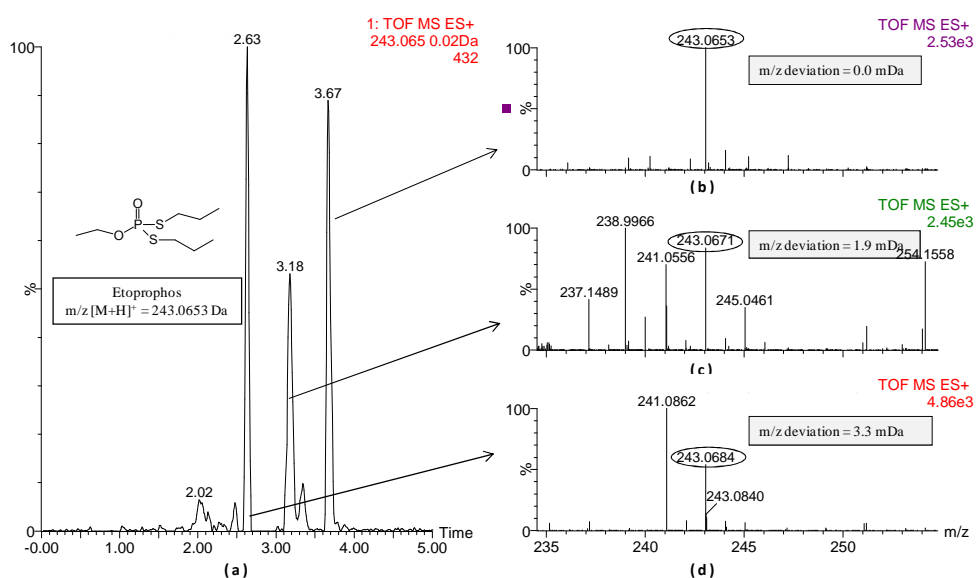


Figure 6. (a) UHPLC-ESI-TOF (nw-XIC \pm 10 mDa) chromatogram of a potential orange peel sample positive to etoprophos. Combined spectra for chromatographic peaks at (b) 3.67 min, (c) 3.18 min and (d) 2.63 min.

Another serious disadvantage of a non previous optimized target analytes appeared in a discovered peak corresponding to m/z 243.1167, which could identified as two isomeric compound, as ethiofencarb or methiocarb. Although their chemical structures are different, both of them present the same molecular weight and ionization properties, and then its ammoniated molecular ion is at the same m/z 243.1167. As a consequence, other analytical confirmative parameters must be considered in order to report a reliable identification, as a retention time or fragmentation ions. Although, as previously reported in literature^[38] different fragment ions could be selected for each pesticide (107 and 169 for ethiofencarb and methiocarb, respectively), no fragmentation peak correspondent of one of

those analytes was found in the combined spectrum, probably due to the low in-source fragmentation and/or sensitivity. Therefore, injection of reference standard of methiocarb and/or ethiofencarb might be the best way to confirm one of them, due to retention time.

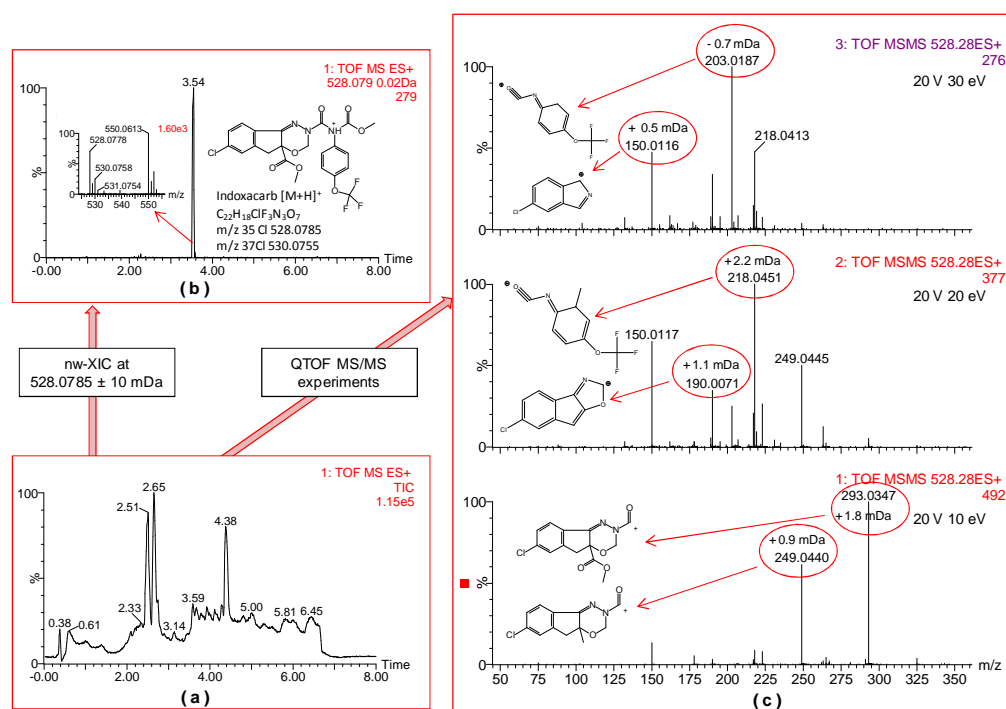


Figure 7. UHPLC-ESI-TOF chromatograms for a potential grape sample positive to indoxacarb (a) TIC and (b) nw-XIC of ± 10 mDa and combined mass spectra for peak at 3.54 min. (c) Combined product ion spectra obtained by QTOF MS/MS at different collision energies. Mass errors and proposed chemical structures are attached to major product ions.

However, an alternative when reference standards are not commercially available is illustrated by a potential positive to indoxacarb in grape sample. A peak at 3.54 min was automatically extracted from the total ion chromatogram (TIC) using ChromatoLynx software by generating a nw-XIC at m/z ion of $[M+H]^+$ 528.0785 (Figure 7a and 7b). Due to indoxacarb presented a chlorine atom in its molecular formula, the first approach was to check the isotopic distribution as well as the exact mass deviation, which fits satisfactorily with its isotope model and presented mass deviations of 0.7 and 0.3 mDa for ^{35}Cl and ^{37}Cl , respectively. In addition, the same isotopic distribution appeared at a m/z 21.9827 Da higher than protonated molecule, which corresponded to the sodium adduct $[M+\text{Na}]^+$

with an exact mass of 550.0613 (0.8 mDa of mass error). The availability of a QTOF instrument allowed a second step to be carried out, performing a MS/MS acquisition at different collision energies (10, 20 and 30 eV). This experiment gave us the possibility to confirm the presence of indoxacarb studying the fragmentation pathway, obtaining six accurate masses for abundant product ions. Using the elemental composition calculator, restricting to the same atoms than indoxacarb, chemical structures were proposed from the obtained empirical formula according to the indoxacarb structure, with m/z deviation lower than 2.2 mDa. Then the possibility to ensure the presence of indoxacarb was very high.

CONCLUSION

After a comprehensive comparison between three mass analyzers (QqQ, TOF and QTOF), all of them presented good capacities to work in target pesticide residue analysis. Moreover, in the case of TOF analyzer, an additional approach was also investigated, a wide multiclass pesticide screening method.

In quantitative target analysis QqQ instrument was selected as the most satisfactory followed by TOF and QTOF, based on its high sensitivity for all 11 studied analytes. In addition, although the use of DRE in TOF improves the linear dynamic range, the lower sensitivity of TOF and QTOF prevents to obtain the same range than QqQ.

For confirmation purposes QTOF instrument presented the higher number of IPs against QqQ and TOF. However, QqQ instrument presented the best robustness obtaining practically the same number of IPs for all analytes at every tested level, demonstrating its confirmative capacity at lower levels of quantification. In this scenario, TOF instrument presented some limitations, as a consequence of the difficulty to generate abundant in-source fragment ions.

In screening application, TOF resulted on the most advantageous due to its better sensitivity in full spectrum acquisition. This approach was studied using an exact mass theoretical database, obtaining several potential positives. In these cases, to confirm the positive, QTOF instrument in MS/MS mode and/or reference standards were used to support the rapid screening by TOF. Nevertheless, a reference standard should be finally acquired or synthesized for a definitely identity confirmation. Another possibility that need further evaluation is the possibility of performing simultaneous screening and confirmation of identity by TOF MS acquisitions using QTOF Premier instrument under MSE measurements (low and high collision energies acquisitions).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are very grateful to Serveis Centrals d'Instrumentació Científica (SCIC) of University Jaume I for the use of the UPLC-TQD and UPLC-QTOF Premier. This work forms part of the research Project Ref: GV06/110, developed under financial support of the Generalitat Valenciana, Spain.

REFERENCES

- [1] D. Barceló, M. Petrovic. Challenges and achievements of LC-MS in environmental analysis: 25 years on. *Trends in Analytical Chemistry* 2007, 26, 2.
 - [2] C. Soler, Y. Picó. Recent trends in liquid chromatography-tandem mass spectrometry to determine pesticides and their metabolites in food. *Trends in Analytical Chemistry*, 2007, 26, 103.
 - [3] S. Richardson. Environmental mass spectrometry: Emerging contaminants and current issues. *Analytical Chemistry*, 2008, 80, 4373.
 - [4] A.A.M. Stolker, U.A. Th. Brinkman. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals- a review. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1067, 15.
 - [5] C. Soler, K. J. James, Y. Picó. Capabilities of different liquid chromatography tandem mass spectrometry systems in determining pesticide residues in food Application to estimate their daily intake. *Journal of Chromatography A*. 2007, 1157, 73.
 - [6] C. Soler, J. Mañes, Y. Picó. Comparison of liquid chromatography using triple quadrupole and quadrupole ion trap mass analyzers to determine pesticide residues in oranges *Journal of Chromatography A*. 2005, 1067, 115.
 - [7] C. Soler, B. Hamilton, A. Furey, K.J. James, J. Mañes, Y. Picó. Comparison of four mass analyzers for determining carbosulfan and its metabolites in citrus by liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2006, 20, 2151.
 - [8] F. Hernández, J.V. Sancho, M. Ibañez, S. Grimalt. Investigation of pesticide metabolites in food and water by LC-TOF-MS *Trends in Analytical Chemistry*, 2008, 27, 862.
-

- [9] S. Grimalt, Ó.J. Pozo, J.V. Sancho, F. Hernández. Use of Liquid Chromatography Coupled to Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry To Investigate Pesticide Residues in Fruits. *Analytical Chemistry*, 2007, 79, 2833.
- [10] F. Hernández, S. Grimalt, O.J. Pozo, J.V. Sancho. Use of ultra-high-pressure liquid chromatography-quadrupole time-of-flight MS to discover the presence of pesticide metabolites in food samples. *Journal of Separation Science*, 2009, 32, 2245.
- [11] T. Pihlström, G. Blomkvist, P. Friman, U. Pagard, B.-G. Österdahl. Analysis of pesticide residues in fruit and vegetables with ethyl acetate extraction using gas and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, 389, 1773.
- [12] P. Payá, M. Anastassiades, D. Mack, I. Sigalova, B. Tasdelen, J. Oliva, A. Barba. Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, 389, 1697.
- [13] M. Hiemstra, A. de Kok. Comprehensive multi-residue method for the target analysis of pesticides in crops using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1154, 3.
- [14] C. L. Hetherington, M. D. Sykes, R. J. Fussell, D. M. Goodall. A multi-residue screening method for the determination of 73 pesticides and metabolites in fruit and vegetables using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2004, 18, 2443.
- [15] D. Ortelli, P. Edder, C. Corvi. Multiresidue analysis of 74 pesticides in fruits and vegetables by liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 2004, 520, 33.
- [16] A. Garrido Frenich, J.L. Martínez Vidal, E. Pastor-Montoro, R. Romero-González. High-throughput determination of pesticide residues in food commodities by use of ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008, 390, 947.
- [17] C. C. Leandro, P. Hancock, R. J. Fussell, B. J. Keely. Ultra-performance liquid chromatography for the determination of pesticide
-

- residues in foods by tandem quadrupole mass spectrometry with polarity switching. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1144, 161.
- [18] O.J. Pozo, M. Barreda, J.V. Sancho, F. Hernández, J. Llibería, M.A. Cortés, B. Bagó. Multiresidue pesticide analysis of fruits by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, 389, 1765.
- [19] I. Ferrer, E. M. Thurman, J. A. Zweigenbaum. Screening and confirmation of 100 pesticides in food samples by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications Mass Spectrometry*, 2007, 21, 3869.
- [20] I. Ferrer, J. F. García-Reyes, A. R. Fernández-Alba. Identification and quantitation of pesticides in vegetables by liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Trends in Analytical Chemistry*, 2005, 24, 671.
- [21] C. Lesueur, P. Knittl, M. Gartner, A. Mentler, M. Fuerhacker. Analysis of 140 pesticides from conventional farming foodstuff samples after extraction with the modified QuEChERS method. *Food Control*, 2008, 19, 906.
- [22] J. Zrostlíková, J. Hajšlová, T. Kovalczuk, R. Štápán, J. Poustka. Determination of 17 polar/thermolabile pesticides in apples and apricots by LC/MS. *Journal of AOAC International*, 2003, 86, 612.
- [23] C. Blasco, G. Font, Y. Picó. Multiple-stage mass spectrometric analysis of six pesticides in oranges by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1043, 231.
- [24] C. Blasco, G. Font, Y. Picó. Analysis of pesticides in fruits by pressurized liquid extraction and liquid chromatography – ion trap – triple stage mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1098, 37.
- [25] M.J.M. Bueno, A. Agüera, M. D. Hernando, M.J. Amadeo, A. R. Fernández-Alba. Evaluation of various liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry operation modes applied to the analysis of organic pollutants in wastewaters. *Analytical and Journal of Chromatography A*, 2009, 1216, 5995.
- [26] J. F. García-Reyes, M. D. Hernando, C. Ferrer, A. Molina-Díaz, A. R. Fernández-Alba. Large Scale Pesticide Multiresidue Methods in Food Combining Liquid Chromatography / Time-of-Flight Mass Spectrometry and Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 2007, 79, 7308.
-

- [27] I. Ferrer, E.M. Thurman. Multi-residue method for the analysis of 101 pesticides and their degradates in food and water samples by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1175, 24.
- [28] I. Ferrer, J.F. García-Reyes, M. Mezcua, E.M. Thurman, A.R. Fernández-Alba. Multi-residue pesticide analysis in fruits and vegetables by liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1082, 81.
- [29] E. M. Thurman, I. Ferrer, O. Malato, A. R. Fernández-Alba. Feasibility of LC/TOFMS and elemental database searching as a spectral library for pesticides in food. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2006; 23(11) 1169.
- [30] E. M. Thurman, I. Ferrer, J. A. Zweigenbaum, J. F. García-Reyes, M. Woodman, A. R. Fernández-Alba. Discovering metabolites of post-harvest fungicides in citrus with liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry and ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1082, 71.
- [31] European Commission, Document SANCO/10232/2006, 31 October 2007.
- [32] European Commission, Decision 2002/657/EC, 31 October 2007.
- [33] F. Hernández, M. Ibáñez, J.V. Sancho, Ó.J. Pozo Comparison of Different Mass Spectrometric Techniques Combined with Liquid Chromatography for Confirmation of Pesticides in Environmental Water Based on the Use of Identification Points. *Analytical Chemistry*, 2004, 76, 4349.
- [34] M. Ibañez, C. Guerrero, J.V. Sancho, F. Hernández Screening of antibiotics in surface and wastewater samples by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216, 2529.
- [35] T. Portolés, E. Pitarch, F.J. López, J.V. Sancho, F. Hernández Methodical approach for the use of GC-TOF MS for screening and confirmation of organic pollutants in environmental water. *Journal of Mass Spectrometry*, 2007, 42, 1175.
- [36] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng. Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS *Analytical Chemistry* 2003, 75, 3019.
-

-
- [37] J. M. Marín, E. Gracia-Lor, J. V. Sancho, F. J. López, F. Hernández. Application of ultra-high-pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry to the determination of multi-class pesticides in environmental and wastewater samples Study of matrix effects. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216, 1410.
- [38] F. Hernández, O.J. Pozo, J.V. Sancho, L. Bijlsma, M. Barreda, E. Pitarch. Multiresidue liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of 52 non gas chromatography-amenable pesticides and metabolites in different food commodities. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1109, 242.
-

Comprehensive comparative of quantification and confirmation capabilities of UHPLC coupled to triple quadrupole and hybrid quadrupole time of flight mass spectrometry analyzers in pesticide residue analysis

S. Grimalt, J.V. Sancho, O.J. Pozo, F. Hernández

Supplementary Information

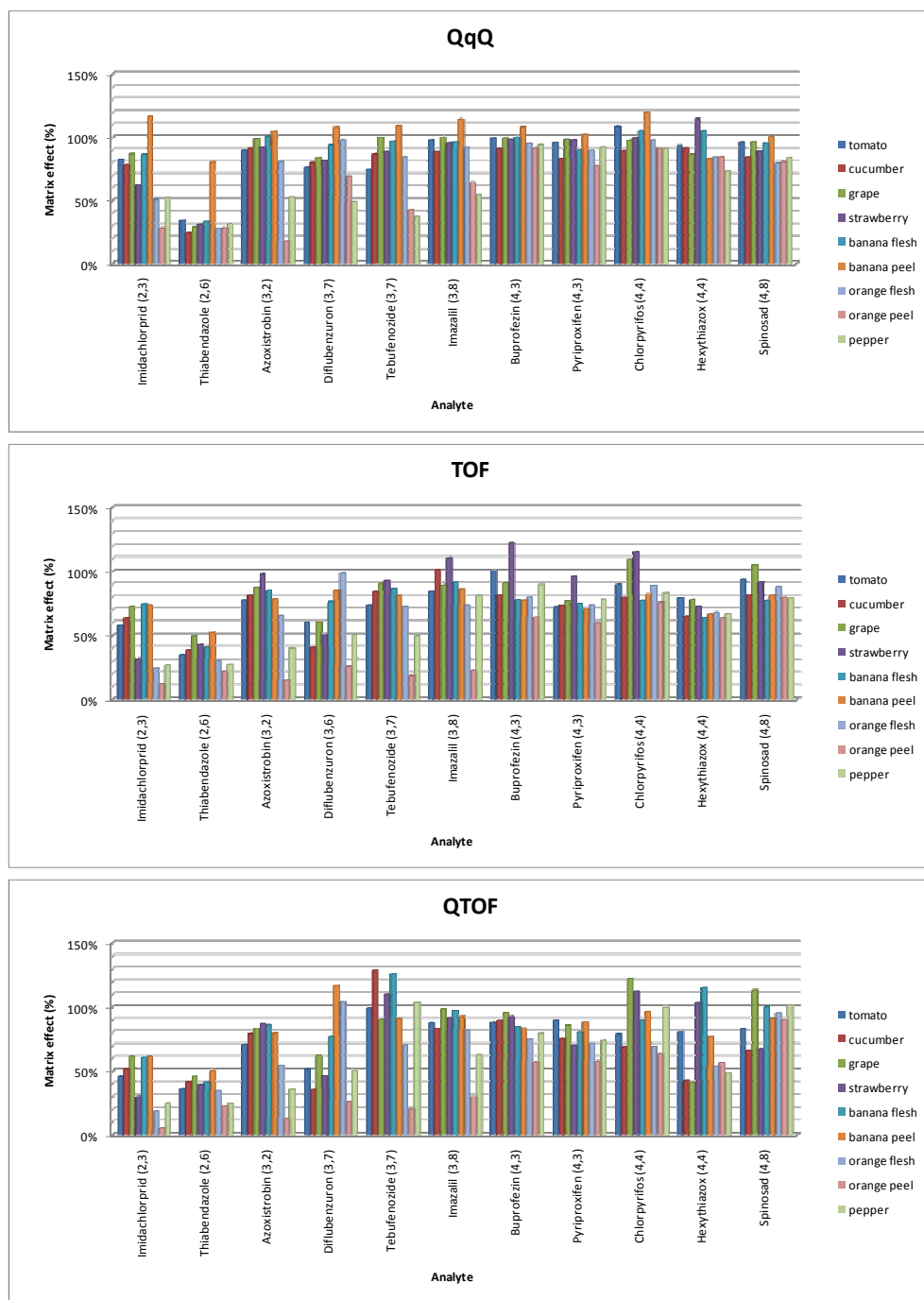


Figure 1. Matrix effects in QqQ, TOF and QTOF analysis for all analyte/matrix combination. Matrix effect resulted in ionization enhancement (values > 100%) or ionization suppression (values < 100%).

Table 1: Confirmative parameters to evaluation of the three analyzers (QqQ, TOF and QTOF). Analytes not included in Table 3 of the article. Ion ratio and limit of confirmation (LOC) values were obtained as an average of every mean values of each matrix. ⁽¹⁾ Precursor ion mass selected in the QTOF analyzer.

Analyte	QqQ				TOF					QTOF						
	MS/MS Transition	Ion ratio (Deviation (%))	LOC (µg/kg)	IPs	Theoretical m/z	Ion ratio (Deviation (%))	m/z deviation (mDa)	LOC (µg/kg)	IPs	Theoretical m/z	Ion ratio (Deviation (%))	m/z deviation (mDa)	LOC (µg/kg)	IPs		
Azoxystrobin	372>329	-	-	2.5	372.0984	-	1.0	-	2.0	372.0984	-	2.2	-	2.0		
	372>344	1.4 (3)	0.6	1.5	344.0986	2.1 (18)	1.7	2.0	2.0	329.0800	3.3 (6)	2.0	4.2	2.5		
	404>372	1.5 (3)	0.7	2.5	329.0787	2.7 (20)	3.1	8.0	1.5	344.1035	4.2 (9)	1.9	11.5	2.5		
	372>172	1.9 (3)	0.7	1.5	404.1246	9.7 (5)	2.2	12.8	1.5	172.0358	12.2 (42)	1.8	88.9	2.5		
	372>156	3.4 (4)	0.8	1.5	172.0358	47.4 (11)	2.5	30.0	1.5	404.1246 ⁽¹⁾	11.0 (41)	3.2	90.2	1.5		
	Total IPs				9.5	Total IPs					8.5	Total IPs				
Hexythiazox	353>228	-	-	2.5	228.0250	-	0.6	-	2.0	228.0250	-	2.6	-	2.0		
	353>168	1.1 (9)	1.8	1.5	168.0580	1.3 (6)	0.8	15.0	2.0	168.0580	1.3 (6)	2.7	12.5	2.0		
	353>116	2.0 (14)	3.5	1.5	353.1091	3.5 (12)	0.7	30.3	2.0	353.1091 ⁽¹⁾	3.7 (14)	2.2	79.2	1.5		
	353>151	3.9 (10)	4.0	1.5	271.0308	3.7 (14)	2.7	42.2	1.5	271.0308	8.4 (21)	1.9	133.3	2.5		
	353>271	4.3 (11)	5.8	1.5	151.0315	6.2 (28)	3.2	86.4	1.5	151.0315	8.5 (46)	3.9	171.9	2.0		
Total IPs				8.5	Total IPs					9.0	Total IPs					10.0
Imidachlorprid	256>175	-	-	2.5	175.0984	-	1.8	-	2.0	209.0594	-	1.4	-	2.5		
	256>209	1.3 (6)	3.6	1.5	209.0594	2.2 (27)	1.8	50.0	2.0	175.0984	1.2 (13)	2.6	32.2	2.0		
	256>210	2.9 (9)	8.5	1.5	256.0601	6.5 (14)	1.9	105.5	2.0	256.0601 ⁽¹⁾	4.2 (35)	2.4	79.7	1.5		
	256>84	4.3 (16)	13.1	1.5	-	-	-	-	-	210.0672	5.5 (36)	1.9	194.4	2.5		
	256>128	8.4 (9)	55.6	1.5	-	-	-	-	-	128.0267	23.5 (52)	2.7	229.2	2.0		
Total IPs				8.5	Total IPs					6.0	Total IPs					10.5

Pyriproxyfen	322>96	-	-	2.5	96.0449	-	0.8	-	2.0	96.0449	-	0.5	-	2.5
	322>78	4.0 (3)	1.4	1.5	322.1443	2.2 (24)	2.8	4.7	1.5	322.1443 ⁽¹⁾	3.1 (7)	2.5	12.8	1.5
	322>77	4.4 (3)	1.4	1.5	185.0603	2.1 (4)	2.3	6.6	1.5	185.0603	5.7 (25)	2.2	38.1	2.0
	322>227	5.3 (3)	1.4	1.5	227.1072	2.9 (3)	2.2	19.4	1.5	227.1072	8.6 (22)	2.5	46.9	2.0
	322>185	5.6 (5)	1.5	1.5	-	-	-	-	-	77.0391	30.3 (57)	2.1	112.5	2.0
Total IPs				8.5	Total IPs				6.5	Total IPs				10.0
Tebufenozide	297>133	-	-	2.5	297.1603	-	1.9	-	2.0	133.0653	-	2.0	-	2.5
	353>133	1.6 (6)	1.5	2.5	133.0653	2.6 (6)	1.8	17.5	2.0	297.1603	4.8 (10)	3.0	30.9	2.0
	297>105	2.5 (3)	1.5	1.5	353.2229	nd	nd	nd	-	105.0720	14.1 (41)	2.3	68.8	2.0
	353>297	3.2 (7)	1.8	1.5	-	-	-	-	-	353.2229 ⁽¹⁾	nd	-	-	-
	353>105	3.6 (10)	1.8	1.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total IPs				9.5	Total IPs				4.0	Total IPs				6.5
Thiabendazole	202>175	-	-	2.5	202.0439	-	1.8	-	2.0	202.0439 ⁽¹⁾	-	1.3	-	2.0
	202>131	1.8 (7)	0.9	1.5	175.0330	4.8 (12)	1.5	41	2.0	175.0330	3.8 (17)	1.1	45.3	2.5
	202>65	2.4 (8)	1.2	1.5	131.0609	30 (48)	1.3	140	2.0	131.0609	7.7 (20)	1.6	70.3	2.5
	202>92	4.4 (7)	3.7	1.5	-	-	-	-	-	92.0500	60.6 (30)	2.8	153.6	2.0
	202>104	13.7 (14)	6.9	1.5	-	-	-	-	-	104.0500	206.3 (21)	2.3	150.0	2.0
Total IPs				8.5	Total IPs				6.0	Total IPs				11.0

Table 2: Confirmation data obtained for real samples analysis. This table shows IPs collection for real samples indicated in Table 4 of the article.

	QqQ				TOF				QTOF					
	Quantification		Confirmation		Quantification		Confirmation		Quantification		Confirmation			
	(mg/kg)	MS/MS transition	Ion ratio deviation (%)	IPs	(mg/kg)	Theoretical m/z	Ion ratio deviation (%)	m/z deviation (mDa)	IPs	(mg/kg)	Theoretical m/z	Ion ratio deviation (%)	m/z deviation (mDa)	IPs
Chlorpyrifos Banana peel	0.601	350>97	-	2.5	0.655	197.9280	-	0.6	2.0	0.405	197.9280	-	0.0	2.5
		350>198	18	1.5		199.9251	1	0.1	2.0		96.9513	4	1.8	2.5
		350>125	3	1.5		351.9312	5	1.2	2.0		124.9826	11	2.3	2.0
		350>153	15	1.5		349.9341	5	0.7	2.0		321.9028	18	1.7	2.5
		350>322	8	1.5		321.9028	5	0.5	2.0		153.0139	18	2.6	2.0
		Total IPs	8.5		Total IPs	10.0		Total IPs	11.5					
Imidachlorprid Red Pepper	0.324	256>175	-	2.5	0.488	175.0984	-	0.7	2.0	0.339	209.0594	-	1.6	2.5
		256>209	6	1.5		209.0594	15	1.4	2.0		175.0984	7	0.3	2.5
		256>210	7	1.5		256.0601	21	0.1	2.0		256.0601	10	1.5	2.0
		256>84	2	1.5		-	-	-	-		210.0672	3	2.5	2.0
		256>128	1	1.5		-	-	-	-		128.0267	44	0.1	2.5
		Total IPs	8.5		Total IPs	6.0		Total IPs	11.5					
Buprofezin Tomato	0.057	306>201	-	2.5	0.065	306.1640	-	2.8	1.5	0.072	201.1062	-	0.5	2.5
		201>57	16	2.5		201.1062	2	0.5	2.0		106.0657	7	0.6	2.5
		306>57	9	1.5		106.0657	12	0.5	2.0		306.1640	8	3.0	1.5
		306>106	5	1.5		-	-	-	-		145.0436	33	1.6	2.5
		306>116	18	1.5		-	-	-	-		86.0606	9	0.1	2.5
		Total IPs	9.5		Total IPs	5.5		Total IPs	11.5					
Pyriproxyfen Green Pepper	0.050	322>96	-	2.5	0.052	96.0449	-	0.3	2.0	0.040	96.0449	-	1.1	2.5
		322>78	6	1.5		322.1443	6	0.8	2.0		322.1443	15	1.1	2.0
		322>77	21	1.5		227.1072	28	7.1	-		185.0603	20	0.1	2.5
		322>227	4	1.5		185.0603	73	11.8	-		227.1072	9	0.1	2.5
		322>185	4	1.5		-	-	-	-		77.0391	24	3.0	2.0
		Total IPs	8.5		Total IPs	4.0		Total IPs	11.5					

Azpoxystrobin Grape	0.025	372>329	-	2.5	0.025	372.0984	-	2.2	1.5	0.020	372.0984	-	3.4	2.0
		372>344	11	1.5		344.0986	1	2.8	1.5		329.0800	4	1.2	2.5
		404>372	11	2.5		329.0800	4	1.3	2.0		344.1035	10	0.5	2.5
		372>172	3	1.5		404.1246	0	0.3	2.0		172.0358	29	0.3	2.0
		372>156	10	1.5		172.0358	27	4.8	-		404.1246	11	4.3	1.5
		Total IPs		9.5			Total IPs		7.0			Total IPs		10.5
Hexythiazox Grape	0.026	353>228	-	2.5	0.024	228.0250	-	0.7	2.0	0.025	228.0250	-	2.2	2.0
		353>168	4	1.5		271.0308	8	1.6	2.0		168.0580	13	6.1	1.5
		353>116	1	1.5		168.0580	20	0.3	2.0		353.1091	-	-	-
		353>151	11	1.5		353.1091	20	2.7	1.5		271.0308	-	-	-
		353>271	17	1.5		151.0315	-	-	-		151.0315	-	-	-
		Total IPs		8.5			Total IPs		7.5			Total IPs		3.5
Thiabendazol Orange peel	0.013	202>175	-	2.5	0.012	202.0439	-	0.2	2	0.015	202.0439	-	2.1	1.5
		202>131	22	1.5		175.0330	-	-	-		175.0330	2	0.1	2.5
		202>65	5	1.5		131.0609	-	-	-		131.0609	11	1.1	2.5
		202>92	25	1.5		-	-	-	-		92.0500	9	1.7	2.5
		202>104	4	1.5		-	-	-	-		104.0500	-	-	-
		Total IPs		8.5			Total IPs		2.0			Total IPs		9.0
Azpoxystrobin Orange peel	0.009	372>329	-	2.5	0.011	372.0984	-	3.8	1.5	-	372.0984	-	-	-
		372>344	19	1.5		344.0986	1	0.6	2.0		329.0800	-	-	-
		404>372	18	2.5		329.0800	-	-	-		344.1035	-	-	-
		372>172	50	-		404.1246	-	-	-		172.0358	-	-	-
		372>156	44	-		172.0358	-	-	-		404.1246	-	-	-
		Total IPs		6.5			Total IPs		3.5			Total IPs		-
Chlorpyrifos Tomato	0.005	350>97	-	2.5	-	197.9280	-	-	-	-	197.9280	-	-	-
		350>198	20	1.5		199.9251	-	-	-		96.9513	-	-	-
		350>125	42	-		351.9312	-	-	-		124.9826	-	-	-
		350>153	69	-		349.9341	-	-	-		321.9028	-	-	-
		350>322	36	-		321.9028	-	-	-		153.0139	-	-	-
		Total IPs		4.0			Total IPs		-			Total IPs		-

Table 3: List of 423 pesticides and transformation products searched by ChromaLynx during screening method by TOF MS in real samples.

Analyte	Formula
1-Naphtalene acetamide	C12H11NO
1-Naphthaleneacetic acid	C12H10O2
2,4,5-T	C8H5Cl3O3
2,4,5-T Isopropyl ester	C11H11Cl3O3
2,4-D	C8H6Cl2O3
2,4-D Butyl ester	C12H14O3Cl2
2,4-D isopropyl ester	C11H12Cl2O3
2,4-D methyl ester	C9H8Cl2O3
2-aminobenzimidazol	C7H5N2O
2-hydroxy-simazine	C7H13N5O
2-hydroxy-terbutylazine	C9H17N5O
2-Naphtoxyacetic acid	C12H10O3
2-phenoxypropionic acid	C9H10O3
3,4,5-trimethacarb	C11N15NO2
3,4-Dichloraniline	C6H5Cl2N
3-hydroxy carbofuran	C12H15NO4
5-hydroxy-imidacloprid	C9H10ClN5O3
5-OH-clethodim-sulfon	C17H26NO6SCI
6-chloro-4-hydroxy-3-phenyl-pyridazin	C10H7N2OCl
8-hydroxyquinoline	C9H7NO
Acephate	C4H10NO3PS
Acetamidrid	C10H11N4Cl
Acetate	C13H12O2
Acetochlor	C14H20ClNO2
Acibenzolar-S-methyl	C8H6N2OS2
Aclonifen	C12H9ClN2O3
Acrinathrin	C26H21F6NO5
Alachlor	C14H20ClNO2
Aldicarb	C7H14N2O2S
Aldicarb sulfoxide	C7H14N2O3S
Aldicarb sulphone	C7H14N2O4S
Aldoxicarb	C7H14N2O4S
Aldoxicarb (NH4)	C7H17N3O4S
Ametryn	C9H17N5S
Amidosulfuron	C9H15N5O7S2
Amidosulfuron (Na)	C9H14N5O7S2Na
Aminocarb	C11H16N2O2
Amitraz	C19H23N3
Anilazine	C9H5N4Cl3
ANTU	C11H10N2S
Atrazine	C8H14N5Cl
Avermectin B1a	C48H72O14
Avermectin B1b	C47H70O14
Azamethiphos	C9H10N2O5PSCI
Azinphos-ethyl	C12H16N3O3PS2
Azinphos-methyl	C10H12N3O3PS2
Azoxystrobin	C22H17N3O5
Benalaxyl	C20H23NO3
Bendiocarb	C11H13NO4
Bendiocarb (NH4)	C11H16N2O4
Benfuracarb	C20H30N2O5S
Bensulfuron-methyl	C16H18N4O7S
Benzoximate	C18H18ClNO5
Bifenox	C14H9NO5Cl2
Bitertanol	C20H23N3O2
Bromacil	C9H13BrN2O2
Bromoxynil	C7H3Br2NO
Bromuconazole	C13H12N3OCl2Br
Bupirimate	C13H24N4O3S
Buprofezin	C16H23N3OS
Butocarboxym	C7H14N2O2S
Butocarboxym (Na)	C7H13N2O2SNa
Butoxycarboxim-sulfoxid (FC)	C7H14N2O3S
butoxycarboxym	C7H14N2O4S
butoxycarboxym (NH4)	C7H13N3O4S
Buturon	C12H13ClN2O
Captan	C9H8NO2SCl3
Carbaryl	C12H11NO2
Carbaryl (NH4)	C12H14N2O2
Carbendazim	C9H9N3O2
Carbetamide	C12H16N2O3
Carbofuran	C12H15NO3
Carbofuran-3-OH	C12H15NO4
Carbofuran-3-OH (NH4)	C12H18N2O4
Carbosulfan	C20H32N2O3S
Carboxin	C12H13NO2S
Chlorbromuron	C9H10N2O2BrCl
Chlorfenvinphos	C12H14Cl3O4P
Chlorfenvinphos-Met	C10H10Cl3O4P
Chlorfluzuron	C20H9Cl3F5N3O3
Chloridazon	C10H8N3OCl
Chlorophenoxyacetic acid	C8H7ClO3
Chloropicrin	CCl3NO2
Chlorotoluron	C10H13ClN2O
Chloroxuron	C15H15ClN2O2
Chlorpropham	C10H12ClNO2
Chlorsulfuron	C12H12N5O4SCI
Chlorsulfuron (NH4)	C12H15N6O4SCI
Cinosulfuron	C15H19N5O7S
Clethodim	C17H26NO3SCI
Clethodim-imin-sulfon	C14H23NO4S
Clethodim-imin-sulfoxide	C14H23NO3S
Clethodim-sulfon	C17H26NO5SCI
Clethodim-sulfoxid	C17H26NO4SCI
Clodinafop-propargyl	C17H13ClFNO4
Clofentezine	C14H8Cl2N4
Clomazone	C12H14ClNO2
Clopyralid	C6H3Cl2NO2
Cloquintocet-mexyl	C18H22ClNO3
Clorpyrifos	C9H11Cl3NO3PS
Clorpyrifos-methyl	C7H7Cl3NO3PS
Coroxon	C9H10N2O2BrCl
Coumaphos	C14H16ClO5PS
Cyanazine	C9H13ClN6
Cyanazine acid	C9H14ClN5O2

