Mechanismen und Minimierung von Matrixeffekten in der quantitativen Spurenanalytik mit der Elektrospray-Massenspektrometrie

vorgelegt von Staatlich geprüfter Diplom-Lebensmittelchemikerin Helen Stahnke aus Stendal

von der Fakultät III - Prozesswissenschaften der Technischen Universität Berlin zur Erlangung des akademischen Grades

> Doktorin der Naturwissenschaften - Dr. rer. nat. -

> > genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender:Prof. Dr. Frank-Jürgen MethnerGutachter:Prof. Dr. Lothar W. KrohGutachter:Dr. Lutz AlderGutachter:Prof. Dr. Walter Vetter

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 17. März 2014

Berlin 2014 D83

(A) PUBLIKATIONEN

- Stahnke, H.; Kittlaus, S.; Kempe, G.; Hemmerling, C.; Alder, L. The Influence of Electrospray Ion Source Design on Matrix Effects. J. Mass Spectrom. 2012, 47, 875-884.
- Stahnke, H.; Kittlaus, S.; Kempe, G.; Alder, L. Reduction of Matrix Effects in Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry by Dilution of the Sample Extracts: How Much Dilution is Needed? Anal. Chem. 2012, 84, 1474-1482.
- Stahnke, H.; Reemtsma, T.; Alder, L. Compensation of Matrix Effects by Postcolumn Infusion of a Monitor Substance in Multiresidue Analysis with LC-MS/MS. Anal. Chem. 2009, 81, 2185-2192.

(B) VORTRÄGE

- Stahnke, H. Matrixeffekte bei der Elektrospray-Ionisation Kein hoffnungsloser Fall. Tagung des Verbands Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA), Fachgruppe Umwelt- und Spurenanalytik, Karlsruhe, 13. März 2013.
- Stahnke, H. Matrixeffekte bei der Elektrospray-Ionisation Kein hoffnungsloser Fall. Kolloquium "LC-MS in der Umweltanalytik" am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung (UFZ), Leipzig, 11. Juni 2012.
- Stahnke, H.; Kittlaus, S. Matrix effects in LC-ESI-MS Some new results from two laboratories.
 6th International Fresenius Conference on Pesticide Residues in Food, Frankfurt am Main, 24.-25. Mai 2011.
- Stahnke, H. Matrix effects in Electrospray-Mass Spectrometry not a hopeless case. 3rd Latin American Pesticide Residue Workshop (LAPRW), Montevideo, Uruguay, 8.-11. Mai 2011.
- Stahnke, H.; Alder, L. Permanent monitoring of matrix effects in LC-ESI-MS. Analytical Forum Water Contaminants (AFWC), Hamburg, 14.-15. Oktober 2010.
- Alder, L.; Stahnke, H.; Reemtsma, T. Non-targeted analysis for pesticide residues by high-resolution LC-MS What is possible? 8th European Pesticide Residue Workshop (EPRW), Straßburg, Frankreich, 20.-24. Juni 2010.
- Stahnke, H.; Alder, L.; Reemtsma, T. Matrix Effects in Liquid Chromatography / Electrospray Mass Spectrometry. 5th International Fresenius Conference on Pesticide Residues in Food, Frankfurt am Main, 28.-29. September 2009.
- Stahnke, H.; Alder L.; Reemtsma, T. Matrixeffekte bei der Elektrospray-Massenspektrometrie und ihre Kompensation mittels Nachsäuleninfusion. Gemeinsame Tagung der Regionalverbände Nord, Nord-Ost und Süd-Ost der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Berlin, 2.-3. April 2009.

(C) POSTER

- Heße, F.; Stahnke, H.; Reemtsma, T.; Alder, L. Matrix effects in LC-ESI-MS analysis of drinking water – a home made problem? Book of Abstracts, 8th European Pesticide Residue Workshop (EPRW), Straßburg, Frankreich, 20.-24. Juni 2010; PA 054, 139.
- Stahnke, H.; Alder, L.; Reemtsma, T. Matrixeffekte in der Spurenanalytik mit LC-MS/MS bei Elektrosprayionisierung – Gibt es prinzipielle Unterschiede bei Messungen mit ESI(+) und ESI(-)? 38. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Berlin, 14.-16. September 2009.
- Stahnke, H.; Alder, L.; Reemtsma, T. Matrixeffekte in der quantitativen Spurenanalytik mit LC-MS – (Etwas) mehr Klarheit f
 ür ein leidiges Ph
 änomen. 42. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft f
 ür Massenspektrometrie, Konstanz, 8.-11. M
 ärz 2009.

VORWORT

Diese Arbeit wurde im Wintersemester 2013/14 von der Fakultät Prozesswissenschaften der Technischen Universität Berlin als Dissertation angenommen. Literatur konnte bis April 2013 einbezogen werden.

Die Ergebnisse der Arbeit stammen aus Messungen, die ich am Bundesinstitut für Risikobewertung in der Zeit von 2009 bis 2011 durchführen konnte. Das Projekt wurde von der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* finanziell gefördert.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, *Dr. Lutz Alder*, der die Anregung für das Thema gab und mich während der Arbeit vielfältig unterstützt und gefördert hat. Mein Dank gilt weiterhin allen ehemaligen *Kolleginnen und Kollegen am Bundesinstitut für Risikobewertung* für die freundliche und anregende Arbeitsatmosphäre. Bedanken möchte ich mich bei Herrn *Prof. Dr. Thorsten Reemtsma* für seine Hilfe beim Einwerben von Drittmitteln und seine Hinweise zum Erstellen wissenschaftlicher Artikel. Mein Dank gilt Herrn *Prof. Dr. Lothar Kroh* für das entgegengebrachte Vertrauen und die Betreuung der Arbeit an der Technischen Universität Berlin. Ich danke Herrn *Prof. Dr. Walter Vetter* für seine schnelle Bereitschaft zur Begutachtung der Arbeit und Herrn *Prof. Dr. Frank-Jürgen Methner* für die Übernahme des Vorsitzes im Promotionsausschuss.

Mit Stefan Kittlaus und Herrn *Dr. Günther Kempe* von der Landesuntersuchungsanstalt Sachsen und Herrn *Dr. Christlieb Hemmerling* vom Landeslabor Berlin-Brandenburg entstanden wertvolle Kooperationen, die Messungen von Matrixeffekten an verschiedenen Geräteplattformen möglich machten. Bedanken möchte ich mich auch bei *Florian Heße, Irina Peter, Anna Ayzenshtadt* und *Eline Basilio-Janke*, die im Rahmen ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeit oder eines Praktikums mit Mess- und Rechercheergebnissen zu diesem Projekt beigetragen haben.

Ich danke meiner Familie, insbesondere *meinen Eltern*, die durch die Förderung meiner Ausbildung die vorliegende Arbeit erst möglich gemacht haben.

Berlin, den 23. April 2014

Helen Stahnke

INHALTSVERZEICHNIS

VORWORT

1	HINTERGRUND UND ZIELSTELLUNG DER ARBEIT	1
2	EINLEITUNG	3
2.1	Elektrospray-Ionisation	
2.2	Definition von Matrixeffekten	6
2.3	Detektion von Matrixeffekten	7
2.4	Mechanismen von Matrixeffekten	
2.5	Auslösende Substanzen für Matrixeffekte	11
2.6	Minimierung von Matrixeffekten	12
2.7	Kompensation von Matrixeffekten	12
3	ERGEBNISSE	
3.1	Der Einfluss der Analyteigenschaften auf Matrixeffekte	
3.2	Der Einfluss der Matrixkonzentration auf Matrixeffekte	32
3.3	Der Einfluss des Quellendesigns auf Matrixeffekte	55
3.4	Identifizierung Matrixeffekt auslösender Inhaltsstoffe	
3.5	Matrixeffekte bei negativer Elektrospray-Ionisation	80
3.6	Matrixeffekte von Trink- und Oberflächenwässern	
4	GESAMTDISKUSSION	
4.1	Methodische Grundlagen	
4.2	Mechanismus von Matrixeffekten	
4.3	Minimierung von Matrixeffekten	105
5	ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY	110
6	ANHANG	112
6.1	Abkürzungen	112
6.2	Identifizierung Matrixeffekt auslösender Inhaltsstoffe in pflanzlichen Lebensmitte	eln 113
6.3	Negative Elektrospray-Ionisation	124
6.4	Abbildungsverzeichnis	126
6.5	Tabellenverzeichnis	128
6.6	Literaturverzeichnis	128

1 HINTERGRUND UND ZIELSTELLUNG DER ARBEIT

Die instrumentelle Spurenanalytik hat sich in den letzten 10 Jahren stark gewandelt. Stand früher die Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) an erster Stelle, wird die Mehrheit spurenanalytischer Untersuchungen heute mittels Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS) durchgeführt.^{1,2} Im Gegensatz zur GC-MS ermöglicht die LC-MS eine Quantifizierung thermisch instabiler, schwer flüchtiger oder polarer Analyte, wie moderner, weniger persistenter Pestizide, ohne dass Derivatisierungsreaktionen notwendig werden. Die Kombination aus flüssigchromatographischer Trennleistung mit der exzellenten Sensitivität und Selektivität der Tandem-Massenspektrometer (MS/MS) im Selected Reaction Monitoring (SRM)-Modus hat die LC-MS/MS zu einem weltweiten Standard in der Lebensmittel-, Pharma-, Bio- und Umweltanalytik gemacht. Auch die Kombination von Flüssigchromatographie mit hochauflösender Massenspektrometrie (LC-HR-MS) gewinnt zunehmend an Bedeutung.³⁻¹³

Voraussetzung für den rasanten Fortschritt der LC-MS war die Entwicklung geeigneter Interfaces zur Kopplung beider Analysetechniken. Der Durchbruch gelang mit Ionenquellen, die bei Atmosphärendruck ionisieren. Atmosphärendruck-Ionenquellen (API-Quellen) bieten Kompatibilität zum großen Flüssigkeitsvolumen der LC, Robustheit, leichte Handhabbarkeit und mindestens vergleichbare Sensitivität wie in der GC-MS.¹⁴ Die am häufigsten eingesetzte API-Quelle basiert auf Elektrospray-Ionisation (ESI). Daneben werden API-Quellen zur Chemischen Ionisation bei Atmospärendruck (APCI) und Photoionisation bei Atmosphärendruck (APPI) produziert.

Die Elektrospray-Ionisation zeichnet sich als besonders sanfte Ionisierungstechnik aus. Selbst labile Analytmoleküle werden ohne Fragmentierungen als Quasimolekülionen in die Gasphase überführt und stehen zum Weitertransport in das Hochvakuum des Massenspektrometers zur Verfügung. Elektrospray-Ionisation ist die Methode der Wahl zur Ionisierung sowohl polarer, kleiner Analytmoleküle wie Pestizide als auch von Makromolekülen. Für den Einsatz der LC-ESI-MS-Technik zur Untersuchung von Proteinen erhielt der US-Amerikaner John Fenn im Jahr 2002 der Nobelpreis für Chemie.¹⁵

Durch die Anfälligkeit der Elektrospray-Ionenquelle für Störeinflüsse der Probenmatrix wird die Genauigkeit spurenanalytischer Untersuchungen mit LC-ESI-MS jedoch stark eingeschränkt. Die als "Matrixeffekte" bezeichneten Störungen verringern die Richtigkeit und Präzision quantitativer Bestimmungen. Die Robustheit von Messmethoden sinkt. Die Auswirkungen von Matrixeffekten sind kritisch insbesondere bei der Überwachung gesetzlicher Höchstmengen und anderer Grenzwerte. Matrixeffekte gelten daher als "Achillesverse der quantitativen LC-ESI-MS".¹⁶

Während die Ursachen für Matrixeffekte bei der GC-MS bekannt sind und Lösungsstrategien entwickelt wurden,^{17,18} gibt es große Wissenslücken zu Matrixeffekten bei der LC-ESI-MS. Matrixeffekte gelten hier als abhängig vom jeweiligen Analyten^{16,19-23} sowie der jeweilig injizierten Probenmatrix.²⁴⁻²⁷ Für den Mechanismus, nach dem sie stattfinden, existieren mehrere Theorien.²⁸⁻⁴⁰ Welche die richtigen sind, wird weiterhin intensiv diskutiert. Eine technische Lösung zur Beseitigung der Matrixeffekte ist nicht absehbar. Daher werden die Messergebnisse bisher mit aufwendigen Verfahren wie der Standardaddition oder dem teuren Einsatz stabilisotop-markierter interner Standards korrigiert.^{41,42}

Die vorliegende Arbeit untersucht fundamentale Fragen zu Matrixeffekten bei der LC-ESI-MS am Beispiel der Multi-Pestizidanalytik in Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft. Sie möchte klären, (i) inwieweit Matrixeffekte bei der Elektrospray-Ionisation analytabhängig sind, (ii) ob das Design der Elektrospray-Ionenquelle einen Einfluss auf Matrixeffekte hat, (iii) inwieweit Matrixeffekte durch Verdünnen der finalen Probenextrakte reduziert werden können und welchen Einfluß Analyteigenschaften darauf haben, (iv) welche sonstigen Methoden Alternativen zu den heute eingesetzten aufwendigen Korrekturverfahren sein könnten, (v) welche Inhaltsstoffe pflanzlicher Lebensmittel Matrixeffekte bei der Elektrospray-Ionisation hervorrufen und (vi) ob sich Matrixeffekte bei Multianalyt-Methoden durch verbesserte Clean-Up-Methoden vermeiden lassen. Letztlich möchte die Arbeit ein besseres Verständnis für den Mechanismus und die Eigenschaften von Matrixeffekten bei der Elektrospray-Ionisation gewinnen. Daraus abgeleitete Lösungsvorschläge hätten nicht nur Gültigkeit für die Pestizid-Rückstandsanalytik, sondern wären von generellem Interesse für die Analytik mit LC-ESI-MS-Geräten.

2 EINLEITUNG

Kapitel 2 gibt einen theoretischen Überblick und den Stand der Forschung zu Matrixeffekten bei der Elektrospray-Ionisation wieder.

2.1 Elektrospray-lonisation

Die Instrumentierung und die Prozesse bei der Elektrospray-Ionisation sind in zahlreichen Studien^{34,43,44} und Übersichtsartikeln^{30,45-50} beschrieben. Nachfolgend werden wesentliche Vorgänge der Elektrospray-Ionisation ohne Störungen durch die Probenmatrix zusammengefasst.

Die Elektrospray-Ionenquelle ist ein Spezialfall der elektrolytischen Zelle.^{51,52} Aus diesem Grund werden den Elutionsmitteln häufig Elektrolyte (Säuren, Puffer oder Basen) zur Erhöhung der Leitfähigkeit zugesetzt. Durch elektrische Energie werden Redoxreaktionen an einer Spraykapillare und ihrer Gegenelektrode erzwungen. Im Gegensatz zur echten Elektrolyse erfolgt der Ionentransport jedoch nicht in durchgängiger Elektrolytlösung, sondern in Spray-Tropfen durch die Gasphase. Der vollständige Ablauf der Elektrospray-Ionisation eines Analyten lässt sich in vier Phasen unterteilen: (i) Erzeugung von Überschussladungen innerhalb einer Spraykapillare, (ii) Zerstäubung des geladenen LC-Eluats an der Spitze der Spraykapillare, (iii) Schrumpfen der gebildeten Primärtropfen zu hoch geladenen Nanotröpfchen durch Lösungsmittelverdampfung und wiederholte Tropfenteilungen und (iv) Freisetzung einzelner Ionen aus den hoch geladenen Nanotröpfchen in die Gasphase. Der Ablauf der Elektrospray-Ionisation ist schematisch in Abb. 1 gezeigt.



Abbildung 1 Schematischer Ablauf der Elektrospray-Ionisation im positiven Ionenmodus/ESI(+) (adaptiert aus Literatur 49)

Um die Prozesse ablaufen zu lassen, wird das Eluat der Flüssigchromatographie in eine feine Stahlkapillare, an der eine Hochspannung von 2-5 kV anliegt, gepumpt. An der Spitze der Spraykapillare wirkt ein sehr starkes elektrisches Feld von $10^{6}-10^{7}$ V/m auf die Elektrolytlösung ein und bewirkt eine elektrophoretische Ladungstrennung. Im positiven Ionenmodus/ESI(+) migrieren die Anionen der Lösung zur positiv geladenen Kapillarwand und werden dort oxidiert bzw. entladen. Weitere Oxidationsreaktionen an der Kapillarwand sind die Protonenbildung aus Wasser (2 H₂O \rightarrow O₂ + 4 H⁺ + 4 e⁻) und die Bildung von Metallkationen (Fe (s) \rightarrow Fe²⁺ + 2 e⁻). An der Grenzfläche von Elektrode zu Elektrolyt bildet sich eine elektrische Doppelschicht aus. Die an das Metall der Spraykapillare abgegebenen Elektronen fließen als 10^{-8} bis 10^{-7} A starker Strom zur Gegenelektrode.

Die bei ESI(+) erzeugten Kationen akkumulieren sich im Bereich der Kapillaröffnung und zwingen die Oberfläche der Elektrolytlösung in die Form eines achsensymmetrischen Kegels. Wird die Spannung weiter erhöht (> V_{onset}),^{43,53,54} übersteigt die elektrostatische Kraft der Kationen die Oberflächenspannung der Lösung. Infolge dessen emittiert der so genannte Taylor Kegel⁵⁵ an seiner Spitze ein Flüssigkeitsfilament < 100 µm Durchmesser mit einem Überschuss an positiver Ladung. Die elektrostatische Abstoßung der Kationen lässt das Filament weiter zerfallen in hoch geladene, sich voneinander entfernende Tropfen (Elektrospray). Der Durchmesser der Primärtropfen steigt mit der Flussrate⁵⁶⁻⁵⁹ und liegt bei 1-10 µm. Generell können Elektrosprays neben dem hier für die LC-ESI-MS beschriebenen Cone-Jet-Modus auch in anderen Modi betrieben werden.⁶⁰ Um bei höheren Flussraten (> 0,1 ml/min) eine stabile Ionisation zu erreichen, verfügen dafür entwickelte Ionenquellen über ein zusätzliches Spraygas.

Die geladenen Primärtröpfchen werden zur negativen Gegenelektrode gezogen. Je nach Quellen-Design fungiert als Gegenelektrode entweder eine Metallplatte mit schmaler Öffnung zum Massenspektrometer (Orifice) oder eine zweite Kapillare, die in das Einlasssystem des Massenspektrometers mündet. Der Winkel zwischen Spraykapillare und x-Achse, vom Orifice zum erstem Quadrupol, beträgt bei älteren ESI-Quellen mit off-axis-Geometrie⁶¹⁻⁶³ 30-45° und bei der heute meistverwendeten orthogonalen Spray-Geometrie⁶⁴⁻⁶⁵ 90°.

Die Ionisierungseffizienz eines Analyten wird wesentlich von der Konzentration an Überschussladungen, d. h. der Differenz zwischen der Konzentration an Kationen und Anionen, bestimmt. Für den Zeitpunkt der Tropfenbildung lässt sich die Konzentration an Überschussladungen [Q] nach einer Gleichung von Enke berechnen:²⁸

$$[\mathbf{Q}] = \frac{I}{F \cdot \Gamma} \tag{1}$$

Setzt man typische Werte von 10^{-7} A für die Stromstärke I, $3,3 \cdot 10^{-6}$ l/sec (d. h. 200 µl/min) für die Flussrate Γ und die Faraday-Konstante F von 96.485,3365 C/mol in Gleichung 1 ein, so ergibt sich eine typische Konzentration an Überschussladungen von ~ $3 \cdot 10^{-7}$ mol/l. Diese überschüssigen Ionen (Kationen im ESI(+)), zu denen jeweils kein gegensätzlich geladenes Ion in der Lösung vorhanden ist, akkumulieren sich aufgrund ihrer Abstoßung auf der Tropfenoberfläche (mit etwas größerer Konzentration auf der zur negativen Elektrode weisenden Seite).

Auf ihrem Weg zur Gegenelektrode wird die Trägerflüssigkeit der Tropfen durch beheizte Gase (200-550 °C) verdampft. Dadurch sinkt der Tropfendurchmesser und die Ladungsdichte der Tropfen steigt kontinuierlich bis die elektrostatische Abstoßungskraft der Überschussladungen die gleiche Stärke wie die Oberflächenspannung der Tropfen erreicht. Dieses Kräftegleichgewicht gilt als Rayleigh-Stabilitätsgrenze, q_R , und kann nach einer Gleichung von Lord Rayleigh berechnet werden⁶⁶:

$$q_R = 8 \prod \sqrt{\varepsilon_0 \gamma R^3} \qquad (2)$$

Dabei ist ε_0 die Permeabilität des umgebenen Mediums, γ die Oberflächenflächenspannung des Lösungsmittels und R der Tropfenradius. Die identische Gleichung konnte später von Vonnegut und Neubauer aus der Thermodynamik abgeleitet werden.⁶⁷

Wenn die Ladungsdichte im Primärtropfen die Rayleigh-Stabilitätsgrenze übersteigt ($q > q_R$), findet ein als Coulomb-Explosion oder Rayleigh-Entladung bezeichneter Prozess statt. Der Primärtropfen vibriert, wechselt zwischen einer ellipsoiden und kugeligen Form und entlässt schließlich 15-30 % seiner Ladungen in Sekundärtropfen, die er an der Spitze feiner Flüssigkeitsstrahlen freisetzt.⁶⁸ Die Sekundärtropfen haben etwa ein Zehntel des Durchmessers des Primärtropfens und tragen nur 2 % seiner Masse.^{46,69,70} Inwieweit die theoretische Rayleigh-Stabilitätsgrenze vor einer Coulomb-Explosion erreicht wird und wie viel Prozent der Nettoladung dabei an Sekundärtropfen abgegeben wird, hängt von der Zusammensetzung der Trägerflüssigkeit ab und wurde in einer Studie von Grimm und Beauchamp⁷¹ für verschiedene Lösungsmittelmischungen untersucht.

Die freigesetzten Sekundärtropfen und die Primärtropfen durchlaufen eine Kaskade weiterer Coulomb-Explosionen, in deren Folge immer kleinere Tröpfchen (Nanotröpfchen mit wenigen nm Durchmesser) mit steigender Ladungsdichte entstehen. Aufgrund ihrer schnelleren Instabilität nach einer Coulomb-Explosion sind die Sekundärtropfen die Hauptquelle für freie Gasphasen-Ionen. Die Primärtropfen liefern weitere Sekundärtropfen. Welche Mechanismen letztlich zur Freisetzung von Ionen aus den Nanotröpfchen in die Gasphase führen, ist noch nicht endgültig geklärt. Es werden zwei Theorien diskutiert: das Ionenverdampfungsmodell (engl.: ion evaporation model, IEM) von Iribarne und Thomson⁷² und das Modell des geladenen Rückstands (engl.: charge residue model, CRM) von Dole et al.⁷³, erweitert von Röllgen et al.⁷⁴

Gemäß IEM können die Tröpfchen, sobald ihr Durchmesser auf einen Wert ~ 12 nm gesunken ist, Ionen von der Flüssigkeitsoberfläche direkt in die Gasphase emittieren. Bei der Ableitung des Modells wurde angenommen, dass die Freisetzung der Ionen ein exergonischer Prozess und die Geschwindigkeit der Ionenemission eine kinetisch kontrollierte Reaktion ist. Eine Coulomb-Explosion der Tröpfchen bleibt weiterhin möglich, findet jedoch langsamer statt als die direkte Freisetzung von Gasphasen-Ionen. Das IEM ist der wahrscheinlichste Mechanismus zur Erklärung der Clusterbildung kleiner Ionen.

Nach dem CRM reduziert sich die Tröpfchengröße durch wiederholte Coulomb-Explosionen bis auf einen Durchmesser ~ 1 nm, bei dem nur noch ein einzelnes (Makro)-Molekül im Tropfen enthalten ist. Nach Verdampfen der letzten Lösungsmittelmoleküle übernimmt das Molekül die vormals im Tropfen enthaltenen Ladungen und bleibt als freies Gasphasen-Ion zurück. Dieses Modell erklärt gut die Bildung mehrfach geladener Proteine.

Wenn die freigesetzten Gasphasen-Ionen und eventuell verbliebene geladene Tropfen auf die Gegenelektrode prallen, wird ihre Ladung durch Elektronen neutralisiert. Einige der Gasphasen-Ionen gelangen durch das Orifice in den Massenanalysator. Sie werden über diffentiell gepumpte Zwischenkammern als fokussierter Ionenstrahl in das Hochvakuum des Massenspektrometers geleitet.

Für eine Ionisierung von Analyten mittels Elektrospray ist es keine Bedingung, dass die Analyte als Ionen in Lösung vorliegen. Es genügt bei ESI(+) die Möglichkeit einer Protonierung $[M+H]^+$ in dem sehr stark sauren Milieu des Nanotropfens oder die Neigung zur Bildung von Alkali- bzw. Ammonium-Addukten

z. B. vom Typ $[M+Na]^+$ bzw. $[M+NH_4]^+$. Im Falle negativer Ionisierung müssen Analyte entweder prinzipiell deprotonierbar sein oder Addukte z. B. mit dem Formiat-Anion bilden. Die bei der Adduktbildung benötigten Ionen werden entweder als Puffer zugesetzt oder liegen als Verunreinigung in ausreichender Menge vor.

2.2 Definition von Matrixeffekten

Matrixeffekte treten bei vielen Methoden in der Analytischen Chemie auf und wurden durch die Internationale Union für reine und angewandte Chemie (IUPAC) definiert als "der Gesamteffekt aller Probenbestandteile außer dem Analyten auf Mengenmessungen".^{75,76} In Übereinstimmung definierte die Generaldirektion Gesundheit und Verbraucher der Europäischen Kommission (SANCO) Matrixeffekte in der Pestizidrückstandsanalytik in Lebens- und Futtermitteln als "den Einfluss eines oder mehrerer Probenbestandteile auf die Messung der Analytkonzentration oder –masse".⁴¹ In Literatur [77] ist eine Zusammenstellung der Definitionen von Matrixeffekten aus Leitlinien für die Arzneimittelanalytik enthalten.

In der Spurenanalytik mit LC-ESI-MS(/MS) versteht man unter Matrixeffekten Veränderungen in der Ionisierungseffizienz der Elektrospray-Ionenquelle durch Substanzen, die mit dem Analyten koeluieren.¹⁶ Die Effizienz der Analytionisierung kann durch Matrixbestandteile herabgesetzt oder verbessert sein. Im Vergleich zur Messung im Lösungsmittel treten Signalsuppressionen oder –erhöhungen auf, wodurch die wahre Analytkonzentration unter- oder überschätzt wird. Bei der Überwachung von Höchstmengen besteht das Risiko falsch negativer oder falsch positiver Befunde. Die Messgenauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Analysenmethoden sinkt. Im Fall von Signalsuppression verschieben sich überdies die Bestimmungsgrenzen zu höheren Konzentrationen.

Die erste Beschreibung eines Matrixeffekts bei der Elektrospray-Ionisation geht auf Tang und Kebarle zurück.⁷⁸ Im Jahr 1993 beobachteten sie eine verschieden starke Verringerung des Messsignals für Morphin, Kokain, Heroin sowie weitere Analyte, wenn bei Messung mit LC-ESI-MS/MS die Konzentration an Ammoniumionen in der Ausgangslösung stufenweise erhöht wurde.⁷⁸ Seitdem wurden zahlreiche Übersichtsartikel zu Matrixeffekten bei der LC-ESI-MS(/MS)^{16,21,79-86} veröffentlicht.

In 2003 schlugen Matuszewski et al. eine Differenzierung in absolute und relative Matrixeffekte vor.²⁷ Als *absoluten Matrixeffekt* definierten sie den Unterschied in der Signalintensität gemessen für die gleiche Analytkonzentration in reinem Lösungsmittel und im Probenextrakt. Er betrifft die Richtigkeit der Analysenergebnisse für die einzelne Messlösung. Für Methodenvalidierungen empfehlen Matuszewski et al. die Bestimmung des *relativen Matrixeffekts*, d. h. der Variation absoluter Matrixeffekte zwischen unterschiedlichen Chargen gleicher Matrixart. Der relative Matrixeffekt setzt die Messpräzision herab. Er kann als Standardabweichung zwischen den absoluten Matrixeffekten in verschiedenen Proben gleicher Matrixart berechnet werden.

Übereinstimmend mit Matuszewski et al.^{27,87} fanden Boer et al.⁸⁸ relative Matrixeffekte bei der LC-ESI-MS/MS-Untersuchung von menschlichem Blutplasma auf pharmakologisch wirksame Substanzen. Nach Anwendung von Internen Standards konnten Boer et al.⁸⁸ die relativen Matrixeffekte auf < 5 % korrigieren. Studien zum Auftreten relativer Matrixeffekte in anderen als bioanalytischen Probenmatrices, deren Zusammensetzung in Abhängigkeit von der Ernährung, dem Stoffwechsel und dem Hormonsystem kurzfristigen Schwankungen unterliegen kann, sind rar. Für Tee und Zitrusfrüchte konnten Kittlaus et al. keine signifikanten relativen Matrixeffekte, aber ausgeprägte absolute Matrixeffekte, feststellen.⁸⁹ Kruve et al. berichten hingegen ausgeprägte relative Matrixeffekte für verschiedene Apfelsorten.²⁴

2.3 Detektion von Matrixeffekten

Die konventionelle Methode zur Messung von Matrixeffekten wurde 1996 von Buhrmann et al.⁹⁰ eingeführt. Später wurde die Methode von der Gruppe um Matuszewski²⁷ aufgegriffen und in der Spurenanalytik mit LC-ESI-MS populär gemacht. Bei der Methode wird die Peakfläche eines Matrixstandards verglichen mit der Peakfläche eines reinen Lösungsmittelstandards gleicher Analytkonzentration. Der Matrixextrakt wird nach der Extraktion dotiert und war zuvor frei vom Analyten (sog. post-extraction spike). Eine Dotierung vor der Extraktion (pre-extraktion spike) würde neben dem Matrixeffekt zusätzlich Analytverluste bei der Probenaufarbeitung und damit die Gesamtprozesseffizienz erfassen.

Eine noch präzisere Quantifizierung von Matrixeffekten kann über den Vergleich der Anstiege linearer Kalibrierfunktionen in Lösungsmittel und in Matrix erhalten werden.^{87,91-94} Ein flacherer Anstieg der Kalibrierung in Matrix gegenüber der Kalibrierung in Lösungsmittel zeigt Signalsuppression an. Umgekehrte Ergebnisse stehen für Signalerhöhung.

Ende der 90'er Jahre wurde von der Gruppe um King und Bonfiglio¹⁹ und zeitgleich von der Gruppe um Choi⁹⁵ eine zweite Methode zur Detektion von Matrixeffekten entwickelt. Bei dieser Methode wird eine Analytlösung mittels Hilfspumpe permanent über ein T-Stück in den LC-Fluss zwischen chromatographischer Säule und Elektrospray-Ionenquelle infudiert (Abb. 2a). Die Signalintensität des infudierten Analyten wird kontinuierlich gemessen. Um die von einem Probenextrakt ausgelösten Matrixeffekte zu bestimmen, wird dieser auf die LC-Säule injiziert und chromatographisch in seine Matrixbestandteile getrennt.

Bei Abwesenheit von Matrixeffekten wird ein konstant hohes Analytsignal gemessen. Eluieren Matrixbestandteile von der Säule, wird eine durch die Matrix erzeugte Veränderung der Ionisierungseffizienz direkt als Signaleinsattelung oder Signalerhöhung im Infusionsprofil sichtbar. Zum Beispiel zeigt Abb. 2b eines der ersten gemessenen Infusionsprofile, das Bonfiglio et al.¹⁹ für den Analyten Phenacetin durch Injektion eines Blutplasma-Extrakts erhielten. Das Infusionsprofil weist mehrere Zonen mit Signalsuppressionen innerhalb der Messzeit von 2 min auf.

Im Vergleich zur konventionellen Methode bietet die Nachsäuleninfusion den Vorteil, die Effekte aller eluierenden Matrixbestandteile unabhängig von ihrer Retentionszeit zu detektieren. Die konventionelle Methode bestimmt hingegen nur den einzelnen Matrixeffekt zur Retentionszeit des untersuchten (detektierten) Analyten. Trotz dieses methodischen Vorteils wurde die Nachsäuleninfusion lange Zeit kaum angewandt.

Um mögliche Einflussgrößen auf Matrixeffekte gezielt untersuchen zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit beide Methoden eingesetzt und die Nachsäuleninfusion zu einer Methode zur Quantifizierung von Matrixeffekten weiterentwickelt (siehe Kapitel 3.1).



Abbildung 2 Erste Messung von Matrixeffekten mittels Nachsäuleninfusion von Analyten (A) Versuchsaufbau aus der Studie von Bonfiglio et al. Mittels Spritzenpumpe wurde eine Analytlösung über ein T-Stück hinter der chromatographischen Säule infudiert. (B) Infusionsprofil des Analyten Phenacetin erhalten mit einem Blutplasma-Extrakt (beide aus Lit. 19).

2.4 Mechanismen von Matrixeffekten

Trotz der sehr klaren Definition von Matrixeffekten bei der Elektrospray-Massenspektrometrie (Kapitel 2.2) konnten ihre zugrunde liegenden Mechanismen bisher nicht aufgeklärt werden. Es sind nahezu keine Theorien bekannt, wie koeluierende Substanzen das Analytsignal verstärken. Für die Entstehung von Signalsuppression werden verschiedene Hypothesen diskutiert:

- Konkurrenz um die verfügbaren Überschussladungen an der Oberfläche der ESI-Tropfen^{28,29,96,97}
- Erschwerter Zugang zur Tropfenoberfläche durch Konkurrenz mit Matrixbestandteilen^{30,98}
- Verlangsamung von Tropfenverdampfung und Tropfenteilung durch Umhüllung der Tropfenoberfläche mit Matrixbestandteilen,^{33,34} durch Erhöhung der Oberflächenspannung,³¹ des Siedepunkts³¹ oder der Leitfähigkeit⁹⁹ des Lösungsmittels im ESI-Tropfen
- Fällung oder Einschluss der Analyte in Präzipitate³¹
- Ionenpaarbildung im Tropfen^{21,35-39}
- Neutralisation freier Analytionen in der Gasphase^{40,100}

Die einzelnen Hypothesen werden in Kapitel 4.2 diskutiert. Wegen ihrer besonderen Bedeutung zum Verständnis von Matrixeffekten werden zwei Theorien von Kebarle et al. und von Enke et al. nachfolgend ausführlicher behandelt.

Kebarle et al.^{45,49,78,101} nehmen an, der Gesamtionenstrom I setze sich aus den Signalintensitäten aller Spezies im ESI-Tropfen zusammen. So gelte für den einfachen Fall eines 2-Komponenten-System aus Analyt A und Elektrolyt E:

 $I \approx I_A + I_E \tag{3}$

Ferner gelte: $I \propto (\lambda^{\circ}_{m}C)^{n}$ mit $n \approx 0,2-0,3$ (4)

Dabei ist λ°_{m} die molare Leitfähigkeit und C die Konzentration. Wegen des kleinen Exponenten *n* von 0,2-0,3 würde auch bei starker Erhöhung der Konzentration einer einzelnen Komponente (Analyt oder Elektrolyt) der Gesamtionenstrom nur wenig erhöht. Zum Beispiel würde eine Erhöhung der Konzentration um Faktor 100 nur eine Erhöhung des Gesamtionenstroms um das 2-4-fache bewirken. Im Bereich hoher Konzentrationen bleibt der Gesamtionenstrom demnach weitgehend konstant. Kebarle et al. gehen davon aus, dass alle im ESI-Tropfen vertretenen Spezies (hier Analyt und Elektrolyt) um ihren Anteil am Gesamtionenstrom konkurrieren müssen. Die Fähigkeit einer Substanz als Ion in die Gasphase freigesetzt zu werden, werde gemäß dem Ion Evaporation Model (IEM) von der Kinetik der Ionenverdampfung bestimmt.^{45,49,78,101} Je niedriger die zur Ionenverdampfung erforderliche freie Energie, umso schneller und bevorzugt würden Gasphasen-Ionen^{46,72} freigesetzt.

Unter der Voraussetzung, die Ionenverdampfungsrate sei proportional zur Ionenkonzentration im Tropfen, greifen Tang und Kebarle¹⁰¹ für ein 2-Komponenten-System aus Analyt und Elektrolyt eine Gleichung von Smith⁵³ auf:

$$I(A^{+}) = P \cdot f \frac{k_{A}[A^{+}]}{k_{A}[A^{+}] + k_{E}[E^{+}]} \cdot I$$
(5)

Hierbei sind I(A⁺) die massenspektrometrisch detektierte Signalintensität des Analyten, P eine Proportionalitätskonstante (die die Effizienz der Ionentransmission in das Massenspektrometer beschreibt), f eine zweite Proportionalitätskonstante (die die in die Gasphase überführte Fraktion der Tropfenladung wiedergibt), [A⁺] und [E⁺] die Konzentration an Analyt bzw. Elektrolyt in den Tropfen, I der Gesamtionenstrom des Elektrosprays und k_A und k_E die Geschwindigkeitskonstanten von Analyt und Elektrolyt für die Ionenverdampfung.

Für ein 3-Komponenten-System mit koeluierender Matrix M formulierten Tang und Kebarle analog zu Gleichung 5:

$$I(A^{+}) = P \cdot f \frac{k_{A}[A^{+}]}{k_{A}[A^{+}] + k_{E}[E^{+}] + k_{M}[M^{+}]} \cdot I \qquad (6)$$

Der Anteil des Analyten am Gesamtionenstrom I würde demnach umso niedriger ausfallen, und die Signalsuppression des Analyten wäre umso stärker, je schneller die koeluierende Matrixsubstanz im Vergleich zum Analyten in die Gasphase freigesetzt wird ($k_M \gg k_A$) und (in geringerem Maße) je höher die Konzentration der Matrixkomponente im Vergleich zum Analyten ($[M^+] \gg [A]^+$).

Für ein 2-Komponenten-System und den vereinfachten Fall mit $[A^+] = [E^+]$ fanden Kebarle et al. im Bereich niedriger Konzentrationen jedoch keine Übereinstimmung zwischen ihren Experimentaldaten und Gleichung 5.⁴⁵ Daraus schlussfolgerten sie auf einen zusätzlichen Einfluss der Oberflächenaktivität auf den Elektrosprayprozess.

Sechs Jahre später veröffentlichte Enke sein Gleichgewichtsmodell vom ESI-Tropfen.²⁸ Er postulierte, ein ESI-Tropfen bestehe formal aus zwei separaten Phasen: der Phase des Tropfeninneren, die vollständig solvatisierte Ionen enthält und nach außen elektrisch neutral ist, sowie der Phase der Tropfenoberfläche, die sämtliche Überschussladungen trägt. Für alle Substanzen in einem ESI-Tropfen stelle sich ein Verteilungsgleichgewicht zwischen diesen beiden Phasen ein. Die Gleichgewichtseinstellung sei bei allen Sub-

stanzen vollständig und soll unter den Bedingungen der Elektrospray-Ionisation so schnell ablaufen, dass die verschiedenen Geschwindigkeitskonstanten gemäß Kebarle vernachlässigbar seien. Entscheidend ist nach Enke die Gleichgewichtskonstante einer Substanz, die das Verhältnis seiner Konzentration auf der Tropfenoberfläche zur Konzentration im Tropfeninneren wiedergibt.

Konkurrieren bei ESI(+) ein Analyt A und ein Bestandteil des Pufferelektrolyten E darum, Teil der Überschussladung auf der Tropfenoberfläche zu werden, gelte das Gleichgewicht:

$$(A^{+}X^{-})_{i} + (E^{+})_{s} \rightleftharpoons (A^{+})_{s} + (E^{+}X^{-})_{i}$$
 (7)

mit X⁻ als Gegenion, das die Ladung in der inneren Tropfenphase i neutralisiert, und der Konzentration des Analyten A⁺ oder Elektrolyten E⁺ an der Tropfenoberfläche s.

Das Verhältnis der Gleichgewichtskonstanten $K_A = [A^+] / [A^+X^-]_i$ und $K_E = [E^+] / [E^+X^-]_i$ zueinander sei dabei gegeben als:

$$\frac{K_{A}}{K_{E}} = \frac{\left[A^{+}\right]_{s}\left[E^{+}X^{-}\right]_{i}}{\left[A^{+}X^{-}\right]_{i}\left[E^{+}\right]_{s}}$$
(8)

Ferner gelten für die analytischen Konzentrationen des Analyten C_A und Elektrolyten C_E folgende Massen-Balance-Gleichungen:

$$C_{A} = [A^{+}]_{s} + [A^{+}X^{-}]_{i}$$
(9)
$$C_{E} = [E^{+}]_{s} + [E^{+}X^{-}]_{i}$$
(10)

Auf Basis der Gleichungen 7-10 leiteten Enke et al.^{28,96,97} für ein 2-Komponenten-System eine quadratische Gleichung ab:

$$0 = \mathbf{a} \times [\mathbf{A}^{+}]_{s}^{2} + \mathbf{b} \times [\mathbf{A}^{+}]_{s} + \mathbf{c}$$
(11)
$$\mathbf{a} = \frac{K_{A}}{K_{E}} - 1$$

$$\mathbf{b} = -\left([\mathbf{Q}] \cdot \left(\frac{K_{A}}{K_{E}} - 1 \right) + C_{A} \cdot \left(\frac{K_{A}}{K_{E}} \right) + C_{E} \right)$$

$$\mathbf{c} = C_{A} \cdot [\mathbf{Q}] \cdot \frac{K_{A}}{K_{E}}$$

Mit Hilfe dieser Gleichung kann die Signalintensität eines Analyten in Abhängigkeit von der Gesamtanzahl an Überschussladungen [Q], der Gesamtkonzentration und der Gleichgewichtskonstante des Analyten und des Elektrolyten berechnet werden. . .

$$0 = \mathbf{a} \times [\mathbf{A}^{T}]_{s}^{s} + \mathbf{b} \times [\mathbf{A}^{T}]_{s}^{s} + \mathbf{c} \times [\mathbf{A}^{T}]_{s}^{s} + \mathbf{d}$$
(12)
$$\mathbf{a} = \mathcal{K}_{M} - \mathcal{K}_{A} + \mathcal{K}_{E} \cdot \left(1 - \frac{\mathcal{K}_{M}}{\mathcal{K}_{A}}\right)$$
$$\mathbf{b} = C_{A}(2\mathcal{K}_{A} - \mathcal{K}_{M} - \mathcal{K}_{E}) + C_{M}(\mathcal{K}_{M} - \mathcal{K}_{E}\left(\frac{\mathcal{K}_{M}}{\mathcal{K}_{A}}\right)) + C_{E}\mathcal{K}_{E}\left(1 - \frac{\mathcal{K}_{M}}{\mathcal{K}_{A}}\right) + [\mathbf{Q}]\left(\mathcal{K}_{A} - \mathcal{K}_{M} - \mathcal{K}_{E}\left(1 - \frac{\mathcal{K}_{M}}{\mathcal{K}_{E}}\right)\right)$$
$$\mathbf{c} = -C_{A}([\mathbf{Q}] (2\mathcal{K}_{A} - \mathcal{K}_{M} - \mathcal{K}_{E}) + C_{M}\mathcal{K}_{M} + C_{A}\mathcal{K}_{A} + C_{E}\mathcal{K}_{E})$$
$$\mathbf{d} = C_{A}^{2} \cdot [\mathbf{Q}] \cdot \mathcal{K}_{A}$$

Als Einflussgrößen auf die Gleichgewichtskonstante einer Substanz werden ihre Polarität, ihre Basizität und die Ladungsdichte diskutiert.²⁹ Nach Enke entsteht Signalsuppression demnach durch eine erfolgreiche Konkurrenz von Matrixbestanteilen um begrenzt verfügbare Überschussladungen in der Phase der Tröpfchenoberfläche.

2.5 Auslösende Substanzen für Matrixeffekte

Es existieren bisher nur wenige Kenntnisse darüber, welche Inhaltsstoffe Matrixeffekte bei der Elektrospray-Ionisation hervorrufen. Man unterscheidet allgemein zwischen *endogenen* auslösenden *Substanzen*, die natürliche, organische oder anorganische Inhaltsstoffe des Probenmaterials sind und während der Probenaufarbeitung miterfasst werden, und *exogenen* auslösenden *Substanzen*, die von außen in den Endextrakt eingeschleppt werden.⁸⁰ Exogene Verursacher von Matrixeffekten können z. B. Polymer-Rückstände¹⁰², Ionenpaarreagenzien^{37,39} oder Antikoagulanzien zur Probenaufarbeitung von Blutplasma¹⁰³ sein. Gray et al.¹⁰⁴ berichten exogene Matrixeffekte bei der Pestizidanalytik durch Verunreinigungen in verschiedenen LC-MS reinen Methanolchargen, die als Eluenten eingesetzt wurden. Als endogene Verursacher von Matrixeffekten sind anorganische Salze bekannt, die allerdings nur unmittelbar nach der chromatographische Totzeit Effekte auslösen.^{30,31,78,80,82,99,105-112} Bei klinischen Untersuchungsmaterial konnte man nachweisen, dass Phospholipide und hier insbesondere Glycerophosphocholine Matrixeffekte bei der Elektrospray-Ionisation verursachen.^{23,113-126} Damit wurde mutmaßlich erst ein kleiner Teil der für Matrixeffekte verantwortlichen Inhaltsstoffe identifiziert.

In der Wasseranalytik diskutiert man eine Korrelation zwischen steigendem Gehalt an gelöstem organischen Kohlenstoff (engl.: dissolved organic carbon, DOC) und der Stärke von Matrixeffekten.^{127,128} Welche organischen Substanzen allerdings diese Matrixeffekte auslösen, kann bisher nur vermutet werden. Das fehlende Wissen um typische Strukturelemente und Stoffeigenschaften der für Matrixeffekte verant-

¹ Zwei in beiden Publikationen enthaltene Fehler bei der Berechnung der Koeffizienten b und c sind bei den hier wiedergegebenen Formeln korrigiert.

wortlichen Substanzen ist ein Grund für das schlechte theoretische Verständnis und den aufwendigen Umgang mit störenden Matrixeinflüssen bei der LC-ESI-MS/MS.

2.6 Minimierung von Matrixeffekten

In den Übersichtsartikeln zu Matrixeffekten bei der Elektrospray-Massenspektrometrie werden theoretische Möglichkeiten, Matrixeffekte zu vermeiden oder zumindest in ihrem Ausmaß zu reduzieren aufgeführt.^{16,21,79,80,82-84} Methoden zur Minimierung von Matrixeffekten können sein:

- Verbesserte Probenvorbereitung. Anhand eines umfassenderen Clean-Ups der Rohextrakte soll die Vielfalt und Konzentration an koextrahierten Probeninhaltsstoffen im Endextrakt herabgesetzt werden. Auch eine effizientere Extraktion des Analyten mit höherer Extraktionsausbeute könnte das Konzentrationsverhältnis zwischen Analyt und Matrix im Endextrakt zugunsten des Analyten verschieben.
- Modifikation der flüssigchromatographischen Bedingungen. Bei Einzelmethoden, die nur wenige Analyte simultan erfassen, kann mit einem Wechsel der mobilen oder der stationären Phase, der Variation des Laufmittelgradienten, der Anwendung zwei-dimensionaler Flüssigkeitschromatographie (2D-LC) oder der Veränderung der Flussrate versucht werden, die Koelution zwischen störenden Matrixkomponenten und Zielanalyten zu vermeiden. Für Multianalyt-Methoden, bei denen hunderte Analyte über das gesamte Chromatogramm verteilt vorliegen, gelten diese Maßnahmen als nicht anwendbar.
- Modifikation der massenspektrometrischen Bedingungen. Ein Wechsel der Ionisierungsart (ESI vs. APCI), des Ionisierungsmodus (ESI(+) vs. ESI(-)) oder des ESI-Quellendesigns (off-axis vs. orthogonale vs. doppelt-orthogonale Spraygeometrie) soll bei einigen Anwendungen zu einer erfolgreichen Minimierung der Matrixeffekte führen.
- Verdünnen der Probenextrakte. Ähnlich wie bei einer verbesserten Probenaufreinigung wird die Menge an Matrix, die in das LC-MS-System injiziert wird, durch Verdünnung reduziert. Im selben Ausmaß sinkt die Analytkonzentration im Endextrakt, so dass die Bestimmungsgrenzen der Analysenmethoden steigen.

Die Frage, welche dieser Strategien am besten für moderne Multianalyt-Methoden geeignet wäre, wurde dabei unterschiedlich beantwortet. Da die für Matrixeffekte verantwortlichen Inhaltsstoffe weitgehend unbekannt sind, war eine gezielte Verbesserung der Methoden zur Probenaufarbeitung bisher nicht möglich. Unklar war bisher auch, wie stark Probenextrakte verdünnt werden müssen, um Matrixeffekte auf ein akzeptables Maß zu minimieren oder wie hoch der Nutzen bei einem Wechsel der ESI-Spraygeometrie ist. Diese und weitere Fragen werden in den Kapiteln 3 und 4 der Arbeit untersucht und diskutiert.

2.7 Kompensation von Matrixeffekten

Können Matrixeffekte nicht vermieden werden, sollten Methoden zu ihrer Kompensation eingesetzt werden, um die Analysenergebnisse nachträglich zu korrigieren. Folgende Methoden können verwendet werden:

- Stabilisotop-markierte interne Standards sollen sich während Extraktion, Chromatographie und Elektrospray-Ionisation identisch zum Analyten verhalten. Theoretisch erleiden Analyt und Interner Standard bei Koelution gleich starke Matrixeffekte, so dass das Verhältnis ihrer Peakflächen zueinander konstant bleibt. Da stabilisotop-markierte Standards für nur wenige Analyte verfügbar und teuer in der Anschaffung sind, bleibt ihr Einsatz auf Einzel-Analytmethoden beschränkt. Zudem können deuterierte interne Standards Matrixeffekte nicht in allen Fällen richtig kompensieren.^{129,130,106}
- Externe Kalibrierungen mit *Matrixstandards* erfordern Referenzmaterial, das unbelastet vom Analyten ist, aber identische Matrixkomponenten in gleicher Konzentration wie die unbekannte Probe enthält. Unter diesen Bedingungen werden die dotierten Analyte in den Matrixstandards gleichermaßen von Matrixeffekten betroffen wie die Analyte in der Analysenprobe. Der Nachteil der Methode ist die in manchen Fällen schwierige Beschaffbarkeit unbelasteter Referenzmaterialien. Auch deren Lagerung stellt ein Labor vor zusätzliche logistische Aufgaben.
- Die *Standardaddition* gilt als beste Methode zur Kompensation von Matrixeffekten,⁴¹ da Koelution mit identischen Matrixkomponenten gewährleistet ist. Die Methode ist jedoch mit dem höchsten Arbeits- und Zeitaufwand verbunden und die ungefähre Analytkonzentration in der Probe muss bekannt sein.

Ein Bestandteil dieser Arbeit war die Entwicklung einer Alternativmethode zur Kompensation von Matrixeffekten nach dem Prinzip der Nachsäuleninfusion. Die Methode wurde in der Kapitel 3.1 beigefügten Publikation veröffentlicht.

3 ERGEBNISSE

3.1 Der Einfluss der Analyteigenschaften auf Matrixeffekte

Der Inhalt dieses Kapitels wurde als "Research Article" veröffentlicht in:

Helen Stahnke, Thorsten Reemtsma, Lutz Alder, "Compensation of Matrix Effects by Postcolumn Infusion of a Monitor Substance in Multiresidue Analysis with LC-MS/MS", *Analytical Chemistry*, **2009**, *81 (6)*, 2185-2192.

Kurzprofil der Publikation

Die Arbeit zeigte zum ersten Mal, dass Matrixeffekte in der LC-MS-Analytik bei positiver Ionisierung nur von der Retentionszeit der Analyte abhängig sind und weitgehend unabhängig von anderen Analyteigenschaften wie Säurestärke und Polarität. Damit wurde die in der Literatur verbreitete Annahme, Matrixeffekte wären analytabhängig, für den positiven Ionenmodus widerlegt. Als Schlussfolgerung aus dieser Erkenntnis wurde eine neue Methode zur Kompensation von Matrixeffekten bei Multianalyt-Methoden entwickelt und validiert. Die Methode bietet eine Alternative zum aufwendigen Verfahren der Standardaddition.

Abgrenzung des Eigenanteils

Die Literaturrecherche, die Probenahme, die Laborarbeiten, die Erhebung der Messdaten, die Entwicklung eines Algorithmus zum automatischen Datentransfer aus der LC-MS-Gerätesoftware in ein Tabellenkalkulationsprogramm und die Auswertung der Messdaten wurden vollständig von mir durchgeführt. Das grundlegende Konzept der Studie orientierte sich am vorgeschlagenen Arbeitsprogramm im Drittmittelantrag bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG).¹³¹ Das Manuskript wurde mehrheitlich von mir erstellt und in Teilen von mir überarbeitet. Die überwiegende Manuskriptüberarbeitung hat Herr Prof. Dr. Thorsten Reemtsma vorgenommen und in Teilen Herr Dr. Lutz Alder. Reprinted with permission from Anal. Chem. 2009, 81 (6), 2185-2192. Copyright 2009 American Chemical Society. http://pubs.acs.org/articlesonrequest/AOR-RH7G7pp3v5FK4pEiVFCS

Anal. Chem. 2009, 81, 2185-2192

Compensation of Matrix Effects by Postcolumn Infusion of a Monitor Substance in Multiresidue Analysis with LC–MS/MS

Helen Stahnke, Thorsten Reemtsma, and Lutz Alder*

Federal Institute for Risk Assessment (BfR), Residue Analysis, Thielallee 88-92, 14195 Berlin, Germany

This study systematically compares matrix effects in liquid chromatography (LC) coupled by electrospray ionization (ESI) in the positive mode with tandem mass spectrometry (MS/MS) for 129 pesticides in 20 plant matrixes. In total. 2388 analyte/matrix combinations were evaluated. Permanent postcolumn infusion (PCI) of analyte standards was used to quantify matrix effects over the whole chromatographic run time. This allowed the analyte signal suppression or enhancement, by different coeluting matrix components, to be assessed throughout the duration of an entire chromatographic run, i.e., independent of a specific retention time. Matrix effects occurring at a certain retention time in one matrix were surprisingly similar for different analytes with diverse physicochemical properties. On the basis of this finding, a new approach for matrix effect compensation in multiresidue analysis was developed in which one single monitor substance is permanently added postcolumn. Signal intensities of all analytes obtained by LC-MS/MS analysis of sample extracts are then corrected for the matrix effect recorded by the monitor substance. With the use of this approach, strong matrix effects could be reduced and apparent recoveries increased from 45% to 85% on average. With dependence on the particular sample matrix, between 69% and 100% of the analytes showed recoveries between 60% and 140% after correction. Thus this approach may significantly reduce the number of cases in which standard addition is required to confirm violations of maximum residue levels.

In quantitative liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (LC-ESI-MS), the so-called matrix effects are a very critical factor. These effects of the sample matrix that alter the signal intensity of a target analyte obtained by ESI-MS decrease the accuracy in quantitative LC-MS/MS but are mechanistically poorly understood. Such matrix effects have been found for all kinds of sample materials, from plasma and urine, over plant and animal tissues, to soil or water. Thus all fields of quantitative LC-MS/MS application, including biomedical analysis, life sciences, metabolomics, residue analysis of food and feed, as well as environmental trace analysis suffer from matrix effects.

Correspondingly, matrix effects have recently been called the Achilles heel of quantitative LC-MS/MS.¹

Several mechanisms have been suggested by which a compound could interfere with the ionization and transfer of a coeluting analyte in the electrospray process, from the initial formation of solvent droplets at the capillary tip to the transition of the charged analyte into the gas phase. Competition may occur between matrix and an analyte for the limited elemental charges on a droplet or for the droplet $surface^{2-4}$ from which the ionized analyte has to escape into the gas phase. Matrix compounds may alter physical properties of the droplets like its surface tension or they may enclose the droplets in micellelike structures. Both effects would slow down the solvent evaporation and reduce the formation of offspring droplets. Matrix may also alter the viscosity of the droplet solution, thus affecting the transport of analytes from the droplet's interior toward its surface.5 Moreover, the matrix may lead to adduct formation which would not be recognized by the highly selective selected reaction monitoring (SRM) analysis.

Generally matrix effects may be reduced or avoided by an improved separation of analytes and matrix compounds, at the stages of extraction, cleanup,6-8 or chromatography.6,9,10 In pesticide residue analysis, where multiresidue methods often include hundreds of analytes with a broad range of physicochemical properties,¹¹ such measures are not applicable.

Therefore matrix effects in multimethods have to be compensated. For this purpose, matrix-matched standards (assuming the matrix is reproducible from sample to sample), isotopically labeled internal standards,^{12,13} or standard addition have to be employed.

