



Bachelorarbeit
Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences

In
Zusammenarbeit mit

GBA Gesellschaft für Bioanalytik mbH

Entwicklung und Validierung von LC-APCI-MS/MS
Methoden zur Bestimmung von
Pestiziden in Hopfen

Biotechnologie

Abgabedatum:

22.09.25

Betreuender Professor:

Prof. Dr. Serhat Çiçek

Betrieblicher Betreuer:

Dr. Axel Möller

Vorname, Name:

Zion, Dagou

Matrikelnummer:

██████████

Geb. Datum, Ort:

████████████████████

Abstract

Diese Arbeit präsentiert die Entwicklung und Validierung einer LC-APCI-MS/MS-Methode zur simultanen Messung von zehn Pestiziden in Hopfen auf einem Zielniveau von 0,05 mg/kg. Die Analyten umfassen THPI, Phthalimid, Acequinocyl, Diphenylamin, Fenpyroximat, Hexythiazox, MilbemectinA3, MilbemectinA4, Captan und Folpet.

Die Methodenentwicklung beinhaltet Optimierungen des Lösungsmittelgradienten, der Flussrate, des Nebulizer-Drucks, der Vaporizer-Temperatur, der Gastemperatur, des Gasflusses, der iFunnel-Spannungen und Anpassungen der Quelleneinstellungen. Die Bewertung basierte auf Signalfäche, Signalrauschen und Matrixeffekt.

Wiederfindungen lagen zwischen 87 % und 110 %, die Streuung unter 10 % und die erweiterte Messunsicherheit unter 32 %. Validiert wurde ein Arbeitsbereich von 0,05 mg/kg bis 20 mg/kg, innerhalb dessen die residuale Abweichung innerhalb der vorgegebenen ± 20 % blieb und somit lineare Bedingungen galten. Entsprechend erfüllt die Leistungsfähigkeit der vorgestellten Methode die Anforderungen der SANTE-Leitlinie an Richtigkeit, Präzision, Empfindlichkeit, Linearität und Spezifität und eignet sich für die Routineanalytik von Pestizidrückständen in Hopfen.

Danksagung

Mit meinem Einstieg bei der GBA begann für mich eine bereichernde Einarbeitungszeit, in der ich insbesondere durch Herrn Dr. Rühl eine weitgehende Einarbeitung in die Tätigkeitsfelder erfahren durfte.

Herr Weingartner begleitete mich vom Einstieg bis zur Abschlussarbeit in seiner Funktion als Abteilungsleiter mit großem Engagement und offener Unterstützung. Seine aufmerksame Art und Wertschätzung haben mir viel bedeutet.

Herr Dr. Möller war für mich ein stets ansprechbarer und aufmerksamer Betreuer. Er half mir insbesondere dabei, meinen Blick auf zentrale Problemstellungen zu fokussieren und meine analytischen Fähigkeiten so unter Bildung eigener Erfahrungen weiterzuentwickeln.

Nicht zuletzt gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Çiçek, der mir im fachlichen Austausch stets zeitnah Hilfestellung gab und mich bei der Orientierung während der Anfertigung der Arbeit hilfreich unterstützte.

Insgesamt möchte ich dem gesamten GBA-Team, mit dem ich zusammenarbeiten durfte, für die Vielzahl fachlicher wie auch menschlicher Erfahrungen herzlich danken.

Inhaltsverzeichnis

Abstract.....	1
Danksagung	2
Inhaltsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis.....	5
Tabellenverzeichnis	8
Formelverzeichnis	10
Abkürzungsverzeichnis.....	11
1 Einleitung	12
1.1 Gegenstand der vorliegenden Arbeit.....	13
1.2 Untersuchte Analyten in Hopfen	14
1.3 Struktur der vorliegenden Arbeit	15
2 Methodik und theoretischer Hintergrund.....	16
2.1 Probenaufarbeitung Prinzip.....	16
2.2 Flüssigchromatographie	17
2.3 Prinzip des Massenspektrometers im APCI-Modus	18
2.3.1 Dwell-Time	21
2.4 Interner Standard.....	21
2.4.1 Gehaltsbestimmung	22
2.4.2 Matrixeffekt.....	23
2.5 Identifikationskriterien	23
2.5.1 Retentionszeit	24
2.5.2 Ion-Ratio.....	24
3 Validierungskriterien Leitgrößen zur Methodenanpassung.....	25
3.1 Richtigkeit einer Messung	25
3.2 Präzision und Reproduzierbarkeit	25
3.2.1 Empfindlichkeit	26
3.3 Linearität, Arbeitsbereich	27
3.3.1 Regressionsanalyse	27
3.3.2 Ausreißer nach Grubbs	29
3.4 Bestimmungsgrenze der Methode und Spezifität	29
3.4.1 Methodenfortschritt Gain	29
3.5 Messunsicherheit der Analytik	30
3.6 Vorgehen bei manueller Datenbearbeitung	30
4 Entwicklung der MRM-Methode	31
4.1 Gradienten Optimierung (V0607→V1107).....	31
4.1.1 Gradienten Ergebnisse.....	32
4.1.2 Gradienten Einstellungswahl	33
4.1.3 Gradienten Diskussion	33
4.2 Flussrate Vaporizer und Nebulizer Optimierung (V1107→V1407).....	33
4.2.1 Flussrate Nebulizer Vaporizer Ergebnisse.....	34
4.2.2 Flussrate Nebulizer Vaporizer Einstellungswahl	36
4.2.3 Flussrate Nebulizer Vaporizer Diskussion	40
4.3 Gastemperatur-Optimierung (Modul)	41
4.3.1 Gastemperatur Ergebnisse.....	41
4.3.2 Gastemperatur Einstellungswahl	42
4.3.3 Gastemperatur Diskussion	42
4.4 Gasfluss Optimierung (Modul).....	43
4.4.1 Gasfluss Ergebnisse	43
4.4.2 Gasfluss Einstellungswahl	45
4.4.3 Gasfluss Diskussion	45
4.5 iFunnel Optimierung (Modul).....	46
4.5.1 iFunnel Ergebnisse	46

4.5.2	iFunnel Einstellungswahl	50
4.6	Kapillarspannung und Corona-Strom (Modul)	51
4.7	Finale MRM-Methode konsolidierung (V1407→V1508B).....	51
4.7.1	Finale MRM-Methode Ergebnisse	52
5	Validierung	56
5.1	Dotierungen	56
5.1.1	Dotierungen Ergebnisse	57
5.1.2	Dotierungen Bewertung.....	57
5.2	Arbeitsbereich.....	58
5.3	Ergebnisse Arbeitsbereich	58
5.3.1	Bewertung Arbeitsbereich	61
6	Bewertung MRM-Methodenentwicklung und Validierung.....	61
	Literaturverzeichnis	62
	Anhangsverzeichnis	i
	Erklärungen	xiv