Cyanazine amide	C9H15N6OCI
Cyanofenphos	C15H14NO2PS
Cyanofenphos oxygen	C15H14NO3P
Cycloate	C11H21NOS
cycloheximide	C15H23NO4
Cyfluthrin	C22H18Cl2FNO3
Cymoxanil	C7H10N4O3
Cyprodinil	C14H15N3
Cyromazine	C6H10N6
Dacthal	C10H6Cl4O4
Daminozide	C6H12N2O3
Dazomet	C5H10N2S2
DDVP (dichlorvos)	C4H7Cl2O4P
DDVP (dichlorvos) (NH4)	C4H10Cl2O4PN
Deethyl ametryn	C7H13N5S
Deethyl cyanazine	C7H9ClN6
Deethyl cyanazine acid	C7H10N5O2Cl
Deethyl cyanazine amide	C7H11N6OCI
Deethyl terbuthylazine	C7H12N5Cl
Deethylatrazine	C6H10N5Cl
Deethylhydroxyatrazine	C6H11N5O
Deethylsymetrine	C6H11N5S
Deethylterbumeton	C8H15N5O
Deethylterbutryn	C8H15N5S
Deisopropylatrazine	C5H8N5Cl
Deisopropylprometryne	C7H13N5S
Deltamethrin	C22H19NO3Br2
Demethon-S-methyl	C6H15O3PS2
Demethon-S-methyl sulfon	C6H15O5PS2
Demethon-S-methyl sulfon (NH4)	C6H18O5PS2N
Demethyl fluometuron	C9H9F3N2O
Demethyl isoproturon	C11H16N2O
Demethyl monuron	C8H9ClN2O
Desmedipham	C16H16N2O4
Desmedipham (NH4)	C16H19N3O4
Desmethylpirimicarb	C10H16N4O2
Dialifos	C14H17ClNO4PS2
Diallate	C10H17Cl2NOS
Diazinon	C12H21N2O3PS
Dichlofluanid	C9H11Cl2FN2O2S2
Dichlone	C10H4Cl2O2
Dichlorprop	C9H8Cl2O3
Diclobutrazol	C15H19Cl2N3O
Diclofop-methyl	C16H14Cl2O4
Dicrotophos	C8H16NO5P
Dicryl	C10H9Cl2NO
Dieldrin	C12H8Cl6O
Diethofencarb	C14H21NO4
Difenoconazole	C19H17Cl2N3O3
Difenoxuron	C16H18N2O3
Diflubenzuron	C14H9ClF2N2O2
Diflubenzuron (Na)	C14H8ClF2N2O2Na
Diflufenican	C19H11F5N2O2
Diflulfoton	C8H19O2PS3
Dimefuron	C15H19ClN4O3
Dimethachlor	C13H18NO2Cl
Dimethoate	C5H12NO3PS2
Dimethomorph	C21H22NO4Cl

Diniconazole	C15H17Cl2N3O
Dinocap	C18H24N2O6
Diphacinone	C23H16O3
Diphenylamine	C12H11N
Diquat dibromide monohydrate	C12H14N2Br2O
Diuron	C9H10N2OCl2
Dixanthogen	C6H10O2S4
Dodemorph	C18H35NO
Dodine	C15H33N3O2
Endrin	C12H8Cl6O
EPN	C14H14NO4PS
Epoxiconazole	C17H13ClFN3O
EPTC	C9H19NOS
Ethephon	C2H6ClO3P
Ethiofencarb	C11H15NO2S
Ethiofencarb (NH4)	C11H18N2O2S
Ethiofencarbsulfon	C11H15NO4S
Ethiofencarbsulfon (NH4)	C11H18N2O4S
Ethion	C9H22O4P2S4
Ethofenprox	C25H28O3
Ethofumesate	C13H18O5S
Ethoprophos	C8H19O2PS2
Etrifos	C10H17N2O4PS
Famoxadone	C22H18N2O4
Fenamiphos	C13H22NO3PS
Fenarimol	C17H12Cl2N2O
Fenazaquin	C20H22N2O
Fenbuconazole	C19H17N4Cl
Fenfuram	C12H11NO2
Fenhexamid	C14H17Cl2NO2
Fenoxaprop-ethyl	C18H16NO5Cl
Fenoxycarb	C17H19NO4
Fenpiclonil	C11H6Cl2N2
Fenpropathrin	C22H23NO3
Fenpropidin	C19H31N
Fenpropimorph	C20H33NO
Fenpyroximate	C24H27N3O4
Fensulfothion	C11H17O4PS2
Fenthion	C10H15O3PS2
Fenuron	C9H12N2O
Flamprop	C16H13NO3FCl
Flamprop isopropyl	C19H19ClFNO3
Flamprop methyl	C17H15ClFNO3
Flazasulfuron	C13H12N5O5SF3
Florasulam	C12H8F3N5O3S
Fluazifop acid	C15H12F3NO4
Fluazifop-P-butyl	C19H20F3NO4
Flucythrinate	C26H23F2NO4
Fludioxonil	C12H6F2N2O2
Flufenacet	C14H13F4N3O2S
Flufenoxuron	C21H11ClF6N2O3
Flufenoxuron (Na)	C21H11ClF6N2O3Na
Fluometuron	C10H11F3N2O
Fluquinconazole	C16H8Cl2FN5O
Fluridone	C19H14F3NO
Fluroxypyr	C7H5Cl2FN2O3
Flurtamone	C18H14F3NO2
Flusilazole	C16H15N3F2Si
Flutriafol	C16H13F2N3O

Folpet	C9H4Cl3NO2S	Mevinphos 1	C7H13O6P
Fosthiazate	C9H18NO3PS2	Mevinphos 2	C7H13O6P
Fuberidazole	C11H8N2O	Molinate	C9H17NOS
Furathiocarb	C18H26N2O5S	Monocrotophos	C7H14NO5P
Gibberellic acid	C19H24O6	Monocrotophos (NH4)	C7H17N2O5P
Haloxifop	C15H11ClF3NO4	Monolinuron	C9H11ClN2O2
Haloxifop-ethoxyethyl	C19H19ClF3NO5	Monuron	C9H11ClN2O
Haloxifop-ethoxyethyl (Na)	C19H18ClF3NO5Na	Myclobutanil	C15H17N4Cl
Haloxifop-ethoxyethyl ester	C19H19ClF3NO4	Naled	C4H7Br2Cl2O4P
Haloxifop-etotyl	C19H19ClF3NO5	Napropamide	C17H21NO2
Haloxifop-methyl	C16H13ClF3NO4	Neburon	C12H16Cl2N2O
Haloxifop-methyl (NH4)	C16H16ClF3N2O4	Nicosulfuron	C15H18N6O6S
Heptenophos	C9H12ClO4P	Nicotine	C10H14N2
Hexaconazole	C14H17Cl2N3O	N-m-Tolylphthalamic acid	C15H13NO3
Hexazinone	C12H20N4O2	Nuarimol	C17H12FN2OCl
Hexythiazox	C17H21ClN2O2S	Ofurace	C14H16ClNO3
Hormodin	C12H13NO2	Omethoate	C5H12NO4PS
Hydroxy atrazine	C8H15N5O	Oxamide	C15H15N2O3Cl
Imazalil	C14H14Cl2N2O	Oxamyl	C7H13N3O3S
Imazameth	C14H17N3O3	Oxamyl (NH4)	C7H16N4O3S
Imazamethabenz-methyl	C16H20N2O3	Oxycarboxin	C12H13NO4S
Imidacloprid	C9H10ClN5O2	Oxydemeton-methyl	C6H15O4PS2
Indoxacarb	C22H17ClF3N3O7	Oxyfluorfen	C15H11ClF3NO4
Iprodione	C13H14Cl2N3O3	Oxygen	C11H15Cl2O3PS
Iprovalicarb	C18H28N2O3	Paclobutrazol	C15H20N3OCl
Isazofos	C19H17ClN3O3PS	Paraoxon	C10H14NO6P
Isofenphos	C15H24NO4PS	Paraoxon-methyl	C8H10NO6P
Isoproturon	C12H18N2O	Paraquat dichloride	C12H14N2Cl2
Isoxaflutole	C12H15NO4SF3	Parathion	C10H14NO5PS
Isoxathion	C13H16NO4PS	Parathion-methyl	C8H10NO5PS
Kresoxim-methyl	C18H19NO4	Pebulate	C10H21NOS
Linuron	C9H10Cl2N2O2	Penconazole	C13H15Cl2N3
Lufenuron	C17H8Cl2F8N2O3	Pencycuron	C19H21ClN2O
Malaoxon	C10H19O7PS	Pendimethalin	C13H19N3O4
Malathion	C10H19O6PS2	Penxonazole	C13H15Cl2N3
MCPA	C9H9ClO3	Phenmedipham	C16H16N2O4
MCPA methylester	C10H11ClO3	Phenoxyacetic acid	C8H8O3
Mecarbam	C10H20NO5PS2	Phenyl mercuric acetate	C8H8HgO2
Mepanipyrim	C14H13N3	Phorate	C7H17O2PS3
Merphos	C12H27PS3	Phorate oxygen analogue	C7H17O3PS2
Metalaxyl	C15H21NO4	Phorate sulfoxide	C7H17O4PS2
Metamitron	C10H10N4O	Phorate-sulfone	C7H17O5PS2
Metazachlor	C14H16N3OCl	Phosalone	C12H15NO4PS2Cl
Metconazole	C17H22N3OCl	Phosfon	C20H34Cl2P
Methabenthiuron	C10H11N3OS	Phosmet	C11H12NO4PS2
Methamidophos	C2H8NO2PS	Phosphamidon	C10H19NO5PCl
Methfuroxam	C14H15NO2	Phoxim	C12H15N2O3PS
Methiocarb	C11H15NO2S	Pirimicarb	C11H18N4O2
Methiocarb (NH4)	C11H18N2O2S	Pirimiphos ethyl	C13H24N3O3PS
Methomyl	C5H10N2O2S	Pirimiphos-methyl	C11H20N3O3PS
Methoxyfenozide	C22H28N2O3	Primisulfuron-methyl	C15H12F4N4O7S
Metidation	C6H11N2O4PS3	Prochloraz	C15H16Cl3N3O2
Metobromuron	C9H11N2O2Br	Prochloraz	C15H16N3O2Cl3
Metolachlor	C15H22ClNO2	Procymidone	C13H11Cl2NO2
Metosulam	C14H13N5O4SCl2	Profenofos	C11H15BrClO3PS
Metoxuron	C10H13ClN2O2	Promecarb	C12H17NO2
Metribuzin	C8H14N4OS	Promecarb (NH4)	C12H20N2O2
Metsulfuron	C14H15N5O6S	Prometon	C10H19N5O
		Prometryne	C10H19N5S

Propachlor	C11H14ClNO
Propamocarb	C9H20N2O2
Propanil	C9H9Cl2NO
Propargite	C19H26O4S
Propethamphos	C10H20NO4PS
Propham	C10H13NO2
Propiconazole	C15H17Cl2N3O2
propoxur	C11H15NO3
Propyzamide	C12H11NOCl2
Prosulfuron	C15H16N5O4SF3
Prosulfuron	C15H16F3N5O4S
Prothiofos	C11H15Cl2O2PS2
Pymetrozine	C10H11N5O
Pyrazophos	C14H20N3O5PS
Pyridaben	C19H25Cl2N2OS
Pyridaphenthion	C14H17N2O4PS
Pyridate	C19H23ClN2O2S
Pyrimethanil	C12H13N3
Pyriproxyfen	C20H19NO3
Quinalphos	C12H15N2O3PS
Quinmerac	C11H8ClNO2
Quinoclamine	C10H6ClNO2
Quinoxifen	C15H8FNOC12
Quizalofop-ethyl	C19H17ClN2O4
Rimsulfuron	C14H17N5O7S2
Rotenone	C23H22O6
Silvex	C9H7Cl3O3
Simazine	C7H12ClN5
Simetryn	C8H15N5S
Spinosyn A	C41H65NO10
Spinosyn D	C42H67NO10
Spiroxamine	C18H35NO2
Strychnine	C21H22N2O2
Sulfallate	C8H14ClNS2
Sulfosulfuron	C19H21N3O7S2
Sulfotep	C8H20O5P2S2
Sulprofos	C12H19O2PS3
Tebuconazole	C16H22ClN3O
Tebufenozide	C22H28N2O2
Tebufenozide (Na)	C22H27N2O2Na
Tebufenpyrad	C18H24ClN3O
Tebuthiuron	C9H16N4OS
Teflubenzuron	C14H6Cl2F4N2O2
Terbacil	C9H13ClN2O2
Terbufos	C9H21O2PS3
Terbumeton	C10H19N5O
Terbutylazine	C9H16ClN5
Terbutryn	C10H19N5S
Tetrachlorvinphos	C10H9Cl4O4P
Tetraconazole	C13H11Cl2F4N3O
Thiabendazole	C10H7N3S
Thiacloprid	C10H9ClN4S
Thiamethoxam	C8H10ClN5O3S
Thifensulfuron-methyl	C12H13N5O6S2
Thiobencarb	C12H16ClNOS
Thiodicarb	C10H18N4O4S3
Thiofanox	C9H18N2O2S
Thiofanox (Na)	C9H17N2O2SNa
Thiofanox-sulfone	C9H18N2O4S
Thiofanox-sulfone(NH4)	C9H21N3O4S
Thiofanox-sulfoxide	C9H18N2O3S

Thiofanox-sulfoxide (NH4)	C9H21N3O3S
Thiophanate-ethyl	C14H18N4O4S2
Thiophanate-methyl	C12H14N4O4S2
Thiram	C6H12N2S4
Tolclofos-methyl	C9H11Cl2O3PS
Tolyfluanid	C10H13Cl2FN2O2S2
Triadimefon	C14H16N3O2Cl
Triadimenol	C14H18N3O2Cl
Triasulfuron	C14H16ClN5O5S
Triazophos	C12H16N3O3PS
Tribenuron-methyl	C15H17N5O6S
Trichlorfon	C4H8Cl3O4P
Tricyclazole	C9H7N3S
Trietazine	C9H16ClN5
Trifloxystrobin	C20H19F3N2O4
Triflumizole	C15H15ClF3N3O
Triflumuron	C15H10ClF3N2O3
Triflumuron (Na)	C15H9ClF3N2O3Na
Trisulfuron-methyl	C17H19F3N6O6S
Trisulfuron-methyl (Na)	C17H18F3N6O6SNa
Triticonazole	C17H20N3OCl
Vamidothion	C8H18NO4PS2
Vinclozolin	C12H9Cl2NO3

Research Institute for Pesticides and
Water, University Jaume I, E-12071
Castellón, Spain

Tel: +34 964 387366, Fax: +34 964
387368

3.3.3. Discusión de los resultados

- **Experimentos MS y MS/MS**

Como primer paso, se realizó un estudio del comportamiento de cada uno de los analitos en modo MS y MS/MS mediante experiencias con instrumentos de QqQ y QTOF. En el caso del QTOF, se inyectaron patrones individuales de cada plaguicida en modo TOF MS, comprobando que, con acetato amónico como modificador en la fase móvil, el ión molecular más abundante para todos ellos era $[M+H]^+$. Después se realizaron experiencias QTOF MS/MS para obtener todos los iones producto con m/z exacta. Esta información fue de especial interés para deducir la fórmula empírica de los fragmentos y con ello la ruta de fragmentación de los plaguicidas. Obtener información sobre las rutas de fragmentación resultó muy útil para seleccionar los iones más específicos y así proporcionar una confirmación más fiable de la identidad del plaguicida, especialmente cuando se llevaba a cabo adquisiciones en SRM (QqQ).

En el diseño del método de adquisición del QqQ, se seleccionaron los iones protonados como precursores, a excepción de algunos casos en los que el compuesto presentaba una gran labilidad en la fuente de ionización, de forma que se obtenía mayor sensibilidad seleccionando iones de fragmentación en la fuente. Así, algunas transiciones utilizadas (azoxistrobin, buprofezin, diflubenzuron, spinosad y tebufenocide; *Tabla 1 del artículo científico 6*), correspondían a una adquisición pseudo-MS³. A pesar que era posible usar hasta 10 transiciones para la mayoría de los analitos en modo SRM por QqQ, se estableció como criterio, un límite de 5 transiciones (1 para cuantificación (Q), 4 para confirmación (q_1, q_2, q_3, q_4)), con las que se cumplía con creces el número de IPs exigido para confirmar su identidad.

Debido a que en TOF la adquisición de datos MS ocurre en modo *full scan* fue posible seleccionar en una sola función todos los plaguicidas con sus correspondientes iones. Para obtener la máxima información posible sobre los 11 plaguicidas, se utilizó una rampa de voltaje de cono, que permitió obtener tanto los iones moleculares como aquellos fragmentos generados a valores altos de cono en la fuente de ionización. Por su parte, a pesar de que el QTOF permite obtener un barrido de todos los iones productos en una sola adquisición, fue necesario crear una función individual para cada uno de los 11 plaguicidas, ya que se debe aislar en el cuadrupolo el correspondiente ion precursor. Para obtener un espectro equilibrado en abundancias de los iones producto se hizo uso de una rampa de energía de colisión optimizada para cada plaguicida (*Tabla 1 del artículo*

científico 6). Es interesante comentar las diferencias en la forma de pico y sensibilidad. Mientras que en TOF con una única función, a una velocidad de barrido baja (0.2 s/scan), todos los iones presentaban buena forma de pico, en QTOF se debe adquirir una función por analito obligando a adquirir menos puntos por pico, lo cual repercutió negativamente en la forma de pico, disminuyendo en algunos casos su precisión.

• **Validación de los parámetros de cuantificación**

De las experiencias anteriores, se seleccionó para la cuantificación el ion/producto más sensible en MS para el TOF y MS/MS para el QqQ y QTOF se evaluaron los diferentes parámetros de cuantificación para los tres analizadores: rango de linealidad, efecto matriz, exactitud y precisión a los niveles de concentración seleccionados (0.01, 0.05 y 0.1 mg/kg), así como LOQ y LOD, para los 11 plaguicidas en todas las matrices. Presentar toda la información conjunta resultaba complejo, e incluso dificultaba la comparativa, por lo que se decidió seleccionar una sola matriz, en concreto la fresa, cuyos resultados eran representativos para la mayor parte de las matrices.

· *Rango de Linealidad*

Se estudió la linealidad con patrones en solvente en un amplio rango de concentración, de 0.01 a 1000 ng/mL, lo que permitió evaluar la sensibilidad de cada analizador, además del orden de magnitud de su respuesta lineal.

Uno de los inconvenientes atribuidos tradicionalmente a los analizadores TOF es su bajo rango lineal, debido a que sus detectores no son capaces de asumir todos los iones que le llegan. Aún así, en algunos trabajos se han obtenido rangos de linealidad más o menos adecuados para determinados plaguicidas (Ferrer *et al.*, 2007; Grimalt *et al.*, 2007). Este inconveniente parece estar superado en la nueva generación de instrumentos TOF por la implementación de nuevas aplicaciones tecnológicas. En nuestro caso, el QTOF Premier (Waters) está provisto de una función que permite la dilución del número de iones que llegan al detector MCP de forma automática mediante el uso del DRE. Esto permitió ampliar el rango lineal, al menos en un orden más de magnitud, especialmente como ejemplo, para aquellos plaguicidas con mayor sensibilidad en la *Figura 1a del artículo científico 6*, se observa que la linealidad del imazalil en el TOF cae rápidamente a 100 ng/mL, mientras que al hacer uso del DRE se obtenía una respuesta lineal entre 0.25 ng/mL y 1000 ng/mL, alcanzando más de 3 órdenes de magnitud. En el caso del QTOF, no fue necesario el uso del DRE (2.5 a 1000 ng/mL,

Figura 1b del artículo científico 6), debido que este analizador presenta menor sensibilidad que el TOF, por la menor cantidad de iones que llegan al detector. Por último, cabe comentar que el mayor orden de magnitud en la respuesta lineal del imazalil fue para el analizador QqQ (0.01 a 100 ng/mL). El ejemplo del comportamiento lineal del imazalil se puede generalizar para el resto de analitos estudiados.

· Efecto Matriz

Uno de los parámetros más relevante para una correcta cuantificación en LC-MS es el efecto matriz. En general, se esperaba una disminución considerable de las interferencias al trabajar con MS en tándem, (QqQ y QTOF), o en alta resolución TOF MS, donde al seleccionar un XIC con una ventana muy estrecha, se minimizaría la presencia de otros componentes adquiridos en *full scan*. El efecto matriz se estudió mediante comparación de las áreas de pico para un patrón preparado en solvente y otro en matriz. El efecto matriz puede estar ligado al tipo de fuente y modo de ionización que se utiliza. En nuestro caso, se hizo uso de la misma fuente y modo de ionización (Z-spray, ESI) en los tres analizadores para evitar diferencias no asociadas al objeto principal de comparación de los mismos.

Para valorar este efecto se trabajó a dos niveles de concentración, dependiendo del instrumento, fortificando la matriz con 10 ng/mL (QqQ) y 100 ng/mL (TOF y QTOF). Esta diferencia de concentración se seleccionó para evitar posibles problemas derivados de la falta de sensibilidad en algunas de las matrices, como pimienta y piel de naranja. Tal y como se muestra en la *Figura 1 de la información suplementaria del artículo científico 6*, el efecto matriz condujo a supresión de la señal para todos los plaguicidas en las 9 matrices, siendo este efecto más acusado para los analitos que eluían al principio de la cromatografía, como es el caso del imidacloprid (2.3 min) y tiabendazol (2.6 min). Probablemente, este efecto se debiera a los componentes más polares de la matriz. El efecto matriz fue más acusado en las muestras de pimienta y piel de naranja. Se concluyó que el efecto matriz siguió el mismo patrón de comportamiento en los tres analizadores, lo que sugiere que está más relacionado con el tipo de fuente de ionización que con el analizador.

Por otro lado, resultó interesante comparar como afectaban las interferencias de la matriz dependiendo del uso de tándem MS/MS frente a MS simple de alta resolución. Como ejemplo, en la *Figura 2 del artículo científico 6*, se muestra el caso del plaguicida buprofezin en matriz de pimienta. Mientras que en MS/MS se pudieron obtener dos transiciones (Q, de cuantificación; q₁, de

confirmación de la identidad) en ambos analizadores (QqQ y QTOF), en la adquisición TOF MS no fue posible observar correctamente ninguno de los picos correspondientes a los dos iones más sensibles, a pesar de haber realizado una extracción de m/z exacta con una ventana de ± 10 mDa. Por esta razón, se realizaron XICs con ventanas más estrechas, llegando a obtener solamente una buena forma de pico al usar ± 2.5 mDa. Por tanto, para realizar una correcta cuantificación del buprofezin en pimiento mediante TOF se requeriría un error de masa máximo del orden de 2 mDa.

· *Calibrado en matriz*

Una vez estudiado el efecto matriz, se decidió hacer uso del calibrado en matriz para compensar la supresión de la ionización y lograr la correcta cuantificación de los analitos en las diferentes matrices. Se estudió la linealidad de 0.1 a 100 ng/mL, con el que se cubrían los niveles de fortificación a los que se iba a trabajar. El rango de respuesta lineal fue función de la sensibilidad para cada analito, así como del efecto matriz. Como ejemplo, se muestran los resultados obtenidos para la fresa (*Tabla 2 del artículo científico 6*). En general, el QqQ presentaba un rango de linealidad más amplio que los analizadores TOF y QTOF. Por otro lado, cabe comentar que se obtuvieron coeficientes de correlación siempre superiores a 0.995 y los residuales fueron menores del 30%, demostrando que el calibrado era adecuado para la cuantificación.

· *Exactitud y precisión: selección del límite de cuantificación (LOQ)*

Se analizaron 3 réplicas para cada nivel de concentración (0.01, 0.05 y 0.1 mg/kg) para todas las matrices. Al igual que en los casos anteriores se usaron los datos en fresa, como ejemplo ilustrativo. La *Tabla 2 del artículo científico 6* muestra que la recuperación y precisión fueron satisfactorias para los tres analizadores a los niveles de 0.1 y 0.05 mg/kg. Sin embargo, sólo para el QqQ se obtuvieron valores satisfactorios de recuperación y precisión al nivel de 0.01 mg/kg, excepto para el caso del spinosad. En este nivel, el TOF y QTOF mostraron además recuperaciones no adecuadas para el imidacloprid y tiabendazol, debido a su baja sensibilidad. De esta forma, se podía considerar como 0.01 mg/kg el LOQ objetivo en el análisis por QqQ, mientras que para el TOF y QTOF se estableció un LOQ objetivo de 0.05 mg/kg.

· *Estimación del límite de detección (LOD)*

El LOD se calculó a partir del punto más bajo del calibrado en matriz, considerando la relación señal/ruido mayor de 3. Como ejemplo ilustrativo se

muestran los resultados en la matriz de fresa (*Tabla 2 del artículo científico 6*). Los LOD más bajos fueron obtenidos para el QqQ, desde 0.04 µg/kg del tiabendazol hasta 0.7 µg/kg del imidacloprid. En el caso del TOF, los valores de LODs estimados aumentaban con respecto al QqQ, en diferentes grados dependiendo del analito. Así, el imazalil y el azoxistrobin fueron sólo dos veces más altos, mientras que para piriproxifen, hexitiazox y tiabendazole aumentaron unas 20 veces los métodos por QTOF y TOF presentaban una sensibilidad similar, aunque hay excepciones como el buprofezin (5 veces más sensible en QTOF que en TOF) o el spinosad (10 veces más sensible en TOF que en QTOF). En general, diflubenzuron y imidacloprid fueron los analitos con peor sensibilidad en los instrumentos utilizados.

Por otro lado, cabe comentar que la estimación del LOD en QTOF resultó en algunos casos problemáticos, debido a la práctica inexistencia de ruido en el cromatograma XIC. Como ejemplo, se puede observar en la *Figura 1d del artículo científico 6* la relación señal/ruido que se obtenía en el punto más bajo del calibrado para el hexitiazox en cada analizador. Mientras que para QqQ y TOF se observa un cierto ruido, en QTOF no aparece ruido de fondo. Este efecto lleva a pensar que la estimación del LOD en el QTOF quizás no sea del todo realista, de forma que para su cálculo se debería inyectar un elevado número de replicas de un patrón de forma que a partir de su desviación estándar se pudiera calcular el LOD.

• **Validación de los parámetros de confirmación**

El siguiente parámetro que se comparó entre los tres analizadores fue su capacidad confirmativa. Para ello, se procedió a la adquisición de otras transiciones o iones que posteriormente permitieran evaluar sus posibilidades confirmativas. El (Q)TOF utilizado presentaba una resolución de aproximadamente 10000 (FWHM) a m/z 556, por lo cual, en sentido estricto no se puede considerar un instrumento de HR. Sin embargo, tal y como se ha comentado en la introducción de este capítulo, se adoptaron los criterios relacionados con la exactitud de masa y no con la resolución instrumental para asignar los IPs. Por tanto, para establecer el número de IPs en cada caso se siguió el criterio que se indica en la **Tabla 3.2** de la introducción al capítulo 3.

Se calcularon relaciones de abundancia entre la transición o ión de cuantificación y los otros seleccionados para confirmación, de forma que se obtuvieron relaciones de iones (IR) como máximo para cuatro transiciones adicionales en QqQ, o cuatro iones en (Q)TOF. En este sentido, se observó que el

QqQ era capaz de proporcionar las 5 transiciones en total (1 de cuantificación + 4 de confirmación) mediante fragmentación en su celda de colisión, mientras que dependiendo de la facilidad de fragmentación del analito y la sensibilidad no fue posible alcanzar este número de iones para todos los analitos en el (Q)TOF. Basándose en su comportamiento en la fragmentación se dividieron los 11 plaguicidas en tres grupos:

- Plaguicidas que presentaban fácil fragmentación, tanto en la fuente de ionización como en la celda de colisión, donde se incluían el azoxistrobin, hexitiazox, clorpirifos e imazalil;
- plaguicidas que presentaban dificultad en la fragmentación en la fuente, pero con abundante fragmentación en la celda de colisión: buprofezin, piriproxifen, tiabendazole, diflubenzuron e imidacloprid;
- en un tercer grupo se consideraron aquellos que presentaban fragmentación poco abundante, tanto en la fuente como en la celda de colisión: spinosad y tebufenocide.

En la *Tabla 3 del artículo científico 6*, así como en la *Tabla 1 de la información suplementaria del artículo científico 6*, se muestran los valores de los IR y sus desviaciones, esta última entre paréntesis. A su vez, se calculó el límite de confirmación (*Limit of Confirmation*, LOC) de cada una de las transiciones/iones seleccionados, como el valor de concentración al cuál fué posible obtener una desviación adecuada para una satisfactoria confirmación (document SANCO/2007/3131). En el caso de medidas masa exacta, los errores de masa también se consideraron como una medida importante en la confirmación de la identidad del analito. Así, se estimaron los IPs en función de estos parámetros: desviación del IR y exactitud de masa.

Teniendo en cuenta lo comentado se compararon los tres analizadores:

· *Capacidad confirmativa del QqQ*

La alta sensibilidad que proporciona la adquisición en modo SRM del QqQ permitió las 5 transiciones establecidas como objetivo, es decir, los 4 IRs propuestos para la confirmación, valor medio de 9 IPs para los 11 plaguicidas, valor suficiente para considerar la confirmación de la identidad como muy fiable.

En general, los LOCs estimados con el primer IR para la mayor parte de los plaguicidas se encontraron entre 1-2 µg/kg, permitiendo la confirmación con 4 IPs

como mínimo a este nivel tan bajo de residuos, confirmación adecuada tanto para sustancias permitidas como prohibidas. Además, al considerar los demás IR, se observaron valores de LOCs muy estables, para varios plaguicidas. En otros casos, se producía un aumento paulatino de los LOCs conforme se iban utilizando transiciones menos sensibles, como en el spinosad, donde su último LOC era 50 veces más alto que el primero.

· *Capacidad confirmativa del TOF*

La confirmación en el TOF fue la peor de los tres analizadores estudiados, como consecuencia de la baja capacidad de los analitos a fragmentarse de forma abundante en la fuente de ionización. Por ejemplo, en el caso del buprofezin el número de IPs disminuyó hasta 5.5 con respecto a los 9.5 obtenidos en QqQ. Adicionalmente, si a la menor fragmentación en la fuente se unía una pobre ionización del analito, como fue el caso del diflubenzuron, el número de IPs disminuía drásticamente (2 IPs), siendo incluso insuficiente para una correcta confirmación de la identidad.

En general, los valores de los LOCs para el TOF fue tres veces superior a los del QqQ, sin embargo, en los peores casos la diferencia fue de hasta 100 veces (buprofezin).

· *Capacidad confirmativa del QTOF*

El analizador QTOF presentó mayor capacidad confirmativa, gracias a que la fragmentación se lleva a cabo en la celda de colisión, así como la posibilidad de trabajar con una buena exactitud de masa. Sin embargo, la menor sensibilidad del QTOF adquiriendo *full scan* de iones producto no permitió alcanzar tantos IPs como con QqQ en SRM en el caso de compuestos con baja ionización (diflubenzuron) o fragmentación (spinosad).

En cuanto a los LOCs, fueron un orden de magnitud por encima del QqQ. Esta desventaja del QTOF, hizo que el QqQ en modo de adquisición SRM se presentara como la alternativa más interesante para llevar a cabo la confirmación de analitos a los niveles más bajos de concentración ensayados.

• ***Aplicación del método de cuantificación y confirmación a muestras reales***

Una vez se validó el método de cuantificación y de confirmación en los tres analizadores, se aplicó a 44 muestras compradas en diferentes mercados, con

el objetivo de corroborar las capacidades estudiadas para cada uno. Los ejemplos de muestras positivas se indican en la *Tabla 4 del artículo científico 6*. Como se puede observar, los resultados obtenidos con cada analizador fueron semejantes, confirmando la correcta cuantificación a nivel de residuos de plaguicidas, incluso en algunos casos por debajo del LOQ objetivo (positivos azoxistrobin y clorpirifos en piel de naranja y tomate, respectivamente). A estos niveles de concentración, el QTOF no siempre fue capaz de detectar la presencia de todos los plaguicidas, como ocurrió con azoxistrobin en piel de naranja, cuya concentración estimada era de 0.01 mg/kg (justo al nivel del LOQ). Por otro lado, en la muestra de tomate positiva a clorpirifos, sólo el QqQ fue capaz de dar un valor de cuantificación estimado 0.005 mg/kg, además de una correcta confirmación de la identidad.

Considerando el número de IPs asignados a cada muestra, se encontró que se cumplían todos los IPs esperados en QqQ, manteniendo una alta robustez en torno a 9 IPs. Sin embargo, para el caso del TOF el número de IPs conseguidos fue muy variable, entre 2 y 10 IPs, de forma que a bajas concentraciones no se obtuvieron todos los IPs esperados teóricamente por falta de sensibilidad (positivos de azoxistrobin en uva, piriproxifen en pimiento verde o tiabendazole en piel de naranja). En cuanto al QTOF presentó mayor número de IPs que el TOF y QqQ para todas las muestras, a excepción del positivo de hexitiazox.

A modo de ejemplo, se muestra en la *Figura 3a, 3b y 3c del artículo científico 6* los cromatogramas obtenidos por QqQ, TOF y QTOF para la muestra positiva de hexitiazox en uva (0.025 mg/kg). En el caso del positivo de imidaclorpid en pimiento rojo (0.3 mg/kg), donde la concentración era mayor (ilustrada en las *Figuras 3d, 3e y 3f del artículo científico 6*), todos los IPs esperados se alcanzaron, a excepción del TOF. El último IR no se pudo conseguir probablemente a causa de una baja fragmentación del imidaclorpid en la fuente de ionización.

Cabe comentar que es posible solventar la limitación de la baja fragmentación de un analito en la fuente de ionización en los casos en que éste presente una distribución isotópica abundante y característica, como ocurre con el clorpirifos. Para este tipo de analitos, se puede ver compensada la fragmentación pobre en la fuente con la selección de otros iones isotópicos y sus correspondientes fragmentos, aumentando considerablemente su poder confirmativo. Este efecto se observa en una muestra de plátano positiva a clorpirifos (**Figura 3.1**).

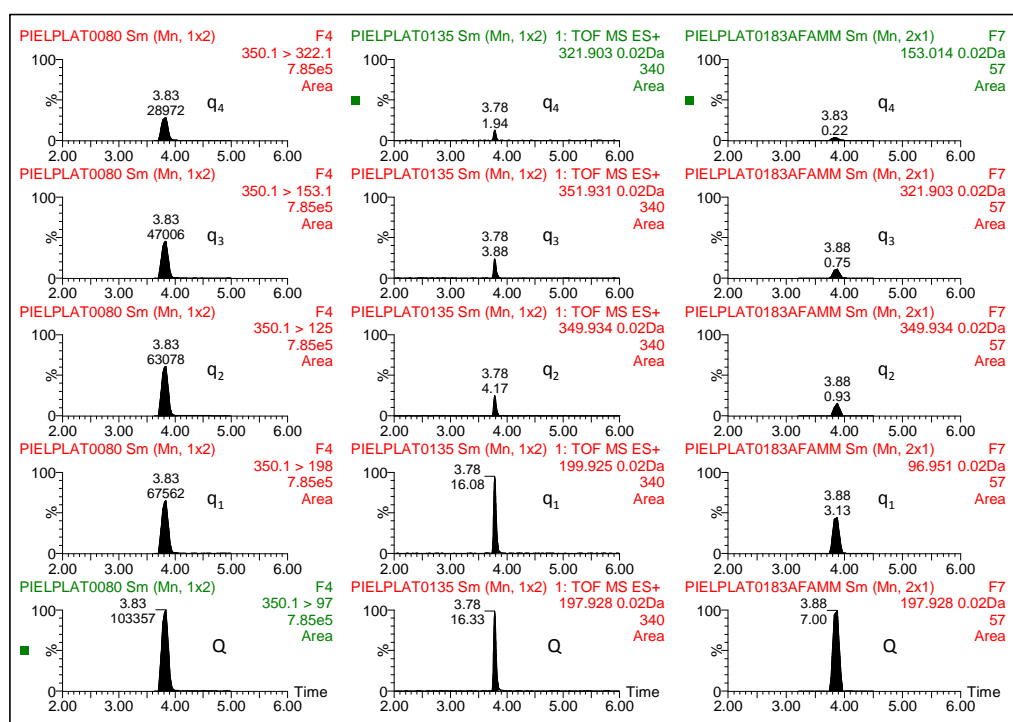


Figura 3.1. Cromatogramas correspondientes a una muestra positiva de clorpirifos (0.6 mg/kg) en piel de plátano obtenidas mediante (a) LC-ESI-QqQ, (b) LC-ESI-TOF XIC y (c) LC-ESI-QTOF XIC. TOF y QTOF XICs se realizaron con ventanas de masa de ± 10 mDa.

Es interesante resaltar las mayores posibilidades de fragmentación cuando se trabaja en modo TOF MS en un instrumento QTOF, ya que en este caso se encuentra disponible la celda de colisión, permitiendo inducir la colisión en la propia celda, además de en la fuente. Esta posibilidad mejoraría la capacidad de fragmentación en el TOF, aumentando tanto las abundancias como la cantidad de los iones para un mismo analito. Esta estrategia se ha utilizado posteriormente en la búsqueda de metabolitos de plaguicidas en muestras de alimentos (ver *artículo científico 8, capítulo 5*).

• Aplicación del método screening a muestras reales

A pesar de la menor capacidad confirmativa del TOF frente al QTOF, y su menor sensibilidad en métodos *pre-target* frente a adquisiciones en SRM en QqQ, el TOF presenta una cualidad extraordinaria como analizador en modo *pos-target*, debido a su alta sensibilidad en modo *full scan*. Esta capacidad se ha explorado en las mismas inyecciones de las 44 muestras reales analizadas para los 11 analitos

pre-target. Conociendo la fórmula molecular de una gran cantidad de plaguicidas, se pudo incluir la misma en una base de datos usando un *software* especializado de búsqueda automatizada a lo largo del TIC del TOF MS (*ChromaLynx XS, Tabla 3 información suplementaria del artículo científico 6*). El *ChromaLynx* es capaz obtener, a partir de la fórmula molecular de cada compuesto introducido, un XIC del ion $[M+H]^+$; además, incluyendo los átomos de Na o de NH_3 en su fórmula molecular, también es posible obtener los iones $[M+Na]^+$ y $[M+NH_4]^+$ en masa exacta. Utilizando esta metodología, se obtuvieron numerosos positivos, algunos de los cuales se comentan a continuación.