- (3) Enke, C. G. Anal. Chem. 1997, 69, 4885-4893.
- (d) Eech, N. B.; Enke, C. G. Mass Spectrom. Rev. 2001, 20, 362–387.
 (5) King, R.; Bonfiglio, R.; Fernandez-Metzler, C.; Miller-Stein, C.; Olah, T.
- *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2000, *11*, 942–950.
 (6) Chambers, E.; Wagrowski-Diehl, D. M.; Lu, Z. L.; Mazzeo, J. R. *J. Chro-*
- matogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 2007, 852, 22-34. (7) Souverain, S.; Rudaz, S.; Veuthey, J. L. J. Chromatogr., A 2004, 1058, 61-
- (8) Kloepfer, A.; Quintana, J. B.; Reemtsma, T. J. Chromatogr., A 2005, 1067,
- 153 160(9) Choi, B. K.; Hercules, D. M.; Gusev, A. I. J. Chromatogr., A 2001, 907, 337-342.
- (10) Pascoe, R.; Foley, J. P.; Gusev, A. I. Anal. Chem. 2001, 73, 6014-6023.
- (11) Pang, G. F.; Cao, Y. Z.; Zhang, J. J.; Fan, C. L.; Liu, Y. M.; Li, X. M.; Jia, G. Q.; Li, Z. Y.; Shi, Y. Q.; Wu, Y. P.; Guo, T. T. J. Chromatogr., A 2006, 1125. 1-30.
- (12) Rychlik, M.; Asam, S. Anal. Bioanal. Chem. 2008, 390, 617-628.

Analytical Chemistry, Vol. 81, No. 6, March 15, 2009 2185

^{*} Corresponding author. E-mail: lutz.alder@bfr.bund.de.

^{10.1021/}ac802362s CCC: \$40.75 © 2009 American Chemical Society Published on Web 02/16/2009

Taylor, P. J. Clin. Biochem. 2005, 38, 328–334.
 Bruins, A. P. J. Chromatogr., A 1998, 794, 345–357.

However, these strategies are neither always applicable nor always successful.^{14,15} Moreover, these approaches partly consume the time saved by the simplified sample preparation for LC–MS/MS.

Systematic studies on matrix effects in LC–MS/MS are hampered by the fact that information on matrix effects are usually obtained only for the respective retention time of an analyte. Since different analytes may coelute with different matrix components, one cannot assume the same underlying mechanism, when comparing signal enhancement or suppression observed for different analytes. Also, because of the high selectivity of tandem mass spectrometric detection, the number and amount of extracted matrix components remains invisible.

The permanent postcolumn infusion of the analytes of interest during chromatographic separation of the sample matrix circumvents these limitations and provides information on matrix effects occurring during a whole chromatographic run. First applications were published a decade ago,^{16,17} and this technique has, meanwhile, been used for various matrixes and analytes.^{17,14,15,18–25} However, neither has it been used with the focus on multimethods nor has postcolumn infusion found its way into the routine of residue and trace analysis by LC–MS/MS.

This article reports on results of a comparative study on matrix effects for 129 pesticides in 20 matrixes by postcolumn infusion. On the basis of these results, a new approach for compensating matrix effects in multiresidue methods is proposed and evaluated that uses one (or few) monitor substance(s) to compensate matrix effects for a large number of analytes.

EXPERIMENTAL SECTION

Pesticide Standard Mixtures. A total number of 140 pesticide standard substances were utilized in this study (see Supporting Information for details). Three standard mixtures each containing 50 pesticides at a concentration of 1 μ g/mL were prepared in methanol. Five pesticides were included in all three mixtures for quality control reasons. The standard mixtures were stored at -80 °C. They were used for preparation of infusion mixtures and spiking mixtures. Infusion mixtures were standard solutions in methanol/water (1/1) with 5 mmol/L ammonium formate for the use in postcolumn infusion experiments. They were prepared

- (13) Benijts, T.; Dams, R.; Lambert, W.; De Leenheer, A. J. Chromatogr., A 2004, 1029, 153–159.
- (14) Lindegardh, N.; Annerberg, A.; White, N. J.; Day, N. P. J. J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 2008, 862, 227–236.
- Wang, S.; Cyronak, M.; Yang, E. J. Pharm. Biomed. Anal. 2007, 43, 701– 707.
 Choi, B. K.; Gusev, A. I.; Hercules, D. M. Anal. Chem. 1999, 71, 4107–
- 4110.
 (17) Bonfiglio, R.; King, R. C.; Olah, T. V.; Merkle, K. Rapid Commun. Mass
- Spectrom. 1999, 13, 1175–1185.
 (18) Choi, B. K.; Hercules, D. M.; Gusev, A. I. Fresenius J. Anal. Chem. 2001,
- (18) Choi, B. K.; Hercules, D. M.; Gusev, A. I. *Presenus J. Anal. Chem.* 2001, 369, 370–377.
- (19) Nelson, M. D.; Dolan, J. W. LC GC Eur. 2002, 15, 73.
- Muller, C.; Schafer, P.; Stortzel, M.; Vogt, S.; Weinmann, W. J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 2002, 773, 47–52.
 Dams, R.; Huestis, M. A.; Lambert, W. E.; Murphy, C. M. J. Am. Soc. Mass
- Spectrom. 2003, 14, 1290–1294.
 (22) van Hout, M. W. J.; Niederlander, H. A. G.; de Zeeuw, R. A.; de Jong, G. J.
- (22) Van Hout, M. W. J., Wederlander, H. A. G., de Zeeuw, K. A. de Jong, G. J. Rapid Commun. Mass Spectra. 2003, 17, 245–250.
- (23) Antignac, J. P.; de Wasch, K.; Monteau, F.; De Brabander, H.; Andre, F.; Le Bizec, B. Anal. Chim. Acta 2005, 529, 129–136.
 (24) De Nardi, C.; Bonelli, F. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2006, 20, 2709–
- 2716.
- (25) Ismaiel, O. A.; Halquist, M. S.; Elmamly, M. Y.; Shalaby, A.; Karnes, H. T. J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 2007, 859, 84–93.
- 2186 Analytical Chemistry, Vol. 81, No. 6, March 15, 2009

through a 20-fold dilution of standard mixtures with methanol and water each with 5 mmol/L ammonium formate. The resulting concentration for each pesticide in an infusion mixture was 50 ng/mL. The total pesticide concentration in an infusion mixture was 2.5 μ g/mL. Higher total concentrations were not used to avoid additional "matrix effects" by direct interference of the infused pesticides. If all 150 analytes would be combined in one infusion mixture, this would limit the concentration to 17 ng/mL of each analyte. To allow a 3-fold higher concentration of the individual pesticides, three mixtures of 50 analytes each were prepared. Spiking mixtures were used for preparation of solvent standards and matrix-matched standards needed for the matrix effect determination in the conventional way. They were obtained by 2-fold dilution of standard mixtures with methanol. The concentration of each pesticide in spiking mixtures was 0.5 μ g/mL.

Sample Extracts. The following fruits and vegetables were considered in this study: (a) commodities with high water content, apple, pear, plum, aubergine, pepper, rocket, peas, onion, potato, cauliflower, carrot, leek; (b) dry commodities, wheat flour, raisins; (c) commodities with high oil content, avocado, linseed; (d) acidic commodities, orange, grapefruit, raspberries; and (e) difficult commodity, fermented tea. They were bought in local supermarkets paying special attention to obtain sample materials without pesticide residues.

Fruits and vegetables with a high water content were cut into small pieces, frozen, and cryogenically milled. Methanol extraction and cleanup on diatomaceous earth with dichloromethane were carried out according to the ChemElut method.²⁶ To avoid differences in matrix effects caused by repeated sample preparations, a large volume of final methanol extract was prepared once from one sample homogenate for each matrix and used for all experiments. In this way it was ensured that equal amounts of matrix compounds were present in all measurements of a particular extract. A volume of 1 mL of the resulting final methanol extract containing sample or 1.25 g of dry sample. The final sample extracts were stored at -24 °C.

Instrumentation. Liquid chromatography was performed on an Agilent 1100 system consisting of a binary pump, vacuum solvent degasser unit, column oven, and injector (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Germany). For the postcolumn infusion, a second pump (Agilent 1100 isocratic pump) was employed. The infusion flow rate was held constant at 0.02 mL/min by a 70 bar backpressure regulator (Upchurch Scientific, Oak Harbor, WA). For determination, an Applied Biosystems API 2000 triple quadrupole mass spectrometer equipped with an offaxis electrospray interface (turbo ion spray) was used. The system was controlled with Analyst 1.4.1 software.

LC-MS/MS Analysis. Chromatographic separations were performed at 20 °C on a polar endcapped C18 phase (Aqua 5 μ C18 125Å, 50 mm × 2 mm column with the corresponding 10 mm × 2 mm precolumn (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany)) by elution with a water/methanol gradient at a flow rate of 0.2 mL/ min. Mobile phase A was methanol/water (2/8), mobile phase B methanol/water (9/1) both with 5 mmol/L ammonium formate. Gradient elution started with 0% B and increased linearly to 100% B at 11 min. B was kept constant for 12 min and then decreased

⁽²⁶⁾ Klein, J.; Alder, L. J. AOAC Int. 2003, 86, 1015-1037.

linearly in 2 min to 0%. The percentage of mobile phase A was kept constant at 100% for a further 3 min. Before the next injection, the column was equilibrated for 10 min.

With the use of the postcolumn infusion for determination of matrix effects, the injection volume of blank sample extracts was 8 μ L. For the conventional determination of matrix effects, 10 μ L of spiked sample extract was injected. The increased volume was necessary to compensate for the 25% dilution of blank extracts by addition of the spiking solutions. Consequently, in both cases the same amount of matrix was injected onto the column. More details are provided as Supporting Information.

For the determination of pesticides in the SRM mode, only the most sensitive transition was used. A list of the mass spectrometric parameters for the 140 pesticides is also available in Supporting Information (Table S-1). Dwell times for SRM were set to 10-150 ms, depending on the intensity of the product ion of each transition.

Conventional Determination of Matrix Effects. Matrixmatched standards and solvent standards were prepared 5-fold at a concentration of 100 ng/mL, respectively. For the preparation of matrix-matched standards, 10 μ L of the pesticide spiking mixture were added to 40 μ L of final sample extract, while for solvent standards 400 μ L of the pesticide spiking mixture were added to 1600 μ L of methanol. The spiking level of 0.05 mg/kg for water-containing samples and 0.1 mg/kg for dry samples was in the range of typical maximum residue levels for pesticides. In total, 315 standards were prepared [(20 matrix-matched standards + 1 solvent standard) × 5 replicates × 3 spiking mixtures].

During the conventional determination of matrix effects the infusion pump added 0.02 mL/min of methanol/water (1/1) with 5 mmol/L ammonium formate. This was necessary to obtain the same total flow rate into the ESI source which was used in postcolumn infusion experiments.

Conventional matrix effects were expressed as "apparent recoveries" (eq 1):

apparent recovery(%) =

$$\frac{\text{response of matrix-matched standard}}{\text{response of solvent standard}} \times 100\% \quad (1)$$

Please, note that apparent recovery is a measure of response changes and does not cover, e.g., incomplete extractability or losses during cleanup.

Postcolumn Infusion. Matrix effects were defined as the percentage by which the signal intensity of a reference, free of matrix compounds, is altered with the injection of a sample extract. Accordingly two injections were needed for the quantification of matrix effects. First, pure mobile phase is injected as a reference and then the unspiked sample extract in a second run. During both runs a pesticide infusion mixture was permanently added to the column effluent via a T-piece with constant flow.

Every 2.75 s the intensity of each SRM transition was recorded. Overall, during the total run time of 28 min for each pesticide, 610 SRM intensity values were obtained. All these signal intensity values (SI) were transferred from the Analyst software to a spreadsheet program (see Supporting Information for more details). The following series of calculations was then performed for each single data point (signal intensity SI_i at retention time t_i): (i) smoothing of all 610 signal intensities according to eq 2, (ii) exclusion of analytes if signal intensity is below a threshold of 500 counts per second for more than 50 data points, (iii) parallel shift to equal signal intensities of reference and sample extract in the time interval which was free of any matrix effect (26–28 min), and (iv) calculation of postcolumn infusion matrix effects at each retention time t_i (PCI-ME_i) by eq 3. A number of 610 values was obtained for each analyte.

smoothed
$$SI_i = (1 - f) SI_i + f SI_{i-1}$$
 (2)

The smoothing factor f of 0.6 was used. Higher values could diminish matrix effects. Postcolumn infusion matrix effects for each retention time t_i were expressed as a percentage:

$$PCI-ME_i(\%) =$$

$$\left[\frac{\text{smoothed SI}_i(\text{sample extract})}{\text{smoothed SI}_i(\text{corresponding reference})} \times 100\%\right] - 100\%$$
(3)

If no differences appeared between the signal intensities of the reference and the sample extract, the resulting recovery would be 100% and the matrix effect 0%. Negative values of PCI-ME stand for signal suppression, positive values for signal enhancement. The graph of all 610 matrix effect values against time is called the "matrix effect profile".

Precision of Postcolumn Infusion for Matrix Effect Quantification. The infusion profiles of 33 pesticides were recorded in 15-fold repetition during 1 day for extracts of rocket (commodity with high water content), wheat flour (dry commodity), orange (acidic commodity), and avocado (commodity with high oil content). According to eq 3, 1207 800 PCI-ME_{*i*} values were calculated (610 data points *i* × 15 repetitions × 33 pesticides × 4 matrixes). First, for each of 33 pesticides in one matrix, all standard deviations (*s*_{*i*}) of the 15 PCI-ME_{*i*} values at each time *t*_{*i*} (*i* = 1–610) were calculated. For each matrix, 20 130 *s*_{*i*} values were obtained (610 data points × 33 pesticides). In a second step for each matrix, the median of all 589 *s*_{*i*} values in the time period 1–28 min (*i* = 21 (solvent front)–610) was calculated for each pesticide. Finally the median over all 33 pesticides for one matrix was calculated.

Statistical Evaluation of Postcolumn Infusion. A statistical evaluation of all matrix effect profiles of the 129 analytes in each sample matrix was performed as follows: (i) calculation of the median of all PCI-ME_i values for each individual analyte in the time period 4–20 min (elution zone of pesticides), (ii) selection of the matrix effect profile corresponding to the 2.5th percentile based on the ranking of median values (Note that this is related to strong matrix effects, because most PCI-ME values are negative.), (ii) selection of the profile corresponding to the 82.5th percentile based on the ranking of median values (Note that this is related to weak matrix effects.), and (iv) calculation of the median of PCI-ME_i values of all analytes at each retention time t_i . The resulting graph of the 610 median values against retention time gave the mean matrix effect profile of all analytes in one sample matrix.

To estimate the influence of the stability of the mass spectrometer during postcolumn infusion experiments, the calculations i-iii were also performed for two consecutive injections of pure mobile phase using one reference measurement as "sample extract" in eq 3.

Analytical Chemistry, Vol. 81, No. 6, March 15, 2009 2187



Figure 1. (A) Instrumental setup for permanent postcolumn infusion; (B) top, infusion profiles for a pesticide after injection of pure mobile phase (reference) and after injection of an unspiked orange extract (sample extract) in a second run; bottom, matrix effect profile calculated from the two infusion profiles.

Correction of Apparent Recoveries by Postcolumn Infusion Matrix Effects. Because of ion suppression caused by the matrix, the "apparent recovery" of analytes spiked to blank extracts was very often below 100% if the peak area is compared to injections of the analytes in pure solvent. Assuming similar matrix effect on different analytes, this reduction of "recovery" can be corrected by postcolumn infusion of a monitor substance (e.g., carbendazim).

To correct "apparent recoveries" from the conventional determinations of matrix effects, the postcolumn infusion matrix effect of carbendazim (our monitor substance) was calculated at the respective elution time of each analyte. Since typical HPLC peak width has to be considered, the mean of those PCI-ME_i values was taken which corresponds to the 9 data points around the analyte's retention time t_i (i.e., all data points at $t_i \pm 0.2$ min).

Subsequently, the "recovery" calculated of analytes in matrixmatched standards was divided by the value mean PCI-ME of carbendazim at the time of the analyte (eq 4):

recovery of spiked content after correction =

 $\frac{\text{apparent recovery}}{\text{PCI-ME}_{\text{at }t_i \pm 0.2 \min}} \quad (4)$

RESULTS AND DISCUSSION

Approach. Two sets of experiments were performed in this study. In the first set, matrix effects were determined by permanent postcolumn infusion similar to Choi.¹⁶ In the second set, matrix effects were detected in the conventional way by spiking of final sample extracts and injection onto the chromatographic column. Both approaches were followed for the same 140 pesticides and 20 matrixes, i.e., for 2800 pesticide/matrix combinations.

For permanent postcolumn infusion, a solution of pesticide standards is permanently added to the effluent of the LC column directly before the ESI source via a T-piece (Figure 1A). The signal

2188 Analytical Chemistry, Vol. 81, No. 6, March 15, 2009

intensities of the continuously infused pesticides are recorded during the whole chromatographic run time. Here, this signal intensity is called "infusion profile". Matrix effects can be quantified by a series of two injections into the LC-MS/MS system. First a pure mobile phase is injected onto the column as a reference and in a second run the sample extract. If no matrix effects occur, the two infusion profiles are identical. If the ionization efficiency of an analyte is influenced by matrix compounds, the infusion profiles of the sample extract differs from the reference, as shown for an orange extract in Figure 1B (top).

By calculations according to eq 3, the so-called "matrix effect profile" is obtained from the two infusion profiles (Figure 1B, bottom). In this way information on the matrix effects for a certain analyte is obtained throughout the whole chromatographic run and thus for the entire coextracted sample matrix. This contrasts the conventional approach for the determination of matrix effects by measurement of peak ratios, where this information is gathered only for the retention time of the analyte under the respective chromatographic conditions (Figure 2). Therefore, matrix effect profiles can be used in different ways: to study the response of a number of different analytes in the presence of the same matrix and to study the effect of different matrixes (or different batches of the same matrix) on the response of an individual analyte.

Precision of Postcolumn Infusion for Matrix Effect Quantification. The mean standard deviation of PCI-ME_{*i*} values was determined as described in the Experimental Section based on a 15-fold determination of matrix effect profiles for 33 pesticides in 4 matrixes. Average values of 589 data points (PCI-ME_{*i*} at retention time t_i) and 33 pesticides standard deviations between 6% and 9% were obtained for the four matrixes. As these values are within the normal range of the LC–MS/MS precision, they prove that the permanent postcolumn infusion is a precise method for the quantification of matrix effects. If a high accuracy can also be obtained, the postcolumn infusion ap-



Figure 2. Matrix effects for azoxystrobin (analyte A) and furathiocarb (analyte B) in an orange extract: (A) determination with permanent postcolumn infusion; (B) determination in the conventional way by matrix-matched standards (black) and equally concentrated solvent standards (white).

proach may not be limited to a qualitative observation of signal alterations by matrix effects but it may also be used to compensate such effects in quantitative analysis.

Comparison of Matrix Effects for Different Analytes in the Same Matrix. Despite the remarkable chemical diversity of the pesticides covered in this study, ranging from acidic to basic (pK_a of 3.4 to pK_b of 9.3), from hydrophilic to hydrophobic (log K_{ow} , -1.7-7.0), from surface active to inactive compounds (surface tension, 29–133 mN/m), the matrix effect profiles of most pesticides are surprisingly similar. This similarity was found throughout all substance classes, like aryloxyphenoxypropionates, carbamates, organophosphorus pesticides, pyrethroides, sulfonylureas, triazines, triazoles, and urea derivatives (For a full list of considered pesticides with corresponding substance classes and substance specific

properties see Table S-2 in the Supporting Information.). The similarity in matrix effect profiles is exemplified in Figure 3A for the three pesticides amidosulfuron, fenpropimorph, and triflumizole in extracts of cauliflower and grapefruit.

To verify this first visual impression of similarity, the matrix effect profiles were statistically evaluated as described in the Experimental Section. Because of insufficient signal intensities, not all 2800 analyte/matrix combinations could be considered, but still 2388 combinations were included. The frequency distribution of the matrix effects was skew with a higher frequency toward the stronger effects. Therefore the graphs of the 82.5th and 2.5th percentiles were used for further comparison. As an example, this is shown for cauliflower and grapefruit in Figure 3B. The matrix effect profiles of analytes exhibit a very similar pattern to the median of matrix effects. This suggests that most pesticides were equally influenced by the diverse matrix components.

Not only the pattern but also the extent of matrix effects is quite similar for most of the analytes. The distance between the graphs of the 82.5th and 2.5th percentiles was dominated by the precision of matrix effect determination by postcolumn infusion. This is demonstrated in the right column of Figure 3B. The distance between these two graphs, calculated from two consecutive injections of pure mobile phase, was approximately 10% matrix effect averaged for the elution zone of pesticides. For an extract of cauliflower, the average distance was only slightly increased to 20% matrix effect and for grapefruit extract to 22%. Comparable results were obtained also for the other 18 matrixes of this study. However, this distance between the graphs of the 82.5th and 2.5th percentiles tend to increase with the strength of matrix effects. On average, 80% of the pesticides differed by less than 10% matrix effect for matrixes with weak effects such as peas but differed for up to 26% matrix effect for a more difficult matrix like orange.

Initially, this similarity of matrix effects for the more than 100 pesticides was surprising. Our expectations, however, were based on literature where matrix effects in LC-MS/MS are usually determined in the conventional way by comparing matrix effects for analytes that elute at different retention times and thus coelute



Figure 3. (A) Matrix effect profiles for the three pesticides amidosulfuron, fenpropimorph, and triflumizole ($\log K_{ow}$, 1.6–5.1, pK_a/pK_b , 3.6, 7.0, and **10.3**; surface tension, 31–71 mN/m) in extracts of cauliflower and grapefruit and for a pure mobile phase (reference); (B) statistical evaluation of matrix effect profiles for 119, 121, and 123 pesticides in cauliflower, grapefruit, and for a reference, distance between the 82.5th and 2.5th percentile, including the profiles from 80% of studied pesticides (dark gray shaded area), shown together with the median over all pesticides.

Analytical Chemistry, Vol. 81, No. 6, March 15, 2009 2189

with different fractions of the sample matrix. On such a basis, the perception of "inconsistent" and "unpredictable" matrix effects in ESI-MS has developed. Now, on the basis of the matrix effect profiles, which allow the comparison of matrix effects on the electrospray ionization of different analytes for each time of the chromatogram, this notion has to be corrected.

However, the literature on postcolumn infusion experiments already provided some rare hints on similarities of matrix effects for different analytes in one matrix. Choi et al.¹⁸ recorded infusion profiles for the pesticides methoxy-fenozide and G-fenozide in wheat forage and concluded that signal suppression appeared to be similar for these two compounds. Infusion profiles shown for three drugs in human plasma¹⁷ and for some other drugs in serum appeared to be similar too.^{20,25} Finally, Antignac et al.²³ noticed that ion suppression was similar for two tranquilizers and one β -blocker in meat samples.

This study, as most of the studies mentioned above, was performed in the positive ion mode (ESI+). This is due to the fact that nearly 90% of all pesticides show a better response in the positive mode. The remaining 10% of pesticides, however, as well as many other trace analytes require the negative ion mode (ESI-). Concerning ionization, the negative mode is usually considered more selective and may, thus, be less affected by interferences from matrix components. It is, however, difficult to anticipate whether this would result in the same degree of similarity for different analytes in one matrix as determined here for the positive mode.

The large data set on matrix effects generated in this study provide a good basis to investigate the influence of selected physicochemical properties of the analytes on the sensitivity toward matrix effects. For example a few pesticides, like bitertanol, cinosulfuron, iprovalicarb, prosulfuron, and pymetrozine, tend to show less pronounced matrix effects for most of the matrixes. Such an investigation may also provide evidence for the most crucial step in the complex electrospray process. However, these more fundamental aspects are beyond the range of the present study. It is obvious, already, that previously recognized influences of analyte polarity on their matrix effects in reversed-phase LC-MS/MS were mainly due to the polarity influence on the analytes' chromatographic retention times, which determined the matrix accompanying it. However, these data provide no indication that the physicochemical properties of the analytes had marked influence on the ESI process. Thus, matrix effects in electrospray ionization should not primarily be considered as analyte dependent but as strongly retention time dependent.

Comparison of Matrix Effects in Different Matrixes. Plant materials contain a large variety of matrix components, among them main constituents like (poly)saccharides, (poly)peptides, and lipids as well as various minor constituents like phenolic substances, carotenoids, phytosterols, chlorophyll, organic acids, or free fatty acids. According to the differences in the composition of samples, the matrix effect profiles of the 20 matrixes considered in this study varied strongly (see examples in Figures 1, 3, and 4).

In these matrix effect profiles, distinct chromatographic peaks occur (e.g., peak at 13 min in carrot, at 7.5 min in rocket), which may be due to the elution of a single, chromatographically well resolved matrix component. In some other cases, broad bands

2190 Analytical Chemistry, Vol. 81, No. 6, March 15, 2009



Figure 4. Median of the matrix effect profiles in different plant materials (for 115–124 pesticides depending on the matrix).

were observed, which elute in a wide time range as visible for onion extract (Figure 4B). In this case, the critical matrix compounds are either chemically diverse or the LC column is overloaded by matrix components resulting in one broad matrix peak.

Considering the complete matrix effect profile, rocket, onion, and wheat flour cause strong signal suppression (Figure 4A–C) whereas apple, carrot, and green pepper led to weaker effects (Figure 4D–F). Signal enhancements were comparatively rare (Figure 4D). Matrix effects may occur at any time of a chromatographic run. Neither short nor long retention times were generally free from matrix effects, indicating that polar as well as nonpolar matrix compounds can interfere with the ionization of the analytes.

Wheat flour is a good example for the existence of time intervals during which no matrix effects occur. This is of practical relevance as such intervals can be easily detected by the postcolumn infusion of an appropriate monitor substance. For analytes eluting in such an interval, no matrix effects have to be considered at all and external calibration with solvent standards can be used for a reliable quantification.

The differences between matrix effects observed for different analytes in one matrix were much smaller than between the matrix effects observed for different matrixes. Thus, it seems to be of greater importance to consider matrix effects for each individual matrix (extract) than for the single analytes. Moreover, in preliminary experiments we observed differences between profiles of various batches of the same fruit or vegetable, even though the same extraction and cleanup procedure was used. Given the

 Table 1. Median of the Recovery of Spiked Pesticide

 Content without Compensation (Apparent Recovery)

 and with Compensation by the Monitor Substance

 Carbendazim^a

	witho compens	out sation	wit compen	h sation	number of
	median	CV^b	median	CV^b	apparent recovery
	(%)	(%)	(%)	(%)	<60% (n)
avocado	40	35	94	34	87
carrot	52	12	87	18	17
cauliflower	42	20	79	23	105
fermented tea	41	24	78	27	112
grapefruit	31	40	84	34	97
leek	51	17	87	22	70
linseed	44	26	89	22	54
onions	45	21	90	26	64
orange	40	31	97	28	76
pear	55	11	89	16	14
potatoes	53	9	88	11	26
raisins	58	5	75	26	2
raspberries	56	18	84	30	4
rocket	41	27	84	29	95
wheat flour	41	26	69	59	8
^{<i>a</i>} Only stron coefficient of va	g matrix riation.	effects	are con	nsidered	(see text). ^b CV,

diversity of matrix components in plant materials (see above), it is reasonable to assume that the similarity of matrix effects for different analytes is not specific for plant matrixes but can also be expected for other matrixes dealt with in residue analysis as well as in biomedical analysis, metabolomics, and environmental trace analysis.

Correction of Matrix Effects by Monitor Substance(s). The similarity in the matrix effect profiles for different analytes in one sample matrix offers a new option to correct matrix effects. Provided that one analyte can be found which is representative for the whole set of analytes, it would be sufficient to record the matrix effect profile of this one monitor substance to correct for the matrix effects of all other analytes of the set. This would substantially reduce the analytical effort for handling matrix effects in multicomponent analysis by LC–MS/MS, especially for the surveillance of tolerance levels, maximum residue levels, or other action levels. However, the accuracy of this approach strongly depends upon two aspects: (a) the selection of a representative monitor substance that adequately reflects the matrix effects encountered for the other analytes of the set and (b) whether or not the continuous postcolumn infusion can adequately correct the matrix effect occurring during normal LC–MS/MS measurements with injection onto the LC column.

To clarify both aspects, conventional matrix effects were determined for the 140 pesticides in the 20 matrixes using matrixmatched standards prepared by standard addition into final sample extracts followed by LC-MS/MS analysis in the positive mode. Of these data, 12 of the more polar pesticides could not be considered due to a lack of chromatographic retention. For the remaining 2560 analyte/matrix combinations, apparent recoveries were calculated according to eq 1. Data for analyte/matrix combinations exhibiting strong matrix effects (apparent recovery below 60%) are summarized in Table 1. This table lists the median and the coefficient of variation for each sample matrix except for apple, aubergine, peas, pepper, and plum, which did not show such strong matrix effects. The number of analytes considered (*n*) is a measure for the frequency of strong suppressions in each matrix. Especially in extracts of fermented tea, cauliflower, grapefruit, orange, and rocket, a large number of pesticides experienced strong matrix effects.



Figure 5. Recovery for 128 pesticides from matrix-matched standards in extracts of rocket (high water content), wheat flour (dry), orange (acidic), and avocado (high oil content): (A) without compensation of matrix effects (apparent recovery) and (B) after compensation by the matrix effect profile of carbendazim. Arrows mark the optimum recovery of 100%. Spiked amount correspond to 0.05 mg/kg in rocket, orange, and avocado and to 0.1 mg/kg in wheat flour.

Analytical Chemistry, Vol. 81, No. 6, March 15, 2009 2191

For instance, the apparent recovery of mepanipyrim in orange was only 8%, corresponding to 92% signal suppression. For ethoprophos and alachlor, that elute close to mepanipyrim, low recoveries of 13% and 17% were obtained too. However, for chlorsulfuron, which eluted about 6 min earlier, the recovery was 99%. These data support the results of the postcolumn infusion experiments that coeluting analytes tend to experience comparable matrix effects.

In the next step, these apparent recoveries below 60% were corrected for the matrix effects by using the matrix effect profile of the fungizide carbendazim as monitor substance as described in the Experimental Section. By this approach, the strong matrix effects could be well compensated, from 45% apparent recovery to 85% on average (Table 1).

The benefit of matrix effect compensation by post column infusion of a monitor substance is also visible in Figure 5, which shows the frequency distributions of apparent recoveries of the whole set of 128 analytes in the matrixes rocket, wheat flour, orange, and avocado. Here, all distribution maxima were shifted to 100% after the correction by monitor substance (column B). The cumulative frequency for recoveries in the range of 60-140% increased in rocket from 25% of all analytes to 85%, in orange from 40% to 80%, and in avocado from 30% to 70%. Only in the case of wheat flour, with generally weak matrix effects, a significant improvement was not observed (shift from 94% to 98%).

While the correction using the postcolumn infusion data of carbendazim compensated the conventionally determined matrix effects to around 100% for the majority of pesticides, it increased the width of frequency distribution as compared to the uncorrected data for all four matrixes (Figure 5). Obviously, the one monitor substance is not suited to compensate the matrix effects of all 128 analytes to the same extent. However, if compliance of action levels has to be checked by LC–MS/MS, an under- or overestimation of 40% is not very critical as long as the analytical result is <40% or >300% of the legal level. This considers the typical measurement uncertainty in pesticide residue analysis and the precision of our procedure. The error of compensation becomes significant only if the action level falls within the band of additional uncertainty.

For a given set of analytes one has to evaluate which substance is best suited as the monitor substance for postcolumn infusion. In critical cases one may use a second monitor substance for an optimum coverage of the whole range of matrix effects. Concerning its physicochemical properties, no specific requirements for the monitor substance are obvious from our data. The use of an isotopically labeled substance is advantageous as these are usually not found in native samples.

CONCLUSIONS

Matrix effect profiles, generated by the postcolumn infusion of 129 analytes and analysis by ESI-MS in the positive mode, provide information on the effect of the sample matrixes on individual analytes, independent of retention time. At a given retention time, matrix effects differ more strongly between matrixes than between analytes. This suggests that the extent of matrix effects is less influenced by the physicochemical properties of the analytes than by the properties of the matrix components eluting at the same time.

The similarity of effects of a given matrix on different analytes offers the opportunity to compensate most matrix effects occurring during electrospray ionization with the help of matrix effect profiles of monitor substances determined by postcolumn infusion. This approach has been shown to improve the quantification for the majority of 2560 analyte/matrix combinations tested in this study.

Beyond that, matrix effect profiles may also support identification of critical matrix components. Because the retention time of a critical matrix component is visible now, further mass spectrometric experiments are possible for the characterization and identification of such matrix components.

ACKNOWLEDGMENT

We gratefully acknowledge the financial support by Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, Bonn, Germany; Project AL 971/1-1).

SUPPORTING INFORMATION AVAILABLE

Additional information as noted in the text and a full list of the 140 pesticides with their mass spectrometric parameters as well as physicochemical properties. This material is available free of charge via the Internet at http://pubs.acs.org.

Received for review November 7, 2008. Accepted January 27, 2009.

AC802362S

Supporting Information

Compensation of Matrix Effects by Postcolumn Infusion of a Monitor Substance in Multiresidue Analysis with LC–MS/MS

Helen Stahnke, Thorsten Reemtsma, and Lutz Alder*

Federal Institute for Risk Assessment (BfR), Residue Analysis, Thielallee 88 – 92, 14195 Berlin, Germany

Additional information on materials and methods, on the procedure of data transfer from chromatography software into spreadsheet format and a list of pesticides covered in this study with their mass spectrometric parameters (Table S-1) as well as substance specific properties (Table S-2) are provided here.

I Materials and Methods:

Suppliers of Pesticide Standards. The 140 pesticide standard substances were purchased by Ehrenstorfer Laboratories GmbH (Augsburg, Germany), Riedel-de-Haën (Seelze, Germany), Syngenta Agro GmbH (Maintal, Germany), former Ciba-Geigy AG (Basel, Switzerland), BASF (Ludwigshafen, Germany), former Hoechst AG (Frankfurt am Main, Germany), Bayer AG (Leverkusen, Germany), and Monsanto Company (St. Louis, Missouri, USA). In addition etofenprox and iprovalicarb were kindly provided by the former Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA) (Braunschweig, Germany).

Injection of Extracts for Postcolumn Infusion Experiments. The methanol extracts of samples were mixed with mobile phase A in the injector in the sandwich technique. Using the postcolumn infusion for determination of matrix effects the total injection volume of sample extracts was 8 μ L. With each injection of sample extract the matrix extracted from 20 mg water-containing sample or 10 mg dry sample was delivered onto the column. The injector program was: drawing of 3 μ L mobile phase A and 2 μ L sample extract, twice washing of injector needle with methanol; drawing of 2 μ L mobile phase A and 2 μ L sample extract, twice washing of 3 μ L mobile phase A and 2 μ L sample extract, twice washing of 3 μ L mobile phase A and 2 μ L sample extract, twice washing of 3 μ L mobile phase A and 2 μ L sample extract, twice washing of 3 μ L mobile phase A and 2 μ L sample extract, twice washing of 3 μ L mobile phase A and 2 μ L sample extract, twice washing of 3 μ L mobile phase A and 2 μ L sample extract, twice washing of 3 μ L mobile phase A and 2 μ L sample extract, twice washing of 3 μ L mobile phase A and 2 μ L sample extract, twice washing of 3 μ L mobile phase A and 2 μ L sample extract, twice washing of 3 μ L mobile phase A and 3 μ L mobile phase A a

* Corresponding author. E-mail: lutz.alder@bfr.bund.de

Injection of Standards for Conventional Determination of Matrix Effects. The dilution of matrix compounds in sample extracts caused by spiking was compensated by increasing the injection volume of matrix-matched standards to 10 μ L. The same injection volume was used for solvent standards to insure identical amounts of injected pesticides. The dilution ratio of methanol extract with mobile phase A in the injector had to be the same as for postcolumn infusion experiments. The injector program was adapted for the conventional determination of matrix effects as follows: drawing of 3 μ L mobile phase A and 3 μ L standard, twice washing of injector needle with methanol; drawing of 3 μ L mobile phase A and 2 μ L standard, twice washing of injector needle with methanol, 2-fold repetition; drawing of 3 μ L mobile phase A and 3 μ L standard, trawing of 3 μ L mobile phase A and 3 μ L standard, trawing of 3 μ L mobile phase A and 3 μ L standard, twice washing of injector needle with methanol; drawing of injector needle with methanol, 2-fold repetition; drawing of 3 μ L mobile phase A and 3 μ L standard, twice washing of 3 μ L mobile phase A and 3 μ L standard, twice washing of injector needle with methanol; drawing of 3 μ L mobile phase A and 3 μ L standard, twice washing of injector needle with methanol; drawing of 3 μ L mobile phase A and 3 μ L standard, twice washing of injector needle with methanol; drawing of 3 μ L mobile phase A and 3 μ L standard, twice washing of injector needle with methanol; drawing of 3 μ L mobile phase A and 3 μ L standard, twice washing of injector needle with methanol; drawing of 3 μ L mobile phase A and 3 μ L standard, twice washing of injector needle with methanol; drawing of 3 μ L mobile phase A and 3 μ L

ESI Source Parameters. The following source parameters were used: positive ion mode (ESI+), ion spray voltage 5500 V; nebulizer gas 60 psi; heater gas 60 psi; heater gas temperature 400 °C; curtain gas (nitrogen) 50 psi; collision gas (nitrogen) 4 psi.

II Data Transfer from Analyst Software into Spreadsheet Format for further Processing: The quantitative acquisition of matrix effects for 2800 analyte/matrix combinations generated a very large quantity of data. The complex evaluation of these data could not be carried out within the chromatography software, but was executed in a spreadsheet. For the data transfer a semiautomated software routine was developed. The Analyst translate program was used for a conversion of the in wiff-format created measurement data files to the netCDF-format (network Common Data Form). A free available java program (toolsUI.jar file from http://www.unidata.ucar.edu/software/netcdf-java/), reading in netCDF-files, served for the generation of text-files that list the data pairs (signal intensity/time) for all 50 SRM transitions recorded during one experiment together in one file. An awk-script was written to sort the data in text-files as needed for our spreadsheet master files.

Pesticide	Main use	RT (min)	Precursor ion	Q1 Mass (amu)	Q3 Mass (amu)	DP (V)	FP (V)	EP (V)	CEP (V)	CE (V)	CXP (V)
Acephate		1.7	[M+H] ⁺	184.1	124.9	9	360	10.0	10	25	9
Acetamiprid		9.4	[M+H] ⁺	223.0	126.0	36	360	12.0	14	27	9
Alachlor	Ч	14.9	[M+H] ⁺	270.1	238.1	3 1	370	11.0	16	15	12
Aldicarb		10.5	[M+NH4] ⁺	208.1	89.1	-	360	7.0	12	21	9
Ametryn	Ч	14.0	[M+H] ⁺	228.1	186.2	36	360	11.0	14	25	10
Amidosulfuron	Ч	7.3	[M+H] ⁺	370.0	217.9	21	360	9.5	22	31	12
Amitraz	а	18.6	[M+H] ⁺	294.2	163.1	16	370	9.5	18	21	ω
Atrazin	Ч	13.1	[M+H] ⁺	216.1	174.0	21	360	11.0	12	25	10
Avermectin B1a		19.5	[M+NH4] ⁺	890.5	305.1	41	350	8.5	40	35	16
Azaconazole	f	13.5	[M+H] ⁺	300.0	231.0	56	370	12.0	20	23	12
Azamethiphos		11.6	[M+H] ⁺	325.0	183.0	16	370	10.0	20	21	10
Azinphos-ethyl		14.8	[M+H] ⁺	346.0	132.2	26	360	9.5	22	21	9
Azinphos-methyl		13.8	[M+H] ⁺	318.0	132.2	16	360	10.0	20	21	9
Azoxystrobin	ţ	14.2	[M+H] ⁺	404.1	371.9	36	360	9.5	24	19	20
Benalaxyl	ł	15.5	[M+H] ⁺	326.2	148.2	26	370	12.0	20	27	ω
Bendiocarb		11.8	[M+H] ⁺	224.1	167.2	9	360	11.0	14	13	ω
Benfuracarb		16.4	[M+H] ⁺	411.2	195.1	-	370	7.5	22	31	10
Benzoximate	a	15.7	[M+H] ⁺	364.1	199.1	-	370	5.0	20	17	10
Bifenthrin		20.0	[M+NH4] ⁺	440.1	181.2	36	350	7.0	22	21	10
Bitertanol	Ŧ	16.0	[M+H] ⁺	338.2	70.0	-	370	8.5	20	25	10
Bupirimate	Ŧ	15.1	[M+H] ⁺	317.1	166.1	31	370	10.5	20	33	8
Buprofezin		16.6	[M+H] ⁺	306.2	201.2	9	370	9.0	20	17	10
Butocarboxim		10.3	[M+NH4]	208.1	116.1	-	360	4.0	10	1	9
Butylate	Ч	16.6	[M+H] ⁺	218.2	57.1	66	60	12.0	12	29	ω
Carbaryl	.—	12.5	[M+H] ⁺	202.1	144.9	1	360	10.0	10	15	ø
Carbendazim	f	10.3	[M+H] ⁺	192.1	160.0	41	360	11.0	16	25	8
Carbetamide	Ч	11.2	[M+H] ⁺	237.1	118.1	21	360	7.0	14	19	4
Carbofuran	.—	11.8	[M+H] ⁺	222.1	165.1	16	360	9.5	12	17	ø
Carbosulfan	.—	19.1	[M+H] ⁺	381.2	118.1	36	370	8.5	22	25	9
Carboxin	÷	12.2	[M+H] ⁺	236.1	142.9	26	370	8.0	14	21	8
Chlorfenvinphos		15.4	[M+H] ⁺	358.9	155.0	36	360	10.0	24	19	8
Chloridazon	٩	9.2	[M+H] ⁺	222.0	92.2	56	370	10.0	14	35	4
Chlorotoluron	Ч	12.9	[M+H] ⁺	213.1	72.0	36	360	11.5	14	33	4
Chlorpyrifos	.—	17.3	[M+H] ⁺	349.9	96.9	21	360	11.0	18	41	9
Chlorsulfuron	Ч	8.5	[M+H] ⁺	358.0	141.0	51	330	10.0	22	23	9
Chlorthiamid	4	9.5	[M+H] ⁺	205.9	118.9	36	370	10.5	14	55	9

Table S-1. Pesticides Considered in this Study and their Mass Spectrometric Parameters

Ergebnisse

٦

Pesticide	Main use	RT (min)	Precursor ion	Q1 Mass (amu)	Q3 Mass (amu)	DP (V)	FP (V)	EP (V)	CEP (V)	CE (V)	CXP (V)
Cinosulfuron	٩	8.7	[M+H] ⁺	414.1	182.9	36	360	10.0	26	23	10
Clomazone	ے	13.6	[M+H] ⁺	240.1	125.0	26	370	12.0	14	27	9
Coumaphos		15.7	[M+H] ⁺	363.0	227.0	66	370	12.0	24	35	12
Cymoxanil	Ŧ	9.5	[M+H] ⁺	199.1	128.0	46	350	8.5	12	13	9
Cyprodinil	Ŧ	15.6	[M+H] ⁺	226.1	76.9	61	360	12.0	14	63	10
Cyromazine		2.6	[M+H] ⁺	167.1	125.0	46	310	8.5	14	25	9
Deltamethrin		18.2	[M+NH ₄] ⁺	522.9	280.7	16	370	10.5	24	23	16
Demeton-S-methyl		12.1	[M+NH4] ⁺	248.0	89.1	9	360	6.5	14	17	4
Desmedipham	Ļ	13.5	[M+NH ₄] ⁺	318.1	182.2	31	340	10.0	22	19	8
Diazinon		15.7	[M+H] ⁺	305.1	169.1	21	370	11.0	22	29	8
Diclofop-methyl	۲	16.6	[M+NH ₄] ⁺	358.0	281.0	26	350	10.0	22	21	16
Dicrotophos		7.7	[M+H] ⁺	238.1	127.1	16	370	9.5	14	23	9
Diethofencarb	Ŧ	13.9	[M+H] ⁺	268.1	226.1	31	330	10.5	18	15	12
Difenoconazole	Ŧ	16.0	[M+H] ⁺	406.1	250.9	41	350	9.0	22	37	14
Dimefuron	۲	13.7	[M+H] ⁺	339.1	167.0	61	330	11.5	20	29	œ
Dimethachlor	Ļ	13.3	[M+H] ⁺	256.1	224.2	26	370	10.5	16	19	12
Dimethenamide	٩	14.0	[M+H] ⁺	276.1	244.1	1	360	6.5	16	19	14
Dimethoate		8.7	[M+H] ⁺	230.0	125.0	1	360	10.0	12	29	9
Dimethomorph	ţ	14.3	[M+H] ⁺	388.1	301.1	46	370	10.0	22	27	18
Dioxathion		16.8	[M+NH ₄] ⁺	474.0	271.0	31	360	6.5	20	19	14
Diuron	Ļ	13.6	[M+H] ⁺	233.0	72.0	66	310	9.5	16	31	10
Dodemorph	Ŧ	18.5	[M+H] ⁺	282.3	116.1	51	370	12.0	16	29	9
Epoxiconazole	Ŧ	15.0	[M+H] ⁺	330.1	121.0	36	70	11.0	22	27	9
EPTC	Ļ	15.4	[M+H] ⁺	190.1	128.1	61	370	10.5	12	15	9
Ethametsulfuron-methyl	۲	10.0	[M+H] ⁺	411.1	196.1	31	370	11.0	24	23	10
Ethoprophos	c	15.0	[M+H] ⁺	243.0	131.0	21	360	10.0	16	29	9
Etofenprox		19.9	[M+NH₄] ⁺	394.2	177.3	16	370	6.5	30	21	ω
Famoxadone	Ŧ	15.4	[M+NH4] ⁺	392.2	238.0	16	360	8.5	22	23	12
Fenamiphos	c	15.2	[M+H] ⁺	304.1	217.1	41	370	11.5	22	31	12
Fenazaquin	Ŧ	19.1	[M+H] ⁺	307.2	161.2	51	360	10.5	12	31	8
Fenhexamid	Ŧ	14.8	[M+H] ⁺	302.1	97.2	91	350	12.0	20	33	4
Fenoxaprop-P-ethyl	Ļ	16.5	[M+H] ⁺	362.1	288.1	46	370	10.5	22	23	16
Fenoxycarb		15.2	[M+H] ⁺	302.1	88.0	66	310	10.0	24	29	4
Fenpropathrin	ъ	17.6	[M+H] ⁺	350.2	125.1	41	350	12.0	20	19	9
Fenpropidin	f	15.3	[M+H] ⁺	274.2	147.1	51	350	10.0	16	37	ø
Fenpropimorph	f	18.9	[M+H] ⁺	304.3	147.1	46	360	11.5	22	39	ω
Fenpyroximate	в	18.2	[M+H] ⁺	422.2	366.3	26	370	10.0	22	23	20
Fenthion		15.6	[M+H] ⁺	279.1	169.1	21	370	12.0	16	23	8

CXP (V)	4	9	10	16	10	8	4	9	16	16	14	14	14	8	10	16	18	9	4	8	12	8	8	9	6	10	9	ω	9	12	4	10	12	10	10	8	9	9
CE (V)	71	21	25	27	17	27	37	63	37	29	17	25	25	31	23	25	23	19	39	21	21	31	25	23	33	19	21	21	17	17	49	33	19	15	45	23	19	15
CEP (V)	24	20	22	20	22	22	14	20	20	20	24	20	18	12	14	24	24	16	22	16	24	14	16	22	18	14	22	14	20	20	14	22	16	16	18	16	12	20
EP (V)	10.0	11.0	7.5	9.0	10.0	10.0	10.0	10.5	11.5	12.0	9.5	12.0	10.5	11.5	12.0	12.0	10.5	10.0	10.5	10.5	7.5	11.5	9.0	12.0	11.5	10.5	10.0	8.5	10.0	5.0	12.0	12.0	12.0	9.5	12.0	7.5	12.0	9.5
FP (V)	360	340	350	310	370	310	360	370	370	360	360	370	370	370	350	350	340	330	370	370	320	360	360	360	360	350	360	370	370	350	340	360	300	370	360	370	360	370
DP (V)	31	36	41	51	÷	86	36	61	76	61	31	36	86	26	51	81	91	36	36	16	66	26	46	46	56	46	16	56	26	9	31	61	46	-	31	÷	26	16
Q3 Mass (amu)	77.1	105.1	182.1	282.1	194.2	158.1	72.0	139.1	310.2	291.9	255.0	247.1	262.1	157.1	195.0	315.9	315.9	127.0	70.1	171.1	227.9	158.9	175.0	119.0	217.0	165.2	115.9	153.1	127.0	227.0	77.0	182.1	220.0	210.1	70.1	165.1	124.9	145.1
Q1 Mass (amu)	364.1	336.0	408.1	384.1	364.1	489.0	233.1	466.1	330.1	312.0	367.1	316.1	324.1	185.1	383.2	434.1	376.1	251.0	314.1	253.2	353.1	297.0	256.1	321.2	346.1	207.1	314.1	235.1	331.0	318.1	224.1	504.1	280.1	278.1	320.1	222.1	142.0	302.9
Precursor ion	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺	[M+NH4] ⁺	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺
RT (min)	15.4	14.5	8.8	16.6	14.8	17.5	12.8	10.2	13.9	14.7	17.4	15.2	14.4	12.0	16.8	16.4	16.0	13.5	15.8	12.0	17.2	15.7	8.3	14.5	15.8	13.4	15.4	13.2	14.6	16.5	14.9	9.9	13.2	13.2	15.8	13.2	1.2	13.5
Main use	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч		Ч	Ч	Ч	Ч	h	f	f	f		Ч	h		f	h	а	f		f		Ч	f	ч		Ч	f	ч	f	Ч	f	Ч		
Pesticide	Flamprop-M-isopropyl	Flamprop-M-methyl	Flazasulfuron	Fluazifop-P-butyl	Flufenacet	Flufenoxuron	Fluometuron	Flupyrsulfuron-methyl sodium	Fluridone	Flurochloridone	Fluroxypyr-meptyl	Flusilazole	Flutolanil	Fuberidazole	Furathiocarb	Haloxyfop-etotyl	Haloxyfop-P-methyl	Heptenophos	Hexaconazole	Hexazinone	Hexythiazox	Imazalil	Imidacloprid	Iprovalicarb	Isofenphos	Isoproturon	Kresoxim-methyl	Lenacil	Malathion	MCPA-butotyl	Mepanipyrim	Mesosulfuron-methyl	Metalaxyl-M	Metazachlor	Metconazole	Methabenzthiazuron	Methamidophos	Methidathion

Pesticide	Main use	RT (min)	Precursor ion	Q1 Mass (amu)	Q3 Mass (amu	DP (V)	FP (V)	EP (V)	CEP (V)	CE (V)	CXP (V)
Methomyl		4.3	[M+H] ⁺	163.0	106.0	46	360	12.0	14	13	9
Metsulfuron-methyl	Ч	8.4	[M+H] ⁺	382.1	198.9	31	360	10.5	22	27	10
Mevinphos		10.2	[M+H] ⁺	225.0	193.1	31	370	10.5	14	13	10
Monolinuron	Ч	12.7	[M+H] ⁺	215.1	125.9	61	340	8.5	12	25	9
Monuron	٩	11.5	[M+H] ⁺	199.1	72.0	31	370	10.0	12	29	4
Myclobutanil	Ŧ	14.7	[M+H] ⁺	289.1	70.1	36	360	12.0	18	33	4
Omethoat		2.0	[M+H] ⁺	214.1	109.0	51	310	11.5	12	35	9
Oxydemeton-methyl		4.1	[M+H] ⁺	247.0	169.0	21	350	12.0	14	19	8
Penconazole	f	15.6	[M+H] ⁺	284.1	158.9	41	370	10.0	16	39	ω
Phoxim		15.7	[M+H] ⁺	299.0	129.1	26	350	9.0	20	17	9
Pirimicarb		12.9	[M+H] ⁺	239.1	72.1	16	360	7.0	12	31	10
Pirimiphos-ethyl		16.8	[M+H] ⁺	334.1	198.1	16	360	10.5	20	29	10
Pirimiphos-methyl		16.0	[M+H] ⁺	306.1	164.1	26	370	11.5	20	29	ω
Profenotos		16.6	[M+H] ⁺	372.9	302.9	56	370	10.0	22	25	18
Propachlor	Ч	13.2	[M+H] ⁺	212.1	170.0	36	360	10.0	14	21	10
Propaquizafop	Ч	16.9	[M+H] ⁺	444.1	299.1	76	370	9.5	20	31	16
Prosulfuron	Ч	12.2	[M+H] ⁺	420.1	141.1	56	330	9.0	24	27	9
Pymetrozine		7.0	[M+H] ⁺	218.1	105.0	56	330	9.5	16	27	9
Pyrazophos	ł	16.1	[M+H] ⁺	374.1	222.1	61	340	10.0	20	29	12
Simetryn	Ч	13.2	[M+H] ⁺	214.1	124.2	31	370	10.5	12	27	9
Sulfosulfuron	Ч	9.5	[M+H] ⁺	471.1	261.0	=	370	8.0	22	23	14
tau-Fluvalinate		18.7	[M+NH4] ⁺	520.1	208.1	31	360	11.0	22	23	12
Terbutryn	Ч	15.1	[M+H] ⁺	242.1	186.1	21	370	11.5	14	25	10
Thiabendazole	ţ	11.7	[M+H] ⁺	202.0	131.1	61	350	10.5	12	43	9
Thiamethoxam		5.4	[M+H] ⁺	292.0	211.0	51	330	8.5	18	17	10
Triasulfuron	Ч	9.6	[M+H] ⁺	402.1	167.1	46	340	10.0	26	25	8
Triazophos		14.8	[M+H] ⁺	314.0	119.1	36	350	12.0	20	47	9
Triflumizole	f	16.3	[M+H] ⁺	346.0	278.0	9	370	8.5	20	17	16
RT: retention time	DP: declustering poter	ntial	FP: focusing pote	ntial EP: entrar	ice potential 0	EP: collisic	n cell en	trance po	tential		
CE: collision energy	CXP: collision cell exit	potential	a: acaricide	h: herbizide f:	fungicide i	insecticide					
Eor furthor information					on band and do	/cd/E820					
	i uli pesiicines (c.i	J. sıı ucını d	", UND INU.) SEA	ζ. IIIIμ.//ww	2W.DII .DUI IU.UG						
Pesticide	Pesticide class ¹	рК _а /рК _b 1	log K _{ow} 1	Surface ten-							
------------------	------------------------------	------------------------------------	-----------------------	--------------------------							
				sion (mN/m) ²							
Acetamiprid	neonicotinoids		0.8	41.1							
Alachlor	chloroacetamides		3.09	39.8							
Aldicarb	carbamates			34.3							
Ametryn	triazines	4.1	2.63	54.4							
Amidosulfuron	sulfonylurea	3.58	1.63	71.0							
Atrazin	triazinės	12.3	2.5	53.8							
Azaconazole	triazoles			55.0							
Azamethiphos	organophosphorus pesticides		1.05	62.0							
Azinphos-ethyl	organophosphorus pesticides		3.18	56.4							
Azinphos-methyl	organophosphorus pesticides		2.96	60.9							
Azoxystrobin	strobilurines		2.5	66.5							
Benalaxyl	phenylamides		3 54	44.5							
Bendiocarb	carbamates	8.8	1 72	43.0							
Benfuracarb	carbamates	0.0	4 22	40.0							
Benzovimate	bridged dipbenyls		7.22	38.6							
Bifonthrin	nyrethroides		2. 4 6	11 3							
Bitertanol	triazoles		4 1	41.5							
Bupirimato	nyrimidinala	1 1	4.1	42.0							
Duprofozio	pyrimumors	4.4	3.9	40.0							
Buteeerbewim			4.3	39.5							
Butocarboxim	carbamates		1.1	33.7							
Butylate	thiocarbamates		4.1	32.1							
Carbary	carbamates		1.59	45.1							
Carbendazim	benzimidazoies	9.8	1.38 (pH 5)	69.3							
			1.51 (pH 7)								
			1.49 (pn 9)								
Carbetamide	carbamates			44.6							
Carboturan	carbamates		1.52	40.5							
Carbosultan	carbamates	(a a		42.3							
Carboxin	oxathiins	> 13.5	2.2	53.9							
Chlorfenvinphos	organophosphorus pesticides		3.85	43.2							
Chloridazon	pyridazinones		1.19	56.6							
Chlorotoluron	urea derivatives		2.5	44.2							
Chlorpyritos	organophosphorus pesticides	. .	4./	52.7							
Chlorsulfuron	sulfonylurea	3.4	-0.99	/2.4							
Cinosulturon	sulfonylurea	4.72	2.04	62.7							
Clomazone	isoxazolidinones		2.5	42.2							
Coumaphos	organophosphorus pesticides		4.13	53.9							
Cyprodinil	anilinopyrimidines	4.44	3.9 (pH 5)	57.5							
			4.0 (pH 7)								
0		5.00	4.0 (pH 9)	400 7							
Cyromazine	triazines	5.22	-0.061	132.7							
Demeton-S-methyl	organophosphorus pesticides		1.32	39.9							
Desmedipnam	carbamates		3.39	54.6							
Diazinon	organophosphorus pesticides	11.4	3.3	45.6							
Diciotop-methyl	aryloxyphenoxypropionates		4.58	42.7							
Dicrotopnos	organophosphorus pesticides		-0.5	30.5							
Dietnotencarb	carbamates	10.0	3.02	37.1							
Direnoconazole		12.9	4.2	50.3							
Dimeturon			2.51	44.0							
Dimethachior			2.17	40.8							
Dimethenamide	chioroacetamides	10.0	2.15	42.0							
Dimethoate	organophosphorus pesticides	12.0	0.704	5U.1							
Dimetnomorph	cinnamic acid	15.305 (calc.)	2.73	45.5							

Table S-2. Pesticides considered in this study and their substance specific properties

Pesticide	Pesticide class ¹	рК _а / <i>рК_b</i> ¹	log K _{ow} ¹	Surface ten- sion (mN/m) ²
Dioxathion	organophosphorus pesticides			54.5
Diuron	urea derivatives		2.85	48.1
Dodemorph	morpholines	8.08	4.14	29.2
Epoxiconazole	triazoles		3.44	49.8
EPTC	thiocarbamates		3.2	33.9
Ethametsulfuron-	sulfonylurea	4.6	0.89 (pH 7)	73.1
methyl	-		1.588 (pH 5)	
Ethoprophos	organophosphorus pesticides		3.59	37.9
Etofenprox	pyrethroides		6.9	38.6
Famoxadone	strobilurines		4.56	59.2
Fenamiphos	organophosphorus pesticides		3.3	41.3
Fenazaquin	nitrogenous pesticides		5.51	44.0
Fenhexamid	hydroxyanilides		3.51	54.6
Fenoxaprop-P-ethyl	aryloxyphenoxypropionates		4.58	47.3
Fenoxycarb	carbamates		4.07	41.7
Fenpropathrin	pyrethroides		6	42.5
Fenpropidin	morpholines	10.1	2.9	33.8
Fenpropimorph	morpholines	6.98	3.3	30.8
Fenpyroximate	pyrazoles		5.01	39.5
Flamprop-M-	arylaminopropionic acids		3.69	45.2
isopropyl				
Flamprop-M-methyl	arylaminopropionic acids		3	47.9
Fluazifop-P-butyl	aryloxyphenoxypropionates	17.1 (calc.)	4.95	35.8
Flufenacet	oxyacetamides		3.2	43.5
Flufenoxuron	urea derivatives	10.1	4	44.5
Fluometuron	urea derivatives		2.38	33.8
Flupyrsulfuron-	sulfonylurea	4.9	0.96	
methyl sodium				
Fluridone	pyridones	12.3	1.87	39.9
Fluroxypyr-meptyl	pyridinecarboxylic acid		4.53 (pH 5)	
Flusilazole	triazoles	11.5	3.74	33.7
Flutolanil	oxathiins		3.17	36.6
Fuberidazole	benzimidazoles	10.0	2.67	56.3
Furathiocarb	carbamates		4.6	46.7
Haloxytop-etotyl	aryloxyphenoxypropionates		4.33	37.7
Haloxytop-P-methyl	aryloxyphenoxypropionates		4	37.6
Heptenophos	organophosphorus pesticides		2.32	41.3
Hexaconazole	triazoles		3.9	46.1
Hexazinone	triazinones	11.8	1.2	47.3
Hexythiazox	carboxamides		2.53	56.5
Imazalil	imidazoles	6.53	3.82	40.8
Imidacloprid	neonicotinoids		0.57	68
Iprovalicarb	nitrogenous pesticides		3.2	36.6
Isotenphos	organophosphorus pesticides			42.9
Isoproturon	urea derivatives		2.5	39.2
Kresoxim-methyl	strobilurines		3.4	36.8
Lenacil	uracils	10.3	2.31	51.1
Malathion	organophosphorus pesticides		2.75	47.1
MCPA-butotyl	aryloxyalkanoic acid			
Mepanipyrim	aniinopyrimidines	11.3	3.28	58.5
Mesosulturon-	sulfonylurea	4.35	1.39 (pH 5)	65.9
methyl			-0.48 (pH 7)	
Mataloved M	nhonulomidee		-2.06 (pH 9)	40 E
Metazashlar			1./1	40.5
Meteonor			2.13	42.5
wietconazole	li lazoles		3.85	40.3

Pesticide	Pesticide class ¹	рК _а / <i>рК</i> _b ¹	log K _{ow} ¹	Surface ten-
•• • • • • •	<u> </u>			sion (mn/m)
Methabenzthiazuron	urea derivatives		2.64	59.6
Methamidophos	organophosphorus pesticides		-0.8	44.4
Methidathion	organophosphorus pesticides		2.2	60.4
Methomyl	carbamates		0.093	36.3
Mevinphos	organophosphorus pesticides		0.127	35.5
Monolinuron	urea derivatives		2.2	47.4
Monuron	urea derivatives			46.1
Myclobutanil	triazoles		2.94	44.6
Omethoat	organophosphorus pesticides		-0.74	41.5
Oxydemeton-methyl	organophosphorus pesticides		-0.74	51.6
Penconazole	triazoles	12.49	3.72	42.9
Phoxim	organophosphorus pesticides		4.104	44.1
Pirimicarb	carbamates	9.56	1.7	45.5
Pirimiphos-ethyl	organophosphorus pesticides			48.7
Pirimiphos-methyl	organophosphorus pesticides	9.7	4.2	51.1
Profenofos	organophosphorus pesticides		4.44	44.7
Propachlor	chloroacetamides		1.6	40.7
Propaguizafop	aryloxyphenoxypropionates		4.78	43.7
Prosulfuron	sulfonylurea	3.76	1.5	56.1
Pymetrozine	pyridines	4.06	-0.18	54.6
Pyrazophos	organophosphorus pesticides		3.8	48.3
Simetryn	triazines	10.0	2.6	58.1
Sulfosulfuron	sulfonylurea	3.51	1	68.0
Terbutryn	triazinės	9.7	3.65	52.3
Thiabendazole	benzimidazoles	9.27	2.39	71.1
Thiamethoxam	neonicotinoids		-0.13	72.5
Triasulfuron	sulfonylurea	4.64	1.1	66.8
Triazophos	organophosphorus pesticides		3.34	49.3
Triflumizole	imidazoles	10.3	5.06 (pH 6.5)	36.2
			5.10 (pH 6.9)	
			5.12 (pH 7.9)	

3.2 Der Einfluss der Matrixkonzentration auf Matrixeffekte

Der Inhalt dieses Kapitels wurde als "Research Article" veröffentlicht in: Helen Stahnke, Stefan Kittlaus, Günther Kempe, Lutz Alder, "Reduction of Matrix Effects in Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry by Dilution of the Sample Extracts: How Much Dilution is Needed?", *Analytical Chemistry*, **2012**, *84 (3)*, 1474-1482.