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Abbau von Captan zu THPI (oben); von Folpet zu Phthalimid (unten).....	15
Abbildung 2	Fließschema der Probenaufarbeitung für APCI-Abfüllungen im Rahmen der Multipestizid-Aufarbeitung von Hopfenpellets.	16
Abbildung 3	Seitenquerschnitt der Agilent AJS-Ionenquelle und Lagebeschreibung zentraler Bauteile (A–F). Darstellung des Probenstroms in der Ionenquelle (Modifiziert nach, Agilent 6400 Series Triple Quadrupole LC/MS System, 01.05.2018, 54).	19
Abbildung 4	Visualisierung der gemessenen Detektorsignale (Area) für Acequinocyl, Diphenylamin, Fenpyroximat und Hexythiazox in Abhängigkeit von variierenden Geräteeinstellungen am Agilent 6495 TQMS (Methode V1407). Die Raumachsen stellen den Nebulizer-Druck (psi), die Flussrate (mL/min) und die Vaporizer-Temperatur (°C) dar. Die Area eines Lösemittelstandards (0,025 ng/μL in ACN) wurde durch einen kontinuierlichen Farbverlauf dargestellt, wobei höhere Signalfächen wärmeren Farben entsprechen. Zur Darstellung von Trends im Parameterraum wurde zwischen den diskreten Messpunkten eine Natural-Neighbor-Interpolation angewendet. Die Farbbalken rechts neben den Plots zeigen die Signalwerte sowie die zugehörigen Analytenamen.	34
Abbildung 5	Visualisierung der gemessenen Detektorsignale (Area) für Milbemectin A3, Milbemectin A4, Phthalimid und THPI in Abhängigkeit von den Geräteeinstellungen am Agilent 6495 TQMS (Methode V1407). Die Raumachsen repräsentieren den Nebulizer-Druck (psi), die Flussrate (mL/min) und die Vaporizer-Temperatur (°C). Die Signalfäche eines Lösemittelstandards (0,025 ng/μL in Acetonitril) wurde durch einen kontinuierlichen Farbverlauf dargestellt, wobei größere Signalfächen wärmeren Farben entsprachen. Zwischen den diskreten Messpunkten erfolgte eine Natural-Neighbor-Interpolation, um Trends im Parameterraum zu verdeutlichen. Die Farbbalken rechts neben den Plots zeigen die Signalwerte und zugehörigen Analytenamen.	35
Abbildung 6	Ebene der gemessenen Area für die Analyten Phthalimid und THPI (Methode V1107) bei einer Flussrate von 0,5 mL/min aus (Abbildung 5), in Abhängigkeit vom Nebulizer-Druck (psi) und der Vaporizer-Temperatur (°C) in einem Lösemittelstandard (0,025 ng/μL in Acetonitril). Die Messwerte sind farbcodiert dargestellt; die Zwischenbereiche wurden mithilfe der Natural-Neighbor-Interpolation eingefärbt, um Trends sichtbar zu machen und die Auswahl geeigneter Einstellwerte zu unterstützen. Die Farbbalken rechts neben den Plots zeigen die Signalwerte sowie die zugehörigen Analyten an.	36
Abbildung 7	Ebene der gemessenen Area von Diphenylamin (Methode V1107) bei einer Flussrate von 0,5 mL/min aus (Abbildung 4), in Abhängigkeit vom Nebulizer-Druck (psi) und der Vaporizer-Temperatur (°C) in einem Lösemittelstandard (0,025 ng/μL in Acetonitril). Die Messwerte sind farbcodiert dargestellt; die Zwischenbereiche wurden mithilfe der Natural-Neighbor-Interpolation eingefärbt, um Trends sichtbar zu machen und die Auswahl geeigneter Einstellwerte zu unterstützen. Die Farbbalken rechts neben dem Plot zeigen die Signalwerte sowie den zugehörigen Analyten an.	37
Abbildung 8	Ebene der gemessenen Area für die Analyten Fenpyroximat, Hexythiazox, MilbemectinA3 und MilbemectinA4 (Methode V1107) bei einer Flussrate von 0,5 mL/min aus (Abbildung 4 und Abbildung 5), in Abhängigkeit vom Nebulizer-Druck (psi) und der Vaporizer-Temperatur (°C) in einem Lösemittelstandard (0,025 ng/μL in Acetonitril). Die Messwerte sind farbcodiert dargestellt; die Zwischenbereiche wurden mithilfe der Natural-Neighbor-Interpolation eingefärbt, um Trends sichtbar zu machen und die Auswahl geeigneter Einstellwerte zu unterstützen. Die Farbbalken rechts neben den Plots zeigen die Signalwerte sowie den zugehörigen Analyten an.	38
Abbildung 9	Ebene der gemessenen Area von Acequinocyl (Methode V1107) bei einer Flussrate von 0,5 mL/min aus (Abbildung 5), in Abhängigkeit vom Nebulizer-Druck (psi) und der Vaporizer-Temperatur (°C) in einem Lösemittelstandard (0,025 ng/μL in Acetonitril). Die Messwerte sind farbcodiert dargestellt; die Zwischenbereiche wurden mithilfe der Natural-Neighbor-Interpolation eingefärbt, um Trends sichtbar zu machen und die Auswahl geeigneter Einstellwerte zu unterstützen. Die Farbbalken rechts neben dem Plot zeigen die Signalwerte sowie den zugehörigen Analyten an.	39
Abbildung 10	Gain der Signalfäche (AreaGain) in Abhängigkeit von der Gastemperatur für die Analyten Acequinocyl, Diphenylamin, Fenpyroximat, Hexythiazox, Milbemectin A3, Milbemectin A4, Phthalimid und THPI. Die Messungen erfolgten mit einem Matrixstandard von 0,5 mg/kg unter Anwendung der Methode V1407.	41

Abbildung 11	Gain der SNR (SNRGain) in Abhängigkeit von der Gastemperatur für die Analyten Acequinocyl, Diphenylamin, Fenpyroximat, Hexythiazox, MilbemectinA3, MilbemectinA4, Phthalimid und THPI. Die Messungen erfolgten mit einem Matrixstandard von 0,5 mg/kg unter Anwendung der Methode V1407. 42
Abbildung 12	Heatmap der Messergebnisse zur Anpassung des iFunnels im Negativmodus Methode V1407. Gezeigt sind die Signale der Analyten Phthalimid (Folpet) und THPI (Captan) aus den Gruppen 1 und 2 in Abhängigkeit von den iFunnel-Spannungen (HP/LP). Die linke Seite stellt die Signalfächen (Area) dar, die rechte Seite die zugehörigen Signal-to-Noise Ratios (SNR). Die Messungen erfolgten mit Matrixstandard (0,5 mg/kg). Die Messwerte sind farbcodiert dargestellt; die Zwischenbereiche wurden mithilfe der Natural-Neighbor-Interpolation eingefärbt, um Trends sichtbar zu machen und die Auswahl geeigneter Einstellwerte zu unterstützen. Die Farbbalken rechts neben den Plots zeigen die Signalwerte sowie die zugehörigen Analyten an. 46
Abbildung 13	Heatmap der Messergebnisse zur Anpassung des iFunnels im Positivmodus basierend auf der Methode V1407. Dargestellt sind die Signale des Analyten Diphenylamin in Abhängigkeit von den iFunnel-Spannungen (HP/LP). Die linke Seite zeigt die Signalfächen (Area), die rechte Seite die entsprechenden Signal-to-Noise Ratios (SNR). Die Messungen erfolgten mit einem Matrixstandard (0,5 mg/kg). Die Messwerte sind farbcodiert dargestellt; die Zwischenbereiche wurden mithilfe der Natural-Neighbor-Interpolation eingefärbt, um Trends sichtbar zu machen und die Auswahl geeigneter Einstellwerte zu unterstützen. Die Farbbalken rechts neben den Plots zeigen die Signalwerte sowie den zugehörigen Analyten an. 47
Abbildung 14	Heatmap der Messergebnisse zur Anpassung des iFunnels im Negativmodus basierend auf der Methode V1407. Dargestellt sind die Signale der Analyten Milbemectin A3 und Milbemectin A4 in Abhängigkeit von den iFunnel-Spannungen (HP/LP). Die linke Seite zeigt die Signalfächen (Area), die rechte Seite die entsprechenden Signal-to-Noise Ratios (SNR). Grundlage der Messungen war ein Matrixstandard mit einer Konzentration von 0,5 mg/kg. Die Messwerte sind farbcodiert dargestellt; die Zwischenbereiche wurden mithilfe der Natural-Neighbor-Interpolation eingefärbt, um Trends sichtbar zu machen und die Auswahl geeigneter Einstellwerte zu unterstützen. Die Farbbalken rechts neben den Plots zeigen die Signalwerte mit zugehörigen Analyten an. 48
Abbildung 15	Heatmap der Messergebnisse zur Anpassung des iFunnels im Positivmodus, Methode V1407. Dargestellt sind die Signale der Analyten Fenpyroximat und Hexythiazox in Abhängigkeit von den iFunnel-Spannungen (HP/LP). Die linke Seite zeigt die Signalfächen (Area), die rechte Seite die entsprechenden Signal-to-Noise Ratios (SNR). Grundlage der Messungen war ein Matrixstandard mit einer Konzentration von 0,5 mg/kg. Die Messwerte sind farbcodiert dargestellt; die Zwischenbereiche wurden mithilfe der Natural-Neighbor-Interpolation eingefärbt, um Trends sichtbar zu machen und die Auswahl geeigneter Einstellwerte zu unterstützen. Die Farbbalken rechts neben den Plots zeigen die Signalwerte sowie die zugehörigen Analyten an. 49
Abbildung 16	Heatmap der Messergebnisse zur Anpassung des iFunnels im Negativmodus auf Basis der Methode V1407. Gezeigt werden die Signale des Analyten Acequinocyl in Abhängigkeit von den iFunnel-Spannungen (HP/LP). Die linke Seite stellt die Signalfächen (Area) dar, die rechte Seite die zugehörigen Signal-to-Noise Ratios (SNR). Grundlage der Messungen war ein Matrixstandard mit einer Konzentration von 0,5 mg/kg. Zwischen den diskreten Messpunkten wurde eine Natural-Neighbor Interpolation durchgeführt, um lokale Trends im Parameterraum sichtbar zu machen. Die Farbbalken rechts neben den Plots zeigen die Signalwerte sowie den zugehörigen Analytenamen an. 50
Abbildung 17	Massenspuren im Chromatogramm der Quantifier von THPI (150→96) links und Captan (150→96) rechts bei einem Gehalt von 0,2 mg/kg im Vergleich zwischen der Ausgangsmethode V0607 (blau) und der angepassten Methode V1508B (rot). 52
Abbildung 18	Massenspuren im Chromatogramm der Quantifier von Phthalimid (146→42) links und Folpet (146→42) rechts bei einem Gehalt von 0,2 mg/kg im Vergleich zwischen der Ausgangsmethode V0607 (blau) und V1508B (rot). 52
Abbildung 19	Massenspuren im Chromatogramm der Quantifier von MilbemectinA3 (527,5→491,5) links und MilbemectinA4 (541,2→431,3) rechts bei einem Gehalt von 0,2 mg/kg im Vergleich der Ausgangsmethode V0607 (blau) mit V1508B (rot). 53