Uno de los ejemplos más ilustrativos fue el positivo de carbendazima que se identificó en una muestra de cítrico. Se descubrió un pico abundante a 3.97 min cuya m/z del espectro combinado del pico sólo se desviaba 0.2 mDa de la masa exacta de este fungicida 192.0773. Además, se encontró otro pico abundante en el espectro cuya m/z era 160.0511. A partir del cálculo de la fórmula empírica se dedujo que se trataba de un fragmento de la carbendazima, $C_8H_6N_3O$, con tan sólo una desviación de 0.6 mDa. Con el objetivo de confirmar la identidad de la carbendazima, se realizó una búsqueda bibliográfica, encontrando como iones fragmento más abundantes el observado en la muestra (m/z 160) además de otro típico a m/z 132, estudiados mediante LC-QqQ (Marín *et al.*, 2009). Además, en este caso se encontraba disponible el patrón en nuestro laboratorio, por lo que fue posible también su confirmación con el tiempo de retención y estudio de la ruta de fragmentación de la carbendazima. Al inyectar el patrón y comparar los tiempos de retención se observó tan sólo una desviación del 0.7%. Tras realizar experiencias en QTOF-MS/MS se encontró que tanto los iones producto como su distribución en el espectro del patrón y del pico sospechoso de carbendazima en la muestra eran idénticos (*Figura 4 y Tabla 5 del artículo científico 6*).

Para comprobar el grado de fiabilidad de esta aproximación *post-target* se decidió incluir en el método las fórmulas moleculares de los plaguicidas estudiados en el método *pre-target*. Prácticamente todos los positivos confirmados en las muestras reales en una aproximación *pre-target* también fueron detectados por el método *post-target*. Sin embargo, podrían haber reportado dos falsos positivos para buprofezin y hexitiazox, ya que en ambos casos los tiempos de retención no correspondieron con los de los patrones (*Figuras 5a y 5b del artículo científico 6*), además la desviación de la masa exacta fue superior a lo esperado (mayor de 5 mDa). Otro posible falso positivo, podría ser tebufenpirad (*Figuras 5c y 5d del artículo científico 6*), aunque se descartó

debido a la ausencia de la relación isotópica correspondiente a su átomo de cloro. Adicionalmente, este tipo de *screening* dió lugar a varios picos con distintos tiempos de retención para un mismo compuesto, tal y como se observó para el caso de un potencial positivo de etoprofos (*Figura 6 del artículo científico 6*), donde como criterio de discriminación se utilizó la exactitud de masa. Por ello, se constató que, a pesar de usar la masa exacta, había posibilidad de obtener falsos positivos. En estos casos, se asumió como necesario recurrir a un patrón de referencia para confirmar los positivos.

Otra desventaja que se planteó fue la presencia de compuestos isómeros. Se identificó un pico a m/z 243.1167, que podía corresponder al ion $[M+NH_4]^+$ tanto del plaguicida etiofencarb como metiocarb, que presentaban estructuras moleculares diferentes pero su fórmula molecular era isobárica. En este caso, se pensó en recurrir a la posibilidad de encontrar un ión fragmento como en el caso de la carbendazima. Según la bibliografía existían dos iones fragmento que podían discriminar una estructura de otra (107 y 169 para el etiofencarb y metiocarb, respectivamente). Sin embargo, no existía ningún fragmento para este pico que presentara alguno de los dos iones fragmento, por lo que no se pudo concluir si la muestra era positiva a alguno de los dos plaguicidas. Definitivamente, volvía a ser imprescindible la inyección del patrón de referencia para poder confirmar el potencial positivo de alguno de los dos.

Así mismo, se descubrió un posible positivo de indoxacarb en una muestra de uva, a una concentración considerable como para poder realizar experiencias QTOF MS/MS, obteniendo una buena abundancia de los iones producto. Este caso resultó especialmente interesante, porque el analito podía confirmarse gracias a su característica relación isotópica al presentar un átomo de cloro, mostrando desviaciones de la masa exacta de los picos de la huella isotópica menor de 1 mDa. Además, como se puede observar en la *Figura 7b del artículo científico 6*, se encontró el pico correspondiente no sólo al ión molecular $[M+H]^+$, sino también del $[M+Na]^+$. Se realizaron experiencias en QTOF MS/MS para obtener los iones productos con masa exacta, calculando una fórmula molecular para cada una de esas masas exactas y proponiendo una estructura química (*Figura 7c del artículo científico 6*). Toda esta información resultó de gran valor para llegar a considerar con un alto grado de confianza este positivo de indoxacarb. Aunque, de la misma forma que se ha indicado en los casos anteriores, la obtención del tiempo de retención mediante el uso del patrón de referencia sería la prueba determinante y definitiva para confirmar la presencia de indoxacarb en esta muestra de uva.

Después de haber realizado este estudio comparativo de los analizadores QqQ, TOF y QTOF, se concluye que los tres presentan buenas capacidades para análisis *pre-target*. En cuanto al análisis cuantitativo, se vió que el analizador QqQ era el que presentaba mejores propiedades, seguidas por el TOF y QTOF, por su mayor sensibilidad y robustez. A pesar de que el instrumento (Q)TOF Premier presenta un buen rango de linealidad gracias al DRE, su menor sensibilidad le impidió llegar a los bajos órdenes de concentración alcanzados por el QqQ. En cuanto a su capacidad confirmativa, destaca el analizador QTOF, lográndose a alcanzar valores de IPs por encima de 10, limitando el número de iones medidos a cuatro. Sin embargo, el QqQ ha sido capaz de llevar a cabo la confirmación de todos los plaguicidas ensayados con gran robustez, a niveles de concentración muy bajos. En el análisis confirmativo, el analizador TOF es el que presentaba mayores limitaciones, básicamente como consecuencia a su baja producción de fragmentos en la fuente de ionización, para la gran mayoría de compuestos.

En un segundo estadio, se han investigado las posibilidades de *screening* en modo *post-target* analizador TOF, ya que resulta el más interesante por su alta sensibilidad en modo *full acquisition*, además de su velocidad de escaneo (0.1-0.3 scan/s). En esta aproximación se han llegado a confirmar varios positivos mediante un estudio de su fragmentación por experiencias QTOF MS/MS, usando el patrón de referencia, si se encontraba disponible.

Otra posible estrategia que pueden permitir los instrumentos QTOF es realizar un *screening* para la detección junto con la confirmación simultánea de la identidad de los potenciales positivos, ya que la nueva generación de este modelo de instrumentos trabaja siempre con una presión de gas constante en la celda de colisión, de forma que la fragmentación se puede controlar con la energía de colisión. Además, éstos son capaces de asegurar la presencia del *lock-mass* tanto en modo TOF MS como QTOF MS/MS por su sistema de *lock-spray*. Este modo de trabajo permite la adquisición conjunta a energías de colisión bajas y altas, denominado comúnmente como MS^E (Waters).

Finalmente cabe comentar, que una verdadera adquisición *non-target* acompañado de un *software* muy especializado, capaz de deconvolucionar y extraer los analitos exógenos de una muestra, ajenos a los componentes de la propia matriz, nos daría la verdadera posibilidad de evitar el *ion shopping* y los falsos negativos por no haber sido considerados en métodos *target* (tanto *pre-target* como *post-target*). En este tipo de trabajos es dónde el analizador TOF presenta un elevado potencial por sus propiedades, indicadas anteriormente. Este

tema se va a tratar en el siguiente capítulo, enfocándolo a los productos de transformación/metabolitos de los plaguicidas en muestras de origen vegetal.

3.3.4. Referencias bibliograficas

- Barceló, D.; Petrovic, M. (2007) *Challenges and achievements of LC-MS in environmental analysis: 25 years on* Trends Anal. Chem. 26, 2-11
- Commission Directive 2002/657/EC, COMMISSION DECISION of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results
- European Commission, Directorate General Health and Consumer Protection, Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed, Document N° SANCO/2007/3131, 31 October 2007 (Supersedes Document No. SANCO/10232/2006 (http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf))
- Ferrer, I.; García-Reyes, J.F.; Mezcua, M.; Thurman, E.M.; Fernández-Alba, A.R. (2005) *Multi-residue pesticide analysis in fruits and vegetables by liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry* J. Chromatogr. A 1082, 81-90
- Ferrer, I.; Thurman, E.M. (2007) *Multi-residue method for the analysis of 101 pesticides and their degradates in food and water samples by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry* J. Chromatogr. A. 1175, 24-37
- García-Reyes, J.F.; Hernando, M.D.; Ferrer, C.; Molina-Díaz, A.; Fernández-Alba, A.R. (2007) *Large scale pesticide multiresidue methods in food combining liquid chromatography - Time-of-flight mass spectrometry and tandem mass spectrometry* Anal. Chem. 79, 7308-7323
- Garrido Frenich, A.; Martínez Vidal, J. L.; Pastor-Montoro, E.; Romero-González, R. (2008) *High-throughput determination of pesticide residues in food commodities by use of ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry* Anal.Bioanal. Chem. 390, 947-959
- Gilbert-López, B.; García-Reyes, J.F.; Ortega-Barrales, P.; Molina-Díaz, A.; Fernández-Alba, A.R. (2007) *Analyses of pesticide residues in fruit-based baby food by liquid chromatography/electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry* Rapid Commun. Mass Spectrom. 21, 2059-2071
- Grimalt, S.; Pozo, Ó.J.; Sancho, J.V.; Hernández, F. (2007) *Use of Liquid Chromatography Coupled to Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry To Investigate Pesticide Residues in Fruits* Anal. Chem. 79, 2833-2843
-

- Hernández, F.; Pozo, O.J.; Sancho, J.V.; López, F.J.; Marín, J.M.; Ibañez, M. (2005) *Strategies for quantification and confirmation of multi-class polar pesticides and transformation products in water by LC-MS2 using triple quadrupole and hybrid quadrupole time-of-flight analyzers* Trends Anal. Chem. 24, 596-612
- Hernández, F.; Pozo, O.J.; Sancho, J.V.; Bijlsma, L.; Barreda, M.; Pitarch, E. (2006) *Multiresidue liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of 52 non gas chromatography-amenable pesticides and metabolites in different food commodities* J. Chromatogr. A 1109, 242-252
- Lacorte, S.; Fernández-Alba, A.R. (2006) *Time of flight mass spectrometry applied to the liquid chromatographic analysis of pesticides in water and food* Mass Spectr. Reviews 25, 866-880
- Marín, J. M.; Gracia-Lor, E.; Sancho, J. V.; López, F. J.; Hernández, F. (2009) *Application of ultra-high-pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry to the determination of multi-class pesticides in environmental and wastewater samples Study of matrix effects* J. Chromatogr. A 1216, 1410-1420
- Matuszewski, B.K.; Constanzer, M.L.; Chavez-Eng, C.M. (2003) *Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS* Anal. Chem. 75, 3019-3030
- Mezcua, M.; Malato, O.; García-Reyes, J.F.; Molina-Díaz, A.; Fernández-Alba, A.R. (2009) *Accurate-Mass Databases for Comprehensive Screening of Pesticide Residues in Food by Fast Liquid Chromatography Time-of-Flight Mass Spectrometry* Anal. Chem. 81, 913-929
- Soler, C.; Mañes, J.; Picó, Y. (2005) *Comparison of liquid chromatography using triple quadrupole and quadrupole ion trap mass analyzers to determine pesticide residues in oranges* J. Chromatogr. A. 1067, 115-125
- Soler, C.; Hamilton, B.; Furey, A.; James, K.J.; Mañes, J.; Picó, Y. (2006) *Comparison of four mass analyzers for determining carbosulfan and its metabolites in citrus by liquid chromatography/mass spectrometry* Rapid Commun. Mass Spectrom. 20, 2151-2164
- Soler, C.; James, K.J.; Picó, Y. (2007) *Capabilities of different liquid chromatography tandem mass spectrometry systems in determining*
-

pesticide residues in food Application to estimate their daily intake J. Chromatogr. A 1157, 73-84

Thurman, E.M.; Ferrer, I.; Malato, O.; Fernández-Alba, A.R. (2006) Feasibility of LC/TOFMS and elemental database searching as a spectral library for pesticides in food *Food Addit. Contam.* 23, 1169-1178

Capítulo 4:

Potencial del TOF y QTOF para la investigación de metabolitos de plaguicidas en alimentos.

4.1. Introducción Capítulo 4.

Tal y como se ha comentado anteriormente, el estudio de los plaguicidas en alimentos es un aspecto relevante en el campo de la salud pública. Teniendo en cuenta las mismas razones, es importante considerar también sus productos de transformación/metabolitos de plaguicidas, debido a que pueden presentar propiedades intrínsecas relacionadas, e incluso una actividad comparable al plaguicida del que proceden. Estos compuestos pueden presentar capacidad biológica activa e incluso, en algunos casos, una toxicidad comparable o mayor a la de su precursor. Por estas razones, el estudio de transformación de los plaguicidas debería considerarse una materia de estudio importante, diseñándose estrategias analíticas que sean eficientes para ello (Sinclair *et al.*, 2003; Medana *et al.*, 2005). En general, la mayor fuente de exposición humana a residuos de plaguicidas proviene de la dieta (Lu *et al.*, 2009; Picó *et al.*, 2007), salvo los casos de exposición profesional en la agricultura, por lo que debe llevarse a cabo el control de su presencia, así como de sus principales productos de degradación, tanto en aguas como en alimentos.

La transformación de los plaguicidas se puede deber a múltiples procesos. A su vez, estos pueden generarse en diferentes compartimentos, tanto a nivel medio ambiental (suelos, aguas o aire), como a nivel de organismos vivos (microorganismos, vegetales o animales) quedando presentes en alimentos de consumo humano; o finalmente, pueden encontrarse como consecuencia de una metabolización, tras su consumo, en fluidos biológicos. En nuestro caso se van a considerar las rutas de degradación en aguas y alimentos. En este sentido, la procedencia de los diferentes productos de transformación/metabolitos puede deberse a diferentes procesos, como se indica a continuación:

- productos de procedencia lateral al plaguicida, considerados como impurezas de la síntesis o de los otros productos presentes en la mezcla del formulado; estos también serán aplicados junto con el plaguicida deseado,
 - pueden provenir de procesos físico-químicos, tales como hidrólisis, reacciones redox, etc.; en tal caso se tratan de productos de transformación generados en las denominadas rutas de degradación abióticas,
-

- pueden proceder de mecanismos de degradación biológicos, metabolizándose por procesos bióticos a nivel microbiano, vegetal o animal. En tal caso se denominan metabolitos.

Sin embargo, desde el punto de vista analítico poder estudiar y llegar a conocer la procedencia exacta de la ruta de degradación que han experimentado estos productos de transformación supondría un trabajo muy complejo y en algunos casos casi imposible. Por otro lado, el hecho de que la degradación sea de origen biótico o abiótico no suele ser directamente de interés analítico, por lo que en general se suele hacer referencia a todos ellos en la bibliografía como metabolitos, independientemente del proceso que hayan sufrido.

Otro aspecto de importancia es el criterio que se debe considerar para decidir si un metabolito de plaguicida ha de ser incluido o no en el análisis, ya que existen miles de potenciales metabolitos como consecuencia de las degradaciones antes indicadas. Mientras la legislación en control medioambiental no especifica cuáles son los metabolitos más relevantes, en el caso de los alimentos algunos de ellos son incluidos en la definición de residuo y también introducidos al establecerse el límite máximo de residuo (LMR). Estos metabolitos son incluidos por su toxicidad o abundancia significativa (European Commission, Directive 91/414/EEC). Sin embargo, estas regulaciones parecen en muchos casos arbitrarias, ya que la inclusión de los mismos en la definición de LMR puede variar de unos países a otros. Así sucede con un metabolito del imazalil (1-[2-(2,4-diclorofenil)-2-hidroxietil]-1H-imidazol) que se incluye en la definición de residuo del imazalil según la legislación de EEUU (Thurman *et al.*, 2005), pero no en la europea. En varios casos se incluye específicamente en la definición de residuo la suma del plaguicida y sus metabolitos más importantes; por ejemplo, en el carbofuran se considera la suma de carbofuran y su metabolito principal 3-hidroxi-carbofuran. Sin embargo, en otros casos similares como en la definición de benfuracarb, a pesar de tratarse de un compuesto de alta inestabilidad y rápida transformación a carbofuran y 3-hidroxi-carbofuran, no se encuentra legislado su LMR como la suma de todos ellos (EU Pesticides Database).

En cuanto a las técnicas analíticas aplicadas en este campo en los últimos años, se han usado esencialmente GC y LC acopladas a MS; especialmente para el caso de los metabolitos conocidos, de los que se dispone del patrón de referencia. Estos metabolitos suelen estar incluidos en los métodos multiresiduales como otro plaguicida más, llevándose a cabo su análisis *target* mediante el uso de GC-MS (Tadeo *et al.*, 2003), GC-MS/MS (Garrido Frenich *et al.*, 2008; Pihlström *et al.*, 2007; Lehotay *et al.*, 2005) y LC-MS/MS (Pihlström *et al.*, 2007; Hernández *et al.*,

2006, Lehotay *et al.*, 2005). De esta forma, queda patente que los metabolitos conocidos y legislados pueden ser controlados de forma rutinaria mediante métodos específicos y sensibles que permiten cuantificar y confirmar su presencia, al igual que la de sus plaguicidas precursores. Pero para llegar a esta situación controlada, es necesario afrontar los vacíos que todavía se encuentran en este campo mediante el estudio de los mecanismos de degradación, y afrontar la búsqueda de metabolitos no incluidos en los métodos multiresiduales y/o metabolitos desconocidos. Se trata de un tema de investigación complejo, ya que nos enfrentamos a miles de potenciales metabolitos, muchos de ellos no bien conocidos, y con pocos patrones de referencia disponibles comercialmente. Para desarrollar esta investigación la técnica analítica LC-MS se presenta como una de las más apropiadas como se expondrá a continuación (Hernández *et al.*, 2005).

4.1.1.- Referencias bibliográficas

European Commission, Guidelines for the generation of data concerning residues as provided in Annex II, section 6; and Annex III, section 8, of Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market. Appendix A: Metabolism and Distribution in Plants, Doc 7028/VI/95, 22 July 1997

EU Pesticide Database, http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm

Garrido Frenich, A.; Plaza-Bolaños, P.; Martínez Vidal, J.L. (2008) *Comparison of tandem-in-space and tandem-in-time mass spectrometry in gas chromatography determination of pesticides: Application to simple and complex food samples* J. Chromatogr. A 1203, 229-238

Hernández, F.; Sancho, J.V.; Pozo, O.J. (2005) *Critical review of the application of liquid chromatography/mass spectrometry to the determination of pesticide residues in biological samples* Anal. Bioanal. Chem. 382, 934-946

Hernández, F.; Pozo, O.J.; Sancho, J.V.; Bijlsma, L.; Barreda, M.; Pitarch, E. (2006) *Multiresidue liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of 52 non gas chromatography-amenable pesticides and metabolites in different food commodities* J. Chromatogr. A 1109, 242-252

Lehotay, S.J.; De Kok, A.; Hiemstra, M.; Van Bodegraven, P. (2005) *Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection*. J. AOAC Int. 88, 595-614

Lu, C.; Barr, D.B.; Pearson, M.A.; Walker, L.A.; Bravo, R. (2009) *The attribution of urban and suburban children's exposure to synthetic pyrethroid insecticides: A longitudinal assessment* J. Exposure Sci. Environ. Epidemiol. 19, 69-78

Medana, C.; Calza, P.; Baiocchi, C.; Pelizzetti, E. (2005) *Liquid chromatography tandem mass spectrometry as a tool to investigate pesticides and their degradation products* Curr. Org. Chem. 9, 859-873

Picó, Y.; Farré, M.; Soler, C.; Barceló, D. (2007) *Confirmation of fenthion metabolites in oranges by IT-MS and QqTOF-MS* Anal. Chem. 79, 9350-9363

Pihlström, T.; Blomkvist, G.; Friman, P.; Pagard, U.; Österdahl, B.G. (2007) *Analysis of pesticide residues in fruit and vegetables with ethyl acetate extraction*

using gas and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection Anal. Bioanal. Chem. 389, 1773-1782

Sinclair, C.J.; Boxall, A.B.A. (2003) *Assessing the ecotoxicity of pesticide transformation products* Environ. Sci. Technol. 37, 4617-4625

Tadeo, J.L.; Sánchez-Brunete, C. (2003) *Analysis of Pesticide Residues in Fruit Juices by Matrix-Solid Phase Dispersion and Gas Chromatographic Determination* Chromatographia 57, 793-798

Thurman, E.M.; Ferrer, I.; Fernández-Alba, A.; Zweigenbaum, J.A.; García-Reyes, J.F.; Woodman, M.; Fernández-Alba, A.R. (2005) *Discovering metabolites of post-harvest fungicides in citrus with liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry and ion trap tandem mass spectrometry* J. Chromatogr. A 1082, 71-80

4.2. Investigación de metabolitos de plaguicidas en alimentos y aguas mediante LC-TOF-MS.

4.2.1. Introducción

Como ya se ha comentado en la introducción a este capítulo, el estudio de los plaguicidas debería ir acompañado en la mayoría de los casos de sus correspondientes metabolitos. Sin embargo, el hecho de que muchos de éstos no hayan sido estudiados en profundidad o que sean desconocidos no hace fácil establecer un criterio uniforme para el analista sobre cuáles deben ser considerados y su importancia en el análisis. En este sentido, todavía queda mucho camino por recorrer, parece relevante adquirir el máximo grado de conocimiento sobre el comportamiento de los metabolitos en los diferentes compartimentos, tanto a nivel medioambiental como alimentario. Estos conocimientos pueden ayudar a establecer unos criterios de búsqueda y evaluación de los distintos metabolitos.

En general, se suele partir de escasos conocimientos sobre la posible presencia de los metabolitos en las muestras, por lo que interesa en general un análisis *post-target* o *non-target*. Como se ha comentado en la introducción del capítulo, una vez el metabolito está descrito y/o su patrón de referencia se encuentra comercialmente disponible, es más directo y sencillo realizar un análisis *pre-target* del mismo. En los análisis *pre-target* las técnicas analíticas por excelencia han sido GC-MS y LC-MS (Pihlström *et al.*, 2007, Lehotay *et al.*, 2005 y 2007), utilizando analizadores de cuadrupolo simple, trampa de iones o triple cuadrupolo; debido a su alta especificidad y sensibilidad. En la elección de la técnica separativa, LC-MS/MS es posiblemente la técnica más adecuada, debido a las características físico-químicas de los metabolitos, que suelen presentar mayor polaridad que sus precursores y una alta solubilidad en medios acuosos, especialmente considerando que MS en tándem permite una adquisición en SRM (Hiemstra *et al.*, 2007; Pihlström *et al.*, 2007). Sin embargo, cuando se realizan estudios *non-target* la adquisición en modo SRM no es adecuada, ya que se desea hacer una búsqueda de metabolitos desconocidos en la muestra, que en muchos casos no han sido descritos previamente. Por ello, el uso de metodologías analíticas que aporten el máximo de información acerca de los componentes de la muestra es de gran utilidad. Los analizadores capaces de proporcionar una mayor sensibilidad en modo de adquisición *full scan* son los más adecuados, como es el caso del TOF, que además de presentar una buena sensibilidad y velocidad de adquisición en modo *full scan*, también ofrece una medida de masa con una buena exactitud (errores del orden de mDa). Estas características hacen que LC-TOF MS sea una de las técnicas más potentes tanto para la búsqueda de

metabolitos *target*, como *non-target* en muestras de distinto origen, como aguas y alimentos.

En el artículo que se incluye a continuación, se han revisado las metodologías desarrolladas mediante la técnica LC-TOF aplicadas hasta el momento en el campo de los metabolitos de plaguicidas en aguas y alimentos. El artículo revisa básicamente tres frentes de trabajo:

- el uso de LC-TOF MS en análisis *pre-target* multirresiduales de plaguicidas, donde se incluyen algunos de sus metabolitos;
 - el uso de estrategias que permiten identificar metabolitos de plaguicidas que se encuentran presentes en las muestras, utilizando metodologías *post-target* y *software* especializado;
 - el uso del LC-TOF MS en métodos *non-target*, donde se lleva a cabo la búsqueda de metabolitos de plaguicidas como un contaminante orgánico en la muestra sin conocimiento previo de la presencia de su plaguicida precursor, identificándolos y elucidándolos.
-

4.2.2. Artículo Científico 7:

Investigation of pesticide metabolites in food and water by LC-TOF-MS.

F. Hernández, J.V. Sancho, M. Ibáñez, S. Grimalt

Trends in Analytical Chemistry **2008**, 27(10), 862-872

Investigation of pesticide metabolites in food and water by LC-TOF-MS

F. Hernández, J.V. Sancho, M. Ibáñez and S. Grimalt

Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, 12071 Castellón, Spain

Available online 2 September 2008.

Abstract

We illustrate the potential of liquid chromatography with (quadrupole) time-of-flight mass spectrometry [LC-(Q)TOF-MS] in investigating the presence of pesticide metabolites in food and water samples. The higher polarity of metabolites compared to their parent pesticides makes the combination of LC [both high-performance (HPLC) and ultra-performance (UPLC)] with TOF-MS one of the most appropriate techniques for their analysis, mainly from a qualitative point of view.

Both target analysis and non-target analysis have been explored making use of this technique. Target analysis is typically applied in the inspection of maximum residue limits in food, when a relevant metabolite is included in the residue definition for toxicological reasons or its presence in significant amounts. Within this field, LC-TOF-MS, thanks to its intrinsic characteristics of high sensitivity in full-scan acquisition mode and elevated mass accuracy, has great potential for qualitative purposes, and it allows detection and reliable identification of a large number of metabolites in only one chromatographic run without the need for re-analysis.

The latest generations of TOF instruments have also been successfully applied for quantitative purposes. By contrast with food analysis, for drinking water, most regulations of residues do not specify which pesticide metabolites must be included in analysis, and even less so for environmental waters. In such cases, analytical laboratories can focus analysis on a list of (normally) a few target metabolites, or on non-target analysis, where the objective is to identify (pre-defined) metabolites in samples without previously selecting them.

We review the use of LC-TOF-MS and LC-(Q)TOF-MS in pesticide-metabolite analysis, considering different approaches:

- multi-residue pesticide analysis, where several metabolites are included within the list of target analytes;
- investigation of pesticide metabolites in samples that were positive for selected pesticides in previous target analysis;
- investigation of metabolites in pesticide-metabolism or degradation studies, typically in laboratory or field experiments under controlled conditions; and,
- non-target analysis, where there is no previous information or restrictions on the compounds to be searched in the samples.

We show that LC-(Q)TOF-MS is at present one of the most advanced and efficient techniques for screening and identification of pesticide metabolites in food and water.

Keywords: *Degradate; Food; Liquid chromatography; Mass spectrometry; Non-target; Pesticide metabolite; Target; Time-of-flight; Transformation product; Water.*

1. Introduction

Pesticide metabolites are a matter of concern, as they may have intrinsic properties comparable to the active parent substance in terms of biological target activity or certain toxicological properties that make necessary strict control of their presence in food and water. Metabolites and breakdown products of pesticides may occur in many environmental compartments (particularly soil, surface waters, groundwater and air), animal feed or food for human consumption.

The decision on which of these compounds must be included in analyses is quite problematic, as there are thousands of potential metabolites resulting from metabolism of hundreds of parent compounds in plants and animals, and different transformation processes in the environment. The situation in food analysis seems less troublesome from an analytical point of view because the most relevant metabolites and degradation products are specifically included in the definition of residue, on the basis of their toxicology and presence in significant amounts [1]. Several examples can be found of residue definitions that include specific metabolites [e.g., carbofuran (sum of carbofuran and 3-hydroxycarbofuran), chlorpropham (sum of chlorpropham and 3-chloroaniline), disulfoton (sum of disulfoton, disulfoton sulfoxide and disulfoton sulfone), fenthion (sum of fenthion and its oxygen analogue, their sulfoxides and sulfone)] [2]. In all these cases, the determination of pesticide metabolites is by target analysis, the best known examples being Maximum Residue Limits (MRLs) in food.

Target analysis is typically by GC-MS or GC-MS² or LC-MS², using single quadrupole, ion trap (IT) or triple-quadrupole analyzers (QqQs), although physico-chemical characteristics of pesticide metabolites (normally higher polarity and solubility in water than parent compounds) make LC-MS² the most suitable technique for their determination. The excellent sensitivity and selectivity of LC-MS² in Selected Reaction Monitoring (SRM) mode are widely recognized, as is the great potential of LC-MS² for pesticide-metabolite analysis. QqQs have been the most frequently employed analyzers in LC-MS²-based methods applied to the field of (polar) pesticide-residue analysis, including metabolites, in different sample matrices (e.g., food, water and biological fluids) [3], [4], [5], [6], [7] and [8].

The situation is rather different in environmental analysis, where little information is available on specific relevant metabolites that should be included in analyses. Aquatic and terrestrial ecotoxicology of metabolites and breakdown products is of outstanding importance. The concept of "relevant metabolite" is used in European Union (EU) Council Directive 91/414/EEC [9] concerning the

placing of plant-protection products on the market and also in the Drinking Water Directive 98/83/EC [10]. Although neither of these two Directives defines this term, this aspect is crucial as both Directives indicate that concentrations of pesticides and their "relevant metabolites" in groundwater and in drinking water must not exceed 0.1 µg/L. Also of interest is the guidance document published by the European Commission on assessment of the relevance of metabolites in groundwater of substances regulated under Council Directive 91/414/EEC [11].

In spite of the existence of some guidelines on this matter, analytical chemists do not currently have available extensive lists of pesticide metabolites to be analyzed in environmental water and drinking water. As a result, the scientific literature contains quite different examples of metabolites included in analyses, but normally little information is given on the reasons for including these and not other compounds. In most cases, the availability of commercial reference standards of metabolites for the group of parent compounds analyzed seems to be the main reason.

Among the pesticide metabolites more frequently determined in water, there can be emphasis on those from triazine herbicides. Parent triazines are among the pesticide families most commonly analyzed and detected in water, and this has surely also led several authors to investigate their metabolites [12], [13], [14] and [15]. Our own group has reported that triazine-transformation products [e.g., deisopropylatrazine (DIA), 2-OH-terbutylazine (2-OH-tbze), desethyltbze, desethyl-2-OH-tbze or desethylterbumeton] are more frequently detected and at higher concentrations than their parent herbicides in groundwater [5] and [16]. Most recent works dealing with this type of analysis have used LC-MS² QqQ, which illustrates the potential of this analyzer in analyzing pesticide metabolites as targets.

In a recent review, we showed the potential of LC-(Q)TOF-MS for determination of pesticides and their transformation products in water [17]. Besides, the excellent capability of TOF-MS in confirming organic micropollutants detected in environmental samples was discussed recently, describing the achievements and the pitfalls of this technique and showing illustrative examples on detecting pesticides and antibiotics in groundwater and surface-water samples [18].

In the present article, we will review the use of LC-TOF-MS in pesticide-metabolite analysis, considering different approaches:

- i) use of LC-TOF-MS in multi-residue pesticide analysis, where several metabolites are included within the list of target analytes; and,

- ii) use of LC-TOF-MS in non-target analysis and in identifying or elucidating pesticide metabolites.

Throughout this article, we will use the term “metabolites”. As far as possible, we will avoid other terms that are also used in the bibliography (e.g., pesticide “degradates”, “derivatives” or “transformation products”, which we unify in the general term “metabolites” for simplification and ease of reading). It is necessary to take into account that not all compounds that derive from parent pesticides and that may be present in environmental or food samples result from metabolism in plants or animals, as other transformation processes (e.g., hydrolysis, photolysis and microbial degradation) can also take place. However, we consider that all such compounds could be treated as a whole group from an analytical point of view, independently of the processes that the parent compounds have undergone.

2. Target screening

LC-TOF-MS can be efficient in target analysis of pesticide metabolites. In this application, the theoretical exact masses of the target analytes are extracted from the full-spectrum acquisition data to reconstruct exact-mass chromatograms, which can depict the presence of the selected pesticides and metabolites in the samples. The accurate-mass capability of TOF analyzers allows reliable confirmation of the identity of the detected compounds, normally with mass errors below 5 ppm in routine analysis [19].

Mass accuracy is critical to identification because it limits the number of empirical formulae for correct identification. The accurate-mass analysis of the protonated molecule and characteristic fragment ion(s), including characteristic isotopic signals and retention times, has enabled unambiguous identification and confirmation of around 100 pesticides in food and water at low-concentration levels, as well as a few pesticide metabolites [20].

Although none of the bench-top TOF systems available can reach the resolving power required according to the EU definition of high resolution [21], TOF instruments have sufficient resolution and accuracy to meet the demands of correct identification [22] and [23]. For this reason, several authors have considered that measuring two ions at accurate mass assures the correct identification, and would suffice to earn the 3 or 4 Identification Points (IPs) required for authorized or banned compounds, respectively, according to the EU IP system [18], [20] and [22]. Unfortunately, the EU system does not set limits for mass accuracy, only resolution [21].

Despite the special features of TOF-MS, the present workhorse of target analysis in pesticide residue analysis is the QqQ, as shown by the abundance of scientific literature [4], [6], [7], [24], [25] and [26]. This is because, at similar confirmatory and multi-residual capabilities, LC-MS² QqQ offers better sensitivity (which is feasible by acquiring several fast SRM transitions per analyte and using ion ratios for confirmation) and because of its excellent potential for quantitation at sub-ppb levels.

However, in the metabolite-analysis field, TOF's capability of interrogating full-spectrum data post acquisition seems more interesting, as it allows screening for unexpected metabolites at the time of injection without re-analyzing the sample. We have proposed the term "post-target" screening [27] and [28] for this approach, the main advantage of which, apart from there being no need for re-analysis, is the huge number of compounds that may be investigated, with the obvious restrictions deriving from the requirements of LC and MS analysis. High-occurrence metabolites, after being properly identified with TOF-MS, might then be included in targeted analytical methods (e.g., using QqQ, when commercial reference standards are available).

Only a few papers have reported on the use of LC-(Q)TOF-MS for determination of pesticide metabolites as targets. This is surely due to use of this technique in environmental and food analysis being very recent. The high cost of these instruments has been one of the main reasons for the scarcity of applications in these fields, as opposed to their frequent use in proteomics or pharmaceutical research. Target methods proposed so far have normally been validated for a few metabolites using samples spiked with reference standards, and the applications developed have been focused more on showing the potential of TOF analyzers in multi-residue quantitative methods rather than including an extensive list of pesticide metabolites within the group of selected analytes.

Some known pesticide metabolites have been included in multi-residue methods based on the use of LC-TOF-MS [e.g., Ferrer et al. [20] included atrazine metabolites (deethylatrazine and deisopropylatrazine), aldicarb (aldicarb sulfone and sulfoxide), methiocarb (methiocarb sulfone), terbutylazine (deethylterbutylazine) or irgarol metabolites], all of which are commercially available. When the method was applied to the analysis of real vegetable samples, no metabolites were detected. In the case of surface-water samples, deethylatrazine and deisopropylatrazine were found, with accurate-mass deviations lower than 3 ppm.

Another multi-residue LC-TOF method for 100 target compounds (including nine metabolites) in food samples has been developed [29]. Different sulfone (aldicarb, ethiofencarb, thiofanox and methiocarb) and sulfoxide (ethiofencarb and methiocarb) metabolites were included, as well as prochloraz and imazalil metabolites. An automated target-database search was performed, reporting hits within a selected retention-time window ($t_R \pm 0.25$ min), area counts (10,000 counts) and mass tolerance ($[M+H]^+ \pm 10$ mDa). When real apple and pear samples were screened, there was a positive finding of the imazalil metabolite (1-(2,4)-Dichloro-phenyl-2-imidazol-1-yl-ethanol). Imazalil and prochloraz metabolites were included in an LC-TOF-MS method for screening post-harvest fungicides in fruit juices [30]. The prochloraz metabolite was found in commercial multi-vitamin fruit juice at a concentration level of 2.1 $\mu\text{g/L}$. This prochloraz metabolite was previously discovered by the same group and the standard was home synthesized by acid hydrolysis from the parent compound [31].

Hybrid QTOF has also been applied in target analysis, specifically for quantitation of fenthion metabolites in orange samples [32], obtaining satisfactory linear ranges and recoveries. However, its main applications are found in identification or elucidation of pesticide metabolites, as shown in the next section.

3. Non-target screening and identification or elucidation

The high selectivity (lack of interferences) and specificity (correct empirical formula assigned) given by the greater resolution and mass accuracy of TOF analyzers make their use very advantageous in non-target screening and also in identification or elucidation when discovering metabolites. Two situations might be considered in seeking pesticide metabolites:

- first, hunting for expected or unexpected metabolites in samples (e.g., soil, water, food and biological fluid), which were positive to specific parent pesticides in previous analysis (e.g. performed by LC-MS² QqQ); and,
- second, performing laboratory or field experiments under controlled conditions in order to investigate pesticide metabolism or degradation in different compartments (e.g., water, plants or animals).

In both approaches, TOF-MS is an indispensable analytical tool for success in identifying the most relevant or the most abundant metabolites.

3.1. Investigation of parent-positive samples

One of the most extensive approaches to investigating the presence of metabolites in food or in water is to examine samples positive for the parent pesticide. The presence of a parent pesticide in a sample makes it probable that some of its metabolites will also be found in the sample. If metabolites have already been reported in the literature [33], it is simple to plot a narrow mass window extracted ion chromatogram (nw-XIC) at its theoretical exact mass. However, other metabolites that have not been described in the literature might be also present and might be investigated. Two methodologies have been developed with this in mind:

- manual selection in positive samples of each abundant peak in the total-ion chromatogram (TIC) and examination of its accurate-mass spectrum. After that, calculated elemental compositions are searched in available databases.
- use of “fragmentation-degradation” relationships between the parent pesticide and its metabolites, assuming that their fragmentation pathways behave similarly. Obtaining nw-XICs at those common fragments, together with their accurate-mass spectra, will reveal their presence in the sample.