Kurzprofil der Publikation

Die Arbeit zeigte erstmals den funktionalen Zusammenhang zwischen der Konzentration an Matrixbestandteilen und dem Matrixeffekt (Signalsuppression) bei der Elektrospray-Massenspektrometrie auf. Anhand der ermittelten logarithmischen Verdünnungsfunktionen konnte berechnet werden, wie stark Extrakte pflanzlicher Lebensmittel, die nach der weit verbreiteten QuEChERS-Methode¹³² aufgearbeitet wurden, verdünnt werden müssen, um Matrixeffekte auf ein akzeptables Maß zu minimieren oder gänzlich zu vermeiden. Mit Hilfe der Koautoren Stefan Kittlaus und Günther Kempe wurde nachgewiesen, dass der gefundene Zusammenhang zwischen dem Logarithmus der Matrixkonzentration und dem resultierenden Matrixeffekt unabhängig vom verwendeten Massenspektrometer ist.

Abgrenzung des Eigenanteils

Die Literaturrecherche, die Festlegung des Versuchsdesigns, die Probenahme, die Laborarbeiten und die Messungen an der QTrap 5500 wurden vollständig von mir vorgenommen. Einige Messungen wurden im Rahmen einer Kooperation mit der Landesuntersuchungsanstalt für das Gesundheits- und Veterinärwesen Sachsen von Herrn Stefan Kittlaus unter der Betreuung von Herrn Dr. Günther Kempe an einem 6460A Triple Quadrupol Massenspektrometer wiederholt. Die benötigten Extrakte und Pestizidmischungen wurden Herrn Kittlaus dafür zur Verfügung gestellt. Die Messdaten beider Labore wurden von mir ausgewertet und die Ergebnisse diskutiert. Das Manuskript wurde von mir erstellt und teilweise überarbeitet. Eine Kommentierung des Manuskripts und die Unterbreitung von Überarbeitungsvorschlägen erfolgten durch die Koautoren Stefan Kittlaus und Günther Kempe. Die Betreuung der Arbeit hat Herr Dr. Lutz Alder übernommen.

Reprinted with permission from Anal. Chem. 2012, 84 (3), 1474-1482. Copyright 2012 American Chemical Society. http://pubs.acs.org/articlesonrequest/AOR-hpQGvnhZBpGeTpVeBz6M





Helen Stahnke,*^{,†} Stefan Kittlaus,[‡] Günther Kempe,[§] and Lutz Alder[†]

[†]Federal Institute for Risk Assessment, Max-Dohrn-Straße 8-10, 10589 Berlin, Germany [‡]Joint Analytical Systems GmbH, Carl-Zeiss-Straße 49, 47445 Moers, Germany

[§]Landesuntersuchungsanstalt für das Gesundheits- und Veterinärwesen Sachsen, Reichenbachstraße 71-73, 01217 Dresden, Germany

Supporting Information

ABSTRACT: In this study, the relationship between matrix concentration and suppression of electrospray ionization (matrix effects) was investigated. Ion suppression of pesticides present in QuEChERS extracts was used as an example. Residue-free extracts of four different commodities, avocado, black tea, orange, and rocket (arugula), were fortified with 39 pesticides each. For many of the resulting 156 pesticide/matrix combinations, considerable matrix effects were observed if the coextracted matrix of 8 mg of equivalent sample (in the case of tea: 1.6 mg) was injected with the undiluted extracts. The



reduction of these matrix effects was measured at 10 levels of dilution up to 1000-fold. The results obtained indicate a linear correlation between matrix effects and the logarithm of matrix concentration (or dilution factor) until the zero-effect level of further dilution was reached. Using the logarithmic equations, it could be shown that a dilution of extracts by a factor of 25-40 reduces ion suppression to less than 20% if the initial suppression is $\leq 80\%$. For stronger matrix effects or complete elimination of suppression, higher dilution factors were needed. The observed correlation was independent from the two instrument platforms used, but the degree of matrix effects differed slightly between the two mass spectrometers in this study.

T remendous developments in mass spectrometry have taken place in the last 10 years. Within this period, liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) has become the predominant approach for analysis of many small organic molecules such as pesticides in complex matrixes. The reasons for this success are an excellent selectivity and low detection limits combined with a rugged instrument. One of the limitations of LC-MS/MS however is that accuracy can not be guaranteed due to matrix effects during atmospheric pressure ionization.

Matrix effects are defined by IUPAC as "the combined effect of all components of the sample other than the analyte on the measurement of the quantity".¹ Such effects can be measured quantitatively by comparison of the response of identical amounts of analytes dissolved in reagent-only and in a postextraction fortified sample extract. Calculation is possible by the response ratio obtained at an individual analyte concentration^{2–5} or more precisely by the ratio of slopes of calibration graphs^{6–9} (if linear calibration graphs are obtained with and without matrix). For more complete measurement of matrix effects occurring during the entire chromatographic run, the better option is postcolumn infusion of analytes in parallel to the injection of blank matrix.^{10,11}

Matrix effects may be divided into two classes, the suppression or enhancement of analyte's response. Possible

causes for enhancement are very rarely proposed, but there are several reasons and hypotheses for the occurrence of ionization suppression. The limited number of excess charges (about 10^{-5} mol/L) and the limited space on the surface of the charged droplets produced in the ion source are most often blamed.¹² Matrix constituents can outcompete analytes for the limited charge or a place on the surface. An increased viscosity or surface tension caused by matrix may inhibit solvent evaporation and Rayleigh fission. Finally, nonvolatile substances from matrix may coprecipitate the analyte before the formation of gaseous ions. On the basis of these explanations, many proposals either to reduce matrix effects or to correct affected results are summarized in many reviews.^{13–20} Recently Lehotay et al.²¹ discussed ways to compensate for

Recently Lehotay et al.²¹ discussed ways to compensate for matrix effects in multimatrix, multianalyte methods. They clearly illustrated advantages and drawbacks of each approach in multiclass, multiresidue analysis. For example, (1) HPLC separations are not capable of separating large matrix components from multiple analytes; (2) no sample preparation method can remove matrix components completely enough without reducing recoveries of at least some analytes; (3)

Received: October 7, 2011 Accepted: December 31, 2011 Published: December 31, 2011

ACS Publications © 2011 American Chemical Society

1474

dx.doi.org/10.1021/ac202661j1 Anal. Chem. 2012, 84, 1474-1482

Article

pubs.acs.org/ac

isotopically labeled standards are very expensive and limited in availability; (4) matrix-matching is logistically onerous due to the need for many blank extracts; (5) postcolumn infusion of marker compounds does not serve as good compensation in all cases; and (6) the echo-peak technique requires much care in method development and does not compensate matrix effects completely. Lehotay et al. also mentioned the dilution of final extracts to reduce matrix effects and noted the associated increase of quantification limits (LOQ), but they gave no idea of the required dilution and consequently the extent of LOQ increase.

Substantial studies on the influence of sample dilution on matrix effects^{22–24} are rare. This is surprising because a simple dilution with solvent (usually called "dilute-and-shoot") is commonly proposed as a strategy to reduce or eliminate matrix effects.^{25–33} However, the diversity of proposed dilution factors (between 2 and 50) illustrates the inadequacy to make conclusions for other analytes and in different matrixes. Even the rarely reported results of two,^{29–31} three,^{32,33} or four⁴ levels of dilution do not allow serious conclusions on the functional relationship between suppression of ionization and matrix concentration.

Certainly, an adequate knowledge about this relationship should be very helpful if observed matrix effects can be eliminated or reduced by dilute-and-shoot. Furthermore, conclusions on the required improvement of cleanup procedures will be possible if the underlying relation between matrix concentration and matrix effect is known. For this reason, we decided to study this issue on the worldwide important application of pesticide residue analysis of fruits and vegetables. Extracts were prepared using a very popular sample preparation method, called "QuEChERS",^{34–37} which is fast and convenient but often contains high amounts of matrix.

EXPERIMENTAL SECTION

Chemicals. Methanol and acetonitrile, both hypergrade for LC-MS, were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Water used for LC-MS/MS was prepared directly in the laboratory with a HP 5 UV water purification system (TKA, Niederelbert, Germany). Ammonium formate was bought from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Buffer-salt mixtures of 4.0 g of anhydrous magnesium sulfate (anh. MgSO₄), 1.0 g of sodium chloride, 1.0 g of trisodium citrate dihydrate, and 0.5 g of disodium hydrogencitrate sesquihydrate and mixtures of 150 mg of primary secondary amine (PSA) with 900 mg of anh. MgSO₄ and of 150 mg of PSA with 900 mg of anh. MgSO₄ and 45 mg of graphitized carbon black (GCB) for QuEChERS sample preparations were purchased from Restek (Bad Homburg, Germany). For the following 39 pesticides, considered in this study, standards of analytical grade were used: acephate, aldicarb, atrazine, azoxystrobin, bifenthrin, bitertanol, butylate, carbaryl, chlorpyrifos, chlorthiamid, cyromazine, deltamethrin, diazinon, diuron, EPTC, fluazifop-butyl, flurochloridone, hexaconazole, imazalil, isoproturon, kresoximmethyl, malathion, MCPA-butotyl, metazachlor, methamidophos, monolinuron, myclobutanil, oxydemeton-methyl, penconazole, pirimicarb, pirimiphos-methyl, profenofos, propachlor, propaquizafop, pyrazophos, simetryn, tau-fluvalinate, terbutryn, and triazophos. Most pesticide standards were purchased from Ehrensdorfer (Augsburg, Germany). Formic acid was bought from Merck (Darmstadt, Germany).

Sample Preparation. Samples of avocado, orange, rocket, and black tea, all in organic quality, were prepared according to

Article

the European version of the QuEChERS method.³⁷ In brief, 10.0 g of cryogenically milled avocados were first mixed with 3 mL of water and allowed to soak. To this sample of avocado and to 10.0 g of cryogenically milled orange and rocket, 10 mL of acetonitrile was added for extraction. A volume of 9.7 mL of water was used to swell 2 g of powdered black tea. After 1 h, also, to this sample, 10 mL of acetonitrile was added. All samples were shaken vigorously by hand for 1 min. In the next step, a partitioning between the acetonitrile and water phases was obtained by the addition of the buffer-salt mixture listed above. The mixture was shaken again by hand for 1 min and then centrifuged (5 min, 3000g). To allow a further separation of coextracted wax and fat, the raw extracts were stored overnight in a freezer. After centrifugation, aliquots of 6 mL were cleaned up by dispersive solid-phase extraction (d-SPE) with 150 mg of PSA in the presence of 900 mg of anh. MgSO₄. Due to the high content of chlorophyll in rocket, in this case, 45 mg of GCB was further added to the mixture of 150 mg of PSA and 900 mg of anh. MgSO₄. The extracts were shaken for 2 min and centrifuged. A volume of 10 μ L of formic acid, 5% in acetonitrile, was added per milliliter of extract. The final QuEChERS extracts were filtered through TITAN PTFE 0.45 μ m syringe filters. About 1 mL of final extract of orange, avocado, or rocket contained the extracted matrix compounds of 1.0 g of sample matrix whereas the final extract of black tea contained the extracted matrix compounds of 0.2 g of sample in 1 mL of extract. All extracts were free of residues of those pesticides which were fortified later.

Liquid Chromatography–Electrospray Ionization– Tandem Mass Spectrometry (LC-ESI-MS/MS) Analysis. Two laboratories with different LC-ESI-MS/MS systems were involved in the study. In the first laboratory, a QTRAP 5500 mass spectrometer with a Turbo V electrospray source (AB Sciex, Foster City, California, USA) was used. This mass spectrometer was coupled to an Agilent 1200 LC system, equipped with a binary pump, vacuum solvent degasser, column oven, and autosampler (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) and controlled with Analyst 1.5.1 software.

The second laboratory has carried out the study on an Agilent 6460A Triple Quadrupole mass spectrometer with a Jet Stream ESI source (Agilent, Santa Clara, USA) coupled to an Agilent 1200 LC system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). The system was controlled with MassHunter acquisition B.03 software.

In both laboratories, the chromatographic separation was performed at 20 °C on the identical Aqua 5 μ m C18 125 Å, 50 mm × 2 mm column with the corresponding 10 mm × 2 mm precolumn (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany). The flow rate was set to 0.2 mL/min. Mobile phase A was methanol/water 1/4 (v/v), and mobile phase B was methanol/water 9/1 (v/v), both of which contained 5 mM ammonium formate. The sample was mixed with mobile phase A during injection by the sandwich injection mode (4 × 3 μ L sample and 3 × 3 μ L mobile phase A). Directly after injection, the linear gradient was raised from 0% B to 100% B over 11 min where B was kept constant for another 12 min. Then, the percentage of B was linearly decreased to 0% over 2 min and kept constant for at least 13 min for equilibration.

The ESI sources were operated in the positive ion mode. Gas flows, gas temperatures, and voltages were set as needed for the particular instrument to obtain maximum sensitivity (see Table S-1 of the Supporting Information for details). For MS/MS detection, the most intensive selected reaction monitoring

(SRM) transition of each pesticide was chosen. With the AB Sciex QTRAP 5500, the scheduled SRM mode with a detection window of 2 min was applied. A detailed description of analyte specific MS parameters is given in Table S-2 of the Supporting Information or is published elsewhere.³⁸

Preparation of Matrix-Matched Standards of Orange (for Calibration Curves). Five mixtures of 39 pesticides were prepared. These contained 2000, 1500, 1000, 500, or 100 ng/ mL of each analyte in acetonitrile. Exactly 50 μ L of each mixture was added to a separate volume of 450 μ L of a blank orange extract. Finally, the matrix-matched standards were shaken on a vortex mixer. The resulting concentration in the fortified extract was 200, 150, 100, 50, or 10 ng/mL, respectively. This procedure was repeated with two further blank orange extracts, which were diluted with acetonitrile (1:10 and 1:100) before fortification and with pure acetonitrile to obtain calibration curves in solvent as a reference. For these experiments in orange, an injection volume of 8 μ L was used.

Determination of Matrix Effects by Comparison of Responses in Fortified Matrix Extracts and Standards in Acetonitrile (for Dilution Graphs). Two separate spiking solutions containing 39 pesticides were prepared in a concentration of 200 ng/mL (first spiking solution) or 40 ng/mL (second spiking solution). To obtain the fortified extracts indicated as "dilution factor 1", 1000 μ L of blank sample extracts (see above) of avocado, orange, and rocket were mixed with 500 μ L of the first spiking solution. In the case of black tea, 1000 μ L of extract were fortified with 500 μ L of the second spiking solution. These fortification levels correspond to a residue amount of 0.1 mg/kg in all commodities.

To obtain the extracts with dilution factors 2, 5, and 10, a volume of 125, 50, or 25 μ L of a fortified extract with dilution factor 1 were filled to 250 μ L with acetonitrile. Fortified extracts with dilution factors 20, 50, and 100 resulted from 1:10 dilution of these three solutions (25 μ L \rightarrow 250 μ L). An analogous 1:10 dilution resulted in extracts with dilution factors of 200, 500, and 1000, respectively. The corresponding two series of standards in solvent (the first for avocado/orange/ rocket, and the second for black tea) were prepared in an analogous way using 1000 μ L of acetonitrile instead of 1000 μ L of blank extracts. Depending on the dilution factor (1–1000), an injection of 12 μ L of fortified extract corresponded to coextracted matrix of 8–0.008 mg of sample and 800–0.8 pg of each pesticide introduced to the LC-MS systems. In case of tea, the injected amounts were 5-fold less.

Matrix effects (ME) were defined as the percentage by which the response of an analyte in pure solvent is altered through matrix. They were calculated according to the equation:

$$ME = \left(\frac{\text{peak area (fortified extract)}}{\text{peak area (solvent standard)}} - 1\right) \times 100\%$$
(1)

A value of ME = 0% means that no matrix effect occurred. Negative values represent suppressions of the analyte signal, and positive values stand for enhancements induced by matrix.

RESULTS AND DISCUSSION

Influence of Matrix Concentration on Calibration Curves. Matrix concentration refers here to the mass of the extracted test portion divided by the volume of the extraction solvent (acetonitrile). In the case of orange, the matrix concentration of the QuEChERS method is 1 g/mL. An

1476

example of the influence of matrix concentration on the response of analytes is demonstrated in Figure 1. The



Figure 1. Calibration curves of the pesticide flurochloridone in solvent and in orange matrix in the concentration range 0-200 ng/mL. The orange extract was used without dilution and in 10-fold and 100-fold dilution. Slopes were taken from the range of 10-150 ng/mL.

calibration curves of the pesticide flurochloridone obtained from standards in solvent (no matrix effect) and from standards in orange matrix at different matrix concentrations show strong differences in slopes and indicate a significant signal suppression in all investigated matrix-matched standards.

As the slope but not the bias of calibration curves is affected, it can be concluded that the extent of matrix effect does not depend on analyte concentration. For example, the matrix effects calculated for the individual concentration levels of flurochloridone varied in the matrix-matched standard prepared from undiluted blank extract between -83% (at 10 ng/mL) and -79% (at 200 ng/mL). A similar very small variation between matrix effects of individual concentration levels between -56% and -48% or -17% and -14% was observed for the matrix-matched standards prepared from 10-fold or 100fold diluted blank extracts. Figure S-1 in the Supporting Information shows the low variability of matrix effects between the individual concentration levels. On the basis of these results, matrix effects were thereafter calculated from a single concentration level only. This level corresponded to 20 ng/mL (tea) and 100 ng/mL (other samples), respectively. This simplified procedure significantly reduced the number of measurements. Moreover, quadratic calibration curves may in some cases hinder the calculation of matrix effects by slopes.

One further aspect of data presented in Figure 1 should be noted. On the basis of the substantial increase of slope after 10fold dilution compared to the slope of the undiluted matrixmatched standard, the complete disappearance of matrix effects after dilution of matrix by a factor of 100 was expected, but the additional rise of slope was comparable to the rise from undiluted to 10-fold diluted extract only. This is a first hint that a linear relationship does not typically exist between matrix concentration and matrix effect.

Influence of Matrix Concentration on Matrix Effects. The main objective of this work was a systematic study of the dependency of the observed ionization suppression (i.e., the matrix effect) on matrix concentration. If this functional relation between matrix effect and matrix concentration is identified, the calculation of such matrix concentrations will be possible, which either not influences ionization or minimizes matrix effects for all analytes to an acceptable level. If the

Article



Figure 2. (A) Responses of solvent standards (white peaks) and fortified extracts (black peaks) obtained for diuron with 10 dilution factors (DF) in the range from 1 to 1000 on the AB Sciex QTRAP 5500 instrument. The fortification level of diuron into a blank orange extract corresponded to 0.1 mg/kg. Solvent standards were prepared in acetonitrile in corresponding concentrations. (B) Resulting "dilution graph" of diuron with its logarithmic regression line. The arrows mark the dilution factors required for a complete elimination of the matrix effect (ME) and for a minimization to a remaining level of -20% matrix effect. (Note that DF 1 refers to the undiluted extract.)



Figure 3. Categories of dilution graphs depending on the particular chromatographic situation of the analyte. (A) Dilution graph obtained with no or weak matrix effects (here, metazachlor in avocado extract). If no significant coelution with matrix components occurs, a variation of $\pm 20\%$ was noticed. (B) Dilution graph with medium signal suppression, i.e., -20% to -40% matrix effect in the undiluted extract (here, fluazifop-butyl in black tea extract). (C) Dilution graph with large signal suppression, i.e., more than -40% matrix effect with the undiluted sample extract (here, kresoximmethyl in rocket extract).

required dilution does not lower analyte concentrations below the LOQ, a dilute-and-shoot procedure and quantification by standards in solvent will be possible.

To conduct the study, fortified extracts and standards in solvent containing the same analytes at identical concentrations were used. The assay covered matrix effects of 39 pesticides, which were fortified to final QuEChERS extracts of avocado (high oil content), black tea (highly complex and dry), orange (high acid content and highly complex), and rocket (high water and chlorophyll content). Fortified extracts and solvent standards were simultaneously diluted by factors between 2 and 1000. Both standards of identical dilution level were successively injected into the LC-MS/MS system.

Matrix effects were calculated in accordance to eq 1 (see Experimental Section) from the peak areas recorded with standards in acetonitrile and fortified extracts. In the next step, the calculated matrix effects of each pesticide/matrix combination were plotted against the dilution factor. The

approach is shown in Figure 2. This figure presents the data of the herbicide diuron in orange extract as an example. The obtained diagram is called "dilution graph". In this diagram, the dilution factor is given in a logarithmic scale. For diuron on the AB Sciex QTRAP 5500, a matrix effect of -52% was calculated with the undiluted orange extract (i.e., 48% of that intensity, which was recorded in acetonitrile). The first dilution steps (2, 5, 10, and 20) resulted in a decrease of matrix effect, that could be described with a logarithmic function ($y = 39.6 \log_{10}(x) - 52.9$, $R^2 = 0.996$). Stronger dilutions had no further benefit. Obviously, after 20-fold dilution, the matrix concentration fell below a critical value for the appearance of matrix effects.

This study was designed to observe a high number of analytes influenced by matrix effects. In total, 156 pesticide/matrix combinations (39 pesticides \times 4 matrixes) were investigated. In 39 cases, peak area data could not be evaluated, because the dilution resulted too early either in peak areas below a threshold of 1000 counts per second or in an

dx.doi.org/10.1021/ac202661j1 Anal. Chem. 2012, 84, 1474-1482

insufficient signal-to-noise ratio (S/N < 10). At low dilution factors, in some cases, data were excluded due to bad peak shape, presumably caused by signal saturation.

For the remaining 117 pesticide/matrix combinations, three categories of dilution graphs could be distinguished: (i) dilution graphs showing no or weak matrix effects, (ii) dilution graphs with medium signal suppression, and (iii) dilution graphs with large signal suppression. Obviously, 23 pesticide/matrix combinations did not suffer from coelution with a matrix component. The calculated values for matrix effects varied randomly around 0% ME. A typical dilution graph of this first category is shown in Figure 3A. For further 17 pesticide/matrix combinations belonging to the second category, a medium matrix effect between -20% and -40% was calculated for the undiluted extracts. However, the majority of cases, i.e., 77 pesticide/matrix combinations, could be sorted into the category of large matrix effects in the complex matrixes. The signal intensity of pesticides from this category was more than 40% suppressed in undiluted (fortified) sample extracts. Examples of dilution graphs belonging to medium and large signal suppression are presented in Figure 3B,C. In total, 94 of the 117 evaluable pesticide/matrix combinations resulted in medium or large signal suppressions.

The data of pesticide/matrix combinations presented in Figures 2 and 3B,C show a linear relation between the logarithm of dilution factor and matrix effect. Also, for all other 91 pesticide/matrix combinations with considerable matrix effect (2nd and 3rd category), the best coefficients of determination (R^2) were observed when the matrix effect (ME) was correlated with the logarithm of the dilution factor (DF), i.e., ME = $m \times \log_{10}$ (DF) + n. Table 1 presents all of the dilution equations obtained with the AB Sciex QTRAP 5500 instrument.

The strength of matrix effect in the undiluted extract is described by the intercept (n) of the logarithmic dilution function. The range of intercepts is between -30% (terbutryn in rocket) and -100% (MCPA-butotyl in avocado). Smaller intercepts are not found, since data from the first category, i.e., from pesticide/matrix combinations with weak matrix effects are not included. Only in one case (triazophos in orange extract), the correlation gave an undefined result. A discussion of this case follows in the next section, which explains dilution graphs in the event of very strong matrix effects.

The second calculated parameter from dilution functions is the slope (m). This slope describes the mean reduction of matrix effect if an extract is diluted by a factor of 10. In 80% of cases after such dilution, 25-45% less suppression was observed with the AB Sciex QTRAP 5500 (range between 90th and 10th percentile). For pesticide/matrix combinations with large matrix effects, a tendency to steeper slopes was observed. That means weak suppressions are normally more persistent against dilution.

The coefficients of determination R^2 varied for all tabulated regressions in Table 1 from 0.842 to 0.999. Consequently, it can be summarized that above a critical matrix concentration a logarithmic function between matrix effect and matrix concentration (or dilution) is confirmed for the AB Sciex QTRAP 5500.

Compared to the most recent systematic study of matrix effects presented by Kruve et al.,²² this result was not expected. On the basis of their results, Kruve proposed a linear instead of a logarithmic correlation between matrix concentration and suppression. Eventually, the limited extent of Kruve's assay,

which was restricted to five analytes, five matrixes, and a smaller dilution range (DF \leq 20) may explain the discrepancy between both findings. Two other systematic studies covering at least 10 levels of matrix concentration supported our result. Ohlenbusch et al.²³ studied the influence of humic acid dissolved in water samples on the signal intensity of 2-naphthoic acid. Their data better correspond to a logarithmic dependency. Sagava et al.²⁴ studied the matrix effects of a rice medium on the response of six mycotoxins. As in our study, dilution graphs with logarithmic scale were used and their diagrams look very similar to ours. However, the latter two studies did not investigate a large number of analyte/matrix combinations.

To get more clarity whether spray geometry and instrument design may influence the observed correlation between matrix effect and matrix concentration, parts of our study were repeated in a second laboratory with a different type of tandem mass spectrometer. For this independent study, an Agilent 6460A Triple Quadrupole mass spectrometer equipped with a Jet Stream ESI source was used. Aliquots of the identical extracts of black tea and orange were fortified with the identical 39 pesticides at the same level. The same 10 dilution factors were applied. Also, the identical chromatographic column and the same method were used to ensure that the pesticides coelute with the identical matrix components. As noticed in the first series with the AB Sciex instrument, the response of about 40% of pesticides was not seriously influenced by matrix or could not be detected with the needed sensitivity, but in 45 cases, the dependence of signal suppression on dilution could be evaluated. Table S-3 in the Supporting Information presents the logarithmic functions obtained with the second mass spectrometer in comparison to the AB Sciex instrument.

The range of meaningful intercepts for the Agilent instrument in Table S-3 of the Supporting Information is between -33% (diazinon in orange) and -94% (myclobutanil in orange). Again, triazophos did not give a meaningful result (expected suppression of 123% without dilution). With the Agilent instrument, a 10-fold dilution resulted in 29–52% less suppression for 80% of cases (range between 90th and 10th percentile). However, the most important aspect was the coefficient of determination R^2 . This parameter varied from 0.905 to 1.000 and indicated again a very good correlation between matrix effect and the logarithm of concentration (dilution factor). Therefore, the independent study with the Agilent 6460A supported the conclusions derived from measurements with the QTRAP 5500 and demonstrated a low influence of the instrument platform used.

Dilution Graphs in the Event of Very Strong Matrix Effects. As mentioned before, for triazophos in orange, an impossible signal suppression of >100% was calculated from the dilution graphs presented in Tables 1 and S-3 of the Supporting Information. With the Agilent 6460A, similar intercepts <-100% were also calculated for azoxystrobin and flurochloridone in orange extract. A very simple explanation exists for these results. Near the highest possible signal suppression of ME = -100%, i.e., near the disappearance of analyte signals, the logarithmic functions must level off. Any further enhancement of matrix concentration cannot have an influence on signal intensity. Therefore, dilution graphs follow S-shaped curves in the case of very strong signal suppressions. As an example, the dilution graph of triazophos in orange obtained with the Agilent instrument is shown in Figure 4.

"Dilute-and-Shoot": The Required Dilution of QuECHERS Extracts. The data presented in the previous

Article

		11901	- (22)																			
				AVOC	SADO				BLACK	TEA				OR	ANGE				ROC	KET		
ANALYTE	retention time (min)	dilutior m (%)	n function n (%)	R	dilutio no ME	n factor for ME of -20%	dilution m (%)	function n (%)	R²	dilution no ME	factor for ME of -20%	dilutior m (%)	functior n (%)	R	dilutio no MI	n factor for E ME of -20%	dilution m (%)	function n (%)	R²	dilution no ME	factor for ME of -20%	
methamidophos	1.50	N/A MF	too	keak			N/A N/A					30.4 N/A	-69.6	0.979	195	43	N/A N/A					
cyromazine	2.36	NA	8	NOOM	_		30.1	-53.7	0.969	61	13	NIA					N/A		_			
oxydemeton-methyl chlorthiamid	3.78 7.03	ME	too	weak			35.0 N/A	-66.5	0.976	62	21	ME	too	weak			ME	too	weak			
aldicarb	7.76	N/A					N/A					N/A					42.3	-53.5	0.977	18	9	
carbaryl	9.52	N/A	_				37.4	-60.6	0.992	42	12	37.4	-54.3	0.998	28	8	32.3	-67.9	0.994	127	30	
monolinuron	9.72	ME	too 1	weak	. 3	, č	39.3	-59.3	0.995	32	10	32.7	-39.7	0.989	16	4 4	32.6	-63.3	0.983	87	21	
atrazina	10.10	2.10	- 37.0	0.860	5 8	47	21.2	63.1	0 086	105	VC VC	27.2	-000-	0.078	44	+ +	0.00	10.01-	0.070	3 52	20	
metazachlor	10.24	ME	-37.0	weak	3.	Ŧ,	26.8	-51.0	0.972	80	14	35.6	47.9	0.994	1 8	2 9	38.6	-12.1	0.980	34	10	
simetryn	10.25	ME	too	weak			38.5	-55.2	0.992	27	8	35.6	-47.1	0.992	21	9	43.0	-62.5	0.987	28	10	
propachlor	10.30	ME	too	weak			36.3	-52.6	0.990	28	8	33.4	-43.4	0.990	20	5	39.8	-60.8	0.989	34	11	
isoproturon	10.43	26.2	-34.8	0.849	21	4	N/A					36.4	-48.3	0.993	21	9	N/A					
diuron	10.68	41.9	-54.1	0.967	20	7	37.9	-59.5	0.998	37	11	39.6	-52.9	0.996	22	7	35.5	-69.1	0.983	88	24	
azoxystrobin	11.25	ME	too	weak		•••	18.1	-37.6	0.993	119	6	32.7	-95.3	0.990	821	201	16.7	-33.6	0.991	103	7	
malathion	11.76	26.4	-34.3	0.848	20	e	21.5	-41.1	0.968	82	10	33.8	-55.8	0.996	45	11	42.1	-78.6	0.958	74	25	
myclobutanil	11.86	ME	too	weak			21.1	-34.9	0.996	45	5	25.8	-53.0	0.984	113	19	31.4	-61.7	0.968	92	21	
flurochloridone	11.94	33.8	-45.0	0.842	21	5	30.1	-48.4	0.992	40	6	35.8	-96.6	0.996	323	98	38.2	-78.4	0.981	113	34	
triazophos	12.01	33.0	-43.2	0.852	20	Q	26.3	-46.7	0.998	09	Q ,	35.9	-114.1	0.994	1508	418	33.7	-66.1	0.968	92	23	
teroutryn	12.32	H/N					20.2	-22.0	0.884	4	4	AIN					14.0	0.82-	0.9/3	071	0	
EPTC	12.64	ANA 202		0.000		07	A/A	0.01		6	c,	N/A		1000	100	L	N/A	0.00	0000	â		
nesoxiii-iileuiyi penconazole	12.82	45.2	-70.9	0.945	37 6	0 61	30.7	-63.1	0.989	114	25	31.3	-292-	0.994	671	15	42.1	-00.9	0.987	99	⁴	
imazalil	12.96	N/A					N/A					25.8	-36.9	0.996	27	5	N/A					
diazinon	12.99	43.8	-67.4	0.913	35	12	N/A					29.0	-45.0	0.999	36	7	34.8	-66.3	0.978	80	21	
hexaconazole	13.13	40.1	-56.5	0.966	26	80	17.6	-37.8	0.969	141	10	ME	too	weak			33.1	-68.8	0.995	120	30	
bitertanol	13.25	ME	too	weak			ME	too	weak			ME	too	weak			N/A				-3	
pirimiphos-methyl	13.26	37.4	-68.1	0.958	99	19	37.7	-58.1	0.998	35	10	ME	too	weak	,		40.1	-85.3	0.996	134	43	
pyrazophos	13.37	56.6	-60.1	0.916	12	5	N/A					WE	too	weak			41.5	-54.7	0.984	21	7	
MCPA-butotyl	13.74	48.8	-99.7	0.975	110	43	27.2	-45.3	0.977	46	6	ME	too	weak			43.1	-73.2	0.993	50	17	
fluazifop-butyl	13.86	42.6	-93.0	0.989	152	51	23.7	-39.6	0.991	47	7	ME	too	weak			27.7	-56.2	0.988	107	20	
butylate	13.8/	A/A					N/A					N/A					NIA					
profenofos	13.87	35.1	-95.1	0.965	512	138	30.0	-47.1	0.998	37	ω Γ	MM	too too	weak			31.5	-60.8	0.985	85	20	
phopaquizatop	14.53	55.5	-02.6	0.960	47	£ 6	25.2	-37.3	0.980	30	2 נ			weak			33.7	517	0 082	89	17	
deltamethrin	15.42	34.8	-92.0	0.989	440	117	N/A			3		W	too	weak			37.3	-44.1	0.988	15	4	
tau-fluvalinate	15.87	35.1	-76.0	0.953	150	40	15.6	-32.5	0.956	121	9	ME	too	weak			53.8	-49.5	0.998	8	4	
bifenthrin	17.42	N/A					N/A					24.5	-30.0	0.973	17	3	26.0	-52.0	0.996	100	17	

Article

Ergebnisse

dx.doi.org/10.1021/ac202661j1 Anal. Chem. 2012, 84, 1474-1482

 a N/A: Function not available, because <4 points for regression.

1479



Figure 4. S-shaped dilution graph observed for very strong signal suppressions (here, triazophos in orange extract). Note the absent fit of correlation in the region of the first dilution steps (dilution factors 1 to 5).

section have shown that usually 25–50% less signal suppression of pesticides was observed after a 10-fold dilution of final QuEChERS extracts. Nevertheless, it would be more helpful to know which dilution of sample will not produce any matrix effect if the standard QuEChERS extraction is used.

The corresponding "no-effect" matrix concentration mainly depends on the matrix type and the retention time of the analyzed pesticides. Consequently, for each pesticide/matrix combination, an individual no-effect matrix concentration exists. This concentration can be estimated from the dilution graphs presented in Figures 2 and 3. It results from the intersection point between the logarithmic regression function and the horizontal line corresponding to 0% matrix effect.

The complete elimination of matrix effects is desirable, but the required dilution may shift the needed LOQ to an unacceptable level. In routine analysis, it may be sufficient to avoid more than 20% error by dilution. Also, the dilution factor required to fulfill this demand can be estimated from dilution graphs. In that case, the intersection point between the regression function and a horizontal line corresponding to -20% matrix effect is used.

On the basis of the tabulated logarithmic equations, it was calculated how much QuEChERS extracts have to be diluted (i) to eliminate signal suppressions completely and (ii) to reduce signal suppressions to a remaining effect of $\leq -20\%$. Both data are given for each pesticide/matrix combination in Tables 1 and S-3 of the Supporting Information. As expected, the required dilution factors are very different for the studied pesticide/matrix combinations. For instance, for the orange extract at the retention time of monolinuron (9.7 min), a dilution factor of 16 was sufficient to eliminate the signal suppression, whereas for the same orange extract at the retention time of triazophos (12.0 min) a dilution factor of 1508 would be required with the QTRAP 5500 instrument.

The benefit of different dilution factors is summarized in Table 2. To avoid matrix effects for all 39 investigated pesticides, the extracts of rocket and black tea must be diluted by a factor of 200. The extract of avocado requires a dilution factor of 1000, and the extract of orange requires even more than 1000 times dilution. With less dilution, matrix effects cannot be completely avoided. Such extreme extract dilution is not applicable. A general dilution factor seems also not appropriate if suppression up to 20% is accepted. To Article

Table 2. Benefit of Different Dilution Factors Given as the Percentage of the Evaluable Analytes (n) That Were Free of Matrix Effects after Extract Dilution (Data from AB Sciex QTRAP 5500)

dilution factor	avocado (%) ^{a}	black tea $(\%)^b$	orange $(\%)^c$	rocket $(\%)^d$
undiluted	31	4	38	3
2	31	4	38	3
5	31	4	38	3
10	31	4	38	7
20	41	4	50	17
50	72	58	78	37
100	79	77	81	77
200	93	100	91	100
500	97	100	94	100
1000	100	100	97	100
$a_n = 29. b_n =$	26. $^{c}n = 32.$ d	n = 30.		

accomplish this also for triazophos in extracts of orange, a dilution by a factor \sim 420 will be required. Such high dilution enhances the LOQ for triazophos to about 0.05 mg/kg if the QTRAP 5500 is used. Consequently, it is not possible to propose a general dilution factor which is applicable on all pesticide/matrix combinations.

Nevertheless, dilute-and-shoot may be a successful approach for the majority of pesticides. As the data in Table 2 show, more than 75% of pesticides were completely free of matrix effects in all four sample extracts after a 100-fold dilution. If a matrix effect of up to 20% is accepted, a 25-fold dilution will be sufficient even in matrixes which cause strong effects. The only difficulty is to distinguish between a less affected pesticide, which will need only moderate dilution to minimize its matrix effect, and a pesticide requiring such high dilution that the LOQ (after dilution) exceeds the MRL or tolerance.

An appropriate method to get this knowledge is postcolumn infusion of some reference compounds. Such infusion allows the estimation of matrix effects during chromatographic runs. Figure 5 illustrates the potential of postcolumn infusion. The figure shows in the upper trace matrix effect profiles measured with postcolumn infusion after injection of blank matrix and in the lower trace chromatographic peaks of two injections of some pesticides. The two injections are made with identical concentrations of pesticides fortified into acetonitrile and into a blank extract of orange. The ratio of peak intensities in the lower trace is a common measure of matrix effects. As expected, the obtained peak ratios for azoxystrobin, triazophos, kresoximmethyl, and profenofos agreed very well with the suppression recorded by postcolumn infusion. Really striking is the similarity of the matrix effect profiles of all four pesticides. In an earlier study,³⁹ it could be shown that this is the typical case in the positive ESI mode. The majority of pesticides show very similar matrix effects if they coelute with the same matrix component. Consequently, the profiles of few reference compounds, which are not present in samples, are sufficient to identify the regions in chromatograms without extreme matrix effects. In Figure 5, these regions are 1.9-10.4 and 13.2-28.0 min. Only if analytes elute between 10.4 and 13.2 min, it cannot be expected that a moderate dilution will be sufficient.

With some experience, matrix effect profiles furthermore allow one to divide chromatograms into time intervals according to the strength of the required dilution factor. Table 3 presents the dilution factors that were needed for the



Figure 5. Matrix effects of the four analytes azoxystrobin, triazophos, kresoxim-methyl, and profenofos obtained with an undiluted QuEChERS extract of an orange (A) given for the whole measurement time as "matrix effect profiles" from the determination with postcolumn infusion, (B) given only for the respective retention time of the analyte (1-4) as the response difference of 67 ng/mL standard in acetonitrile (white peaks) and in orange matrix (black peaks). All signal intensities were normalized to the responses of solvent standards.

Table 3. Required Dilution Factors for Reduction of Matrix Effects (ME) Depending on the Initial Extent of Matrix Effects (Summary of Table 1)

	required dil	ution factor for	
initial extent of matrix effect $(\%)^a$	no ME	$ME \le -20\%$	n ^b
-30 to -40	17-142	3-10	15
-40 to -50	8-81	4-10	16
-50 to -60	12-193	5-20	23
-60 to -70	29-127	10-31	19
-70 to -80	32-149	13-40	10
-80 to -99	47-1511	20-418	10
a- a	h h		

^{*a*}Data from AB Sciex QTRAP 5500. ^{*b*}n: number of pesticides with observed ME to the initial extent.

AB Sciex QTRAP 5500 in dependence from the degree of matrix effect. If, for instance, a dilution of final QuEChERS extracts by a factor of 40 is possible with the mass spectrometer, it is apparent from Table 3 that the signal suppressions of pesticides are minimized to an acceptable level in all chromatogram regions with matrix effects of up to -80%. However, if the mass spectrometer offers due to low sensitivity only a dilution factor of 10, for all pesticides in chromatogram regions with up to -50% matrix effect, dilute-and-shoot is a successful approach. On the Agilent instrument, slightly lower dilutions (see Table S-3 of the Supporting Information) were needed. Thus, postcolumn infusion in combination with a carefully defined dilution factor of the mass spectrometer may avoid the use of more laborious quantification procedures like standard addition. However, for such analytes, which are detected with low sensitivity, the necessary dilution of extracts may hinder the enforcement of the lowest MRLs (tolerances). Compared to EU MRLs, this was noticed for 18% of the studied 39 pesticides (acephate, aldicarb, butylate, chlorthiamid, cyromazine, EPTC, and methamidophos).

CONCLUSIONS

The presence of sample matrix in the extracts may cause significant suppression of the response of analytes. The extent of these matrix effects depends on the logarithm of matrix concentration. Two-fold or 3-fold dilution does not cause a significant improvement due to this logarithmic relationship. In the case of extracts obtained by the QuEChERS method, suppressions between 25% and 50% may be eliminated by 10fold dilution. For several analyte/matrix combinations, such reduction of matrix effect may not be sufficient, but to double the effect of a 10-fold dilution, a 100-fold is required. Consequently, a complete elimination of all matrix effects by dilution of QuEChERS extracts seems not possible with the sensitivity of instruments available at present. Nevertheless, the moderate dilution of extracts (dilution factors of 25-40) may result in an acceptable accuracy of quantitative results of many analytes, which are significantly suppressed in undiluted extracts. The selection between analytes, which require not more than moderate dilution and the other stubborn cases, is possible by postcolumn infusion of some reference compounds. Using the additional information provided by postcolumn infusion, in most cases, dilution may replace standard addition or other laborious measures to compensate for matrix effects.

To reduce strong matrix effects by improved cleanup may require more than 99% elimination of extracted sample constituents. A 100-fold dilution seems to be the more simple approach. The design of ESI sources may slightly influence the magnitude of signal suppression but not the principal relationship between matrix effect and matrix concentration.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Additional information as noted in text. This material is available free of charge via the Internet at http://pubs.acs.org.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author *E-mail: helen.stahnke@bfr.bund.de. Fax: +49-30-18412-3685.

ACKNOWLEDGMENTS

H.S. and L.A. gratefully acknowledge the financial support by Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, Bonn, Germany; project AL 971/1-1).

REFERENCES

 Guilbault, G. G.; Hjelm, M. Pure Appl. Chem. 1989, 61, 1657.
 Van De Steene, J. C.; Mortier, K. A.; Lambert, W. E. J. Chromatogr., A 2006, 1123, 71-81.

(3) Mei, H.; Hsieh, Y.; Nardo, C.; Xu, X.; Wang, S.; Ng, K.; Korfmacher, W. A. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003, 17, 97-103.
(4) Villagrasa, M.; Guillamón, M.; Eljarrat, E.; Barceló, D. J. Chromatogr., A 2007, 1157, 108-114.

(5) Ismaiel, O. A.; Halquista, M. S.; Elmamly, M. Y.; Shalaby, A.; Karnes, H. T. *J. Chromatogr.*, B **200**7, 859, 84–93.

(6) Sojo, L. E.; Lum, G.; Chee, P. Analyst 2003, 128, 51-54.

(7) Zhang, K.; Wong, J. W.; Yang, P.; Tech, K.; DiBenedetto, A. L.;

Lee, N. S.; Hayward, D. G.; Makovi, C. M.; Krynitsky, A. J.; Banerjee, K.; Jao, L.; Dasgupta, S.; Smoker, M. S.; Simonds, R.; Schreiber, A. J.

Agric. Food Chem. **2011**, 59, 7636–7646. (8) Matuszewski, B. K. J. Chromatogr., B **2006**, 830, 293–300.

(9) Sulyok, M.; Krska, R.; Schuhmacher, R. Food Addit. Contam. 2007, 24, 1184–1195.

(10) Choi, B. K.; Gusev, A. I.; Hercules, D. M. Anal. Chem. 1999, 71, 4107-4110.

dx.doi.org/10.1021/ac202661j | Anal. Chem. 2012, 84, 1474-1482



(11) Bonfiglio, R.; King, R. C.; Olah, T. V.; Merkle, K. Rapid Commun. Mass Spectrom. 1999, 13, 1175–1185.

(12) Bruins, A. P. J. Chromatogr., A 1998, 794, 345–357.
(13) Hajšlová, J.; Zrostlíková, J. J. Chromatogr., A 2003, 1000, 181– 197.

(14) Taylor, P. J. Clin. Biochem. 2005, 38, 328-334.

(15) Antignac, J.-P.; de Wasch, K.; Monteau, F.; De Brabander, H.;

Andre, F.; Le Bizec, B. Anal. Chim. Acta 2005, 529, 129-136. (16) Niessen, W. M. A.; Manini, P.; Andreoli, R. Mass Spectrom. Rev.

2006, 25, 881-899.

(17) Côté, C.; Bergeron, A.; Mess, J.-N.; Furtado, M.; Garofolo, F. Bioanalysis 2009, 1, 1243-1257.

(18) Van Eeckhaut, A.; Lanckmans, K.; Sarre, S.; Smolders, I.; Michotte, Y. J. Chromatogr., B 2009, 877, 2198-2207.

(19) Gosetti, F.; Mazzucco, E.; Zampieri, D.; Gennaro, M. C. J. Chromatogr., A 2010, 1217, 3929-3937.

(20) Trufelli, H.; Palma, P.; Famiglini, G.; Cappiello, A. Mass Spectrom. Rev. 2011, 30, 491-509.

(21) Lehotay, S. J.; Mastovska, K.; Lightfield, A. R.; Gates, R. A. J. AOAC Int. 2010, 93, 355-367.

(22) Kruve, A.; Leito, I.; Herodes, K. Anal. Chim. Acta 2009, 651, 75 - 80

(23) Ohlenbusch, G.; Zwiener, C.; Meckenstock, R. U.; Frimmel, F. H. J. Chromatogr, A 2002, 967, 201–207. (24) Sagawa, N.; Takino, T.; Kurogochi, S. Biosci. Biotechnol. Biochem.

2006, 70, 230-236.

(25) Admescope Home Page. http://www.admescope.com/2010/

12/sample-type-sample-preparation-and.html (accessed Oct 7, 2011). (26) Ibanez, M.; Sancho, J. V.; Hernández, F. Anal. Chim. Acta 2009, 649, 91-97.

(27) Trebstein, A.; Lauber, U.; Humpf, H.-U. Mycotoxin Res. 2009, 25, 201-213.

(28) García-Valcárcela, A. I.; Tadeo, J. L. Anal. Chim. Acta 2009, 641, 117-123.

(29) Gómez, M. J.; Malato, O.; Ferrer, I.; Agüera, A.; Fernández-Alba, A. R. J. Environ. Monit. 2007, 9, 718-729.

(30) Lee, H.-B.; Peart, T. E.; Svoboda, M. L. J. Chromatogr., A 2007, 1139, 45-52.

(31) Hernando, M. D.; Suárez-Barcena, J. M.; Bueno, M. J. M.; Garcia-Reyesa, J. F.; Fernández-Alba, A. R. J. Chromatogr., A 2007, 1155, 62-73.

(32) Choi, B. K.; Hercules, D. M.; Gusev, A. I. J. Chromatogr., A 2001, 907, 337-342.

(33) Wang, S.; Cyronak, M.; Yang, E. J. Pharm. Biomed. Anal. 2007, 43, 701-707.

(34) Anastassiades, M.; Lehotay, S. J.; Stajnbaher, D.; Schenck, F. J. J. AOAC Int. 2003, 86, 412-431.

(35) Lehotay, S. J.; Mastovska, K.; Lightfield, A. R. J. AOAC Int. 2005, 88, 615-629.

(36) Paya, P.; Anastassiades, M.; Mack, D.; Sigalova, I.; Tasdelen, B.; Oliva, J.; Alberto Barba, A. Anal. Bioanal. Chem. 2007, 389, 1697-1714.

(37) European Standard EN 15662:2008. Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS (/MS) following acetonitrile extraction/partitioning and cleanup by dispersive SPE - QuEChERS method. Beuth Verlag GmbH, Berlin-Wien-Zürich, Burggrafenstraße 6, 10787 Berlin, Germany, 2008.

(38) Kittlaus, S.; Schimanke, J.; Kempe, G.; Speer, K. J. Chromatogr., A 2011, 1218, 8399-8410.

(39) Stahnke, H.; Reemtsma, T.; Alder, L. Anal. Chem. 2009, 81, 2185-2192.

dx.doi.org/10.1021/ac202661j | Anal. Chem. 2012, 84, 1474-1482

Article



Table of Contents

Table S-1.	ESI source parametersS-2
Table S-2.	Analyte specific MS parameters for AB Sciex QTRAP 5500 instrumentS-2
Figure S-1.	Variability of matrix effects for five individual calibration levels of flurochloridone in orange matrix in the concentration range 0-200 ng/mL (data from Figure 1)S-3
Figure S-2.	Relation between matrix effect and amount of coextracted matrix injected into the LC-ESI-MS/MS system (refers to Figures 1-4)S-3
Table S-3.	$\label{eq:comparison} \begin{array}{l} \mbox{Comparison of dilution functions and required dilution factors obtained with two different instruments (AB Sciex QTRAP 5500 vs. Agilent 6460A QqQ)S-4 \end{array}$
Figure S-3.	Comparison of dilution graphs of 32 pesticide/matrix combinations from a fortified orange extract obtained with two instruments (AB Sciex QTRAP 5500 vs. Agilent 6460A QqQ)S-5

Table S-1.ESI source parameters

Turbo V Sourc AB Sciex QTRAP	e 5500	Jet Stream So Agilent 6460A	urce QqQ
polarity	positive	polarity	positive
ion spray voltage	5.5 kV	capillary	3.5 kV
		nozzle voltage	300 V
nebulizer gas	40 psi	nebulizer gas	45 psi
heater gas	40 psi	sheath gas flow	12 L/min
heater gas temperature	400 °C	sheath gas temperature	375 ℃
curtain gas	40 psi	drying gas flow	7 L/min
		drying gas temperature	250 ℃

Table S-2. Analyte specific MS parameters for AB Sciex QTRAP 5500 instrument

pesticide	retention time (min)	precursor ion	Q1 mass (amu)	Q3 mass (amu)	declustering potential (V)	entrance potential (V)	collision energy (V)	collision cell exit potential (V)
acephate	1.75	$[M+H]^+$	184.1	124.9	46	10.0	25	3.1
aldicarb	7.76	$[M+NH_4]^+$	208.1	89.1	41	7.0	21	2.9
atrazine	10.19	[M+H] ⁺	216.1	174.0	61	11.0	25	3.4
azoxystrobin	11.25	[M+H] ⁺	404.1	371.9	76	9.5	19	4.4
bifenthrin	17.42	$[M+NH_4]^+$	440.1	181.2	76	7.0	21	3.4
bitertanol	13.25	$[M+H]^+$	338.2	70.0	41	8.5	25	2.9
butylate	13.87	[M+H] ⁺	218.2	57.1	106	12.0	29	2.8
carbaryl	9.52	$[M+H]^+$	202.1	144.9	51	10.0	15	3.2
chlorpyrifos	14.53	[M+H]⁺	349.9	96.9	61	11.0	41	3.0
chlorthiamid	7.03	[M+H] ⁺	205.9	118.9	76	10.5	55	3.1
cyromazine	2.36	[M+H] ⁺	167.1	125.0	86	8.5	25	3.1
deltamethrin	15.42	$[M+NH_4]^+$	522.9	280.7	56	10.5	23	3.9
diazinon	12.99	[M+H] ⁺	305.1	169.1	61	11.0	29	3.3
diuron	10.68	$[M+H]^+$	233.0	72.0	106	9.5	31	2.9
EPTC	12.64	$[M+H]^+$	190.1	128.1	101	10.5	15	3.1
fluazifop-butyl	13.86	[M+H] ⁺	384.1	282.1	91	9.0	27	3.9
flurochloridone	11.94	$[M+H]^+$	312.0	291.9	101	12.0	29	4.0
hexaconazole	13.13	$[M+H]^+$	314.1	70.1	76	10.5	39	2.9
imazalil	12.96	[M+H] ⁺	297.0	158.9	66	11.5	31	3.3
isoproturon	10.43	[M+H] ⁺	207.1	165.2	86	10.5	19	3.3
kresoxim-methyl	12.70	[M+H] ⁺	314.1	115.9	56	10.0	21	3.1
malathion	11.76	[M+H] ⁺	331.0	127.0	66	10.0	17	3.1
MCPA-butotyl	13.74	$[M+NH_4]^+$	318.1	227.0	46	5.0	17	3.6
metazachlor	10.24	$[M+H]^+$	278.1	210.1	41	9.5	15	3.6
methamidophos	1.50	[M+H] ⁺	142.0	124.9	66	12.0	19	3.1
monolinuron	9.72	$[M+H]^+$	215.1	125.9	101	8.5	25	3.1
myclobutanil	11.86	[M+H]⁺	289.1	70.1	76	12.0	33	2.9
oxydemeton-methyl	3.78	[M+H] ⁺	247.0	169.0	61	12.0	19	3.3
penconazole	12.82	$[M+H]^+$	284.1	158.9	81	10.0	39	3.3
pirimicarb	9.90	$[M+H]^+$	239.1	72.1	56	7.0	31	2.9
pirimiphos-methyl	13.26	[M+H] ⁺	306.1	164.1	66	11.5	29	3.3
profenofos	13.87	$[M+H]^+$	372.9	302.9	96	10.0	25	4.0
propachlor	10.30	$[M+H]^+$	212.1	170.0	76	10.0	21	3.4
propaquizafop	14.13	[M+H] ⁺	444.1	299.1	116	9.5	31	4.0
pyrazophos	13.37	$[M+H]^+$	374.1	222.1	101	10.0	29	3.6
simetryn	10.25	$[M+H]^+$	214.1	124.2	71	10.5	27	3.1
Tau-fluvalinate	15.87	$[M+NH_4]^+$	520.1	208.1	71	11.0	23	3.5
terbutryn	12.32	$[M+H]^+$	242.1	186.1	61	11.5	25	3.4
triazophos	12.01	$[M+H]^+$	314.0	119.1	76	12.0	47	3.1



Figure S-1. (A) Variability of matrix effects for five individual calibration levels of flurochloridone in orange matrix in the concentration range 0-200 ng/mL. The orange was used without dilution (\bullet) and in 10-fold (\bullet) and 100-fold (\blacksquare) dilution. (B) Mean matrix effect and its variation. Data are taken from Figure 1.