Abbildung 20	Massenspuren im Chromatogramm der Quantifier von Diphenylamin (169,9→92,9) links und Fenpyroximat (422,1→366) rechts bei einem Gehalt von 0,2 mg/kg im Vergleich der Ausgangsmethode V0607 (blau) mit V1508B (rot).	54
Abbildung 21	Massenspuren im Chromatogramm der Quantifier von Hexythiazox (353,1→227,9) links und Acequinocyl (384,1→342,1) rechts bei einem Gehalt von 0,2 mg/kg im Vergleich der Ausgangsmethode V0607 (blau) mit V1508B (rot).	55
Abbildung 22	Validierungsbereich für THPI (links) und Phthalimid (rechts). Dargestellt ist die Konzentration in mg/kg in Abhängigkeit von der Response Rate (RR). Die roten Punkte markieren die experimentellen Messwerte, die schwarze durchgezogene Linie zeigt die Regressionsgerade. Die Balken stellen den Bereich von ± 20 % um die Regressionslinie dar und veranschaulichen die akzeptierte Abweichung zur Bewertung der Linearität.	58
Abbildung 23	Validierungsbereich für Captan (links) und Folpet (rechts). Dargestellt ist die Konzentration in mg/kg in Abhängigkeit der Response Rate (RR). Die roten Punkte markieren die experimentellen Messwerte, die schwarze durchgezogene Linie zeigt die Regressionsgerade. Die Balken stellen den Bereich von ± 20 % um die Regressionslinie dar und veranschaulichen die akzeptierte Abweichung zur Bewertung der Linearität.	59
Abbildung 24	Validierungsbereich für Hexythiazox (links) und Fenpyroximat (rechts). Dargestellt ist die Konzentration in mg/kg in Abhängigkeit der Response Rate (RR). Die roten Punkte markieren die experimentellen Messwerte, die schwarze durchgezogene Linie zeigt die Regressionsgerade. Die Balken stellen den Bereich von ± 20 % um die Regressionslinie dar und veranschaulichen die akzeptierte Abweichung zur Bewertung der Linearität.	59
Abbildung 25	Validierungsbereich für Acequinocyl (links) und Diphenylamin (rechts). Dargestellt ist die Konzentration in mg/kg in Abhängigkeit der Response Rate (RR). Die roten Punkte markieren die experimentellen Messwerte, die schwarze durchgezogene Linie zeigt die Regressionsgerade. Die Balken stellen den Bereich von ± 20 % um die Regressionslinie dar und veranschaulichen die akzeptierte Abweichung zur Bewertung der Linearität.	60
Abbildung 26	Validierungsbereich für MilbemectinA3 (links) und MilbemectinA4 (rechts). Dargestellt ist die Konzentration in mg/kg in Abhängigkeit der Response Rate (RR). Die roten Punkte markieren die experimentellen Messwerte, die schwarze durchgezogene Linie zeigt die Regressionsgerade. Die grauen Balken stellen den Bereich von ± 20 % um die Regressionslinie dar und veranschaulichen die akzeptierte Abweichung zur Bewertung der Linearität.	60

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Maximale Rückstandshöchstmenge (MRL) und Ziel BG der untersuchten Analyten (* Summenangabe).	14
Tabelle 2	Gemessene Matrixeffekte (ME) und Signal-to-Noise Ratios (SNR) für die Methode V0607 bei einer Analytenkonzentration von 1 mg/kg in einem dotierten Matrixstandard. Gradientensteigung: 7,1 %/min.....	32
Tabelle 3	Matrixeffekte und relative Änderung der Signal-to-Noise Ratio (SNRGain) für verschiedene Gradientenprofile im Vergleich zur Ausgangsmethode V0607, gemessen bei einer Analytenkonzentration von 1 mg/kg in Matrixstandards.	32
Tabelle 4	In der Methode V1508B verwendete Einstellungen für Nebulizer-Druck (psi), Vaporizer-Temperatur (°C) und Flussrate (mL/min) für die einzelnen Analyten-Gruppen.....	40
Tabelle 5	Relative Zuwächse der Signal-to-Noise Ratio (SNRGain) und der Signalfläche (AreaGain) im Vergleich zur Methode V1407. Dargestellt sind die Messergebnisse zur Anpassung des Gasflusses für die Analyten der Gruppen 1 und 2 unter Verwendung der Methode V1407. Die Messungen basieren auf einem Matrixstandard mit einer Konzentration von 0,5 mg/kg.....	43
Tabelle 6	Relative Zuwächse der Signal-to-Noise Ratio (SNRGain) und der Signalfläche (AreaGain) im Vergleich zur Methode V1407. Dargestellt sind die Messergebnisse zur Anpassung des Gasflusses für die Analyten der Gruppe3: Hexythiazox, Fenpyroximat, MilbemectinA3 und MilbemectinA4, Matrixstandard 0,5 mg/kg.	44
Tabelle 7	Relative Zuwächse der Signal-to-Noise Ratio (SNRGain) und der Signalfläche (AreaGain) im Vergleich zur Methode V1407. Dargestellt sind die Messergebnisse zur Anpassung des Gasflusses für Acequinocyl, Matrixstandard 0,5 mg/kg.	44
Tabelle 8	Finale Gasfluss-Einstellungen für die Gruppen eins bis Gruppe vier in Methode V1508.	45
Tabelle 9	Gewählte iFunnel-Spannungen High Pressure (HP), Low Pressure (LP) für positive und negative Polarität in den Gruppen eins bis Gruppe vier.....	50
Tabelle 10	Übersicht der eingestellten Corona-Ströme (Corona Current) und Kapillarspannungen (Capillary Voltage) für die Gruppen 1 bis 4 im Positiv- und Negativmodus.....	51
Tabelle 11	Matrixeffekte (ME) der Ausgangsmethode V0607 im Vergleich zur finalen Methode V1508B. Matrixstandardgehalt von 0,2 mg/kg.	55
Tabelle 12	Validierungsergebnisse für dotierte Hopfenpellets (n = 6) mit der Messmethode V1508B. Angegeben sind die mittleren Wiederfindungen (WDF), deren relative Standardabweichung (RSD _{WDF}), sowie die erweiterte Messunsicherheit (U), getrennt nach Analyt und Gehalt.	57
Tabelle 13	Verlauf des Lösemittelgradienten, der Fließmittelgeschwindigkeit und Säulentemperatur V0607.	ii
Tabelle 14	Transitionswerte der Quantifier-Signale. Massenübergänge, Ionisierungspolarität (eingeklammert) und Kollisionsenergien (CE) der in der Ausgangsmethode V060725 zusammengefassten Zielanalyten.....	ii
Tabelle 15	Einstellwerte der Ausgangsmethode V060725 an der APCI-Quelle und am Massenspektrometer. Für die Polarisationsmodi positiv und negativ, sowie die davon unabhängig einstellbaren Parameter.	ii
Tabelle 16	Signalfläche (Area) der Analyten für die Ausgangsmethode V0607 und die Gradientenvarianten G09 bis G16; Matrixstandard 1 mg/kg.....	iii
Tabelle 17	Signalfläche (Area) der Analyten für die Ausgangsmethode V0607 und die Gradientenvarianten G09 bis G16; Lösemittelkalibrierstandard (Acetonitril), 0,05 ng/µL.	iii
Tabelle 18	Signal-to-Noise Ratio der Analyten für die Ausgangsmethode V0607 und die Gradientenvarianten G09 bis G16; Matrixstandard 1 mg/kg.....	iii
Tabelle 19	Signalflächen (Area) des Lösemittelstandards (0,025 ng/µL in Acetonitril) bei Variation von Flussrate, Vaporizer-Temperatur und Nebulizer-Druck, Methode V1107.	iv
Tabelle 20	Signalfläche (Area) der Analyten in Abhängigkeit von der Gastemperatur (°C); Messmethode V1407, Matrixstandard 0,5 mg/kg.	v