The first methodology has been applied using TOF-MS accurate-mass measurements to generate elemental compositions of ions in combination with an IT analyzer to provide complementary structural information [31] and [34]. This approach has been used when investigating post-harvest fungicides in citrus [34], where imazalil and prochloraz were identified. Metabolites from these fungicides were investigated by examining each abundant and suspicious peak in the TIC, obtaining its accurate-mass spectrum. One metabolite for each compound was detected, thanks to the presence of the same distinctive isotopic signature as imazalil and prochloraz, with two or three chlorine atoms, respectively. Only those molecular formulae with mass errors lower than 1.5 ppm were considered and contrasted in databases (e.g., Merck Index, ChemIndex and Sigma-Aldrich commercial electronic catalogue). For imazalil, a previously reported metabolite [(1-(2,4)-dichloro-phenyl-2-imidazol-1-yl-ethanol)] [33] was found in the Sigma-Aldrich commercial electronic catalogue, because it is a regulated metabolite of imazalil in USA. However, for prochloraz, no positive match was found.

The fragmentation pathway of parent prochloraz was studied, as that might have been helpful to elucidate its metabolite. The use of an tandem instrument

(e.g., IT-MS) was advantageous to this aim. Finally, a reasonable degradation product from prochloraz was deduced.

The same strategy was applied to other fruit samples when searching for non-target chlorinated pesticides [31]. An unknown doubly-chlorinated species with m/z 311 was detected from the TIC in extracts of grapefruit and pear. The most probable elemental composition, based on accurate mass and “double bond and ring equivalent” (DBE), was proposed to be $C_{15}H_{17}N_2OCl_2$ (error lower than 1.1 ppm), which did not match with any hit in available databases. Elucidation of its structure was proposed, thanks to its retention time close to that imazalil fungicide, also detected in the sample. Only a methyl group differentiated this unknown from imazalil, so a methylated transformation product of imazalil was proposed for this compound. For confirmation, its fragmentation pathway was compared to that of imazalil, but only a few fragment ions were obtained by in-source fragmentation at two different cone voltages in TOF-MS. Tandem experiments were therefore required, and were performed with IT-MS. Unequivocal identification of the methylated imazalil structure was not feasible, and the use of other analytical technique, such as nuclear magnetic resonance (NMR), was suggested for overall identification and confirmation of the methylated compound, which was perhaps an impurity from the commercial formulation of imazalil.

One of the limitations of this methodology is the need to find the potential metabolite peak among all visible peaks in the TIC to start suspecting the presence of a possible metabolite – assuming the metabolite peaks will be visible. Moreover, only those compounds with a characteristic isotopic pattern (e.g., metabolite molecules that keep the chlorine atoms coming from their parent pesticide) would be considered. Available databases are of great importance, as only a limited number of known compounds are included, and are therefore useful only for already described metabolites. For a final elucidation and/or reliable confirmation of proposed structures, MS^2 experiments are typically required, but, in some particular cases, they may not be sufficient for total structural elucidation.

In order to avoid this kind of manual search and inspection, a strategy based on the use of “fragmentation-degradation” relationships [35] has been proposed. In positive pear and pepper samples, metabolites of amitraz and malathion, respectively, were investigated by TOF. In both cases, previous study of the parent-pesticide-fragmentation pathway, which had been performed using the positive sample, was essential to search degradation products. For amitraz, nw-

XICs of all fragment ions were plotted (Fig. 1). There were four amitraz metabolites [i.e. *N,N'*-bisdimethylphenylformamidine, *N*-2,4-dimethyl-*N*-methylformamidine (TP-1 in Fig. 1), 2,4-dimethylformamidine and 2,4-dimethylaniline (TP-2 in Fig. 1)] that shared fragmentation pathways with their parent. Fragmentation-pathway information was more limited for malathion, as a consequence of the complexity of the matrix. When performing in-source fragmentation by TOF-MS, the precursor ion was not isolated as it would have been in MS² experiments (i.e. using a QTOF instrument), so it was difficult to study which ions are related to the parent compound, especially in complex matrices, such as pepper. Moreover, the low concentration of potential metabolites, compared to the high concentration of natural components of the sample, makes it difficult to detect low-abundance fragment ions. Despite the complexity of the pepper matrix, two malathion metabolites were identified.

Ferrer and Thurman [20] proposed a similar approach based on selecting one diagnostic ion characteristic of the fragmentation pathway of a chemical family of pesticides (i.e. triazines, phenyl ureas, organophosphorus, fluorobenzoyl ureas, neonicotinoids and conazole fungicides). For example, the nw-XIC at *m/z* 72.0444 (characteristic of phenyl ureas) from a spiked orange sample resulted in a peak for each phenyl-urea compound included in the list of compounds selected, suggesting the possibility of using only one diagnostic ion as a potential tool to identify pesticides and metabolites from the same family. This approach might be limited for some metabolites because some transformation processes might produce changes in the structure in the side of the molecule from which the diagnostic ion comes, making use of this diagnostic ion unsuccessful for identifying such metabolites.

Our own research group extended this approach, based on not only the fragmentation pathway of parent compound but also metabolites identified as being present in samples. Following this extended approach, the research [36] identified in orange-peel samples both a previously-unknown metabolite of imazalil and a known metabolite [1-(2,4)-dichloro-phenyl-2-imidazol-1-yl-ethanol].

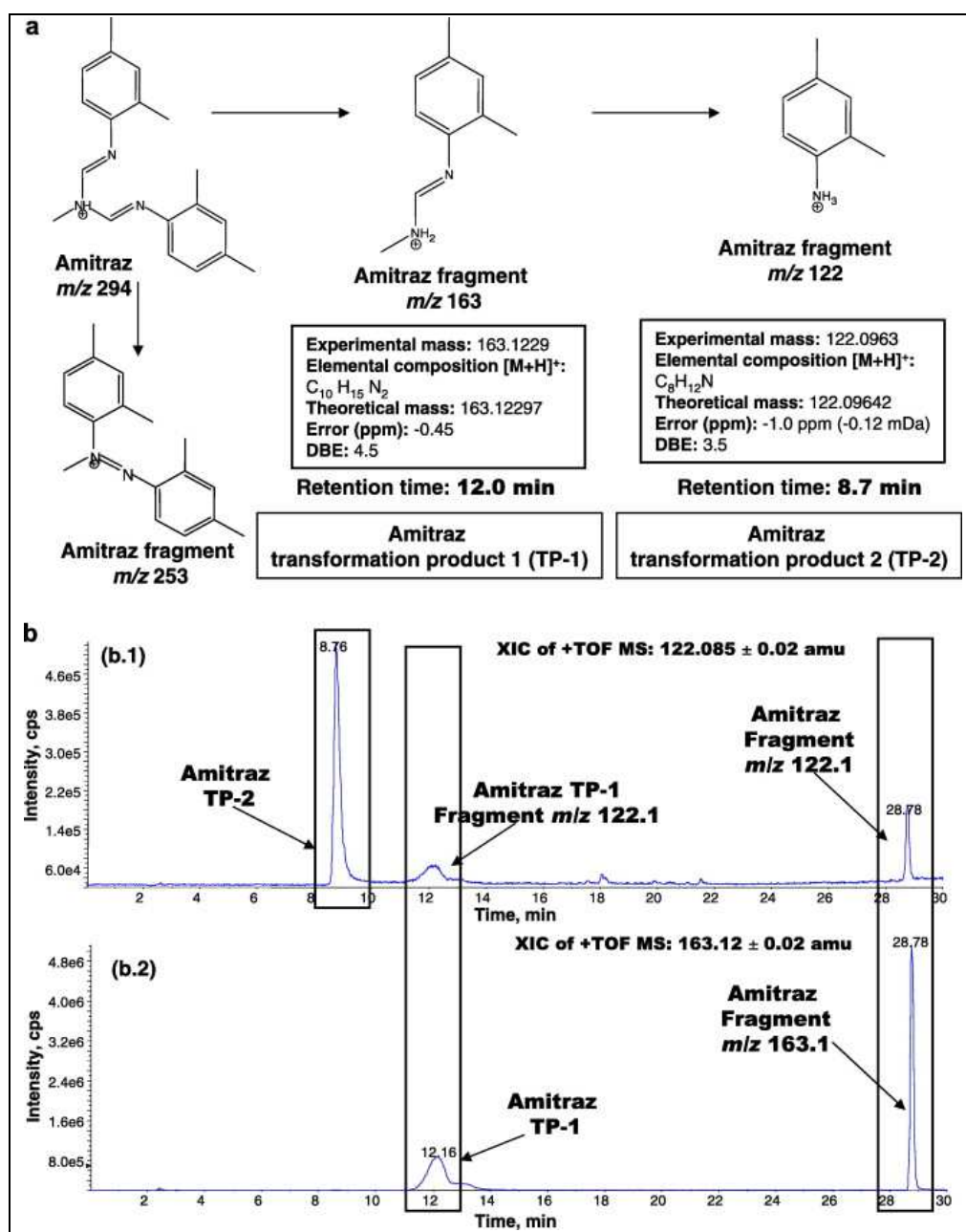


Figure 1. Identification of degradation products of pesticides in food by “fragmentation-degradation” relationships. (a) Fragmentation and degradation pathways of amitraz are the same, thus suggesting that pesticides are often transformed into degradation products in the same fashion that they are fragmented in the instrument; (b) Extracted ion chromatograms obtained from the LC-TOF-MS analysis of the pear extract being studied: (b.1) m/z 122.09 \pm 0.01 Da; and, (b.2) m/z 163.12 \pm 0.01; the peak at 12.16 min corresponds to amitraz transformation product 1 (TP-1) (*N*-2,4-dimethyl-*N*-methylformamide); and, the peak at 8.7 min corresponds to amitraz transformation product 2 (TP-2) (2,4-dimethylaniline) (Cited with permission from [39]).

To conclude, the strategy of “fragmentation-degradation” relationships can be considered one of the most interesting approaches to investigating the presence of metabolites in parent-positive samples, although the possibility that some metabolites would have different fragmentation pathways, because of a crucial change to a chemical group, means that it would not reveal the presence of all metabolites.

Generally, when investigating metabolites in parent-positive samples by LC-TOF-MS, some difficulty would arise where a parent pesticide in the sample totally degraded, because it would then be impossible to apply the strategy of “fragmentation-degradation” relationships. Another drawback arises when metabolite concentrations are very low, especially when working with complex matrices, as the peaks of interest might be masked by isobaric abundant ions in the full-scan spectrum. Besides, an inherent handicap of using TOF-MS arises from the need to produce in-source fragmentation, as not all investigated compounds produce an abundant and reproducible fragmentation in the source, so better fragmentation is required to improve success in metabolite discovery. Fragmentation would be optimized in a collision cell, which can be incorporated into an MS² instrument. Fortunately, the new generation of QTOF instruments allows fragmentation to be performed in the collision cell without precursor-ion selection, thus improving the generation of fragment ions. Hopefully, this possibility will allow more advantage to be taken of the fragmentation-degradation approach.

3.2. Identification under controlled conditions

Although attention has rarely been paid to analysis of pesticide metabolites, there is a growing interest on this subject because:

- (a) some metabolites can be rather persistent and are as hazardous as parent compounds [37], [38] and [39];
- (b) the present regulations on drinking water and environmental waters include relevant metabolites within the group of compounds to be investigated; and,
- (c) data available show that concentrations of pesticide metabolites in environmental water are often higher than those of parent compounds [5], [8] and [16].

For these reasons, to have better knowledge of water and food quality, the most relevant metabolites should be incorporated into current analytical methods, but reliable identification of these compounds in samples is one of the

most important analytical tasks. TOF-MS, especially QTOF-MS, plays an important role in performing this task, as we describe in the following paragraphs.

Our own research group has applied LC-QTOF-MS to study the photodegradation of four triazine herbicides in water after exposure to ultraviolet (UV) light [40]. After acquisition in full-scan mode, the chromatogram of a control sample was compared, using specialized software, with those of spiked, UV-exposed samples, on the assumption that different chromatographic peaks corresponded to potential metabolites. For each compound, 3–5 degradation products were identified, and some were even below 2% of the total peak area. In some cases, MS² experiments with accurate-mass measurements were necessary to elucidate their structures. The most important triazine metabolites identified by LC-QTOF-MS were subsequently included in a multi-residue method developed at our laboratory, which was applied to groundwater and surface-water samples [5]. Only 25% of positive findings at concentrations above 0.1 µg/L corresponded to parent triazines and around 75% corresponded to their metabolites, in this way illustrating the importance of investigating metabolites in water samples using QTOF-MS. This methodology, based on irradiating spiked water samples under laboratory-controlled conditions and subsequent investigation of the compounds formed by LC-QTOF-MS, was afterwards applied to other pesticides frequently detected in the Mediterranean Spain region [8] (e.g., insecticides bromacil and diuron) or fungicide imazalil. In some cases, it was necessary to use accurate masses to differentiate between isobaric compounds. For example, the nominal mass of a diuron metabolite was 219, which could be attributed to the elemental composition C₈H₉N₂OCl₂ (*m/z* 219.0092) or C₉H₁₃N₂Cl₂ (*m/z* 219.0456), both compatible with the empirical formula of diuron (*m/z* 233.0248, C₉H₁₁N₂OCl₂). When using the experimental mass of the compound detected (*m/z* 219.0135), we obtained differences of 4.3 and 32.1 mDa, respectively, which allowed us to establish its elemental composition as C₈H₉N₂OCl₂. These compounds would have been indistinguishable using nominal masses provided by a quadrupole or IT instrument. The use of QTOF was also helpful in differentiating between isomeric compounds (e.g., the nitrated derivate of imazalil, in which the NO₂ group was finally located in the phenyl ring after performing MS² spectra with accurate-mass measurements).

The photodegradation and metabolism of organophosphorus-insecticide diazinon was also investigated by LC-QTOF-MS [41]. Spiked environmental water was irradiated with a UV mercury lamp for 9 days, sampling 3-mL aliquots approximately every 12 hours. Also, both *in vitro* (microsomes) and *in vivo* (rats) metabolism experiments were carried out with different substrate concentrations

and incubation times. Nine metabolites were identified using accurate-mass measurements. Despite the evident advantages of QTOF, the unequivocal elucidation of the structure of some compounds was not feasible due to the limited understanding of the fragmentation rules in MS² of (de)protonated molecules.

The photocatalytic degradation products of diazinon in aqueous suspensions were also studied by Kouloumbus et al. [42] using GC-IT-MS and LC-QTOF-MS. Data obtained by GC-MS were complemented with exact-mass measurements on both precursor and fragment ions obtained with LC-QTOF-MS. On the basis of the intermediates identified, a degradation pathway for diazinon was proposed.

Hogenboom et al. characterized photodegradation products of alachlor in water after irradiation with a UV mercury lamp [43]. In addition to the 4–6 products detected by GC-MS, several compounds were detected by LC-MS. With LC-MS, various MS² scanning strategies using neutral loss and precursor-ion scan were applied to screen for degradation products of pesticides. Afterwards, LC-TOF-MS was used to obtain accurate-mass information for the peaks detected, as well as their fragment ions, by applying in-source collision-induced dissociation (CID).

Using LC-MS² with a QTOF analyzer, Detomaso et al. [44] investigated the structural elucidation of seven by-products from photodegradation of carbofuran with a high-pressure UV lamp. Accurate-mass measurements of product ions allowed removal of ambiguities concerning neutral losses having the same nominal mass, namely CO (m/z 27.9949) and C₂H₄ (m/z 28.0313), so that the fragmentation patterns could be resolved.

Recently, exact-mass measurements using Ultra Performance LC (UPLC)-QTOF-MS have made it possible to identify two bentazone metabolites in different types of water exposed to light from systems simulating natural sunlight [45].

All these papers illustrate the extraordinary potential of LC-MS or LC-MS² with QTOF analyzers for qualitative and structural analysis, which offers analytical chemists one of the most powerful tools available at present to investigate the degradation of pesticides in water.

For vegetables, Directive 91/414/EEC [9], which concerns the placing of plant-protection products on the market, establishes the need to perform metabolism studies to identify metabolic and degradation products in plants. On the basis of this information, the most abundant metabolites of toxicological relevance are included in the definition of residue. Metabolites specifically included are

regularly determined for inspection of MRLs in food. However, information on the most relevant metabolites to be determined in food samples is not abundant in scientific literature, and most pesticide-residue laboratories typically include parent compounds but only a few selected metabolites in their analysis.

An interesting possibility for investigating the presence of pesticide metabolites in vegetables is to work with samples from field trials on residues, from which blank specimens of the same variety and state of growth can be collected. The methodology is based on comparing blank and treated samples using specialized software (e.g., MetaboLynx). Blank samples have characteristics identical to those of treated samples, and that facilitates obtaining only those peaks corresponding to the metabolized or degraded pesticide. Each chromatographic peak found in the treated sample, but not in the control sample, is considered as a potential metabolite. The molecular formula for each potential metabolite is then obtained from accurate masses and the isotopic pattern observed in the mass spectrum. Following this approach, a buprofezin metabolite was elucidated in banana samples [46]. After accurate-mass and isotopic-pattern filtering, two possible oxidized metabolites could be proposed, a ring-hydroxylated metabolite and sulfoxide (Fig. 2). At this point, it was essential to use a QTOF-MS² analyzer, as it allowed the correct chemical structure to be established as a hydroxylated metabolite.

A similar study of organophosphorus-pesticide fenthion and its metabolites in samples from two varieties of orange used QTOF-MS [32]. A first acquisition in TOF-MS established differences between untreated and treated samples. MS data from the TIC were manually interrogated, looking for any evident peak in the chromatogram of the fenthion-treated samples that was not present in the control samples. Due to the complexity of the matrix, some metabolites of fenthion were invisible in the TIC, so possible ions corresponding to known metabolites, referenced in the literature, were extracted from the TIC as nw-XICs. To consider a peak a potential metabolite, it had to appear in several of the treated samples collected at different times, following the criteria of robustness in the retention time (± 0.1 min) and the m/z value (± 20 ppm). After that, the identity of the compound was studied using accurate-mass data and isotopic pattern to obtain a possible empirical formula.

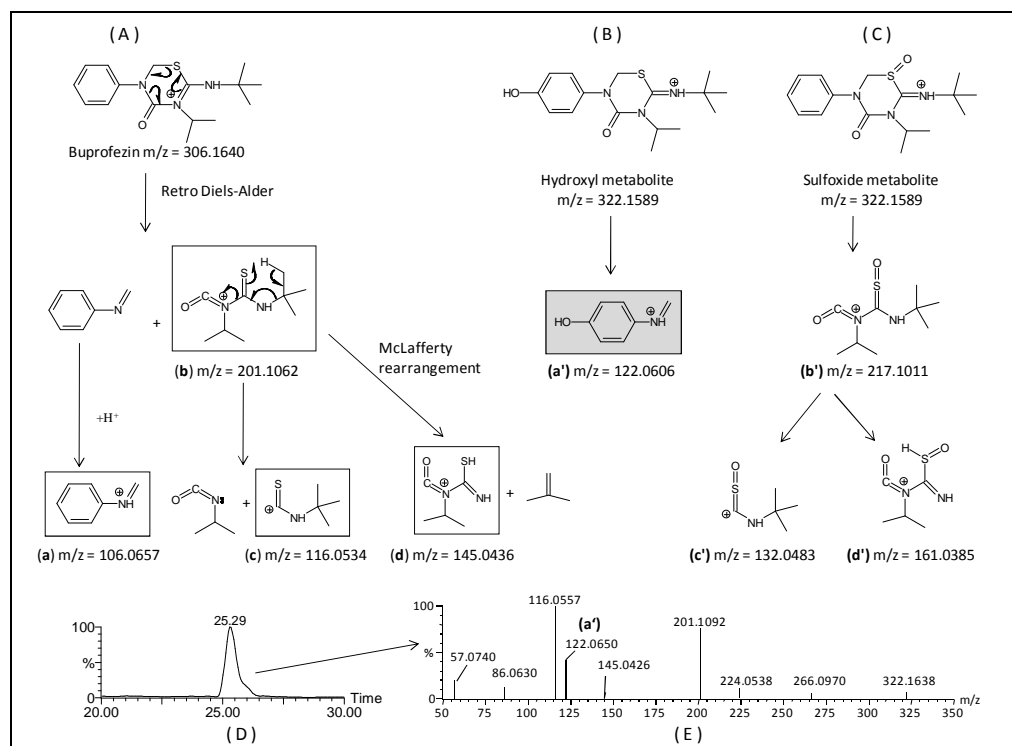


Figure 2. Identification of a hydroxyl buprofezin metabolite in banana by LC-QTOF-MS. Suggested fragmentation pathways (only differential product ions are shown) for (A) buprofezin (B) hydroxyl metabolite and (C) a potential sulfoxide metabolite; (D) LC-TOF-MS² chromatogram; (E) Combined product ion spectrum (precursor ion $m/z = 322$) from a positive buprofezin banana-skin sample (0.28 mg/kg) containing the hydroxyl metabolite.

Performing MS² experiments led to the final structural elucidation of the metabolites. The presence of these compounds was also confirmed by ESI-IT-MS, after performing successive fragmentation steps (MSⁿ). Once identified, each metabolite was quantified and confirmed by comparison with its analytical reference standard. Fenthion sulfone and fenthion sulfoxide, as well as fenthion-oxon sulfoxide and fenthion-oxon sulfone, were found in treated samples of orange, and could be unequivocally confirmed and quantified because reference standards were available and could be injected.

The use of specialized software is crucial for a rapid and successful comparison between blank and treated full-scan data obtained the metabolite-discovery process, as manual inspection of TICs to look for visible peaks can easily fail when matrices are complex.

3.3. Non-target screening

Both water-pollution monitoring and food-quality control typically make use of target analysis (normally based on usage of the pesticides, their occurrence or their inclusion in priority lists), the scope of which rarely exceeds several tens of analytes, it being quite unusual to find analytical methods applied to more than 150 pesticides [6], [7], [47] and [48]. LC-MS² in SRM mode has become one of the most powerful techniques in (multi)-residue pesticide analysis. However, working in MS² mode makes any MS system blind to all other compounds [39]. Under these circumstances, only a limited number of analytes is recorded, so other potentially harmful, non-targeted analytes, may also be present in the samples but would not be detected in a target analysis.

As an alternative to MS² instruments, TOF analyzers provide the selectivity and the sensitivity required for efficient and wide-ranging screening, as they combine high full-spectral sensitivity with both increased mass accuracy and mass resolution, allowing the mass of any ionizable component in the sample to be measured accurately. The advantage of a TOF-MS analyzer for screening comes from its ability to examine a data file for a theoretically unlimited number of pesticides and their metabolites. The LC-TOF-MS approach enables screening for hundreds of compounds with high sensitivity within one run, making this technique very attractive for performing both target and non-target analysis.

A non-target analysis would require visual inspection of the TIC chromatogram to find potential components present in the sample. However, low-abundance compounds might not be apparent by visual inspection and intense peaks might not necessarily be associated with a single component.

A genuine non-target analysis requires deconvolution software able to detect the components in the sample. In a previous work [49], we explored the potential of LC-QTOF-MS for the elucidation of non-target unknown compounds in different water samples. After acquisition in full-scan mode, data were processed using MetaboLynx software. Accurate-mass measurement of selected peaks allowed the elemental compositions of candidates to be calculated. To reduce the number of possible elemental compositions, we applied an approach based on the experimentally-observed isotopic abundances and on performing QTOF-MS² experiments. The remaining elemental compositions were searched in available databases. This methodology allowed us to elucidate the structures of several unknown compounds in samples. In most cases, it was not feasible to propose the structure of the unknown, although molecular formulae and some functional groups could be highlighted. The success of this procedure depends in some way

on the availability of compound databases to search. Further restrictions came from the need to pre-select "relevant" peaks, normally based on peak intensity, as a compromise between time, effort invested and information gathered had to be reached.

Rather than perform a general screening for unknowns, it seems reasonable to focus identification effort on relevant compounds and not on all unknown peaks present in the sample, as not all LC-amenable compounds present in environmental waters are necessarily "relevant" for man or the environment [50]. This can be facilitated by making use of vast spectral libraries, which can include many relevant compounds.

Following this idea to identify pesticides in food and water samples, Ferrer et al. [19] used a semi-automated "molecular-feature" and database search, involving the exact monoisotopic mass of 100 compounds, at least one exact mass in-source fragment for each compound and chromatographic retention time. The software compiled a list of accurate-mass ions, excluded noise, and compared them with the monoisotopic exact masses in the database. The screening criteria consisted of ± 5 -ppm accurate-mass window, ± 0.2 -min retention-time window, and a minimum signal-to-noise ratio of $\approx 10:1$. In spite of the progress made, there were still some limitations using this approach due to matrix interferences, the loss of mass accuracy and the impossibility of automating the matching of isotopic distribution.

Recently, UPLC-TOF-MS in combination with the ChromaLynx software was applied for non-target screening of environmental waters and wastewaters [28]. After chromatographic-peak deconvolution, the software discriminated ions coming from organic compounds present in the sample from background ions. In a second step, a library search was performed to match the deconvoluted mass spectra of proposed components with existing entries in available libraries. Finally, the formula from the library hit was submitted to an elemental-composition calculator and the most intense ions (up to 30 ions being feasible) were either confirmed or rejected based on accurate-mass criteria and isotopic pattern.

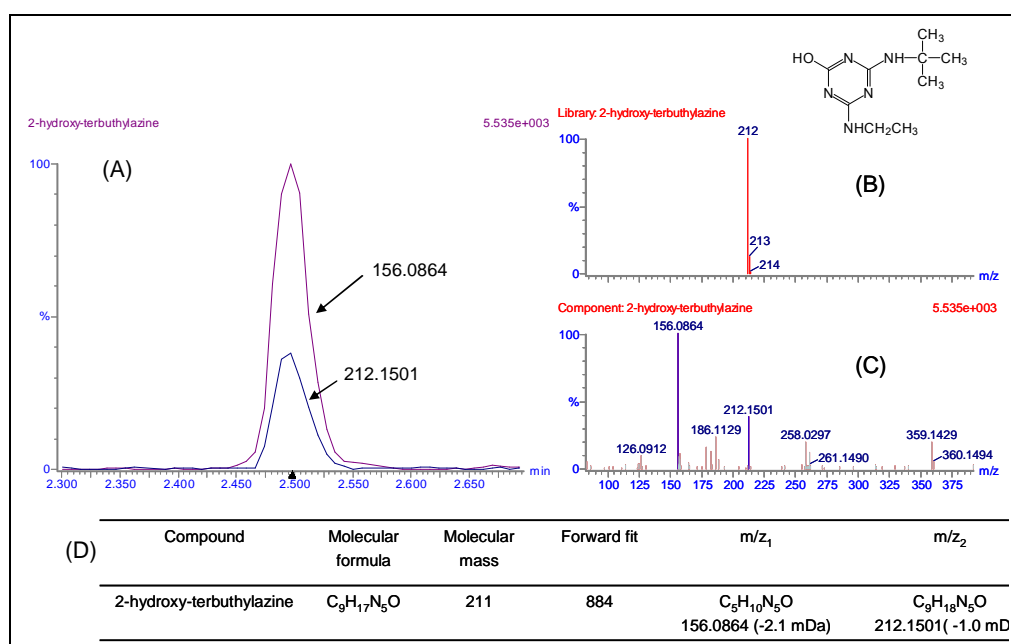


Figure 3. Identification of non-target 2-hydroxy-terbutylazine in a surface-water sample. (A) Extracted ion chromatogram for two deconvoluted 2-hydroxy-terbutylazine ions, (B) Theoretical library mass spectrum of 2-hydroxy-terbutylazine at nominal mass. (C) Deconvoluted accurate-mass spectrum of 2-hydroxy-terbutylazine in surface water. (D) Library forward fit and accurate-mass confirmation of the two deconvoluted ions (mass errors in mDa, in brackets).

The main difficulty associated with this approach is the lack of LC-MS standardized libraries as a consequence of the well-known differences in ionization efficiency between existing interfaces, together with the variability in the results depending on the composition of the mobile phase or the cone voltage applied. Under these circumstances, it is necessary to build home-made libraries to facilitate searching. Obviously, the higher the number of compounds included in the library, the greater the possibilities of detecting as many contaminants as possible in positive samples. Luckily, nowadays it is possible to build both empirical and/or theoretical library databases using available software. We have already commented on the advantages and the limitations of using theoretical or empirical libraries in a previous work [28], for which we built a theoretical library containing around 500 contaminants, including 377 pesticides and 40 metabolites, 47 antibiotics, 20 other pharmaceuticals and seven other emerging contaminants frequently detected in the environment, such as cocaine and caffeine. As an example, Fig. 3 shows the identification of the metabolite 2-hydroxy-terbutylazine in a surface-water sample. Accurate-mass confirmation automatically performed by the software for two ions (parent ion and an in-

source fragment corresponding to the loss of the *tert*-butyl group [40]) led to the safe identification of 2-hydroxy-*tert*-butylazine in the sample with mass errors below 2.1 mDa.

4. Conclusions and future trends

LC-TOF-MS has great potential for investigating the presence of pesticide metabolites in environmental and food samples. Its capability comes from its inherent characteristics of mass accuracy and increased resolution, which give great confidence in the process of identification and elucidation. The use of isotopic-distribution filtering, together with evaluation of possible in-source fragment ions or product ions, increases the reliability of this process. This technique has been successfully applied in multi-residue target analysis, and has allowed the safe identification of metabolites detected in samples, as well as their accurate quantitation once the target methods have been previously validated using commercially-available reference standards.

The extraordinary qualitative capability of TOF-MS can be better exploited when searching for large numbers of pesticides and metabolites in environmental or food samples after MS-data acquisition (post-target screening). Special features of LC-TOF-MS are also useful in laboratory or field experiments on metabolism and degradation, the objective of which is to identify the main metabolites and degradates of parent pesticides. QTOF-MS offers more possibilities for further investigating the identity of the compounds detected due to the valuable information obtained from MS² experiments on product-ion accurate-mass spectra.

Furthermore, TOF-MS is a very attractive tool for non-target analysis, in which the use of large libraries (theoretical and/or empirical) can facilitate identification and discovery of unknowns in this type of sample. The huge amount of useful information provided by TOF-MS, together with the measurements of the accurate masses of several representative ions using powerful software, has proved to be an efficient approach for non-target screening in water samples. Some limitations have been observed in this challenging task, as the deconvolution software has failed when trying to discriminate ions from background when the ions were present in samples at low levels of concentration [51]. Future improvements are expected in deconvolution software in order to increase the success in detecting components, especially at low levels of concentration.

Acknowledgements

The authors are very grateful to Serveis Centrals d'Instrumentació Científica (SCIC), University Jaume I, for the use of the QTOF instrumentation. This equipment was bought thanks to European FEDER Funds. The authors acknowledge financial support from the Ministerio Español de Ciencia y Tecnología (Project CTQ2006-07594).

References

- [1] European Commission, Guidelines for the generation of data concerning residues as provided in Annex II, part A, section 6, and Annex III, part A, section 8, of Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market. Appendix A: Metabolism and Distribution in Plants, Doc 7028/VI/95, 22 July 1997
 - [2] European Commission, Regulation (EC) No. 396/2005 on maximum residue levels of pesticides in products of plant and animal origin. Annex II
 - [3] F. Hernández, J.V. Sancho and O.J. Pozo, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **16** (2002), p. 1766.
 - [4] J.V. Sancho, O.J. Pozo and F. Hernández, *Analyst (Cambridge, UK)* **129** (2004), p. 38.
 - [5] J.M. Marín, J.V. Sancho, O.J. Pozo, F.J. López and F. Hernández, *J. Chromatogr., A* **1133** (2006), p. 204.
 - [6] M. Hiemstra and A. de Kok, *J. Chromatogr., A* **1154** (2007), p. 3.
 - [7] T. Pihlström, G. Blomkvist, P. Friman, U. Pagard and B.G. Österdahl, *Anal. Bioanal. Chem.* **389** (2007), p. 1773.
 - [8] F. Hernández, M. Ibáñez, O.J. Pozo and J.V. Sancho, *J. Mass Spectrom.* **43** (2008), p. 173.
 - [9] European Commission, Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market, EU Off. J. L 230 (1991) pp. 1–32
 - [10] European Commission, Council Directive 98/83/EC on the quality of water intended for human consumption, EU Off. J. L 330 (1998) pp. 32–54
-

- [11] European Commission, Guidance document on the assessment of the relevance of metabolites in groundwater of substances regulated under Council Directive 91/414/EEC, Sanco/221/2000, 25 February 2003
- [12] D.W. Kolpin, E.M. Thurman and S.M. Linhart, *Sci. Total Environ.* **248** (2000), p. 115.
- [13] R. Tauler, D. de Almeida Azevedo, S. Lacorte, R. Céspedes, P. Viana and D. Barceló, *Environ. Technol.* **22** (2001), p. 1043.
- [14] S.J. Kalkhoff, K.E. Lee, S.D. Porter, P.J. Terrio and E.M. Thurman, *J. Environ. Quality* **32** (2003), p. 1025.
- [15] G.V. Steele, H.M. Johnson, M.W. Sandstrom, P.D. Capel and J.E. Barbash, *J. Environ. Quality* **37** (2008), p. 1116.
- [16] F. Hernández, J.M. Marín, O.J. Pozo, J.V. Sancho, F.J. López and I. Morell, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **88** (2008), p. 409
- [17] J.V. Sancho, O.J. Pozo, M. Ibáñez and F. Hernández, *Anal. Bioanal. Chem.* **386** (2006), p. 987.
- [18] O.J. Pozo, J.V. Sancho, M. Ibáñez, F. Hernández and W.M.A. Niessen, *Trends Anal. Chem.* **25** (2006), p. 1030.
- [19] I. Ferrer, A. Fernández-Alba, J.A. Zweigenbaum and E.M. Thurman, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **20** (2006), p. 3659.
- [20] I. Ferrer and E.M. Thurman, *J. Chromatogr., A* **1175** (2007), p. 24.
- [21] European Commission, European Union Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, EU Off. J. L 221 (2002) pp. 8–36
- [22] F. Hernández, M. Ibáñez, J.V. Sancho and O.J. Pozo, *Anal. Chem.* **76** (2004), p. 4349.
- [23] E.M. Thurman, I. Ferrer and J.A. Zweigenbaum, *Anal. Chem.* **78** (2006), p. 6702.
- [24] L. Alder, K. Greulich, G. Kempe and B. Vieth, *Mass Spectrom. Rev.* **25** (2006), p. 838.
- [25] C. Soler, J. Mañes and Y. Picó, *Crit. Rev. Anal. Chem.* **38** (2008), p. 93.
-

- [26] Y. Picó, C. Blanco and G. Font, *Mass Spectrom. Rev.* **23** (2004), p. 45.
- [27] F. Hernández, O.J. Pozo, J.V. Sancho, F.J. López, J.M. Marín and M. Ibáñez, *Trends Anal. Chem.* **24** (2005), p. 596.
- [28] M. Ibáñez, J.V. Sancho, D. McMillan, R. Rao and F. Hernández, *Trends Anal. Chem.* **27** (2008), p. 481.
- [29] J.F. García-Reyes, A. Molina-Díaz and A.R. Fernández-Alba, *Anal. Chem.* **79** (2007), p. 7308.
- [30] B. Gilbert-López, J.F. García-Reyes, M. Mezcuca, A. Molina-Díaz and A.R. Fernández-Alba, *J. Agric. Food Chem.* **55** (2007), p. 10548.
- [31] E.M. Thurman, I. Ferrer, J.A. Zweigenbaum, J.F. García-Reyes, M. Woodman and A.R. Fernández-Alba, *J. Chromatogr., A* **1082** (2005), p. 71.
- [32] Y. Picó, M. Farré, C. Soler and D. Barceló, *Anal. Chem.* **79** (2007), p. 9350.
- [33] T.R. Roberts, D.H. Hutson, P.J. Jewess, P.W. Lee, P.H. Nicholls and J.R. Plimmer, *Metabolic Pathways of Agrochemicals*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK (1999).
- [34] J.F. García-Reyes, I. Ferrer, E.M. Thurman, A. Molina-Díaz and A.R. Fernández-Alba, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **19** (2005), p. 2780.
- [35] J.F. García-Reyes, A. Molina-Díaz and A.R. Fernández-Alba, *Anal. Chem.* **79** (2007), p. 307.
- [36] S. Grimalt, J.V. Sancho, O.J. Pozo, F. Hernández, (2008) (submitted for publication).
- [37] C. Soler, J. Mañes and Y. Picó, *J. Chromatogr., A* **1109** (2006), p. 228.
- [38] C. Medana, P. Calza, C. Baiocchi and E. Pelizzetti, *Curr. Org. Chem.* **9** (2005), p. 859.
- [39] J.F. Garcia-Reyes, M.D. Hernando, A. Molina-Diaz and A.R. Fernández-Alba, *Trends Anal. Chem.* **26** (2007), p. 828.
- [40] M. Ibáñez, O.J. Pozo, J.V. Sancho and F. Hernández, *Anal. Chem.* **76** (2004), p. 1328.
- [41] M. Ibáñez, J.V. Sancho, O.J. Pozo and F. Hernández, *Anal. Bioanal. Chem.* **384** (2006), p. 448.
-

- [42] V.N. Kouloumbos, D.F. Tsiipi, Hiskia A.E., Nikolic D., Van Breemen R.B. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **14** (2003), p. 803.
- [43] A.C. Hogenboom, W.M.A. Niessen and U.A.Th. Brinkman, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14** (2000), p. 1914.
- [44] A. Detomaso, G. Mascolo and A. Lopez, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **19** (2005), p. 2193.
- [45] M. Peschka, M. Petrovic, T.P. Knepper and D. Barceló, *Anal. Bioanal. Chem.* **388** (2007), p. 1227.
- [46] S. Grimalt, O.J. Pozo, J.V. Sancho and F. Hernández, *Anal. Chem.* **79** (2007), p. 2833.
- [47] S.J. Lehotay, A. De Kok and M. Hiemstra, *J. AOAC Int.* **88** (2005), p. 595.
- [48] I.R. Pizzutti, A. De Kok, R. Zanella, M.B. Adaime, M. Hiemstra, C. Wickert and O.D. Prestes, *J. Chromatogr., A* **1142** (2007), p. 123.
- [49] M. Ibáñez, J.V. Sancho, O.J. Pozo, W. Niessen and F. Hernández, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **19** (2005), p. 169.
- [50] I. Bobeldijk, P.G.M. Stoks, J.P.C. Vissers, E. Emke, J.A. van Leerdam, B. Muilwijk, R. Berbee and Th.H.M. Noij, *J. Chromatogr., A* **97** (2002), p. 167.
- [51] T. Portolés, E. Pitarch, F.J. López and F. Hernández, *Anal. Chem.* **79** (2007), p. 9494.
-

4.2.3. Discusión del artículo

A lo largo del artículo se discuten los diferentes enfoques posibles cuando se desea estudiar la presencia de metabolitos de plaguicidas en muestras ambientales, como aguas, o en muestras de alimentos, como productos vegetales. Desde el punto de vista analítico el uso del LC-TOF MS puede ir dirigido hacia dos vertientes en función del conocimiento que se tiene del metabolito: como *target*, donde se dispone del conocimiento previo sobre la existencia del metabolito y en muchos casos existe patrón de referencia disponibles comercialmente; o, *non-target*, cuando no se dispone información previa sobre el potencial metabolito (no existe ninguna selección previa de los compuestos a buscar).