Figure S-2. Relation between matrix effect and amount of co-extracted matrix injected into the LC-ESI-MS/MS system. (A) metazachlor in avocado, (B) fluazifop-butyl in black tea, (C) kresoximmethyl in rocket, (D) flurochloridone in orange, (E) diuron in orange, and (F) triazophos in orange. The corresponding (logarithmic) dilution graphs are presented in Figures 3A, 3B, 3C, 1, 2, and 4, respectively.

Table S-3. Comparison of dilution functions ($y = m \cdot \log_{10}(x) + n$) and required dilution factors obtained with two different instruments (AB Sciex QTRAP 5500 vs. Agilent 6460A QqQ)

			AB Sciex	QTRAP 55	00			Agilent 6	460A QqQ			
		retention	dilution fu	nction		dilution fa	actor for	dilution fu	unction		dilution fa	ctor for
analyte	matrix	time (min)	m (%)	n (%)	Вž	no ME	ME of -20%	m (%)	n (%)	В²	no ME	ME of -20%
methamidophos	orange	1.50	30.4	-69.6	0.979	195	43	30.9	-49.5	0.961	31	7
monolinuron	black tea	9.72	39.3	-59.3	0.995	32	10	50.0	-68.4	0.973	23	6
atrazine	orange	10.19	42.5	-66.4	0.994	44	13	50.5	-63.3	0.986	18	7
atrazine	black tea	10.19	31.2	-63.1	0.986	105	24	45.4	-70.7	0.972	36	13
metazachlor	orange	10.24	35.6	-47.9	0.994	22	6	33.7	-41.0	0.944	16	4
metazachlor	black tea	10.24	26.8	-51.0	0.972	80	14	48.2	-56.8	0.992	15	9
simetryn	black tea	10.25	38.5	-55.2	0.992	27	ø	46.9	-44.9	0.985	6	e
propachlor	orange	10.30	33.4	-43.4	066.0	20	5	33.4	-39.9	0.911	16	4
propachlor	black tea	10.30	36.3	-52.6	0.990	28	8	54.0	-56.3	0.990	1	5
diuron	orange	10.68	39.6	-52.9	0.996	22	7	35.3	-40.1	0.905	14	4
azoxystrobin	orange	11.25	32.7	-95.3	0.990	821	201	52.3	-104.7	0.993	100	41
azoxystrobin	black tea	11.25	18.1	-37.6	0.993	119	6	37.4	-46.2	0.980	17	5
malathion	orange	11.76	33.8	-55.8	0.996	45	11	46.1	-78.7	0.979	51	19
malathion	black tea	11.76	21.5	-41.1	0.968	82	10	30.9	-37.2	0.978	16	4
myclobutanil	orange	11.86	25.8	-53.0	0.984	113	19	40.9	-94.0	0.997	198	64
myclobutanil	black tea	11.86	21.1	-34.9	0.996	45	5	40.9	-54.2	0.990	21	7
flurochloridone	orange	11.94	35.8	-96.6	0.996	323	98	40.8	-114.3	0.989	635	205
flurochloridone	black tea	11.94	30.1	-48.4	0.992	40	9	51.4	-63.0	0.996	17	7
triazophos	orange	12.01	35.9	-114.1	0.994	1508	418	51.9	-122.9	0.994	234	96
triazophos	black tea	12.01	26.3	-46.7	0.998	60	10	37.4	-49.2	0.976	21	9
terbutryn	black tea	12.32	20.2	-32.5	0.994	41	4	31.7	-38.3	0.974	16	4
kresoxim-methyl	orange	12.70	35.6	-75.1	0.991	129	35	48.8	-70.6	0.993	28	1
kresoxim-methyl	black tea	12.70	48.3	-73.0	0.983	32	13	38.9	-49.5	0.990	19	9
penconazole	orange	12.82	31.3	-56.5	0.994	64	15	39.2	-61.2	0.991	37	11
penconazole	black tea	12.82	30.7	-63.1	0.989	114	25	43.5	-71.7	0.993	45	15
diazinon	orange	12.99	29.0	-45.0	0.999	36	7	25.9	-33.3	0.937	19	ი
hexaconazole	black tea	13.13	17.6	-37.8	0.969	141	10	45.2	-61.6	0.996	23	8
pirimiphos-methyl	black tea	13.26	37.7	-58.1	0.996	35	10	51.6	-62.3	0.996	16	7
fluazifop-butyl	black tea	13.86	23.7	-39.6	0.991	47	7	39.7	-54.7	0.996	24	7
profenofos	black tea	13.87	30.0	-47.1	0.998	37	8	42.3	-55.9	0.967	21	7
propaquizafop	black tea	14.13	18.6	-38.4	0.962	116	10	41.2	-67.0	0.995	42	14
chlorpyrifos	black tea	14.53	25.2	-37.3	0.980	30	5	50.2	-61.1	1.000	17	7
bifenthrin	orange	17.42	24.5	-30.0	0.973	17	ო	27.5	-39.8	0.962	28	5

Instrument dependence of dilution factors. For 33 pesticide/matrix combinations in the retention time range 1.5–17.4 min logarithmic dilution functions could be determined on both mass spectrometers and were compared to each other. Differences appeared in intercept and in slope. On average the dilution functions of the Agilent 6460A QqQ with the Jet Stream ESI source had slightly higher slopes (factor 1.4) compared to the AB Sciex QTRAP 5500. The differences in intercept cancelled each other out (factor 1.1).

















S-10



S-11



S-12

3.3 Der Einfluss des Quellendesigns auf Matrixeffekte

Der Inhalt dieses Kapitels wurde als "Special Feature: Tutorial" zusammen mit einem kurzen Vorwort der Redaktion veröffentlicht in:

Helen Stahnke, Stefan Kittlaus, Günther Kempe, Christlieb Hemmerling, Lutz Alder, "The influence of electrospray ion source design on matrix effects", *Journal of Mass Spectrometry*, **2012**, *47 (7)*, 875-884.

Kurzprofil der Publikation

In der Arbeit wurde untersucht, ob das Design von Elektrospray-Ionenquellen deren Anfälligkeit für Matrixeffekte beeinflusst. Die Untersuchungen wurden mit fünf verschiedenen Elektrospray-Ionenquellen und erstmals nicht mit der konventionellen Methode, sondern mittels Nachsäuleninfusion einer Analytlösung durchgeführt. Bei positiver Ionisierung wurde kein Einfluss der Spraygeometrie (off-axis, orthogonal oder doppelt-orthogonal) auf Matrixeffekte festgestellt. Die Arbeit kommt damit zu einem anderen Schluss als in der Literatur zum Teil vertreten wird.

Abgrenzung des Eigenanteils

Die Literaturrecherche, die Festlegung des Versuchsdesigns, die Probenahme, die Herstellung der verwendeten Matrixextrakte sowie die Bereitstellung der verwendeten HPLC-Säulen erfolgten bei allen Messungen durch mich. Alle Messungen am API 2000 und die Messungen an der QTrap 3200 wurden allein von mir durchgeführt. Die Messungen am Quattro LC erfolgten unter meiner praktischen Anleitung in Kooperation mit Herrn Dr. Christlieb Hemmerling und Frau Astrid Maye am Landeslabor Berlin-Brandenburg. Die Messdaten vom 6460A Triple Quadrupol Massenspektrometer stammen aus einer Kooperation mit der Landesuntersuchungsanstalt für das Gesundheits- und Veterinärwesen Sachsen von Herrn Stefan Kittlaus und Herrn Dr. Günther Kempe. Die Auswertung aller Messergebnisse, die Ergebnisdiskussion und das Verfassen des Manuskripts gehen vollständig auf meinen Anteil zurück. Eine Kommentierung des Manuskripts und die Unterbreitung von Überarbeitungsvorschlägen erfolgten durch die Koautoren. Herr Dr. Lutz Alder hat die Arbeit betreut.





Special feature: tutorial

(wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/jms.3056

The influence of electrospray ion source design on matrix effects

Helen Stahnke, Stefan Kittlaus, Günther Kempe, Christlieb Hemmerling and Lutz Alder Page 875–884



More than 20 years and a Nobel prize since its introduction there is still a lot to learn about the mechanism of electrospray ionization. For example, certain compounds when present in solution can enhance or suppress ionization of a targeted species. In this month's Special Feature Stahnke and co-workers examine whether or not ion source geometry influences whether or not sample matrix impacts the measured ion signal of targeted compounds.

Authors' biographies

Helen Stahnke finished her studies in food chemistry in 2005 at the Technical University in Berlin (Germany). She gained her state examination at the Hessian State Laboratory in Germany. In 2007 she started to work with mass spectrometry, at first as a diploma student at the Federal Institute for Risk Assessment in Berlin. During her PhD thesis she investigated matrix effects in trace level analysis with electrospray mass spectrometry. For this research she was awarded at the European Pesticide Residue Workshop. She has published two articles about matrix effects in scientific journals.

Stefan Kittlaus finished his studies in food chemistry in 2008 at the Technical University in Dresden (Germany). During his diploma thesis he developed a mass spectrometric method for a special pesticide in difficult matrices. For his PhD thesis he designed a new automated multiresidue method for the determination of more than 300 pesticides in different food with multidimensional LC-MS/MS. For this later work he received two awards. He is author of four articles in scientific journals.

Güenther Kempe studied chemistry in Dresden (Germany) with a focus in food and analytical Chemistry. He has been employed by the Hygiene Institute, which is now the Federal Institute for Food and Health Protection in Saxony/Germany since 1991. Most of his research has been concerned with pesticide residue analysis on Food. For more than 10 years he was the head of Pesticide Department and also the chairmen of the Working Group Pesticides of the German Chemical Society (GDCh). Today he is the head of Veterinary Drugs Analytical Department in Saxony. He has published 25 scientific articles and book chapters.

Christlieb Hemmerling studied Chemistry in Greifswald (Germany) with a focus on catalysis. Some years later, he graduated in chemical analysis and spectroscopy. In 1980 he became the head of the laboratories for chromatography and mass spectroscopy of the Hygiene Institute in Frankfurt/Oder and since 1998 he is responsible for mass spectrometric analysis of contaminants, pesticides and veterinary drug residues in the State Veterinary and Food Office of Berlin/Brandenburg (Germany). For more than 15 years he is member of the Working Group Pesticides of the German Chemical Society (GDCh). He has published more than 10 scientific articles.



Lutz Alder studied chemistry in Berlin (Germany) with a focus in organic chemistry. In 1979 he started the practical use of mass spectrometers, at first as head of the Mass Spectrometry laboratory of the Chemical Institutes of Humboldt University. Since 1991 he works about pesticide residue analysis for the Federal Health Office of Germany, which is now the Federal Institute for Risk Assessment in Berlin. Lutz Alder is the convenor of national and European working groups, which develop either official or standardized methods for pesticide residue analysis. He is author of more than 50 scientific articles and book chapters.

Special Feature: Tutorial

Received: 29 February 2012

(wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jms.3047

The influence of electrospray ion source design on matrix effects

Accepted: 12 June 2012

Helen Stahnke,^a* Stefan Kittlaus,^b Günther Kempe,^c Christlieb Hemmerling^d and Lutz Alder^a

Revised: 18 May 2012

This study investigates to which extent the design of electrospray ion sources influences the susceptibility to matrix effects (MES) in liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). For this purpose, MEs were measured under comparable conditions (identical sample extracts, identical LC column, same chromatographic method and always positive ion mode) on four LC-MS/MS instrument platforms. The instruments were combined with five electrospray ion sources, viz. Turbo lon Spray, Turbo VTM Source, Standard ESI, Jet Stream ESI and Standard Z-Spray Source. The comparison of MEs could be made at all retention times because the method of permanent postcolumn infusion was applied. The MEs ascertained for 45 pesticides showed for each electrospray ion source the same pattern, i.e. the same number of characteristic signal suppressions at equivalent retention times in the chromatogram. The Turbo lon Spray (off-axis geometry), Turbo VTM Source (orthog-onal geometry) and the Standard Z-Spray Source (double orthogonal geometry) did not differ much in their susceptibility to MEs. The Jet Stream ESI (orthogonal geometry) reaches a higher sensitivity by an additional heated sheath gas, but suffers at the same time from significantly stronger signal suppressions than the comparable Standard ESI (orthogonal geometry) without sheath gas. No relation between source geometry and extent of signal suppression was found in this study. Copyright © 2012 John Wiley & Sons, Ltd.

Supporting information may be found in the online version of this article.

Keywords: LC-MS/MS; signal suppressions; source design; source geometry; postcolumn infusion; electrospray ionization

INTRODUCTION

Combined liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) is today routinely used in many laboratories for trace level analysis in biological, environmental, pharmaceutical and food samples. Compared to conventional LC, LC-MS/MS offers much higher selectivity, lower detection limits and higher speed, since several hundreds of diverse analytes can be measured simultaneously. Today, users of LC-MS/MS can choose between a wide range of rugged instruments from various manufacturers.

The interfacing of LC and MS was a challenging task at the beginning, but the difficulties could be overcome with ion sources that work under atmospheric pressure. An excellent overview on the historical development and optimization of atmospheric pressure ionization (API) sources for LC–MS is available from Niessen^[1–4] and from Manisali *et al.*^[5]. API sources were modified several times to achieve a higher sensitivity and lesser contamination by non-volatile materials. Further objectives for optimization of desolvated ions from solvent vapor, more effective separation of desolvated ions from solvent vapor, more effective declustering, more reproducible in-source fragmentations and a generally better handling. Today, a large variety of API interfaces exist. However, the most often used ion sources still follow the principle of electrospray ionization (ESI).

The mechanism of ESI was discussed in detail in many reviews.^[6-11] To describe it briefly, the ESI process consists of following four phases: formation of charge carrying droplets from LC effluent, drastical reduction of droplet size by continuous solvent evaporation and repeated droplet fissions, release of ions

J. Mass. Spectrom. **2012**, 47, 875–884

from highly charged microdroplets into the gas phase and transport of free gas phase ions into the mass analyzer.

The main components of ESI sources for flow rates of 0.05-3 mL/min are (1) a stainless steel or metalized fused-silica capillary through which the LC effluent is continuously pumped, (2) a second capillary (transfer capillary) or a planar metal plate with a narrow aperture for ion sampling into the mass spectrometer, (3) a high-voltage DC power supply to build up a potential difference of 3-6 kV between spray capillary and metal plate or transfer capillary, (4) gas inlets supporting the nebulization of the LC effluent, the desolvation of ESI droplets, or in case of countercurrent flows the declustering of ion-solvent clusters and the reduction of source contamination and (5) differentially pumped chambers with modules for ion focussing to transport the free gas phase ions as efficient as possible from the atmospheric pressure region of the source into the high vacuum of the mass analyzer.

- Correspondence to: Helen Stahnke, Federal Institute for Risk Assessment, Max-Dohrn-Straße 8–10, 10589 Berlin, Germany. E-mail: helenstahnke@eurofins.de
- Federal Institute for Risk Assessment, Max-Dohrn-Straße 8-10, 10589 Berlin, Germany
- b Joint Analytical Systems GmbH, Carl-Zeiss-Straße 49, 47445 Moers, Germany
- c Landesuntersuchungsanstalt f
 ür das Gesundheits- und Veterin
 änwesen Sachsen, Reichenbachstra
 ße 71-73, 01217 Dresden, Germany
- d Landeslabor Berlin-Brandenburg, Gerhard-Neumann-Straße 2-3, 15236 Frankfurt (Oder), Germany

Copyright © 2012 John Wiley & Sons, Ltd.

Published online in Wiley Online Library

MASS SPECTROMETRY

Modifications in ESI source design mainly involve the number and the positioning of heated gas inlets,^[12-16] the sprayer orientation relative to sampling orifice^[12,13,17-19] as well as the diameter of MS orifice^[20] or the number of transfer capillaries.^[21] Further, the ion lens system may be a starting point for improvements in ESI design as it decides on ion sampling efficiency and stability of ion signals.^[22,23]

Concerning the sprayer position, manufactures offer today three geometries. If off-axis geometry is used, the spray capillary is positioned at 30–45° relative to the x-axis between sampling orifice and the first quadrupole. This geometry is mainly implemented in Ion Spray^[12,13,24] and Turbo Ion Spray^[14] interfaces. Now, the majority of ESI models apply an orthogonal geometry,^[17,18] i.e. a 90° position of spray capillary to x-axis. Better than off-axis interfaces, orthogonal sampling prevents the orifice for clogging with non-volatile materials and enhances sensitivity, since mainly the fine droplets with higher charge density enter the orifice while the larger droplets are carried away by the nebulizer gas. In Z-spray geometry, a double orthogonal sampling shall very efficiently separate neutral molecules and solvent vapor from the ion jet into mass spectrometer.^[19]

The major drawback of ESI sources is their susceptibility for disturbing influences of the sample matrix – known as matrix effects (MEs).^{25–321} Coextracted matrix components which are not removed during the sample cleanup can strongly diminish or sometimes also improve the ionization efficiency of analytes. Quantifications by external calibration with solvent standards instead of standards in residue-free sample matrix will therefore lead to incorrect analysis results if signal suppression or enhancement occurs.

The causes for signal enhancement are not well understood. For signal suppression, it is assumed that matrix components can outcompete the analytes for the limited concentration of excess charges in ESI droplets (about 10⁻⁵ mol/L)^[33] or for the limited space on the droplet surface.[7] This may reduce the number of analyte ions released into the gas phase. Also, a change of the solvent's viscosity by matrix may influence the ability of analytes to migrate from the droplets enterior to its surface.^[34] Further, a change of the solvent's surface tension may shift the Rayleigh limit and therewith influence the formation of offspring droplets. Most of these processes are more affected by the spray voltage, the size of primary droplets leaving the Taylor cone and physical properties of the solution entering the ESI source. The above mentioned main differences in source design - like spray position, the positioning of heated gas inlets or the device for ion sampling - seem to be less important in that context.

While a number of studies compare MEs occurring in ESI with those noticed during atmospheric pressure chemical ionization,^[35–38] only few verify the influence of the different ESI source designs on MEs. The present study compares the MEs of plant food extracts on pesticides for ESI sources from three major LC–MS manufacturers including off-axis, orthogonal and Z-spray geometry.

EXPERIMENTAL

Chemicals

LiChrosolv[®] methanol and UniSolv[®] dichloromethane were purchased from Merck (Darmstadt, Germany) in hypergrade

H. Stahnke et al.

quality for LC–MS and in quality for organic trace analysis, respectively. Water for LC–MS/MS was prepared directly in the laboratory with a HP 5 UV water purification system (TKA, Niederelbert, Germany). All pesticide standards and ammonium formate were of analytical grade. Ammonium formate was supplied by Sigma-Aldrich (Seelze, Germany). The majority of pesticide standards were bought from Ehrensdorfer (Augsburg, Germany).

For the postcolumn infusion to Turbo Ion Spray, Turbo V[™] Source and Standard Z-Spray Source, the following 45 pesticides were randomly chosen as first set of analytes: acephate, aldicarb, acetamiprid, atrazine, azoxystrobin, bitertanol, butylate, carbaryl, carbendazim, chlorpyrifos, chlorthiamid, cyromazine, diazinon, diuron, EPTC, fluazifop-butyl, flurochloridone, furathiocarb, hexaconazole, imazalil, imidacloprid, isoproturon, kresoxim-methyl, malathion, metazachlor, methamidophos, methomyl, metsulfuron-methyl, monolinuron, myclobutanil, oxydemeton-methyl, penconazole, pirimicarb, pirimiphos-methyl, profenofos, propachlor, propaquizafop, prosulfuron, pyrazophos, simetryn, terbutryn, thiabendazole, thiamethoxam, triasulfuron and triazophos.

To the Standard ESI and the Jet Stream ESI a second set of 45 pesticides was infused postcolumn: aldicarb, amidosulfuron, azoxystrobin, bromacil, bupirimate, carbendazim, clofentezine, clomazone, clopyralid, cymoxanil, cyprodinil, daminozide, diclofop-methyl, diniconazole, ethofumesate, etofenprox, fenazaquin, fenbutatin oxide, fenhexamid, fluoroglycofen-ethyl, flutolanil, imazalil, imidacloprid, indoxacarb, iprovalicarb, lufenuron, metamitron, metazachlor, mevinphos, monolinuron, oxadixyl, oxamyl, pencycuron, propargite, propetamphos, prosulfocarb, pyrazophos, pyrifenox, quinoxyfen, spiroxamine, tebufenozide, tepraloxydim, terbuthylazine, tolylfluanid and triforine. In total, eight pesticides were identical in both analyte sets.

Preparation of sample extracts

Organic samples of grapefruit, orange, pear and sweet pepper were prepared by methanol extraction followed by a cleanup on diatomaceous earth with dichloromethane according to the ChemElut method.^[39]

In brief, a portion of 20 g of homogenized sample was mixed with a defined volume of water, so that the natural water content of the sample was filled up to 20 mL. After addition of 40 mL of methanol, it was homogenized for 2 min with an ultra turrax (T25, Janke und Kunkel, Staufen/Breisgau, Germany), and centrifugated at 4000 RPM for 10 min (Heraeus, Multifuge 1 S-R, Thermo Electron Corp., Osterode, Germany). A volume of 30 mL of raw extract was mixed with 10 mL of sodium chloride solution (20% in water). This extract was loaded in two equal portions of 20 mL on two liquid/liquid extraction cartridges packed with diatomaceous earth (ChemElut cartridges CE 1020, Varian, Darmstadt, Germany). After 5 min, each cartridge was eluted with $4 \times 24 \,\text{mL}$ dichloromethane into the same round-bottom flask. The eluate was evaporated to dryness at 40 $^\circ\text{C}$ on a rotary evaporator (Büchi, Flawil, Switzerland). The residue was resolved in 2 mL of methanol in an ultrasonic bath (Sonorex RK100, Bandelin, Berlin, Germany) and filtrated through a syringe filter (Titan PTFE 0.45 µm) directly into vials. The final extract contained the extracted matrix constituents from 5 g of sample in 1 mL of extract.

It should be noted that matrix extracts prepared with the more popular QuEChERS method^[40,41] show comparable MEs if the same amount of matrix is introduced to LC–MS systems.^[42]

876

Copyright © 2012 John Wiley & Sons, Ltd.

J. Mass. Spectrom. 2012, 47, 875-884

Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry (LC–MS/MS) instrumentation

The study involved four LC–MS/MS instruments that were operated with five different electrospray ion sources.

Applied Biosystems API 2000 (Turbo Ion Spray)

The first instrument platform consisted of an Applied Biosystems API 2000 triple quadrupole mass spectrometer with a Turbo Ion Spray source (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany) that was coupled to an Agilent 1100 LC device (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) with binary pump (G1312A), vacuum solvent degasser (G1322A), autosampler (G1329A) and column oven (G1316A). For system control, Analyst 1.4.1 software was used. To continuously infuse a pesticide mixture without pulsations into the LC stream, a second Agilent 1100 isocratic pump (G1310A) was used together with a 70 bar backpressure regulator (Upchurch Scientific, Oak Harbor, WA, USA).

Applied Biosystems 3200 QTrap (Turbo V[™] Source)

For the second LC–MS/MS system, an Agilent 1200 LC device (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) with binary pump (G1312B), vacuum solvent degasser (G4208A), autosampler (G1367C) and column oven (G1316B) was coupled to an Applied Biosystems 3200 QTrap mass spectrometer with a Turbo VTM Source (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). The system was controlled with Analyst 1.4.1 software. The Agilent 1100 isocratic pump (G1310A) and the 70 bar backpressure regulator were used for postcolumn infusion.

Agilent 6460A (Standard ESI, Jet Stream ESI)

The experiments with a Standard ESI and a Jet Stream ESI source were performed on an identical LC–MS/MS instrument. An Agilent 1200 LC device (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) with binary pump (G1312B), degasser (G1379B), autosampler (G1367D), column oven (G1316B) and for postcolumn infusion, a second binary pump (G1312B) was coupled to an 6460A triple quadrupole mass spectrometer (Agilent, Santa Clara, USA). For system control, MassHunter acquisition B.03 software was used.

Micromass Quattro LC (Standard Z-Spray Source)

A Waters Alliance 2695 LC device (Waters GmbH, Eschborn, Germany) was coupled via a Standard Z-Spray Source with a Micromass Quattro LC triple quadrupole mass spectrometer (Micromass UK Limited, Altricham, UK). The complete system was controlled with MassLynx 4.1 software. For postcolumn infusion the Agilent 1100 isocratic pump (G1310A) with 70 bar backpressure regulator was used.

Mass spectrometric conditions

Analyte specific voltages like declustering potential or collision energy were individually adjusted on all instruments to obtain optimal sensitivity for each pesticide. From two optimized transitions, the most sensitive mass transition was used. Dwell times on the API 2000 and the 3200 QTrap were set to 10–150 ms depending on the intensity of the transitions. On the Agilent 6460A, the dwell times were set to 15 ms for all pesticides and on the Quattro LC to 10 ms. The voltages, gas flows and gas temperatures in the different electrospray ion sources are summarized in Table 1.

J. Mass. Spectrom. 2012, 47, 875-884

Copyright © 2012 John Wiley & Sons, Ltd.

Table 1. Comparison be	etween the	settings of the different elect	trospray io	n sources (for small molecul	les)				
Turbo lon Spray (AB API	2000)	Turbo V TM Source (AB QTra	ap 3200)	Standard ESI (Agilent	6460A)	Jet Stream ESI (Agilent (6460A)	Standard Z-Spray Source (Mi Quattro LC)	cromass
spray voltage	+5.5 kV	spray voltage	+5.5 kV	capillary voltage	+3.5 kV	capillary voltage nozzle voltage	+3.5 kV 300 V	capillary voltage cone voltage	+3.11 kV 18 V
								extractor voltage	2 V
nebulizer gas	60 psi	nebulizer gas	60 psi	nebulizer gas	40 psi	nebulizer gas	40 psi	nebulizer gas	126 L/h
heater gas	60 psi	heater gas	60 psi			sheath gas	12L/min	desolvation gas	644 L/h
heater gastemperature	400°C	heater gastemperature	350°C			sheath gastemperature	375 °C	desolvation gastemperature	350°C
curtain gas	35 psi	curtain gas	50 psi	drying gas	12 L/min	drying gas	7 L/min		
				drying gastemperature	350°C	drying gastemperature	250 °C	source block temperature	120°C

Ergebnisse

MASS SPECTROMETRY

wileyonlinelibrary.com/journal/jms

H. Stahnke et al.

MASS SPECTROMETRY

LC conditions

On all instrument platforms, the same chromatographic method was applied. The separations were performed at 20 °C on an identical polar endcapped C18 HPLC column (Aqua, 5 µm, C18, 125 Å, 50 mm × 2 mm; Phenomenex, Aschaffenburg, Germany). When necessary, the corresponding precolumns (10 mm × 2 mm; Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) were replaced. The flow rate was set to 0.2 mL/min. Mobile phase A was methanol/water 1/4 (v/v), and mobile phase B was methanol/water 9:1 (v:v), both with 5 mM ammonium formate. The gradient started with a linear step from 0% B to 100% B over 11 min and held for another 12 min at 100% B. Then, the percentage of B was linearly decreased to 0% in 2 min and was kept constant for at least 13 min to equilibrate the column. The injection volume was 20 μ L or all ESI sources. Only for the Standard ESI and Jet Stream ESI injection volumes of 20 μ L and additionally 4 μ L were used.

Determination of matrix effects

MEs were measured during complete chromatographic runs according to the method of permanent postcolumn infusion.[43,44] The infused mixture contained 45 pesticides at a concentration of 50 ng/mL, each in methanol/water 1:1 (v:v) with 5 mM ammonium formate. These pesticides were not present in the samples. The mixture was permanently infused into the LC stream via a T-piece between the LC column and the ESI source at a flow rate of 0.02 mL/min. Pure mobile phase was injected onto the column before and after each sample extract. The responses of pesticides were continuously measured in the selected reaction monitoring (SRM) mode. In this way, during a single chromatographic run between 611 (with API 2000 and 3200 QTrap) and 2012 data points (with 6460A) for the signal intensity were recorded. The ME profile of each analyte/sample combination results from the calculation of the ME for each single data point i according to Eqn (1) and its graphical plotting against retention time.[45]

$$ME_{i}(\%) = \left(\frac{SI_{i} \text{ (extract)}_{smoothed}}{SI_{i}(solvent)_{smoothed}} - 1\right) \times 100\%$$
(1)

Each measurement of a sample extract was followed by a blank run with pure mobile phase to prove the absence of matrix enrichments on the column.

RESULTS AND DISCUSSION

Tested electrospray interfaces

This study compares five electrospray ion sources from three manufactures regarding their susceptibility to MEs in the positive ion mode. The tested LC–MS interfaces were: (1) Turbo lon Spray (Applied Biosystems), (2) Turbo VTM Source (Applied Biosystems), (3) Standard ESI (Agilent), (4) Jet Stream ESI (Agilent) and (5) Standard Z-Spray Source (Micromass). In all five ESI sources, the nebulization of the LC effluent into an aerosol of charged droplets was pneumatically assisted by a nitrogen (N₂) stream that blew coaxially around the spray capillary. Also, four of the tested ESI sources were similar to each other in the use of a countercurrent N₂ stream around the ion sampling aperture, termed curtain gas or drying gas depending on the manufacturer. Despite these and other similar elements, each type of an

ESI source has specific structural features that make it distinct from other ion sources.

The construction of the five different ESI sources which were investigated in this study is schematically shown in Fig. 1. The study covered ESI sources with off-axis geometry (Turbo lon Spray), with orthogonal geometry (Turbo VTM Source, Standard ESI, Jet Stream ESI), and with double orthogonal geometry (Standard Z-Spray Source). Further, there are differences in the number of heated gases and their orientation towards the spray plume, or in the way of ion sampling into the mass spectrometer either via an aperture in a planar counter electrode or via a transfer capillary. Until now, it was hardly investigated to which extent these specific features of ESI sources affect the extent of ion suppression due to sample matrix.

Approach for matrix effect determination

In contrast to the few previous studies that deal with the influence of ESI source design on MEs,^[46–48] in this study, MEs were continuously measured over entire chromatographic runs of 25 min duration by permanent postcolumn infusion of analytes.^[43,44] The SRM transitions of the infused pesticides were continuously recorded, while a sample extract was injected onto the LC column and was chromatographically separated into its matrix constituents. In this way, it was possible to investigate the influence of all matrix constituents of a sample extract on many analytes. To obtain significant MEs for all samples, including pear and sweet pepper, the extracted matrix constituents of 100 mg of sample were injected onto the column, i.e. fivefold more than proposed in [39].

In a second run, pure mobile phase was injected onto the column as a reference for the signal intensities without matrix influences. From the intensity data of both runs for each of the infused pesticides, a ME profile of the respective sample extract was calculated. In the last step, from the MEs of all simultaneously postcolumn infused pesticides, the median was calculated and plotted against retention time. In previous studies^[42,45], it was shown that in the positive ion mode at the retention time of a matrix component, the majority of chemically dissimilar pesticides suffer in the same extent for MEs. Therefore, mean ME profiles correctly reflect the pattern and the strength of MEs for the respective ion source and reduce imprecision without the need to repeat measurements. For the same reason, very similar MEs had to be expected, irrespective of the use of two sets of analytes containing 8 identical and 37 different pesticides. The different sets of analytes were chosen to avoid additional (unnecessary) tuning experiments.

Postcolumn infusion was used for this study instead of the conventional determination of MEs by comparison of responses obtained with standards in solvent and matrix-matched standards for the following reasons:

- The conventional determination of MEs is possible only at the retention time of pesticides investigated. For example, 100 data points in a chromatogram can be collected with the injection of 100 analytes. If there are regions in the chromatogram without elution of available analytes, no investigation of MEs is possible. In contrast, postcolumn infusion allows the collection of data during the entire chromatogram (in this study between 611 and 2012 data points).
- To reduce the measurement uncertainty during the conventional determination, repeated injection of standards in solvent and matrix-matched standards is required. With postcolumn

wileyonlinelibrary.com/journal/jms

Copyright © 2012 John Wiley & Sons, Ltd.

J. Mass. Spectrom. 2012, 47, 875-884



Figure 1. Schemes of the five electrospray ion sources tested in the study.

infusion, results of high quality are obtained in a much more simple way by merging simultaneously recorded data from different pesticides instead of merging data from different injections.

- It was not possible to use the identical liquid chromatograph in all cases. Due to the different pumps, small differences in retention time occurred, which also may result in coelution of different matrix constituents with identical pesticides. Such disturbing influences are avoided by permanent infusion of pesticides.
- Rarely, an influence of LC columns on the response of pesticides cannot be excluded. To focus the investigation on the influence of ion sources, the infusion of pesticides behind the column was preferred. Consequently, the LC column could not effect the response of analytes.

The experiments to obtain ME profiles were repeated on all instrument platforms using identical sample and separation conditions. An investigation of potential influences of ion source settings on MEs was not in the scope of this paper. Voltages, gas flows and gas temperatures in the sources were individually adjusted on each instrument as required for the analysis of pesticides. The used settings are summarized in Table 1.

Comparison of matrix effect profiles from different ESI sources

If an identical sample extract was injected, we have observed a similar pattern of ME profiles on all instrument platforms independent from source design. Figure 2 shows this for the example of an orange extract. At all five ESI sources, an increasing

ME was found between 6 and 11 min. In addition, the ME profiles exhibited the same ten characteristic 'negative peaks', i.e. suppressions of analyte response. Their retention times were not completely identical, solely because not the same liquid chromatograph could be utilized for all instrument platforms. Varying dead volumes or slower gradient mixing have thus led to a slight shift in the retention times of the matrix components.

The same observation of similar ME profiles was made for the Turbo Ion Spray, the Turbo VTM Source and the Standard Z-Spray Source with extracts of grapefruit, pear and sweet pepper. In Fig. 3 the ME profiles of the other three matrix extracts are exemplarily shown by means of the measurements with the Turbo VTM Source.

In contrast, a seemingly different pattern of MEs was measured with the Jet Stream ESI. If the coextracted matrix from 100 mg of sample was injected onto the column, the usually well separated suppression peaks 2, 3 and 4 in Fig. 2 were hardly visible (100 mg injection with Jet Stream ESI not shown in Fig. 2). The disappearance of the normal pattern was caused by a nearly complete suppression of all signals of infused compounds in this part of the Jet Stream ESI chromatogram. However, the normal peak pattern became visible again, when the injected sample amount was reduced to 20 mg orange matrix (shown in Fig. 2). As discussed in the supporting information, the different sets of analytes are not the cause for stronger suppression effects with the Jet Stream ESI source. A stronger suppression with the Jet Stream ESI source compared to the other sources was also observerd based on the data belonging to those eight pesticides which are present in both analyte sets.

Moreover, some variations were observed for the negative suppression peak marked as '1'. At some instruments, e.g. the

J. Mass. Spectrom. 2012, 47, 875-884

Copyright © 2012 John Wiley & Sons, Ltd.

H. Stahnke et al.

grapefruit extract (Turbo V[™] Source) 3rd

3456

pear extract (Turbo V[™] Source)

15 20

10

10 15 20

sweet pepper extract (Turbo V

10

Time, min

15

interva

Source

20

2

MASS SPECTROMETRY



Figure 2. Mean matrix effect profile, calculated from 45 simultaneously postcolumn infused pesticides, for the same orange extract on five different ESI sources: (A) Turbo Ion Spray, (B) Turbo VTM Source, (C) Standard ESI, (D) Jet Stream ESI and (E) Standard Z-Spray Source, using the same chromatography. Characteristic declines in signal intensity were numbered (1–10). To all sources, the coextracted matrix of 100 mg of sample was introduced except for the Jet Stream ESI with fivefold lesser matrix.

API 2000 with the Turbo Ion Spray, or the Quattro LC with the Standard Z-Spray Source, this suppression of the salt freight appeared broader than at the others instrument platforms. Chromatographic causes were excluded, because differences occurred also between the two ion sources of the completely identical Agilent LC-MS/MS system (even with fivefold less injected matrix for the Jet Stream ESI). Since stronger suppression causes broader peaks and stronger shifts from the baseline, it is assumed that the suppressions due to the salt freight did not last longer, but were stronger at these ESI sources due to their specific design. Nevertheless, for pesticide residue analysis, the ME of the salt freight is the least important as only few pesticides elute in this early region of chromatograms.

Matrix Effect, % 0 -50 -100 5 0 Figure 3. Mean matrix effect profile of 45 pesticides obtained with the coextracted matrix of 100 mg of (A) grapefruit, (B) pear or (C) sweet pepper sample with a Turbo V^{TM} Source.

A

в

С

Effect,

Matrix -50

Matrix Effect, %

0

-50

-100

0

-100

Extent of matrix effects on different ESI sources

Only some investigations of the susceptibility towards MEs of different LC-MS instruments are published. Xu et al.[48] have reported in 2005 strong differences between MEs on a Finnigan Quantum, Sciex API 3000, and Micromass Quattro Ultima instrument in the positive ion mode for two drug analytes in rat plasma caused by the dosing vehicles Tween 80 and PEG400. However, from their data, it could not be derived which ion source was reproducible less prone to matrix influences. Thus, no ESI source design has turned out to be advantageous. Such conclusion was done in a study of Holčapek *et al.*^[47] for the negative ion mode. In their study MEs on sulphonated dyes due to mobile phase additives for ion-pairing chromatography were compared for five LC-MS instruments. It was noticed that the Z-Spray geometry led to weaker signal suppressions by the additives than the orthogonal geometry or even the on-axis geometry.

To evaluate possible differences in the susceptibility of the tested ESI sources in this study, the mean and the most extreme signal suppression in three time intervals were analyzed in detail. The first interval (0-2.5 min) was used as a measure for the effect of the salt freight. The second interval (2.5-6.0 min) was considered, because compared to the other chromatogram regions, all four extracts caused low signal suppressions in this time period. The third interval (8.5–16.0 min) was the main elution zone of the analytes in this normal method for pesticide residue analysis and therefore of special interest. The values in Table 2 summarize the mean ME (mean suppression) in the entire interval, whereas values in Table 3 correspond to the strongest signal suppression measured. The results in Table 2 and 3 are based on all pesticides present in both analyte sets because it is assumed that this is more informative. However, a second calculation of tabulated

wileyonlinelibrary.com/journal/jms

Copyright © 2012 John Wiley & Sons, Ltd.

J. Mass. Spectrom. 2012, 47, 875-884

Table 2. Comparison of mean matrix effects for five differen intervals of the chromatogram. To each ESI source, the coext	it ESI sources. The mat racted matrix of 100 m	ix effect profiles of 45 ig of sample was intro	postcolumn infused pes duced	ticides were averaged (calculatio	n of the median) in	three typical time
Retention time	Matrix	Turbo lon Spray	Turbo V TM Source	Standard Z-Spray Source	Standard ESI	Jet Stream ESI
zone 1/salt freight/0–2.5 min	grapefruit	-40%	-16%	-51%		
	orange	-45%	-18%	-40%	-10%	-51%
	pear	-31%	-10%	-25%		
	sweet pepper	-27%	-20%	-25%		
zone 2/region of typically low matrix effects/2.5-6.0 min	grapefruit	-33%	-13%	-14%		
	orange	-29%	-13%	-15%	-5%	-41%
	pear	-19%	-7%	-8%		
	sweet pepper	-17%	-10%	-7%		
zone 3/main elution zone of analytes/8.5-16.0 min	grapefruit	-78%	-75%	-88%		
	orange	-64%	-58%	-71%	-49%	-86%
	pear	-45%	-30%	-31%		
	sweet pepper	-49%	-33%	-44%		
Table 3. Comparison of the highest matrix effects for five di typical time intervals of the chromatogram. To each ESI sour Betervitor time	fferent ESI sources. The ce, the coextracted ma Matrix	thean matrix effect printing of 100 mg of sam Turbo lon Sorav	ofile of 45 postcolumn in ple was introduced Turbo V TM Source	ifused pesticides was checked fo Standard Z-Sorav Source	the most intense si StandardFCI	upression in three lat StreamFSI
Retention time	Matrix	Turbo Ion Spray	Turbo V'''' Source	Standard Z-Spray Source	StandardESI	Jet StreamESI
zone 1/salt freight/0-2.5 min	grapefruit	-86%	91%	91%		
	orange	-86%	%06 <i>—</i>	-89%	-87%	-96%
	pear	-78%	-87%	83%		
	sweet pepper	-78%	-87%	-85%		
zone 2/region of typically low matrix effects/2.5-6.0 min	grapefruit	-39%	-37%	-35%		
	orange	-35%	-28%	-28%	-17%	-62%
	pear	-25%	-16%	-16%		
	sweet pepper	-18%	-17%	-15%		
zone 3/main elution zone of analytes/8.5–16.0 min	grapefruit	-92%	-87%	-95%		
	orange	-89%	~06-	-95%	-89%	-98%
	pear	-64%	-59%	-60%		
	sweet pepper	-61%	-51%	-60%		

Influence of ESI source design on matrix effects

MASS SPECTROMETRY

J. Mass. Spectrom. 2012, 47, 875-884

Copyright © 2012 John Wiley & Sons, Ltd.

wileyonlinelibrary.com/journal/jms

881

Ĩ.
ROMETRY

H. Stahnke *et al*.

figures based on the limited number of common analytes (eight pesticides are identical in both sets) resulted in comparable results (see Figure S1).

In all extracts, the first interval contained solely the suppression peak of the salt freight; the second interval covered no characteristic suppression peaks; and in the main elution zone of the pesticides, i.e. in the third interval, a number of nine (grapefruit), five (orange), three (pear) and three (sweet pepper) suppression peaks were recorded. For the Standard and the Jet Stream ESI, only data for the orange extract were available.

It was found that the extent of suppression for the mean ME profile of the 45 pesticides could be calculated with a precision of 5%. This value was derived from a calculation of the mean standard deviation of 15 repeated measurements of ME profiles for the same 45 pesticides. The measurements were conducted with the Turbo Ion Spray, the Turbo VTM Source, and the Standard Z-Spray Source, with extracts of orange, rocket, wheat flour, and avocado. Thus, if ME profiles differed >5% between different ion sources, this is presumably not a consequence of imprecise data. Nevertheless, in this study, only differences >10% ME were classified as significant differences caused by the source design.

Looking at the data of **mean** MEs (Table 2), the Standard ESI had in all cases the lowest ME, and the Jet Stream ESI visibly the strongest. By contrast, the **highest** MEs noticed in zone 1 (salt freight) and zone 3 (main elution zone of analytes) did not differ significantly between all ion sources (see Table 3 and Figure S1 for orange). This is not astonishing, because also the ion source with usually lowest susceptibility to MEs (Standard ESI) suffered rarely for \geq 87% suppression in both zones. Nevertheless, except for retention times with such severe signal suppressions, MEs with the Standard ESI were on average about 40% (absolute value) weaker than with the Jet Stream ESI. The differences in MEs between these two ion sources are also apparent in Fig. 4, which compares the mean ME profiles of both sources obtained with the coxtracted matrix of 20 mg of orange sample (instead of 100 mg for the Standard ESI in Fig. 2).

Both ion sources share a similar design. The Standard ESI and the Jet Stream ESI operate with a transfer capillary for ion sampling, which is surrounded by a heated drying gas. However, the Jet Stream ESI uses an additional heated N₂ sheath gas that blow concentrically around the nebulizer tube to support the desolvation of ESI droplets and to thermically confine the spray plume. Due to an enhanced ion density in the confinement zone, more ions shall be available for sampling. In this way the additional sheath gas shall increase the sensitivity by a factor of 5 to 10.^[49] Such gain in sensitivity was also observed during the experiments with postcolumn infusion. Nevertheless, as a



Figure 4. Comparison of the mean matrix effect profiles obtained with the coextracted matrix of 20 mg of orange sample with a Standard ESI and a Jet Stream ESI source.

wileyonlinelibrary.com/journal/jms

882

negative side effect, the sheath gas seems to facilitate stronger signal suppressions. Usually, dilution of sample extracts is the simplest possibility to reduce MEs.^[50] Figure 2 shows that a dilution by the factor of 5 results in a similar extent of MEs of the Jet Stream ESI source compared to other ESI sources, but this dilution neutralizes the benefit in sensitivity.

The MEs of the other three sources ranged between the Standard ESI and the Jet Stream ESI and differed only slightly. With the Turbo VTM Source, the signal suppression in the main elution zone of the analytes (third interval) was on average about 10% (absolut value) weaker than with the Turbo Ion Spray or with the Standard Z-Spray Source (see Table 2).

In the region of typically low MEs (second interval), the Turbo VTM Source and the Standard Z-Spray Source both caused weaker MEs than the Turbo lon Spray. The difference between mean MEs was on average 14%. Less significant differences between the three sources were observed on the basis of the highest ME in this interval (see Table 3). Consequently, for matrix constituents except for salts, the design of the Turbo lon Spray, the Turbo VTM Source and the Standard Z-Spray Source seems to have only a minor influence on the extent of signal suppressions. Features like orthogonal or double orthogonal sprayer geometry or the integration of exhaust guide tubes may be advantageous for aspects like enhanced sensitivity or reduced recirculation inside the source, but based on our data, their benefit for the reduction of MEs seems to be limited.

CONCLUSIONS

Incompletely removed constituents of the sample matrix present in final extracts for LC–MS analysis can severely suppress the electrospray ionization of target analytes.

The construction of ESI sources may be important for factors like sensitivity, degree of contamination, memory effects, etc., but its influence on MEs seems limited. As long as the same chromatography is applied, the pattern of MEs caused by a sample is comparable on many LC–MS instruments independent from the design of its ESI source. Only slight shifts in retention time have to be expected if not completely identical LC systems are used.

Beside the pattern, also the extent of MEs is similar for most electrospray interfaces, even if some differences were observed. At least, the spray geometry of an ESI source (off-axis, orthogonal or double orthogonal) has no significant influence on the extent of MEs. Two very similarly constructed ESI sources showed the most significant differences in the strength of signal suppression. The main difference between these two sources was the additional use of a heated sheath gas. This additional gas improved significantly the sensitivity, but also the influence of matrix was much stronger. MEs comparable to those of the other electrospray ion sources were obtained only, when the gain in sensitivity was lost by the required dilution of extracts.

Nevertheless, the similar susceptibility of ESI sources to MEs does not mean that MEs should be more or less equal in routine analysis with different LC–MS systems. If two complete instruments are compared, the more sensitive instrument requires lower extract concentrations or injection volumes to quantify the same analyte concentration. This may significantly reduce MEs.

J. Mass. Spectrom. 2012, 47, 875-884

Influence of ESI source design on matrix effects

Acknowledgements

Helen Stahnke and Lutz Alder gratefully acknowledge the financial support by Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, Bonn, Germany; project AL 971/1-1).

Stefan Kittlaus thanks Joint Analytical Systems (JAS, Germany), especially Joerg Radke, for financial and technical support and their excellent cooperation. Moreover, he gratefully acknowledges the support of the State Laboratory for health and veterinary affairs (LUA) of Saxony/Germany. The authors also thank Astrid Maye for her support on the Quattro LC instrument.

Supporting Information

Supporting information may be found in the online version of this article

REFERENCES

- [1] W.M.A. Niessen, U.R. Tjaden, J. van der Greef. Strategies in developing interfaces for coupling liquid chromatography and mass spectrometry. J. Chromatogr. A **1991**, 554(1–2), 3–26.
- W.M.A. Niessen. Advances in instrumentation in liquid chromatgraphy-mass spectrometry and related liquid-introduction techniques. J. Chromatogr. A 1998, 794, 407–435.
 W.M.A. Niessen. State-of-the-art in liquid chromatography-mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1999, 856, 179–197.
 W.M.A. Niessen. Progress in liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation and its impact on high-throughput screening. J. [2]
- [3]
- instrumentation and its impact on high-throughput screening. J. Chromatogr. A **2003**, 1000, 413–436. I. Manisali, D.D.Y. Chen, B.B. Schneider. Electrospray ionization source
- [5] geometry for mass spectrometry: past, present, and future. *Trends* Anal. Chem. **2006**, 25(3), 243–256.
- P. Kebarle, L. Tang. From ions in solution to ions in gas phase The mechanism of Electrospray Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **1993**, *65* [6] (22), 972 A-986 A.
- A.P. Bruins. Mechanistic aspects of electrospray ionization. J. Chromatogr. A, **1998**, 794, 345–357. [7]
- Chiomatogi, A, 1996, 794, 343–357.
 P. Kebarle, M. Peschke. On the mechanisms by which the charged droplets produced by electrospray lead to gas phase ions. *Anal. Chim. Acta* 2000, 406, 11–35.
 R.B. Cole. Some tenets pertaining to electrospray ionization mass spectrometry. J. Mass Spectrom. 2000, 35, 763–772. [8]
- [9]
- [10] N.B. Cech, C.G. Enke. Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spec. Rev.* 2001, 20, 362–387.
- P. Kebarle, U.H. Verkerk. Electrospray: From ions in solution to ions in the gas phase, what we know now. *Mass Spectrom. Rev.* 2009, *28*, [11] 898-917
- [12] A.P. Bruins, T.R. Covey, J.D. Henion. Ion spray interface for combined Liquid chromatographylatmospheric pressure ionization mass spectrometry. Anal. Chem. 1987, 59(22), 2642–2646.
 J.D. Henion, T.R. Covey, A.P. Bruins. Ion Spray Apparatus and Method.
 U.S. Patent 4,861,988, Aug 29, 1989.
 T.R. Covey, J.F. Anacleto. Ion Spray with Intersecting Flow. U.S. Patent
- [13]
- [14] [15]
- T.A. Covey, J.F. Analeto, for Spray with intersecting how 0.3. Patent 5/412,208 May 2, 1995.
 T.R. Covey, R. Jong, H. Javaheri. Method of and Apparatus for Ionizing an Analyte and Ion Source Probe for use therewith. U.S. Patent 6,759,650, Jul 6, 2004.
 A. Mordehai, M.H. Werlich, C.P. Love, J.L. Bertsch. Ion Sources for
- [16] Improved Ionization. U.S. Patent Application Publication US 2009/ 0250608 A1, Oct 8, 2009.
- K. Hiraoka, H. Fukasawa, F. Matsushita, K. Aizawa. High-flow Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Interface Using a Parallel Ion Spray. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1995**, *9*, 1349–1355. [17]
- J.A. Apffel, Jr., M.H. Werlich, J.L. Bertsch. Orthogonal Ion Sampling for Electrospray LC/MS. U.S. Patent 5,495,108, Feb. 27, 1996.
- Back to Basics Section B: Interfaces and Ionization Techniques. Chapter B3. Z-Spray Combined Inlet/Ion Source. Micromass UK Limited. 181. [19] http://notendur.hi.is/~agust/kennsla/ee05/verkl/MALDITOF/decode% 20talk%20oct%209/itarefni2/zspbtb.pdf (accessed 28 June **2012**).
- [20] A.P. Bruins. Mass Spectrometry with ion sources operating at atmospheric pressure. Mass Spectrom. Rev. **1991**, 10(1), 53–77.

Copyright © 2012 John Wiley & Sons, Ltd.

J. Mass. Spectrom. 2012, 47, 875-884

- P. Momoh, A. Fandino, E. Aisawa, T. Schlabach, K. Miller, G. Stafford. [21] iFunnel Technology for Enhanced Sensitivity in Tandem LC/MS. Technical Overview, Agilent Technologies: USA, May 21, **2010**.
- B.B. Schneider, D.J. Douglas, D.D.Y. Chen. An atmospheric pressure ion lens that improves nebulizer assisted electrospray ion sources. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2002, 13(8), 906–913. [22]
- Ami Soc. Mass Spectrom. 2002, 15(8), 906-915.
 Ibrahim, K. Tang, A.V. Tolmachev, A.A. Shvartsburg, R.D. Smith. Improving Mass Spectrometer Sensitivity Using a High-Pressure Electrodynamic Ion Funnel Interface. J. Am. Chem. Soc. Mass Spectrom. 2006, 17(9), 1299–1305. [23]
- J.D. Henion. The Origins of Ion Spray Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Clin. Chem.* 2009, *55*(6), 1234–1235.
 J. Hajšlová, J. Zrostlíková. Matrix effects in (ultra)trace analysis of pes-ticide residues in food and biotic matrices. *J. Chromatogr. A* 2003, *1000*, 101–102.
- 1000, 181-197. [26] P.J. Taylor. Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-
- performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clin. Biochem.* 2005, *38*, 328–334.
 [27] J.-P. Antignac, K. de Wasch, F. Monteau, H. De Brabander, F. Andre,
 - B. Le Bizec. 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.
- [28] pesticide analysis using liquid chromatography-mass spectrometry. Mass Spectrom. Rev. **2006**, 25, 881–899.
- C. Côté, A. Bergeron, J.-N. Mess, M. Furtado, F. Garofolo, Matrix effect [29] C. Cote, A. Bergeron, J.-N. Mess, M. Furtado, F. Garofolo. Matrix effect elimination during LC-MS/MS bioanalytical method development. *Bioanalysis*, 2009, *1*, 1243–1257.
 A. Van Eeckhaut, K. Lanckmans, S. Sarre, I. Smolders, Y. Michotte. Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: Evaluation of matrix *Granuel Chemotechica* 2020, 0212 (2000) 2020.
- [30]
- F. Gosetti, E. Mazzucco, D. Zampieri, M.C. Gennaro. Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatog-raphy tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A 2010, 1217, 2020.2027. [31] 3929-3937.
- H. Trufelli, P. Palma, G. Famiglini, A. Cappiello. An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry. *Mass Spectrom.* [32] Rev. 2011, 30, 491–509. C.G. Enke. A Predictive Model for Matrix and Analyte Effects in
- [33] Electrospray Ionization of Singly-Charged Ionic Analytes. *Anal. Chem.* **1997**, *69*(23), 4885–4893. R. King, R. Bonfiglio, C. Fernandez-Metzler, C. Miller-Stein, T. Olah.
- [34] Mechanistic Investigation of Ionization Suppression in Electrospray Ionization. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **2000**, *11*, 942–950.
- B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng. Matrix Effect in Quantitative LC/MS/MS Analyses of Biological Fluids: A Method for [35] Determination of Finasteride in Human Plasma at Picogram Per Milliliter Concentrations. Anal. Chem. 1998, 70, 882–889.
- Y. Hsieh, M. Chintala, H. Mei, J. Agans, J.-M. Brisson, K. Ng, W.A. Korfmacher. Quantitative screening and matrix effect studies of drug [36] discovery compounds in monkey plasma using fast-gradient liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2001**, *15*, 2481–2487.
- R. Dams, M.A. Huestis, W.E. Lambert, C.M. Murphy. Matrix Effect in Bio-Analysis of Illicit Drugs with LC-MS/MS: Influence of Ionization [37] Type, Sample Preparation, and Biofluid. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2003, 14, 1290–1294.
- A. Garcia-Ac, P.A. Segura, L. Viglino, C. Gagnon, S. Sauvé. Comparison of APPI, APCI and ESI for the LC-MS/MS analysis of bezafibrate, cyclophosphamide, enalapril, methotrexate and orlistat in municipal [38] wastewater. J. Mass Spectrom. **2011**, 46, 383–390. [39] European Standard EN 15637:2008-11-30. Food of plant orgin –
- Determination of pesticide residues using LC-MS/MS following methanol extraction and clean-up using diatomaceous earth. Beuth Verlag GmbH, Berlin – Wien – Zürich, Burggrafenstraße 6, 10787 Berlin, Germany, **2008**.
- [40] M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Štajnbaher, F.J. Schenck. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extrac-tion/Partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the Determination of Pesticide Residues in Produce. J. AOAC Int. 2002, 96(2), 412. 2003, 86(2), 412-431.
- S.J. Lehotay, K. Maštovská, A.R. Lightfield. Use of Buffering and Other Means to Improve Results of Problematic Pesticides in a Fast and [41] Easy Method for Residue Analysis of Fruits and Vegetables. J. AOAC Int. 2005, 88(2), 615–629.

wileyonlinelibrary.com/journal/jms

MASS SPECTROMETRY

MASS SPECTROMETRY

- [42] S. Kittlaus, J. Schimanke, G. Kempe, K. Speer. Assessment of sample cleanup and matrix effects in the pesticide residue analysis of foods using postcolumn infusion in liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A 2011, 1218(46), 8399-8410.