Tabelle 21	Signal-to-Noise Ratio (SNR) der Analyten in Abhängigkeit von der Gastemperatur (°C); Messmethode V1407, Matrixstandard 0,5 mg/kg.....v
Tabelle 22	Signalfläche (Area) der Analyten in Abhängigkeit vom Gasfluss (L/min); Messmethode V1407, Lösemittelstandard in Acetonitril 0,25 ng/µL vi
Tabelle 23	Signal-to-Noise Ratio der Analyten in Abhängigkeit vom Gasfluss (L/min); Messmethode V1407, Matrixstandard 0,5 mg/kg vi
Tabelle 24	iFunnel-Rohdaten mit High-Pressure- und Low-Pressure-Spannungen HP (V) und LP (V) sowie Area der Analyten Acequinocyl, Diphenylamin, Fenpyroximat, Hexythiazox, MilbemectinA3, MilbemectinA4, Phthalimid, THPI. Messbedingungen: Lösemittelstandard in Acetonitril 0,025 ng/µL, Methode V1407. vii
Tabelle 25	iFunnel-Rohdaten mit High-Pressure- und Low-Pressure-Spannungen HP (V) und LP (V) sowie Area der Analyten Acequinocyl, Diphenylamin, Fenpyroximat, Hexythiazox, MilbemectinA3, MilbemectinA4, Phthalimid, THPI. Messbedingungen: Matrixstandard 0,5 mg/kg, Methode V1407. viii
Tabelle 26	Arbeitsbereich für die untersuchten Analyten mit Rohdaten der Response Rate (RR) in Abhängigkeit von Konzentration in Lösung (ng/µL) und berechnetem Gehalt (mg/kg) für Matrixstandardlösungen von 0,04 mg/kg bis 30 mg/kg gemäß Messmethode V1508B. Analyten: Acequinocyl, Diphenylamin, Hexythiazox, Phthalimid, THPI. Felder mit „AR“ kennzeichnen Ausreißer, die nach dem Grubbs-Test identifiziert wurden.....ix
Tabelle 27	Arbeitsbereich für die untersuchten Analyten mit Rohdaten der Response Rate (RR) in Abhängigkeit von Konzentration in Lösung (ng/µL) und berechnetem Gehalt (C) (mg/kg) für Matrixstandardlösungen von 0,04 mg/kg bis 30 mg/kg gemäß Messmethode V1508B. Analyten: Captan, Fenpyroximat, Folpet, MilbemectinA3, MilbemectinA4. Felder mit „AR“ kennzeichnen Ausreißer, die nach dem Grubbs-Test identifiziert wurden.....ix
Tabelle 28	Zuordnung interner Standards (IS) auf Basis der Wiederfindung (WDF) aus Matrixkalibrierung und Dotierungen auf dem Gehaltsniveau L2 (0,1 mg/kg, n = 3). Angegeben sind die bestimmten Detektorantworten als Signalfläche (Area) in Dotierungen und Matrixstandards sowie die daraus abgeleitete WDF.x
Tabelle 29	Ion-Ratio (QIR) der Analyten für MxCal und Level 3 (a–c); Messmethode V1508B, Matrixstandard 1 mg/kg.xi
Tabelle 30	Signalflächen bestimmt aus acht Standards für Captan Folpet und restlichen APCI–Milbemectin Mix zusammengefasst. Gemessen mit der Ausgangsmethode und der finalen Validierungsmethode. xii
Tabelle 31	Response–Ratios (RR) der Aufarbeitung bei Dotierleveln von 0,05 mg/kg bis 1,0 mg/kg als Grundlage für die Berechnung von Wiederfindung und Gehalt. Eingetragen sind die Einzelwerte der aufgearbeiteten Dotierungen (DOT a–f) sowie die zusammengefassten Werte für den Matrixstandard (mean RR MxCal). xiii

Formelverzeichnis

Formel 1	Response-Ratio aus Detektorantworten von Analyt und Standard	22
Formel 2	Analytgehalt aus Responserate Einzelstandard	22
Formel 3	Einwaagebezogener Gehalt von Zielanalyt in Matrix	22
Formel 4	Bestimmung von Matrixeffekt aus Matrix- und Lösemittelstandard	23
Formel 5	Wiederfindungsrate des Erwartungswertes	25
Formel 6	Relative Standardabweichung bezogen auf den Mittelwert	25
Formel 7	Steigungskoeffizient Berechnung lineare Regression	27
Formel 8	Achsenabschnittsberechnung für lineare Regression	27
Formel 9	Steigungskoeffizient Berechnung gewichtete lineare Regression	28
Formel 10	Achsenabschnitt Berechnung gewichtete lineare Regression	28
Formel 11	Bestimmung der rückgerechneten Konzentration aus Kalibrierfunktion	28
Formel 12	Relative Abweichung der Residue vom Erwartungswert	28
Formel 13	Bestimmung der Prüfgröße für Ausreißertest nach Grubbs	29
Formel 14	Relative Änderung einer Zielgröße zum Ausgangswert	29
Formel 15	Kombinierte Messunsicherheit von Präzision und Richtigkeit	30
Formel 16	Kombinierte Messunsicherheit von Präzision und Richtigkeit	30

Abkürzungsverzeichnis

AB	Arbeitsbereich
ACN	Acetonitril
AoI	Validierungspflichtige Analyten
APCI	Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck
Area	Signalfäche/Detektorresponse
BG	Bestimmungsgrenze
C	Massenkonzentration/Gehalt
dSPE	Dispersive Festphasenextraktion
ESI	Elektrospray-Ionisierung
GC	Gaschromatographie
IS	Interner Standard
LC	Flüssigchromatographie
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
ME	Matrixeffekt
MRL	Maximale Rückstandshöchstmenge
MRM	Multiple-Reaction-Monitoring
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
Q1	Quadropol-eins
q2	Quadropol-zwei
Q3	Quadropol-drei
RR	Response Ratio
rrel	Relative Abweichung eines Residuums
RSD	Relative Standardabweichung
RT	Retentionszeit
s	Standardabweichung (Stichprobe)
SANTE	Generaldirektion Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
SNR	Signal-to-Noise Ratio
THPI	1,2,3,6-Tetrahydrophthalimid
TQMS	Triple-Quadropol-Massenspektrometer
u	Messunsicherheit
U	Erweiterte-Messunsicherheit
WDF	Wiederfindung
Zellbeschleunigungsspannung	Quadropol-eins
β	Volumenkonzentration
ω	Gewicht einer Regressionsfunktion

1 Einleitung

Deutschland zählt zu den weltweit größten Produzenten von Hopfen. Über ein Drittel der globalen Hopfenernte stammt aus deutschen Anbaugebieten (Stand 2023).¹

Die Blütenstände weiblicher Pflanzen, die sogenannten Dolden der Art *Humulus lupulus*, stellen einen zentralen Rohstoff für die Bierherstellung dar und unterliegen dementsprechend gesetzlichen Vorgaben zur Lebensmittelsicherheit. Diese fordern unter anderem eine vor der Inverkehrbringung bestandene Untersuchung des Hopfens zur Einhaltung von Pflanzenschutzmittelhöchstgehalten durch akkreditierte Laboratorien.²

Die komplexe Zusammensetzung von Hopfenmatrices erschwert deren analytische Untersuchung. Da nur eine begrenzte Zahl an Anbietern diese Analysen durchführt, ergeben sich für Dienstleister wie die GBA Group gute Möglichkeiten zur Erschließung neuer Marktanteile.