A) Análisis Target

Este modo de análisis mediante LC-TOF-MS se basa en la búsqueda de la m/z exacta teórica de metabolitos que son conocidos. A partir de la extracción de cromatogramas mediante el uso de *nw-XICs* de la adquisición en *full scan*, se obtienen cromatogramas en los que se puede detectar la presencia de los plaguicidas y sus metabolitos. A su vez, la capacidad del analizador TOF de proporcionar masa exacta permite confirmar la presencia de los compuestos detectados, generalmente con error de masa por debajo de 5 ppm en análisis de rutina (Ferrer *et al.*, 2006). En este sentido y con el objetivo de poder efectuar una correcta identificación de la presencia de un analito mediante TOF MS, se ha recurrido al uso de más de un ión de identificación característico del compuesto. En el caso de analitos que presentaban otros iones con suficiente abundancia, correspondientes a su distribución isotópica (por ejemplo, analitos clorados), eran seleccionados como segundo ion. Mientras que para otros compuestos que no presentan esta característica, fue necesario provocar su fragmentación en la fuente de ionización, intentando seleccionar los iones fragmento más específicos posible (Ferrer *et al.*, 2007). De esta forma, cuando se adquiere más de un ion identificativo con masa exacta para un compuesto se llega a cumplir una correcta identificación con 3 ó 4 puntos de identificación (IPs), requeridos para compuestos autorizados o prohibidos, respectivamente.

La búsqueda de metabolitos ya descritos puede llevarse a cabo mediante un método *target* utilizando dos estrategias distintas. Por un lado, si existe una intencionalidad previa de la búsqueda de dicho metabolito y se dispone del patrón, se inyecta el mismo obteniendo el tiempo de retención, además de los iones de identificación característicos. A partir de esta información se crea un

método de extracción de las masas teóricas al tiempo de retención esperado. Este tipo de estrategia lo hemos etiquetado como métodos *pre-target*. Por otro lado, gracias a que el analizador TOF presenta una alta capacidad resolutive y también a su modo de adquisición en *full scan* con alta sensibilidad, es posible hacer una búsqueda de un metabolito conociendo su m/z teórica con posterioridad a la adquisición de datos MS. Esta búsqueda posterior a la inyección, sin necesidad de reanálisis de la muestra, se ha denominado como *post-target*. Una de las ventajas más interesantes del análisis *post-target* es que permite investigar la presencia de un alto número de compuestos presentes en la muestra, obviamente con la limitación de los requerimientos analíticos de extracción, de cromatografía o ionización en MS que debe superar el compuesto.

Dentro de las dos estrategias, es interesante comentar que la búsqueda en modo *pre-target* viene a ser lo que habitualmente se entiende como método multirresidual y que generalmente se suele aplicar usando analizadores QqQ. Incluso cabría destacar que el análisis multirresidual de metabolitos pre-seleccionados mediante QqQ resultaría más efectivo que con el analizador TOF, debido a su mayor sensibilidad en modo SRM, así como una potencial capacidad confirmatoria si se adquieren dos o más transiciones por analito. Sin embargo, la búsqueda *post-target* es una aproximación más adecuada para el analizador TOF, que permite explotar su alta sensibilidad en modo *full scan*. Teniendo en cuenta estos puntos de vista, el uso de métodos *post-target* con TOF-MS nos permitirá encontrar e identificar un mayor número de metabolitos, que podrán ser incluidos posteriormente, si se consideran relevantes, en métodos analíticos *pre-target* mediante QqQ, sobre todo cuando el patrón de referencia se encuentre comercialmente disponible.

El uso del instrumento (Q)TOF-MS no se ha extendido apenas en el análisis *target* de metabolitos en muestras de origen medioambiental o en alimentos, probablemente debido a que su aplicación es reciente en este campo. Por otro lado, el alto coste de esta técnica hace que su uso se limite a otros campos. En el campo medioambiental y alimentario las excelentes prestaciones de este analizador parecen encajar mejor en análisis tipo *screening*, con un enfoque *post-target*, e incluso *non-target*. Sólo se han encontrado unos pocos artículos en los que se hace uso del instrumento LC-TOF MS en modo *pre-target*, habiéndose aplicado a unos pocos metabolitos incluidos dentro de un listado de varios plaguicidas (Ferrer *et al.*, 2007; García-Reyes *et al.*, 2007; Gilbert-López *et al.*, 2007). También se ha aplicado QTOF-MS para el estudio de metabolitos de fention en muestras de naranja (Picó *et al.*, 2007).

B) Análisis Post-target: elucidación e identificación de metabolitos de plaguicidas

Las características del analizador TOF de alta selectividad (eliminación de interferentes usando estrechas ventanas de extracción (nw-XICs)) y especificidad (asignación de una fórmula empírica, gracias a la masa exacta), hacen que sea uno de los instrumentos más adecuados e imprescindibles para la búsqueda de compuestos desconocidos, para su elucidación e identificación, entre ellos metabolitos de plaguicidas. Dentro de este tipo de análisis se pueden diferenciar dos estrategias:

- a) La búsqueda de metabolitos de plaguicidas tanto conocidos como desconocidos en una muestra positiva para un plaguicida, que haya sido previamente detectado (por ejemplo, por LC-MS² con QqQ);
- b) la búsqueda de compuestos relacionados con la aplicación de un plaguicida en experimentos controlados de campo o laboratorio; estudiando a su vez las rutas de metabolismo o degradación en diferentes medios (aguas, suelos, plantas o animales).

B.1) Búsqueda de metabolitos en muestras positivas al plaguicida precursor

Si se encuentra una muestra positiva a un plaguicida es probable que se puedan encontrar sus metabolitos en dicha muestra. De esta manera, la búsqueda de metabolitos de un determinado plaguicida en muestras positivas parece una aproximación específica y muy interesante. En principio, si se conoce el metabolito que se pretende buscar, se trataría de una aproximación *post-target*, ya que una simple extracción del cromatograma a la masa exacta esperada nos informaría de la presencia de picos potencialmente atribuibles al metabolito. Sin embargo, la aplicación más interesante de esta estrategia es investigar la presencia de otros metabolitos no descritos o no pre-seleccionados. En este sentido se han utilizado dos metodologías:

- selección manual de los picos más abundantes encontrados *de visu* en el cromatograma de la suma total de iones (TIC), combinando los espectros de estos picos y observando en ellos las masas exactas. A partir de esas masas exactas se pueden obtener fórmulas moleculares que, posteriormente, son confrontadas con bases de datos;
-

- hacer uso de la posible relación entre los iones de fragmentación del plaguicida y de sus metabolitos, esperando que el comportamiento de las rutas de fragmentación sean similares y existan iones comunes. Se extraen cromatogramas a las masas exactas de los iones fragmento del plaguicida precursor, donde pueden aparecer otros picos a tiempos de retención diferentes al propio plaguicida, que corresponderían a potenciales metabolitos.

Se ha descrito la búsqueda de metabolitos de los plaguicidas imazalil y procloraz (García-Reyes *et al.*, 2005; Thurman *et al.*, 2005) mediante TOF-MS, obteniéndose la medida de masas exactas y proponiéndose así la composición elemental de los iones. Además, de hacer uso del analizador IT para obtener información estructural complementaria. En uno de los trabajos (Thurman *et al.*, 2005) se usó la relación isotópica del cloro para la búsqueda manual de plaguicidas en zumo de pera y uva. Se encontró un pico desconocido que presentaba 2 cloros y cuya masa exacta correspondía a la fórmula molecular de $C_{15}H_{17}N_2OCl_2$, con un error de masa de 1.1 ppm. Esta fórmula molecular no encajaba con ningún compuesto de la base de datos. Se dedujo que probablemente correspondía a un metabolito metilado del imazalil, pues le diferenciaba únicamente un metilo de su fórmula molecular. Para llegar a una correcta identificación, se estudiaron los iones de fragmentación producidos en la fuente de ionización en la adquisición TOF MS del posible metabolito y del imazalil. A pesar de realizar una adquisición a colisión alta en la fuente, apenas se encontraron iones abundantes para una correcta elucidación. Por esta razón, se realizaron experimentos en tándem MS mediante el uso de IT, pero sin llegar a una identificación inequívoca del metabolito propuesto.

En el otro trabajo (García-Reyes *et al.*, 2005), se investigó la presencia de potenciales metabolitos en muestras de cítricos que habían sido positivas a imazalil y procloraz. Para ello, se fue examinando los picos abundantes y visibles en el TIC, obteniendo sus espectros con masas exactas. Gracias a la característica relación isotópica del cloro (2 Cl para imazalil; 3 Cl para procloraz) se localizaron dos metabolitos, uno de cada fungicida. Se propusieron fórmulas moleculares con un error de masa por debajo de 1.5 ppm. Éstas fueron buscadas en las bases de datos (Merk Index, ChemIndex y catálogo comercial de Sigma-Aldrich), encontrando un metabolito del imazalil (1-(2,4)-dicloro-fenil-5-imidazol-1-il-etanol) cuyo patrón estaba disponible de forma comercial. En el caso del procloraz, se realizaron experiencias en tándem MS mediante el uso de IT,

obteniendo fragmentos producto que resultaban coherentes con estructuras químicas relacionadas con el procloraz.

Este modo de búsqueda manual de metabolitos en muestras positivas presenta importantes limitaciones. La primera y más importante es la necesidad de encontrar un pico que destaque en el TIC, para empezar a sospechar la presencia del metabolito. De esta forma, los picos que no fueran visibles en el TIC no podrían ser estudiados. También sería necesaria una propiedad destacable del compuesto, como una relación isotópica característica (presencia de átomos de cloro), para guiarnos hacia la posible presencia del metabolito entre todos los iones del espectro. En tercer lugar, para poder realizar la identificación de la fórmula molecular resultante debería aparecer en las bases de datos, por lo que dichas bases de datos tendrían que presentar un alto número de metabolitos. En caso de que el metabolito no se haya descrito, difícilmente aparecerá en la base de datos, siendo útil sólo en el caso de metabolitos ya conocidos y descritos. Finalmente, para completar la elucidación y/o confirmación de la identificación del metabolito es necesario realizar experiencias MS^2 ; aún así, en algunos casos estas no son suficientes para determinar la verdadera estructura del analito.

Como alternativa a esa búsqueda manual, se ha utilizado la relación que podría existir entre los iones de fragmentación de los metabolitos y su plaguicida precursor. Esta estrategia se ha utilizado en muestras de origen vegetal como pera y pimienta (García-Reyes *et al.*, 2007), en las que se ha encontrado metabolitos de amitraz y malation, respectivamente, mediante el uso del TOF. Para poder llevar a cabo esta búsqueda, hay que conocer de forma detallada la ruta de fragmentación de los plaguicidas precursores, lo cual se realizó para amitraz y malation directamente en la muestra positiva. Llevando a cabo los XICs para cada una de las m/z de los iones fragmento del amitraz, se llegó a observar 4 metabolitos en pera. Como ejemplo de la estrategia se puede ver la *Figura 1 del artículo científico 7*. Sin embargo, en el estudio de los fragmentos de malation la información que se obtuvo fue muy limitada, a consecuencia de la complejidad de la matriz de la muestra. Con un instrumento TOF, la fragmentación se debe realizar en la fuente, lo cual dificulta el estudio de la ruta de fragmentación: por un lado, no es posible fragmentar correctamente algunos analitos con baja labilidad; y por otro, se produce la entrada en el sistema de numerosos interferentes de la matriz. En esta estrategia lo ideal sería poder realizar un estudio de la fragmentación mediante experimentos en tándem MS, por ejemplo haciendo uso del QTOF. Evidentemente, también sería recomendable utilizar un patrón de referencia.

Este tipo de estrategia ya había sido propuesta por Ferrer *et al.* (2007), pero desde el punto de vista de fragmentos comunes a familias de plaguicidas. Se pueden seleccionar iones fragmento correspondientes a la estructura común de un grupo funcional, que corresponderían a una parte común de los plaguicidas de una misma familia (triazinas, fenil ureas, organofosforados, fluorobencil ureas, neonicotinoides y fungicidas conazol). A pesar que esta estrategia se puede considerar de interés para llevar a cabo búsquedas de plaguicidas con un ion diagnóstico, siempre nos podemos encontrar con excepciones que no presentarían ese fragmento característico de la familia a la que pertenecen.

Cabe comentar, que este tipo de estrategias de búsqueda de metabolitos, por LC-TOF es muy interesante, especialmente en el caso de metabolitos desconocidos. Sin embargo, presenta varias limitaciones; la más importante es que se pueden producir transformaciones químicas en el proceso de degradación del plaguicida, que impidan obtener fragmentos comunes. Otro inconveniente es que se haya degradado totalmente el plaguicida precursor, por lo que no se buscarían sus metabolitos al no ser la muestra positiva. Por otro lado, la concentración del metabolito puede ser muy baja pudiendo quedar enmascarado por otros interferentes de la matriz, especialmente si los picos de interés en el espectro no presentan una relación isotópica característica. Finalmente, cabe comentar que el TOF MS presenta un inconveniente en cuanto a la fragmentación, ya que debe tener lugar en la fuente de ionización. A diferencia de los instrumentos TOF MS, la fragmentación puede realizarse de forma más controlada y eficaz, en una celda de colisión, como sucede en generaciones recientes de equipos QTOF, con los que es posible obtener un espectro TOF MS con mejor fragmentación de los iones compensando las situaciones donde se prefiere una mayor sensibilidad.

B.2) Identificación de metabolitos bajo condiciones controladas

Se ha investigado la degradación de plaguicidas bajo condiciones controladas mediante LC-(Q)TOF, en experiencias de laboratorio, especialmente en muestras de agua. Estos estudios se llevan a cabo bajo unas condiciones controladas, en las que uno de los factores más importantes es que se dispone de muestras blanco de idénticas características a las tratadas con el plaguicida. De esta forma, se facilita la aplicación de *software* especializado capaz de buscar aquellos picos que diferencian la muestra tratada con el plaguicida de la no tratada, sometida a las condiciones de degradación. La mayor parte de estos estudios se han realizado en muestras de aguas mediante fotodegradación, ya

que se trata de experiencias sencillas, que pueden ser controladas en el laboratorio, donde la matriz de estudio no suele presentar demasiadas interferencias. Así en nuestro grupo hemos realizado estudios de degradación de triazinas en aguas a niveles de concentración de 0.5 µg/mL en aguas superficiales (Ibáñez *et al.*, 2004) mediante el uso del QTOF, obteniendo hasta 5 metabolitos para algunas de ellas, mediante el uso de *software* especializado (*Metabolynx*). También se ha aplicado esta estrategia a aguas para el diazinon (Koulombus *et al.*, 2003) a concentraciones de hasta 20 µg/mL llegando a preconcentrar 250 veces el extracto acuoso sometido al experimento de degradación. También se han estudiado diferentes tipos de metabolismos (*in vivo*, ratas; y *in vitro*, microsomas) (Ibáñez *et al.*, 2006) en el estudio de la degradación del insecticida diazinon mediante el uso del GC-IT-MS (Koulombus *et al.*, 2003) y/o LC-QTOF-MS (Koulombus *et al.*, 2003; Ibáñez *et al.*, 2006) llegando a obtener hasta 9 metabolitos. Cabe destacar que se han usado otras estrategias diferentes al uso de un *software* especializado, obligando a trabajar a concentraciones más elevadas o realizando una preconcentración posterior, con el fin de obtener picos suficientemente abundantes y fácilmente detectables. Por ejemplo, en el estudio de la fotodegradación del alaclor se hizo uso de un sistema de preconcentración *on-line* (Hogenboom *et al.*, 2000) llegándose a concentraciones absolutas mayores de 1 µg, para su análisis mediante GC-MS, LC-QqQ y LC-TOF y pudiendo así detectar numerosos compuestos. De la misma forma, se ha llegado a elucidar siete productos de degradación del carbofuran por LC-QTOF (Detomaso *et al.*, 2005) obtenidos mediante una lámpara de UV a concentraciones en torno a 50 µg/mL. Finalmente, haciendo uso de un sistema de UHPLC-QTOF-MS ha sido posible identificar dos metabolitos de bentazona a concentraciones de 40 µg/mL (Peschka *et al.*, 2007) en diferentes tipos de aguas expuestas a la luz natural.

Todos estos estudios ponen en evidencia el extraordinario potencial que presenta el QTOF para el estudio de rutas de degradación de plaguicidas en aguas. En algunos casos indispensable para la correcta elucidación de algunos metabolitos; por ejemplo, para discernir entre la pérdida neutra de CO (m/z 27.9949) y C₂H₄ (m/z 28.0313) gracias a la medida de la masa exacta que proporciona el QTOF (Detomaso *et al.*, 2005). O como en el caso de dos compuestos isobáricos a m/z 219 que probablemente provenía del diuron (C₉H₁₁N₂OCl₂), cuya composición elemental podía ser C₈H₉N₂OCl₂ (m/z 219.0092) ó C₉H₁₃N₂Cl₂ (m/z 219.0456) (Hernández *et al.*, 2008). Sin embargo, con el uso del QTOF se obtenían experimentalmente la m/z 219.0135, que se desviaba 4.3 y 32.1 mDa, respectivamente, de las dos posibles composiciones elementales. El dato de

la aproximación a la masa exacta proporcionada por el QTOF fue crucial para asignar como $C_8H_9N_2OCl_2$ la composición elemental correcta.

Mientras que en aguas, no existe legislación que defina claramente que metabolitos de plaguicidas deberían ser incluidos en los estudios de vigilancia y control, en el caso de vegetales, la Directiva Europea 91/414/EEC (European Commission, Council Directive 91/414/EEC) establece que deben realizarse estudios de metabolismo de plaguicidas en plantas con el objetivo de identificar los metabolitos más relevantes. Basándose en estos estudios, se incluyen algunos metabolitos en la definición de residuo de los plaguicidas cuando pueden resultar relevantes. Sin embargo, apenas existen estudios de investigación publicados sobre productos de degradación de plaguicidas en vegetales, de forma que la mayoría de los laboratorios no incluyen apenas metabolitos de plaguicidas en sus estudios de *screening*, a no ser que estén incluidos en la definición de residuos.

Cuando se trabaja con muestras de alimentos, resulta complicado disponer de una muestra blanco de idénticas características. Por esta razón, resulta interesante realizar estudios de degradación de plaguicidas en muestras vegetales que proceden de estudios de campo dónde se puede comparar la muestra tratada con el plaguicida con muestras control correspondiente al mismo espécimen y recogidas al mismo tiempo que las tratadas. En tal caso, un *software* especializado, como el *MetaboLynx* (Waters), permite una comparación directa entre la muestra tratada y el blanco ambas adquiridas en modo TOF-MS, considerando como potenciales metabolitos cada pico encontrado en la muestra tratada que no se encuentra en la muestra control. Aplicando esta metodología, hemos descubierto un metabolito de buprofezin, que no había sido descrito en plátano, mediante el uso de LC-QTOF (Grimalt *et al.*, 2007), generando datos de masa exacta adecuados para obtener las fórmulas moleculares. El uso del QTOF permitió realizar experiencias MS^2 , que fueron críticas para poder discernir entre dos posibles metabolitos oxidados del buprofezin: sulfóxido o una oxidación del anillo aromático. Esta última estructura es la que encajaba con la ruta de fragmentación propuesta, tal y como aparece en la *Figura 2 del artículo científico 7*.

Por otro lado, también se ha utilizado la técnica LC-QTOF para investigar los metabolitos de fention en muestras de naranja (Picó *et al.*, 2007), estudiando las diferencias apreciables en los TIC de las adquisiciones realizadas en TOF-MS de una forma más intuitiva y manual. En primer lugar, se realizó una búsqueda de picos abundantes presentes en el TIC de la muestra tratada pero no en el blanco,

lo que supone una limitación para aquellos metabolitos que no presentan picos directamente observables en el TIC, principalmente como consecuencia de la complejidad de la matriz. Por ello, se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica de los valores para m/z teóricos en masa exacta de los metabolitos descritos de fention, extrayéndose del TIC esas relaciones masa-carga con una ventana de masa muy estrecha. Finalmente, para considerar un pico cromatográfico atribuible a un metabolito se establecieron dos criterios de identificación, desviación del tiempo de retención (± 0.1 min) y error de masa (20 ppm). En este trabajo, se realizó una confirmación de la identidad de los picos a partir de diversas experiencias MS^2 mediante QTOF, y MS^n mediante IT-MS. Posteriormente, se buscaron los metabolitos en diversas muestras de naranja, cuantificándose gracias a la inyección de patrones de referencia de los mismos, ya que se encontraban comercialmente disponibles.

En general, se puede concluir en este apartado que el uso de *software* especializado es una herramienta de gran utilidad, que es capaz de acortar el tiempo y el esfuerzo de la comparación entre los cromatogramas/espectros de las muestras tratadas y las blanco, siendo capaz de encontrar aquellos metabolitos que no se podrían observar directamente en el TIC, especialmente en matrices de alta complejidad.

C) Análisis Non-target: elucidación e identificación de compuestos desconocidos

Tanto en análisis medioambiental, como en el campo general de la salud pública, para la determinación de residuos de plaguicidas en aguas y alimentos se recurre a métodos *target*, donde MS en tándem (como QqQ) ha resultado ser una de las técnicas más selectivas y sensibles mediante una adquisición en modo SRM. Además también ha sido considerada como una de las más eficientes y de más amplio rango, llegando a obtener métodos multirresiduales de más de 100 plaguicidas, incluyendo algunos metabolitos (Lehotay *et al.*, 2005; Hiemstra *et al.*, 2007; Pihlström *et al.*, 2007, Pizzuti *et al.*, 2007). No obstante, este tipo de análisis se ve restringido en el sentido que no será posible llevar a cabo la búsqueda de otros compuestos que no se encuentren en la lista *target* del método de adquisición en SRM. Frente a este sistema de trabajo, cabe destacar la adquisición en modo *full scan*, muy apta para la búsqueda de otros compuestos que no han sido previamente seleccionadas. Para este modo de trabajo el TOF es un instrumento muy adecuado, ya que presenta una alta sensibilidad y buena

resolución, así como la posibilidad de obtener la relación masa-carga de los iones con un muy bajo error de masa (del orden de mDa).

Trabajar en modo *non-target* supone un gran esfuerzo, si se debe hacer una búsqueda manual de los potenciales analitos de interés entre todos los picos del TIC. Incluso una vez se obtiene el espectro combinado del pico, los iones de interés deberían presentar una relación isotópica característica a destacar respecto a la ingente información que se obtiene en una adquisición *full scan* mediante el TOF. Para aumentar las posibilidades de esta búsqueda de analitos *non-target* es recomendable usar *software* adecuado, como es el caso del *MetaboLynx* (Ibáñez *et al.*, 2005), ya que puede eliminar aquellos picos que se deben a la matriz del tipo de muestra que se analiza. A partir de la medida aproximada de las masas exactas es posible determinar la composición elemental de los picos seleccionados. Sin embargo, el número de posibles composiciones elementales puede ser muy elevado. Por ello es interesante el uso de abundancias isotópicas y experiencias con QTOF-MS² para reducir el número de candidatos. Una vez se conoce la composición elemental del analito desconocido, se puede hacer una búsqueda en las bases de datos disponibles, pudiendo llegar a obtener de esta forma la estructura química del analito. Sin embargo, en la mayoría de los casos (Ibáñez *et al.*, 2005) no es posible determinar la estructura del analito, aunque sí determinar algunos de sus grupos funcionales, ya que muchos compuestos pueden no encontrarse en las bases de datos.

Debe tenerse en cuenta que todos los componentes pueden presentar un pico en una muestra si se cromatografían e ionizan correctamente, sin embargo no todos serán relevantes o de interés para el analista. Por lo tanto, para que la búsqueda de compuestos no preseleccionados resulta más interesante, hay que poder seleccionar aquellos picos suficientemente abundantes en la muestra que coincidan con analitos de interés. Esta metodología de trabajo se podría llevar a cabo disponiendo de librerías lo suficientemente extensas que incluyan los analitos deseados. Siguiendo esta misma estrategia, se ha llevado a cabo la identificación de plaguicidas en muestras de aguas y alimentos mediante el uso de LC-TOF-MS (Ferrer *et al.*, 2006). En primer lugar, este grupo diseñó una base de datos propia para 100 compuestos considerando su tiempo de retención y su *m/z* exacta monoisotópica, de forma que el *software* semiautomático, *molecular-feature*, era capaz de eliminar el ruido e identificar los picos encontrados con la información de la base de datos. Se consideraban como potenciales positivos aquellos picos que superaban la relación S/N 10:1, y tuvieran una desviación de tiempo de retención ± 0.2 min, y un error de masa exacta dentro del rango de ± 5

ppm. Otro trabajo también interesante en este campo, aplicado a muestras de aguas, se realizó mediante el uso de un *software* de deconvolución *ChromaLynx*, capaz de discriminar entre componentes orgánicos presentes en la muestra frente a los iones de fondo (Ibáñez *et al.*, 2008). Una vez el pico cromatográfico había sido deconvolucionado, obteniendo también su espectro de masas, se realizaba una búsqueda de la identidad del mismo con las entradas de la librería; seleccionando el ion más intenso y comparando su relación isotópica y masa exacta. Como ejemplo, se puede ver en la *Figura 3 del artículo científico 7* la identificación de un metabolito de terbutilazina, 2-hidroxi-terbutilazina, en una muestra de agua superficial (Ibáñez *et al.*, 2004). En la que el software lleva a cabo la confirmación de forma automática mediante la detección de dos iones relacionados, el molecular $[M+H]^+$ (m/z 212) y uno de sus iones fragmento, pérdida del grupo terbutil (m/z 156). En este tipo de estrategias, la principal limitación es la falta de disponibilidad de librerías comunes a todos los instrumentos. Obtener librerías comunes en LC-MS resulta muy complicado, ya que existen considerables diferencias en función de la cromatografía, fases móviles o modificadores utilizados, variando la eficiencia de ionización. Las diferencias todavía divergen más si se trabaja con distintos modos de ionización, adquisición y fragmentación.

Después de haber revisado los trabajos publicados hasta el momento, se puede concluir que la técnica LC-TOF-MS tiene un gran potencial para la investigación de metabolitos en muestras medioambientales y de alimentos. Además de poseer unas destacadas capacidades resolutivas y de masa exacta, el uso de la relación isotópica y la posibilidad de producir fragmentación en la fuente puede ayudar enormemente a una confirmación más adecuada de la identidad de los metabolitos descubiertos. Incluso se ha encontrado que el TOF presenta buenos resultados desde un punto de vista cuantitativo en métodos *target* multirresiduales. Por lo que si se encuentra disponible el patrón del metabolito identificado, sería posible obtener una cuantificación en la muestra, así como una confirmación del mismo por el tiempo de retención, por la masa exacta y por las relaciones de los iones de fragmentación.

En definitiva, cabe destacar el excelente potencial del TOF cuando se utiliza en métodos de búsqueda de analitos en un modo *post-target*, especialmente cuando se desea abarcar un gran número de plaguicidas y/o metabolitos, llegando a superar el número de analitos habitualmente determinados en métodos multirresiduales en adquisición SRM (QqQ). En este campo, el uso del QTOF ofrece todavía mayores posibilidades para una mejor

identificación y elucidación de los compuestos encontrados, debido a su capacidad de realizar experimentos en modo MS/MS, pudiendo aislar los iones sospechosos encontrados para obtener y estudiar sus iones producto. Además, este equipo es una herramienta muy atractiva para el análisis *non-target*, en el cual el uso de librerías de compuestos, tanto teóricas como experimentales, pueden facilitar enormemente la identificación de desconocidos. Sin embargo, este campo todavía presenta muchas limitaciones, algunas de las cuales podrán solventarse con el diseño de nuevo *software* de deconvolución.

4.2.4. Referencias bibliográficas

- Detomaso, A.; Mascolo, G.; López, A. (2005) *Characterization of carbofuran photodegradation by-products by liquid chromatography/hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry* Rapid Commun. Mass Spectrometry 19, 2193-2202
- European Commission, Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market, EU Off. J. L 230 (1991), 1-32
- Ferrer, I.; Fernández-Alba, A.; Zweigenbaum, J.A.; Thurman, E.M. (2006) *Exact-mass library for pesticides using a molecular-feature database* Rapid Commun. Mass Spectrometry 20, 3659-3668
- Ferrer, I.; Thurman, E.M. (2007) *Multi-residue method for the analysis of 101 pesticides and their degradates in food and water samples by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry* J. Chromatogr. A 1175, 24-37
- García-Reyes, J.F.; Molina-Díaz, A.; Fernández-Alba, A.R. (2007) *Large scale pesticide multiresidue methods in food combining liquid chromatography - Time-of-flight mass spectrometry and tandem mass spectrometry* Anal. Chem. 79, 7308-7323
- García-Reyes, J.F.; Ferrer, I.; Thurman, E.M.; Molina-Díaz, A.; Fernández-Alba, A.R. (2005) *Searching for non-target chlorinated pesticides in food by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry* Rapid Commun. Mass Spectrom. 19, 2780-2788
- Gilbert-López, B.; García-Reyes, J.F.; Mezcuá, M.; Molina-Díaz, A.; Fernández-Alba, A.R. (2007) *Determination of postharvest fungicides in fruit juices by solid-phase extraction followed by liquid chromatography electrospray time-of-flight mass spectrometry* J. Agric. Food Chem. 55, 10548-10556
- Grimalt, S.; Pozo, O.J.; Sancho, J.V.; Hernandez, F. (2007) *Use of liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry to investigate pesticide residues in fruits* Anal. Chem. 79, 2833-2843
- Hernández, F.; Ibañez, M.; Pozo, O.J.; Sancho, J.V. (2008) *Investigating the presence of pesticide transformation products in water by using liquid chromatography-mass spectrometry with different mass analyzers* J. Mass Spectrom. 43, 173-184
-

- Hiemstra, M.; de Kok, A. (2007) *Comprehensive multi-residue method for the target analysis of pesticides in crops using liquid chromatography-tandem mass spectrometry* J. Chromatogr. A 1154, 3-25
- Ibañez, M.; Sancho, J.V.; Pozo, O.J.; Hernandez, F. (2004) *Use of Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry in Environmental Analysis: Elucidation of Transformation Products of Triazine Herbicides in Water after UV Exposure* Anal. Chem. 76, 1328-1335
- Ibañez, M.; Sancho, J.V.; Pozo, O.J.; Niessen, W.; Hernandez, F. (2005) *Use of quadrupole time-of-flight mass spectrometry in the elucidation of unknown compounds present in environmental water* Rapid Commun. Mass Spectrom. 19, 169-178
- Ibañez, M.; Sancho, J.V.; Pozo, O.J.; Hernandez, F. (2006) *Use of liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry in the elucidation of transformation products and metabolites of pesticides. Diazinon as a case study* Anal. Bional. Chem. 384, 448-457
- Ibañez, M.; Sancho, J.V.; McMillan, D.; Rao, R.; Hernandez, F. (2008) *Rapid non-target screening of organic pollutants in water by ultraperformance liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry* Trends Anal. Chem. 27, 481-489
- Hogenboom, A.C.; Niessen, W.M.A.; Brikman, U.A. Th. (2000) *Characterization of photodegradation products of alachlor in water by on-line solid-phase extraction liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry and orthogonal-acceleration time-of-flight mass spectrometry* Rapid Commun. Mass Spectrom. 14, 1914-1924
- Kouloumbos, V.N.; Tsiipi, D.F.; Hiskia, A.E.; Nikolic, D.; Van Breemen, R.B. (2003) *Identification of photocatalytic degradation products of diazinon in TiO₂ aqueous suspensions using GC/MS/MS and LC/MS with quadrupole time-of-flight mass spectrometry* J. Am. Soc. Mass Spectrom. 14, 803-817
- Lehotay, S.J.; De Kok, A.; Hiemstra, M.; Van Bodegraven, P. (2005) *Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection.* J. AOAC Int. 88, 595-614
- Lehotay, S.J.; O'Neil, M.; Tully, J.; García, A.V.; Contreras, M.; Mol, H.; Heinke, V.; Anspach, T.; Lach, G.; Fussell, R.; Mastovska, K.; Poulsen, M.E.; Brown, A.;
-

- Hammack, W.; Cook, J.M.; Alder, L.; Lindtner, K.; Vila, M.G.; Hopper, M.; De Kok, A.; Hiemstra, M.; Schenck, F.; Williams, A.; Parker, A. (2007) *Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and portioning with magnesium sulfate: Collaborative study*. J. AOAC Int. 90, 485-520
- Peschka, M.; Petrovic, M.; Knepper, T.P.; Barceló, D. (2007) *Determination of two phototransformation products of bentazone using quadrupole time-of-flight mass spectrometry* Anal. Bioanal. Chem. 388, 1227-1234
- Picó, Y.; Farré, M.; Soler, C.; Barceló, D. (2007) *Confirmation of fenthion metabolites in oranges by IT-MS and QqTOF-MS* Anal. Chem. 79, 9350-9363
- Pihlström, T.; Blomkvist, G.; Friman, P.; Pagard, U.; Österdahl, B.G. (2007) *Analysis of pesticide residues in fruit and vegetables with ethyl acetate extraction using gas and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection* Anal. Bioanal. Chem. 389, 1773-1782
- Pizzutti, I.R.; de Kok, A.; Zanella, R.; Adaime, M.B.; Hiemstra, M.; Wickert, C.; Prestes, O.D. (2007) *Method validation for the analysis of 169 pesticides in soya grain, without clean up, by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using positive and negative electrospray ionization* J. Chromatogr. A 1142, 123-136
- Thurman, E.M.; Ferrer, I.; Fernández-Alba, A.; Zweigenbaum, J.A.; García-Reyes, J.F.; Woodman, M.; Fernández-Alba, A.R. (2005) *Discovering metabolites of post-harvest fungicides in citrus with liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry and ion trap tandem mass spectrometry* J. Chromatogr. A 1082, 71-80
-

4.3. Estudio de la metodología de análisis desarrollada para la investigación de metabolitos de plaguicidas mediante LC-QTOF-MS.

4.3.1. Introducción

En el apartado 4.2 se han revisado las aplicaciones del LC-TOF MS para la búsqueda de metabolitos de plaguicidas en muestras de alimentos y aguas (Hernández *et al.*, 2008). Dentro de las estrategias expuestas, el estudio de la degradación de los plaguicidas mediante el diseño previo de un estudio bajo condiciones controladas permite la obtención de muestras control (no tratadas) con idénticas características que las muestras positivas al plaguicida. En estos casos, el uso de *software* de comparación es de gran utilidad, como es el caso del *MetaboLynx*. Esta aproximación ha sido utilizada en otros campos, especialmente en el farmacéutico (Mortishire-Smith *et al.*, 2005), donde los ensayos se realizan generalmente a niveles de concentración mayores que para residuos de plaguicidas en alimentos. Por otro lado, se han realizado diversos estudios de degradación de plaguicidas en aguas (Hogenboom *et al.*, 1999; Kouloumbus *et al.*, 2003, Ibáñez *et al.*, 2004 y 2006), probablemente por su sencilla accesibilidad, pues se pueden realizar en laboratorio. Sin embargo, su aplicación en alimentos frente a muestras acuosas presenta mayor complejidad, no sólo por el diseño del ensayo de campo sino también por la propia matriz, que en algunos casos puede complicar considerablemente la confirmación de la identidad del metabolito. Cuando se utilizan otras estrategias de búsqueda de metabolitos, como la de fragmentos comunes con el plaguicida del precursor, la complejidad de la matriz y la baja concentración de los metabolitos pueden generar serios problemas de identificación, como ocurrió con la detección de dos metabolitos del insecticida malation en una muestra de pimiento (García-Reyes *et al.*, 2007). En este trabajo se detectaron dos metabolitos de malation mediante el uso de dos iones diagnósticos (m/z 99 y 127) típicos de esta familia de plaguicidas. Sin embargo, el espectro combinado de los picos se encontraba interferido por un gran número de iones de otros compuestos de la matriz de pimiento que coelúan con los propios metabolitos. Este hecho dificultó seriamente la identificación de los metabolitos de malation, por lo que los autores sugirieron apoyar estas experiencias con otras técnicas complementarias, como el uso de técnicas MS/MS. Una adquisición en modo MS/MS permitiría aislar el ion precursor $[M+H]^+$ del metabolito de gran parte de los interferentes que coeluyen, para llevar a cabo una fragmentación más controlada: en una celda de colisión (QTOF) o en trampa de iones.