H. Stahnke et al.

- application to drug discovery. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003, *17*, 97–103.
 [47] M. Holčapek, K. Volná, P. Jandera, L. Kolářová, K. Lemr, M. Exner, A. Církva. Effects of ion-pairing reagents on the electrospray signal suppression of sulphonated dyes and intermediates. *J. Mass Spectrom.* 2004, *20*, *42*, 65.
- 2004, 39, 43–50.
 [48] X. Xu, H. Mei, S. Wang, Q. Zhou, G. Wang, L. Broske, A. Pena, W.A. Korfmacher. A study on common discovery dosing formulation components and their potential for causing time-dependent matrix effects in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry assays. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2005, 19, 2643–2650.
- [49] A. Mordehai, J. Fjeldsted. Agilent Jet Stream Thermal Gradient Focusing Technology. Technical Note, Agilent Technologies: USA, Feb 12, 2009.
 [50] H. Stahnke, S. Kittlaus, G. Kempe, L. Alder. Reduction of Matrix Effects in Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry by Dilution of the Sample Extracts: How Much Dilution is Needed? Anal. Chem. 2012, 84(3), 1474–1482.

wileyonlinelibrary.com/journal/jms

Copyright © 2012 John Wiley & Sons, Ltd.

J. Mass. Spectrom. 2012, 47, 875-884





Figure S1 Mean and most intense matrix effects obtained with an orange extract in three typical chromatogram zones for five electrospray ion sources. Median and maximum matrix effects were determined using the mean matrix effect profile (i) from all pesticides in both mixtures as reported in Table 2 and 3 and (ii) from the 8 pesticides which are present in both mixtures, respectively.

At the first glance, it may appear as a weak point that with the Agilent system (Standard ESI, Jet Stream ESI) a different set of analytes was used. However, previous results^{42,45,50} clearly have shown that in the positive ESI mode matrix effects do not differ significantly between analytes if matrix effects measured at identical retention time are compared. The data reported in this article confirm that finding for four different LC-MS instrument platforms with five ESI sources. Figure S1 shows that nearly the same matrix effects were obtained regardless whether the data of 8 identical pesticides were solely evaluated or a data set of 8 identical and 37 different pesticides was used.

3.4 Identifizierung Matrixeffekt auslösender Inhaltsstoffe

Dieses Kapitel fasst bisher unveröffentlichte Ergebnisse der Dissertation zusammen.

Zielstellung

Mit hochauflösender Massenspektrometrie sollte in einer non-targeted Analyse versucht werden, einige Stoffgruppen und Stoffe, die Matrixeffekte bei der Elektrospray-Ionisation verursachen, zu identifizieren. Wenn möglich sollten Rückschlüsse auf den Mechanismus von Matrixeffekten bei der Elektrospray-Ionisation gezogen werden. Weiterhin sollte geprüft werden, ob die verantwortlichen Inhaltsstoffe gezielt bei der Probenaufarbeitung abgereichert werden können, um Matrixeffekte zu vermeiden.

Experimentalteil

Probenaufarbeitung. Unbelastete Bio-Proben von Orange, Weizenmehl, Blumenkohl, Karotte und Avocado wurden nach der ChemElut-Methode (DIN EN 15637:2008) und nach der QuEChERS-Methode (DIN EN 15662:2008) aufgearbeitet. ChemElut-Endextrakte wurden hergestellt wie in Kapitel 3.3 und QuEChERS-Extrakte wie in Kapitel 3.2 beschrieben. Es wurden QuEChERS-Rohextrakte (nach Ausfrieren von Wachsen und Fetten) und QuEChERS-Endextrakte (nach dispersiver Festphasenextraktion und Ansäuern mit Ameisensäure) abgefüllt.

Analysenstandards der Pflanzeninhaltsstoffe. Nobiletin, Citral, Geranylacetat, Citropten, Linalylacetat, Terpinylacetat, Osthol, Naringin, Naringenin, (+)-Carvon und 4-Cymen wurden bei Extrasynthese bestellt. 9(R),10(S)-Epoxyoctadeca-12(Z)-ensäure, 9(S),12(S),13(S)-Trihydroxyoctadeca-10(E)-ensäure und 15(R)-Hydroxyoctadeca-9(Z),12(Z)-diensäure wurden über Larodan bezogen. Scoparon, Palmitinsäure, 13-Hydroxykaur-16-en-19-säure, Aurapten, Nerylacetat, Citronellylacetat, Oxypeucedanin, alpha-Linolensäure, gamma-Terpinen, Valencen, Synephrin, E,E-Farnesol, Hesperetin, Isovitexin, Eleutherosid B, beta-Caryophyllen, Nomilin, trans-Kaffeesäure, Hesperidin, Limonin und trans-Nerolidol wurden bei PhytoLab bestellt. Sinensetin wurde von Phytoplan erhalten. (S)-(-)-Perillylalkohol, (S)-(-)-Perillaldehyd, 1-Monoolein und 1-Monolinolein wurden bei Sigma-Aldrich gekauft. Dihydrojasmonsäure und Methyl-dihydrojasmonat wurden bei TCI Europe bestellt. Alle Standards waren analysenrein.

Kombination aus Flüssigchromatographie und hochauflösender Massenspektrometrie (LC-HR-MS). Eine Accela HPLC-Anlage bestehend aus quaternärer Pumpe (Accela 1250) und Accela Autosampler mit integriertem Säulenofen (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) wurde über eine beheizte ESI-Quelle (HESI) mit einem Exactive-Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland) gekoppelt. Das Gerät wurde mit LC Quan-Software gesteuert. Die Massenkalibrierung wurde im positiven Ionenmodus mit den Referenzmassen 265,1479 amu und 1379,9908 amu erreicht. Es wurden 4 μ L Extrakt injiziert. Alle Messungen wurden im Full-Scan-Modus bei positiver Ionisierung über einen Massenbereich von m/z 100-2000 amu mit sehr hoher Massenauflösung der Orbitrap (100.000 FWHM) durchgeführt. Vor jeder Massentrennung wurden in der vorgeschalteten Ion Trap (C-Trap) des Massespektrometers innerhalb von \leq 100 ms maximal 1.000.000 Ionen aus der Ionenquelle gesammelt. Die Scanrate lag bei 1 Scan/Sekunde. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit dem QualBrowser der Xcalibur Software (Version 2.1). Die Minora-Software (Beta-Version) wurde zum Teil zur Berechnung untergrundbereinigter Spektren eingesetzt. Aliquote der identischen Extrakte wurden im Demolabor der Firma Agilent (Waldbronn, Deutschland) an einem Agilent 6530 Accurate Mass Q-TOF-Gerät gemessen. Dieses Massenspektrometer war mit einem HPLC-System vom Typ Agilent 1200 über eine Standard-ESI-Quelle gekoppelt. Der Time-of-Flight-(TOF)-Massenanalysator wurde im Full-Scan-Modus über einen Massenbereich von m/z 100-2000 amu und einer Massenauflösung von 20.000 (FWHM) bei positiver Ionisierung verwendet. Das Injektionsvolumen betrug 4 μ L. Die Massenkalibrierung wurde mit einer Mischung von HP-0921 und Purin in Acetonitril:Wasser (95:5, v:v) vorgenommen. Das System wurde mit MassHunter Software (Version B.03.01) gesteuert.

Kombination aus Flüssigchromatographie und Tandem-Massenspektrometrie (LC-ESI-MS/MS) mit Nachsäuleninfusion. Die Kontrollmessungen zu den für Matrixeffekte mutmaßlich verantwortlichen Inhaltsstoffen wurden mit dem detailliert in Kapitel 3.1 bis 3.3 beschriebenen, niedrig auflösenden API 2000 Triple Quadrupol Massenspektrometer mit Agilent 1100 HPLC, zusätzlicher isokratischer Pumpe (G1310A) und Backpressure Regulator (Upchurch Scientific, Oak Harbor, USA) durchgeführt. Die Nachsäuleninfusion erfolgte mit den gleichen 39 Pestiziden wie in der Publikation in Kapitel 3.2. Das Injektionsvolumen der Lösungen von Inhaltsstoffen lag bei 8 μL.

LC-Methode. Die Full-Scan-Spektren der hochauflösenden LC-MS-Geräte und die Matrixeffekt-Profile vom API 2000 wurden unter vergleichbaren Bedingungen registriert (Aliquote identischer Probenextrakte, gleicher LC-Gradient, ähnliche LC-Säule). Sowohl am Q-TOF 6530 als auch am API 2000 wurde eine identische Trennsäule (Aqua, 5 μ m, C18, 125 Å, 50 mm × 2 mm) (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) verwendet. Die Flussrate betrug 200 μ L/min. Am Exactive wurde eine ähnliche RP18-Säule, die für einzelne Peaks eine bessere Auflösung bot, (Synergi Fusion-RP, 2,5 μ m, 100 Å, 50 mm × 2 mm) (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) eingesetzt. Die Flussrate betrug 300 μ L/min. An allen drei Geräten war Eluent A Methanol/Wasser 1/4 (v/v) und Eluent B Methanol/Wasser 9/1 (v/v), beide mit 5 mM Ammoniumformiat. Der Gradient begann mit einem linearen Anstieg von 0 % auf 100 % B in 11 min. Der Anteil von B wurde für 12 min bei 100 % gehalten und dann in 2 min linear auf 0 % abgesenkt. Anschließend wurde die Säule 13 min mit 100 % A equilibriert. Aus Zeitgründen wurden die Messzeit im Demolabor von Agilent bei gleichbleibendem LC-Gradienten auf 22 min und die Equilibrierzeit der Säule auf 5 min verkürzt.

Strategie 1. Mittels Nachsäuleninfusion wurden am API 2000 die Matrixeffektprofile der Extrakte gemessen. Matrixeffektprofile und Totalionenstromchromatogramme der LC-HR-MS-Messungen verhielten sich oft wie Bild und Spiegelbild zueinander. Daher konnten Regionen starker Suppression im Matrixeffektprofil bestimmten Peaks in den Totalionenstromchromatogrammen der LC-HR-MS zugeordnet werden (siehe Abschnitt *Vergleich von Matrixeffektprofilen mit Full-Scan-Messungen*). Aus den Massenspektren im Bereich jedes relevanten (spiegelbildlichen) LC-HR-MS-Peaks wurden die Ionen identifiziert, die am wesentlichsten zum Totalionenstrom beitrugen und deren Retentionszeit im Extracted Ion Chromatogram (EIC) weniger als 0,1 min Retentionszeitabweichung zum Peakmaximum im Totalionenstrom (TIC) aufwiesen. Ionen, die nicht simultan mit TOF und Orbitrap gemessen wurden, blieben unberücksichtigt. Da jedes identifizierte Ion (richtiger: Quasimolekülion) eine [M+H]⁺, [M+NH₄]⁺ oder [M+Na]⁺ Struktur besitzen kann, wurden aus der jeweils gemessenen Ionenmasse die drei möglichen Massen für das Neutralmolekül [M] berechnet. Aus dem Dictionary of Food Compounds (DFC), einer online-Datenbank, die eine Suchfunktion über exakte Massen anbietet, mit ca. 50.000 eingetragenen Lebensmittelinhaltsstoffen (Chapman and Hall / CRC Press, London, England),¹³³ wurden Trefferlisten für alle Neutralmassen erstellt. Mit Hilfe von anschließenden Literaturrecherchen zu den Inhaltsstoffen der untersuchten Lebensmittel wurden aus den Trefferlisten der online-Datenbank die wahrscheinlichsten Kandidaten für den jeweiligen Extrakt ausgewählt. Insofern kommerziell erhältlich wurden Analysenstandards der Inhaltsstoffe beschafft und Lösungen in Acetonitril mit den aus Literaturangaben zu erwartenden Konzentration angesetzt. Zur Überprüfung, ob die ausgewählten Inhaltsstoffe, zur erwarteten Retentionszeit einen Matrixeffekt verursachen, wurden Matrixeffektprofile der Lösungen mittels Nachsäuleninfusion am API 2000 gemessen.

Strategie 2. Für kommerziell angebotene, typische Zitrusinhaltsstoffe wurden die exakten Massen als $[M+H]^+$, $[M+NH_4]^+$ und $[M+Na]^+$ berechnet. Anschließend wurde nach den entsprechenden Ionen in den hochaufgelösten Full-Scan-Chromatogrammen der Orangenextrakte gesucht. Waren Ionen mit dieser Masse sowohl in den Messungen mit dem Orbitrap Massenspektrometer als auch in denen des TOF-MS nachweisbar, wurde versucht, die entsprechenden Zitrusinhaltsstoffe zu beschaffen. Waren sie erhältlich, wurden die im Endextrakt der Orange zu erwartenden Konzentrationen recherchiert und entsprechende Lösungen in Acetonitril angesetzt. Mittels Nachsäuleninfusion wurde am API 2000 überprüft, ob die Inhaltsstoffe Matrixeffekte bei der Elektrospray-Ionisation verursachen.

Ergebnisse und Diskussion

Strategie 1 / Non-targeted Analyse. Die non-targeted Analyse unbekannter Substanzen mit hochaufgelösten Full-Scan-Messdaten ist ein neues Verfahren der Spurenanalytik mit LC-MS, für das bisher kaum Erfahrungen existieren. Ihre Anwendung im Rahmen dieser Dissertation zur Identifizierung der für Matrixeffekte verantwortlichen Stoffe und Stoffgruppen ergab unerwartet große Schwierigkeiten. Die Identifizierung der Hauptkomponenten war extrem zeitaufwendig. Die von den Geräteherstellern angebotene Software zur automatischen Erkennung zusammengehöriger Quasimolekülionen (z. B. [M+H]⁺, [M+NH₄]⁺ und [M+Na]⁺) sowie der dazugehörigen Isotopenpeaks (z. B. ¹³C, ³⁷Cl, ³⁴S) (*Molecular Features*) befand sich zum Zeitpunkt der Arbeit noch im Entwicklungsstadium und lieferte keine reproduzierbaren Substanzlisten. Daher musste auf ein aufwendiges manuelles Sichten der Massenspektren, manuelles Übertragen in Tabellen und eine manuelle Clusteranalyse zur Erkennung der zu einer Neutralmasse zugehörigen Ionenmassen zurückgegriffen werden.

Die Schwierigkeiten beruhten dabei nicht nur auf der Vielzahl der beobachteten Molecular Features (ca. 3000 – 6000 je Matrix). Die Identifizierungen wurden auch durch das häufige Fehlen von solchen Heteroatomen erschwert, die eine eindeutige Zuordnung von Massenpeaks zu Summenformeln über ein charakteristisches Isotopenmuster erleichtert hätten (es wurden vorwiegend nur CHO-Verbindungen gefunden). Letztlich fehlten umfangreiche, frei zugängliche Substanzbibliotheken mit Pflanzeninhaltsstoffen und es gab Schwierigkeiten bei der Beschaffung von Analysenstandards für eine abschließende Bestätigung von Hypothesen. Es wurde daher beschlossen im Rahmen der Arbeit nur die Messreihen zu zwei Matrices (Orange und Weizenmehl) auszuwerten.

Vergleich von Matrixeffektprofilen mit Full-Scan-Messungen. Es konnte für alle Probenextrakte gezeigt werden, dass sich das Matrixeffektprofil aus Messungen mit der Nachsäuleninfusion und der Totalionenstrom (TIC) aus Full-Scan-Messungen annähernd wie Bild und Spiegelbild zueinander verhalten. Abbildung 3 und 4 zeigen dies beispielhaft für Extrakte von Orange und Weizenmehl. Substanzen, die bei Full-Scan-Messungen einen deutlichen TIC-Peak erzeugen, sind mit hoher Wahrscheinlichkeit verantwortlich für die mittels Nachsäuleninfusion gleichzeitig beobachteten Signalsuppressionen. Beispiele für weitere Matrices sind im Anhang (Abb. A-1 bis -3) enthalten.

Bilanz der non-targeted Analyse von Orange. Eine tabellarische Zusammenfassung findet sich in Tabelle A-1 im Anhang. Die Untersuchung von 10 Peaks im Totalionenstrom der Full-Scan-Chromatogramme von Orange (TIC-Peaks # 1, 2a, 2b, 3a, 3b, 4-6, 7a und 7b in Abb. 3) zeigte insgesamt 39 intensive Ionensignale, die diese 10 TIC-Peaks erzeugten. Nach Berücksichtigung zusammengehöriger Quasimolekülionen ($[M+H]^+$, $[M+NH_4]^+$ oder $[M+Na]^+$ des identischen M) und dazugehöriger Isotopen- bzw. Fragmentpeaks ergaben sich insgesamt 21 unabhängige Signale, hervorgerufen durch unterschiedliche Ionen bzw. Ionengruppen. Bei jedem Signal konnte es sich um ein $[M+H]^+$, $[M+NH_4]^+$ oder $[M+Na]^+$ Addukt handeln. Da in 11 Fällen kein zugehöriges Addukt identifiziert werden konnte, ergaben sich aus den 21 unabhängigen Signalen unter den 10 TIC-Peaks nach Abzug der Masse von H, NH₄ bzw. Na insgesamt 43 Möglichkeiten für die Masse des Moleküls. Diese theoretisch möglichen 43 Neutralmassen der 21 unabhängigen Signale ergaben 275 Treffer für Lebensmittelinhaltsstoffe im Dictionary of Food Compounds (DFC). Die im DFC gefundenen Substanzen für eine einzelne Neutralmasse hatten meistens gleiche, manchmal aber auch unterschiedliche Summenformeln. Sobald mehr als eine Summenformel in der Trefferliste mit einer Neutralmasse übereinstimmte, wurde zusätzlich die theoretischen Isotopenverteilungen¹³⁴ mit dem gemessenen Mustern abgeglichen. Durch Vergleich der verbliebenen > 250 Substanzen mit publizierten Inhaltsstoffen von Orange wurden 20 Substanzen für einen experimentellen Abgleich ausgewählt. Diese kamen als Verursacher der Matrixeffekte in Frage, weil sie üblicherweise in Orangen enthalten sind und die aufgrund der Retentionszeit zu erwartende niedrige Polarität aufweisen. Für vier der unter den TIC-Peaks # 2a bzw. 4, # 3a bzw. 2b, # 6 und # 7a vermuteten Substanzen konnten Analysenstandards beschafft werden. Für die anderen 16 vermuteten Verursacher von Matrixeffekten waren kommerziell keine Standards erhältlich. Von den beschafften vier Substanzen wurden Lösungen hergestellt, die die Inhaltsstoffe mit der laut Literatur im Orangenextrakt zu erwartenden Konzentration enthielten. Die Untersuchung der Lösungen mittels LC-MS-Retentionszeitvergleich und Nachsäuleninfusion bestätigte für die Substanzen Sinensetin und Nobiletin die Richtigkeit der Strukturaufklärung. Beide Substanzen lieferten Matrixeffekte (Abb. 5b-c) genau zu den Retentionszeiten, die für die TIC-Peaks # 2 und # 3 in Abb. 3 zu erwarten waren. Die Lösungen der anderen beiden kommerziellen Inhaltsstoffe (1-Monolinolein und 1-Monoolein) erzeugten ebenfalls Signalsuppressionen zu ähnlichen Retentionszeiten wie der Orangenextrakt (Abb. 5e-f). Bei Wiederholungsmessungen konnten die deckungsgleichen Retentionszeiten mit der Signalsuppression des Orangenextrakts jedoch nicht sicher reproduziert werden.

Eine eindeutige Identifizierung der für Matrixeffekte verantwortlichen Inhaltsstoffe gelang daher nur für die Verursacher der Supressions- bzw. TIC-Peaks # 2 und # 3 in Abb. 3. Hierbei handelte es sich um die beiden stärksten Signalsuppressionen, die mit allen drei Aufarbeitungen der Orangenprobe auftraten.



Abbildung 3 (A) Matrixeffekt-Profil, (B) TIC eines Full-Scans vom Agilent 6530 Q-TOF und (C) TIC eines Full-Scans vom Thermo Fisher Scientific Orbitrap-MS für drei verschiedene Aufarbeitungen einer identischen *Orangenprobe* bei Anwendung der gleichen chromatographischen Methode. Die Trennsäule bei C bot für einzelne Peaks eine bessere chromatographische Auflösung. Die Retentionszeiten wurden mit einer an allen drei LC-MS-Geräten gemessenen Pestizidmischung miteinander korreliert.



Abbildung 4 (A) Matrixeffekt-Profil, (B) TIC eines Full-Scans vom Agilent 6530 Q-TOF und (C) TIC eines Full-Scans vom Thermo Fisher Scientific Orbitrap-MS für drei verschiedene Aufarbeitungen einer identischen *Weizenmehlprobe* bei Anwendung der gleichen chromatographischen Methode. Die Retentionszeiten wurden mit einer an allen drei LC-MS-Geräten gemessenen Pestizidmischung miteinander korreliert.



Abbildung 5 Matrixeffektprofil erhalten durch Injektion (A) und (D) der extrahierten Matrix aus 20 mg Orange bei Aufarbeitung nach der ChemElut-Methode, (B) von 200 ng Sinensetin, (C) von 200 ng Nobiletin, (E) von 2 µg 1-Monolinolein und (F) von 2 µg 1-Monoolein

Die Literatur enthält mehrere Hinweise auf die beiden Flavone, die als Verursacher von Matrixeffekten identifiziert wurden. Sowohl 3',4',5,6,7-Pentamethoxyflavon, $C_{20}H_{20}O_7$, (Trivialname: Sinensetin) als auch 3',4',5,6,7,8-Hexamethoxyflavon, $C_{21}H_{22}O_8$, (Trivialname: Nobiletin) sind als Inhaltsstoffe in der Schale von Orangen bekannt.¹³⁵⁻¹³⁸ Ihre Konzentration ist im Flavedo, der äußeren gelb-orangen Schicht der Fruchtschale, etwa 10 × höher als im Albedo, der inneren weißen Schicht der Fruchtschale.¹³⁹ Für beide Polymethoxyflavone wurden passende exakte Massen als $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ und $[2M+Na]^+$ gemessen. Darüber hinaus enthielten die Massenspektren übereinstimmende exakte Massen der Fragmentionen $[M+H-Me]^+$ und $[M+H-2OMe]^+$ für Sinensetin und des Fragmentions $[M+H-Me]^+$ für Nobiletin – den jeweils spezifischen Ionen der Polymethoxyflavone.¹³⁶

Auch wenn durch experimentellen Vergleich sichergestellt wurde, dass Sinensetin und Nobiletin die wahrscheinlichen Verursacher der Signalsuppression sind, kann nicht ausgeschlossen werden, dass weitere, nicht kommerziell erhältliche Inhaltsstoffe von Orange zur Signalsuppression im Bereich der TIC-Peaks # 2 - 4 beitragen. Neben Sinensetin, als hauptverantwortlichen Inhaltsstoff, könnte in geringerem Maße auch 3,3',4',5,7,8-Hexamethoxyflavon (isoliert aus der Schale von Valencia Orangen), 3,3',4',5,6,8-Hexamethoxyflavon (Bestandteil von *Citrus reticulata* / Mandarinen) oder 3,3',4',5,6,7-Hexamethoxyflavon (isoliert aus der Schale von Citrusarten) zum Supressions- bzw. TIC-Peak # 2 beitragen. Alle drei haben eine exakte Masse von 402,13147 amu und die Summenformel C₂₁H₂₂O₈. Zum Supressions- bzw. TIC-Peak # 3 könnten neben Nobiletin auch 4',5,6,7-Tetramethoxyflavon (isoliert aus Orangenschale) oder 4',5,7,8-Tetramethoxyflavon (Bestandteil von Citrusarten), beide 342,11034 amu

und $C_{19}H_{18}O_6$, und 3,3',4',5,6,7,8-Heptamethoxyflavon (isoliert aus Orangenschale) mit der exakten Masse 432.14204 amu und der Summenformel $C_{22}H_{24}O_9$ beitragen. Als Verursacher der Signalsuppression # 4 wird 3,4',6,7,8-Pentamethoxyflavon (Trivialname: Auranetin) (isoliert aus Orangenschale), mit einer exakten Masse von 372,12091 amu und der Summenformel $C_{20}H_{20}O_7$, angenommen. Da keine Analysenstandards beschaffbar waren, fehlt der abschließende Beweis, dass die oben genannten Kandidaten die vermutete Signalsuppression auslösen.

Für die Supressions- bzw. TIC-Peaks # 5-7 werden aus nachfolgenden Gründen Monoacylglyceride als Ursache angenommen. Es wird vermutet, dass Glycerol verestert (#5) mit C18:3 Δ 9,12,15 (alpha-Linolensäure), (#6) mit C18:2 Δ 9,12 (Linolsäure), (#7a) mit C16:0 (Palmitinsäure) und (#7b) mit C18:1 Δ 9 (Ölsäure) die Reihe der Signalsuppressionen verursacht. Die Möglichkeit eines Auftretens von Monoglyceriden in Zitrusfrüchten wird durch eine Studie¹⁴⁰ unterstützt, die über einen Gehalt von 2,4 % Monoglyceride in Orangenöl berichtet. Die von den Autoren ermittelten drei Hauptbestanteile der Monoglycerid-Fraktion (33 % C16:0, 31 % C18:1, 24 % C18:2) stimmt gut mit den berechneten Summenformeln für die Ionen überein, die mittels hochauflösender Massenspektrometrie bei den Retentionszeiten der Signalsupressionen # 5 - 7 beobachtet wurden. Es handelt sich genau um die Summenformeln der drei Monoacylglyceride, die mit den höchsten Konzentrationen in Orangenöl zu erwarten sind. Für die Hypothese der Monoacylglyceride spricht auch, dass die Signalsuppressionen im QuEChERS-Rohextrakt nach dem Ausfrieren von Wachsen und Fetten nicht mehr auftraten (siehe Abb. 3a). Warum die Retentionszeiten der durch Monolinolein und Monoolein hervorgerufenen Signalsuppression nicht genauso reproduzierbar waren wie bei Sinensetin und Nobiletin, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden. Es kann jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden, dass die Stellungsisomerie in 1- oder 2-Position des Glycerols einen Einfluss haben könnte und die Signalsuppressionen durch 2-Monoacylglyceride entstehen.

Bilanz der non-targeted Analyse von Weizenmehl. Für die Weizenmatrix wurden unter 6 TIC-Peaks 22 unabhängige Signale festgestellt. Die daraus abgeleiteten 52 Möglichkeiten für die Masse des Moleküls ergaben 423 Treffer im Dictionary of Food Compounds. Darunter ergaben sich in der Literatur in 23 Fällen deutliche Hinweise, dass es sich dabei um Inhaltstoffe von Weizen handelt. Für 8 der Stoffe konnten Standards beschafft und mit der Nachsäuleninfusion auf Matrixeffekte untersucht werden. Dabei wurde 9(S),12(S),13(S)-Trihydroxyoctadeca-10(E)-ensäure als verursachender Inhaltsstoff für die Signalsuppression #1 nachgewiesen (Abb. 6c). Hierbei handelt es sich um ein Produkt des Linolsäure-Metabolismus.¹⁴¹ Linolsäure macht den wesentlichen Anteil (etwa 60 %) der Fettsäurezusammensetzung von Weizenmehl aus.¹⁴²⁻¹⁴⁵ Die durch Lipoxygenase aus Linolsäure enzymatisch gebildete 9- (oder 13)-Hydroperoxyoctadeca-10,12-diensäure wurde bereits in Suspensionen von Weizenmehl nachgewiesen.^{146,147} Über die Zwischenstufe 12,13-Expoxy-9-hydroxy-octadeca-10-ensäure entsteht durch Hydroly-9(S),12(S),13(S)-Trihydroxyoctadeca-10(E)-ensäure.^{141,146} Die anderen 7 Kandidaten se (Dihydrojasmonsäure,¹⁴⁸⁻¹⁵⁰ Methyldihydrojasmonat,¹⁴⁸⁻¹⁵⁰ 15(R)-Hydroxyoctadeca-9(Z),12(Z)diensäure,¹⁵¹ 9(R),10(S)-Epoxyoctadeca-12(Z)-ensäure,¹⁵² alpha-Linolensäure,^{142,144,145} Palmitinsäure^{142,144,145} und 13-Hydroxykaur-16-en-19-säure¹⁵³⁻¹⁵⁵ lieferten Signalsuppressionen zu anderen Retentionszeiten als erwartet (Abb. 6). Eine tabellarische Zusammenfassung der non-targeted Analyse von Weizenmehl ist im Anhang enthalten (Tab. A-2).

Die übrigen vermuteten Inhaltsstoffe, die mangels Beschaffbarkeit von Analysenstandards nicht auf die Verursachung der Matrixeffekte geprüft werden konnten, waren:

- für Supressions- bzw. TIC-Peak #1: 16-Hydroxyoctadeca-9,12,14-triensäure, 10-Oxooctadeca-11-en-13-olid, 13-Hydroxy-10-oxooctadeca-11-ensäure, 5,8,12-Trihydroxyoctadeca-9-ensäure, *ent*-6,7,17-Trihydroxy-kauran-19-säure und *ent*-9,16,17-Trihydroxy-kauran-19-säure,
- für Supressions- bzw. TIC-Peak #2: Octadeca-9,11-dien-13-olid, 4,8,12-Trimethyltrideca-3,7,11ensäureethylester, 13-Oxo-octadeca-9-ensäure, verschiedene Dihydroxyoctadecensäuren, verschiedene Hydroxyhexadecansäuren und Hexadecandisäureester und
- für Supressions- bzw. TIC-Peak # 3: 15,16-Epoxy-3-hydroxy-2-kauranon und 15-Hydroxykaur-16en-19-säure.

Auswertung nach Strategie 2. Für Zitrusfrüchte wurden in der Literatur eine große Zahl typischer Inhaltsstoffe identifiziert. Davon wurden 28 Stoffe beschafft, nachdem deren exakte Massen in Orangenextrakten nachgewiesen werden konnten. Erst danach wurde geprüft, ob diese Stoffe störende Matrixeffekte bei der Elektrospray-Ionisation hervorrufen. Es wurden Lösungen mit den im Orangenextrakt zu erwartenden Konzentrationen angesetzt. Bei der Nachsäuleninfusion wurden für 13 Inhaltsstoffe die erwarteten Signalsuppressionen zum erwarteten Zeitpunkt festgestellt. Es handelte sich dabei um Oxypeucedanin,¹⁵⁶ Citral,^{157,158} Citropten,¹⁵⁹ Linalylacetat, Osthol,¹⁶⁰ Synephrin, E,E-Farnesol, Hesperetin,¹⁶¹ Eleutherosid B, Nomilin,¹⁶² Hesperidin,^{163,164} Limonin¹⁶⁵ und Poncirin.¹⁶⁶ Für weitere 6 Stoffe traten Matrixeffekte bei einer höheren Konzentration als in der Literatur für Orange beschrieben auf: Naringin,¹⁶⁷ Isovitexin, Scoparon,¹⁶⁸ Geranylacetat,¹⁵⁷ Naringenin,^{167,169} und trans-Nerolidol¹⁷⁰. Weitere 9 Stoffe erzeugten bis zu einer Injektion von 2 µg keinen Matrixeffekt: Nerylacetat¹⁵⁷ Citronellylacetat,¹⁵⁷ Terpinylacetat,¹⁵⁷ (+)-Carvon, 4-Cymen, gamma-Terpinen,¹⁵⁷ beta-Caryophyllen,¹⁵⁷ trans-Kaffeesäure¹⁷¹ und Valencen. Damit erwies sich die zweite Strategie trotz geringerem Aufwand als erfolgreicher bei der Identifizierung von Pflanzeninhaltsstoffen, die zu Matrixeffekten führen.

Stoffe und Stoffklassen, die Matrixeffekte verursachen. Die Strukturformeln aller 31 identifizierten Verursacher von Matrixeffekten sind im Anhang 6.2 aufgeführt. Als häufigtste Stoffklassen wurden Flavone, Flavanone und deren Glykoside, Cumarine, (substituierte) Fettsäuren, Monoacylglyceride, Jasmonate sowie einige Terpene ermittelt. Für eine Diskussion bzgl. des Mechansimus von Matrixeffekten und deren Vermeidung mittels gezielt verbesserter Probenaufarbeitung sei auf Kapitel 4 hingewiesen.



Abbildung 6 Matrixeffektprofil erhalten durch Injektion (A) und (F) der extrahierten Matrix aus 10 mg Weizenmehl bei Aufarbeitung nach der ChemElut-Methode, (B) von 2 µg Dihydrojasmonsäure (Kandidat für ME #1), (C) von 100 ng 9(S),12(S),13(S)-Trihydroxyoctadeca-10(E)-ensäure (Kandidat für ME #1), (D) von 2 µg Methyldihydrojasmonat (Kandidat für ME #1), (E) von 115 ng 15(R)-Hydroxyoctadeca-9(Z),12(Z)-diensäure (Kandidat für ME #2), (G) von 600 ng 9(R),10(S)-Epoxyoctadeca-12(Z)-ensäure (Kandidat für ME #2), (H) von 1 µg alpha-Linolensäure (Kandidat für ME #2), (I) von 2 µg Palmitinsäure (Kandidat für ME #2) und (J) von 2 µg 13-Hydroxykaur-16-en-19-säure (Kandidat für ME #3). A-D gemessen mit der simultanen Nachsäuleninfusion von 39 Pestiziden und E, G-J von 3 Pestiziden (Carbendazim, Pirimicarb und Terbutryn). Zur Nomenklatur der Matrixeffekte (ME) siehe Abb. 4. Nur C lieferte die Signalsuppression zur erwarteten Retentionszeit.

3.5 Matrixeffekte bei negativer Elektrospray-Ionisation

Das Kapitel fasst bisher unveröffentlichte Ergebnisse der Dissertation zusammen.

Zielstellung

Die LC-MS-Analytik von Pestiziden läuft in rund 90 % der Fälle bei positiver Elektrospray-Ionisation ab. Etwa 10 % der Pestizide benötigen jedoch die negative Ionisierung zur Detektion. Es wurde untersucht, ob ein Einfluss der Ionisierungspolarität auf Matrixeffekte besteht. Dazu wurden die Effekte derselben 20 Obst- und Gemüseextrakte, die in Kapitel 3.1 bereits bei positiver Ionisierung untersucht worden waren, auf 50 im negativen Ionenmodus detektierbare Pestizide gemessen. Die Untersuchung erfolgte auf konventionelle Weise, d. h. mit Matrixstandards, und mit der Nachsäuleninfusion von Analyten. Außer dem Wechsel der Ionisierungspolarität und der detektierbaren Analyte wurden die gleichen Bedingungen wie bei der Bestimmung mit positiver Ionisierung eingehalten.

Experimentalteil

Pestizidstandards. 2,4-D, 2,4-DB, 2-Naphthoxyessigsäure, 4-Chlorophenoxyessigsäure, Acifluorfen, Bentazon, Bromadiolon, Bromoxynil, Chlorophacinon, Clopyralid, Cyclanilid, Cycloxydim, Dicamba, Dichlorprop-P, Difenacoum, Diflubenzuron, Diflufenzopyr, Dinoseb, Dinoterb, Dithianon, Endosulfansulfat, Fenoprop, Fenoxaprop, Fipronil, Fluazifop (freie Säure), Fluazinam, Fludioxonil, Fluroxypyr, Flusulfamid, Fosetyl-Aluminium, Haloxyfop (freie Säure), Hexaflumuron, Inabenfid, Ioxynil, MCPA, MCPB, Mecoprop, Picloram, Propanil, Thiazafluron, Topramezon, Triclopyr und Triflumuron wurden über Ehrenstorfer (Augsburg, Deutschland) bezogen. Chlorpropham und Maleinsäurehydrazid wurden bei Riedel-de-Haën (Seelze, Deutschland) und DNOC bei der früheren Schering AG (Berlin, Deutschland) gekauft. Methoxyfenozid wurde von der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA) (Braunschweig, Deutschland) und Clethodim sowie 5-Hydroxy-Clethodim-Sulfon von Tomen Agro (San Francisco, USA) erhalten. Flocoumafen wurde über ChemService (West Chester, USA) bezogen. Alle Standards waren analysenrein.

Probenextrakte. Es wurden die identischen ChemElut-Extrakte wie bei der Untersuchung zum Einfluss der Analyteigenschaften auf Matrixeffekte bei positiver Ionisierung verwendet (Kap. 3.1): (i) Proben mit hohem Wassergehalt: Apfel, Birne, Pflaume, Aubergine, Paprika, Rucola, Erbsen, Speisezwiebel, Kartoffel, Blumenkohl, Karotte, Porree, (ii) Proben mit niedrigem Wassergehalt: Weizenmehl, Rosinen, (iii) Proben mit hohem Ölgehalt: Avocado, Leinsamen, (iv) Proben mit hohem Säuregehalt: Orange, Grape-fruit, Himbeeren und (v) Schwierige Proben: Schwarzer Tee. Alle Proben waren Bio-Proben und frei von den Pestiziden, auf die später untersucht wurde.

Messung der Matrixeffekte. Bei der Bestimmung auf konventionelle Art wurden analog zur Messung bei ESI(+) Lösungsmittelstandards und Matrixstandards in einer Konzentration von 100 ng/mL in 5-fach-Bestimmung angesetzt. Der Pestizidgehalt lag mit 0,05 mg/kg für wasserhaltige Proben und 0,1 mg/kg für trockene Proben im Bereich typischer Rückstandshöchstmengen. Für die Bestimmung mit der Nachsäuleninfusion wurde eine Infusionsmischung aus 50 Pestiziden (siehe Tab. A-3, Anhang 6.3) in einer Konzentration von 200 ng/ml in Methanol/Wasser 1/1 (v:v) mit 5 mmol/l Ammoniumformiat hergestellt. Die höhere Konzentration im Vergleich zur Messung bei positiver Ionisierung war notwendig zum Ausgleich der schlechteren Messempfindlichkeit bei ESI(-). Mit 50 Pestiziden waren nahezu alle bei negativer Ionisierung messbaren Pestizide erfasst.

LC-MS/MS. Es wurde dasselbe API 2000 Triple Quadrupol MS mit Agilent 1100 LC, zusätzlicher Infusionspumpe und identischer Turbo Ion ESI-Quelle wie bei der Messung im ESI(+)-Modus eingesetzt. Alle Gasflüsse und –temperaturen entsprachen denen bei positiver Ionisierung. Die ESI-Spannung betrug +5500 V bei ESI(+) und -5500 V bei ESI(-), um vergleichbare Bedingungen einzuhalten. Die chromatographische Methode war bei beiden Ionisierungsmodi identisch. Zur Verifizierung der Befunde wurde bei negativer Ionisierung zusätzlich zur Aqua-Säule (Aqua 5 µm, C18, 125 Å, 50 mm × 2 mm) eine Synergi Fusion-RP18-Säule (Synergi Fusion-RP 2,5 µm, 100 Å, 50 mm × 2 mm) (beide Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) eingesetzt. Die Flussrate lag bei 200 µl/min.

Ergebnisse und Diskussion

Präzision der Nachsäuleninfusion im ESI(-). Die 15-fache Wiederholung der Messung eines Matrixeffektprofils ergab für Weizenmehl (trockene Matrix) eine mittlere Abweichung um ± 8 % Matrixeffekt, für Avocado (ölreiche Matrix) um ± 8 % Matrixeffekt, für Rucola (wasserhaltige Matrix) um ± 10 % Matrixeffekt und für Orange (saure Matrix) um ± 9 % Matrixeffekt. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Matrixgruppen. Bei der Berechnung wurde zunächst für jeden einzelnen Messzeitpunkt eines Profils die Standardabweichung des Matrixeffekts für 15 Wiederholungsmessungen ermittelt. Im zweiten Schritt wurden alle 612 Einzelstandardabweichungen innerhalb der gesamten Messzeit von 28 min gemittelt (Median). Zum Schluss wurde aus den mittleren Standardabweichungen aller Analyte der Median gebildet. Die Präzision lag im Rahmen normaler LC-MS/MS-Messungen. Damit arbeitet die Nachsäuleninfusion bei negativer Ionisierung genauso reproduzierbar wie im positiven Ionenmodus.

Matrixeffektprofile identischer Probenextrakte bei ESI(+) *und* ESI(-). Bei beiden Ionisierungsmodi wurde die Analytionisierung durch Probenmatrix gestört. Die Störeffekte bei negativer Ionisierung wiesen jedoch ein grundlegend anderes Verhalten als bei positiver Elektrospray-Ionisation auf. Die Unterschiede betrafen erstens das "Muster" im gemessenen Matrixeffektprofil. In Retentionszeitbereichen, in denen bei ESI(+) starke Signalsuppressionen beobachtet wurden, liefen bei ESI(-) z. T. keine oder gegensätzliche Prozesse ab. Abb. 7 zeigt die Unterschiede am Beispiel der Avocado- und Weizenmatrix. Auffällig war das häufige Auftreten von Signalerhöhungen bei negativer Ionisierung von teilweise sehr hohem Ausmaß. Zum Beispiel wurde für 5-Hydroxy-Clethodim-Sulfon durch Bestandteile in fermentiertem Tee eine Erhöhung der Signalintensität um bis zu 706 % gemessen (RT = 6.0 min). Bei positiver Ionisierung wurden fast ausschließlich Suppressionen der Analytsignale beobachtet.

Einfluss der Analyteigenschaften auf Matrixeffekte. Grundsätzlich verschieden verhielten sich die Matrixeffekte zweitens auch hinsichtlich ihrer Analytabhängigkeit. Während für die positive Elektrospray-Ionisation im Rahmen der Arbeit zum ersten Mal nachgewiesen werden konnte, dass nur geringe Unterschiede in den Matrixeffekten selbst sehr verschiedener Analyte bestehen, bestätigte sich für den negativen Betriebsmodus der ESI-Quelle das Bild vom analytabhängigem Matrixeffekt. Die 50 im negativen Modus untersuchten Pestizide reagierten auf dieselben Matrixbestandteile zum Teil entgegengesetzt. Während manche Pestizide Signalsuppressionen erlitten, wiesen zeitgleich andere Signalerhöhungen auf. Durch die simultane Infusion der Pestizide waren identische Spraybedingungen gegeben. Abbildung 8



Abbildung 7 Matrixeffektprofile erhalten (A) bei positiver Elektrospray-Ionisation und (B) bei negativer Elektrospray-Ionisation für je 50 simultan infudierte Pestizide bei Injektion eines identischen Extrakts von Avocado (links) und von Weizenmehl (rechts).

zeigt den Unterschied in der Ähnlichkeit der Matrixeffektprofile verschiedener Analyte bei positiver und bei negativer Ionisation am Beispiel der Orange. Betrachtet man den Matrixeffekt, den die Orangenmatrix zur Retentionszeit von 19,4 min auslöste, so erlitten die sechs willkürlich ausgewählten Pestizide bei positiver Ionisation Matrixeffekte zwischen -35 % und -47 %. Bei negativer Ionisation betrug der Matrixeffekt zur selben Retentionszeit für Cyclanilide +254 %, Flocoumafen +116 %, Clethodim +104 %, Propanil 0 %, Ioxynil -16 % und für Fluazinam -42 %. Die deutlich beobachteten Unterschiede zwischen den Matrixeffekten verschiedener Analyte bei negativer Elektrospray-Ionisation waren keine zufälligen Messergebnisse, sondern wurden reproduzierbar an zwei RP18-Säulen erhalten.

Bezüglich Protonenaffinität, Polarität, Oberflächenspannung und Anzahl verschiedener Substanzklassen, variierten die 50 im ESI(-) auf Matrixeffekte untersuchten Pestizide ähnlich stark wie die 140 im ESI(+) gemessenen Pestizide (siehe Tab. A-3). Die pK_s-Werte lagen im Bereich von 2,0 (Dicamba) und 7,3 (Fluazinam). Die log K_{OW}-Werte schwankten zwischen -2,1 (Fosetyl-Aluminium) und +6,1 (Flocouma-fen). Die Oberflächenspannung lag zwischen 39 mN/m (Clethodim) bis 94 mN/m (Dithianon). Es wurden Pestizide aus 23 Substanzklassen (Phenoxycarbonsäuren, Benzylharnstoffe, Dinitrophenole, Hydroxy-benzonitrile, Pyridincarboxylsäuren ...) erfasst. In Streudiagrammen (Abb. A-4, Anhang 6.3) konnte jedoch kein Trend zwischen der Stärke des Matrixeffekts und den oben genannten Analyteigenschaften festgestellt werden. Welche anderen spezifischen Eigenschaften der Analyte für deren verschieden starke und z. T. gegensätzlichen Matrixeffekte bei negativer Ionisation verantwortlich waren, konnte aus



Abbildung 8 Matrixeffektprofile für je sechs von 50 simultan infudierten Pestiziden erhalten durch Injektion eines identischen Orangenextrakts (A) bei positiver Elektrospray-Ionisation mit immer gleichem Muster an Suppression aller Analytsignale (B) bei negativer Elektrospray-Ionisation mit verschiedenen Mustern aus Signalsuppressionen und – erhöhungen in Abhängigkeit vom Analyten.

Zeitgründen in dieser Arbeit nicht weiter untersucht werden. Der genaue Ablauf der negativen Elektrospray-Ionisation wurde bisher noch nicht beschrieben. Die Beobachtungen aus dieser Arbeit legen nahe, dass sich die ablaufenden Prozesse bei der negativen Elektrospray-Ionisation um mehr als nur die Polarität der beteiligten Ionen unterscheiden.

Vergleich zwischen konventionell bestimmten Matrixeffekten und Matrixeffekten aus der Nachsäuleninfusion. Die Unterschiede zwischen Matrixeffekten bei positiver und negativer Elektrospray-Ionisation betrafen drittens die Überstimmung zwischen den Effekten, die konventionell, d. h. über den Responseunterschied zwischen Lösungsmittel- und Matrixstandards, oder mit der Nachsäuleninfusion von Analyten gemessen wurden. Von den im negativen Modus insgesamt 590 auswertbaren Analyt/Matrix-Kombinationen wurden mit der konventionellen Methode in 81 Fällen Suppressionen der Analytsignale (ME < -20 %) gemessen (siehe Abb. 9). Dieselben Analyt/Matrix-Kombinationen ergaben mit der Nachsäuleninfusion in nur 26 Fällen Signalsuppressionen, davon 13 in übereinstimmender Höhe. Als Übereinstimmung galt jeder konventionelle Effekt, der dem Matrixeffekt aus der Nachsäuleninfusion mit einer Differenz von weniger als ± 10 % entsprach. Besonders auffällig waren die vielen konventionell bestimmten Signalerhöhungen, die mit der Nachsäuleninfusion nicht wiedergefunden wurden. Von 317 Analyt/Matrix-Kombinationen mit konventioneller Signalerhöhung (ME > 20 %) wiesen mit der Nachsäuleninfusion nur 28 Erhöhungen der Analytsignale auf. Davon waren 13 in übereinstimmender Höhe. Wenn bei negativer Elektrospray-Ionisation mit der konventionellen Methode Effekte festgestellt wurden, lag die Übereinstimmungsquote mit der Nachsäuleninfusion demnach bei nur ~ 6 %. Nur wenn konventionell kein Matrixeffekt gemessen wurde, betrug die Übereinstimmung mit der Nachsäuleninfusion wieder 92 %. Während die Methode der Nachsäuleninfusion von Analyten nur die Matrixeffekte, die in der Elektrospray-Ionenquelle stattfinden, wiedergibt, erfasst die konventionelle Methode zusätzlich Effekte, die während der Flüssigchromatographie auftreten können. Aus den Matrixeffektprofilen der 20 Obstund Gemüseextrakte ist zwar bekannt, dass auch in der ESI-Quelle signifikante Matrixeffekte stattfanden (siehe Abb. 7, 8), diese traten aber meist nicht zu den Retentionszeiten der Pestizide auf.

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurde sowohl für die Methode der Nachsäuleninfusion als auch für die konventionelle Methode Matrixeffekte zu messen nachgewiesen. Die Messung der Matrixeffektprofile wurde für 50 Analyte und 4 Matrices aus verschiedenen Matrixgruppen 15-fach wiederholt und die Präzision bestimmt (siehe Abschnitt Präzision der Nachsäuleninfusion im ESI(-)). Die Messung der konventionellen Effekte wurde für 50 Analyte und 20 Matrices 5-fach wiederholt, um präzise Messergebnisse sicherzustellen. Die beobachteten Unterschiede zwischen den konventionell bestimmten Effekten und den mit der Nachsäuleninfusion gemessenen Matrixeffekten traten systematisch auf. Sie bestätigten sich auch bei der Wiederholung des Methodenvergleichs auf einer zweiten RP18-Säule am Beispiel der Karotten- und der Avocadomatrix. Sie lassen sich gegenwärtig nur durch bisher unbekannte zusätzliche Effekte vor der Ionisierung, d. h. bei der Chromatographie, erklären. Leider waren Experimente zum Beweis dieser These aus Zeitgründen nicht mehr möglich. Diese Arbeit konzentrierte sich auf Matrixeffekte, die bei der Elektrospray-Ionisation stattfinden.



Abbildung 9 Histogramme der bei negativer Elektrospray-Ionisation auftretenden Matrixeffekte (A) gemessen nach der konventionellen Methode über einen Responsevergleich von Lösungsmittel- und Matrixstandards und (B) gemessen mit der neuen Methode der Nachsäuleninfusion von Analyten.

3.6 Matrixeffekte von Trink- und Oberflächenwässern

Das Kapitel fasst bisher unveröffentlichte Ergebnisse der Dissertation zusammen.

Zielstellung

Im Kapitel 3.1 wurde für die LC-ESI-MS-Analytik positiv geladener Ionen zum ersten Mal eine starke Abhängigkeit des Matrixeffekts von der Retentionszeit der Analyte, aber eine weitgehende Unabhängigkeit von anderen Analyteigenschaften, festgestellt. Die am Beispiel von Lebensmittelproben pflanzlicher Herkunft erzielten Ergebnisse sollten für eine andere Matrixart verifiziert werden, um die Allgemeingültigkeit der Beobachtung nachzuweisen. Dazu wurden die Matrixeffekte, die drei Trink- und drei Oberflächenwässer während der positiven Elektrospray-Ionisation von 140 Pestiziden verursachten, mit der Nachsäuleninfusion gemessen und systematisch miteinander verglichen. Am Beispiel eines Oberflächenwassers wurde die Übereinstimmung mit konventionell gemessenen Matrixeffekten überprüft.

Experimentalteil

Probenahme. Die Entnahme der Trinkwasserproben erfolgte beim Endabnehmer an den Standorten Berlin (Steglitz-Zehlendorf), Oldenburg (Niedersachsen) und Tangermünde (Sachsen-Anhalt). Die Trinkwässer wurden nach 30 min Spülen aus der Entnahmearmatur in Glasflaschen abgefüllt. Ablagerungen durch Stehen des Wassers in Rohrleitungen gelangten nicht in die Probe. Die Oberflächenwässer wurden in Ufernähe aus der Elbe (bei Tangermünde), der Havel (an der Schleuse Berlin-Spandau) und dem Großen Wannsee (in Berlin) direkt unter der Wasseroberfläche entnommen.

Charakterisierung der Trink- und Oberflächenwässer. Der pH-Wert, die Leitfähigkeit, der Gehalt an organisch gelöstem Kohlenstoff (DOC) und die Absorption im UV-Bereich ($\lambda = 254$ nm) wurden am Institut für technischen Umweltschutz der Technischen Universität Berlin durch Mitarbeiter im Fachbereich für Wasserreinhaltung gemessen. Die Ergebnisse wurden freundlicherweise für die Arbeit zur Verfügung gestellt.

Probenvorbereitung. Die Proben wurden nach dem Schema in Abb. 10 aufgearbeitet. Die Oberflächenwässer wurden zur Entfernung von Schwebstoffen mit Durapore HV, 0,45 μm Filtern (Millipore, Schwalbach, Deutschland) membranfiltriert. Oberflächen- und Trinkwässer wurden anschließend durch eine Festphasenextraktion (SPE)¹⁷² an Oasis HLB 6 cc Kartuschen mit 500 mg polymeren Umkehrphasensorbent (Nr. 186000115, Waters, Milford, USA) 100-fach angereichert. Die wässrigen SPE-Eluate wurden durch Acrodisc PSF GxF/GHP, 0.45μm Spritzenfilter (PALL, Dreieich, Deutschland) in Vials abgefüllt und zur Messung eingesetzt.

Alternativ zur Aufkonzentrierung durch SPE wurde eine Vakuumzentrifuge vom Typ A-160 SpeedVac Concentrator (Savant Instruments, New York, USA) eingesetzt. Die Temperatur in der Thermokammer betrug 50 °C. Die Drehzahl lag bei ~ 1560 U/min. Nach einer maximalen Anreicherungszeit von 6,5 Stunden waren die Trinkwässer 50-fach und die Oberflächenwässer 25-fach angereichert. Der Anreicherungsfaktor wurde durch Differenzwägung ermittelt. Geringfügige Unterschiede wurden durch Zugabe von Reinstwasser ausgeglichen.



- STEP 1 Durapore[®] membrane filter, 0.45µm HV (Millipore, Schwalbach, Germany), material: polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane
- STEP 2 OASIS® HLB 6cc cartridges (Waters, Milford, Mass USA), sorbent: poly(divinylbenzene)-co-N-vinylpyrrolidone
- STEP 3 Acrodisc PSF GxF/GHP 0.45µm syringe filters (PALL, Dreieich, Germany), material: glass fiber prefilter and polypropylene (PP) membrane

Abbildung 10(A) Gesamtübersicht zur Aufarbeitung der Wasserproben mit Membranfiltration (nur Oberflächen-
wässer) (Schritt 1), Festphasenextraktion (Schritt 2) und Filtration durch Spritzenfilter (Schritt 3) (B) Durchführung der
Festphasenextraktion.

Pestizidstandards. Analog zum Vorgehen für Publikation [173] wurden drei Mischungen aus 140 Pestiziden hergestellt.

LC-MS/MS. Dasselbe Gerät, das für Lit. [173] verwendet worden war, wurde mit denselben LC- und MS-Methoden auch zur Untersuchung der Trink- und Oberflächenwässer eingesetzt. Nur das Injektionsvolumen betrug abweichend 80 μ l bei konventioneller Bestimmung und 100 μ l bei Messungen mit Nachsäuleninfusion und war damit um den Faktor 10 höher. Die Gerätesteuerung erfolgte mit der neueren Softwareversion Analyst 1.5.1.

Konventionelle Messung der Matrixeffekte. Matrixstandards und matrixfreie Referenzstandards wurden in drei Ansätzen auf eine Konzentration von 10 ng/ml dotiert. Ein Volumen von 40 μ L einer 50 ng/ml Pestizidmischung in Methanol/Wasser 1/1 (v/v) wurde zu 160 μ L Probenextrakt bzw. Reinstwasser dotiert. Die 25-prozentige Verdünnung der Probe beim Dotieren wurde durch eine entsprechende Erhöhung des Injektionsvolumens ausgeglichen, damit bei der konventionellen Bestimmung dieselbe Matrixmenge auf die Säule injiziert wurde. Messung der Matrixeffekte mit Nachsäuleninfusion. Die Arbeitsweise war dieselbe wie bei der Untersuchung von Matrixeffekten, die durch Lebensmittel pflanzlicher Herkunft ausgelöst werden (Details siehe Kapitel 3.1). Zur Vermeidung sehr starker Verschmutzungen der Curtain-Platte und des Massenspektrometers durch die Salzfracht wurde der LC-Fluss bei der Untersuchung der Trink- und Oberflächenwässer während der ersten vier Minuten jeder Messung über ein Schaltventil in den Abfall geleitet. Die Matrixeffektprofile beginnen daher ab der 4. Minute der Messungen.

Statistische Auswertung. Folgende Berechnungen wurden durchgeführt: (i) Mittelwertberechnung des Matrixeffektes für jeden individuellen Analyten während der 4.-20. Minute einer Messung (Elutionszeit der Analyte), (ii) Bildung einer Rangliste der 140 verschiedenen Pestizide entsprechend ihrer berechneten mittleren Matrixeffekte, (iii) Bestimmung der Matrixeffektprofile, die dem 2,5. und 97,5. Perzentil entsprechen, da eine symmetrische Verteilung vorlag, und (iv) Berechnung des Perzentilabstands zwischen diesen beiden Matrixeffektprofilen zu jedem Messzeitpunkt.