Die analytischen Kompetenzen des Unternehmens werden in der vorliegenden Arbeit durch Parametereingliederung und der Entwicklung einer neuen Messmethode zur Bestimmung ausgewählter Analyten in Hopfen gestärkt.

Ziel ist es, eine entwickelte Mess-Methode im Rahmen der vorgegebenen methodischen Anforderungen zu validieren, wobei sich hier an den Vorgaben der Generaldirektion Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (SANTE) orientiert wird.

¹ (BarthHaas GmbH & Co. KG 01.05.2024, 10).

² (SANTE 2021, 1).

1.1 Gegenstand der vorliegenden Arbeit

Im Rahmen eines Ringversuchs der Arbeitsgruppe Hopfenanalyse zur Pestizidanalytik führte die GBA Group Rückstandsanalysen von etwa 40 Wirkstoffen in Hopfen durch. Eine parallel zur vorliegenden Arbeit entwickelte Multipestizid-Probenaufarbeitungsmethode, die sowohl Flüssigchromatographie (LC) mit Elektrospray-Ionisierung (ESI) und Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) als auch Gaschromatographie (GC) mit gekoppelter MS/MS in Hopfenmatrix kombinierte, zeigte für einen Teil der LC-Analyten eine matrixbedingte unzureichende Detektion unter ESI.

Ursächlich sind Effekte wie erhöhte Viskosität des Matrixextrakts, was die Bildung feiner Tropfen, essenziell für eine effiziente ESI-Ionisierung, beeinträchtigt. Zusätzlich erschwert die komplexe Zusammensetzung aus Harzen, Polyphenolen und ätherischen Ölen die Analytik, weshalb Hopfen gemäß SANTE generell als besonders herausfordernd klassifiziert wird.^{3,4}

Um die Analytik der betroffenen Parameter zu verbessern, sollen diese in einer ausgegliederten LC-Messmethode mittels chemischer Ionisierung unter Atmosphärendruck (APCI) analysiert werden. Die APCI ist gegenüber der ESI weniger anfällig für matrixbedingte Effekte. Dies liegt unter anderem daran, dass sie im Gegensatz zur ESI nicht auf die Bildung eines feinen Tröpfchennebels angewiesen ist, welcher durch erhöhte Viskosität negativ beeinflusst werden kann (siehe 2.3).

Die Entwicklung der LC-APCI-MS/MS-Methode verfolgt das Ziel, die Geräte- und Quellenparameter so festzulegen, dass alle ausgewählten Analyten in Hopfen auf dem vorgegebenen Gehaltsniveau zuverlässig quantifiziert und anschließend entsprechend den Validierungsvorgaben geprüft werden können. Dazu wird eine Multiple-Reaction-Monitoring (MRM) Methode erstellt, die für jeden der zehn Zielanalyten mindestens auf dem vorgesehenen Bestimmungsgrenzniveau einsetzbar ist. Die Methode basiert auf einer statischen MRM-Methode in welche Massenübergänge aus bestehenden Verfahren übertragen wurden.

³ (Professor Dr. Belitz et al. 15.07.1982, 967).

⁴ (SANTE 2021, 24).

1.2 Untersuchte Analyten in Hopfen

Die untersuchten, zwingend zu validierenden Analyten (AoI) umfassten Acequinocyl, Diphenylamin, Fenpyroximat, Hexythiazox, Phthalimid sowie 1,2,3,6-Tetrahydrophthalimid (THPI), jeweils mit einer Bestimmungsgrenze (BG) von 0,05 mg/kg. MilbemectinA3 und MilbemectinA4 wurden gemäß EU-Vorgabe als Summe bewertet. Für diese Summe wurde eine Validierung mit einem Zielwert von 0,2 mg/kg durchgeführt, was 0,1 mg/kg je Einzelverbindung entspricht (Tabelle 1).

Tabelle 1 Maximale Rückstandshöchstmenge (MRL) und Ziel BG der untersuchten Analyten (* Summenangabe).

CompoundName	MRL [mg/kg]	Ziel BG [mg/kg]	Rückstandsdefinition
THPI	150*	0,05	Summe Captan
Acequinocyl ⁵	15	0,05	Einzelgehalt
Captan	150*	0,05	Summe Captan (Absicherung)
Diphenylamin ⁶	0,05	0,05	Einzelgehalt
Fenpyroximat ⁷	15	0,05	Einzelgehalt
Folpet	400*	0,05	Summe Folpet (Absicherung)
Hexythiazox ⁸	3	0,05	Einzelgehalt
MilbemectinA3	0,2*	0,1	Summe Milbemectin
MilbemectinA4	0,2*	0,1	Summe Milbemectin
Phthalimid	400*	0,05	Summe Folpet

Für die Quantifizierung der Analyten Captan, Folpet, THPI und Phthalimid ist ein methodisch und rechtlich relevanter Zusammenhang zu berücksichtigen. THPI stellt das Grundgerüst von Captan dar, während Phthalimid in gleicher Weise mit seinem Derivat Folpet verknüpft ist. Aufgrund günstigerer Detektionseigenschaften wurden beide Derivate in die GC-Methode integriert, welche Bestandteil des Gesamtprojekts war.

Captan und Folpet wurden in die APCI-Methode aufgenommen, um die Befunde der GC abzusichern. Beide Verbindungen haben eine ausgeprägte Neigung zum Abbau in ihre Grundstruktur, sowohl unter thermischen Einflüssen als auch spontan während der Lagerung oder vor der Probenannahme (Abbildung 1). Nach der aktuellen Rückstandsdefinition gemäß EU 2016/452 und EU 2023/1042 sind die Gehalte als Summenparameter für Captan und THPI sowie für Folpet und Phthalimid anzugeben.^{9,10}

⁵ Verordnung (EU) 2017/623 vom 02.07.2025, 37.

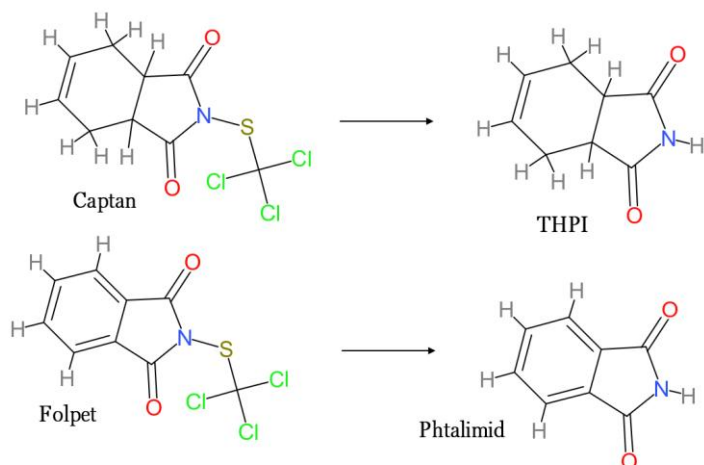
⁶ Verordnung (EG) 2018/1515 vom 02.07.2025, 9.