Cabe destacar que en la mayoría de los trabajos publicados en este campo se hace uso del analizador TOF MS acompañado de otra técnica alternativa que permita una mejor identificación o confirmación de los metabolitos encontrados

(García-Reyes *et al.*, 2005 y 2007; Thurman *et al.*, 2005). Sin embargo, este tipo de confirmaciones podrían realizarse con sólo un analizador como el QTOF, ya que permite trabajar en modo TOF MS y modo QTOF MS/MS. Este tipo de experimentos en tándem MS son especialmente interesantes cuando no existen disponibles comercialmente patrones de referencia de los metabolitos. Este es el caso que hemos descrito en nuestro grupo sobre el metabolito de buprofezin en piel de plátano, en el que su elucidación final se pudo llevar a cabo gracias a las experiencias MS/MS realizadas por QTOF (Grimalt *et al.*, 2007). Sin embargo, sólo unos pocos trabajos relacionados con la degradación de plaguicidas en muestras de origen vegetal se han llevado a cabo mediante el uso del QTOF (Soler *et al.*, 2007; Picó *et al.*, 2007 y 2008a). Así se han estudiado desde un punto de vista cuantitativo y confirmativo los plaguicidas amitraz (Picó *et al.*, 2008a) y carbosulfan (Soler *et al.*, 2007) junto con algunos de sus metabolitos descritos, de los que se encuentra patrón disponible comercialmente. Los analizadores QTOF presentan un creciente potencial para el análisis *target* de plaguicidas y sus metabolitos en muestras de alimentos (Picó *et al.*, 2008b), y han demostrado poseer capacidades parecidas a los QqQ para desarrollar métodos analíticos cuantitativos y confirmativos a niveles de residuo.

Estos mismos autores (Picó *et al.*, 2007) han investigado los metabolitos de fention en muestras de naranja obtenidas de un estudio de campo controlado. La identificación de estos metabolitos se realizó de forma manual, a partir de aquellos picos que destacaban en el TIC y que eran aparentemente diferentes en las muestras tratadas respecto a las no tratadas. Siguiendo esta metodología, se identificaron dos de los metabolitos del fention, fention sulfóxido y fention sulfona. Sin embargo, el resto de metabolitos incluidos en el trabajo no pudieron ser detectados de esta forma, por lo que se recurrió a la información que se encontraba publicada sobre los metabolitos de fention. De esta forma, fue posible realizar XICs a las m/z exactas para el ion $[M+H]^+$ de cada uno de ellos, identificándose finalmente tres metabolitos más (fenoxon, fenoxon sulfona y fenoxon sulfóxido).

Otra alternativa frecuentemente usada en el campo de metabolismo de fármacos (Liu *et al.*, 2005), pero poco extendida en el de medio ambiente, se basa en la selectividad del modo *scan* como es la pérdida neutra de una parte de la estructura molecular (*Neutral Loss*). La pérdida neutra puede ser común a una estructura química que se repite en todos los plaguicidas de una familia. Otro modo de adquisición en *scan* en QqQ es la búsqueda de un ion precursor a partir de un ion producto común entre moléculas de estructuras muy similares

(*precursor-ion scan*). Este tipo de metodologías se han aplicado básicamente con analizadores de triple cuadrupolo en muestras de aguas (Hogenboom *et al.*, 1999; Steen *et al.*, 2001). En el trabajo de Hogenboom *et al.* (1999) se llevó a cabo un barrido de ion precursor común para el ión producto m/z 72 correspondiente a las estructuras de herbicidas de N',N' -dimetilfenilureas, con el objetivo de buscar productos de transformación de isoproturon en aguas superficiales, encontrándose 3 productos de degradación después de la fotólisis. En este mismo trabajo también se hizo uso de la estrategia de la pérdida neutra típica de $O=C=N-CH$ (m/z 57) de N -metilcarbamatos para la búsqueda del hidroxicarbofuran como producto de transformación del carbofuran. Por otro lado, en el trabajo de Steen *et al.* (2001) se realiza una búsqueda de los productos de degradación de dos plaguicidas, etil-fenclorazol y furatiocarb de muy baja estabilidad, en agua superficial. Mediante la selección de los iones producto de m/z 358 y 288 para el barrido del ion precursor se obtuvieron dos metabolitos de etil-fenclorazol (metil-fenclorazol y fenclorazol).

Considerando que la metodología de búsqueda de fragmentos comunes entre el plaguicida precursor y sus metabolitos, así como el análisis mediante *software* especializado de muestras vegetales procedentes de estudios controlados de campo, son las dos estrategias más atractivas para la búsqueda de metabolitos se consideró de interés llevar a cabo un estudio en profundidad de su aplicación en casos reales. En este sentido, se han realizado una serie de trabajos que se plasman en el artículo publicado en la revista científica *Journal of Separation Science*, que se incluye a continuación. En él se ha llevado a cabo, a modo de ejemplo, la búsqueda de metabolitos para los plaguicidas imazalil y clopirifos en muestras positivas de limón y uva respectivamente, haciendo uso de la búsqueda de fragmentos comunes entre el plaguicida y sus metabolitos. Esto ha permitido encontrar dos metabolitos para el imazalil, uno de los cuáles no se había descrito previamente, y otros dos para el clopirifos, que sí habían sido reportadas previamente. Por otro lado, a partir de muestras de aceite de oliva obtenidas de un estudio controlado de campo en olivar donde se aplicó fosmet, ha sido posible hacer uso de un *software* de comparación (*MetaboLynx*) entre muestras tratadas y no tratadas, para la búsqueda de metabolitos de fosmet.

4.3.2. Artículo Científico 8:

Use of UHPLC-QTOF MS to discover the presence of pesticide metabolites in food samples.

F. Hernández, S. Grimalt, O.J. Pozo, J.V. Sancho

Journal of Separation Science **2009**, 32, 2245-2261

Original Paper

Use of ultra-high-pressure liquid chromatography– quadrupole time-of-flight MS to discover the presence of pesticide metabolites in food samplesFelix Hernández¹ Susana Grimalt¹ Oscar J. Pozo^{1,2} Juan V. Sancho¹¹Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, Castellón, Spain²DoCoLab, UGent, Department of Clinical Chemistry, Microbiology and Immunology, Zwijnaarde, Belgium

In this paper we illustrate the use of two different methodologies to investigate the presence of pesticide metabolites in parent pesticide-positive food samples, using ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to hybrid quadrupole time-of-flight (UHPLC – QTOF) mass spectrometry. First, a common fragmentation pathway between the parent pesticide and its metabolites has been considered to search for metabolites in two positive market samples (imazalil in lemon, chlorpyrifos in grape). Secondly, olive oil samples from field residue trials were used for automated application of comparative software (MetaboLynx), which was used with treated and untreated samples to search for expected and unexpected metabolites of phosmet. One of the main objectives when using these approaches was to avoid the tedious manual searching for potential metabolites within the huge amount of information contained in the total ion chromatogram acquired by TOF MS. The common fragmentation approach applied to TOF MS full-acquisition data, considering an enhanced fragmentation in the collision cell, has allowed the discovery of two metabolites of imazalil (1-[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-hydroxyethyl]-1H-imidazole and

1-[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-oxoethyl]-1H-imidazole) in a lemon positive sample, as well as another two metabolites of chlorpyrifos (chlorpyrifos-oxon and 3,5,6-tri-chloro-2-pyridinol) in a grape positive sample. Moreover, MetaboLynx application to TOF MS data, without promoting fragmentation, from treated and untreated olive oil samples has been helpful in detecting the metabolite phosmet-oxon. In both strategies, every metabolite detected by TOF MS was confirmed using QTOF and/or triple quadrupole instruments. Accurate masses given by TOF MS together with the valuable information on product ions given by QTOF MS/MS experiments were crucial for the unambiguous identification of metabolites.

Keywords: Food samples / Fragmentation pathway / Pesticide metabolites / Quadrupole time-of-flight mass spectrometry / Ultra-high-pressure liquid chromatography

Received: February 11, 2009; revised: April 23, 2009; accepted: April 23, 2009; DOI 10.1002/jssc.200900093

1. Introduction

Pesticide residue research in food is an important topic of modern analytical chemistry. Understanding their degradation and metabolism in food has nowadays become one of the most interesting aims and challenges within this field. Because the toxicological properties of some pesticides may persist in their metabolites, it is necessary to design efficient strategies for metabolite pesticide investigation in food [1 – 3]. The major source of human exposure to pesticide residues is from diet [4, 5], and consequently their metabolites may represent a health risk too. Pesticide transformation products and/or metabolites present in fruits or vegetables could come from several routes: they may occur as a result of impurities of the formulated products applied to the field; they may be present because of physico-chemical processes, leading to abiotic transformation products; or pesticides may be metabolized by the plant, leading to biotic transformation products (metabolites). However, from an analytical point of view such differentiation between degradates according to origin is not usually performed, and in most cases both biotic and abiotic transformation products found in food are referred to as metabolites. Some pesticide metabolites are specifically included in the definition of residue applied in inspection of Maximum Residue Limits (MRLs), on the basis of their toxicology and presence in significant amounts [6]. However, national regulations can vary when considering a metabolite as relevant and including it in the definition of residue. For example, the imazalil metabolite 1-[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-hydroxyethyl]-1H-imidazole is included in USA regulations [7] but not in those of the EU.

Both gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry are essential analytical tools in Pesticide Residue Analysis (PRA), although in the last few years LC – MS (mainly when using tandem MS (LC – MS/MS)) has shown wider scope and better sensitivity [8]. Generally, the transformation or metabolism of pesticides implies higher polarity and solubility in water of the products formed. This makes LC – MS/MS the most appropriate technique for their determination. A number of well-known relevant metabolites are included in legislation on MRLs; their reference standards are commercially available and are included in multiresidue methods based on GC – MS/MS [9, 10] or LC – MS/MS [9 – 11] as target analytes, typically using Selected Reaction Monitoring (SRM) acquisition mode.

However, many metabolite reference standards are commercially unavailable, especially if they are not regulated, and their discovery in samples is more difficult. The use of LC – time-of-flight mass spectrometry (LC – TOF MS) has shown a great potential in searching for pesticide metabolites in food, due to the combined characteristics of high full-spectral sensitivity and increased mass accuracy and mass resolution, which facilitate unambiguous identification of compounds detected in samples. Moreover, hybrid QTOF MS provides additional features for confirmation, because of the useful information given by accurate mass product ion spectra after performing MS/MS experiments. In a recent

review [1], we have discussed the use of LC – TOF MS in pesticide metabolite research, considering different approaches: (a) investigation of parent-positive samples; (b) investigation of metabolites formed in experiments carried out under field or laboratory controlled conditions; and (c) a non-target approach without previous information or restrictions on compounds to be searched for in the samples.

Investigation of parent-positive samples is one of the options more extensively applied in the analysis of food samples for pesticide metabolites. The presence of the parent pesticide makes it probable that some of its metabolites are also present in this sample. An interesting methodology based on the fragmentation-degradation relationship between the parent pesticide and its metabolites has been employed for this purpose [12]. This allowed investigation of the metabolites of amitraz and malathion in pear and pepper samples by TOF MS, based on previous study of the parent-pesticide-fragmentation pathway, which was essential in searching for degradation products. Another strategy applied by Thurman et al. [7, 13] involves a manual inspection for selected samples of each peak in the total-ion chromatogram (TIC) acquired in TOF-MS mode, and examination of its accurate-mass spectrum. After that, elemental compositions were calculated, considering the isotopic pattern, and potential structures were searched in available databases (e. g., Merck Index, ChemIndex, and Sigma – Aldrich commercial electronic catalogue). Following this strategy, where the presence of the chlorine atoms in both imazalil and prochloraz structures was essential, two metabolites of the fungicides imazalil and prochloraz were found in citrus [7]. MS/MS experiments performed with ion trap (IT) were included in confirmation attempts.

Identification of metabolites formed under controlled conditions has been widely carried out in environmental water studies, but to our knowledge not much has been published about the application of LC – TOF MS to food samples [5, 14]. These studies have been performed on samples from field residue trials, where blank vegetable specimens of the same variety and state of growth are normally collected (i. e. untreated samples). The methodology applied is based on comparing blank and treated samples; hence the availability of blank samples identical to the treated ones is crucial. A study of fenthion metabolites in orange samples was performed by QTOF [5]. Metabolites were detected in the TIC recorded in a first acquisition in TOF MS mode, looking for any evident differences between the peaks of the blank and those of the treated samples. Four metabolites were identified as fenthion sulfone, fenthion sulfoxide, fenthion-oxon sulfoxide, and fenthion-oxon sulfone, and were finally confirmed by IT-MS with reference standards. Our own research group has reported an oxidized metabolite of buprofezin in banana skin samples [14]. In this case, the use of a QTOF instrument was crucial for correct elucidation of this metabolite.

Post-target screening is another strategy for finding potential metabolites in samples, without prior limitations such as the need to have a parent-positive sample

available. One publication related to food analysis [15] reports the identification of an imazalil degradation product (1-[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-hydroxyethyl]-1H-imidazole) in apple and pear. However, the powerful deconvolution software required for detecting components in a sample along with vast mass spectral libraries may not be sufficient to discover a pesticide metabolite.

A minimum previous knowledge of the metabolite sought may be indispensable – at least its exact mass should be included in the database. This methodology may allow elucidation of the molecular formulae of unknown compounds in samples, although assigning the chemical structure and functional groups is normally unfeasible without some extra information, such as comparison with data obtained from the parent pesticide.

In the present work, we apply two different strategies for pesticide metabolite searching in parent-positive samples making use of ultra-high-pressure liquid chromatography (UHPLC) coupled to QTOF MS. A first strategy is directed towards pesticide-positive samples collected from the market, where an otherwise identical blank sample is not always available. Here, the fragmentation-degradation relationship has been applied, and its advantages and drawbacks have been discussed. A second methodology has been applied to samples from field residue trials, making use of comparative software (MetaboLynx) for both treated and untreated samples. In both cases, MS/MS experiments by QTOF and/or triple quadrupole (QqQ) have led to the identification of metabolites detected. Moreover, when the reference standard of the potential metabolite was available, it was injected for confirmation, making use of its fragmentation pathway and retention time.

2. Experimental

2.1. Reagents and chemicals

Imazalil, 1-[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-hydroxyethyl]-1H-imidazole, chlorpyrifos, 3,5,6-trichloropyridinol (TCP), phosmet, and phosmet-oxon reference standards were purchased from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). HPLC-grade methanol, residue analysis grade acetone, acetonitrile, and hexane, and reagent grade ammonium acetate and benzoic acid were purchased from Scharlab (Barcelona, Spain). LC-grade water was obtained by purifying demineralized water in a Milli-Q Gradient A10 (Millipore, Billerica, MA, USA).

Stock standard solutions of each compound were prepared by dissolving 50 mg of powder, accurately weighed, in 100 mL of acetone, to give a final concentration of 500 µg/mL. These solutions were stored at – 20°C. Working solutions, used for injection in LC systems or raw extract fortification, were obtained by diluting the stock solutions with a solvent mixture of methanol/ water (50:50, v/v).

2.2. Instrumentation

A triple quadrupole (TQ Detector) mass spectrometer and a hybrid quadrupole time-of-flight (QTOF Premier) mass spectrometer were both provided with an orthogonal Z- spray-electrospray interface (ESI) (Waters, Milford, MA, USA) and interfaced to an ultra performance liquid chromatography (UPLC) system (Acquity; Waters) for the chromatographic separation. Drying gas as well as nebulising gas was nitrogen generated from pressurized air in a nitrogen generator N2 LCMS-0 from Claind (Lenno, Italy). The desolvation gas flow was set to approximately 600 L/h and the cone gas flow to 60 L/h. The nitrogen desolvation temperature was set to 350°C and the source temperature to 120°C. A capillary voltage of 3.5 kV was used in positive and negative ionization mode in both instruments, and the cone voltage was selected depending on the analyte. As collision gas argon (99.995% Praxair, Madrid, Spain) was used in the collision cell providing as vacuum values $6 \cdot 10^{-3}$ mbar (QqQ) and $8.5 \cdot 10^{-3}$ mbar (QTOF). In the QTOF Premier instrument argon gas was always on, for both MS and MS/MS operation. Collision energies for the different product ions were chosen depending on the precursor ion. The gain of the detector in QqQ was 1.0 arbitrary units, and in the case of QTOF the MCP detector was set to 1850 V. An auto MS profile was used. Data station operating software was MassLynx v 4.1.

TOF MS resolution was approximately 10000 (FWHM) at m/z 556. MS and MS/MS spectra were normally acquired over a m/z range of 50 to 1000. Calibration of the m/z axis was performed using the built-in single syringe pump, directly connected to the interface. Calibration was conducted from m/z 50 to 1000 with a 1:1 mixture of 0.1 M NaOH/10% HCOOH diluted (1:25) with acetonitrile/water (80:20), at a flow rate of 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. For automated accurate mass measurement, a lock-spray probe was used, using as lockmass a solution of leucine enkephaline 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in acetonitrile/water (50:50) with 0.1% HCOOH pumped at 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ through the lock-spray needle using a Reagent Delivery Module from Waters. Leucine enkephalin, as protonated molecule at m/z 556.2771 in ESI+ and as deprotonated molecule at 554.2615 in ESI- , was used for recalibrating the mass axis and ensuring a reliable accurate mass measurement along time.

Mobile phases consisting of mixtures of 0.5 mM NH_4OAc in methanol/0.5 mM NH_4OAc in water were used in both instruments, and a volume of 20 or 50 μL was injected in TQD and QTOF, respectively. Separation was performed on an Acquity UPLC BEH C_{18} column (100 x 2.1 mm, id 1.7 μm) (Waters, MA, USA) using a gradient elution at a flow rate of 0.3 mL/min. The percentage of methanol was changed as follows: 0.0 min, 10%; 14.0 min, 90%; 17.0 min, 90%; 17.1 min, 10%; 20.0 min, 10%.

In phosmet experiments, conventional HPLC was used: Discovery C_{18} column (50 x 2.1 mm id, 5 μm) (Supelco, Bellefonte, PA); similar gradient elution with 0.5 mM NH_4OAc in methanol/0.5 mM NH_4OAc in water.

2.3. Positive sample selection

Food samples were collected from a market and analyzed by LC – MS/MS (QqQ) in SRM mode in order to identify pesticide-positive samples. Later, positive samples were used to investigate the presence of pesticide metabolites. An imazalil-positive lemon and a chlorpyrifos-positive grape sample were selected for further analysis and taken as examples in the present work.

Sample treatment applied to lemon and grape was a simple and rapid extraction with 25 mL of methanol/ water (80:20, v/v) of 10 g of homogenized chopped sample during 2 min using a high-speed blender Ultra-Turrax T25 at 8000 rpm. The entire extract was filtered through a 25 – 30 µm paper filter, washed with 10 ml of the extraction solvent, and the volume adjusted to 50 mL with the same extraction mixture solvent. An aliquot of the crude extract was passed through a 0.22 µm nylon syringe filter (Scharlab, Barcelona, Spain) to remove solid particles before injection into the UHPLC – MS system.

The two samples investigated were found to contain 1.2 mg/kg imazalil (lemon) and 0.08 mg/kg chlorpyrifos (grape). The LC – MS/MS (QqQ) method applied to these samples was previously validated according to the European SANCO guideline [16], considering the most sensitive transition for quantification 297 > 41 (imazalil) and 350 > 97 (chlorpyrifos). In both cases, the reliable identification of positive findings was assured by monitoring four additional transitions (297 > 159, 297 > 109, 297 > 201, 297 > 255 for imazalil; and 350 > 198, 350 > 125, 350 > 153, 350 > 322 for chlorpyrifos). The ion ratios were in agreement to those of reference standards, earning up to 8.5 Identification Points (IPs) according to the European guidelines [17].

In addition, several olive samples (treated and untreated) from a phosmet field residue trial were processed to obtain olive oil. The presence of phosmet was detected in treated olive oil samples at concentration levels between 10 and 500 ng/mL. The sample treatment procedure consisted of two consecutive liquid – liquid extractions with 10 mL of acetonitrile saturated in hexane to 2 g of olive oil previously diluted in 10 mL of hexane. The volume of the extract was adjusted to 25 mL with acetonitrile saturated in hexane, and an aliquot of the crude extract was passed through a 0.22 µm nylon syringe filter, to remove solid particles, before injection into UHPLC – MS.

2.4. Methodology applied to pesticide metabolite investigation

A chromatographic data set acquired in full spectrum TOF MS acquisition mode generates a large amount of MS data. With the aim of avoid tedious manual inspection, two methodologies were applied to investigate pesticide metabolites in positive vegetable samples in a faster and easier way. Samples from two origins were investigated: market and field-residue trials. In general, market samples correspond to the most likely situation in

pesticide residue analysis. However, field-residue trial samples are more difficult to obtain, but studying degradation and/or plant metabolism of the active ingredient applied is easier and more realistic.

2.4.1. Common fragmentation pathway approach applied to positive market samples

When a positive market sample was found by target analysis using LC – MS/MS (QqQ), a first approach was applied, consisting in consideration of a common fragmentation route between metabolites and parent pesticide. Assuming that most metabolites share the same fragmentation pathway with the parent pesticide, specific narrow-window extracted ion chromatograms (nw-XIC) at the expected m/z fragments were obtained from full-spectrum TOF MS acquisitions. The presence of chromatographic peaks at different retention times (R_t) than the parent pesticide would alert the investigator to the presence of potential pesticide metabolites. Therefore, a previous study by QTOF MS/MS of the fragmentation behavior of the pesticide is essential to obtain the accurate m/z of each valuable fragment. In addition, knowing the fragmentation pathway of a pesticide can be useful when elucidating its metabolites, as in our previous work on buprofezin [14]. This methodology has been applied and named as “fragmentation-degradation” relationship between the parent pesticide and its metabolites [13].

Traditionally, TOF MS studies on pesticide residues have been performed using in-source collision-induced dissociation (CID) [13, 15]. However, when using a QTOF instrument that always works with the collision gas on, two fragmentation approaches for TOF MS could be considered as plausible: a typical in-source CID, increasing cone voltage; and an in-cell CID, increasing collision energy values. In general, fragmentation induced in the collision cell presents more efficiency than in-source, both in the number of fragment ions obtained, and in their abundance, and in our experience leads to better mass accuracy and reproducibility. Consequently, we first injected positive samples in TOF MS inducing fragmentation in the collision cell (high energy CID TOF MS). In order to avoid mass spectra dominated by only one or two fragment ions, a collision energy ramp between 5 to 30 eV was applied with a cone voltage at 25 V, as general acquisition parameters. In this way, a more balanced mass spectrum between fragments and molecular ion was obtained.

Using this approach, nw-XICs for the observed m/z fragment ions were obtained for parent-positive samples by high energy CID TOF MS. The combined spectra of each chromatographic peak observed at R_t values different than the parent were obtained and each peak was treated as a potential metabolite. From this combined spectrum, the “precursor ion” of the selected fragment might be obtained, and therefore the mass of the metabolite. However, the precursor might not be observed in the combined spectrum. In

such a case, a second acquisition was made in TOF MS mode without collision cell ramp activation, to provide a higher abundance of metabolite molecular ion, decreasing the generic cone voltage applied if necessary.

2.4.2. Application of specific comparative software (MetaboLynx) to field residue trial samples

When investigating samples from field residue trials, untreated and treated specimens are generally available. This facilitates the comparison of their full-spectrum acquisition MS data using commercial spectral/chromatographic comparative software. In our work, a program associated with MassLynx software, named MetaboLynx (Waters), was applied. MetaboLynx compares extracted ion chromatograms of a control versus a positive sample, and automates the detection, identification, and reporting of differential ions/chromatographic peaks, which in principle would correspond to metabolites, in a fast and easy way in contrast to a manual inspection. This software has been developed for metabolite searching in two ways: as expected or unexpected metabolites. Expected metabolites are known from previous literature data (e. g. reported metabolism) or from common metabolic pathways, while unexpected ones are any other non-described compounds.

The exact mass of expected metabolites can be included in the processing settings for each specific analyte. Some typical biotransformation pathways can be also found in the resident library, such as oxidation, deamination, methylation, etc. In this case, the processing software performs XICs for each possible biotransformation compound at a mass window previously selected. Searching for unexpected metabolites is performed by mass spectral comparison of control (i. e. untreated field sample) versus treated field samples. In this work, TOF MS acquisitions in both ESI positive and negative modes were considered, in order to achieve a wide overview of potential metabolites present in samples.

MetaboLynx processing settings for expected metabolites were: mass window of ± 10 mDa for nw-XICs of each metabolite exact mass; peak selection was accomplished with the ApexTrack algorithm; only peaks with an area less than 10 area units were eliminated. For unexpected metabolite searches, XICs were generated in each sample (treated and untreated) over a range from m/z 270 Da to 500 Da greater than the mass of the parent (phosmet, m/z 318 Da), at 1 Da mass window. Integrated XICs parameters were also obtained with the aid of the ApexTrack algorithm. In both cases, a R_t filter was applied between 5.0 and 12.0 min (phosmet R_t was 10.9 min).

3. Results and discussion

3.1. Common fragmentation pathway applied to positive market food samples

Two illustrative examples of positive market samples are shown. They correspond to a lemon sample that was positive for imazalil, and a grape sample positive for chlorpyrifos. QTOF experiments were carried out with reference standards to study their fragmentation behaviors, which are shown in Figs. 1 and 2.

Each product ion described in Fig. 1 and 2 might be considered as a potential common fragment for parent pesticide and metabolites.

3.1.1. Imazalil metabolite discovery

In a first approach, an acquisition in high energy CID TOF MS mode was performed for the positive lemon sample. Assuming a common fragmentation pathway with imazalil (Fig. 1), nine nw-XICs corresponding to the m/z product ions (structures 1.6 to 1.14) were extracted from the TIC. A peak (3.31 min) close to imazalil R_t (Fig. 3.b) was observed when m/z 255.0092 was selected. The combined spectra of this chromatographic peak showed the typical two-chlorine atom isotopic pattern (Fig. 3.c). Using the elemental composition tool with restriction of the number of atoms of imazalil, only one empirical formula ($C_{11}H_9N_2OCl_2$) was proposed with 0.2 mDa mass deviation, normalized isotopic fit (i-FIT) 0.0, and double bond equivalent (DBE) 7.5. Although a highly probable structure for this metabolite (**IMZ-M1**) could be proposed from this information, QTOF MS/MS experiments were performed for confirmation selecting as precursor ion m/z 255, at collision energies 10, 20, and 30 eV. Since the low concentration of **IMZ-M1** in the lemon sample did not afford a sufficient abundance of product ions, the enhanced duty cycle (EDC), an advanced functionality of new TOF instruments, was applied centered at m/z 130 to amplify the m/z range of interest. As seen in Fig. 3.d, the combined QTOF MS/MS spectrum presented three product ions in common with imazalil (159, 81, and 69, see Table 1), which had not been seen before (high energy CID TOF MS) because of the complexity of the matrix and low metabolite concentration level.

The presence of fragments in common with parent imazalil confirmed **IMZ-M1**, and is helpful in corroborating their origin and proposing a chemical structure, as Fig. 3.d shows. Moreover, a product ion (experimental m/z 170.9785) not observed in parent imazalil was present in its MS/MS spectrum. The elemental composition of this fragment was $C_8H_5Cl_2$ with m/z deviation of 1.7 mDa, and its chemical structure is proposed in Table 1. Assuming that a metabolite might share more structural characteristics with other metabolites than with the own parent pesticide, this methodology was applied for a second time to the m/z 171 fragment ion. Therefore, a common fragmentation pathway between imazalil metabolites was assumed.

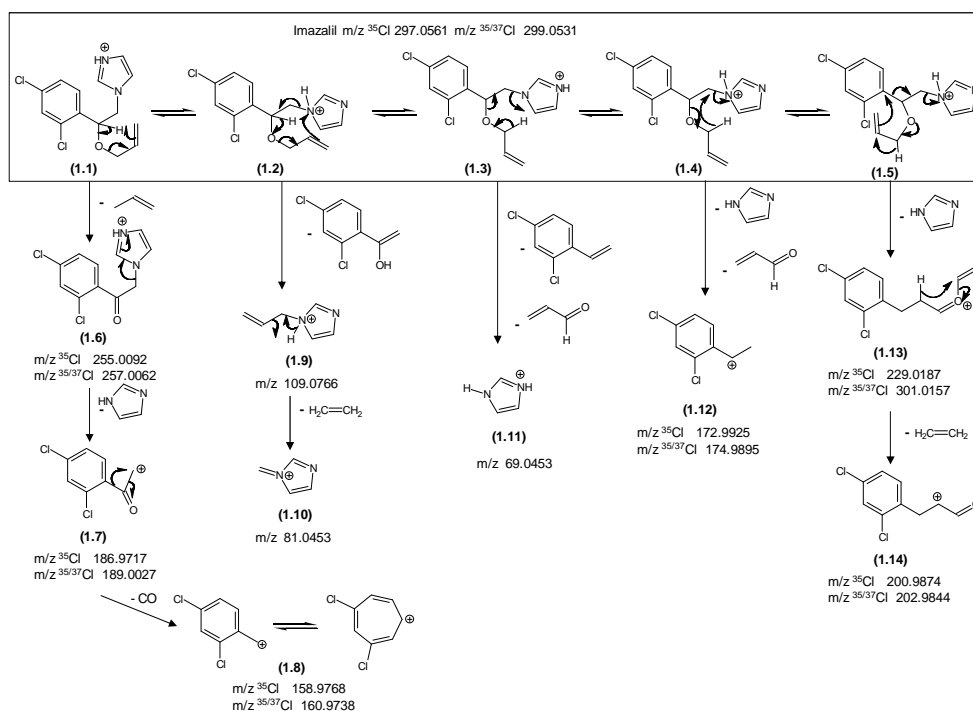


Figure 1. Suggested fragmentation pathway for imazalil, as a result of TOF MS and QTOF MS/MS experiments with reference standards.

A new nw-XIC at 170.9768 was performed with the TIC acquired by high energy CID TOF-MS. Figure 4.c shows the presence of three peaks at 3.02, 3.29, and 3.45 min. As the peak at 3.29 min belonged to **IMZ-M1**, the other two peaks might be considered as other potential metabolites. The combined spectra (Fig. 4.d) of the 3.02 min peak showed a couple of ions at m/z 257 and 259, revealing the isotopic distribution of two chlorine-containing molecule. The empirical formula $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{OCl}_2$ was provided by the elemental composition software as the only possibility, with 0.7 mDa deviation, a DBE 8, and normalized i-FIT 0.0. As with **IMZ-M1**, in order to elucidate the structure of this imazalil metabolite (named as **IMZ-M2**) a QTOF MS/MS acquisition was performed selecting m/z 257 as precursor ion at collision energies of 10, 20, and 30 eV. The fragmentation spectrum (Fig. 4.e) of **IMZ-M2** showed a low degree of similarity to that of imazalil, as apparently only the fragment of m/z 69 was common to both of them (see Fig. 1). The most probable structure is proposed in Fig. 4.e. This structure suggests a reduction of **IMZ-M1** to **IMZ-M2** (or perhaps an initial transformation of imazalil into **IMZ-M2** and subsequent oxidation to give **IMZ-M1**).

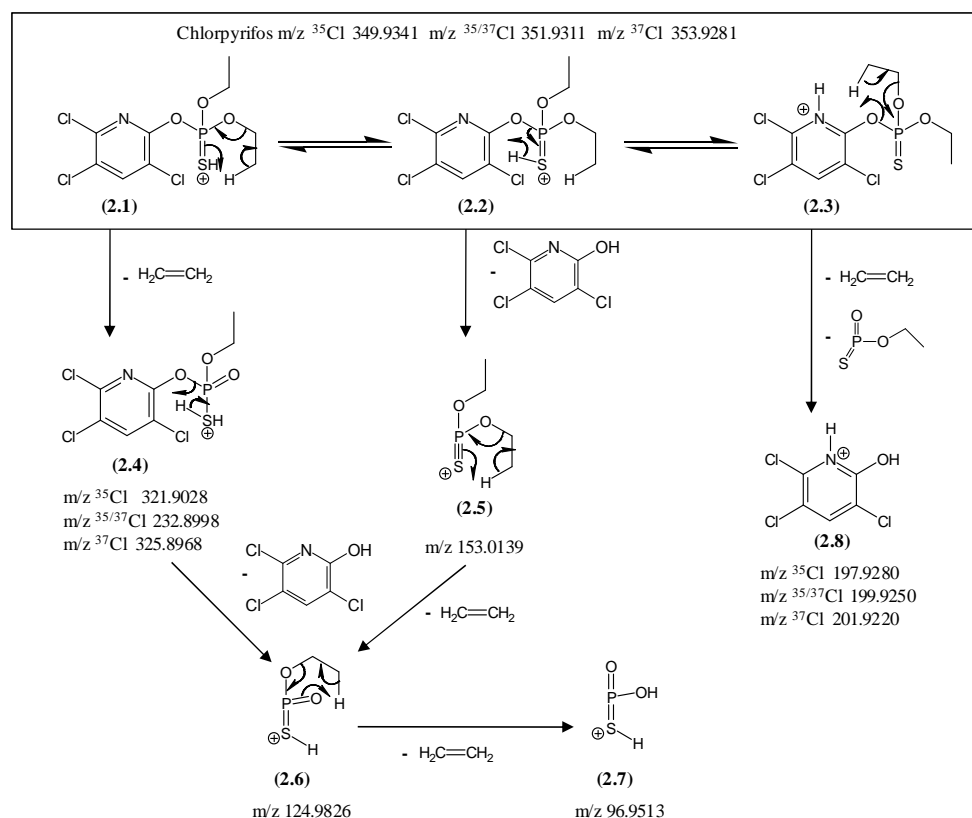


Figure 2. Suggested fragmentation pathway for chlorpyrifos, as a result of TOF MS and QTOF MS/MS experiments with reference standards.

As stated above, a third peak was observed at 3.45 min (Fig. 4.c) in the nw-XIC at m/z 171. This peak seemed to correspond to a fragment ion of parent imazalil that had not been previously observed when studying its fragmentation pathway, undoubtedly because of its low abundance (lower than 1% relative to the base peak ion (m/z 158)). However, the relative abundance of the product ion m/z 171 was as high as 24% in the metabolite **IMZ-M2** (Fig. 4.e).

As illustrated by the discovery of **IMZ-M2**, the use of common fragmentation pathway methodology presents some limitations when parent pesticide and metabolites show notable differences in their fragmentation behavior. Differential behavior can be due to abundance differences of common fragment ions (m/z 171/173 and m/z 69) and/or to distinct fragmentation pathways (see fragments m/z 189/191 and m/z 153, which were not common to imazalil; Table 1 and Fig. 1). In our work, application of a common fragmentation relationship between metabolites has allowed us to discover additional imazalil metabolites, minimizing this limitation.

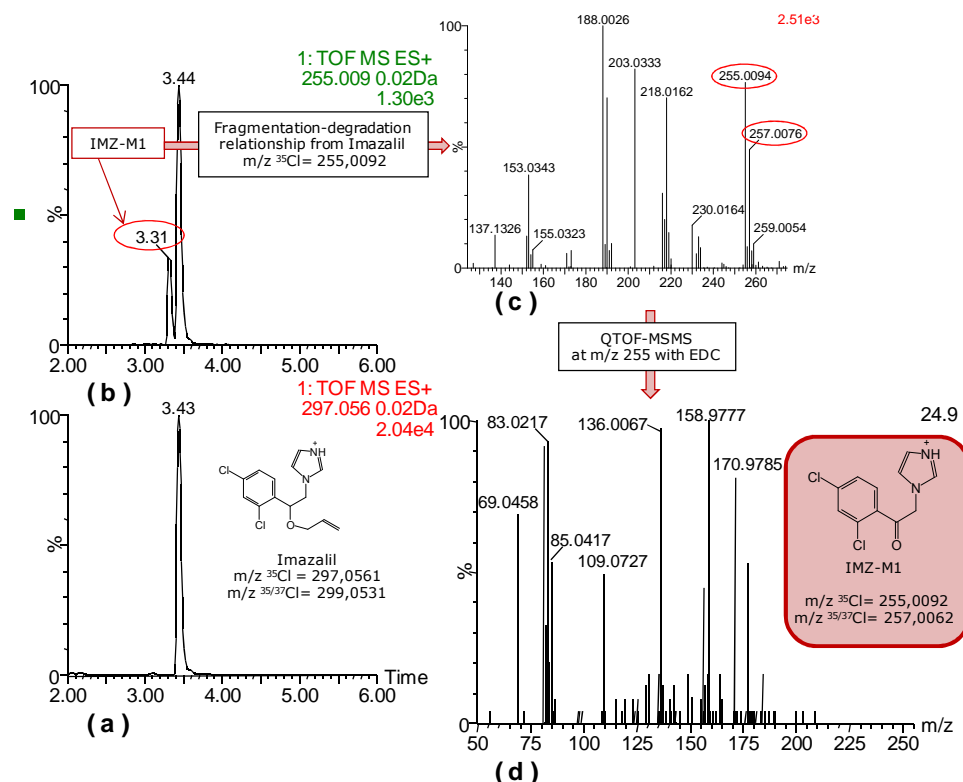


Figure 3. UHPLC – ESI(+)-TOF nw-XICs chromatograms of an imazalil-positive lemon sample at m/z (a) 297.0561 and (b) 255.0092, corresponding to the ion $[M+H]^+$ of imazalil and one of its fragments, respectively. (c) Combined spectrum of potential metabolite **IMZ-M1**. (d) Product ion QTOF MS/MS spectrum of metabolite **IMZ-M1** (precursor ion m/z 255) with EDC centered at m/z 130, and collision energy of 20 eV. Chemical structure proposed for metabolite **IMZ-M1**.