Ergebnisse und Diskussion

Matrixeffekte verursacht durch exogene Substanzen. Bei der Aufarbeitung der Trink- und Oberflächenwässer mittels Festphasenextraktion und Filtration wurden zunächst sehr starke Signalsuppressionen bis zu 85 % detektiert. Damit wurden die häufiger in der Literatur beschriebenen starken Effekte^{20,22,42,174-178} anfänglich bestätigt. Dann wurden gleichstarke Matrixeffekte allerdings auch für Kontrollproben mit hochreinem Wasser, die auf identische Art angereichert und filtriert worden waren, beobachtet. Durch Messungen mit der Nachsäuleninfusion konnte nachgewiesen werden, dass die beobachteten starken Matrixeffekte in Trink- und Oberflächenwasser durch eine Kontamination der Proben mit wasserlöslichen Substanzen aus den bei der Aufarbeitung verwendeten Verbrauchsmaterialien verursacht worden waren. Abbildung 11 zeigt als kritische Verbrauchsmaterialien Membranfilter, Festphasenkartuschen und Spritzenfilter.

Die Matrixeffekte verschwanden erst, wenn die Membranfilter mit 100 ml und die Spritzenfilter mit 30 ml Reinstwasser vorgewaschen wurden. Zur Vermeidung zusätzlicher Matrixeffekte aus den verwendeten Arbeitsmaterialien, sollte die Probenaufarbeitung auf so wenige Arbeitsschritte wie möglich beschränkt werden. Bei ausreichender Messempfindlichkeit des Massenspektrometers wird eine Direktinjektion der Proben empfohlen. Andernfalls ist darauf zu achten, das Wasser für Referenzstandards auf gleiche Weise zu behandeln wie die meist komplexeren Proben, d. h. zum Beispiel ebenfalls membranzufiltrieren.



Abbildung 11 Blindwertproblem bei der Messung von Matrixeffekten hervorgerufen durch unbekannte exogene Substanzen, die aus Verbrauchsmaterialien ausgewaschen wurden. Die Matrixeffektprofile von 50 simultan infudierten Pestiziden wiesen bei Reinstwasser (i) ohne eine Behandlung (oben, links) keine Effekte auf, (ii) nach einer Membranfiltration (oben, rechts) eine mittelstarke Signalsuppression um 15 min Retentionszeit, (iii) nach einer Festphasenextraktion (unten, links) mehrere mittelstarke Signalsuppressionen über das gesamte Chromatogramm verteilt oder (iv) nach einer Filtration durch Spritzenfilter (unten, rechts) viele starke Signalsuppressionen bis zu 85 % über das gesamte Chromatogramm.

Matrixeffekte verursacht durch endogene Wasserinhaltsstoffe. Im Unterschied zu Obst- und Gemüseproben, die sehr unterschiedliche Matrixeffektprofile aufweisen,^{89,173} war bei den Trink- und Oberflächenwässern das Muster in den Matrixeffektprofilen immer gleich. Wurden die Proben in der Vakuumzentrifuge angereichert, trat ein 12 min breiter Bereich gleichmäßiger Signalsuppression auf. Dabei unterschieden sich die Wässer deutlich in ihrem Gehalt an Huminsäuren und anorganischen Salzen. Der DOC-Gehalt der sechs Proben deckte einen Bereich von 2,7 bis 12,1 mg/l ab. Der spektrale Absorptionskoeffizient bei 254 nm variierte zwischen 0,0291 und 0,1796. Die pH-Werte lagen zwischen 7,43 und 8,42. Die Leitfähigkeit als Maß für den Gehalt an gelösten Ionen schwankte zwischen 268 und 1323 μS. Die Stärke der Signalsuppression korrelierte mit dem Gehalt an organisch gelöstem Kohlenstoff (DOC) im Wasser. Abbildung 12 zeigt die Zunahme des Matrixeffekts mit dem Logarithmus des DOC-Gehalts. Der in Lit. [179] vorgestellte logarithmische Zusammenhang zwischen Matrixeffekt und Matrixkonzentration bestätigte sich damit auch für Wasser als Untersuchungsmatrix.



Abbildung 12 Zusammenhang zwischen Matrixeffekt und DOC-Gehalt ausgedrückt als logarithmische Funktion.

Auch die Probe mit dem höchsten DOC-Gehalt von 12,1 mg/L, Oberflächenwasser aus dem Großen Wannsee, (Abb. 13b) wies bei einem Anreicherungsfaktor von 25 nur eine Signalsuppression von im Mittel 24 % auf. Für die Probe mit dem niedrigsten DOC-Gehalt von 2,7 mg/L, Trinkwasser aus Oldenburg, und einem Anreicherungsfaktor von 50 (Abb. 13a) betrug die gemittelte Signalsuppression nur noch 10 %. Damit sind die durch die gelösten Inhaltsstoffe von Trinkwasser und Oberflächenwasser hervorgerufenen Störungen der Elektrospray-Ionisation bei niedrigen Anreicherungsfaktoren oder Direktinjektion als gering einzuschätzen.

Abhängigkeit des Matrixeffekts vom Analyten. Im Wesentlichen bestätigten sich die zuvor mit Obst- und Gemüseextrakten erzielten Ergebnisse. Für den positiven Ionenmodus wurde gefunden, dass Matrixeffekte überwiegend von der Retentionszeit und nicht von anderen Eigenschaften der Analyte abhängen. Bei Koelution mit identischen Matrixkomponenten aus Trink- oder Oberflächenwasser unterschieden sich die Matrixeffekte von 110 Pestiziden um nicht mehr als 12 % vom mittleren Matrixeffekt, der für die jeweilige Retentionszeit berechnet worden war. Damit ergibt sich auch für Wasserproben die neue Option zur Kompensation von Matrixeffekten anhand der Matrixeffektprofile von Referenzverbindungen.



Abbildung 13Matrixeffektprofile von 50 simultan infudierten Pestiziden beeinflusst allein durch endogene Wasserin-
haltsstoffe (A) eines Trinkwassers aus Oldenburg, angereichert um Faktor 50, und (B) eines Oberflächenwassers aus dem
Großen Wannsee in Berlin, angereichert um Faktor 25.

Kompensation von Matrixeffekten mit Referenzverbindungen. Es wurde überprüft, ob Matrixeffekte, die von Wasserinhaltsstoffen hervorgerufen werden, mit Referenzverbindungen richtig korrigiert werden können. Dazu wurden die Matrixeffekte, die das Oberflächenwasser aus dem Großen Wannsee auslöste, für alle 140 Pestizide auf konventionelle Art gemessen. Das Wasser aus dem Großen Wannsee eignete sich am besten für den Vergleich, da es noch die stärksten Signalsuppressionen verursachte. Die konventionellen Matrixeffekte wurden anschließend für alle 140 Pestizide mit dem Matrixeffektprofil einer einzelnen Referenzverbindung kompensiert. Wie in Kapitel 3.1 wurde als Referenzverbindung Carbendazim eingesetzt. Häufigkeitsverteilungen über der Wiederfindung des dotierten Pestizidgehalts zeigen in Abb. 14 die Situation vor und nach der Korrektur mit der Referenzverbindung. Der Anteil der Pestizide mit Wiederfindungen zwischen 80 und 120 % verbesserte sich von 13 % auf 53 %. Eine relevante Überkompensation trat sehr selten (< 3 %) auf.



Abbildung 14 Häufigkeitsverteilung über der Wiederfindung des dotierten Pestizidgehalts (10 ng/ml) in Oberflächenwasser aus dem Großen Wannsee für 140 Pestizide (A) ohne Anwendung einer Referenzsubstanz und (B) mit Anwendung von Carbendazim als einziger Referenzsubstanz.

4 GESAMTDISKUSSION

4.1 Methodische Grundlagen

In der Spurenanalytik mit LC-ESI-MS sind scheinbar spontan auftretende Änderungen der Ionisierungseffizienz ein ernsthaftes Problem. Die durch Begleitstoffe aus dem Probenmaterial hervorgerufenen "Matrixeffekte" sind als Phänomen seit 20 Jahren bekannt. Sie führen zu falschen Messergebnissen und zählen zu den wichtigsten Fehlerquellen in der Analysekette aus Probenahme, -aufarbeitung, -aufreinigung und analytischer Erfassung. Dem Spurenanalytiker stehen mehrere Methoden zur Verfügung, um das Stattfinden eines Matrixeffekts während einer Messung mit LC-ESI-MS nachzuweisen und um das Ausmaß einer Signalsuppression oder -erhöhung quantitativ zu erfassen. Genaue Messergebnisse werden sichergestellt, indem die Matrixeffekte während der Messung kompensiert werden oder indem die Analysenergebnisse nachträglich korrigiert werden. Die dafür angewandten Methoden bedeuten einen hohen Mehraufwand für die Labore. Sie behandeln Matrixeffekte nur symptomatisch.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es Matrixeffekte grundlegend zu charakterisieren, Einflussfaktoren auf Matrixeffekte festzustellen und Erkenntnisse über ihren Mechanismus zu gewinnen. Weiterhin sollten, wenn es die Untersuchungsergebnisse zulassen, praktikablere Methoden für den Umgang mit Matrixeffekten bei LC-ESI-MS-Multianalyt-Methoden abgeleitet werden. Dazu war zu Beginn eine Weiterent-wicklung der bisherigen Messmethoden für Matrixeffekte notwendig. Traditionell wurden und werden folgende Methoden zur quantitativen Bestimmung von Matrixeffekten bei der LC-ESI-MS eingesetzt:

- Peakflächenvergleich zwischen Lösungsmittel- und Matrixstandard (auch "post-extraction spike") in derselben Analytkonzentration
- Vergleich der Anstiege zwischen Kalibriergeraden in Lösungsmittel und in Matrix
- Zusatz stabilisotop-markierter interner Standards zu Probenextrakten

Der gemeinsame Nachteil aller konventionellen Methoden ist, dass mit ihnen immer nur eine Bestimmung der Matrixeffekte zur Retentionszeit des zugesetzten Analyten möglich ist. Es fehlte lange Zeit eine Methode, mit der man Matrixeffekte auch über einen gesamten chromatographischen Lauf messen konnte. Im Jahr 1999 erschienen erste Veröffentlichungen zu solch einer Methode. Bonfiglio et al.¹⁹ und Choi et al.⁹⁵ infudierten unabhängig voneinander Analyte bzw. einen Internen Standard hinter der LC-Säule und konnten so das Auftreten von Matrixeffekten über die gesamte Infusionszeit qualitativ verfolgen.

In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode der Nachsäuleninfusion^{19,95} aufgegriffen und zu einer Methode zur Quantifizierung von Matrixeffekten weiterentwickelt.¹⁷³ Nach bestem Wissen wurden zum ersten Mal sogenannte "Matrixeffektprofile" erstellt und als Werkzeug (i) zum Umgang mit und (ii) zum Studium von Matrixeffekten in der Spurenanalytik mit LC-MS eingeführt. Zur Erstellung der Matrixeffektprofile wurden die Effekte der injizierten Matrix auf die Analytionisierung wie bei Bonfiglio et al.¹⁹ und Choi et al.⁹⁵ über die Signalintensität von Analyten ermittelt und dann zusätzlich über jene Signalintensität en normiert, die nach Injektion von reinem Lösungsmittel bestimmt wurden. Die graphische Darstellung dieser so normierten Intensität der infudierten Analyte über der gesamten Retentionszeit gibt das Matrixeffektprofil des injizierten Probenextrakts wieder. Die Messung von Matrixeffektprofilen brachte der Arbeit einen methodischen Vorteil, der neue Einsichten zu den Störeffekten möglich machte.

Die Nachsäuleninfusion hat sich darüber hinaus als wertvolles Instrument zur Qualitätssicherung (Gute

Laborpraxis) gezeigt. Die Messweise erlaubt es, die Abwesenheit unerwarteter Matrixeffekte, z. B. aufgrund (i) einer Kontamination des Gerätesystems durch hoch belastete Probenextrakte anderer Messmethoden (Geräteblindwert), (ii) einer Kontamination der Probenextrakte durch SPE-Kartuschen, Spritzenfilter o. ä. oder (iii) einer Kontamination der Eluenten durch verunreinigte Membranfilter oder Spülmittelrückstände in Glasgefäßen, über die gesamte Messzeit zu prüfen. Starke exogene Matrixeffekte wurden in Kapitel 3.6 der Arbeit bei der Untersuchung von Trink- und Oberflächenwässern festgestellt. Kittlaus et al.⁸⁹ haben gezeigt, dass (iv) auch spät eluierende Matrixbestandteile, die erst mit dem zweiten Lauf des Lösungsmittelgradienten von der LC-Säule gespült werden und in nachfolgenden Messungen zu Signalsuppression führen, mit der Nachsäuleninfusion erkannt werden können. Die derzeit gängige Praxis zur Prüfung der Einsatzfähigkeit eines LC-MS-Geräts sieht die Injektion eines Lösungsmittelstandards aus 2-3 Analyten vor. Nach den Erfahrungen dieser Arbeit genügt eine solche Prüfung nicht zur Freigabe von LC-MS-Messgeräten, da damit nicht ausgeschlossen werden kann, dass eingeschleppte Substanzen in anderen Chromatogrammbereichen starke Signalsuppressionen auslösen und Messungen verfälschen.

4.2 Mechanismus von Matrixeffekten

Signalsuppression

Mehrere Forschungsgruppen haben sich mit den Ursachen für Matrixeffekte bei der Elektrospray-Ionisation beschäftigt. Zusammengenommen wurden diverse Hypothesen zum Mechanismus von Signalsuppression vorgeschlagen:

- Neutralisation freier Analytionen in der Gasphase. Wang et al.,¹⁰⁰ Amad et al.⁴⁰ und Kebarle et al.⁴⁶ unterstützten die Hypothese, dass Analyte, die bereits als Quasi-Molekülionen vorlagen, in der Gasphase ihre Ladung an Matrix- oder Lösungsmittelmoleküle verlieren könnten, wenn Unterschiede in der Reihenfolge der Basizität in Lösung und in der Gasphase auftreten. Weisen Matrixbestandteile mit hohem pK_B-Wert, d. h. schwacher Basizität in Lösung, in der Gasphase eine höhere Protonenaffinität auf als die in Lösung protonierten Analytmoleküle, komme es demnach zu einem Protonentransfer in der Gasphase. Die ungeladen zurückbleibenden Analyte könnten nicht mehr massenspektrometrisch erfasst werden (Auftreten von Signalsuppression).
- 2. Erhöhung der Oberflächenspannung, des Siedepunkts und / oder der Leitfähigkeit des Lösungsmittels im ESI-Tropfen. Aus einer Reihe von Experimenten mit modifizierten Elektrospray-Ionenquellen leiteten King et al.³¹ eine unvollständige Verdampfung der ESI-Tropfen durch hohe Konzentrationen an schwerflüchtigen Materialien als wahrscheinlichste Ursache für Signalsuppression ab. Sie schlugen als Mechanismus eine Erhöhung der Oberflächenspannung oder des Siedepunkts des Lösungsmittels im ESI-Tropfen durch koeluierende Matrixbestandteile vor. Dadurch verlängere sich die notwendige Verdampfungszeit bis die Rayleigh-Stabilitätsgrenze erreicht würde. Da der kritische Punkt zur Tropfenteilung später einträte, könnten die Tropfen in der Nähe der Gegenelektrode noch zu groß für die Freisetzung von Quasi-Molekülionen sein. Beaudry und Vachon⁹⁹ schlugen als Mechanismus für Signalsuppression ein unregelmäßiges Sprayverhalten aufgrund deutlich erhöhter Leitfähigkeit der elektrogesprühten Lösung vor. Salze, die unmittelbar nach der Totzeit eluieren,

könnten die Leitfähigkeit und Oberflächenspannung der Tropfen ändern und damit das Gleichgewicht zwischen elektrostatischer Abstoßungskraft und Oberflächenspannung verschieben.

- 3. Fällung oder Einschluss der Analyte in Präzipitate schwerflüchtiger Matrixbestandteile. King et al.³¹ schlugen Fällung als Mechanismus von Signalsuppression bei der APCI vor. Die Fällung solle stattfinden, wenn die Konzentrationen an Analyt und anderen nichtflüchtigen Probenbestandteilen mit der Lösungsmittelverdampfung steigen. King et al.³¹ schließen nicht aus, dass Fällung auch einen geringen Anteil an der Signalsuppression im Elektrospray ausmacht.
- 4. *Einschränkung der Verdampfung durch oberflächenaktive Stoffe.* Fenn³⁴ wies darauf hin, dass Komponenten mit langen Alkylketten, wie Stearinsäure, Decylalkohol oder Cetylalkohol, einen Film auf der Tropfenoberfläche ausbilden und damit die Lösungsmittelverdampfung behindern könnten. Bliebe die Verdampfung der Primärtropfen aus, würden keine Analytionen freigesetzt.
- 5. Ionenpaarbildung. Für einige Zusätze zur mobilen Phase wurden Signalsuppressionen bei der Elektrospray-Ionisation nachgewiesen. Apffel et al.,³⁶ Gustavsson et al.³⁷ und Holčapek et al.³⁹ zeigten, dass protonierte Analytionen in Gegenwart fluorierter Carbonsäuren wie Trifluoressigsäure,³⁶ Perfluorheptansäure oder Heptafluorbuttersäure³⁷ sowie Tetraalkylammoniumsalzen³⁹ elektrisch neutrale Ionenpaare ausbilden können und damit zu Signalsuppression führen.
- 6. *Wettbewerb um Platz an der Tropfenoberfläche.* Bruins^{30,98} stellte die Hypothese auf, dass der Verlust an Linearität bei hohen Analytkonzentrationen auf den begrenzten Platz an der Oberfläche der ESI-Tropfen zurückzuführen sei. Er vermutete, dass die Oberfläche des finalen ESI-Tröpfchens (Radius: 10 nm) ab einer Analytkonzentration $\sim 10^{-5}$ M vollständig besetzt sei. Bei höheren Analytkonzentrationen finde ein Teil der Analytmoleküle nur noch im Inneren des finalen Tröpfchens Platz und könne von dort nicht als Ion in die Gasphase freigesetzt werden.

Aus Bruins' Hypothese lässt sich eine noch frühere Auslastung der Tropfenoberfläche bei niedrigeren Analytkonzentrationen ableiten, wenn durch Koelution zusätzlich Matrixmoleküle vorliegen. Matrixbestandteile mit höherer Präferenz für die Oberfläche des ESI-Tropfens würden Analyte ins Tropfeninnere verdrängen und an der Ionisierung hindern.

7. Wettbewerb um die Überschussladungen auf der Tropfenoberfläche. Kebarle et al.^{45,49,78,101} wiesen nach, dass es – unabhängig von der Gesamtkonzentration an enthaltenen Stoffen – im Elektrospray einen konstant hohen Gesamtionenstrom gebe. Ab Konzentrationen größer ~ 10⁻⁵ M müssten alle Stoffe im Elektrospray um ihren Anteil am Gesamtionenstrom kon-kurrieren. Als wesentlichen Parameter für den Erfolg der Analytionisierung beschrieben Kebarle et al.⁴⁵ die Geschwindigkeit der Ionenfreisetzung in die Gasphase gemäß dem "Ion Evaporation Model⁷². Sie wiesen jedoch auch auf einen möglichen zusätzlichen Einfluss der Oberflächenaktivität der Stoffe hin.

Aufbauend auf der Arbeit von Kebarle et al.^{45,49,78,101} definierten Enke et al.^{28,29,96,97} die Konzentration an Überschussladungen auf der Tropfenoberfläche als Obergrenze für die mit E- lektrospray-Ionisation beobachtbare Konzentration an Ionen. Alle im ESI-Tropfen enthaltenen Stoffe (Analyte, Elektrolyte, koeluierende Matrix, Lösungsmittel, ionische Zusätze und ggf. Kontaminanten) würden um die Überschussladungen konkurrieren. Enke et al.^{28,29,96,97} schlugen ein Gleichgewichtsmodell, nach dem Matrixeffekte anhand der Verteilungen der Stoffe zwischen der Tropfenoberfläche und dem nach außen elektrisch neutralem Tropfeninneren und anhand der Stoffkonzentrationen vorhergesagt werden können, vor. Stoffe mit hoher Basizität und hoher Oberflächenaktivität seien erfolgreicher im Wettkampf um Überschussladung.¹⁸⁰ Weiterführende Informationen zu den Modellen von Kebarle et al.⁴⁵ und Enke et al.²⁸ enthält das Kapitel 2.4.

Nachfolgend sollen die o. a. Hypothesen ausgehend von den hier durchgeführten Experimenten und neueren Ergebnissen aus der Literatur diskutiert werden.

Zu 1. Die Hypothese einer späten Neutralisation von Analytionen in der Gasphase spielt in der Literatur nur eine untergeordnete Rolle. King et al.³¹ konnten mit Experimenten an einer kombinierten ESI/APCI-Quelle und einer dualen ESI-Quelle anschaulich belegen, dass Signalsuppressionen bei der Elektrospray-Ionisation vorrangig Flüssigphasenprozesse sein müssen. Cech und Enke¹⁸⁰ kamen in 2010 ebenfalls zu dem Schluss, eine Suppression des Analytsignals durch Protonentransfer könne in der Gasphase zumindest bei positiver Elektrospray-Ionisation nur unter untypischen Bedingungen stattfinden. Daher wurde diese Hypothese in der vorliegenden Arbeit nicht mehr untersucht.

Zu 2.-4. Die Hypothesen 2 bis 4 haben gemeinsam, dass der vorgeschlagene Mechanismus nicht selektiv nur den Analyten betrifft, sondern gleichzeitig die koeluierende Matrix erfasst wird. Zur selben Retentionszeit, zu der das Analytsignal supprimiert wird, müsste demnach ein Einbruch im Totalionenstrom zu verzeichnen sein.

Das Verhalten des Totalionenstroms wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals gezielt zu Zeiten mit Signalsuppression beobachtet. Dazu wurden Totalionenstrom-Chromatogramme, die bei LC-MS-Messungen im Scan-Modus erhalten wurden (Details siehe Kapitel 3.4), den neu eingeführten Matrixeffektprofilen für dieselbe Matrix gegenübergestellt.¹⁸¹ Dabei konnte gezeigt werden, dass sich Totalionenstrom und Matrixeffektprofil identischer Extrakte wie Bild und Spiegelbild zueinander verhalten. Zu Retentionszeiten, bei denen die Matrixeffektprofile Signalsuppressionen anzeigten, wurde im Totalionenstrom kein Signaleinbruch, sondern stattdessen eine Intensitätserhöhung (Peak) gemessen. Damit wurde nachgewiesen, dass während der Suppression der Analytsignale gleichzeitig besonders viele andere Ionen gemessen wurden. Je stärker die Signalsuppression ausfiel, umso höher waren auch die Peaks im Totalionenstrom (Bild \leftrightarrow Spiegelbild). Diese wichtige Beobachtung spricht gegen die Hypothesen 2 bis 4. Die Arbeit konnte an dieser Stelle zeigen, dass bei der Untersuchung von Obst- und Gemüseextrakten Suppressionen des Elektrospray-Signals nicht über unvollständige Lösungsmittelverdampfung, instabiles Spray oder Fällung ablaufen können. Ein kürzlich erschienener Artikel von Ekdahl et al.¹⁸² zeigt für Blutplasmaproben ebenfalls ein spiegelbildliches Verhalten von Totalionenstrom und Infusionsprofilen auf.

Gegen eine Fällung oder einen Einschluss der Analyte in Präzipitate (Hypothese 3) spricht zusätzlich, dass Fällungen üblicherweise nicht innerhalb von µs verlaufen. In diesem Zeitmaßstab erfolgt aber die Bildung von Analytionen bei der Elektrospray-Ionisation.

Zu 5. Einer Ionenpaarbildung steht entgegen, dass das Ausmaß der Bildung von Ionenpaaren wesentlich von der Struktur der beteiligten Stoffe (Analyt und Matrixkomponente) abhängig sein sollte. In der vor-

liegenden Arbeit wurde jedoch festgestellt, dass alle nach der Säule infudierten Analyte unabhängig von ihrer Struktur sehr ähnlich auf eluierende Matixbestandteile reagieren (siehe Kapitel 3.1).

Zu 6. und 7. Das nachgewiesene spiegelbildliche Verhalten zwischen Matrixeffektprofil und Totalionenstrom-Chromatogramm zeigt, dass Stoffe, welche Matrixeffekte verursachen, offenbar selbst ionisiert werden. Diese Beobachtung unterstützt die beiden Hypothesen von einer Konkurrenz zwischen koeluierender Matrix und Analyt.

Bei Konkurrenz um Platz an der Tropfenoberfläche gemäß Bruins³⁰ (Hypothese 6) könnte die Matrix *allein* aufgrund ihrer *stärkeren Präferenz für die Oberfläche des ESI-Tropfens* die dort befindlichen Überschussladungen erhalten und als Peak im Totalionenstrom erscheinen. Obwohl noch Überschussladungen zur Verfügung stünden, hätten die ins Tropfeninnere gedrängten Analyte nach Bruins keinen Zugang mehr zu ihnen (entstehende Signaleinsattelung im Matrixeffektprofil).

Bei einer Konkurrenz um Überschussladungen gemäß Enke et al.^{28,29,96,97} (Hypothese 7) könnte die Matrix aufgrund ihrer *hohen Oberflächenaktivität <u>und</u>* ihrer *zusätzlich höheren Protonenaffinität in Lösung* die Protonen tragen, die den ebenfalls auf der Tropfenoberfläche befindlichen Analyten mit schwächerer Protonenaffinität fehlen.

Beide Hypothesen können das spiegelbildliche Verhalten zwischen Totalionenstrom-Chromatogramm und Matrixeffektprofil erklären.

Um Bruins' Hypothese zu evaluieren, wurde näherungsweise berechnet, ob die verfügbare Oberfläche eines ESI-Tropfens zu klein für alle enthaltenen Spezies ist (nicht veröffentlichte Ergebnisse). Aus hiesiger Sicht ist entgegen Bruins' Annahme³⁰ dafür jedoch die Oberfläche des Primärtropfens maßgebend. Pro Coulomb-Explosion setzt ein Primärtropfen etwa 20 Sekundärtropfen frei.⁴⁵ In dem einzelnen Sekundärtropfen beträgt der Radius typischerweise 10 %, die Oberfläche 1 %, das Volumen 0,1 % und die Anzahl der Überschussladungen 0,75 %² vom Primärtropfen.⁴⁵ Der Anteil an Überschussladungen (und damit die Zahl der protonierten Analytmoleküle), der auf den Sekundärtropfen übergeht, verringert sich stärker als die Tropfenoberfläche. Dieser Befund wurde auch experimentell bestätigt, da sich der Radius eines durch Coulomb-Explosion neu entstandenen Sekundärtropfens zunächst durch Verdampfung etwas verkleinert, bevor sich die auf seiner Oberfläche verteilten Überschussladungen erneut so nahe kommen, dass das Rayleigh-Limit erreicht wird und eine weitere Coulomb-Explosion stattfindet.^{71,183} Bezogen auf das Volumen erfolgt eine Aufkonzentrierung, sobald sich aber gleichartig geladene Ionen auf der Tropfenoberfläche zu nahe kommen, findet als Entlastungsreaktion eine Coulomb-Explosion statt. Eine Verknappung des Platzes auf der Tropfenoberfläche durch eine Abfolge von Tropfenteilungen tritt nicht ein.

Wenn Konkurrenz um die Tropfenoberfläche der Mechanismus von Signalsuppression ist, müsste daher die stärker oberflächenaktive Matrix den Analyten *bereits im Primärtropfen* in das Innere zurückdrängen und am Übergang in Sekundär- und Tertiärtropfen hindern. Nur aus Tropfen, die durch Verdampfung auf einen Radius < 10 nm schrumpfen, können Ionen in die Gasphase freigesetzt werden. Durch die schnellere Verdampfung gelten gerade die Sekundär- und Tertiärtropfen als Hauptlieferanten für Ionen in der Gasphase. Verdrängt eine Matrixkomponente den Analyten von der Oberfläche des Primärtropfens, blie-

 $^{^2}$ Die etwa 20 freigesetzten Sekundärtropfen tragen zusammengenommen ~ 15 % der Überschussladung des Primärtropfens.

be der Analyt nach der Coulomb-Explosion im Inneren des nur wenig kleiner gewordenen Primärtropfens zurück und würde sich dort bei wiederholten Tropfenteilungen aufkonzentrieren. Je später ein Analyt in einen Sekundärtropfen übergeht, umso schlechter sind seine Chancen als Analytion in die Gasphase freigesetzt zu werden und umso geringer fällt die detektierte Signalintensität aus (Signalsuppression).

Ein typischer Primärtropfen hat im klassischen Elektrospray nach Kebarle und Tang⁴⁵ einen Radius von 1,5 μ m und enthält ca. 51000 Überschussladungen / Protonen. Nach einer Verdampfungszeit von 460 μ s ist der Tropfenradius auf 0,945 μ m gesunken und die erste Coulomb-Explosion findet statt.⁴⁵ Unmittelbar vor einer bevorstehenden Tropfenteilung sind die 51000 Protonen auf einer Oberfläche von 1,12·10⁹ Å² verteilt. Die Träger der Überschussladungen benötigen demnach auf der Tropfenoberfläche einen minimalen Flächenabstand von 2,19·10⁴ Å² zueinander. Kommen sie sich noch näher, findet zur Entlastung eine Coulomb-Explosion statt. Für Neutralteilchen wäre zwischen den Trägern der Überschussladungen sterisch jedoch Platz verfügbar. Wichtige Fragen sind daher: (i) Wie hoch ist der sterische Platzbedarf einer typischen Analytkonzentration im Primärtropfen, (ii) Wie hoch ist der zusätzliche sterische Platzbedarf der Ingeladenen Analyt- und Matrixmoleküle zusammen die unmittelbar vor der Coulomb-Explosion im Primärtropfen verfügbare Oberfläche?

Tabelle 1 beantwortet diese Fragen am Beispiel einer starken Signalsuppression, die in dieser Arbeit für den Analyten Azoxystrobin in Orangenextrakten gemessen wurde. Als verursachende Matrixkomponente wurde Sinensetin, ein typisches Zitrusflavonoid, identifiziert. Bei der Berechnung wurde vereinfachend angenommen, dass alle im Tropfenvolumen enthaltenen Analyt- und Matrixmoleküle auf der Tropfenoberfläche sitzen. (Nach Enkes Gleichgewichtsmodell²⁸ befindet sich ein Teil der Analyt- und der Matrixmoleküle im Tropfeninneren, so dass der tatsächliche Flächenbedarf auf der Oberfläche kleiner ist als berechnet.) Zusätzlich wurde mit der maximalen Projektionsfläche der Moleküle¹⁸⁴ gerechnet, obwohl angenommen werden kann, dass sich die Analyt- und Matrixmoleküle tatsächlich sterisch günstiger arrangieren können. Als Analytkonzentration wurde eine typische Rückstandsmenge von 0,1 mg/kg eingesetzt. Der abgeschätzte Masseanteil der Matrixkomponente Sinensetin betrug 10 mg/kg (siehe Kapitel 3.4). Ein Masseanteil von 1 mg/kg in der Probe entspricht beim verwendeten Analysenverfahren einer Konzentration von 2,5 µg/ml im messfertigen Endextrakt.

Zur Berechnung der Anzahl an Analyt- und Matrixmolekülen im Primärtropfen wurden die Messbedingungen der Arbeit (Flussrate von 200 μ l/min etc.) eingesetzt. (Eine vollständige Auflistung der verwendeten Parameter findet sich in der Fußnote zu Tab. 1.) Als maximaler Platzbedarf der Azoxystrobinmoleküle wurde eine Fläche von 1,06 · 10⁵ Å² und für Sinensetinmoleküle von 1,22 · 10⁷ Å² berechnet. Um alle Analyt- und Matrixmoleküle an der Oberfläche des Primärtropfens zu verteilen, wird eine Fläche von 1,24 · 10⁷ Å² benötigt. Im Primärtropfen steht selbst unmittelbar vor der Coulomb-Explosion eine 90-fach größere Oberfläche von 1,12 · 10⁹ Å² zur Verfügung. Auch mit mehrfachen Hydrathüllen haben nicht nur sämtliche Matrix-, sondern auch alle Analytmoleküle, zusätzliche Lösungsmittelmoleküle und Methanolcluster ausreichend Platz auf der Oberfläche – was gegen eine Konkurrenz um Platz an der Tropfenoberfläche spricht. Auffällig ist zudem, dass die berechnete Anzahl an Sinensetinmolekülen (~ 115.000) die verfügbare Zahl an Überschussladungen (~ 50.000) deutlich übersteigt.

Parameter	Überschussladungen: Protonen	Matrix: Sinensetin	Analyt: Azoxystrobin
Konzentration im Probenextrakt	0 ng/ml	25000 ng/ml	250 ng/ml
Teilchenanzahl im Primärtropfen	51.250	114.390	1.056
Oberfläche des Primärtropfens kurz vor Coulomb-Explosion	1.12E+09 Å ²	1.12E+09 Å ²	1.12E+09 Å ²
Maximale Projektionsfläche des einzelnen Teilchens ¹⁸⁴	4,52 Å ²	107,07 Å ²	100,30 Å ²
Maximaler Platzbedarf aller Teilchen auf der Tropfen- oberfläche	2,32E+05 Å ²	1,22E+07 Å ²	1,06E+05 Å ²

Tabelle 1 Situation in einem typischen Primärtropfen mit 1,5 µm Radius bei Koelution des Analyten mit einer Matrixfraktion. Die Berechnung erfolgte am Beispiel der Signalsuppression von Azoxystrobin hervorgerufen durch den Orangeninhaltsstoff Sinensetin.³

Somit kann abschließend festgestellt werden, dass der Mechanismus von Signalsuppression bei der Elektrospray-Ionisation pflanzlicher Extrakte auf Konkurrenz zwischen Analyt und der koeluierenden Matrix beruht. Dabei wird eine Konkurrenz um Überschussladungen / Protonen an der Tropfenoberfläche für wahrscheinlicher gehalten als eine alleinige sterische Konkurrenz. In Zukunft können evtl. multivariate statische Verfahren klären, welche Gruppen von Matrixkomponenten (niedriger pK_B , hoher log K_{OW} , niedrige Konzentration oder niedriger pK_S , hoher log K_{OW} , aber hohe Konzentration etc.) das Auftreten von Matrixeffekten begünstigen, und Korrelationen zu deren Ausmaß herstellen. Die zuvor vorgestellten, anderen in der Literatur vertretenen Hypothesen zum Mechanismus von Signalsuppressionen wurden experimentell widerlegt. Ob zusätzlich noch ein Protonentransfer in der Gasphase stattfindet, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden.

Signalerhöhung

In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit zur Methodenentwicklung für den Influenzaarzneistoff Oseltamivir und seinem Carboxylat in Blutplasma stellten Hu et al.¹⁸⁵ als eine der ersten Gruppen eine Hypothese zum Mechanismus von Signalerhöhung vor. Danach führt eine Verbesserung der Analytprotonierung

³ Folgende Parameter wurden zur Berechnung herangezogen:

Massenkonzentration an Azoxystrobin = 0,1 mg/kg, Massenkonzentration an Sinensetin = 10 mg/kg, ChemElut-Extrakt: 2,5 g Probe/ml Extrakt, Injektionsvolumen = 8 μ l, exakte Masse von Sinensetin = 372.120.902.994 ng/mol, exakte Masse von Azoxystrobin = 403.116.820.669 ng/mol, Avogadro-Konstante = 6,02E+23 1/mol, Flussrate = 200 μ l/min, Peakhalbwertsbreite der Signalsuppression = 0,2 min, Lösungsmittelvolumen im Peak = 4,0E-05 l, Tropfenvolumen bei Entstehung des Primärtropfens = 14,14 μ m³ = 1,41E-14 l. Der Primärtropfen wurde zur Vereinfachung als Kugel angenommen.

durch elektrolyt-ähnliche Matrixbestandteile zur beobachteten Signalerhöhung. Der Effekt trat bei Messungen nur dann deutlich auf, wenn der mobilen Phase kein Elektrolyt zugesetzt wurde. War eine bestimmte Konzentration an Elektrolyt z. B. Ameisensäure vorhanden, wurde nur noch ein minimaler Effekt beobachtet.

In dieser Arbeit wurden Signalerhöhungen fast ausschließlich bei Anwendung des negativen Ionenmodus gemessen. Wie in Kapitel 3.5 beschrieben wurden trotz des Zusatzes von Ammoniumformiat als Elektrolyt zur mobilen Phase Signalerhöhungen von bis zu + 706 % (hier für 5-Hydroxy-Clethodim-Sulfon in fermentiertem Tee) gemessen. In einer Studie von Leverence et al.¹⁸⁶ traten Signalerhöhungen ebenfalls im negativen Ionenmodus trotz Zusatz von Ammoniumacetat und Ameisensäure zu den Eluenten auf. Der von Hu et al.¹⁸⁵ vorgeschlagene Zusammenhang kann daher nicht der einzige Mechanismus von Signalerhöhungen bei der Elektrospray-Ionisation sein. Zum Auftreten von Signalerhöhungen besteht weiterer Forschungsbedarf.

Schwacher Einfluss der Analyteigenschaften auf Matrixeffekte

Im Rahmen der Arbeit gelang es eine lange in der Literatur vorherrschende Fehlinterpretation zu Matrixeffekten bei der Elektrospray-Ionisation zu korrigieren. Matrixeffekte galten nicht nur als abhängig von der jeweiligen Matrix, sondern auch als abhängig vom Analyten.^{16,19-23} Tendenziell wurden bei Methodenvalidierungen Matrixeffekte eher für alle Analyte der Methode, aber nur für stellvertretend ausgewählte Matrices einer Matrixgruppe (z. B. hoher Säuregehalt) geprüft.

Auch bei der Einführung der Nachsäuleninfusion als Methode zur Messung von Matrixeffekten hatten Bonfiglio et al.¹⁹ im Jahr 1999 geschlussfolgert, Matrixeffekte wären analytabhängig. Mit steigender Polarität des Analyten solle die Stärke der Signalsuppression zunehmen. Der Einfluss der Analyteigenschaften wäre stärker als der auch vorhandene Einfluss der Probenaufarbeitung, d. h. der Konzentration und Art an koextrahierten Matrixbestandteilen. Bonfiglio et al.'s Arbeit¹⁹ zeigte Infusionsprofile für zwei pharmazeutisch wirksame Substanzen sowie eine unbekannte Verbindung. Diese wurden durch die extrahierten Inhaltsstoffe von Blutplasma hervorgerufen.

Choi et al.⁹⁵ vermuteten in ihrem Artikel zur Einführung der Nachsäuleninfusion hingegen, dass mit der Infusion eines einzelnen Internen Standards hinter der chromatographischen Säule Matrixeffekte für mehrere Analyte kompensiert werden können. Solch ein Konzept setzt gleich starke Matrixeffekte auch bei Analyten mit ggf. verschiedenen physikalisch-chemischen Eigenschaften voraus. Choi et al.'s Veröffentlichung⁹⁵ enthielt jedoch nur ein einzelnes Infusionsprofil für ein stabilisotop-markiertes Pestizid erhalten nach Injektion eines Weizenheuextrakts.

In dieser Arbeit wurden Matrixeffektprofile für mehr als 3600 verschiedene Analyt/Matrix-Kombinationen bei ESI(+) [140 Pestizide × (20 pflanzliche Lebensmittelextrakte + 3 Trinkwässer + 3 Oberflächenwässer)] und für weitere 590 Analyt/Matrix-Kombinationen bei ESI(-) (50 Pestizide × 20 pflanzliche Lebensmittelextrakte, nicht alle auswertbar) gemessen. Die untersuchten Pestizide deckten einen weiten Bereich bestimmter Analyteigenschaften wie Polarität und Säurestärke ab. Damit wurden in dieser Arbeit erstmalig Matrixeffekte für eine große Anzahl an Analyten über die gesamte Länge von Chromatogrammen miteinander verglichen. Dabei fiel auf, dass bei ESI(+) zur selben Retentionszeit immer alle Analyte in die gleiche Richtung (Signalsuppression) und in ähnlichem Ausmaß von Matrixeffekten betroffen waren. Eine statistische Auswertung bestätigte, dass für ~ 80 % der untersuchten Pestizide die Eigenschaften der Analyte keinen signifikanten Einfluss auf die Stärke der Signalsuppression hatten. Matrixeffekte zeigten sich nicht als "analytabhängig", sondern als retentionszeitabhängig. Die Retentionszeit bestimmt mit welcher Matrixfraktion die Analyte koeluieren. Die Matrixeigenschaften und die Matrixkonzentration wurden als entscheidende Parameter für das Ausmaß von Matrixeffekten identifiziert. Die Erkenntnisse zur Retentionszeitabhängigkeit von Matrixeffekten wurden als Research Artikel¹⁷³ in der Zeitschrift Analytical Chemistry veröffentlicht (Nachdruck in Kapitel 3.1).

Die später veröffentlichten beiden Artikel^{179,187} zu Matrixeffekten bei der LC-ESI-MS (Nachdrucke in Kapitel 3.2 und 3.3) bestätigen ebenfalls eine vorwiegende Abhängigkeit der Matrixeffekte von der Retentionszeit der Analyte und nahezu keinen Einfluss von deren physikalisch-chemischen Eigenschaften. So wurde für den Special-Feature Artikel zum Einfluss des ESI-Quellendesigns auf Matrixeffekte¹⁸⁷ (Kapitel 3.3) die Messung der Matrixeffektprofile für 45 Pestizide an verschiedenen Geräteplattformen wiederholt. An allen vier LC-MS/MS-Gerätesystemen mit fünf ESI-Quellen verschiedenen Typs bestätigte sich, dass alle Analyte gleichzeitig und in ähnlichem Ausmaß Signalsuppressionen erleiden. (In der Veröffentlichung wurden nicht mehr die Matrixeffektprofile der einzelnen 45 Analyte, sondern bereits der Median aller Pestizide abgedruckt.) In der Arbeit zum Einfluss der Matrixkonzentration auf Matrixeffekte¹⁷⁹ (Kapitel 3.2) bestätigte sich der Befund auch für Extrakte, die nach einer zweiten Aufarbeitungsmethode erhalten wurden (QuEChERS, DIN EN 15662:2008). In Kapitel 3.6 wurde darüber hinaus gezeigt, dass die Matrixeffektprofile von mehr als 100 Pestiziden auch in Trink- und Oberflächenwässern alle simultan ähnliche Intensitätsänderungen aufwiesen. Die Retentionszeitabhängigkeit von Matrixeffekten bei positiver Elektrospray-Ionisation ist folglich eine generelle Beobachtung und gilt unabhängig von der Geräteplattform, der Probenaufarbeitung und dem Typ der Probenmatrix. Sie wurde mittlerweile von einem zweiten unabhängigen Labor,⁸⁹ mit dem später eine Kooperation zur Untersuchung von Matrixeffekten entstand, für 45 Pestizide und 7 Obst- und Gemüseproben bestätigt. Auch in einer kürzlich erschienenen Arbeit von Bodi et al.¹⁸⁸ riefen verschiedene Futtermittelmatrices nahezu deckungsgleiche Matrixeffektprofile für zwei Antibiotika hervor. Matrixeffektprofile wurden hier eingesetzt, um die Effizienz verschiedener Probenaufarbeitungen und chromatographischer Methoden zu testen. In einer Studie von Geis-Asteggiante et al.¹⁸⁹ wurden Matrixeffektprofile zur Optimierung und Validierung einer UHPLC-ESI-MS/MS-Methode zur Quantifizierung von mehr als 100 Tierarzneimittel in Rindfleisch verwendet. Geis-Asteggiante et al.¹⁸⁹ bestätigten ebenfalls ähnliche Matrixeffektprofile für Tierarzneimittel aus verschiedenen chemischen Gruppen mit deutlich verschiedenen physikalisch-chemischen Eigenschaften bei positiver Elektrospray-Ionisation.

Das Bild vom "analytabhängigen Matrixeffekt" war fälschlich entstanden, weil mit den bisherigen konventionellen Verfahren zur Messung von Matrixeffekten die einfache Tatsache nicht beachtet wurde, dass Analyte mit unterschiedlicher Retentionszeit bei der Ionisierung nicht den Einflüssen identischen Matrixkomponenten ausgesetzt sind. Ein Vergleich der Matrixeffekte nur für koeluierende Analyte oder bei Injektion ohne chromatographische Säule hätte schon früher auf die nur schwachen Unterschiede zwischen den Analyten hinweisen können.

Mit ihrer Grundidee, Matrixeffekte mittels Nachsäuleninfusion zu messen, haben Bonfiglio et al.¹⁹, einen wichtigen Beitrag zur Spurenanalytik mit LC-MS geleistet. Die damalige Auswertung der kontinuierlich gemessenen Signalintensitäten wies jedoch noch Schwachpunkte auf, die evtl. zur Fehlinterpretation beigetragen haben können. Die Signalintensitäten des Blankextrakts wurden auf die maximale Signalintensität, die innerhalb eines Laufs von Blankextrakt gemessen wurde, relativiert und nicht auf die Signal-
intensität ohne Matrix. Damit war das Ansetzen der Basislinie, die für einen Matrixeffekt von ME = 0 % stand, von zufälligen Fehlern (z. B. Spikes) abhängig. Quantitative Schlussfolgerungen wurden gezogen, ohne den tatsächlichen Matrixeffekt zu berechnen. Das führte Bonfiglio trotz Anwendung der Nachsäuleninfusion zur Einschätzung, dass Matrixeffekte analytabhängig sind. Auch die technische Ausstattung enthielt noch keine Vorrichtung, um während der Infusion mit geringer Flussrate (5 μ l/min) von nur 2 % des Hauptflusses und ohne LC-Säule einen konstanten Druck aufzubauen. Die von Bonfiglio et al. veröffentlichten Infusionsprofile der reinen mobilen Phase¹⁹ zeigten kein Analytsignal auf konstanter Höhe, wie es bei der verwendeten isokratischen Elution zu erwarten ist, sondern Signaleinbrüche und -erhöhungen, die zudem bei mehreren Messungen zu verschiedenen Zeiten im Chromatogramm auftraten. Das deutet auf nicht reproduzierbare Infusionsbedingungen hin. Auch die Anzahl der Analyte und Matrices war sehr gering.

Choi et al.⁹⁵ lagen mit ihrer Beschreibung vom Matrixeffekt von Beginn an richtig. Allerdings brachten sie auch in nachfolgenden Veröffentlichungen¹⁹⁰⁻¹⁹² nie den experimentellen Nachweis für die Ähnlichkeit von Matrixeffekten für mehr als drei Analyte in einer Probenmatrix. Die Formeln, wie eine Korrektur mit Internem Standard berechnet werden soll, wurden nicht veröffentlicht. So blieb die allgemeine Meinung vom analytabhängigen Matrixeffekt für weitere 10 Jahre bestehen. Der Beweis, dass Matrixeffekte bei der positiven Elektrospray-Ionisation stark von der Retentionszeit, d. h. der koeluierenden Matrixfraktion, aber nur schwach von den Analyteigenschaften abhängen, erfolgte nach bestem Wissen erst in dieser Arbeit.¹⁷³ Es erscheinen jedoch auch heute noch Artikel, die die Ionensuppression bei der Elektrospray-Ionisation als "komponentenabhängig" und die Nachsäuleninfusion als Methode nur zum qualitativen Nachweis von Matrixeffekten wiedergeben.⁸⁶

Anwendbarkeit von Enkes theoretischem Modell

Es wurde untersucht, ob der experimentelle Befund der Retentionszeitanhängigkeit von Matrixeffekten mit Enkes Gleichgewichtsmodell vom ESI-Tropfen²⁸ übereinstimmt. Enkes Modell beruht auf der Annahme, dass sich jede Komponente im ESI-Tropfen entweder gut solvatisiert im Tropfeninneren oder schlechter solvatisiert in einer separaten, äußeren Schicht des Tropfens aufhalten kann. Nur die äußere Schicht enthält sämtliche Überschussladungen. Für einen ESI-Tropfen, der bestimmte Konzentrationen an Elektrolyt (C_E), Analyt (C_A) und einer Matrixkomponente (C_M) enthält, leiteten Enke et al.^{28,29} folgende Gleichung ab⁴:

$$0 = \mathbf{a} \times [\mathbf{A}^{+}]_{\mathbf{s}}^{3} + \mathbf{b} \times [\mathbf{A}^{+}]_{\mathbf{s}}^{2} + \mathbf{c} \times [\mathbf{A}^{+}]_{\mathbf{s}} + \mathbf{d}$$
(12)
$$\mathbf{a} = \mathbf{K}_{\mathbf{M}} - \mathbf{K}_{\mathbf{A}} + \mathbf{K}_{\mathbf{E}} \cdot \left(1 - \frac{\mathbf{K}_{\mathbf{M}}}{\mathbf{K}_{\mathbf{A}}}\right)$$

⁴ Zwei in beiden Publikationen enthaltene Fehler bei der Berechnung der Koeffizienten b und c sind bei den hier wiedergegebenen Formeln korrigiert.

$$b = C_A(2K_A - K_M - K_E) + C_M(K_M - K_E\left(\frac{K_M}{K_A}\right)) + C_EK_E\left(1 - \frac{K_M}{K_A}\right) + [Q]\left(K_A - K_M - K_E\left(1 - \frac{K_M}{K_E}\right)\right)$$
$$c = -C_A([Q] (2K_A - K_M - K_E) + C_MK_M + C_AK_A + C_EK_E)$$

 $d = C_A^2 \cdot [Q] \cdot K_A$

Die Gleichgewichtskonstanten K_E, K_A und K_M sind stoffspezifische Größen, welche die Verteilung von Elektrolyt, Analyt und koeluierender Matrixkomponente zwischen der inneren und der äußeren Tröpfchenphase quantitativ beschreiben. Eigenschaften wie z. B. die Polarität, Ladungsdichte, Solvatationsenergie und Basizität sowie die Natur des Gegenions bilden die Präferenz eines Stoffs für die Tropfenoberfläche oder das Tropfeninnere aus.^{29,96} Der Einfluss der Stoffeigenschaften spiegelt sich daher indirekt in der Gleichgewichtskonstante wieder.

Die oben angegebene Version von Enkes Gleichung wurde zur Simulation verschiedener Situationen im ESI-Tropfen angewandt (nicht veröffentlichte Ergebnisse). Die Bedingungen der Simulation wurden so gewählt wie sie während der Messungen in der Arbeit vorlagen. Die Konzentration des Elektrolyten (Ammoniumformiat) betrug $C_E = 5 \text{ mmol/l}$, die Konzentration an Überschussladungen Q lag bei 0,003 mmol/l. Für den Elektrolyten wurde eine gleichmäßige Verteilung zwischen Tropfenoberfläche und –innerem geschätzt ($K_E = 1$).

Abbildung 15 zeigt die theoretischen Ergebnisse nach Enke, wenn ein Analyt ($K_A = 1000$, $C_A = 300$ ng/ml) mit vier verschiedenen Matrixkomponenten ($K_M = 10$, 100, 300 und 1000) koeluiert. Die Matrixkonzentration variiert in allen vier Fällen gleich von 0,0001 bis 10 µg/ml. Die Abbildung zeigt umso stärkere Signalsuppressionen, je höher K_M ist, d. h. je besser die Matrix die Tropfenoberfläche besetzen kann. Das stimmt mit dem experimentellen Befund überein, dass ein Analyt zu verschiedenen Retentionszeiten, d. h. bei Koelution mit verschiedenen Matrixkomponenten, stark unterschiedliche Signalsuppressionen erleidet.

Abbildung 16 zeigt theoretische Ergebnisse nach Enke, wenn fünf Analyte mit verschiedenen physikalisch-chemischen Eigenschaften, die eine verschieden starke Tendenz zur Tropfenoberfläche bewirken ($K_A = 1$, 10, 100, 300 oder 1000), mit derselben Matrixfraktion koeluieren. Nach Enkes Modell erleiden alle Analyte, trotz bis zu 1000-fachem Unterschied der Gleichgewichtskonstante K_A , ähnlich starke Matrixeffekte. Die Fähigkeit des Analyten die Tropfenoberfläche zu besetzen, ist entscheidend für den Responsefaktor, mit dem ein Analyt beobachtet wird, aber nicht wichtig für das Ausmaß von Matrixeffekten. Das wurde sowohl für die simulierte Koelution mit einer Matrixkomponente, die gern die Tropfenoberfläche besetzt (Abb. 16a, $K_M = 1000$), als auch für die Berechnungen mit einer Matrixkomponente, die eine geringere Präferenz zur Tropfenoberfläche aufweist (Abb. 16b, $K_M = 300$), festgestellt. In beiden Fällen waren die Unterschiede in den Matrixeffekten der sehr verschiedenen Analyte klein. Die Ähnlichkeit des Analytverhaltens ist somit nicht an bestimmte Matrixeigenschaften gebunden. Die experimentellen Ergebnisse der Arbeit zum starken Einfluss der Retentionszeit und schwachem Einfluss der Analyteigenschaften auf Matrixeffekte stimmen gut mit Enkes Gleichgewichtsmodell vom ESI-Tropfen überein.



Abbildung 15 Simulation zur Stärke des Matrixeffekts bei Koelution desselben Analyten ($K_A = 1000$, $C_A = 300$ ng/ml) mit vier verschiedenen Matrixkomponenten: (A) einer Matrixkomponente mit $K_M = 10$, d. h. nur schwacher Präferenz für die Tropfenoberfläche, (B) einer Matrixkomponente mit $K_M = 100$, (C) einer Matrixkomponente mit $K_M = 300$ und (D) einer Matrixkomponente mit $K_M = 1000$, d. h. starker Präferenz, die Oberfläche eines ESI-Tropfens zu besetzen. Die Stärke des Matrixeffekts ist gegeben als Wiederfindung (rel. Intensität) von der Analytkonzentration an der Tropfenoberfläche ohne Matrixeffekt, d. h. bei Matrixkonzentrationen nahe Null. Die Matrixkonzentration variiert in allen vier Fällen von 0,0001 bis 10 µg/ml. Auch für den Elektrolyten liegen identische Bedingungen vor: $K_E = 1$, $C_E = 5$ mmol/l. Die Konzentration an Überschussladungen Q liegt bei 0,003 mmol/l.



Abbildung 16 Simulation zur Stärke der Matrixeffekte von fünf verschiedenen Analyten mit verschiedener Präferenz zur Oberfläche des ESI-Tropfens ($K_A = 1$, 10, 100, 300 und 1000) bei Koelution mit derselben Matrixfraktion (A) Koelution mit einer Matrixkomponente, die gern die Tropfenoberfläche besetzt ($K_M = 1000$), und (B) Koelution mit einer Matrixkomponente mit schwächerer Tendenz zur Tropfenoberfläche ($K_M = 300$). Die Matrixkonzentration variiert in beiden Fällen von $C_M = 0,0001$ bis 10 µg/ml. Die Bedingungen für den Elektrolyten sind $K_E = 1$ und $C_E = 5$ mmol/l. Die Konzentration an Überschussladungen Q liegt bei 0,003 mmol/l. Die Konzentration des Analyten beträgt $C_A = 300$ ng/ml.

Im Rahmen der Arbeit wurde außerdem experimentell festgestellt, dass Matrixeffekte mit dem Logarithmus der Matrixkonzentration ansteigen.¹⁷⁹ Der logarithmische Verlauf von Verdünnungsgraphen ergibt sich ebenfalls aus Enkes theoretischem Modell. Abbildung 17a stellt die Simulation eines Matrixeffekts auf gleiche Weise wie in Abb. 15 und 16 dar. Wechselt man die Matrixkonzentration gegen den Verdünnungsfaktor des Probenextrakts (logarithmische Skalierung) und die relative Analytintensität gegen den Matrixeffekt, erhält man einen theoretisch berechneten Verdünnungsgraphen (Abb. 17b). Bleibt die Analytkonzentration an der Tropfenoberfläche trotz Matrix konstant hoch, d. h. beträgt die Wiederfindung des Analyten 100 % der Signalintensität ohne Matrix (I = 100 %), liegt kein Matrixeffekt vor (ME = 0 %). Die in Kapitel 3.2 experimentell bestimmten Verdünnungsgraphen (Bsp. in Abb. 17c) stimmen sehr gut mit dem theoretischen Graphen nach Enke in Abb. 17b überein.



Abbildung 17 (A) und (B) Simulation eines Matrixeffekts nach ENKE (Bedingungen: Elektrolyt $K_E = 1$, $C_E = 5$ mmol/l; Analyt $K_A = 1000$, C_A variabel von 0,003 ng/ml bis 300 ng/ml; Matrix $K_M = 1000$, C_M variabel von 0,0001 bis 10 µg/ml): (A) Auftragung der Wiederfindung des Analytsignals über der logarithmierten Matrixkonzentration, (B) Auftragung des Matrixeffekts über dem Verdünnungsfaktor des Probenextrakts in logarithmischer Skalierung, (C) Beispiel eines experimentell gemessenen Verdünnungsgraphen (hier Malathion in Orangenextrakt).