⁷ Verordnung (EU) 2020/856 vom 19.06.2025, 3.

⁸ (Abdourahime et al. 2019, 19).

⁹ Verordnung (EU) 2023/1042 vom 26.05.2023, 3.

¹⁰ Verordnung (EU) 2016/452 vom 29.03.2016, 4.



Um die Einzelgehalte zuverlässig quantifizieren zu können, wurden Kalibrierstandards stets mit Captan und Folpet getrennt von denen der weiteren Analyten angesetzt und gemessen.

Die Grundstrukturen THPI und Phthalimid verbleiben bei

Abbildung 1 Abbau von Captan zu THPI (oben); von Folpet zu Phthalimid (unten). der Aufarbeitung aufgrund ihrer polaren Eigenschaften in der Acetonitril-Phase und müssen somit in der LC-MS/MS gemessen werden, von welcher aus sie aufgrund beobachteter Analyseschwierigkeiten weiter in die LC-APCI-MS/MS ausgegliedert werden sollen (2.1). Ziel-BG für diese vier Analyten ist 0,05 mg/kg (Tabelle 1), wobei aufgrund des geschilderten Sachverhalts der GC-Wert von Captan und Folpet im Projekt zur Summenbildung verwendet wird. Die Validierung von Captan und Folpet ist aus entsprechendem Grund in der LC-APCI-MS/MS-Messmethode nicht notwendig, aber sinnvoll.

Es wurde angenommen, dass Captan und Folpet beim Erhitzen im Zugang zur APCI-Ionenquelle vollständig thermolytisch zu THPI bzw. Phthalimid abgebaut werden. Bei der Optimierung wurde daher in der Methodenentwicklung auf zusätzliche Standards für Captan und Folpet häufig verzichtet. Die Unterscheidung dieser Verbindungen ist im analytischen Aufbau ausschließlich über ihre Retentionszeit möglich.¹¹

1.3 Struktur der vorliegenden Arbeit

Die Arbeit umfasst die methodische Entwicklung und die anschließende Validierung der LC-APCI-MS/MS-Methode. Nach der Darstellung des theoretischen Hintergrunds und der relevanten Validierungsleitgrößen erfolgte die schrittweise Optimierung zentraler Geräteeinstellungen. Jeder Optimierungsschritt beinhaltete die Definition des Ziels, die Auswahl geeigneter Parameter, die Präsentation der Messergebnisse sowie eine Diskussion. Die daraus abgeleitete finale Methode wird anschließend anhand der SANTE-Kriterien validiert.

¹¹ (Hägele et al. 2020, 1).

2 Methodik und theoretischer Hintergrund

2.1 Probenaufarbeitung Prinzip

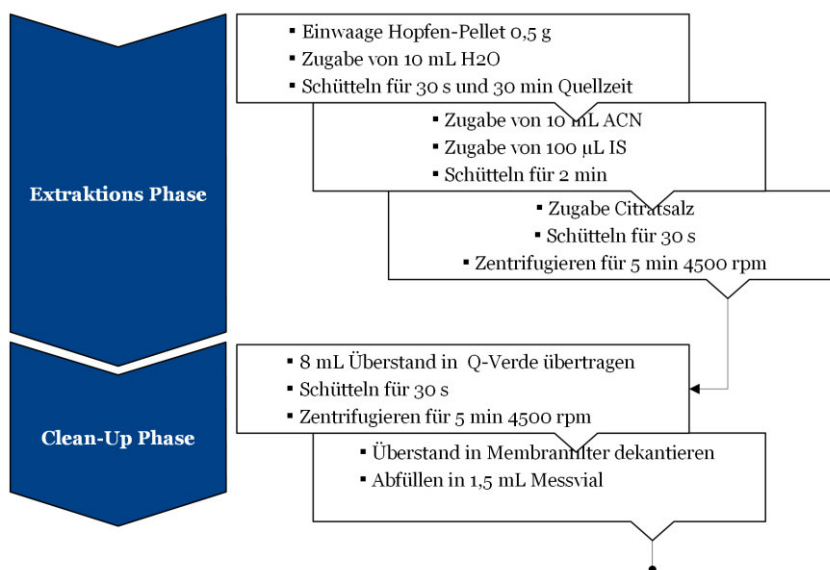


Abbildung 2 Fließschema der Probenaufarbeitung für APCI-Abfüllungen im Rahmen der Multipestizid-Aufarbeitung von Hopfenpellets.

Der Ablauf von der Einwaage bis zur Analyse einer Probe sowie weitere Details zu Mengen und Zeiten sind (Abbildung 2) zu entnehmen. Es handelt sich um den für APCI-Abfüllungen relevanten Ausschnitt aus der Probenaufarbeitung.

Für eine zuverlässige und reproduzierbare Analytik ist die Erfassung der Grundgesamtheit durch die untersuchte Probe essenziell. Daher wird die Einwaage aus homogenisierten Hopfenpellets zunächst mit Wasser vermischt und für eine definierte Zeit gequollen. Dieser Schritt verbessert die Zugänglichkeit der Oberflächenstruktur des Homogenisats für das anschließend zugegebene Acetonitril (ACN), wodurch die Effizienz und Reproduzierbarkeit der Extraktion erhöht werden. Zur Kompensation nachfolgender Analytverluste wird dem Gemisch ein definiertes Volumen an internem Standard zugegeben siehe (2.4).

Im nächsten Schritt wird nach einem Schütteln ein Citratsalz zugesetzt, das sowohl als Puffersystem als auch zur Phasentrennung dient. Die Salzkationen fördern die Kohäsion der Wassermoleküle und verdrängen dadurch weniger polare Matrixbestandteile sowie ACN-lösliche Analyten aus der wässrigen Phase. Es bildet sich ein Zweiphasengemisch aus einer organischen ACN-Phase und einer wässrigen Phase mit einem festen Matrixpellet an der Grenzfläche.

Nach dem Schütteln und Zentrifugieren des Extrakt-Salzgemischs wird ein definiertes Volumen der oberen ACN-Phase zur weiteren Reinigung in ein Tube mit einer dispersiven Festphasenextraktionsmischung (dSPE) überführt. Die eingesetzte Sorbentmischung (QVerde) enthält mehrere Komponenten, die für die Aufreinigung komplexer Matrices wie Hopfen geeignet sind. Primär-sekundäre Amine entfernen organische Säuren und Zucker, Octadecylsiliciumdioxid bindet lipophile Substanzen wie Fette und Wachse, und Aktivkohle reduziert Pigmente. Magnesiumsulfat trocknet das Extrakt durch Hydratation. Ergänzend wirken zirkoniumbeschichtete Sorbentien selektiv gegen Phospholipide und weitere lipophile Matrixbestandteile. Nach der dSPE wird erneut zentrifugiert. Der gereinigte Überstand wird dekantiert, membranfiltriert und für die anschließende chromatographische Analyse bereitgestellt.^{12,13}

Als Membranfilter kommt der LLG-Spritzenvorsatzfilter SPHEROS mit einer Porengröße von 0,22 µm zum Einsatz.

2.2 Flüssigchromatographie

Die Trennung erfolgt über Flüssigchromatographie mit Umkehrphase. Sie dient nach der Probenaufarbeitung der weiteren Separation von Probenbestandteilen und Analyt. Sie basiert auf unterschiedlichen Wechselwirkungen der Probenbestandteile mit zwei Phasen, die wiederum in unterschiedlichen Laufzeiten resultieren. Als Phasen existieren die mobile, polare Phase, bestehend aus einem Wasser-Gemisch mit veränderlichem Anteil angesäuertem organischem Lösungsmittel, und eine stationäre, unpolare Phase in Form einer chromatographischen Säule.

Eine über das Mischungsverhältnis hinausgehende Modifikation der Eluenten wurde bewusst ausgeschlossen, um die Kompatibilität mit weiteren auf dem Gerät bestehenden Methoden zu gewährleisten.

Ein Aliquot der Probe wird vom Sampler des Geräts injiziert und mit der mobilen Phase durch die Säule transportiert.¹⁴

¹² (MilliporeSigma 2013).

¹³ (SANTE 2021, 4).