A bibliographic search of imazalil metabolites was undertaken to confirm whether **IMZ-M1** and **IMZ-M2** had been previously reported in vegetable matrices. Metabolite **IMZ-M2** has been reported in fruit samples analyzed by LC – TOF MS [7, 18]. However, to our knowledge metabolite **IMZ-M1** has not been reported before. As metabolite **IMZ-M2** is available as 1-[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-hydroxyethyl]-1H-imidazole commercial reference standard, standard solution was injected and examined by QTOF MS in order to confirm the product ions observed in the lemon sample and their Rt. Moreover, injecting the standard allowed cleaner spectra without interferences from the matrix, providing a better knowledge of the fragmentation pathway.

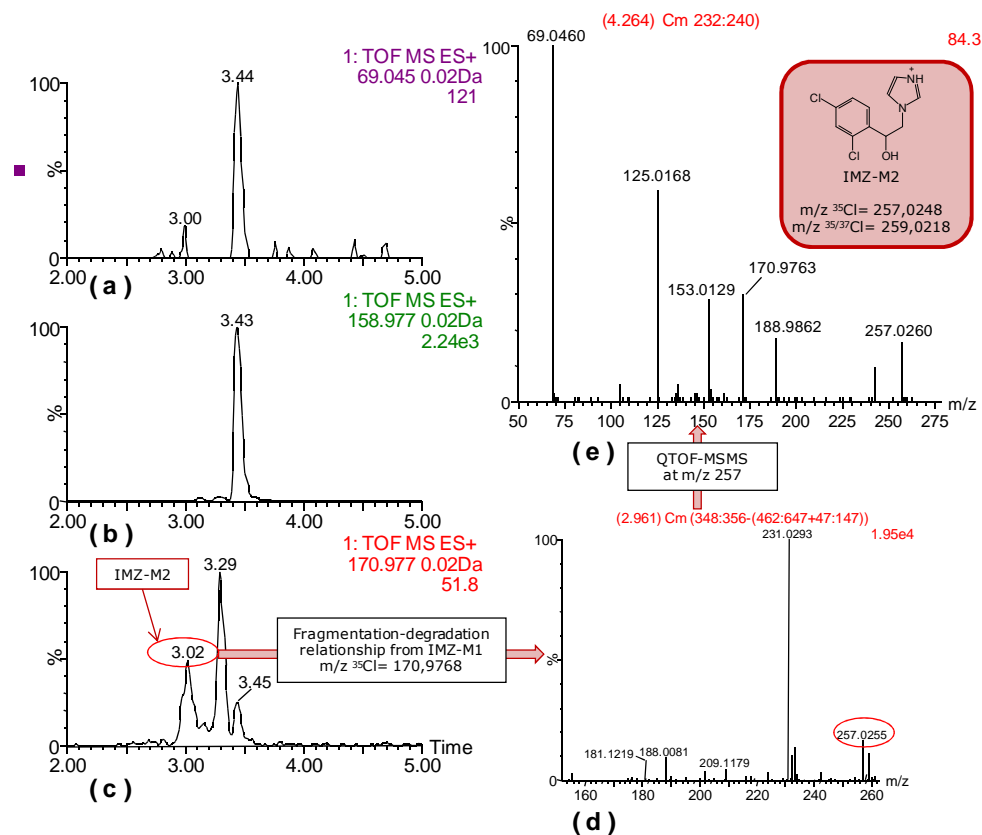


Figure 4. UHPLC – ESI(+)-TOF nw-XICs chromatograms of an imazalil positive lemon sample at m/z (a) 69.0453, (b) 158.9768 and (c) 170.9768. (d) Combined spectrum of the potential metabolite **IMZ-M2** peak at 3.02 min. (e) Product ion QTOF MS/MS spectrum of metabolite **IMZ-M2** (precursor ion m/z 257, collision energy 20 eV). Chemical structure proposed for metabolite **IMZ-M2**.

We also explored the possibility of using a triple quadrupole analyzer to investigate the presence of metabolites. Performing precursor-ion scan experiments for a fragment ion of the parent pesticide is an interesting alternative to detect the presence of unknown metabolites. With this approach the precursor ion of common fragments can be easily obtained, a significant difference compared with full spectrum acquisitions in TOF instruments. In this work, we performed a precursor-ion scan, selecting m/z 69 as diagnostic fragment ion for imazalil metabolites (collision energy, 30 eV; mass range 40 – 400). In this first approach, a complex chromatogram was obtained (parents of 69, Fig. 5.a). In order to facilitate the discovery of imazalil metabolites, a cluster analysis was applied (Fig. 5.b). This cluster analysis filters out all compounds not exhibiting a selected isotopic distribution. In this case, only precursor ions fitting the isotopic pattern of two chlorine atoms, as in imazalil (i. e. mass difference 2, abundance ratio 1.5) will be further

considered. Despite the low mass accuracy (QqQ works in nominal masses) this approach is useful as it provides complementary information. After the application of this strategy, only two peaks survived (Fig. 5.b), and corresponded to imazalil itself (Fig. 5.c) and the described metabolite **IMZ-M2** 1-[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-hydroxyethyl]-1H-imidazole (Fig. 5.d). The characteristic isotopic pattern for two Cl atoms can be observed for both m/z 297/299 (imazalil) and m/z 257/259 (**IMZ-M2**).

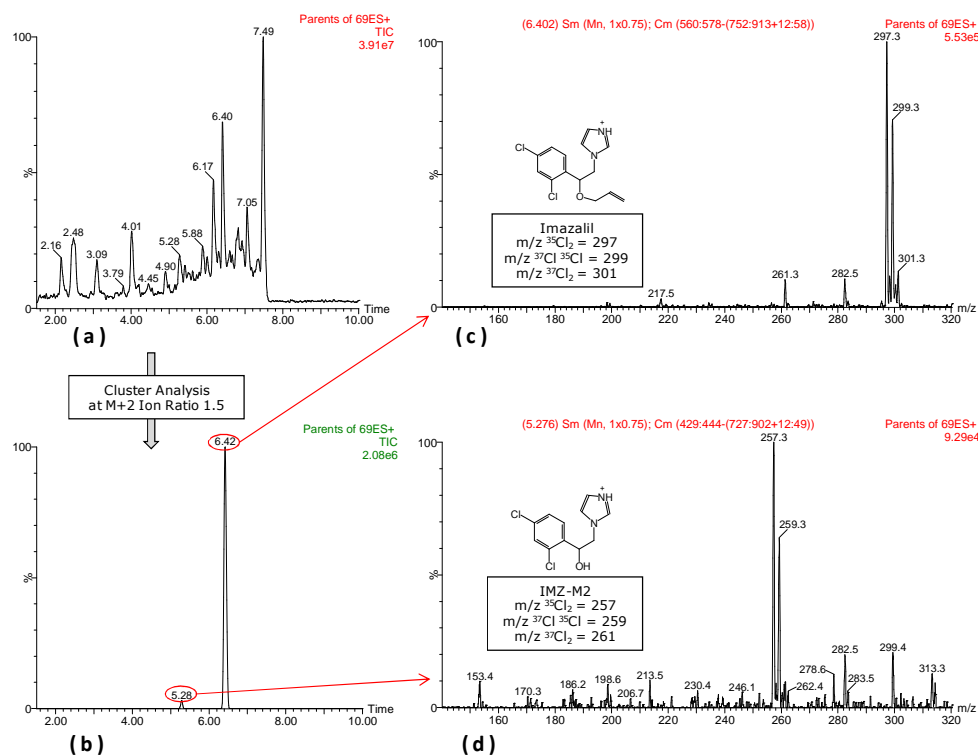


Figure 5. UHPLC – ESI(+)-QqQ MS/MS chromatograms of an imazalil-positive lemon sample for (a) precursor-ion scan at m/z 69, and (b) after cluster analysis processing (see text). (c) combined spectra for the chromatographic peak at 6.42 min and (d) **IMZ-M2** chromatographic peak at 5.28 min.

When using QqQ, the metabolite **IMZ-M1** was not found as a consequence of the lower sensitivity in precursor-ion scan mode compared to full spectrum acquisition in TOF MS, and because of the low **IMZ-M1** concentration in the sample. In addition to the lack of sensitivity of QqQ in scan mode, the chemical structure elucidation is more difficult because only nominal masses are provided by a QqQ instrument.

Table 1. Fragmentation ions of imazalil and chlorpyrifos metabolites elucidated by QTOF. Proposed formula and structure from the exact mass extracted by elemental composition processing data.

Metabolite	Fragment's Exact Mass	Mass Deviation (mDa)	Formula	Proposed structure
IMZ-M1	255.0092 257.0062	0.2 1.2	C ₁₁ H ₉ N ₂ OCl ₂	
	170.9768 172.9738	1.7 1.9	C ₈ H ₅ Cl ₂	
	158.9768 160.9738	0.9 1.0	C ₇ H ₅ Cl ₂	
	81.0453	1.5	C ₄ H ₅ N ₂	
	69.0453	0.3	C ₃ H ₅ N ₂	
IMZ-M2	257.0248 259.0218	0.7 1.1	C ₁₁ H ₁₁ N ₂ OCl ₂	
	188.9768 190.9844	0.6 0.9	C ₈ H ₇ OCl ₂	
	170.9768 172.9738	0.5 1.5	C ₈ H ₅ Cl ₂	
	153.0107	2.2	C ₈ H ₈ OCl	
	69.0453	0.7	C ₃ H ₅ N ₂	
CHLOR-M1	333.9570 335.9540	1.0 1.6	C ₅ H ₁₂ NO ₄ PCl ₃	
	305.9257 307.9227	1.7 2.3	C ₇ H ₈ NO ₄ PCl ₃	
	277.8944 279.8914	0.7 1.8	C ₅ H ₄ NO ₄ PCl ₃	
	259.8838 261.8808	1.1 2.0	C ₅ H ₂ NO ₃ PCl ₃	
	197.9280 199.9250	1.9 2.1	C ₅ H ₃ NOCl ₃	
	179.9175 181.9145	2.2 1.9	C ₅ HNCl ₃	
CHLOR-M2	195.9124 197.9094	0.4 1.0	C ₄ HNOC ₃	

3.1.2. Chlorpyrifos metabolite discovery

A chlorpyrifos-positive grape sample was analyzed by high energy CID TOF MS (collision energy ramp from 5 to 30 eV). According to the fragmentation pathway of chlorpyrifos (see Fig. 2), five nw-XICs were performed from the TIC as potential common fragment ions of parent pesticide and metabolites. Using this methodology, only the m/z 198 ion led to additional peaks (12.67 min and 7.47 min) different than chlorpyrifos (14.74 min, Fig. 6.a). Two relevant ions were observed in the combined spectra of the 12.67 min chromatographic peak with the characteristic 3 chlorine isotopic pattern (198/200 and 278/280, Fig. 6.b). Experimental accurate mass of the m/z 198 fragment ion presented a deviation of 1.9 mDa with respect to the theoretical structure 2.8 (see Table 1, and Fig. 2). For the other unknown m/z 278, three possible empirical formulae were provided by the elemental composition software (Table 2). Among the three possibilities, the first was considered the most plausible. This option presented lower DBE and m/z deviation. Thus, m/z 278 might correspond to a chlorpyrifos metabolite or to a fragment ion of a chlorpyrifos metabolite. Nevertheless, no peak at 12.67 min was observed when performing a nw-XIC at m/z 277.8944 in TOF MS acquisition without applying fragmentation in the collision cell. Therefore, this ion might be considered as another fragment of a chlorpyrifos metabolite, which obviously should have higher m/z. The collision energy ramp applied in the first acquisition mode probably prevented acquisition of the molecular ion, as a consequence of its practically complete fragmentation. For this reason, the combined spectrum at the same retention time was recorded again, but at low collision energy, giving the typical 3-chlorine isotopic pattern as the spectrum of Fig. 6.d. Only one formula ($C_9H_{12}NO_4PCl_3$) was proposed by the elemental composition calculator, with 1 mDa deviation, DBE 3.5, and 0.0 normalized i-FIT. This metabolite was named as **CHLOR-M1** (see Table 1). The structure was confirmed by means of QTOF MS/MS experiments, selecting 334 as $[M+H]^+$ precursor ion. However, the low concentration of this metabolite prevented its detection. In the same way as for **IMZ-M1**, EDC acquisition centered at m/z 300 and 250 was applied (cone 20 V, collision energies 10, 20, and 30 eV) to obtain a greater response. This provided confirmation that fragments 278 and 198 of **CHLOR-M1** were product ions from 334. In addition, other fragment ions (m/z 306, 260, and 180) were obtained from the combined spectrum, as shown in Table 1. Considering all fragmentation information, **CHLOR-M1** was elucidated to be chlorpyrifos-oxon. As Fig. 2 and Table 1 show, only one common fragment ion (198/200) was found for chlorpyrifos and chlorpyrifos-oxon, in spite of their high level of structural similarity. Chlorpyrifos-oxon has been described before and determined by LC – MS [19, 20]. Raina et al. [19] selected as quantitative and confirmative SRM transitions 336>280 and 336>200, respectively, corresponding to the ^{37}Cl isotopic pattern, confirming the fragmentation observed for chlorpyrifos-oxon in our work.

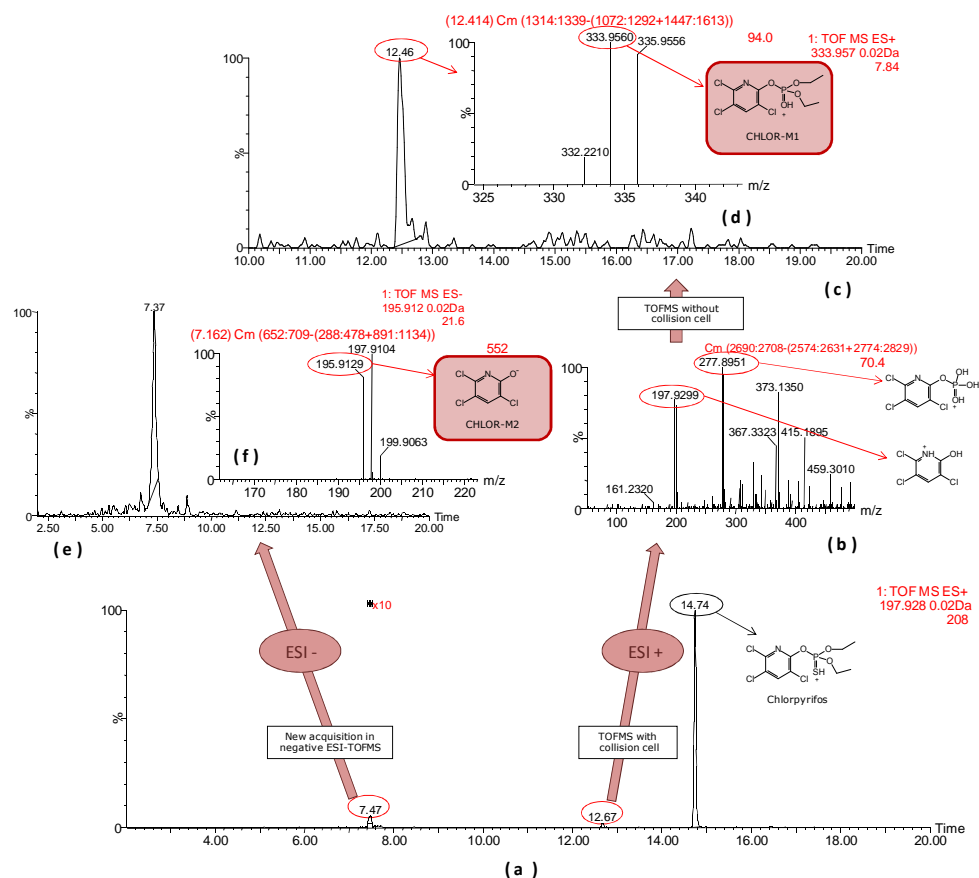


Figure 6. (a) UHPLC-ESI(+)-TOF nw-XIC chromatogram at m/z 197.9280 of a chlorpyrifos-positive grape sample. Right: Experiments in ESI (+) for the metabolite peak at 12.67 min (CHLOR-M1). (b) Combined spectrum and proposed structures of ion fragments 278 and 198, (c) UHPLC-ESI(+)-TOF XIC chromatogram at m/z 333.9570 without fragmentation and (d) combined spectrum of the chromatographic peak. Left: Experiments in ESI(-) for the metabolite peak at 7.47 min (CHLOR-M2). (e) UHPLC – ESI(-)-TOF XIC chromatogram at m/z 195.9124, corresponding to the deprotonated molecule of TCP and (f) combined spectrum of the chromatographic peak.

Table 2. Predicted elemental composition of m/z 278 ion from combined spectra of 12.7 min chromatographic peak (XIC at m/z 198; see Fig. 6).

Calculated mass	mDa	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
277.8944	0.7	3.5	16.9	0.1	$C_5H_4NO_4PCl_3$
277.9001	-5.0	7.5	19.6	2.8	$C_9H_3NOSCl_3$
277.8999	-4.8	7.5	19.9	3.1	$C_8H_3NO_2PSCl_2$

As previously stated, a low intensity peak was also found at 7.47 min in the m/z 198 nw-XIC (Fig. 6.a). Its combined spectrum did not lead to satisfactory results as a consequence of the low analyte concentration and/or sensitivity. According to the bibliography, several major metabolites of chlorpyrifos have been reported: 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP), diethyl phosphate (DEP), and diethyl thiophosphate (DETP), among others [20, 21]. However, the ionization of these three metabolites is preferably performed in negative mode as $[M - H]^-$. Consequently, an ESI negative mode acquisition was performed in our work to try to find these metabolites in the grape sample. In these new experiments, the metabolite TCP (**CHLOR-M2**) was identified in this sample with its characteristic 3 Cl isotopic pattern (196/198/200), and mass errors below 1 mDa (Figs. 6.e and 6.f, and in Table 1). Although a confirmatory study was attempted, trying to effect fragmentation of TCP (m/z 196) by QTOF MS/MS, no plausible product ions were observed [22]. As TCP reference standard is commercially available, we could compare its retention time with that of the real sample, obtaining a deviation of only 0.4%. This case illustrates that use of an additional ionization mode could solve some drawbacks of the common fragmentation pathway approach between parent pesticide and metabolites.

DEP and DETP exact mass nw-XICs were also extracted from TIC obtained in negative ESI. However, no peaks appeared as potential metabolites. This was surely due to their ionic character. As previously reported, two approaches can be considered for obtaining a suitable chromatographic retention of DEP and DETP: another kind of chromatographic separation mechanism, such as anionic exchange [20]; or ion-pairing in reverse phase chromatography [21]. So, although negative ESI was selected for ionization of DEP and DETP, the chromatographic conditions applied in this paper were inadequate for these two metabolites.

3.2. Application of MetaboLynx to field residue trial samples

A second methodology was applied to investigate phosmet metabolites in olive oil samples processed from olive samples that were subjected to phosmet application. The first step was to search reported metabolites or transformation products, which were considered as expected metabolites [23]. A list of exact-mass differences between phosmet and its reported metabolites were included in the MetaboLynx software (Table 3). Moreover, other typical biotransformation processes were included, such as reduction ($+H_2$, +2.0157), hydroxylation ($+O$, +15.9949), double hydroxylation ($+O_2$, +31.9898), triple hydroxylation ($+O_3$, +47.9847), hydration ($+H_2O$, +18.0106), hydroxylation + desaturation ($+O - H_2$, +13.9793), and ethyl to alcohol ($-C_2H_4+O$, - 12.0364).

3.2.1. Expected metabolites

In previous work [14], we applied the MetaboLynx software to buprofezin-treated and untreated banana samples. This allowed discovery of the presence of a buprofezin

metabolite in banana skin. Following a similar methodology, in the present paper two peaks of potential phosmet metabolites were observed in treated olive oil samples, one in positive and the other in negative ESI mode. Working in positive mode, the metabolite phosmet-oxon (**PHOS-M1**) was found at Rt 8.0 min in olive oil processed from treated olive samples collected 15 days after application (see Fig. 7.a). Experimental accurate mass deviation was 1.6 mDa in relation to its exact mass.

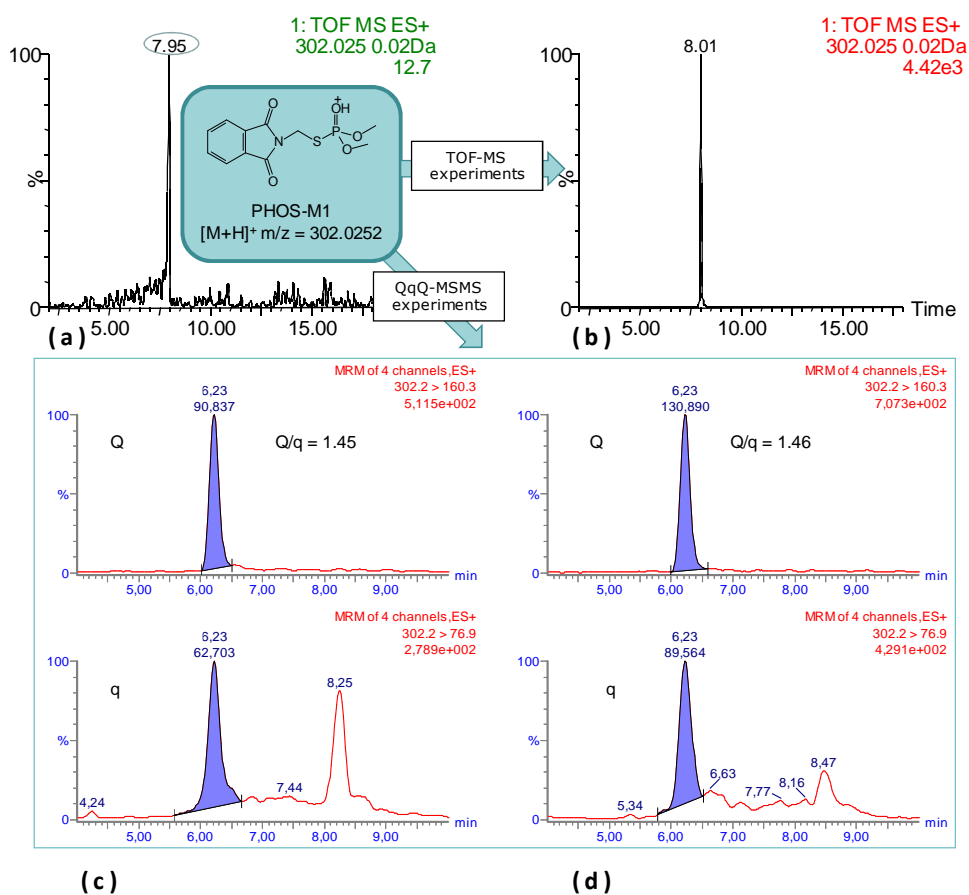


Figure 7. UHPLC – ESI(+)-TOF XIC chromatograms at 302.0252 of (a) an olive oil sample where phosmet-oxon was detected (**PHOS-M1**) and (b) phosmet-oxon standard at 100 ng/mL. HPLC-ESI(+)-QqQ SRM chromatograms of (c) the same olive oil sample than in (a) and (d) phosmet-oxon standard at 1 ng/mL in olive oil matrix.

As a reference standard was available, additional QTOF experiments could be carried out for confirmative purposes. Working in TOF MS mode, the retention times of reference standard and expected metabolite the in sample were similar, with a deviation of

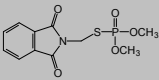
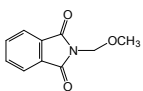
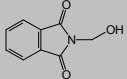
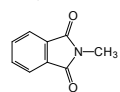
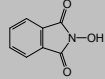





only 0.6% (Fig. 7.b). However, after QTOF MS/MS experiments we could not confirm the presence of phosmet-oxon, due to its low concentration level in sample. We performed a fragmentation study of phosmet-oxon standard by QTOF MS, and the two most abundant fragment ions were selected to develop a MS/MS method using a more sensitive triple quadrupole instrument. The transitions 302>160 and 302>77 were acquired as quantitative (Q) and confirmative (q), respectively, in a SRM method. In both the positive sample (Fig. 7.c) and the reference standard (Fig. 7.d), peaks at exactly the same Rt were obtained. In addition, Q/q ratios were almost identical, confirming the presence of phosmet-oxon in the sample. A concentration of 0.6 ng/mL was found in the extract, corresponding to 0.008 mg/kg phosmet-oxon in the olive oil sample. Moreover, after processing the data acquired in negative mode, a second potential metabolite was tentatively identified as benzoate (Rt 6.0 min), with mass deviation of 0.6 mDa compared to its exact mass (m/z 121.0290 Da). However, this metabolite could not be confirmed to be benzoate in any of the subsequent experiments performed.

3.2.2. Unexpected metabolites

In the unexpected metabolite processed data, a relevant peak was present in several of the treated olive oil samples, but not in the untreated ones. This potential non- described metabolite ($[M+H]^+$, m/z 395.2197) with Rt 6.3 min was investigated in greater detail. First, mass deficiency in comparison to phosmet ($[M+H]^+$, m/z 318.0024) was too high to fit usual transformation processes, making the metabolic origin of this compound questionable. Nevertheless, QTOF MS/MS experiments were performed (cone, 20 V; collision energies 10, 20, and 30 eV) to study the fragmentation of this potential metabolite. Neither common fragments nor mass losses compatible with phosmet were found, and the elemental composition given by the accurate mass did not lead to consistent chemical structures. Therefore, this compound was not considered as a phosmet metabolite. It might be associated to the application of the phosmet formulated in the field, as it was detected in most treated, but not in untreated samples.

J. Sep. Sci. 2009, 32, 2245 – 2261

Table 3. List of expected metabolites of phosmet, exact mass of their protonated ion and mass difference from the parent pesticide.

Expected metabolites	m/z [M+H] ⁺	m/z [M-H] ⁻	MetaboLynx code (mass difference)
Phosmet-oxon C ₁₁ H ₁₂ NO ₃ PS 	302.0252	-	-S+O (-15.9772)
N-methoxymethylphthalimide C ₁₀ H ₉ NO ₃ 	192.0661	-	-CH ₃ OPS ₂ (-125.9363)
N-hydroxymethylphthalimide C ₉ H ₇ NO ₃ 	178.0504	176.0348	-C ₂ H ₅ OPS ₂ (-139.9519)
N-methylphthalimide C ₉ H ₇ NO ₂ 	162.0555	-	-C ₂ H ₅ O ₂ PS ₂ (-155.9469)
N-hydroxyphthalimide C ₈ H ₅ NO ₃ 	164.0348	162.0191	-C ₃ H ₇ OPS ₂ (-153.9676)
Phthalimide C ₈ H ₅ NO ₂ 	148.0399	146.0242	-C ₃ H ₇ O ₂ PS ₂ (-169.9625)
Phthalic acid C ₈ H ₆ O ₄ 	-	165.0188	-C ₃ H ₆ NPS ₂ (-150.9679)
Phthalamic acid C ₈ H ₇ NO ₃ 	166.0504	164.0348	-C ₃ H ₅ OPS ₂ (-151.9519)
Benzoic acid C ₇ H ₆ O ₂ 	-	121.0290	-C ₄ H ₆ NO ₂ PS ₂ (-194.9578)
O,O-dimethyl phosphorodithioate C ₂ H ₇ O ₂ PS ₂ 	158.9703	156.9547	-C ₉ H ₅ NO ₂ (-159.0320)

4. Concluding remarks

This work shows the potential of LC – QTOF for the investigation of pesticide metabolites in food samples. The use of a QTOF instrument allows full spectra acquisition in TOF MS mode, promoting fragmentation in the collision cell. It was essential to study the fragmentation pathway of the parent pesticide, which was facilitated by the accurate mass information given by this analyzer. Besides, MS/MS experiments gave relevant information about product ions and allowed elimination of interferences coeluting with the analytes, providing an excellent way of elucidating and/or confirming the presence of discovered metabolites. High sensitivity may be required in some particular cases. Therefore, new functionalities such as BDC, available in modern QTOF instruments, are of great interest in this field.

Using the common fragmentation pathway approach between parent pesticide and metabolites in positive samples allowed the discovery of two metabolites of imazalil and two metabolites of chlorpyrifos in lemon and grape fruits, respectively. This strategy was extended to a second level, considering a common fragmentation pathway between a known metabolite detected in the sample and other potential metabolites that could be also present. This made possible the discovery of the imazalil metabolite (1-[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-hydroxyethyl]-1H-imidazole). In spite of the success in identifying several metabolites in samples, this methodology presents some drawbacks when there are notable differences in the chemical structures of metabolites. It might occur that no common fragment ions are observed, either because the parent pesticide and metabolite do not share a common fragment, or because there are notable differences in the abundance of common fragments. This might also apply to metabolites themselves. In addition, differences in chemical behavior between metabolites should be taken into account, because relevant differences may exist in the optimization of instrumental parameters, ionization mode (e. g. chlorpyrifos metabolites TCP, DBP, and DBTP observed in negative BSI), chromatographic retention (anionic DBP and DBTP require ion-pair formation in reversed phase chromatography), as well as in sample extraction conditions. In the common fragmentation approach the use of isotopic fingerprints, such as chlorine pattern, was indispensable to identify the molecular ion of the discovered metabolite. Moreover, a complementary strategy based on the use of a QqQ analyzer working in precursor-ion scan mode has been applied, taking as illustrative example the investigation of imazalil metabolites. In this case, the possibility of directly identifying the precursor ion of the fragment ion could be noted as a great advantage. However, the scan sensitivity of QqQ was poor compared with that of TOF, and its mass resolution did not allow accurate mass data to be obtained.

Another strategy for investigating the presence of pesticide metabolites was application of the specific software package MetaboLynx, which allowed searching for differences between TOF MS data of treated and non- treated samples in an automated

way. This approach was applied to olive oil samples collected from phosmet field residue trials. The availability of blank (untreated) and treated samples, with exactly the same matrix, made the application of this strategy easier and led to the discovery of phosmet-oxon in several phosmet-positive samples. MetaboLynx looks for relevant differences between blank and positive samples independently of the existence of common fragmentation or characteristic isotopic distributions. However, some of the limitations stated above also apply to this strategy, such as the need to select appropriate experimental conditions for sample extraction and chromatographic separation, compatible with the metabolite investigated.

The authors are very grateful to Serveis Centrals d'Instrumentació Científica (SCIC), University Jaume I, for the use of the QTOF instrumentation. This equipment was bought thanks to European FEDER Funds. The authors acknowledge financial support from the Ministerio Español de Ciencia y Tecnología (Project CTQ2006-07594).

The authors declared no conflict of interest.

5. References

- [1] Hernández, F., Sancho, J. V., Ibáñez, M., Grimalt, S., Trends Anal. Chem. 2008, 27, 862 – 872.
 - [2] Medana, C., Calza, P., Baiocchi, C., Pelizetti, B., Curr. Org. Chem. 2005, 9, 859 – 873.
 - [3] Sinclair, C. J., Boxall, A. B. A., Environ. Sci. Technol. 2003, 37, 4617 – 4625.
 - [4] Lu, C., Barr, D. B., Pearson, M. A., Walker, L. A., Bravo, R., J. Exposure Sci. Environ. Epidemiol. 2009, 19, 69 – 78.
 - [5] Picó, Y., Farre, M., Soler, C., Barceló, D., Anal. Chem. 2007, 79, 9350 – 9363.
 - [6] European Commission, Guidelines for the generation of data concerning residues as provided in Annex II, part A, section 6, and Annex III, section 8, of Directive 91/414/BBC concerning the placing of plant protection products on the market. Appendix A: Metabolism and Distribution in Plants, Doc 7028/VI/95, 22 July 1997 (<http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/app-a.pdf>).
 - [7] Thurman, B. M., Ferrer, I., Zweigenbaum, J. A., García-Reyes, J. F., Woodman, M., Fernández-Alba, A. R., J. Chromatogr. A 2005, 1082, 71 – 80.
-

- [8] Alder, L., Greulich, K., Kempe, G., Vieth, B., *Mass Spectrom. Rev.* 2006, 25, 838 – 865.
- [9] Lehotay, S. J., de Kok, A., Hiemstra, M., van Bodegraven, P., *J. AOAC Int.* 2005, 88, 595 – 614.
- [10] Pihlström, T., Blomkvist, G., Friman, P., Pagard, U., Osterdahl, B. G., *Anal. Bioanal. Chem.* 2007, 389, 1773 – 1789.
- [11] Hernández, F., Pozo, O. J., Sancho, J. V., Bijlsma, L., Barreda, M., Pitarch, B., *J. Chromatogr. A* 2006, 1109, 242 – 252.
- [12] García-Reyes, J. F., Molina-Díaz, A., Fernández-Alba, A. R., *Anal. Chem.* 2007, 79, 307 – 321.
- [13] García-Reyes, J. F., Ferrer, I., Thurman, B. M., Molina-Díaz, A., Fernández-Alba, A. R., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2005, 19, 2780 – 2788.
- [14] Grimalt, S., Pozo, O. J., Sancho, J. V., Hernández, F., *Anal. Chem.* 2007, 79, 2833 – 2843.
- [15] Ferrer, I., Fernández-Alba, A., Zweigenbaum, J. A., Thurman, B. M., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2006, 20, 3659 – 3668.
- [16] European Commission, Directorate General Health and Consumer Protection, Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed, Document N0 SANCO/2007/3131, 31/October/2007, Supersedes Document No. SANCO/10232/2006 (http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf).
- [17] Commission Directive 2002/657/BC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/BC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, Official Journal L221/8 (http://eur-lex.europa.eu/pri/es/oj/dat/2002/l_221/l_221/20020817es00080036.pdf).
- [18] Gilbert-López, B., García-Reyes, J. F., Mezcua, M., Molina-Díaz, A., Fernández-Alba, A. R., *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 10548 – 10556.
- [19] Raina, R., Sun, L., *Environ. Sci. Health B* 2008, 43, 323 – 332.
- [20] Bicker, W., Lämmerhofer, M., Lindner, W., *J. Chromatogr. B* 2005, 822, 160 – 169.
- [21] Hernández, F., Sancho, J. V., Pozo, O. J., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2002, 16, 1766 – 1773.
- [22] Sancho, J. V., Pozo, O. J., Hernández, F., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2000, 14, 1485 – 1490.
-

J. Sep. Sci. 2009, 32, 2245 – 2261

- [23] Roberts, T. R., Huston, D. H., Jewess, P. J., Lee, P. W., Nicholls, P. H., Plimmer, J. R., *Metabolic Pathways of Agrochemicals. Part 2: Insecticides and Fungicides*, The Royal Society of Chemistry, London, UK, 1999, pp. 437 – 441.
-

4.3.3. Discusión de los resultados

El trabajo se ha enfocado hacia el uso de dos metodologías para la búsqueda de metabolitos de plaguicidas en muestras de origen vegetal.

A) Iones de fragmentación comunes entre el plaguicida precursor y sus metabolitos

La primera aproximación aplicada en este trabajo ha sido el uso de fragmentos comunes entre los metabolitos y su plaguicida precursor en muestras vegetales positivas procedentes de comercios. En este caso no se disponía de muestras blanco que presentaran las mismas características: exactamente la misma variedad, estado de maduración, procedencia de campo de cultivo, y/o en caso de haber sido procesadas, que lo fueran en las mismas condiciones. Por esta razón, una aproximación comparativa entre una muestra blanco y otra positiva al plaguicida no sería posiblemente la mejor opción. Como ejemplo se seleccionaron una muestra de limón previamente analizada, en la que se encontró imazalil y otra muestra de uva positiva a clorpirifos.

Como ya se conocía la presencia del plaguicida del que se van a buscar metabolitos, el primer paso fue estudiar su ruta de fragmentación mediante el uso del QTOF-MS/MS. Las rutas de fragmentación propuestas para imazalil (*Figura 1 del artículo científico 8*) y clorpirifos (*Figura 2 del artículo científico 8*) permitieron conocer los valores de m/z teóricos exactos a los que se podían buscar iones de fragmentación que fueran comunes para el plaguicida y sus metabolitos.

Para obtener una mayor abundancia de los iones fragmento, así como de su ión molecular precursor, se usó el QTOF en modo TOF MS. Esto es, no se hacía uso del primer cuadrupolo para aislar iones precursores, pero sí que pasaban por la celda de colisión con suficiente energía para fragmentarse, antes de su entrada en el TOF. Esto fue posible porque se disponía de un instrumento QTOF, de forma que se obtuvo una colisión aparentemente más controlada que en el caso de llevar a cabo la clásica fragmentación en la fuente de ionización del TOF (Ferrer *et al.*, 2006; García-Reyes *et al.*, 2005). Además, se hizo uso de una rampa de colisión, permitiendo una adquisición más o menos equilibrada entre los iones moleculares y sus iones de fragmentación.

CASO 1. Investigación de metabolitos de Imazalil

En primer lugar, se estudió la presencia de fragmentos comunes al imazalil a otros tiempos de retención en una adquisición en modo TOF MS, mediante la extracción de nueve nw-XICs correspondientes a las masas exactas teóricas de los iones producto, a partir de la información obtenida en la ruta de fragmentación del imazalil. Se obtuvo un pico a t_R de 3.31 min para el ion fragmento m/z 255.0092. Su correspondiente espectro combinado mostró tres iones típicos de una relación isotópica de dos cloros (m/z 255, 257 y 259). Mediante el cálculo de la composición elemental se obtuvo la fórmula molecular ($C_{11}H_9N_2OCl_2$) cuya masa teórica se desviaba muy poco de la masa experimental obtenida, así como la relación de abundancia de los iones (error de masa 0.2 mDa, i-FIT 0.0 y DBE 7.5). A partir de esta información, se llegó a una posible estructura molecular del metabolito (etiquetado como IMZ-M1) que puede observarse en la *Tabla 1 del artículo científico 8*.