Positive versus negative lonisierung

Interessanterweise wurden in der Arbeit Unterschiede zwischen dem positiven und dem negativen Ionenmodus festgestellt. Studien von Kittlaus et al.⁸⁹ und Geis-Asteggiante et al.¹⁸⁹ bestätigen den in Kapitel 3.5 der Arbeit beschriebenen Einfluss der Analyteigenschaften auf die Stärke und die Art von Matrixeffekten (Signalsuppression oder -verstärkung) beim negativen Ionenmodus. Die bisher diskutierten Ergebnisse gelten für Messungen im positiven Ionenmodus, der in der überwiegenden Mehrheit aller LC-ESI-MS-Anwendungen eingesetzt wird. Die gemessenen Unterschiede zwischen positiver und negativer Ionisierung könnten ein Hinweis auf Unterschiede im Ablauf der Elektrospray-Ionisation schon ohne Anwesenheit von Matrix sein. Nach bestem Wissen wurde der Ablauf der Analytionisierung im Elektrospray bisher nur für den positiven Ionenmodus beschrieben. Die Auslassung des negativen Modus bedeutet jedoch nicht automatisch, dass im negativen Spray nur die Orte für Oxidation und Reduktion getauscht sind. Möglicherweise könnten bei negativer Elektrospray-Ionisation zusätzliche Redoxreaktionen stattfinden oder Teilprozesse anders ablaufen. Vereinzelt finden sich darauf Hinweise auch in der Literatur. Zum Beispiel wurden in einer Studie von Wortmann et al.¹⁹³ im negativen Elektrospray 3-fach größere Primärtropfen (~ 22 µm) im Vergleich zum positiven Spray (~ 7 µm) gemessen. Trotz gleicher äußerer Bedingungen erhielten Wortmann et al.¹⁹³ nur bei positiver Ionisation einen stabilen Cone-Jet-Modus mit schmaler Verteilung der Tröpfchengröße. Generell existieren kaum vergleichende Studien

zum ESI-Mechanismus bei positiver und negativer Ionisierung. Hier besteht weiterer Forschungsbedarf.

4.3 Minimierung von Matrixeffekten

Um die Sensitivität des Massenspektrometers optimal zu nutzen und niedrige Bestimmungsgrenzen aufrecht zu erhalten, wird das Auftreten von Matrixeffekten im günstigsten Fall schon mit der Probenaufarbeitung durch Abtrennen verantwortlicher Inhaltsstoffe vom Probenextrakt vermieden. Eine zielgerichtete Verbesserung der Probenaufarbeitung erfordert jedoch zunächst Wissen, welche Inhaltsstoffe Matrixeffekte bei der Elektrospray-Ionisation verursachen. Die Literatur enthält dazu nahezu keine Informationen. Insbesondere über entsprechende Stoffe in Extrakten pflanzlicher Lebensmittel war bislang nichts bekannt.

Im Rahmen der Arbeit wurden nun erste Inhaltsstoffe von Zitrusfrüchten und von Weizenmehl, die Matrixeffekte bei der Elektrospray-Ionisation verursachen, identifiziert. Die dazu angewandten Strategien werden in Kapitel 3.4 beschrieben. In dieser Arbeit kam dazu erstmals eine Kombination aus nontargeted-Analysen an hochauflösenden Massenspektrometern und der Nachsäuleninfusion zur Messung von Matrixeffektprofilen zum Einsatz. Es wurde festgestellt, dass Matrixeffekte durch eine Vielzahl von CHO-Verbindungen (Flavone, Cumarine, Fettsäuren, Monoacylglyceride ...) mit unterschiedlichsten funktionellen Gruppen und mit Molmassen im Bereich der Pestizide ausgelöst werden. Für Multianalyt-Methoden wird daher keine Möglichkeit gesehen, die für Matrixeffekte verantwortlichen Inhaltstoffe abzureichern ohne gleichzeitig nicht hinnehmbare Analytverluste hervorzurufen. Auch von einem Wechsel der ESI-Quelle (off-axis, orthogonal oder Z-Spray) ist nach Kapitel 3.3 der Arbeit¹⁸⁷ keine signifikante Minderung der Effekte zu erwarten. Daher muss als ein Ergebnis der Arbeit festgestellt werden, dass in der Multipestizid-Analytik mit LC-ESI-MS das Auftreten von Matrixeffekten generell nicht vermeidbar ist. Es müssen Methoden zur Minimierung und zur Kompensation der Effekte angewandt werden, um ihr Ausmaß so klein wie möglich zu halten und richtige Analysenergebnisse sicher zu stellen.

Die EU Leitline SANCO/12495/2011 zur Methodenvalidierung und zu Qualitätskontrollverfahren in der Rückstandsanalytik von Pestiziden in Lebens- und Futtermitteln,⁴¹ empfiehlt für solche Messtechniken, die nicht grundsätzlich frei von Matrixeffekten sind, routinemäßig mit Matrixkalibrierungen zu quantifizieren. Dazu kann unbelastetes Material vom selben Matrixtyp wie die zu analysierende Probe (Blankextrakt) eingesetzt werden. Zur Absicherung von Höchstmengenüberschreitungen und/oder wenn kein unbelastetes Probenmaterial vorrätig ist, sollte allerdings die aufwändigere Standardaddition angewandt werden. Darüber hinaus ermöglicht die Leitlinie den Einsatz alternativer Methoden, wenn für diese Methoden eine vergleichbare oder überlegene Messgenauigkeit nachgewiesen ist.

Die vorliegende Arbeit zeigt alternative Wege zur Messung, Minimierung und Kompensation von Matrixeffekten auf. Für die Spurenanalytik mit LC-ESI-MS/MS wurde die in Abb. 18 vorgestellte Strategie zum Umgang mit Matrixeffekten abgeleitet. Danach empfiehlt es sich (i) Matrixeffekte grundsätzlich so weit wie möglich durch Verdünnen der Probenextrakte zu minimieren ("Dilute-and-shoot"-Konzept nach Kapitel 3.2) und (ii) verbleibende Matrixeffekte über die Messung von 3 bis 5 permanent nach der LC-Säule infudierten Referenzverbindungen nachzuweisen und ggf. zu kompensieren. Als Referenzverbindungen können stabilisotop-markierte Analyte eingesetzt werden (Konzept nach Kapitel 3.1).



Abbildung 18 Strategie zum Umgang mit Matrixeffekten bei Multianalyt-Methoden in der Spurenanalytik mit LC-MS/MS und positiver Elektrospray-Ionisation

Die Minimierung von Matrixeffekten durch das Verdünnen der Endextrakte wurde in Kapitel 3.2 der Arbeit erstmals systematisch für einen weiten Bereich von Verdünnungsfaktoren (drei Zehnerpotenzen) und für eine hohe Anzahl an Analyt/Matrix-Kombinationen untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass grundsätzlich jede Analyt/Matrix-Kombination in Abhängigkeit von den spezifischen Eigenschaften und der Konzentration der jeweils koeluierenden Matrix verschieden starke Verdünnungsfaktoren zur Beseitigung des Matrixeffekts benötigt.¹⁷⁹ Für einzelne Matrixkomponenten waren in der Arbeit sehr hohe Verdünnungen bis zum Faktor 1500 notwendig. Für die Mehrheit der Matrixkomponenten ermöglicht die Messempfindlichkeit der heutigen Massenspektrometer jedoch ausreichend hohe Verdünnungsfaktoren, um die Störeffekte ganz zu beseitigen oder auf unter 20 % zu minimieren.

Zusätzlich bietet das Verdünnen der Extrakte den Vorteil, das Gerät weniger zu verschmutzen, so dass weniger Ausfallzeiten anfallen. Geis-Asteggiante et al.¹⁸⁹ führen als weiteren Vorteil eine verbesserte Chromatographie für die polarsten Analyte in Multiklassen-, Multirückstandsmethoden mit Umkehrphasen an. Die vorgeschlagene Strategie macht eine Beschaffung und Lagerung repräsentativer, unbelasteter Probematerialien, die sonst für Matrixkalibrierungen erforderlich sind, überflüssig. Zur Quantifizierung genügen Kalibriergeraden in Lösungsmittel. Aufgrund der o. a. Vorteile scheint es empfehlenswert, generell alle Endextrakte vor Injektion in ein LC-MS-System um einen tolerierbaren Faktor zu verdünnen. Der maximal anwendbare Verdünnungsfaktor richtet sich (i) nach den Bestimmungsgrenzen, die mindestens zur Überwachung von Höchstmengen eingehalten werden müssen und (ii) nach der Messempfindlichkeit des LC-MS-Geräts. Je nach Gerätegeneration können Unterschiede in der Sensitivität um mehr als das

100-Fache auftreten. Daher muss die Höhe der Extraktverdünnung individuell an die vorliegende Geräteempfindlichkeit angepasst werden.

Setzt man die ESI-Quelle zur Erzeugung positiver Ionen ein, so haben die Eigenschaften der Analyte generell nur einen schwachen Einfluss auf das Ausmaß von Matrixeffekten. Diese grundlegende Eigenschaft der Matrixeffekte wurde im Rahmen der Arbeit aufgedeckt und in Kapitel 3.1 beschrieben. Für Messungen im ESI(+) erscheint es daher unnötig, bei Anwendung der Nachsäuleninfusion die Matrixeffektprofile für jeden einzelnen Analyten zu messen. Vielmehr sollte es genügen, die Analyte in wenige Gruppen (etwa 3 bis 5), innerhalb derer die Stärke des Matrixeffekts besonders ähnlich ist, einzuteilen und pro Gruppe das Matrixeffektprofil nur einer einzelnen "Referenzverbindung" zu messen.¹⁷³ Der auf konventionelle Weise (mittels Matrixkalibrierung) für einen Analyten gemessene Matrixeffekt sollte sich nur wenig von dem Matrixeffekt, den die Referenzverbindung der Gruppe zur Retentionszeit des Analyten erleidet, unterscheiden. Das in Abb. 18 empfohlene Schema sieht deshalb vor, die SRM-Messmethoden um 3 bis 5 Übergänge von Referenzverbindungen zu erweitern und deren Signalintensitäten simultan zur Messung der verdünnten Probenextrakte mit der Methode der Nachsäuleninfusion über die gesamte Messzeit aufzuzeichnen. Dabei werden keine zusätzlichen Injektionen benötigt ("Echtzeit-Methode"). Werden Matrixeffekte durch die Verdünnung nicht vollständig beseitigt, kann deren Einfluss über das Profil der Referenzverbindung erkannt und kompensiert werden.

Die Methode entspricht im Wesentlichen der Idee, die Choi et al.⁹⁵ schon 1999 vorgeschlagen hatten. Die Validierung dieses Verfahrens erfolgte erst in der vorliegenden Arbeit und ergab bei der 15-fach wiederholten Messung eines Matrixeffektprofils im Mittel eine Standardabweichung kleiner 10 % Matrixeffekt. Damit war die Wiederholpräzision vergleichbar mit der normaler LC-MS/MS-Messungen. Ob Matrixeffekte mit den Profilen von Referenzverbindungen nicht nur präzise, sondern auch richtig kompensiert werden, wurde im ESI(+) für 129 Pestizide anhand einer einzelnen Referenzverbindung (Carbendazim) untersucht. Für Analytsignale, die um mehr als 40 % supprimiert vorlagen, verbesserten sich die Wiederfindungen von im Mittel 45 % auf 85 %. Wird die Anzahl der Referenzverbindungen auf 3 bis 5 erhöht, ist aufgrund der robusteren Bestimmung des Matrixeffekts mit noch genaueren Ergebnissen zu rechnen.

Wenn nach der Kompensation mit den Referenzverbindungen eine Überschreitung gesetzlicher Höchstmengen oder anderer Grenzwerte aufgrund der üblichen Messunsicherheit nicht sicher nachgewiesen oder ausgeschlossen ist, müssen die Analysenbefunde zusätzlich nach dem Standardadditionsverfahren abgesichert werden. Nur in diesen Fällen ist noch eine Standardaddition notwendig.

Alternativ zur generellen Verdünnung aller injizierten Probenextrakte können die Extrakte auch nur für ausgewählte Wiederholungsmessungen verdünnt werden. Diese Arbeitsweise ist insbesondere sinnvoll, wenn durch Matrixeffekte verursachte Unsicherheiten bei der Beurteilung von Grenzwertüberschreitungen selten sind. Zwar wird zusätzliche Messzeit für die nachträglichen Wiederholungsmessungen notwendig, der Verdünnungsfaktor kann jedoch individuell an die jeweilige Analyt/Matrix-Kombination angepasst werden. Auf diese Weise würden Bestimmungsgrenzen nicht pauschal angehoben. Als Faustregel ergab die Arbeit: Mit einer Verdünnung um Faktor 10 werden Signalsuppressionen um mindestens 25 % gesenkt. Wegen des logarithmischen Zusammenhangs zwischen Matrixkonzentration und Matrixeffekt, ist zur Verdopplung des reduzierten Effekts (mind. 50 %) eine Verzehnfachung des Verdünnungsfaktors (Faktor 100) notwendig.

Aus der Literatur sind nur zwei weitere Vorschläge, Matrixeffekte mittels Nachsäuleninfusion zu kom-

pensieren, bekannt. Vogeser et al.¹⁹⁴ favorisieren für die Klinische Chemie normalerweise eine Kompensation von Matrixeffekten mit Internen Standards. Für Analyte, für die kein stabilisotop-markierter Interner Standard erhältlich ist, schlugen sie in 2012 auch ein auf Nachsäuleninfusion beruhendes Konzept vor. Im Unterschied zu der Methode in Abb. 18 für Multi-Analytmessungen¹⁷³ werden dabei nicht wenige repräsentative Referenzverbindungen, sondern sämtliche Zielanalyte infudiert. Damit weisen alle gemessenen Chromatogramme einen erhöhten Untergrund entsprechend der infudierten Konzentration auf. Enthält der injizierte Probenextrakt einen Analyten, so sitzt der zugehörige Analytpeak auf dem erhöhten "Untergrund".

Vogeser et al.¹⁹⁴ schlagen eine Berechnung des Responseverhältnisses zwischen LC-Peakfläche des Analyten (Fläche A) und der darunter befindlichen Fläche an infudiertem Analyt (Fläche B, berechnet aus Untergrundhöhe und doppelter Halbwertsbreite) vor. Das Konzept geht bei Stattfinden eines Matrixeffekts von einer gleichmäßigen Änderung beider Flächen, d. h. einem unverändertem Flächenverhältnis, aus. Dieser Ansatz erscheint zwar theoretisch richtig, praktisch können eine ESI-Quelle und ein MS-Detektor jedoch nicht zwischen infudierten und mit dem Extrakt injizierten Analytmolekülen unterscheiden. Es ist anzunehmen, dass die bei einer Signalsuppression verringerte infudierte Fläche B von der darüber befindlichen, in gleichem Maße verringerten, Peakfläche A "aufgefüllt" wird. Durch die auf gleichem Niveau verbleibende Integrationslinie erschiene nur Peakfläche A verkleinert (wenn A > B). Bei gleichgroßen Flächen A und B und einem Matrixeffekt von ME = - 50 % verbliebe, verglichen zur Signalintensität ohne Matrixeffekt, nur eine konstant hohe infudierte Fläche B. Es bestünde das Risiko zu kleiner oder falsch negativer Analytbefunde aufgrund unerkannter Signalsuppressionen. Die Schwierigkeit bei einem Konzept, das auf der Nachsäuleninfusion *von Zielanalyten* zur Kompensation von Signalsuppressionen beruht, liegt auswertetechnisch beim richtigen Ansetzen der Integrationslinie für den LC-Analytpeak.

Diese Schwierigkeit wurde in einer Methode von Kaufmann und Butcher¹⁹⁵ bereits in 2005 beschrieben und gelöst. Die Analytlösung wurde dazu nicht permanent infudiert, sondern anhand von zwei Hilfspumpen und einem Schaltventil in Paketen aus analythaltiger und analytfreier Lösung. Das infudierte Analytsignal erscheint als periodische Spikes. Wenn die Peakweite der Spikes viel schmaler als die der LC-Analytpeaks eingestellt wird, sitzen die kleinen, infudierten Spikes dem Analytpeak auf. Matrixeffekte können dann durch einen Responsevergleich der Spikes im Probenextrakt und im reinen Lösungsmittel berechnet werden. Wegen ihrer Komplexität und schwierigen Handhabbarkeit wurde die Methode seit ihrer Veröffentlichung jedoch kaum aufgegriffen. Neben einem sehr komplexen technischen Messaufbau ist zur Peakflächenerkennung zusätzlich eine mathematisch aufwendige Auswertung mithilfe multilinearer Regressionen, die außerhalb der Gerätesoftware erfolgen muss, erforderlich.

Die hier vorgeschlagene Strategie zum Umgang mit Matrixeffekten bei LC-MS-Multianalyt-Methoden mit positiver Elektrospray-Ionisation ist im Vergleich zu Kaufmann und Butchers¹⁹⁵ Methode leichter umsetzbar. Vor allem das Verdünnen ist ein einfacher, wirkungsvoller Arbeitsschritt. Zudem werden beim neuen Verfahren – vergleichbar zur Standardaddition – die Matrixeffekte der tatsächlichen Probenextrakte gemessen. Im Vergleich dazu kann bei Matrixkalibrierungen die Messgenauigkeit aufgrund von Unterschieden zwischen der Konzentration bestimmter Inhaltstoffe in Probe und Matrixstandard herabgesetzt sein. Erhöht man die Anzahl der Referenzverbindungen auf 3 bis 5, wird daher von einer ähnlichen Messunsicherheit zwischen der hier vorgeschlagenen Methodik und der nach der EU-Leitlinie SANCO/12495/2011⁴¹ vorgesehenen Matrixkalibrierungen ausgegangen.

Als Methode mit der höchsten Messgenauigkeit sollte nach wie vor die aufwendige Standardaddition angesehen werden. Mit der neuen Strategie wird die Anzahl der Fälle, in denen Standardadditionen zur Absicherung herangezogen werden sollten, jedoch auf ein Minimum reduziert. Je nach Messempfindlichkeit des eingesetzten LC-ESI-MS-Geräts kann in Zukunft vielleicht vollständig auf Standardadditionen verzichtet werden. Durch das Messen von Matrixeffektprofilen werden Bereiche im Chromatogramm ohne Auftreten von Matrixeffekten erkannt. Während früher zur Absicherung von Höchstmengenüberschreitungen in diesen Bereichen Standardadditionen durchgeführt wurden, genügt nun eine wiederholte Quantifizierung über Kalibriergeraden in Lösungsmittel. Das Verdünnen der Probenextrakte reduziert Matrixeffekte schon heute in vielen Fällen so stark, dass in solchen Chromatogrammbereichen anstelle von Standardadditionen ebenfalls Quantifizierungen über Kalibriergeraden in Lösungsmittel genügen.

In den Fällen, in denen das Analytsignal trotz Verdünnung um mehr als 20 % supprimiert wird, kann der über Lösungsmittelstandards berechnete Analytgehalt anhand des Matrixeffekts der Referenzverbindung korrigiert werden. Nur wenn der so berechnete Analytgehalt zwischen dem 0,4-Fachem und dem 2,5-Fachem der Höchstmenge liegt, sollte zur Absicherung eine Standardaddition durchgeführt werden. Der Annahme liegt eine Messunsicherheit der Kompensation von Matrixeffekten über Referenzverbindungen von 60 % zugrunde. Bisher wurde der Einsatz der Standardaddition unabhängig von der Stärke des Matrixeffekts im jeweiligen Chromatogrammbereich, empfohlen sobald der über Matrixkalibrierungen gemessene Analytgehalt zwischen dem 0,5-Fachem und dem 2-Fachem der Höchstmenge lag.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel dieser Arbeit war es Matrixeffekte, die in der Spurenanalytik mit LC-ESI-MS auftreten, grundlegend zu charakterisieren, Rückschlüsse auf ihren Mechanismus zu ziehen und Vorschläge zum Umgang mit diesen Störeffekten für Multianalyt-Methoden abzuleiten.

Dazu wurde eine neue Methode zur Quantifizierung von Matrixeffekten bei LC-ESI-MS-Analysen über Matrixeffektprofile eingeführt. Matrixeffektprofile beschreiben das Ausmaß von Ionisierungsstörungen erstmals quantitativ über die gesamte Messzeit chromatographischer Läufe. Neben der konventionellen Messung von Matrixeffekten mit Matrixstandards wurden in dieser Arbeit die Matrixeffektprofile für mehr als 3600 Analyt/Matrix-Kombinationen bei ESI(+) und weitere 590 Analyt/Matrix-Kombinationen bei ESI(-) gemessen. Die Untersuchung der Matrixeffekte erfolgte am Beispiel von Pestizid-Rückständen in Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft, Trink- und Oberflächenwässern.

Die statistische Auswertung der Messdaten ergab im positiven Ionenmodus überraschend ähnliche Matrixeffekte für die Mehrheit der Pestizide. Damit wurde entgegen der lange vorherrschenden Meinung gezeigt, dass Matrixeffekte vorhersagbar sind, weil sie i. d. R. nur von der Retentionszeit und kaum von weiteren Eigenschaften der Analyte abhängig sind. Dieser Befund deckt sich mit einem theoretischen Modell von Enke et al.,^{28,29,96,97} mit dem in dieser Arbeit der Einfluss koeluierender Matrix auf den ESI-Response von Analyten simuliert wurde. Die weitestgehend alleinige Abhängigkeit der Matrixeffekte von der Retentionszeit wurde mit fünf ESI-Quellen von drei Geräteherstellern bestätigt. Der häufiger vermutete Einfluss der ESI-Quellengeometrie auf Matrixeffekte wurde bei dem Gerätevergleich nicht festgestellt.

Durch Messungen an hochauflösenden Massenspektrometern wurden 31 Inhaltsstoffe pflanzlicher Lebensmittel identifiziert, die Matrixeffekte bei der ESI verursachen. Die Stoffeigenschaften der identifizierten Inhaltsstoffe unterscheiden sich zu wenig von denen wichtiger Pestizide, um mit einer speziellen Probenaufarbeitung eine selektive Abtrennung der verantwortlichen Probenmatrix zu erreichen.

Als Alternative zur Verbesserung der Probenaufarbeitung wurde das Verdünnen der Probenendextrakte als Methode zur Minimierung von Matrixeffekten untersucht. Für 156 Analyt/Matrix-Kombinationen wurde der Nutzen verschiedener Verdünnungsfaktoren gemessen. Dabei wurde festgestellt, dass Matrixeffekte mit dem Logarithmus der Matrixkonzentration steigen.

Es wurde eine neue Vorgehensweise abgeleitet, mit der die Anzahl der heute noch durchgeführten aufwendigen Standardadditonen deutlich gesenkt werden könnte. Dazu wird empfohlen (i) alle Probenextrakte vor Injektion in das LC-MS-Gerät zu verdünnen und (ii) die SRM-Messmethoden um 3-5 Übergänge für permanent nach der LC-Säule infudierte Referenzverbindungen zu erweitern. Effekte der Matrix auf den Response von Analyten können in vielen Fällen mit Hilfe der Matrixeffektprofile der Referenzverbindungen kompensiert werden.

Als Mechanismus der Signalsuppression unterstützen die Ergebnisse der Arbeit stark die Hypothese einer Konkurrenz zwischen Analyt und koeluierender Matrix um Überschussladungen an der Oberfläche der ESI-Tropfen. Andere Hypothesen zum Mechanismus der Matrixeffekte wurden in der Arbeit widerlegt.

Letztlich wurde im Elektrospray ein unterschiedlicher Einfluss der Matrix bei der Erzeugung positiver oder negativer Ionen festgestellt. So wurden z. B. bei negativer Ionisierung Unterschiede in den Matrixeffektprofilen festgestellt und häufiger Signalerhöhungen gemessen als mit ESI(+). Zum Ablauf der negativen Elektrospray-Ionisation und ihrer Störung durch Matrix besteht weiterer Forschungsbedarf.

5 SUMMARY

The aim of this work was to fundamentally characterise matrix effects, which occur in trace level analysis with LC-ESI-MS. Based on the understanding of their mechanism, recommendations concerning the handling of these disturbing effects for multianalyte methods should be drawn.

For this purpose a new procedure for the quantification of matrix effects in LC-ESI-MS analyses by matrix effect profiles was introduced. The matrix effect profiles obtained by this procedure continuously cover the changes of ionization efficiency during the complete run time of chromatograms. In addition to the conventional determination of matrix effects with matrix-matched standards, matrix effect profiles were measured in this work for more than 3600 analyte/matrix combinations with ESI(+) and further 590 analyte/matrix combinations with ESI(-). Matrix effects were investigated using as an example pesticide residues in food of plant origin, and drinking and surface water.

The statistical evaluation of the obtained data resulted in surprinsingly similar matrix effects for the majority of pesticides in the positive ion mode. Thus, in contrast to the predominating opinion, it was shown that matrix effects are predictable, since they are usually only dependent on the retention time and hardly on further properties of the analytes. This finding is in agreement with a theoretical model of Enke et al.,^{28,29,96,97} which was used in this work to simulate the influence of coeluting matrix components on the ESI response of analytes. The nearly exclusive dependence of matrix effects on retention time was confirmed with five ESI sources from three manufacturers. The often supposed influence of spray geometry on the extent of matrix effects was not observed in this comparison of instruments.

Via analysis with high-resolving mass spectrometers 31 ingredients of vegetable food causing matrix effects in ESI were identified. The material properties of the identified substances differ too little from those of important pesticides in order to achieve their selective separation from extracts without reduction of analyte concentrations.

As an alternative method for minimization of matrix effects, the dilution of final sample extracts was investigated. The benefit of different dilution levels was measured for 156 analyte/matrix combinations. Thereby it was proven that matrix effects increase with the logarithm of matrix concentration.

A new procedure, which may significantely reduce the number of labour-intensive standard additions still performed today, was derived. Therefore, it is recommended to (i) dilute all sample extracts before injection into the LC-MS instrument and (ii) to extend the SRM acquisition methods by 3-5 transitions of permanently post-column infused monitor substances. Effects of matrix on the response of analytes can be compensated in many cases with the help of the matrix effect profiles of the monitor substances.

The results of the work strongly support the hypothesis of a competition between analyte and co-eluting matrix for excess charges on the surface of the ESI droplets as a basic mechanism of signal suppression. Other hypotheses for the mechanism of matrix effects were not supported by results of this study.

Finally, it was noticed that the formation of negative and positive ions during electrospray is often influenced by matrix in a different way. For instance, matrix effect profiles differed between analytes and more often strong signal enhancements were measured with negative ionization compared to ESI(+). The basic mechanism of negative electrospray ionization and the influence of matrix compounds on the analyte response in ESI(-) are two areas that require further research.

6 ANHANG

6.1 Abkürzungen

2D-LC	Zwei-dimensionale Flüssigchromatographie
	Atmospheric Pressure Chemical Ionization (Chemische Ionisation unter Atmosphären-
AFCI	druck)
API	Atmospheric Pressure Ionization (Atmosphärendruck Ionisation)
APPI	Atmospheric Pressure Photo Ionization (Photoionisation bei Atmosphärendruck)
BBA	Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft
CRM	Charged Residue Model (Modell des geladenen Rückstands)
DFC	Dictionary of Food Compounds
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DOC	Dissolved Organic Carbon (gelöster organischer Kohlenstoff)
EIC	Extracted Ion Chromatogram (extrahiertes Ionenchromatogramm)
ESI	Electrospray Ionization (Elektrospray-Ionisation)
ESI(-)	Negative Elektrospray-Ionisation
ESI(+)	Positive Elektrospray-Ionisation
FWHM	Full Width at Half Maximum (Halbwertsbreite)
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
HR	High Resolution (Hochauflösung)
IEM	Ion Evaporation Model (Ionenverdampfungsmodell)
	International Union of Pure and Applied Chemistry (Internationale Union für reine und
	angewandte Chemie)
LC	Flüssigchromatographie
LC-ESI-MS	Flüssigchromatographie-Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie
LC-ESI-MS/MS	Flüssigchromatographie-Elektrospray-Ionisation-Tandem-Massenspektrometrie
LC-MS	Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie
m/z	Masse/Ladung
ME	Matrixeffekt
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
QuEChERS-Methode	"Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe" method
RP	Reversed Phase (Umkehrphase)
RT	Retention Time (Retentionszeit)
	Directorate-General for Health and Consumers of the European Commission (Gene-
GD SANCO	raldirektion Gesundheit und Verbraucher der Europäischen Kommission)
SPE	Solid Phase Extraction (Festphasenextraktion)
SRM	Selected Reaction Monitoring
TIC	Total Ion Current (Totalionenstrom)
TOF	Time of flight (Flugzeit)



6.2 Identifizierung Matrixeffekt auslösender Inhaltsstoffe in pflanzlichen Lebensmitteln

Abbildung A-1(A) Matrixeffekt-Profil, (B) TIC eines Full-Scans vom Agilent 6530 Q-TOF und (C) TIC eines Full-Scans vom Thermo Fisher Scientific Orbitrap-MS für drei verschiedene Aufarbeitungen einer identischen Blumenkohlprobebei Anwendung dergleichen chromatographischen Methode. Die Retentionszeiten wurden mit einer an allen drei LC-MS-Geräten gemessenen Pestizidmischung miteinander korreliert.



Abbildung A-2(A) Matrixeffekt-Profil, (B) TIC eines Full-Scans vom Agilent 6530 Q-TOF und (C) TIC eines Full-
Scans vom Thermo Fisher Scientific Orbitrap-MS für drei verschiedene Aufarbeitungen einer identischen Karottenprobe bei
Anwendung dergleichen chromatographischen Methode. Die Retentionszeiten wurden mit einer an allen drei LC-MS-
Geräten gemessenen Pestizidmischung miteinander korreliert.



Abbildung A-3(A) Matrixeffekt-Profil, (B) TIC eines Full-Scans vom Agilent 6530 Q-TOF und (C) TIC eines Full-
Scans vom Thermo Fisher Scientific Orbitrap-MS für drei verschiedene Aufarbeitungen einer identischen Avocadoprobe bei
Anwendung dergleichen chromatographischen Methode. Die Retentionszeiten wurden mit einer an allen drei LC-MS-
Geräten gemessenen Pestizidmischung miteinander korreliert.

	•						
TIC- Peak # ¹	Exakte Massen (amu) ²	Theoretisch mögliche Neutralmassen (amu)	Σ Treffer DFC ^{3,4}	Σ Summen- formeIn	Σ Abgeleitete Kandidaten	Σ Beschaffb. Standards	ldenti- fizierung
	144.1018		210		Randadon	otandardo	
	166.0837						
	287.1959	143.0945	20	1	1	0	
1	309.1777						nein
	203.0524	202.0451	1	1	0	0	
		185.0186	0	0	0	0	
		180.0637	77	2	2	0	
	373.1267						
2a	395.1092	372.1195	30	1	2	<u>1</u>	ja
	767.2236						
	403.1375	100 1015	16	4	2	0	
2b	425.1198	402.1315	10	I	3	0	nein
	827.2464			identisch	zu TIC-Peak 3a	a	
	343.1166	342.1093	31	2	2	0	
		325.0828	0	0	0	0	
30		320.1279	4	1	0	0	ia
Ja	403.1374						ja
	425.1203	402.1301	16	1	4	<u>1</u>	
	827.2482						
	433.1476						
3b	455.1301	432.1403	15	2	1	0	nein
	887.2678						
	373.1269		2	1	1	0	
4	395.1086	372.1196	2	•	•	Ū	nein
	767.2254			identisch	zu TIC-Peak 2a	a	
	261.2213	260.2140	0	0	0	0	
		243.1874	0	0	0	0	
		238.2326	0	0	0	0	
-	353.2676	352,2603	8	1	1	0	nein
5	375.2497	002.2000	Ĵ.	•	•	Ũ	
	424.3626	423.3554	0	0	0	0	
		406.3288	0	0	0	0	
		401.3740	0	0	0	0	
	355.2834				-		
	372.3099	354.2761	3	1	2	1	
	377.2654						
	393.2402	392.2329	1	1	0	0	
6		375.2063	0	0	0	0	nein
		370.2515	1	1	0	0	
	337.2735	336.2662	11	1	0	0	
		319.2396	0	0	0	0	
		314.2848	4	1	0	0	
	282.2788	281.2715	4	1	0	0	
		264.2450	3	1	0	0	
	000.0070	259.2901	0	0	0	0	
7a	303.2679	302.2606	1	1	0	0	nein
		285.2341	0	0	0	0	
	004 0000	280.2792	1	1	0	0	
	331.2836	330.2763	4	1	1	0	
	353.2655						

Tabelle A-1Bilanz der Non-targeted-Analyse zur Identifizierung von Inhaltsstoffen in Orangenextrakten, welche
Matrixeffekte bei der Elektrospray-Ionisation hervorrufen

TIC- Peak # ¹	Exakte Massen (amu) ²	Theoretisch mögliche Neutralmassen (amu)	Σ Treffer DFC ^{3,4}	Σ Summen- formeln	Σ Abgeleitete Kandidaten	Σ Beschaff. Standards	Identi- fizierung
	403.2808	402.2735	3	1	1	0	
7a		385.2470	0	0	0	0	
		380.2921	5	1	1	0	
	339.2891	338.2818	3	1	0	0	
		321.2552	0	0	0	0	
		316.3004	2	1	0	0	
	357.2990						
7b	374.3255	356.2917	6	1	2	1	nein
	379.2810						
	395.2557	394.2484	0	0	0	0	
		377.2218	0	0	0	0	
		372.2670	3	1	0	0	

1 Die Nummerierung der TIC-Peaks geht aus Abb. 3c hervor.

2 Es wurden nur Molecular Features, deren Peakmaximum im Extracted Ion Chromatogram (EIC) < 0,1 min Retentionszeit-Abweichung zum Peakmaximum im Totalionenstrom (TIC) aufweist, gelistet.

3 DFC = Dictionary of Food Compounds, online-Datenbank mit > 50.000 Lebensmittelinhaltsstoffen

4 Tolerierte Massenabweichung bei der Datenbanksuche ± 10 ppm

HC: Example Bask # Independent mogicine DFC* Treffer Summen- Summen- DFC* Augeleitete Kandiaten Beschards Standards Indevendent Standards 195.13791 194.1306 30 1 0 0 0 213.14840 212.1411 16 1 1 1 1 227.16403 226.1568 41 1 1 1 1 227.16403 226.1568 41 1 1 1 1 227.16403 226.1568 41 1 1 1 1 295.2614 294.2189 24 1 2 0 0 0 295.2614 294.2189 24 1 2 1 1 0 303.26396 312.2300 3 1 1 0 0 0 333.22898 330.2398 6 1 2 1 1 1 334.256623 393.2490 0 0 0 0 0 0 <th>TIO</th> <th>Fuelds</th> <th>The survey is the set of the line of the set of the set</th> <th>Σ</th> <th>Σ</th> <th>Σ</th> <th>Σ</th> <th>l d a se ti</th>	TIO	Fuelds	The survey is the set of the line of the set	Σ	Σ	Σ	Σ	l d a se ti
195.13791 194.1306 30 1 0 0 0 195.13791 194.1306 0 0 0 0 0 0 213.14840 212.1411 16 1	Peak # ¹	Exakte Massen (amu) ²	Neutralmassen (amu)	Treffer	Summen-	Abgeleitete Kandidaten	Beschaff. Standards	fizierung
1 10.101 177.1041 0 <		195 13791	194 1306	30	1	0	0	
172.1492 0 0 0 0 213.14840 212.1411 16 1 1 1 195.1146 0 0 0 0 0 227.16403 226.1668 41 1 1 1 209.1302 0 0 0 0 0 207.16403 226.1668 8 1 0 0 204.1754 0 0 0 0 0 295.22614 294.2189 24 1 2 0 0 295.22614 294.2189 24 1 2 0 0 0 313.23727 330.2398 6 1 2 1 1 0 363.22698 352.2217 14 1 2 0 0 0 0 0 0 0 0 1 2 1 1 1 1 2 1 1 1 1 1 1 <td></td> <td>100.10101</td> <td>177.1041</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td></td>		100.10101	177.1041	0	0	0	0	
213.14840 212.1411 16 1 1 1 195.1146 0 0 0 0 0 0 227.16403 226.1668 41 1 1 1 1 209.1302 0 0 0 0 0 0 277.21607 276.2088 8 1 0 0 0 277.21607 276.2088 8 1 0 0 0 285.22614 294.2189 24 1 2 0 0 0 313.23727 330.2398 6 1 2 1 0 0 333.22898 330.2398 6 1 2 1 3 0 1 1 1 1 1 1			172.1492	0	0	0	0	
195.1146 0 0 0 0 190.1597 0 0 0 0 0 227.16403 228.1568 41 1 1 1 201.1754 0 0 0 0 0 277.21607 276.2088 8 1 0 0 255.22614 294.2189 24 1 2 0 255.22614 294.2189 24 1 2 0 313.23727 330.26396 312.2300 3 1 1 0 334.27361 330.2398 6 1 2 1 335.22808 330.2490 0 0 0 0 334.25623 333.2490 0 0 0 0 279.23147 278.2242 29 1 4 1 297.24194 296.2347 18 1 3 1 297.24194 296.2347 18 1 3 <td< td=""><td></td><td>213,14840</td><td>212.1411</td><td>16</td><td>1</td><td>1</td><td>1</td><td></td></td<>		213,14840	212.1411	16	1	1	1	
190.1597 0 0 0 0 227.16403 226.1568 41 1 1 1 201.1754 0 0 0 0 0 277.21607 276.2088 8 1 0 0 256.2214 294.2189 24 1 2 0 295.22614 294.2189 24 1 2 0 313.23727 30 0 0 0 0 330.26396 312.2300 3 1 1 0 0 333.26396 352.2217 14 1 2 0 0 0 344.27361 3 0 0 0 0 0 0 394.25623 393.2490 0 0 0 0 0 0 279.23147 278.2242 29 1 4 1 1 1 297.24194 296.2347 18 1 3 2			195.1146	0	0	0	0	
227.16403 226.1568 41 1 1 1 209.1302 0 0 0 0 0 201.1754 0 0 0 0 0 277.21607 276.2088 8 1 0 0 259.1822 0 0 0 0 0 295.22614 294.2189 24 1 2 0 0 0 313.23727 312.2300 3 1 1 0 0 0 344.27361 353.22898 330.2398 6 1 2 1 353.22898 352.2217 14 1 2 0			190.1597	0	0	0	0	
1 209.1302 0 0 0 0 277.21607 276.2088 8 1 0 0 259.1822 0 0 0 0 0 295.22614 294.2189 24 1 2 0 0 0 217.21607 276.2087 12 0 0 0 0 295.22614 294.2189 24 1 2 0 0 0 313.23727 312.2300 3 1 1 0 3 348.27361 3 35.22898 3 3 1 1 0 <		227.16403	226,1568	41	1	1	1	
204.1754 0<			209.1302	0	0	0	0	
277.21607 276.2088 8 1 0 0 1 259.1822 0 0 0 0 0 295.22614 294.2189 24 1 2 0 0 0 0 313.23727 330.26396 312.2300 3 1 1 0 0 3 3 1 1 0 0 3 3 1 1 0 0 3 3 1 1 0 3 3 1 1 0 3 3 1 1 0 0 3 3 1 1 0 3 3 1 1 0 3 3 3 1 1 0 3 3 3 1 1 0 3 <td></td> <td></td> <td>204.1754</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td></td>			204.1754	0	0	0	0	
1 259.1822 0 0 0 0 0 295.22614 294.2189 24 1 2 0 <td></td> <td>277.21607</td> <td>276.2088</td> <td>8</td> <td>1</td> <td>0</td> <td>0</td> <td></td>		277.21607	276.2088	8	1	0	0	
1 254.2274 0<			259.1822	0	0	0	0	
1 295.22614 294.2189 24 1 2 0			254.2274	0	0	0	0	
277.1923 0 0 0 0 313.23727 312.2300 3 1 1 0 348.27361 330.2398 6 1 2 1 353.22898 330.2398 6 1 2 1 353.22898 352.2217 14 1 2 0 394.25623 393.2490 0 0 0 0 376.2224 6 1 0 0 0 376.2224 6 1 0 0 0 279.23147 278.2242 29 1 4 1 297.24194 296.2347 18 1 3 2 279.23147 279.2081 0 0 0 0 315.25243 314.2452 16 1 3 0 375.25243 314.2452 16 1 3 0 319.2212 0 0 0 0 0 <	1	295.22614	294.2189	24	1	2	0	<u>ja</u>
272.2375 12 1 0 0 313.23727 312.2300 3 1 1 0 330.26396 312.2300 3 1 1 0 348.27361 330.2398 6 1 2 1 353.22898 330.2398 6 1 2 1 353.22898 352.2217 14 1 2 0 354.5223 393.2490 0 0 0 0 376.2224 6 1 0 0 0 279.23147 278.2242 29 1 4 1 297.24194 296.2347 18 1 3 2 279.23147 278.2342 16 1 3 0 409.25507 408.2478 0 0 0 0 319.2212 0 0 0 0 0 319.22370 318.2164 48 1 3 1			277.1923	0	0	0	0	
313.23727 330.26396 312.2300 3 1 1 0 348.27361 353.22898 330.2398 6 1 2 1 353.22898 352.2217 14 1 2 0 353.22898 352.2217 14 1 2 0 353.22898 352.2217 14 1 2 0 353.22898 352.2217 14 1 2 0 353.22898 352.2217 14 1 0 0 353.22898 352.2217 14 1 0 0 353.25243 352.224 6 1 0 0 297.24194 296.2347 18 1 3 2 279.2081 0 0 0 0 0 315.25243 314.2452 16 1 3 0 315.25243 314.2452 16 1 3 0 319.22370 378.2242 identisch zu TIC-Peak 2, S			272.2375	12	1	0	0	
330.26396 312.2300 3 1 1 0 348.27361 30.2398 6 1 2 1 353.22898 330.2398 6 1 2 1 353.22898 394.25623 393.2490 0 0 0 394.25623 393.2490 0 0 0 0 376.2224 6 1 0 0 0 279.23147 278.2242 29 1 4 1 297.24194 296.2347 18 1 3 2 297.24194 296.2347 18 1 3 2 315.25243 314.2452 16 1 3 0 315.25243 314.2452 16 1 3 0 315.25243 314.2452 16 1 3 0 319.22370 408.2478 0 0 0 0 319.22370 318.2164 48 1 3<		313.23727	0.40,0000		4	4	<u>^</u>	
348.27361 353.22898 330.2398 6 1 2 1 353.22898 352.2217 14 1 2 0 394.25623 393.2490 0 0 0 0 394.25623 393.2490 0 0 0 0 394.25623 393.2490 0 0 0 0 376.26429 1 1 0 0 0 279.23147 278.2242 29 1 4 1 297.24194 296.2347 18 1 3 2 21 279.2081 0 0 0 0 315.25243 314.2452 16 1 3 0 337.23421 314.2452 16 1 3 0 0 348.2507 408.2478 0 0 0 0 0 319.2212 0 0 0 0 0 0 319.22370 318.2164 <		330.26396	312.2300	3	1	1	0	
353.22898 330.2398 6 1 2 1 353.22898 352.2217 14 1 2 0 394.25623 393.2490 0 0 0 0 376.2224 6 1 0 0 371.2676 0 0 0 0 279.23147 278.2242 29 1 4 1 297.24194 296.2347 18 1 3 2 297.24194 296.2347 18 1 3 2 315.25243 314.2452 16 1 3 0 337.23421 314.2452 16 1 3 0 337.23421 314.2452 16 1 3 0 391.2212 0 0 0 0 0 319.22370 identisch zu TIC-Peak 2, Stoff 1 295.22644 272.2375 identisch zu TIC-Peak 1, Stoff 5 nein 4 324.28990 323.2826 1		348.27361	220.2200	0	4	2	4	
363.22898 705.45429 352.2217 14 1 2 0 394.25623 393.2490 0 0 0 0 0 0 394.25623 393.2490 0 0 0 0 0 0 0 394.25623 393.2490 0 0 0 0 0 0 0 376.2224 6 1 0 0 0 0 0 0 0 279.23147 278.2242 29 1 4 1 2 1		353.22898	330.2398	6	1	2	1	
705.45429 332.2217 14 1 2 0 394.25623 393.2490 0 0 0 0 376.2224 6 1 0 0 371.2676 0 0 0 0 279.23147 278.2242 29 1 4 1 261.1976 0 0 0 0 0 297.24194 296.2347 18 1 3 2 297.24194 296.2347 18 1 3 2 315.25243 1 1 0 0 0 315.25243 337.23421 314.2452 16 1 3 0 409.25507 408.2478 0 0 0 0 0 316.2664 0 0 0 0 0 0 0 319.22370 318.2164 48 1 3 1 nein 319.22370 318.2164 48		353.22898	252 2247	14	4	2	0	
394.25623 393.2490 0		705.45429	332.2217	14	I	2	0	
2 376.2224 6 1 0 0 371.2676 0 0 0 0 0 279.23147 278.2242 29 1 4 1 266.2428 12 1 1 1 297.24194 296.2347 18 1 3 2 279.2081 0 0 0 0 0 315.25243 314.2452 16 1 3 0 315.25243 314.2452 16 1 3 0 409.25507 408.2478 0 0 0 0 386.2664 0 0 0 0 0 319.22370 318.2164 48 1 3 1 313.22370 318.2164 48 1 3 1 4 306.2561 55 1 0 0 0 319.22370 318.2164 48 1 3 1 1		394.25623	393.2490	0	0	0	0	
2 371.2676 0 0 0 0 279.23147 278.2242 29 1 4 1 261.1976 0 0 0 0 0 297.24194 296.2347 18 1 3 2 297.24194 296.2347 18 1 3 2 279.2081 0 0 0 0 0 315.25243 1 1 0 0 0 337.23421 314.2452 16 1 3 0 409.25507 408.2478 0 0 0 0 391.2212 0 0 0 0 0 391.2212 0 0 0 0 0 319.22370 identisch zu TIC-Peak 2, Stoff 1 1 nein 319.22370 318.2164 48 1 3 1 4 306.2561 55 1 0 0 319.22370 </td <td></td> <td>376.2224</td> <td>6</td> <td>1</td> <td>0</td> <td>0</td> <td></td>			376.2224	6	1	0	0	
2 279.23147 278.2242 29 1 4 1 261.1976 0 0 0 0 0 256.2428 12 1 1 1 1 297.24194 296.2347 18 1 3 2 274.2533 1 1 0 0 0 315.25243 314.2452 16 1 3 0 409.25507 408.2478 0 0 0 0 386.2664 0 0 0 0 0 295.22644 272.2375 identisch zu TIC-Peak 2, Stoff 1 1 0 319.22370 318.2164 48 1 3 1 637.44238 318.2164 48 1 3 1 4 306.2561 55 1 0 0 0 637.44238 318.2164 48 1 3 1 nein 301.3012 0 0			371.2676	0	0	0	0	
2 2 2 1		279.23147	278.2242	29	1	4	1	
2 12 1			261.1976	0	0	0	0	
297.24194 296.2347 18 1 3 2 279.2081 0 <td></td> <td></td> <td>256.2428</td> <td>12</td> <td>1</td> <td>1</td> <td>1</td> <td></td>			256.2428	12	1	1	1	
2 279.2081 0<		297.24194	296.2347	18	1	3	2	
2 274.2533 1 1 0 0 nein 315.25243 337.23421 314.2452 16 1 3 0			279.2081	0	0	0	0	
315.25243 337.23421 314.2452 16 1 3 0 409.25507 408.2478 0	2		274.2533	1	1	0	0	nein
337.23421 011.2102 10 1 0		315.25243	314 2452	16	1	3	0	
409.25507 408.2478 0		337.23421	011.2102	10		0	•	
391.2212 0<		409.25507	408.2478	0	0	0	0	
386.2664 0<			391.2212	0	0	0	0	
279.23141 278.2242 identisch zu TIC-Peak 2, Stoff 1 3 295.22644 272.2375 identisch zu TIC-Peak 1, Stoff 5 319.22370		070 004 44	386.2664	0	0		0	
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$		279.23141	278.2242		identisch zu	TIC-Peak 2, St	off 1	
319.22370 318.2164 48 1 3 1 4 324.28990 323.2826 1 1 0 0 4 306.2561 55 1 0 0 nein 301.3012 0 0 0 0 0 1 5 478.29370 477.2864 0 0 0 0 0 5 372.31150 371.3042 0 0 0 0 nein 349.3228 0 0 0 0 0 0 0	3	295.22644	272.2375		identisch zu	TIC-Peak 1, St	017 5	nein
4 324.28990 323.2826 1 1 0 0 4 306.2561 55 1 0 0 nein 301.3012 0 0 0 0 0 nein 5 478.29370 477.2864 0 0 0 0 0 0 5 372.31150 371.3042 0 0 0 0 0 1 nein 349.3228 0	Ũ	319.22370	318.2164	48	1	3	1	
4 323.2826 1 1 0 0 nein 4 306.2561 55 1 0 0 nein 301.3012 0 0 0 0 0 0 4 478.29370 477.2864 0 0 0 0 0 5 460.2599 0 0 0 0 0 nein 5 372.31150 371.3042 0 0 0 0 0 nein 349.3228 0 0 0 0 0 0 0		037.44238	202.0000	4	4	0	0	
4 300.2501 55 1 0 0 Inem 301.3012 0 0 0 0 0 0 0 478.29370 477.2864 0	4	324.28990	323.2820	1	1	0	0	noin
478.29370 477.2864 0	4		201 2012	0	0	0	0	TIEIT
$5 \begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$		479 20270	477 2964	0	0	0	0	
5 372.31150 371.3042 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0		410.29310	411.2004	0	0	0	0	
5 372.31150 371.3042 0 0 0 0 0 nein 354.2777 3 1 0 0 349.3228 0 0 0 0 0			455 3050	0	0	0	0	
354.2777 3 1 0 0 349.3228 0 0 0 0	5	372 31150	371 3042	0	0	0	0	nein
349.3228 0 0 0 0		012.01100	354 2777	3	1	0	0	
			349.3228	0	0	0	0	

Tabelle A-2Bilanz der Non-targeted-Analyse zur Identifizierung von Inhaltsstoffen in Weizenmehlextrakten, welche
Matrixeffekte bei der Elektrospray-Ionisation hervorrufen

TIC- Peak # ¹	Exakte Massen (amu) ²	Theoretisch mögliche Neutralmassen (amu)	Σ Treffer DFC ^{3,4}	Σ Summen- formeln	Σ Abgeleitete Kandidaten	Σ Beschaff. Standards	Identi- fizierung
	263.23760	262.2303	3	1	0	0	
5		245.2038	0		0	0	nein
		240.2489	0		0	0	
	496.33831	495.3310	0	0	0	0	
		478.3045		0	0	0	
6		473.3496		0	0	0	nein
	520.33769	F 10,000,1	•	0	0		
	542.31920	519.3304	0	0	0	0	

1 Die Nummerierung der TIC-Peaks geht aus Abb. 4 hervor.

2 Es wurden nur Molecular Features, deren Peakmaximum im Extracted Ion Chromatogram (EIC) < 0,1 min Retentionszeit-Abweichung zum Peakmaximum im Totalionenstrom (TIC) aufweist, gelistet.

3 DFC = Dictionary of Food Compounds, online-Datenbank mit > 50.000 Lebensmittelinhaltsstoffen

4 Tolerierte Massenabweichung bei der Datenbanksuche ± 10 ppm

Inhaltsstoffe pflanzlicher Lebensmittel, die zu Matrixeffekten bei der Elektrospray-Ionisation führen:

1 Flavonoide

1.1 Flavone







1.1.1 C-Glykoside

óн

Isovitexin

OH.

Gl

Sinensetin









Naringenin

1.2.1 O-Glykoside



Hesperidin



Poncirin

OH

Rh

Gĺć

óн

Naringin

2 Phenylpropane

2.1 Cumarine





Scoparon



Osthol

2.1.1 Furocumarine





2.2 Sonstige Phenylpropane

Oxypeucedanin

Eleutherosid B

3 Isoprenoide

3.1 Terpene

3.1.1 Monoterpene (acyclisch)





Citral



Geranylacetat

H₃C

с́н₃

Linalylacetat

.CH₃

ĊН3

3.1.2 Diterpene



13-Hydroxykaur-16-en-19-säure

3.1.3 Sesquiterpene



E,E-Farnesol



trans-Nerolidol

3.1.4 Limonoide





Limonin

4 N-haltige Verbindungen

4.1 Amine

Synephrin

5 Lipide

HOOC

5.1 Fettsäuren und substituierte Fettsäuren

СН3

CH3

Palmitinsäure

alpha-Linolensäure





9(R),10(S)-Epoxyoctadeca-12(Z)-ensäure

соон он

15(R)-Hydroxyoctadeca-9(Z), 12(Z)-diensäure

5.2 Monoacylglyceride



9(S), 12(S), 13(S)-Trihydroxyocta-10(E)-ensäure

1-Monolinolein



1-Monoolein

6 Jasmonate

соон

Dihydrojasmonsäure

Methyldihydrojasmonat

Inhaltsstoffe pflanzlicher Lebensmittel, die bei Injektion bis zu 2 µg nicht zu Matrixeffekten bei der Elektrospray-Ionisation führten:

- 1 Isoprenoide
- 1.1 Terpene

1.1.1 Monoterpene

1.1.1.1 Acyclisch

$$H_3C$$
 H_3C H_3C H_3C H_3C



Nerylacetat

Citronellylacetat

1.1.1.2 Monocyclisch







Terpinylacetat

(+)-Carvon

gamma-Terpinen

1.1.1.3 Aromatisch



4-Cymen

1.1.4 Sesquiterpene



beta-Caryophyllen



Valencen

2 Phenylpropane

2.1 Zimtsäurederivate

но Он

trans-Kaffeesäure

6.3 Negative Elektrospray-Ionisation

Tabelle A-3 Liste der im ESI(-) gemessenen Pestizide mit spezifischen Stoffeigenschaften

Name des Wirkstoffs ¹	Substanzklasse ¹	log Kow (bei pH) ¹	Polarisierbarkeit [±0,5*10 ⁻²⁴ cm ³] ²	Oberflächen- spannung [dyne/cm] ²	pK _a ¹
2,4-D	Phenoxycarboxylsäure	2,58-2,83 (1) 0,04-0,33 (5)	19,4	51,2	2,73
2,4-DB	Phenoxycarboxylsäure		23,1	47,6	4,80
2-NAPHTHOXYESSIGSÄURE	Synthetisches Auxin		22,6	53,5	
4-CHLOROPHENOXY- ESSIGSÄURE (4-CPA)		2,52	17,5	49,1	
5-OH-CLETHODIM-SULFON					
ACIFLUORFEN	Diphenylether		30,1	49,3	
BENTAZON	Benzothiadiazinon	0,77 (5) -0,46 (7) -0,55 (9)	23,7	48,0	3,30
BROMADIOLON	Cumarin Antikoagulans	4,27	54,7	62,4	
BROMOXYNIL	Hydroxybenzonitril	1,04 (7)	19,1	80,9	3,86
CHLOROPHACINON	Indandion Antikoagu- Ians		40,3	57,4	3,40
CHLORPROPHAM	Carbamat	3,79 (4)	22,4	41,9	
CLETHODIM	Cyclohexandionoxim		38,2	39,0	
CLOPYRALID	Pyridincarboxylsäure	-1,81 (5) -2,63 (7) -2,55 (9)	16,3	62,8	2,00
CYCLANILID		3,25	25,1	81,9	3,5 0
CYCLOXYDIM	Cyclohexandionoxim	1,36 (7)	35,4	43,0	4,17
DICAMBA	Benzoesäure (Auxin)	-0,55 (5) -1,88 (7) -1,9 (9)	19,7	49,6	1,97
DICHLORPROP-P	Phenoxycarboxylsäure	-0,25 (7)	21,2	47,6	3,67
DIFENACOUM	Cumarin Antikoagu- Ians, Hydroxycumarin	>7 (calc.)	52,1	56,9	
DIFLUBENZURON	Benzylharnstoff	3,89	29,3	53,0	
DIFLUFENZOPYR	Semicarbazon	0,037 (7)	32,1	48,1	3,18
DINOSEB	Dinitrophenol		23,8	56,3	
DINOTERB	Dinitrophenol		23,6	53,1	
DITHIANON	Chinon	3,2	29,6	94,2	
DNOC	Dinitrophenol	0,08 (7)	18,3	70,8	4,48
ENDOSULFANSULFAT	Cyclodien Organochlorverbindung		31,1	65,9	
FENOPROP	Auxin		23,2	49,5	
FENOXAPROP	Aryloxyphenoxy- propionat	1,83-0,24 (5-9)	33,0	56,4	
FIPRONIL	Phenylpyrazol	4	32,5	52,9	
FLOCOUMAFEN	Cumarin Antikoagulans	6,12	56,7	52,3	4,50
FLUAZIFOP (FREIE SÄURE)	Aryloxyphenoxy- propionat	3,18	29,0	41,2	3,20
FLUAZINAM	2,6-Dinitroanilin	4,03	34,3	47,6	7,34
FLUDIOXONIL	Phenylpyrrol	4,12	22,3	62,2	<0,00 14,10
FLUROXYPYR	Pyridincarboxylsäure	-1,24	20,3	67,2	2,94
FLUSULFAMID	Benzolsulfonamid	2,8±0,5 (7) 3,9±0,5 (2)	33,5	56,2	4,89
FOSETYL-ALUMINIUM	Phosphonat	-2,1 bis -2,7			4,70
HALOXYFOP (FREIE SÄURE)	Aryloxyphenoxy- propionat	0,27 (7)	31,0	42,7	4,27

Name des Wirkstoffs ¹	Substanzklasse ¹	log Kow (bei pH) ¹	Polarisierbarkeit [±0,5*10 ⁻²⁴ cm ³] ²	Oberflächen- spannung [dyne/cm] ²	pK _a ¹
HEXAFLUMURON	Benzylharnstoff	5,64	36,0	43,1	
INABENFID		3,13	37,5	61,5	
IOXYNIL	Hydroxybenzonitril	2,2 (5) 0,23 (9)	23,3	85,9	4,10
MALEINSÄUREHYDRAZID	Pyridazin	-1,96 (7) -0,56	9,9	41,3	5,62
МСРА	Phenoxycarboxylsäure	2,75 (1) 0,59 (5) -0,71 (7)	19,4	46,5	3,73
МСРВ	Phenoxycarboxylsäure	>2,37 (5) 1,32 (7) -0,17 (9)	23,0	44,0	4,84
MECOPROP	Phenoxycarboxylsäure	0,1004 (7)	21,2	43,6	3,78
METHOXYFENOZID	Diacylhydrazin	3,7	42,9	41,4	
PICLORAM	Pyridincarboxylsäure	1,9	19,9	78,6	2,30
PROPANIL	Anilid	3,3	21,8	45,2	
THIAZAFLURON			19,17	44,2	
TOPRAMEZON		-0,81 (4) -1,52 (7) -2,34 (9)	36,07	57,4	4,06
TRICLOPYR	Pyridincarboxylsäure	0,42 (5) -0,45 (7) -0,96 (9)	20,57	59,8	3,97
TRIFLUMURON	Benzylharnstoff	4,91	32,15	46,8	

¹ Quelle: The Pesticide Manual, fourteenth edition, 2006

² Quelle: ACD/ChemSketch 11.02, 2008



Abbildung A-4 Streudiagramme der von Orangenmatrix zur Retentionszeit von 19,4 min hervorgerufenen Matrixeffekte bei negativer Elektrospray-Ionisation (A) über dem pK_s-Wert, (B) über dem log K_{ow}-Wert und (C) über der Oberflächenspannung der Analyte.