¹⁴ (Matissek und Fischer 2021, 135–136).

Die verwendete Biphenyl-Säule (1,8 µm·150 mm·2,1 mm) verfügt neben ihren unpolaren Eigenschaften über eine selektive Retentionszeiterhöhung für Analyten mit konjugierten Elektronensystemen oder Dipoleigenschaften. Abhängig von den physikochemischen Eigenschaften der Probenbestandteile erfolgt deren Verdrängung entlang der Grenzfläche von der mobilen zur stationären Phase, was zu einer selektiv retardierten Migration durch das chromatographische System führt.¹⁵

Die mobile Phase besteht aus Wasser und Methanol, angesäuert mit 5 % Methansäure Komponente (B). Mit zunehmendem Anteil von B sinkt die Grenzflächenspannung gegenüber der Biphenyl-Säule, wodurch die Wechselwirkungen mit der stationären Phase abnehmen. Die Zusammensetzung des Lösungsmittelgradienten und die eingestellte Flussrate dienen als Parameter zur gezielten Steuerung der Retentionszeiten und zur Reduktion matrixbedingter Störungen durch gleichzeitige Elution.

Die Flussrate beeinflusst zusätzlich die Menge des am Detektor eintreffenden Analyten und damit die Signalstärke und Empfindlichkeit. Der Lösungsmittelgradient wirkt sich zudem auf die Ionisierungseffizienz aus, da der steigende Anteil des weniger flüchtigen Wassers die Überführung der mobilen Phase in die für APCI erforderliche Gasphase verlängert und somit die Trocknungszeit sowie die Ionisierung in der Quelle beeinflusst siehe (2.3).

2.3 Prinzip des Massenspektrometers im APCI-Modus

Zur massenspektrometrischen Analyse wird ein Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (TQMS) im APCI-Modus verwendet. Dieses ist an das LC-System gekoppelt. Im TQMS wird der eintretende Probenstrom zunächst in die Gasphase überführt und anschließend in der APCI-Quelle ionisiert, sodass die Probenbestandteile anhand ihres Masse-zu-Ladung-Verhältnisses (m/z) selektiv gefiltert und analysiert werden können. Der Aufbau der Quelle mit den Versuchsrelevanten Bauteilen ist in (Abbildung 3) dargestellt.

¹⁵ (Restek GmbH).

An der Schnittstelle von LC zu TQMS (Abbildung 3a) gelangt der Strom aus Lösungsmittel, Wasser, Matrixbestandteilen und Zielanalyten in das Gerät, wo er durch den Nebulizer (Abbildung 3b) zerstäubt wird. Die Trocknung des Aerosols erfolgt durch einen gerichteten N₂-Gasstrom (Abbildung 3d) sowie durch zwei Infrarotlampen des Vaporizers (Abbildung 3c), die im Absorptionsbereich von Wasser emittieren und so eine effiziente Verdampfung ermöglichen. Die Ionisierung bei APCI findet ausschließlich in der Gasphase statt. Parameter wie Nebulizer-Gasdruck, Temperatur des Gases und des Vaporizers, Gasflussgeschwindigkeit sowie die Flussrate der mobilen Phase bestimmen die Menge und den Zustand der Reaktionspartner in der Ionenquelle. Änderungen der Flussrate wirken sowohl auf die eingebrachte Analyt- und Matrixmenge als auch auf die zur Überführung in die Gasphase erforderliche Trocknungsleistung. Im Ionisierungsbereich wird über eine Nadelelektrode (Abbildung 3e) und eine Gegenelektrode (Abbildung 3f) ein einstellbarer Strom angelegt. Die Ionisierung beginnt mit einer elektrischen Entladung an der Koronanadel in der verdampften mobilen Phase, die im Wesentlichen aus Methanol und Wasser besteht. Bei der Ionisation unter Atmosphärendruck entstehen Ion-Molekül-Reaktionen zwischen der ionisierten gasförmigen mobilen Phase und dem Probengas, die zur chemischen Ionisation der Analyten führen. Auch Matrixbestandteile können ionisiert werden und die nachfolgende Messung beeinträchtigen.^{16,17,18}

Die Ionisierung erfolgt abhängig von der eingestellten elektrischen Polarität im positiven oder negativen Modus, wodurch Protonierung, Deprotonierung, Ladungsaustausch oder Elektroneneinfang möglich sind. Der ionisierte Probengasstrom wird über eine Hexabore-Kapillare (Abbildung 3g) in das Massenspektrometer geleitet. An dieser Kapillare wird eine Spannung angelegt, die neutrale und falsch geladene Ionen abscheidet und die gewünschten Ionen gezielt in das Massenspektrometer überführt.^{19,20}

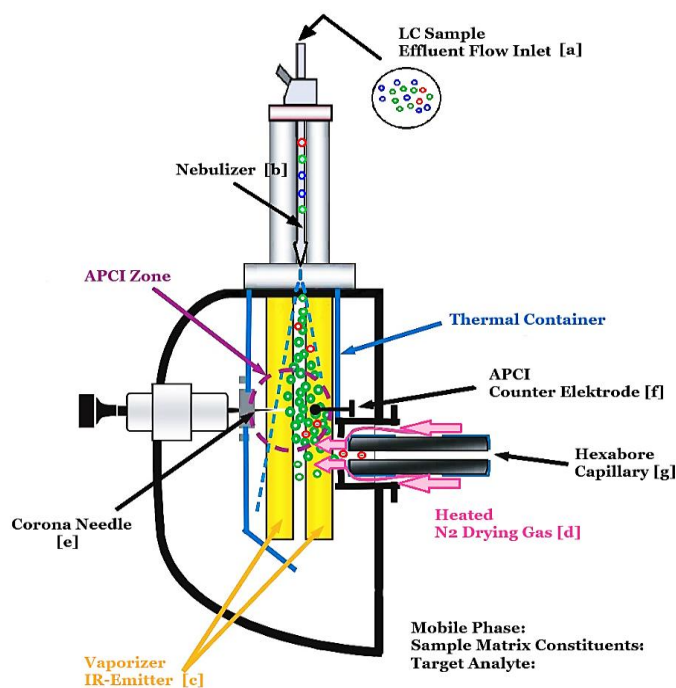


Abbildung 3 Seitenquerschnitt der Agilent AJS-Ionenquelle und Lagebeschreibung zentraler Bauteile (A–F). Darstellung des Probenstroms in der Ionenquelle (Modifiziert nach, Agilent 6400 Series Triple Quadrupole LC/MS System, 01.05.2018, 54).

¹⁶ (Agilent Technologies Inc. 01.05.2018, 54).

¹⁷ (Dr. Gross 2019, 71).

¹⁸ (Matissek und Fischer 2021, 155).

¹⁹ (Dr. Gross 2019, 91).

²⁰ (Agilent Technologies Inc. 30.08.2025).

Nach dem Eintritt in die Kapillare wird das Trägergas zusammen mit verbliebenen Neutralteilchen entfernt. Dazu durchläuft der Probenstrom zwei Kammern mit abfallenden Spannungsgradienten, die als iFunnel bezeichnet werden. In der Hochdruckkammer werden ladungsrichtige Ionen gesammelt und in Richtung Niederdruckkammer beschleunigt, wo eine weitere Fokussierung ins Zentrum der Leitung erfolgt, bevor die Ionen in den ersten Quadrupol (Q1) gelangen. Die Frequenzeinstellungen der Kammern beeinflussen die Empfindlichkeit des Messsignals.