Para confirmar IMZ-M1 se llevaron a cabo experimentos en QTOF MS/MS, seleccionando como ion precursor m/z 255. Como este metabolito no se encontraba a concentraciones suficientemente elevadas para la sensibilidad del QTOF, se debió hacer uso de la función EDC. Una vez se obtuvieron los espectros a diferentes energías de colisión se concluyó que se trataba de un metabolito de imazalil por la concordancia de los iones producto con la estructura molecular propuesta. A su vez, se encontró que compartía otros iones producto minoritarios con el imazalil (*Tabla 1 del artículo científico 8*, m/z 159, 81 y 69).

También se planteó el uso de fragmentos no comunes con el imazalil, obtenidos en las experiencias MS/MS del metabolito descubierto IMZ-M1. El ion producto de m/z 171, que no había sido considerado en el imazalil, apareció en el espectro combinado del pico IMZ-M1, y presentó también la relación isotópica de una estructura diclorada (ver *Figura 3 del artículo científico 8*). En este sentido, se consideró que podría ser posible que existiera incluso una mayor relación entre los fragmentos de dos metabolitos procedentes de un mismo plaguicida, que entre éste y uno de sus metabolitos, ya que también compartirían características estructurales. Por ello, se aplicó la misma estrategia que para IMZ-M1, suponiendo fragmentos comunes entre los metabolitos. Se extrajo el XIC a m/z 170.9768 y se encontró un pico extra a 3.02 min, fue considerado como un nuevo potencial metabolito. Tal como muestra la *Figura 4 del artículo científico 8*, se encontró en su espectro combinado dos iones, m/z 257 y 259, que guardaban la relación isotópica correspondiente a una estructura diclorada. Se obtuvo una única fórmula molecular ($C_{11}H_{11}N_2OCl_2$) con tan sólo una desviación de masa 0.7

mDa, DBE 8 e i-FIT 0.0. Se propuso una estructura química probable para esa fórmula (ver *Figura 4 del artículo científico 8*) y se denominó como IMZ-M2.

De la misma forma que para IMZ-M1, la confirmación de la identidad del metabolito se realizó mediante una adquisición (ión precursor m/z 257) QTOF MS/MS a diferentes energías de colisión (10, 20 y 30eV). Se observó que la fragmentación de este metabolito no presentaba apenas iones comunes con el imazalil, a excepción del m/z 69 (*Figura 4.e del artículo científico 8*). Una vez elucidada la estructura del IMZ-M2, y relacionándola con el IMZ-M1 y el imazalil, se pudo concluir que ambas presentaban una degradación por pérdida de la cadena alquílica del éter. Además, podría ocurrir la reducción de IMZ-M1 a IMZ-M2, o viceversa, una previa transformación del imazalil a IMZ-M2 para sufrir una oxidación a IMZ-M1.

Cabe destacar, como dato interesante, que se encontró un pico a 3.45 min (*Figura 4.c del artículo científico 8*) cuando se llevó a cabo la extracción del XIC a m/z 171. El t_R correspondía al imazalil, para el cuál no se había observado dicho fragmento, por lo que se estudió de nuevo la ruta de fragmentación del imazalil, encontrándose, en efecto, un ion producto de muy baja abundancia a esta m/z (menor de un 1% respecto al pico base m/z 158). Sin embargo, la abundancia relativa para este ion fragmento era mucho mayor en los metabolitos (24% para IMZ-M2). Esta diferencia significativa de abundancias entre los iones fragmento de los metabolitos y del plaguicida evidencia una de las limitaciones de esta estrategia, como consecuencia de las diferencias en sus estructuras químicas. En el peor de los casos, podría darse la situación en que no se observaran iones de fragmentación comunes, impidiendo el descubrimiento del metabolito. En particular, el IMZ-M2 presentaría esta limitación, aunque llevando la misma estrategia a un segundo nivel, utilizando la búsqueda de fragmentos comunes entre metabolitos, se ha podido encontrar este metabolito en la muestra.

Posteriormente a su identificación, se realizó una búsqueda bibliográfica de los metabolitos del imazalil con el objetivo de confirmar si habían sido estudiados por otros autores. No se encontraron referencias sobre el metabolito IMZ-M1, mientras que el IMZ-M2 se encontró su análisis en muestras de frutas mediante el uso del LC-TOF MS (Gilbert-López *et al.*, 2007; Thurman *et al.*, 2005). El hecho de que este último metabolito se encontrara disponible comercialmente (1-[2-(2.4-dichlorophenyl)-2-hydroxyethyl]-1H-imidazole) permitió llevar a cabo su inyección en QTOF, confirmando no sólo los fragmentos propuestos sino el tiempo de retención.

Como alternativa a la estrategia usada mediante TOF MS y QTOF MS/MS, se propuso explorar el uso del QqQ para investigar la presencia de metabolitos en las muestras ya analizadas. Haciendo uso del modo *precursor-ion scan* en QqQ era posible detectar los iones precursores que al fragmentarse generaban un mismo ion producto. Teniendo en cuenta los conocimientos previos, se decidió seleccionar el ion producto más abundante y común a todos los analitos (imazalil, IMZ-M1 y IMZ-M2), que en este caso fue m/z 69. En principio, se esperaba obtener un cromatograma más sencillo que en el caso del *full scan* del TOF MS, ya que sólo se obtendrían picos para aquellos compuestos que al fragmentarse en las condiciones seleccionadas generarán el ion producto 69. Sin embargo, como se puede observar en la *Figura 5.a del artículo científico 8* se obtuvo un cromatograma con numerosos picos. Para simplificar este cromatograma, se decidió usar un filtro de *cluster* isotópico incorporado en el propio *software*, asumiendo que las estructuras que se deseaban encontrar todavía presentaban una relación isotópica característica, por la presencia de 2 cloros. Se obtuvieron dos picos significativos como se puede observar en la *Figura 5.b del artículo científico 8*, correspondientes a los dos analitos clorados más abundantes en la muestra (imazalil, IMZ-M2). En este caso no fue posible detectar el metabolito IMZ-M1, como consecuencia de la menor sensibilidad del QqQ en modo *scan*. A pesar de que el QqQ presente una limitación en cuanto a la sensibilidad frente al analizador TOF, este modo de adquisición tiene la ventaja de permitir definir directamente el ión precursor a partir del ión producto. Esta ventaja todavía sería de mayor interés cuando se desee buscar precursores que no presenten una abundancia isotópica relativa típica, evitando la búsqueda de posibles iones precursores en un espectro de combinación de alta complejidad como es el obtenido por un *full scan* en TOF. Sin embargo, las adquisiciones en TOF proporcionan la ventaja de conocer la masa exacta, que en la mayoría de los casos nos conducirá a la hipótesis de fórmulas moleculares relacionadas con el plaguicida de partida.

CASO 2. Investigación de metabolitos de clorpirifos

De la misma forma que en el imazalil, la muestra de uva positiva a clorpirifos se analizó mediante TOF MS con fragmentación en la celda de colisión (rampa de energía de colisión de 5 a 30 eV). Según la ruta de fragmentación obtenida para este plaguicida fue posible la extracción de cinco potenciales iones fragmento comunes a sus masas exactas a partir del TIC. Se obtuvieron dos picos, además del clorpirifos, para el ión fragmento m/z 198 a los tiempos de retención 12.67 y 7.47 min (*Figura 6.a del artículo científico 8*). A partir del espectro

combinado del pico a 12.67 min se pudo observar dos iones relevantes que presentaban la relación isotópica de estructuras tricloradas, al igual que el clorpirifos (198/200 y 278/280 en la *Figura 6.b del artículo científico 8*). En el ión m/z 198 se observó una desviación de la masa experimental con respecto a la exacta de 1.9 mDa, mientras que para el ión m/z 278 se obtuvieron 3 posibles fórmulas moleculares (*Tabla 2 del artículo científico 8*). Se consideró más adecuada la primera opción, ya que presentó menor error de masa, así como un valor de DBE atribuible al anillo aromático del clorpirifos. Al igual que en el imazalil, se consideró como ión molecular del metabolito al ión de mayor masa en el espectro, que presentaba una relación isotópica acorde con una estructura relacionada con el plaguicida (m/z 278). Para confirmar esta suposición, se buscó el ión molecular en una nueva adquisición de la muestra mediante TOF MS sin fragmentación en la celda de colisión, esperando encontrar un pico más abundante a m/z 278. Sin embargo, no se encontró presencia alguna, lo que llevó a pensar que no se trataba del ión molecular, sino también de un fragmento del potencial metabolito. Lo que si se observó fue un ión de mayor masa a m/z 334 que también presentaba la relación isotópica de 3 cloros (*Figura 6.d del artículo científico 8*). Se calculó su composición elemental, obteniendo una única fórmula molecular ($C_9H_{12}NO_4PCl_3$) según las restricciones consideradas en función de la estructura del clorpirifos. El error de masa para esta fórmula fue de 1 mDa, con DBE de 3.5 y un i-FIT normalizado de 0.0. La estructura propuesta para $C_9H_{12}NO_4PCl_3$ aparece en la *Figura 6 del artículo científico 8* (CHLOR-M1). La confirmación de la identidad de CHLOR-M1 se llevó a cabo mediante QTOF MS/MS, seleccionando como ión precursor $[M+H]^+$ m/z 334. Al igual que en IMZ-M1, la baja concentración del metabolito CHLOR-M1 en la muestra, hizo necesario el uso de una adquisición con EDC para detectarlo. El espectro de fragmentación de m/z 334 presentó los iones 278 y 198, confirmándolos como sus iones producto; además, se encontraron otros iones fragmento que se indican en la *Tabla 1 del artículo científico 8*. Según la información obtenida y las referencias bibliográficas disponibles (Bicker *et al.*, 2005; Raina *et al.*, 2008) se consideró el metabolito CHLOR-M1 como el clorpirifos-oxon.

Por otro lado, no se observaron picos de iones característicos de una estructura derivada del clorpirifos en el espectro combinado del otro pico encontrado (t_R 7.47 min) para el XIC a m/z 198. Por lo que se sospechó que podía corresponder a una ionización baja en modo positivo de un metabolito que se ionizaba preferentemente en modo negativo, basándose en las referencias de los metabolitos conocidos del clorpirifos (Bicker *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2002). En consecuencia, se decidió realizar una adquisición con TOF MS en modo

negativo, con el objeto de detectar la posible presencia del $[M-H]^-$ de los metabolitos descritos TCP, DEP y DETP. En esta nueva experiencia fue detectada la presencia del metabolito TCP, con sus correspondientes iones a m/z 196, 198 y 200, con desviaciones de la masa exacta menores de 1 mDa, así como la adecuada relación isotópica. El t_R de este pico en negativo era igual al obtenido en el XIC a m/z 198 en modo positivo (*Figura 6 del artículo científico 8*), por lo que se confirmó que, en efecto, se trataba de una pequeña ionización en modo positivo del TCP. Para confirmar su identidad se realizaron experiencias en QTOF MS/MS en modo negativo, pero no se pudo observar fragmentación del ión seleccionado (m/z 196), lo que concuerda con lo descrito en la bibliografía (Sancho *et al.*, 2000). Dado que se encontraba comercialmente disponible el patrón de TCP, se pudo confirmar su presencia mediante la inyección del patrón de referencia. Se obtuvo una desviación de tan sólo el 0.4% entre los tiempos de retención del patrón y el pico del metabolito encontrado en la muestra de uva. En este caso, se ha podido comprobar que el uso de un modo de ionización adicional puede ayudar a encontrar otros metabolitos que por su estructura química pueden diferir en su modo de ionización con respecto al plaguicida del que proceden.

Finalmente, se obtuvieron los XICs a las masas exactas de DEP y DETP sin observar ningún pico. La ausencia de picos podía deberse a la no presencia de estos metabolitos en la muestra, o bien, a que no habían sido cromatografiados correctamente. Tal y como aparece descrito en bibliografía (Bicker *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2002), el carácter iónico de estos analitos obliga a realizar una separación cromatográfica diferente, mediante intercambio aniónico (Bicker *et al.*, 2005), o bien mediante el uso de pares iónicos en fase reversa (Hernández *et al.*, 2002). Esta premisa debe considerarse como otra importante limitación en la búsqueda de metabolitos, ya que los cambios estructurales sufridos pueden conducir no sólo a un cambio en el modo de ionización, sino también de extracción y separación cromatográfica.

B) Uso de Software comparativo: MetaboLynx

Como segunda aproximación para la búsqueda de metabolitos en muestras positivas de vegetales se ha hecho uso de un *software* con la capacidad de comparar las adquisiciones en *full scan* obtenidas mediante TOF. Las adquisiciones en TOF se realizan sin fragmentación, tanto en modo positivo como negativo, para muestras control y tratadas con el plaguicida. El *software* compara de forma automática cromatogramas extraídos a diferentes m/z , seleccionando aquellos picos cromatográficos que aparecen en las muestras tratadas, pero no en las muestras control. Por tanto, este tipo de estrategia implica disponer de

muestras blanco y positivas que presenten exactamente las mismas características, de forma que aquello que las diferencie esté directamente relacionado con la presencia del plaguicida. Considerando estas restricciones, las muestras más interesantes para este tipo de trabajo son las provenientes de ensayos de campo o de laboratorio donde se aplica el plaguicida bajo condiciones controladas. En nuestro caso, se ha trabajado con muestras de aceite obtenida de aceitunas sometidas a tratamiento con fosmet, disponiendo tanto de muestras no tratadas como tratadas a diferentes tiempos de recolección.

El *software MetaboLynx* trabaja en dos modos: buscando posibles diferencias esperadas, es decir metabolitos ya descritos, de los que se conoce su m/z , o bien buscando cualquier pico/ión que se diferencie aunque no haya sido definido previamente (compuestos no esperados). De esta forma, se debe hacer una búsqueda previa en bibliografía de los metabolitos conocidos del fosmet. Las diferencias de masa con respecto al plaguicida precursor son introducidas en el *software* como búsqueda de metabolitos esperados, a la vez que se introducen las diferencias correspondientes a biotransformaciones típicas, descritos en la bibliografía.

CASO 3. Metabolitos descritos del fosmet

Como metabolitos esperados se obtuvieron dos picos, uno en modo positivo y otro en modo negativo. El pico en modo positivo correspondía al metabolito fosmet-oxon, con una desviación de masa de tan solo 1.6 mDa. Como el patrón de referencia estaba disponible, se pudo inyectar en el TOF MS, también en modo positivo, obteniendo una desviación del 0.6 % en el t_R (ver *Figura 7.b del artículo científico 8*). Después, se probaron experimentos QTOF MS/MS, tanto con el patrón de referencia como con la muestra positiva, pero debido a la baja concentración en la muestra no fue posible la detección de iones productos significativos. Ya que se conocía la fragmentación del fosmet-oxon, estudiada en QTOF MS/MS a partir del patrón, se decidió crear un método de detección en un instrumento más sensible (QqQ). Se seleccionaron los fragmentos más específicos y sensibles obtenidos por QTOF y se adquirieron las transiciones 206>160 y 306>77 en el QqQ. De esta forma, se pudo confirmar la identidad del metabolito, y además cuantificarlo en la muestra de aceite de oliva (0.008 mg/kg). Tal como se muestra en las *Figuras 7.c y 7.d del artículo científico 8*, los t_R del patrón y de la muestra positiva son idénticos, así como las relaciones de las abundancias de las transiciones adquiridas.

El pico encontrado en la búsqueda en modo negativo pareció corresponder a benzoato, un posible derivado de degradación del fosmet. El pico presentó un error de masa de tan sólo 0.6 mDa con respecto al valor teórico del $[M-H]^-$ del benzoato. Sin embargo, tras realizar varias experiencias para confirmar la identidad de dicho producto de degradación, no se obtuvieron resultados satisfactorios.

CASO 4. Metabolitos desconocidos del fosmet

En la búsqueda de metabolitos desconocidos se encontró un pico que aparecía en la mayor parte de las muestras tratadas con fosmet, que no aparecía en las no tratadas. Sin embargo, tras ser estudiado con detenimiento, considerando los iones presentes en su espectro combinado, no se pudo llegar a ninguna conclusión que demostrara su relación con la estructura química del fosmet. Al contrario, parecía no estar relacionado con este plaguicida, observando el defecto de masa que presentaba, así como los fragmentos obtenidos en las experiencias QTOF MS/MS. Su presencia podría estar ligada a la aplicación del formulado, bien a los aditivos que acompañaban al fosmet, bien como un efecto derivado de su aplicación en la propia planta.

Después de haber aplicado estas dos estrategias para la búsqueda de metabolitos de plaguicidas en muestras vegetales, se comprueba que LC-QTOF es una técnica con un alto potencial para este tipo de investigaciones. También cabe destacar que el uso del QTOF ha permitido realizar adquisiciones *full scan* en modo TOF MS, fragmentando en la celda de colisión. Una adecuada fragmentación de los posibles metabolitos detectados es esencial para encontrar su correspondencia mediante fragmentación común con el plaguicida precursor. Además, ha sido fundamental disponer de la información de la masa exacta que proporciona este analizador para deducir las fórmulas moleculares de los metabolitos encontrados. Finalmente, hay que considerar la relevancia de poder hacer experiencias MS/MS, aislando el ion precursor del metabolito en estudio del resto de interferentes de la matriz y obtener así iones producto en masa exacta, que ayuden a confirmar la identidad del mismo.

4.3.4. Referencias bibliográficas

- Bicker, W.; Lämmerhofer, M.; Lindner, W.J. (2005) *Determination of chlorpyrifos metabolites in human urine by reversed-phase/weak anion exchange liquid chromatography-electrospray ionisation-tandem mass spectrometry* J. Chromatogr. B 822, 160-169
- Ferrer, I.; Fernández-Alba, A.; Zweigenbaum, J.A.; Thurman, E.M. (2006) *Exact-mass library for pesticides using a molecular-feature database* Rapid Commun. Mass Spectrometry 20, 3659-3668
- García-Reyes, J.F.; Ferrer, I.; Thurman, E.M.; Molina-Díaz, A.; Fernández-Alba, A.R. (2005) *Searching for non-target chlorinated pesticides in food by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry* Rapid Commun. Mass Spectrom. 19, 2780-2788
- García-Reyes, J.F.; Molina-Díaz, A.; Fernández-Alba, A.R. (2007) *Identification of pesticide transformation products in food by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry via "fragmentation- degradation" relationships* Anal. Chem. 79, 307-321
- García-Reyes, J.F.; Ferrer, I.; Thurman, E.M.; Molina-Díaz, A.; Fernández-Alba, A.R. (2005) *Searching for non-target chlorinated pesticides in food by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry* Rapid Commun. Mass Spectrom. 19, 2780-2788
- Gilbert-López, B.; García-Reyes, J.F.; Mezcua, M.; Molina-Díaz, A.; Fernández-Alba, A.R. (2007) *Determination of postharvest fungicides in fruit juices by solid-phase extraction followed by liquid chromatography electrospray time-of-flight mass spectrometry* J. Agric. Food Chem. 55, 10548-10556
- Grimalt, S.; Pozo, O.J.; Sancho, J.V.; Hernandez, F. (2007) *Use of liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry to investigate pesticide residues in fruits* Anal. Chem. 79, 2833-2843
- Hernandez, F.; Sancho, J.V.; Pozo, O.J. (2002) *Direct determination of alkyl phosphates in human urine by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry* Rapid Commun. Mass Spectrom. 16, 1766-1773
- Hernandez, F.; Sancho, J.V.; Ibañez, M.; Grimalt, S. (2008) *Investigation of pesticide metabolites in food and water by LC-TOF-MS* Trends Anal. Chem. 27, 862-872
-

- Hogenboom, A.C.; Niessen, W.M.A.; Brikman, U.A. Th. (1999) *On-line solid-phase extraction-short-column liquid chromatography combined with various tandem mass spectrometric scanning strategies for the rapid study of transformation of pesticides in surface water* J. Chromatogr. A 841, 33-44
- Ibañez, M.; Sancho, J.V.; Pozo, O.J.; Hernandez, F. (2004) *Use of Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry in Environmental Analysis: Elucidation of Transformation Products of Triazine Herbicides in Water after UV Exposure* Anal. Chem. 76, 1328-1335
- Ibañez, M.; Sancho, J.V.; Pozo, O.J.; Hernandez, F. (2006) *Use of liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry in the elucidation of transformation products and metabolites of pesticides. Diazinon as a case study* Anal. Bional. Chem. 384, 448-457
- Kouloumbos, V.N.; Tsiipi, D.F.; Hiskia, A.E.; Nikolic, D.; Van Breemen, R.B. (2003) *Identification of photocatalytic degradation products of diazinon in TiO₂ aqueous suspensions using GC/MS/MS and LC/MS with quadrupole time-of-flight mass spectrometry* J. Am. Soc. Mass Spectrom. 14, 803-817
- Liu, D.Q.; Hop, C.E.C.A. (2005) *Strategies for characterization of drug metabolites using liquid chromatography-tandem mass spectrometry in conjunction with chemical derivatization and on-line H/D exchange approaches* J. Pharm. Biomed. Anal. 37, 1-18
- Mortishire-Smith, R.J.; O'Connor, D.; Castro-Perez, J.M.; Kirby, J. (2005) *Accelerated throughput metabolic route screening in early drug discovery using high-resolution liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry and automated data analysis* Rapid Commun. Mass Spectrom 19, 2659-2670
- Picó, Y.; Farré, M.; Soler, C.; Barceló, D. (2007) *Confirmation of fenthion metabolites in oranges by IT-MS and QqTOF-MS* Anal. Chem. 79, 9350-9363
- Picó, Y.; Farré, M.; Soler, C.; Tokman, N.; Barceló, D. (2008a) *Rapid and sensitive ultra-high-pressure liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry for the quantification of amitraz and identification of its degradation products in fruits* J. Chromatogr. A. 1203, 36-46
- Picó, Y.; Barceló, D. (2008b) *The expanding role of LC-MS in analyzing metabolites and degradation products of food contaminants* Trends Anal. Chem. 27, 821-835
-

- Raina, R.; Sun, L. (2008) *Trace level determination of selected organophosphorus pesticides and their degradation products in environmental air samples by liquid chromatography-positive ion electrospray tandem mass spectrometry* Environ. Sci. Health B 43, 323-332
- Sancho, J.V.; Pozo, O.J.; Hernandez, F. (2000) *Direct determination of chlorpyrifos and its main metabolite 3,5,6- trichloro-2-pyridinol in human serum and urine by coupled-column liquid chromatography/electrospray-tandem mass spectrometry* Rapid Commun. Mass Spectrom. 14, 1485-1490
- Soler, C.; Hamilton, B.; Furey, A.; James, K.J.; Mañes, J.; Picó, Y. (2007) *Liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry analysis of carbosulfan, carbofuran, 3-hydroxycarbofuran, and other metabolites in food* Anal. Chem. 79, 1492-1501
- Steen, R.J.C.A.; Bobeldijk, I.; Brinkman, U.A.Th. (2001) *Screening for transformation products of pesticides using tandem mass spectrometric scan modes* J. Chromatogr. A 915, 129-137
- Thurman, E.M.; Ferrer, I.; Fernández-Alba, A.; Zweigenbaum, J.A.; García-Reyes, J.F.; Woodman, M.; Fernández-Alba, A.R. (2005) *Discovering metabolites of post-harvest fungicides in citrus with liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry and ion trap tandem mass spectrometry* J. Chromatogr. A 1082, 71-80
-

Conclusiones

La **conclusión general** que se puede extraer de la presente Tesis Doctoral es la gran versatilidad y excelente potencial que ofrece la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas para la investigación de residuos de plaguicidas y sus metabolitos en muestras de alimentos, mediante el uso de diferentes analizadores MS: triple cuadrupolo (QqQ), tiempo de vuelo (TOF) e híbrido cuadrupolo tiempo de vuelo (QTOF). Además, se pueden considerar las siguientes **conclusiones** más **concretas** relacionadas con las dos partes en las que está dividida la Tesis Doctoral.

1. El acoplamiento LC-QqQ ha demostrado ser una herramienta poderosa para la cuantificación de muy bajos niveles de plaguicidas y metabolitos de especial dificultad en GC-MS, en alimentos de origen vegetal, aplicando un mínimo tratamiento de muestra. El uso de patrón interno marcado isotópicamente y/o la dilución del extracto de la muestra (fosetil-aluminio) y/o calibrado en matriz (triclorfon, ciromazina, melamina y fosetil-aluminio) permite contrarrestar el efecto matriz, obteniendo una alta sensibilidad y selectividad que ha permitido la determinación de niveles de $\mu\text{g}/\text{kg}$ por debajo del LMR establecido.
 2. Se ha aplicado con éxito la adición de reactivos formadores de pares iónicos (TBA y TFHA) para una correcta separación por cromatografía líquida en fase reversa de compuestos aniónicos como el fosetil (TBA) y catiónicos como la ciromazina y melanina (TFHA). También se ha estudiado la posibilidad de añadir el aditivo en la fase móvil o en el vial. Esta última opción ha permitido mejorar notablemente la sensibilidad al disminuir el efecto matriz producido por el propio reactivo formador de pares iónicos, especialmente en el caso del fosetil.
 3. Los métodos desarrollados han sido validados bajo un sistema de aseguramiento de la calidad (BPLs) siguiendo las guías SANCO de la Unión Europea. Se ha seleccionado el menor nivel de concentración para el cual ha sido validado el método como LOQ, obteniendo en todos los métodos validados recuperaciones adecuadas (70-110%), así como precisión (<20%) y especificidad (señal menor de un 30% en el blanco). Todos los métodos LC-MS/MS (QqQ) desarrollados han
-

presentado excelentes características analíticas tanto en términos de sensibilidad y selectividad como de exactitud y precisión.

4. El análisis de muestras reales procedentes de ensayos de residuos ha conducido a resultados coherentes con los datos de aplicación de plaguicidas en campo. La confirmación de las muestras positivas por LC-MS/MS QqQ se ha realizado mediante la adición de transiciones SRM adicionales a la de cuantificación, calculando las relaciones de abundancia entre los picos resultantes, cumpliendo siempre los requisitos establecidos en las guías europeas.
 5. Se han evaluado las interfases ESI, APCI y APCI Sabre en compuestos que presentan dificultades de ionización (abamectina y azadiractina), estudiando la formación de aductos, la abundancia de los iones producto y el efecto matriz de cada una de las fuentes. Se concluye que la sensibilidad alcanzada es función básicamente de dos efectos: la afinidad de la molécula por el ión para la formación del aducto y la abundancia de iones producto que genera la formación del mismo. Además, se ha encontrado que las condiciones de adición del aditivo formador de aducto son cruciales para obtener una mejor sensibilidad. La interfase APCI Sabre ha permitido mejorar la sensibilidad en relación a la APCI convencional, alcanzándose una sensibilidad hasta 10 veces mayor para la abamectina.
 6. En la abamectina, el orden de sensibilidad obtenido en la formación de aductos fue $[M+NH_4]^+ > [M+Li]^+ > [M+Na]^+$, siendo la aproximación más sensible la formación de aductos de amonio en la fuente ESI, mostrando también una mejor relación Q/q para la confirmación a niveles de residuo de abamectina en muestras de naranja.
 7. En el caso de la azadiractina se estudio la formación de $[M+NH_4]^+$ frente a la formación de $[M+Na]^+$ y $[M+Li]^+$, observándose que las relaciones de abundancia Q/q para el amoniado eran más favorables ($Q/q \approx 1.5$) que las obtenidas para los aductos de sodio o litio ($Q/q \approx 10$).
 8. Se ha comprobado que la técnica analítica LC-QTOF presenta un gran potencial para el análisis cuantitativo y confirmativo de residuos de plaguicidas, con una excelente capacidad de elucidación e identificación de metabolitos de plaguicidas en muestras de
-

alimentos. Además, es una de las combinaciones de analizadores más idónea para la investigación de las rutas de fragmentación de los plaguicidas.

9. Se ha desarrollado y validado un método de análisis cuantitativo y confirmativo por LC-QTOF para los insecticidas hexitiazox y buprofezin en seis matrices de fruta, alcanzando un rango lineal adecuado para la cuantificación a niveles de $\mu\text{g/L}$ a una alta sensibilidad. Además, se ha podido comprobar el potencial que ofrece esta técnica para la identificación de analitos, llegando a elucidar dos estructuras químicas isobáricas gracias al estudio de sus rutas de fragmentación.
 10. Se ha realizado un estudio comparativo entre los analizadores QqQ, TOF y QTOF, acoplados a UHPLC, utilizando como modelo 11 plaguicidas en 9 matrices vegetales, concluyendo que el QqQ presenta mayor sensibilidad en análisis cuantitativo *target* de los 11 analitos, además de un mayor rango lineal (seguido de TOF y QTOF). Respecto a la capacidad confirmativa, el QTOF fue el analizador más poderoso alcanzando un mayor número de IPs, para todos los compuestos seguido del QqQ y del TOF. Sin embargo, en cuanto a la confirmación de muestras reales el QqQ presenta una mayor robustez alcanzando un número suficiente de IPs (guía 2002/657/CE) para la confirmación de analitos tanto permitidos como prohibidos. El TOF fue el analizador con mayor limitación para la confirmación en análisis *target*, como consecuencia de la menor fragmentación en la fuente de ionización de los analitos seleccionados.
 11. Se ha demostrado que la LC-TOF es una gran herramienta para fines de *screening*, permitiendo investigar la presencia de otros plaguicidas *non-target* mediante el uso de una base de datos de más de 400 plaguicidas y metabolitos. Además, se ha confirmado la presencia de alguno de estos plaguicidas no preseleccionado mediante el estudio de la fragmentación (carbendazima, indoxacarb), y posterior inyección de su patrón de referencia (carbendazima).
 12. LC acoplada a TOF es una técnica adecuada para la investigación de metabolitos de plaguicidas en muestras de alimentos y aguas, sobre todo cuando está acompañada de *software* especializado que facilita la búsqueda y confirmación de forma rápida y sencilla. Sin embargo,
-

se ve superada por LC-QTOF, que presenta un mayor potencial para la investigación de metabolitos de plaguicidas en muestras de alimentos.

13. LC-QTOF se ha aplicado para la búsqueda de metabolitos usando dos estrategias con éxito, una manual basada en la relación previsible de las rutas de fragmentación entre los metabolitos y el plaguicida de procedencia, y otra empleando el *software MetaboLynx* para una búsqueda automatizada.
 14. Mediante el método de búsqueda de metabolitos basado en las rutas de fragmentación comunes con el plaguicida precursor se ha encontrado dos metabolitos de imazalil en una muestra de limón y dos metabolitos de clorpirifos en una muestra de uva. Sin embargo, esta estrategia en principio muy útil, no permite descubrir la presencia de un metabolito cuando éste no comparte fragmentos comunes con el plaguicida, o cuando las relaciones de abundancia varían notablemente entre el plaguicida y el metabolito. Para evitar en parte este inconveniente de esta metodología, se ha ampliado su aplicación a la relación de fragmentos comunes entre metabolitos de un mismo plaguicida, lo cual ha permitido descubrir un segundo metabolito de imazalil.
 15. Se ha aplicado el *software MetaboLynx* satisfactoriamente, en casos en los que se disponía de muestras similares tratadas y no tratadas. Esto ha permitido encontrar un metabolito de buprofezin en plátano y un metabolito de fosmet en aceite de oliva, demostrándose que es una metodología adecuada para la búsqueda automatizada rápida y sencilla tanto de metabolitos de plaguicidas tanto descritos y esperados, como de otros no esperados o incluso no descritos.
 16. Tras el uso de diferentes metodologías avanzadas de investigación de metabolitos de plaguicidas se concluye que es muy importante el conocimiento previo de la estabilidad y potenciales compuestos de degradación de un plaguicida. Esta información puede resultar crítica al diseñar la estrategia adecuada, tanto de extracción de la muestra como de análisis seleccionando la cromatografía y modo de ionización más efectiva, para evitar la exclusión de algunos de ellos y maximizar el grado de cobertura de potenciales metabolitos.
-

Sugerencias de futuras líneas de investigación

El trabajo realizado en esta Tesis Doctoral ha puesto de manifiesto el gran potencial que ofrece la técnica LC-MS, así como la versatilidad de los diferentes tipos de analizadores, permitiendo una amplísima funcionalidad en diversos campos de trabajo. A su vez, se ha comprobado que la introducción de continuos avances técnicos y su rápida implementación en los instrumentos amplían cada vez más las posibilidades de la técnica LC-MS, llegando a niveles de sensibilidad, especificidad y selectividad cada vez mayores.

En este sentido, se pueden proponer futuras líneas de trabajo dirigidas hacia diferentes vertientes dentro del campo de la seguridad alimentaria:

✓ La mejora en el diseño de nuevas estrategias tipo *screening* basadas en instrumentos tipo *full acquisition* como el (Q)TOF, que permitan la detección del mayor número de analitos exógenos nocivos en muestras de alimentos mediante el uso de librerías de espectros/bases de datos de compuestos lo más universales posibles, persiguiendo como objetivo ideal el control y conocimiento total de componentes desconocidos presentes en una muestra.

✓ El estudio en profundidad de los compuestos de degradación de los distintos plaguicidas en diferentes matrices, con el objetivo de conocer e identificar los productos de transformación/metabolitos más importantes de los mismos. A su vez, hacer hincapié en el desarrollo de nuevos métodos de análisis que incluyan estos metabolitos.

✓ Al margen de la importancia del desarrollo de metodologías multirresiduales, también es crucial mantener el desarrollo de métodos analíticos específicos y adecuados para aquellos analitos con especial dificultad, debido a sus características físico-químicas o bien a su inestabilidad. Como es el caso de algunos ditiocarbamatos o carbamatos, como el tiram y el benfuracarb, que no pueden ser incluidos en métodos de análisis multirresiduales por su alta inestabilidad, especialmente en matrices vegetales.

Por otro lado, resulta interesante la aplicación de estas técnicas a otras áreas de trabajo, especialmente tras haber podido colaborar en el campo del *anti-doping*. En este sentido, ha resultado de gran interés el uso del gran potencial del instrumento LC-QTOF para la búsqueda e identificación de esteroides estudiados y sus metabolitos conocidos, así como aquellos semi/des-conocidos y de esteroides de diseño desconocidos en fluidos biológicos.

Artículos científicos presentados en la Tesis Doctoral

Artículo científico 1. S. Grimalt, J.V. Sancho, O.J. Pozo, J.M. García-Baudin, M.L. Fernández-Cruz, F. Hernández. *Analytical Study of Trichlorfon Residues in Kaki and Cauliflower Samples by Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry* J. Agric. Food Chem. **2006**, 54, 1188-1195

Artículo científico 2. J.V. Sancho, M. Ibañez, S. Grimalt, O.J. Pozo, F. Hernández. *Residue determination of cyromazine and its metabolite melamine in chard samples by ion-pair liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry* Anal. Chim. Acta **2005**, 530, 237-243

Artículo científico 3. F. Hernández, J.V. Sancho, O.J. Pozo, C. Villaplana, M. Ibañez, S. Grimalt. *Rapid Determination of Fosetyl-Aluminum Residues in Lettuce by Liquid Chromatography/Electrospray Tandem Mass Spectrometry* J. AOAC Int. **2003**, 86, 832-838

Artículo científico 4. S. Grimalt, O.J. Pozo, J.M. Marín, J.V. Sancho, F. Hernández. *Evaluation of Different Quantitative Approaches for the Determination of Noneasily Ionizable Molecules by Different Atmospheric Pressure Interfaces Used in Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry: Abamectin as Case of Study* J. Am. Soc. Mass Spectrom. **2005**, 16, 1619-1630

Artículo científico 5. S. Grimalt, O.J. Pozo, J.V. Sancho, F. Hernández. *Use of Liquid Chromatography Coupled to Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry To Investigate Pesticide Residues in Fruits* Anal. Chem. **2007**, 79, 2833-2843

Artículo científico 6. S. Grimalt, J.V. Sancho, O.J. Pozo, F. Hernández. *Comprehensive comparative of quantification and confirmation capabilities of UHPLC coupled to triple quadrupole and hybrid quadrupole*

time of flight mass spectrometry analyzers in pesticide residue analysis J. Mass Spectrom. **2009**, submitted

Artículo científico 7. F. Hernández, J.V. Sancho, M. Ibáñez, S. Grimalt. *Investigation of pesticide metabolites in food and water by LC-TOF-MS* Trends Anal. Chem. **2008**, 27(10), 862-872

Artículo científico 8. F. Hernández, S. Grimalt, O.J. Pozo, J.V. Sancho. *Use of UHPLC-QTOF MS to discover the presence of pesticide metabolites in food samples* J. Sep. Sci. **2009**, 32, 2245-2261

Artículos científicos relacionados con la Tesis Doctoral

- F. Hernández, C. Hidalgo, S. Grimalt, J.V. Sancho *Application of Column-Switching Liquid Chromatography to the Determination of Polar Herbicides in different Environmental Matrices. MCPA as a case Study*. *Química Analítica*, **2001**, 20, 81-91
- J.V. Sancho, O. Pozo, T. Zamora, S. Grimalt, F. Hernández *Direct Determination of Paclobutrazol Residues in Pear Samples by Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **2003**, 51, 4202-4206
- M.L. Fernández-Cruz, S. Grimalt, M. Villarroya, F.J. López, S. Llanos, J.M, García-Baudín. *Residue levels of captan and trichlorfon in field-treated kaki fruits, individual versus composite samples, and after household processing* *Food Additives and Contaminants*, **2006**, 23(6), 591-600
- O.J. Pozo, P. Van Eenoo, K. Deventer, S. Grimalt, J.V. Sancho, F. Hernández, F. T. Delbeke *Collision-induced Dissociation of 3-keto Anabolic Steroids and related Compounds after Electrospray Ionization. Considerations for Structural Elucidation*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2008**, 22, 4009-4024
- O.J. Pozo, P. Van Eenoo, K. Deventer, L. Lootens, S. Grimalt, J.V. Sancho, F. Hernández, P. Meuleman, G. Leroux-Roels, F. T. Delbeke *Detection and Structural Investigation of Metabolites of Stanozolol in Human Urine by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry*. *Steroids*, **2009**, 74, 837-852
-