6.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematischer Ablauf der Elektrospray-Ionisation im positiven Ionenmodus ESI(+)3
Abbildung 2:	Erste Messung von Matrixeffekten mittels Nachsäuleninfusion von Analyten (A) Versuchsaufbau aus der Studie von Bonfiglio et al. Mittels Spritzenpumpe wurde eine Analytlösung über ein T-Stück hinter der chromatographischen Säule infudiert. (B) Infusionsprofil des Analyten Phenacetin erhalten mit einem Blutplasma-Extrakt (beide aus Lit. 19)
Abbildung 3:	(A) Matrixeffekt-Profil, (B) TIC eines Full-Scans vom Agilent 6530 Q-TOF und (C) TIC eines Full-Scans vom Thermo Fisher Scientific Orbitrap-MS für drei verschiedene Aufarbeitungen einer identischen <i>Orangenprobe</i> bei Anwendung der gleichen chromatographischen Methode. Die Trennsäule bei C bot für einzelne Peaks eine bessere chromatographische Auflösung. Die Retentionszeiten wurden mit einer an allen drei LC-MS-Geräten gemessenen Pestizidmischung miteinander korreliert
Abbildung 4:	(A) Matrixeffekt-Profil, (B) TIC eines Full-Scans vom Agilent 6530 Q-TOF und (C) TIC eines Full-Scans vom Thermo Fisher Scientific Orbitrap-MS für drei verschiedene Aufarbeitungen einer identischen <i>Weizenmehlprobe</i> bei Anwendung der gleichen chromatographischen Methode. Die Retentionszeiten wurden mit einer an allen drei LC-MS-Geräten gemessenen Pestizidmischung miteinander korreliert
Abbildung 5:	Matrixeffektprofil erhalten durch Injektion (A) und (D) der extrahierten Matrix aus 20 mg Orange bei Aufarbeitung nach der ChemElut-Methode, (B) von 200 ng Sinensetin, (C) von 200 ng Nobiletin, (E) von 2 µg 1-Monolinolein und (F) von 2 µg 1-Monoolein
Abbildung 6:	Matrixeffektprofil erhalten durch Injektion (A) und (F) der extrahierten Matrix aus 10 mg Weizenmehl bei Aufarbeitung nach der ChemElut-Methode, (B) von 2 μ g Dihydrojasmonsäure (Kandidat für ME #1), (C) von 100 ng 9(S),12(S),13(S)-Trihydroxyoctadeca-10(E)-ensäure (Kandidat für ME #1), (D) von 2 μ g Methyldihydrojasmonat (Kandidat für ME #1), (E) von 115 ng 15(R)-Hydroxyoctadeca-9(Z),12(Z)-diensäure (Kandidat für ME #2), (G) von 600 ng 9(R),10(S)-Epoxyoctadeca-12(Z)-ensäure (Kandidat für ME #2), (H) von 1 μ g alpha-Linolensäure (Kandidat für ME #2), (I) von 2 μ g Palmitinsäure (Kandidat für ME #2) und (J) von 2 μ g 13-Hydroxykaur-16-en-19-säure (Kandidat für ME #3). A-D gemessen mit der simultanen Nachsäuleninfusion von 39 Pestiziden und E, G-J von 3 Pestiziden (Carbendazim, Pirimicarb und Terbutryn). Zur Nomenklatur der Matrixeffekte (ME) siehe Abb. 4. Nur C lieferte die Signalsuppression zur erwarteten Retentionszeit
Abbildung 7:	Matrixeffektprofile erhalten (A) bei positiver Elektrospray-Ionisation und (B) bei negativer Elektrospray-Ionisation für je 50 simultan infudierte Pestizide bei Injektion eines identischen Extrakts von Avocado (links) und von Weizenmehl (rechts)
Abbildung 8:	Matrixeffektprofile für je sechs von 50 simultan infudierten Pestiziden erhalten durch Injektion eines identischen Orangenextrakts (A) bei positiver Elektrospray-Ionisation mit immer gleichem Muster an Suppression aller Analytsignale (B) bei negativer Elektrospray-Ionisation mit verschiedenen Mustern aus Signalsuppressionen und –erhöhungen in Abhängigkeit vom Analyten
Abbildung 9:	Histogramme der bei negativer Elektrospray-Ionisation auftretenden Matrixeffekte (A) gemessen nach der konventionellen Methode über einen Responsevergleich von Lösungsmittel- und Matrixstandards und (B) gemessen mit der neuen Methode der Nachsäuleninfusion von Analyten
Abbildung 10:	 (A) Gesamtübersicht zur Aufarbeitung der Wasserproben mit Membranfiltration (nur Oberflächenwässer) (Schritt 1), Festphasenextraktion (Schritt 2) und Filtration durch Spritzenfilter (Schritt 3) (B) Durchführung der Festphasenextraktion
Abbildung 11:	Blindwertproblem bei der Messung von Matrixeffekten hervorgerufen durch unbekannte exogene Substanzen, die aus Verbrauchsmaterialien ausgewaschen wurden. Die Matrixeffektprofile von 50 simultan infudierten Pestiziden wiesen bei Reinstwasser (i) ohne eine Behandlung (oben, links) keine Effekte auf, (ii) nach einer Membranfiltration (oben, rechts) eine mittelstarke Signalsuppression um 15 min Retentionszeit, (iii) nach einer Festphasenextraktion (unten, links) mehrere mittelstarke Signalsuppressionen über das gesamte Chromatogramm verteilt oder (iv) nach einer Filtration durch Spritzenfilter (unten, rechts) viele starke Signalsuppressionen bis zu 85 % über das gesamte Chromatogramm

Abbildung 12:	Zusammenhang zwischen Matrixeffekt und DOC-Gehalt ausgedrückt als logarithmische Funktion90
Abbildung 13:	Matrixeffektprofile von 50 simultan infudierten Pestiziden beeinflusst allein durch endogene Wasserinhaltsstoffe (A) eines Trinkwassers aus Oldenburg, angereichert um Faktor 50, und (B) eines Oberflächenwassers aus dem Großen Wannsee in Berlin, angereichert um Faktor 25
Abbildung 14:	Häufigkeitsverteilung über der Wiederfindung des dotierten Pestizidgehalts (10 ng/ml) in Oberflächenwasser aus dem Großen Wannsee für 140 Pestizide (A) ohne Anwendung einer Referenzsubstanz und (B) mit Anwendung von Carbendazim als einziger Referenzsubstanz
Abbildung 15:	Simulation zur Stärke des Matrixeffekts bei Koelution desselben Analyten ($K_A = 1000$, $C_A = 300$ ng/ml) mit vier verschiedenen Matrixkomponenten: (A) einer Matrixkomponente mit $K_M = 10$, d. h. nur schwacher Präferenz für die Tropfenoberfläche, (B) einer Matrixkomponente mit $K_M = 100$, (C) einer Matrixkomponente mit $K_M = 300$ und (D) einer Matrixkomponente mit $K_M = 1000$, d. h. starker Präferenz, die Oberfläche eines ESI-Tropfens zu besetzen. Die Stärke des Matrixeffekts ist gegeben als Wiederfindung (rel. Intensität) von der Analytkonzentration an der Tropfenoberfläche ohne Matrixeffekt, d. h. bei Matrixkonzentrationen nahe Null. Die Matrixkonzentration variiert in allen vier Fällen von 0,0001 bis 10 µg/ml. Auch für den Elektrolyten liegen identische Bedingungen vor: $K_E = 1$, $C_E = 5$ mmol/l. Die Konzentration an Überschussladungen Q liegt bei 0,003 mmol/l
Abbildung 16:	Simulation zur Stärke der Matrixeffekte von fünf verschiedenen Analyten mit verschiedener Präferenz zur Oberfläche des ESI-Tropfens (KA = 1, 10, 100, 300 und 1000) bei Koelution mit derselben Matrixfraktion (A) Koelution mit einer Matrixkomponente, die gern die Tropfenoberfläche besetzt (KM = 1000), und (B) Koelution mit einer Matrixkomponente mit schwächerer Tendenz zur Tropfenoberfläche (KM = 300). Die Matrixkonzentration variierte in beiden Fällen von CM = 0,0001 bis 10 μ g/ml. Die Bedingungen für den Elektrolyten waren KE = 1 und CE = 5 mmol/l. Die Konzentration an Überschussladungen Q lag bei 0,003 mmol/l. Die Konzentration des Analyten betrug CA = 300 ng/ml
Abbildung 17:	Simulation eines Matrixeffekts unter folgenden Bedingungen: Elektrolyt $KE = 1$, $CE = 5 \text{ mmol/l}$; Analyt $KA = 1000$, CA variabel von 0,003 ng/ml bis 300 ng/ml; Matrix $KM = 1000$, CM variabel von 0,0001 bis 10 µg/ml. (A) Auftragung der Wiederfindung des Analytsignals ohne Matrix über der logarithmierten Matrixkonzentration und (B) zweite Darstellungsweise mit Auftragung des Matrixeffekts über dem Verdünnungsfaktor des Probenextrakts in logarithmischer Skalierung
Abbildung 18:	Strategie zum Umgang mit Matrixeffekten bei Multianalyt-Methoden in der Spurenanalytik mit LC-ESI- MS/MS
Abbildung A-1:	(A) Matrixeffekt-Profil, (B) TIC eines Full-Scans vom Agilent 6530 Q-TOF und (C) TIC eines Full-Scans vom Thermo Fisher Scientific Orbitrap-MS für drei verschiedene Aufarbeitungen einer identischen <i>Blumenkohlprobe</i> bei Anwendung dergleichen chromatographischen Methode. Die Retentionszeiten wurden mit einer an allen drei LC-MS-Geräten gemessenen Pestizidmischung miteinander korreliert
Abbildung A-2:	(A) Matrixeffekt-Profil, (B) TIC eines Full-Scans vom Agilent 6530 Q-TOF und (C) TIC eines Full-Scans vom Thermo Fisher Scientific Orbitrap-MS für drei verschiedene Aufarbeitungen einer identischen <i>Karottenprobe</i> bei Anwendung dergleichen chromatographischen Methode. Die Retentionszeiten wurden mit einer an allen drei LC-MS-Geräten gemessenen Pestizidmischung miteinander korreliert
Abbildung A-3:	(A) Matrixeffekt-Profil, (B) TIC eines Full-Scans vom Agilent 6530 Q-TOF und (C) TIC eines Full-Scans vom Thermo Fisher Scientific Orbitrap-MS für drei verschiedene Aufarbeitungen einer identischen <i>Avocadoprobe</i> bei Anwendung dergleichen chromatographischen Methode. Die Retentionszeiten wurden mit einer an allen drei LC-MS-Geräten gemessenen Pestizidmischung miteinander korreliert
Abbildung A-4:	Streudiagramme der von Orangenmatrix zur Retentionszeit von 19,4 min hervorgerufenen Matrixeffekte bei negativer Elektrospray-Ionisation (A) über dem pK _s -Wert, (B) über dem log K_{ow} -Wert und (C) über der Oberflächenspannung der Analyte

6.5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Situation in einem typischen Primärtropfen mit 1,5 µm Radius bei Koelution des Analyten mit einer Matrixfraktion.
	Die Berechnung erfolgte am Beispiel der Signalsuppression von Azoxystrobin hervorgerufen durch den Orangenin-
	haltsstoff Sinensetin
Tabelle A-1:	Bilanz der non-targeted Analyse unbekannter Lebensmittelinhaltsstoffe, die Matrixeffekte bei der Elektrospray- Ionisation hervorrufen, am Beispiel der Orange
Tabelle A-2:	Bilanz der non-targeted Analyse unbekannter Lebensmittelinhaltsstoffe, die Matrixeffekte bei der Elektrospray- Ionisation hervorrufen, am Beispiel des Weizenmehls
Tabelle A-3:	Liste der im ESI(-) gemessenen Pestizide mit spezifischen Stoffeigenschaften

6.6 Literaturverzeichnis

Die in den Publikationen zitierte Literatur ist direkt in den Nachdrucken in Kapitel 3 angegeben. Die in den weiteren Teilen der Arbeit zitierte Literatur ist in diesem Verzeichnis aufgeführt.

- L. Alder, K. Greulich, G. Kempe, B. Vieth. Residue Analysis of 500 High Priority Pesticides: Better by GC-MS or LC-MS/MS? *Mass Spectrom. Rev.* 2006, 25 (6), 838-865.
- (2) C. Soler, J. Mañes, Y. Picó. The Role of the Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Pesticide Residue Determination in Food. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2008, *38*, 93-117.
- (3) M. Kellmann, H. Münster, P. Zomer, H. Mol. Full Scan MS in Comprehensive Qualitative and Quantitative Residue Analysis in Food and Feed Matrices: How Much Resolving Power is Required? J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2009, 20 (8), 1464-1476.
- (4) L. Alder, A. Steinborn, S. Bergelt. Suitability of an Orbitrap Mass Spectrometer for the Screening of Pesticide Residues in Extracts of Fuits and Vegetables. J. AOAC Int. 2011, 94 (6), 1661-1673.
- (5) J. Wang, W. Chow, D. Leung, J. Chang. Application of Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography and Electrospray Ionization Quadrupole Orbitrap High-Resolution Mass Spectrometry for Determination of 166 Pesticides in Fruits and Vegetables. J. Agric. Food Chem. 2012, 60, 12088-12104.
- (6) A. Kaufmann, V. Dvorak, C. Crüzer, P. Butcher, K. Maden, S. Walker, M. Widmer, A. Schürmann. Study of High-Resolution Mass Spectrometry Technology as a Replacement for Tandem Mass Spectrometry in the Field of Quantitative Pesticide Residue Analysis. J. AOAC Int. 2012, 95 (2), 528-548.
- (7) F. Hernández, J.V. Sancho, M. Ibáñez, E. Abad, T. Portolés, L. Mattioli. Current use of high-resolution mass spectrometry in the environmental sciences. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012, 403, 1251-1264.
- (8) A. Kaufmann. The current role of high-resolution mass spectrometry in food analysis. Anal. Bioanal. Chem. 2012, 403, 1233-1249.

- (9) L. Polgár, J.F. García-Reyes, P. Fodor, A. Gyepes, M. Dernovics, L. Abrankó, B. Gilbert-López, A. Molina-Díaz. Retrospective screening of relevant pesticide metabolites in food using liquid chromatography high resolution mass spectrometry and accurate-mass databases of parent molecules and diagnostic fragment ions. J. Chromatogr. A 2012, 1249, 83-91.
- (10) M.G. Cahill, B.A. Dineen, M.A. Stack, K.J. James. A critical evaluation of liquid chromatrography with hybrid linear ion trap-Orbitrap mass spectrometry for the determination of acidic contaminants in wastewater effluents. J. Chromatogr. A 2012, 1270, 88-95.
- (11) M.M. Gómez-Ramos, C. Ferrer, O. Malato, A. Agüera, A.R. Fernández-Alba. Liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry for pesticide residue analysis in fruit and vegetables: Screening and quantitative studies. J. Chromatogr. A 2013, 1287, 24-37.
- (12) A. Kaufmann, S. Walker. Evaluation of the interrelationship between mass resolving power and mass error tolerances for targeted bioanalysis using liquid chromatography coupled to highresolution mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2013, 27 (2), 347-356.
- (13) A. Martinez-Villalba, L. Vaclavik, E. Moyano, M.T. Galceran, J. Hajslova. Direct analysis in real time high-resolution mass spectrometry for high-troughput analysis of antiparasitic veterinary drugs in feed and food. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2013, *27 (3)*, 467-475.
- R.D. Voyksner. Combining Liquid Chromatography with Electrospray Mass Spectrometry. In *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, and Applications*.
 R.B. Cole, Ed., Wiley-Interscience: New York, USA, **1997**, pp 323-342.
- (15) J.B. Fenn. Electrospray Wings for Molecular Elephants. *Nobel Lecture* [Online], Dec 8, 2002. Nobelprize Home Page. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes /chemistry/laureates/2002/fenn-lecture.pdf (accessed Sept 30, 2012).
- (16) P.J. Taylor. Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clin. Biochem.* 2005, *38*, 328-334.
- (17) M. Anastassiades, K. Mastovska, S.J. Lehotay. Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides. J. Chromatogr. A 2003, 1015, 163-184.
- (18) K. Mastovska, S.J. Lehotay, M. Anastassiades. Combination of Analyte Protectants to Overcome Matrix Effects in Routine GC Analysis of Pesticide Residues in Food Matrixes. *Anal. Chem.* 2005, 77 (24), 8129-8137.
- (19) R. Bonfiglio, R.C. King, T.V. Olah, K. Merkle. The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds. *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **1999**, *13* (*12*), 1175-1185.
- (20) T. Benijts, R. Dams, W. Lambert, A. de Leenheer. Countering matrix effects in environmental liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry water analysis for endocrine disrupting chemicals. J. Chromatogr. A, 2004, 1029, 153-159.
- (21) W.M.A. Niessen, P. Manini, R. Andreoli. Matrix effects in quantitative pesticide analysis using liquid chromatography-mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* 2006, 25, 881–899.
- (22) 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. *J. Chromatogr. A*, **2009**, *1216*, 1410-1420.

- (23) H. Jiang, H. Cao, Y. Zhang, D.M. Fast. Systematic evaluation of supported liquid extraction in reducing matrix effect and improving extraction efficiency in LC-MS/MS based bioanalysis for 10 model pharmaceutical compounds. J. Chromatogr. B 2012, 891-892, 71-80.
- (24) A. Kruve, A. Künnapas, K. Herodes, I. Leito. Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **2008**, *1187*, 58-66.
- (25) K.A. Barnes, R.J. Fussell, J.R. Startin, H.J. Mobbs, R. James, S.L. Reynolds. Determination of the Pesticide Fenbutatin Oxide in Tomatoes, Cucumbers and Bananas by High Performance Liquid Chromatographic/Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1997, *11* (2), 159-164.
- (26) S. Ito, K. Tsukada. Matrix effect and correction by standard addition in quantitative liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins. J. Chromatogr. A 2001, 943, 39-46.
- (27) 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. *Anal. Chem.* 2003, 75, 3019-3030.
- (28) C.G. Enke. A Predictive Model for Matrix and Analyte Effects in Electrospray Ionization of Singly-Charged Ionic Analytes. *Anal. Chem.* 1997, 69, 4885-4893.
- (29) N.B. Cech, C.G. Enke. Relating Electrospray Ionization Response to Nonpolar Character of Small Peptides. Anal. Chem. 2000, 72, 2717-2723.
- (30) A.P. Bruins. Mechanistic aspects of electrospray ionization. J. Chromatogr. A, 1998, 794, 345-357.
- (31) R. King, R. Bonfiglio, C. Fernandez-Metzler, C. Miller-Stein, T. Olah. Mechanistic Investigation of Ionization Suppression in Electrospray Ionization. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2000, 11, 942-950.
- (32) C.R. Mallet, Z. Lu, J.R. Mazzeo. A study of ion suppression effects in electrospray ionization from mobile phase additives and solid-phase extracts. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2004, 18 (1), 49-58.
- (33) J.V. Iribarne, P.J. Dziedzic, B.A. Thomson. Atmospheric pressure ion evaporation-mass spectrometry. Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys. 1983, 50 (3), 331-347.
- (34) J.B. Fenn. Ion Formation from charged droplets: roles of geometry, energy, and time. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1993, 4 (7), 524-535.
- (35) J. Eshraghi, S.K. Chowdhury. Factors affecting electrospray ionization of effluents containing trifluoroacetic acid for high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. Anal. Chem. 1993, 65, 3528-3533.
- (36) A. Apffel, S. Fisher, G. Goldberg, P.C. Goodley, F.E. Kuhlmann. Enhanced sensitivity for pep-

tide mapping with electrospray liquid chromatography-mass spectrometry in the present of signal suppression due to trifluoroacetic acid-containing mobile phases. *J. Chromatogr. A* **1995**, *712*, 177-190.

- (37) S.Å. Gustavsson, J. Samskog, K.E. Markides, B. Långström. Studies of signal suppression in liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry using volatile ion-pairing reagents. J. Chromatogr. A 2001, 937, 41-47.
- (38) S. Zhou, K.D. Cook. A mechanistic study of electrospray mass spectrometry: Charge gradients within electrospray droplets and their influence on ion response. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2001, 12, 206-214.
- (39) M. Holčapek, K. Volná, P. Jandera, L. Kolářová, K. Lemr, M. Exner, A. Církva. Effects of ionpairing reagents on the electrospray signal suppression of sulphonated dyes and intermediates. J. Mass Spectrom. 2004, 39, 43-50.
- M.H. Amad, N.B. Cech, G.S. Jackson, C.G. Enke. Importance of gas-phase proton affinities in determining the electrospray ionization response for analytes and solvents. *J. Mass Spectrom.* 2000, *35 (7)*, 784-789.
- (41) *Document No. SANCO/12495/2011.* Method validation and quality control procedures for pesticide residue analysis in food and feed.
- (42) M. Stüber, T. Reemtsma. Evaluation of three calibration methods to compensate matrix effects in environmental analysis with LC-ESI-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 2004, 378, 910-916.
- (43) M.G. Ikonomou, A.T. Blades, P. Kebarle. Electrospray-Ion Spray: A Comparison of Mechanisms and Performance. *Anal. Chem.* 1991, 63, 1989-1998.
- (44) R.B. Cole. Some tenets pertaining to electrospray ionization mass spectrometry. J. Mass Spectrom. 2000, 35, 763-772.
- (45) P. Kebarle, L. Tang. From ions in solution to ions in gas phase The mechanism of Electrospray Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **1993**, *65 (22)*, 972 A-986 A.
- (46) P. Kebarle, M. Peschke. On the mechanisms by which the charged droplets produced by electrospray lead to gas phase ions. *Anal. Chim. Acta* 2000, 406, 11-35.
- (47) N.B. Cech, C.G. Enke. Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spec. Rev.* 2001, 20, 362-387.
- (48) T.C. Rohner, N. Lion, H.H. Girault. Electrochemical and theoretical aspects of electrospray ionisation. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2004**, *6*, 3056-3068.
- (49) P. Kebarle, U.H. Verkerk. Electrospray: From ions in solution to ions in the gas phase, what we know now. *Mass Spectrom. Rev.* 2009, 28, 898-917.
- (50) S. Crotti, R. Seraglia, P. Traldi. Some thoughts on electrospray ionization mechanisms. *Eur. J. Mass Spectrom.* 2011, 17, 85-100.
- (51) G. Mengali, A. Pieracci, C.D. Hendricks, R.J. Pfeifer. Parametric studies of electrohydrodynamic spraying. *AIAA J.* **1968**, *6 (3)*, 496-502.

- (52) A.T. Blades, M.G. Ikonomou, P. Kebarle. Mechanism of Electrospray Mass Spectrometry. Electrospray as an Electrolysis Cell. Anal. Chem. 1991, 63 (19), 2109-2114.
- (53) D.P.H. Smith. The electrohydrodynamic atomization of liquids. *IEEE Trans. Ind. Appl.* **1986**, *IA*-22 (3), 527-535.
- (54) F.W. Wampler, A.T. Blades, P. Kebarle. Negative Ion Electrospray Mass Spectrometry of Nucleotides: Ionization from Water Solution with SF₆ Discharge Suppression. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1993, 4, 289-295.
- (55) G. Taylor. Disintegration of Water Drops in an Electric Field. *Proc. R. Soc. Lond. A*, **1964**; 280 (1382), 383-397.
- (56) M.S. Wilm, M. Mann. Electrospray and Taylor-Cone Theory, Dole's Beam of Macromolecules at Last? *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1994**, *136*, 167-180.
- (57) J. Fernandez de la Mora, I.G. Loscertales. The Current Emitted by Highly Conducting Taylor Cones. J. Fluid Mech. **1994**, 260, 155-184.
- (58) R.J. Pfeifer, C.D. Hendricks, Jr. Parametrix Studies of Electrohydrodynamic Spraying. AIAA J. 1968, 6, 469-502.
- (59) A. Schmidt, M. Karas, T. Dülcks. Effect of Different Solution Flow Rates on Analyte Ion Signals in Nano-ESI MS, or: When Does ESI Turn into Nano-ESI? J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2003, 14, 492-500.
- (60) M. Cloupeau, B. Prunet-Foch. Electrohydrodynamic spraying functioning modes : a critical review. J. Aerosol Sci, **1994**, 25 (6), 1021-1036.
- (61) A.P. Bruins, T.R. Covey, J.D. Henion. Ion spray interface for combined liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* **1987**, *59* (22), 2642-2646.
- (62) J.D. Henion, T.R. Covey, A.P. Bruins. Ion Spray Apparatus and Method. U.S. Patent 4,861,988, Aug 29, **1989**.
- (63) T.R. Covey, J.F. Anacleto. Ion Spray with Intersecting Flow. U.S. Patent 5,412,208, May 2, 1995.
- (64) K. Hiraoka, H. Fukasawa, F. Matsushita, K. Aizawa. High-flow Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Interface Using a Parallel Ion Spray. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1995, 9, 1349-1355.
- (65) J.A. Apffel, Jr., M.H. Werlich, J.L. Bertsch. Orthogonal Ion Sampling for Electrospray LC/MS. U.S. Patent 5,495,108, Feb. 27, 1996.
- (66) L. Rayleigh. On the Equilibrium of Liquid Conducting Masses charged with Electricity. *Philos. Mag., Series 5* 1882, *14*, 184-186.
- (67) B. Vonnegut, R.L. Neubauer. Production of monodisperse liquid particles by electrical atomization. J. Colloid Sci. 1952, 7, 616-622.
- (68) D. Duft, T. Achtzehn, R. Müller, B.A. Huber. Coulomb fission. Rayleigh jets from levitated microdroplets. *Nature* **2003**, *421*, 128.

- (69) P. Kebarle. A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. J. Mass Spectrom. 2000, 35, 804-817.
- (70) E.J. Davis, M.A. Bridges. The rayleigh limit of charge revisited: light scattering from exploding droplets. J. Aerosol Sci. 1994, 25 (6), 1179-1199.
- (71) R.L. Grimm, J.L. Beauchamp. Evaporation and Discharge Dynamics of Highly Charged Multicomponent Droplets Generated by Electrospray Ionization. J. Phys. Chem. A 2010, 114, 1411-1419.
- (72) J.V. Iribarne, B.A. Thomson. On the evaporation of small ions from charged droplets. J. Chem. Phys. 1976, 64, 2287-2294.
- (73) M. Dole, L.L. Mack, R.L. Hines, R.C. Mobley, L.D. Ferguson, M.B. Alice. Molecular Beams of Macroions. J. Chem. Phys. 1968, 49 (5), 2240-2249.
- (74) G. Schmelzeisen-Redeker, L. Bütfering, F.W. Röllgen. Desolvation of ions and molecules in thermospray mass spectrometry. *Int. J. Mass Sectrom. Ion Proc.* 1989, 90, 139-150.
- (75) G.G. Guilbault, M. Hjelm. Nomenclature for Automated and Mechanised Analysis. Pure & Appl. Chem. 1989, 61 (9), 1657-1664.
- (76) *IUPAC Gold Book.* International Union of Pure and Applied Chemistry Home Page. http://goldbook.iupac.org/M03759.html (Accessed online at Nov 1, **2012**).
- (77) Y. Huang, R. Shi, W. Gee, R. Bonderud. Matrix effect and recovery terminology issues in regulated drug bioanalysis. *Bioanalysis* **2012**, *4* (3), 271-279.
- (78) L. Tang, P. Kebarle. Dependence of Ion Intensity in Electrospray Mass Spectrometry on the Concentration of the Analyte in the Electrosprayed Solution. *Anal. Chem.* 1993, 65, 3654-3668.
- (79) J. Hajšlová, J. Zrostlíková. Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. J. Chromatogr. A 2003, 1000, 181–197.
- (80) J.-P. Antignac, K. de Wasch, F. Monteau, H. De Brabander, F. Andre, B. Le Bizec. 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.
- (81) C. Côté, A. Bergeron, J.-N. Mess, M. Furtado, F. Garofolo. Matrix effect elimination during LC-MS/MS bioanalytical method development. *Bioanalysis* 2009, 1 (7), 1243–1257.
- (82) A. Van Eeckhaut, K. Lanckmans, S. Sarre, I. Smolders, Y. Michotte. Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: Evaluation of matrix effects. J. Chromatogr. B 2009, 877, 2198–2207.
- (83) F. Gosetti, E. Mazzucco, D. Zampieri, M.C. Gennaro. Signal suppression/enhancement in highperformance liquid chromatography tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A 2010, 1217, 3929–3937.
- (84) H. Trufelli, P. Palma, G. Famiglini, A. Cappiello. An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* 2011, 30, 491–509.
- (85) F.T. Peters, D. Remane. Aspects of matrix effects in applications of liquid chromatography-mass spectrometry to forensic and clinical toxicology a review. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *403*,

2155-2172.

- (86) A.F. Furey, M. Moriarty, V. Bane, B. Kinsella, M. Lehane. Ion Suppression; A Critical Review on Causes, Evaluation, Prevention and Applications. Talanta 2013, http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2013.03.048.
- (87) B.K. Matuszewski. Standard line slopes as a measure of a relative matrix effect in quantitative HPLC-MS bioanalysis. *J. Chromatogr. B* **2006**, *830*, 293-300.
- (88) E. den Boer, R.J.W. Meesters, B.D. van Zelst, T.M. Luider, J.M.W. Hazes, S.G. Heil, R. de Jonge. Measuring methotrexate polyglutamates in red blood cells: a new LC-MS/MS-based method. *Anal. Bioanal. Chem.* 2013, 405, 1673-1681.
- (89) S. Kittlaus, J. Schimanke, G. Kempe, K. Speer. Assessment of sample cleanup and matrix effects in the pesticide residue analysis of foods using postcolumn infusion in liquid chromatographytandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A 2011, 1218 (46), 8399–8410.
- (90) D.L. Buhrmann, P.I. Price, P.J. Rudewicz. Quantitation of SR 27417 in Human Plasma Using Electrospray Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: A Study of Ion Suppression. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1996, 7, 1099-1105.
- (91) L.E. Sojo, G. Lum, P. Chee. Internal standard signal suppression by co-eluting analyte in isotope dilution LC-ESI-MS. *Analyst* 2003, 128, 51–54.
- (92) K. Zhang, J.W. Wong, P. Yang, K. Tech, A.L. DiBenedetto, N.S. Lee, D.G. Hayward, C.M. Makovi, A.J. Krynitsky, K. Banerjee, L. Jao, S. Dasgupta, M.S. Smoker, R. Simonds, A.J. Schreiber. Multiresidue Pesticide Analysis of Agricultural Commodities Using Acetonitrile Salt-Out Extraction, Dispersive Solid-Phase Sample Clean-Up, and High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. J. Agric. Food Chem. 2011, 59 (14), 7636–7646.
- (93) M. Sulyok, R. Krska, R. Schuhmacher. Application of a liquid chromatography-tandem mass spectrometric method to multi-mycotoxin determination in raw cereals and evaluation of matrix effects. *Food Addit. Contam.* **2007**, *24 (10)*, 1184–1195.
- (94) M. Sergi, E. Bafile, D. Compagnone, R. Curini, G. D'Ascenzo, F.S. Romolo. Multiclass analysis of illicit drugs in plasma and oral fluids by LC-MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 2009, 392 (2), 709-718.
- (95) B.K. Choi, A.I. Gusev, D.M. Hercules. Postcolumn Introduction of an Internal Standard for Quantitative LC-MS Analysis. *Anal. Chem.* 1999, 71 (18), 4107-4110.
- (96) T.L. Constantopoulos, G.S. Jackson, C.G. Enke. Effects of Salt Concentration on Analyte Response Using Electrospray Ionization Mass Spectrometry. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1999, 10, 625-634.
- (97) T.L. Constantopoulos, G.S. Jackson, C.G. Enke. Challenges in achieving a fundamental model for ESI. *Anal. Chim. Acta* 2000, 406, 37-52.
- R. Kostiainen, A.P. Bruins. Effect of Solvent on Dynamic Range and Sensitivity in Pneumatically-assisted Electrospray (Ion Spray) Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1996, 10 (11), 1393-1399.

- (99) F. Beaudry, P. Vachon. Electrospray ionization suppression, a physical or a chemical phenomenon? *Biomed. Chromatogr.* 2006, 20 (2), 200-205.
- (100) G. Wang, R.B. Cole. Solution, gas-phase, and instrumental parameter influences on charge-state distributions in electrospray ionization mass spectrometry. In *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, and Applications*. R.B. Cole, Ed., Wiley-Interscience: New York, USA, **1997**, pp 137-174.
- (101) L. Tang, P. Kebarle. Effect of the Conductivity of the Electrosprayed Solution on the Electrospray Current. Factors Determining Analyte Sensitivity in Electrospray Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 1991, *63*, 2709-2715.
- (102) H. Mei, Y. Hsieh, C. Nardo, X. Xu, S. Wang, K. Ng, W.A. Korfmacher. Investigation of matrix effects in bioanalytical high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric assays: application to drug discovery. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003, 17, 97-103.
- (103) T. Barri, L.O. Dragsted. UPLC-ESI-QTOF/MS and multivariate data analysis for blood plasma and serum metabolomics: Effect of experimental artefacts and anticoagulant. *Anal. Chim. Acta* 2013, 768, 118-128.
- (104) M.J. Gray, S. Jahani, G.K.-C. Low. Effect of methanol quality on the ionisation of herbicides, insecticides and fungicides using gradient elution liquid chromatography. J. Chromatogr. A 2012, 1219, 83-92.
- (105) E. Dijkman, D. Mooibroek, R. Hoogerbrugge, E. Hogendoorn, J.-V. Sancho, O. Pozo, F. Hernández. Study of matrix effects on the direct trace analysis of acidic pesticides in water using various liquid chromatographic modes coupled to tandem mass spectrometric detection. J. Chromatogr. A 2001, 926, 113-125.
- (106) N. Lindegardh, A. Annerberg, N.J. White, N.P. Day. Development and validation of a liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for determination of piperaquine in plasma. Stable isotope labeled internal standard does not always compensate for matrix effects. J. Chromatogr. B 2008, 862 (1-2), 227-236.
- (107) T.M. Annesley. Ion Suppression in Mass Spectrometry. Clin. Chem. 2003, 49 (7), 1041-1044.
- (108) F. Hernández, J.V. Sancho, O.J. Pozo. 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.
- (109) W. Lambert. Pitfalls in LC-MS(/MS) Analysis. T + K 2004, 71 (2), 64-68.
- (110) S. Souverain, S. Rudaz, J.-L. Veuthey. Matrix effect in LC-ESI-MS and LC-APCI-MS with offline and on-line extraction procedures. J. Chromatogr. A 2004, 1058, 61-66.
- (111) A. Tan, S. Hussain, A. Musuku, R. Massé. Internal standard response variations during incurred sample analysis by LC-MS/MS: Case by case trouble shooting. J. Chromatogr. B 2009, 877, 3201-3209.
- (112) S. Kowal, P. Balsaa, F. Werres, T.C. Schmidt. Determination of the polar pesticide degradation product *N*,*N*-dimethylsulfamide in aqueous matrices by UPLC-MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.*

2009, 395, 1787-1794.

- (113) L.H. Du, R.L. White. Reducing glycerophosphocholine lipid matrix interference effects in biological fluid assays by using high-turbulence liquid chromatography. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2008, 22 (21), 3362-3370.
- (114) C. Ghosh, C.P. Shinde, B.S. Chakraborty. Influence of ionization source design on matrix effects during LC-ESI-MS/MS analysis. J. Chromatogr. B 2012, 893, 193-200.
- (115) X.H. Guo, E. Lankmayr. Phospholipid-based matrix effects in LC-MS bioanalysis. *Bioanalysis* 2011, 3 (4), 349-352.
- (116) O.A. Ismaiel, M.S. Halquist, M.Y. Elmamly, A. Shalaby, H.T. Karnes. Monitoring phospholipids for assessment of matrix effects in a liquid chromatography-tandem hydrocodone mass spectrometry method for and pseudoephedrine in human plasma. J. Chromatogr. B 2007, 859 (1), 84-93.
- (117) O.A. Ismaiel, M.S. Halquist, M.Y. Elmamly, A. Shalaby, H.T. Karnes. Monitoring phospholipids for assessment of ion enhancement and ion suppression in ESI and APCI LC/MS/MS for chlorpheniramine in human plasma and the importance of multiple source matrix effect evaluations. J. Chromatogr. B 2008, 875 (2), 333-343.
- (118) O.A. Ismaiel, T.Y. Zhang, R.G. Jenkins, H.T. Karnes. Investigation of endogenous blood plasma phospholipids, cholesterol and glycerides that contribute to matrix effects in bioanalysis by liquid chromatography/mass spectrometry. J. Chromatogr. B 2010, 878 (31), 3303-3316.
- (119) M. Lahaie, J.N. Mess, M. Furtado, F. Garofolo. Elimination of LC-MS/MS matrix effect due to phospholipids using specific solid-phase extraction elution conditions. *Bioanalysis* 2010, 2 (6), 1011-1021.
- (120) J.N. Mess, C. Côté, A. Bergeron, M. Furtado, F. Garofolo. Selection of HILIC columns to handle matrix effect due to phospholipids. *Bioanalysis* **2009**, *1* (1), 57-62.
- (121) V. Pucci, S. Di Palma, A. Alfieri, F. Bonelli, E. Monteagudo. A novel strategy for reducing phospholipids-based matrix effect in LC-ESI-MS bioanalysis by means of HybridSPE. J. Pharm. Biomed. Anal. 2009, 50 (5), 867-871.
- (122) S. Silvester, L. Smith. Profiling phospholipid elution in reversed-phase LC-MS/MS bioanalytical methods in order to avoid matrix effects. *Bioanalysis* 2012, 4 (8), 879-895.
- (123) S.T. Wu, D. Schoener, M. Jemal. Plasma phospholipids implicated in the matrix effect observed in liquid chromatography/tandem mass spectrometry bioanalysis: evaluation of the use of colloidal silica in combination with divalent or trivalent cations for the selective removal of phospholipids from plasma. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2008, 22 (18), 2873-2881.
- (124) Y.Q. Xia, M. Jemal. Phospholipids in liquid chromatography/mass spectrometry bioanalysis: comparison of three tandem mass spectrometric techniques for monitoring plasma phospholipids, the effect of mobile phase composition on phospholipids elution and the association of phospholipids with matrix effects. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2009, 23 (14), 2125-2138.
- (125) P.D. Rainville, N.W. Smith, D. Cowan, R.S. Plumb. Comprehensive investigation of the influence of acidic, basic, and organic mobile phase compositions on bioanalytical assay sensitivity in
positive ESI mode LC/MS/MS. J. Pharm. Biomed. Anal. 2012, 59, 138-150.

- (126) S. Ahmad, H. Kalra, A. Gupta, B. Raut, A. Hussain, Md.A. Rahman. HybridSPE: A novel technique to reduce phospholipid-based matrix effect in LC-ESI-MS Bioanalysis. J. Pharm. Bioallied Sci. 2012, 4 (4), 267-275.
- (127) G. Ohlenbusch, C. Zwiener, R.U. Meckenstock, F.H. Frimmel. Identification and quantification of polar naphthalene derivatives in contaminated groundwater of a former gas plant site by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A 2002, 967 (2), 201-207.
- (128) R.J.C.A. Steen, A.C. Hogenboom, P.E.G. Leonards, R.A.L. Peerboom, W.P. Cofino, U.A.Th. Brinkman. Ultra-trace-level determination of polar pesticides and their transformation products in surface and estuarine water samples using column liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1999, 857 (1-2), 157-166.
- (129) M. Jemal, A. Schuster, D.B. Whigan. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry methods for quantitation of mevalonic acid in human plasma and urine: method validation, demonstration of using a surrogate analyte, and demonstration of unacceptable matrix effect in spite of use of a stable isotope analog internal standard. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003, *17 (15)*, 1723-1734.
- (130) S. Wang, M. Cyronak, E. Yang. Does a stable isotopically labeled internal standard always correct analyte response? A matrix effect study on a LC/MS/MS method for the determination of carvedilol enantiomers in human plasma. J. Pharm. Biomed. Anal. 2007, 43, 701-707.
- (131) A. Alder, T. Reemtsma. Mechanismen und Minimierung von Matrixeffekten in der quantitativen Spurenanalytik mit Elektrospray-Massenspektrometrie. Förderantrag bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), Projekt AL 971/1-1, 2007.
- (132) European Standard EN 15662:2008. Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS(/MS) following acetonitrile extraction/partitioning and cleanup by dispersive SPE – QuEChERS method. Beuth Verlag GmbH, Berlin-Wien-Zürich, Burggrafenstraße 6, 10787 Berlin, Germany, 2008.
- (133) Chapman and Hall / CRC Press, London, England. Dictionary of Food Compounds. [Online], 2009, Chemical Databases Online Home Page. http://dfc.chemnetbase.com/dictionarysearch.do?method=view&id=5510929&si= (accessed Jan 1st, 2013).
- (134) J.J. Manura, D.J. Manura. Isotope Distribution Calculator and Mass Spec Plotter. [Online], 1996. Scientific Instrument Services (SIS) Home Page. http://www.sisweb.com/mstools/isotope.htm (accessed Jan 1st, 2013).
- (135) S. Li, C.-Y. Lo, C.-T. Ho. Hydroxylated Polymethoxyflavones and Methylated Flavonoids in Sweet Orange (Citrus sinensis) Peel. J. Agric. Food Chem. 2006, 54, 4176-4185.
- (136) M. Scordino, L. Sabatino, P. Traulo, M. Gargano, V. Pantó, G. Gagliano. HPLC-PDA/ESI-MS/MS detection of polymethoxylated flavones in highly degraded citrus juice: a quality control case study. *Eur. Food Res. Technol.* 2011, 232, 275-280.

- (137) S. Li, H. Yu, C.-T. Ho. Nobiletin: efficient and large quantity isolation from orange peel extract. *Biomed. Chromatogr.* 2006, 20, 133-138.
- (138) B. Weber, B. Hartmann, D. Stöckigt, K. Schreiber, M. Roloff, H.-J. Bertram, C.O. Schmidt. Liquid Chromatography/Mass Spectrometry and Liquid Chromatography/Nuclear Magnetic Resonance as Complementary Analytical Techniques for Unambiguous Identification of Polymethoxylated Flavones in Residues from Molecular Distillation of Orange Peel Oils (Citrus sinensis). J. Agric. Food Chem. 2006, 54 (2), 274–278.
- (139) K. Herrmann. Inhaltsstoffe von Obst und Gemüse. Verlag Eugen Ulmer GmbH & Co. 2001, pp. 37-39, 68.
- (140) A. Waheed, S. Mahmud, M. Saleem, T. Ahmad. Fatty acid composition of neutral lipid: Classes of Citrus seed oil. J. Saudi Chem. Soc. 2009, 13, 269-272.
- (141) Kanehisa Laboratories. Linoleic Acid Metabolism. [Online], Jan 17, 2012. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Home Page. http://www.genome.jp/kegg/ (accessed Jan 9, 2013).
- (142) T.A. MacMurray, W.R. Morrison. Composition of Wheat Flour Lipids. J. Sci. Food Agr. 1970, 21, 520-528.
- (143) Römpp Lexikon Lebensmittelchemie, 2. Auflage; G. Eisenbrand, P. Schreier, A.H. Meyer, Eds.; Georg Thieme Verlag KG, 2006, S. 1294.
- (144) N. Nikolić, N. Radulović, B. Momcilović, G. Nikolić, M. Lazić, Z. Todorovic. Fatty acids composition of wheat and wheat and white or brown rice flour mixture. *Eur. Food Res. Technol.* 2008, 227, 1543-1548.
- (145) P. Prabhasankar, M.L. Sudha, P.H. Rao. Quality characteristics of wheat flour milled streams. Food Res. Int. 2000, 33, 381-386.
- (146) B.A.W. Gallasch, G. Spiteller. Synthesis of 9,12-Dioxo-10(Z)-dodecenoic Acid, a New Fatty Acid Metabolite Derived from 9-Hydroperoxy-10,12-octadecadienoic Acid in Lentil Seed (*Lens culinaris* Medik.) *Lipids* 2000, 35 (9), 953-960.
- (147) A. Graveland. Analysis of Lipoxygenase Nonvolatile Reaction Products of Linoleic Acid in Aqueous Cereal Suspensions by Urea Extraction and Gas Chromatography. *Lipids* 1973, *8*, 599-606.
- (148) A. Meyer, O. Miersch, C. Büttner, W. Dathe, G. Sembdner. Occurrence of the Plant Growth Regulator Jasmonic Acid in Plants. J. Plant Groth Regul. 1984, 3, 1-8.
- (149) A. Meyer, J. Schmidt, D. Gross, E. Jensen, A. Rudolph, S. Vorkefeld, G. Sembdner. Amino Acid Conjugates as Metabolites of the Plant Growth Regulatro Dihydrojasmonic Acid in Barley (hordeum vulgare). J. Plant Growth Regul. 1991, 10, 17-25.
- (150) Kanehisa Laboratories. α-Linolenic Acid Metabolism. [Online], Jun 6, 2012. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Home Page. http://www.genome.jp/kegg/ (accessed Jan 9, 2013).
- (151) M. Hamberg. G. Hamberg. 15(R)-hydroxylinoleic acid, an oxylipin from oat seeds. Phytochem-

istry 1996, 42 (3), 729-732.

- (152) T. Kato, Y. Yamaguchi, T. Uyehara, T. Yokoyama. Self defence substances in rice plant against rice blast disease. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24 (43)*, 4715-4718.
- (153) O.A. Timofeeva, Y.Y. Nevmerzhitskaya, I.G. Miftakhova, A.S. Strobykina, A.L.Mikhailov, I.Y. Strobykina, V.F. Mironov. Diterpenoid steviol derivatives regulate the growth of winter wheat and improve its frost resistance. *Dokl. Biolog. Sci.* **2010**, *435* (1), 411-414.
- (154) H. Aach, G. Böse, J.E. Graebe. *ent*-Kaurene biosynthesis in a cell-free system from wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings and the localisation of *ent*-kaurene synthetase in plastids of three species. *Planta* 1995, *197*, 333-342.
- (155) Kanehisa Laboratories. Biosynthesis of plant hormones. [Online], Oct 11, 2011. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Home Page. http://www.genome.jp/kegg/ (accessed Jan 9, 2013).
- (156) E. Frérot, E. Decorzant. Quantification of Total Furocoumarins in Citrus Oils by HPLC Coupled with UV, Fluorescence, and Mass Detection. J. Agric. Food Chem. **2004**, *52*, 6879-6886.
- (157) D.R.L. Caccioni, M. Guizzardi, D.M. Biondi, A. Renda, G. Ruberto. Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *Int. J. Food Microbiol.* **1998**, *43*, 73-79.
- (158) E.K. Nelson, H.H. Mottern. The Occurrence of Citral in Florida Valencia Orange Oil. J. Am. Chem. Soc. 1934, 56, 1238-9.
- (159) D. Chouchi, D. Barth. Rapid identification of some coumarin derivatives in deterpenated citrus peel oil by gas chromatography. J. Chromatogr. A 1994, 672, 177-183.
- (160) G. Ziegler, G. Spiteller. A Coumarin and a Diterpene from Citrus sinensis (L.) Osbeck cv. Valencia (Rutaceae). *Flavour Frag. J.* 1992, 7, 141-145.
- (161) C. Sánchez-Moreno, L. Plaza, B. de Ancos, M.P. Cano. Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of commercial orange juices. *J. Sci. Food Agric.* 2003, *83*, 430-439.
- (162) S. Pichaiyongvongdee, R. Haruenkit. Investigation of Limonoids, Flavanones, Total Polyphenol Content and Antioxidant Activity in Seven Thai Pummelo Cultivars. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 2009, 43, 458-466.
- (163) G.A. Barthe, P.S. Jourdan, C.A. McIntosh, R.L. Mansell. Radioimmunoassay for the quantitative determination of hesperidin and analysis of its distribution in citrus sinensis. *Phytochemistry* **1988**, 27 (1), 249-254.
- (164) S. Gorinstein, D. Huang, H. Leontowicz, M. Leontowicz, K. Yamamoto, R. Soliva-Fortuny, O. Martin Belloso, A.L. Martinez Ayala, S. Trakhtenberg. Determination of naringin and hesperidin in citrus fruit by high-performance liquid chromatography. The antioxidant potential of citrus fruit. *Acta Chromatographica* 2006, 17, 108-124.
- (165) R.F. Albach, G.H. Redman, B.J. Lime. Limonin Content of Juice from Marrs and Hamlin Oranges [Citrus sinensis (L.) Osbeck]. J. Agric. Food Chem. 1981, 29, 313-315.

- (166) J.J. Peterson, J.T. Dwyer, G.R. Beecher, S.A. Bhagwat, S.E. Gebhardt, D.B. Haytowitz, J.M. Holden. Flavanones in oranges, tangerines (mandarins), tangors, and tangelos: a compilation and review of the data from the analytical literature. *J. Food Compos. Anal.* 2006, *19*, S66-S73.
- (167) P. Swatsitang, G. Tucker, K. Robards, D. Jardine. Isolation and identification of phenolic compounds in *Citrus sinensis*. *Anal. Chim. Acta* 2000, *417*, 231-240.
- (168) V. Mohanlall, B. Odhav. Biocontrol of Aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂, and Fumonisin B₁ with 6,7-Dimethoxycoumarin, a Phytoalexin from *Citrus sinensis*. J. Food Protect. **2006**, 69 (9), 2224-2229.
- (169) J.A. del Río, P. Gómez, A.G. Baidez, M.C. Arcas, J.M. Botía, A. Ortuño. Changes in the Levels of Polymethoxyflavones and Flavanones as Part of the Defense Mechanism of *Citrus sinensis* (Cv. Valencia Late) Fruits against *Phytophthora citrophthora*. J. Agric. Food Chem. 2004, 52, 1913-1917.
- (170) K. Umano, Y. Hagi, T. Shibamoto. Volatile Chemicals Identified in Extracts from Newly Hybrid Citrus, Dekopon (*Shiranuhi mandarin* Suppl. J.). *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 5355-5359.
- (171) H. Peleg, M. Naim, R.L. Rouseff, U. Zehavi. Distribution of Bound and Free Phenolic Acids in Oranges (*Citrus sinensis*) and Grapefruits (*Citrus paradisi*). J. Sci. Food Agric. 1991, 57, 417-426.
- (172) R. Rodil, J.B. Quintana, P. López-Mahía, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodríguez. Multi-Residue analytical method for the determination of emerging pollutants in water by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A 2009, 1216, 2958-2969.
- (173) H. Stahnke, T. Reemtsma, L. Alder. Compensation of Matrix Effects by Postcolumn Infusion of a Monitor Substance in Multiresidue Analysis with LC-MS/MS. *Anal. Chem.* 2009, *81*, 2185-2192.
- (174) R.J.C.A. Steen, A.C. Hogenboom, P.E.G. Leonards, R.A.L. Peerboom, W.P. Cofino, U.A.Th. Brinkman. Ultratrace-level determination of polar pesticides and their transformation porducts in surface and estuarine water samples using column liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1999, 857 (1-2), 157-166.
- (175) A.C. Hogenboom, M.P. Hofman, D.A. Jolly, W.M.A. Niessen, U.A.Th. Brinkman. On-line dualprecolumn-based trace enrichment for the determination of polar and acidic microcontaminatnts in river water by liquid chromatography with diode-array UV and tandem mass spectrometric detection. J. Chromatogr. A 2000, 885 (1-2), 377-388.
- (176) T. Reemstma. The use of liquid chromatography-atmospheric pressure ionization-mass spectrometry in water analysis Part II: Obstacles. *TrAC* **2001**, *20* (*10*), 533-542.
- (177) A. Kloepfer, J.B. Quintana, T. Reemtsma. Operational options to reduce matrix effects in liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry analysis of aqueous environmental samples. J. Chromatogr. A 2005, 1067, 153-160.
- (178) J.C. van de Steene, K.A. Mortier, W.E. Lambert. Tackling matrix effects during development of a liquid chromatographic-electrospray ionisation tandem mass spectrometric analysis of nine ba-

sic pharmaceuticals in aqueous environmental samples. J. Chromatogr. A 2006, 1123, 71-81.

- (179) H. Stahnke, S. Kittlaus, G. Kempe, L. Alder. Reduction of Matrix Effects in Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry by Dilution of the Sample Extracts: How Much Dilution is Needed? *Anal. Chem.* 2012, *84* (3), 1474-1482.
- (180) N.B. Cech, C.G. Enke. Selectivity in Electrospray Ionization Mass Spectrometry. In Electrospray and MALDI Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, Practicabilities, and Biological Applications. R.B. Cole, Ed., John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, New Jersey, USA, 2010, pp 49-73.
- (181) H. Stahnke, L. Alder. Matrix effects in electrospray mass spectrometry: not a hopeless case. Book of Abstracts, 3rd Latin American Pesticide Residue Workshop, Food and Environment, Montevideo, Uruguay, May 8th-11th, **2011**, O13, 62.
- (182) A. Ekdahl, M.C. Johansson, M. Ahnoff. Tracing and separating plasma components causing matrix effects in hydrophilic interaction chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. J. Chromatogr. B 2013, 923-924, 83-91.
- (183) R.L. Grimm, J.L. Beauchamp. Dynamics of field induced droplet ionization : Time resolved studies of distortion, jetting, and progeny formation from charged and neutral methanol droplets exposed to strong electric fields. J. Chem. Phys. B 2005, 109, 8244-8250.
- (184) ChemAxon, Chemicalize 3.0 Home Page [Online], Properties Viewer. http://www.chemicalize.org/ (accessed Aug 18th, 2013).
- (185) Z.-Y. Hu, S.C. Laizure, B. Meibohm, V.L. Herring, R.B. Parker. Simple and sensitive assay for quantification of oseltamivir and its active metabolite oseltamivir carboxylate in human plasma using high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry: Improved applicability to pharmacokinetic study. J. Pharm. Biomed. Anal. 2013 (72), 245-250.
- (186) R. Leverence, M.J. Avery, O. Kavetskaia, H. Bi, C.E.C.A. Hop, A.I. Gusev. Signal suppression/enhancement in HPLC-ESI-MS/MS from concomitant medications. *Biomed. Chromatogr.* 2007, 21, 1143-1150.
- (187) H. Stahnke, S. Kittlaus, G. Kempe, C. Hemmerling, L. Alder. The influence of electrospray ion source design on matrix effects. J. Mass Spectrom. 2012, 47 (7), 875-884.
- (188) D. Bodi, C. Ringling, C. Schödel, A. Preiß-Weigert, H. Fry. Investigation of Matrix Effects on the Determination of Carbadox and Olaquinox in Feed by LC-MS/MS. *Chromatographia* 2013, DOI 10.1007/s10337-013-2444-4, *in press*.
- (189) L. Geis-Asteggiante, S.J. Lehotay, A.R. Lightfield, T. Dutko, C. Ng, L. Bluhm. Ruggedness testing and validation of a practical analytical method for > 100 veterinary drug residues in bovine muscle by ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A 2012, 1258, 43-54.
- (190) B.K. Choi, A.I. Gusev, D.M. Hercules. Quantitative LC-ESI-MS analysis for pesticides in a complex environmental matrix using external and internal standards. *Intern. J. Environ. Anal.*

Chem. 2000, 77 (4), 305-322.

- (191) B.K. Choi, D.M. Hercules, A.I. Gusev. Effect of liquid chromatography separation of complex matrices on liquid chromatography-tandem mass spectrometry signal suppression. J. Chromatogr. A 2001, 907, 337-342.
- (192) B.K. Choi, D.M. Hercules, A.I. Gusev. LC-MS/MS signal suppression effects in the analysis of pesticides in complex environmental matrices. *Fresenius J. Anal. Chem.* 2001, 369, 370-377.
- (193) A. Wortmann, A. Kistler-Momotova, R. Zenobi, M.C. Heine, O. Wilhelm, S.E. Pratsinis. Shrinking Droplets in Electrospray Ionization and Their Influence on Chemical Equilibria. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2007, 18, 385-393.
- (194) M. Vogeser, F. Kirchhoff, R. Geyer. A novel approach to signal normalisation in atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2012**, *66*, 399-401.
- (195) A. Kaufmann, P. Butcher. Segmented post-column analyte addition; a concept for continuous response control of liquid chromatography/mass spectrometry peaks affected by signal suppression/enhancement. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2005, *19*, 611-617.