Im Q1 werden die Precursor-Ionen des Zielanalyten selektiert, sodass nur Ionen mit passendem m/z -Wert in die Kollisionszelle im zweiten Quadrupol (q2) überführt werden. Dort kollidieren die Precursor-Ionen mit Stickstoffgas, wodurch charakteristische Produkt-Ionen entstehen. Das Fragmentationsspektrum wird durch die Kollisionsenergie bestimmt, die die Größe und Häufigkeit der Fragmente beeinflusst. Zusätzlich steuert die Zellbeschleunigungsspannung (CAV) die Effizienz des IONENTRANSPORTS aus q2. Eine ausreichend hohe CAV verbessert die Leerung der Zelle und erhöht die Überföhrungseffizienz, während zu hohe Spannungen unerwünschte zusätzliche Fragmentierungen verursachen können.²¹

Die in q2 erzeugten Produkt-Ionen gelangen in den dritten Quadrupol (Q3), wo sie anhand der eingestellten Massenfilterparameter selektiert werden. Nur Ionen mit dem gewünschten m/z -Wert passieren Q3 und werden anschließend mit einem Elektronenmultiplier detektiert. Beim Auftreffen auf Dynoden werden sie in ein Elektronensignal umgewandelt, das in eine Spannung transformiert und für die weitere Auswertung digitalisiert wird.^{22, 23, 24}

²¹ (Katerina et al. 09.01.2017, 10–11).

²² (Agilent Technologies Inc. 01.05.2018, 51–54).

²³ (Fisher und Perkins 21.04.2005, 3–5).

²⁴ (Agilent Technologies Inc. 01.05.2018, 62).

2.3.1 Dwell-Time

Die Dwell-Time entspricht der Zeitspanne, welche das TQMS innerhalb eines Messzyklus zur Erfassung eines spezifischen Massenübergangs aufwendet. Funktionell lässt sie sich mit einer Belichtungszeit vergleichen. Bei steigender Dwell-Time können pro Zyklus mehr Ionen den Detektor erreichen, was die Signalintensität und Reproduzierbarkeit erhöht.

Während eine zu hohe Dwell-Time zu einer unzureichenden Peakbeschreibung infolge verminderter Messpunktdichte führt, verringert eine zu niedrige die Signalqualität ebenfalls. Für den vorliegenden Versuch wurde ein Zielwert von mindestens 15 Datenpunkten pro Peak als ausreichend für eine zuverlässige Quantifizierung definiert. Die Dwell-Time wird so eingestellt, dass dieser Wert unter Berücksichtigung der Peakbreite und der Anzahl der innerhalb eines Messfensters überwachten Massenübergänge erreicht wird.²⁵

2.4 Interner Standard

Zur Kompensation analytischer Verluste zwischen Probenaufarbeitung und Analyse sowie matrixbedingter Signalunterdrückung werden den Probenextrakten interne Standards (IS) zugesetzt. Ändert sich die Konzentration des IS während der Aufarbeitung oder treten Störungen bei der Messung auf, wird davon ausgegangen, dass der Zielanalyt in ähnlichem Maße betroffen ist. Unterschiede im Verhalten von IS und Analyt können zu systematischen Fehlern führen.

Damit der IS diese Funktion zuverlässig erfüllt, sollte er dem Zielanalyt in seinen physikochemischen Eigenschaften möglichst ähnlich sein, insbesondere hinsichtlich Löslichkeit, Polarität und Ionisierungsverhalten. Gleichzeitig darf der IS nicht natürlich in der Probe vorkommen, um eine eindeutige Zuordnung sicherzustellen.

²⁵ (Behrooz Zekavat et al. 20.03.2019).

Isotopenmarkierte Standards eignen sich besonders gut für diese Aufgabe, sind jedoch nicht immer verfügbar oder wirtschaftlich einsetzbar. Im vorliegenden Versuch wird daher auf eine Auswahl validierter IS zurückgegriffen, die für APCI-Methoden bereits etabliert sind. Bei der Zuordnung der IS wird in erster Linie die Ionisierungspolarität berücksichtigt, anschließend wird der am besten geeignete Standard für die Korrektur ausgewählt siehe Anhang (Tabelle 28).

Wie in (2.1) beschrieben, wird jeder Probe die gleiche Menge an IS zugesetzt. Für die Quantifizierung wird die vom Detektor gemessene Signalantwort (Area) des Zielanalyten ins Verhältnis zur Signalantwort des IS gesetzt. Aus diesem Verhältnis ergibt sich die Response Ratio (RR), die sich bei gleicher Konzentration des Zielanalyten und identischer Matrix in Standard wie Probe ähneln sollte.²⁶

$$RR = \frac{Area_{AoI}}{Area_{IS}} \quad [\quad 1 \quad]$$

2.4.1 Gehaltsbestimmung

In vereinfachter Form lässt sich die Volumenkonzentration des Analyten in einer Probe auch durch eine Ein-Punkt-Kalibrierung bestimmen, wie bei den Dotierungen geschehen. Dabei wird die gemessene RR der Probe ins Verhältnis zu der des Kalibrierstandards bei bekannter Konzentration gesetzt. Die Volumenkonzentration (β) wird über den folgenden Zusammenhang bestimmt.

$$\beta_{AoI} = \beta_{Cal} \cdot \frac{RR_{AoI}}{RR_{Cal}} \quad [\quad 2 \quad]$$

Die Analytbelastung der Probenmatrix (C) wird berechnet, indem die Volumenkonzentration des Analyten in der Probe auf die ursprüngliche Einwaage bezogen wird. Hierzu wird der im Extrakt bestimmte Analytgehalt auf die Volumenkonzentration der eingewogenen Matrix in der ACN-Phase bezogen.

$$C_{AoI} = \frac{\beta_{AoI}}{\beta_{Matrix}} \quad [\quad 3 \quad]$$

²⁶ (SANTE 2021, 7).

2.4.2 Matrixeffekt

Matrixeffekte entstehen in der LC-MS Analytik häufig durch coeluierende Matrixbestandteile, die in der Ionisationsquelle mit dem Zielanalyten um Ladungen konkurrieren. Es kann sowohl zu Signalunterdrückung als auch zu Signalverstärkung kommen. Zusätzlich beeinflussen physikalische Eigenschaften wie die Viskosität der Probe die Ionisationseffizienz.

Zur experimentellen Bestimmung des Matrixeffekts (ME) wird die Area eines Kalibrierstandards in Lösungsmittel mit der eines identisch konzentrierten Standards in Matrixextrakt verglichen. Ein ME im Bereich von $\pm 20\%$ gilt gemäß SANTE-Leitlinie als akzeptabel und erfordert keine Korrektur. Bei größeren Abweichungen sind Maßnahmen wie Matrix-matched-Kalibrierung oder Standardaddition erforderlich. Signalverstärkungen lassen sich durch Matrix-matched-Kalibrierung weitgehend kompensieren, während Suppressionseffekte das Erreichen der Bestimmungsgrenze erschweren.

In dieser Arbeit wird der Begriff Matrixeffekt ausschließlich im Sinne des beschriebenen mathematischen Zusammenhangs verwendet und grenzt sich damit von einer allgemeinen Beschreibung matrixbedingter Störungen ab.^{27,28}

$$ME = \frac{Area_{AoI, Matrix}}{Area_{AoI, Lösemittel} \cdot \left(\frac{\beta_{AoI, Matrix}}{\beta_{AoI, Lösemittel}} \right)} - 1 \quad [4]$$

2.5 Identifikationskriterien

Die Signalpeaks der Proben sollen mit denen der Kalibrierlösungen sowohl qualitativ, etwa hinsichtlich der Peakform, als auch quantitativ übereinstimmen.

Für die Ion-Ratio und die Retentionszeit werden aufgrund des bekannten Inhalts vereinfachte Prüfungen vorgenommen. Die Ion-Ratio wird quantitativ nur für das höchste Dotierungslevel bestimmt; bei niedrigeren Gehalten erfolgt eine Bewertung nur bei auffälligen Abweichungen siehe (IX).

²⁷ (SANTE 2021, 46).

²⁸ (Wanlong Zhou et al. 24.11.2017, 3).

2.5.1 Retentionszeit

Die Retentionszeit (RT) bezeichnet die Zeitspanne zwischen dem Start der Messung und dem Erreichen des Peak-Maximums eines Analyten. Sie wird im Wesentlichen durch Wechselwirkungen mit der stationären Phase bestimmt siehe (2.2) und bleibt für eine gegebene Messmethode und den jeweiligen Analyt nahezu konstant.

Im Rahmen der Methodenvalidierung gilt, dass die Retentionszeit eines Analyten innerhalb einer Messsequenz höchstens um $\pm 0,1$ Minuten von der Retentionszeit des Standard-Peaks mit der höchsten Konzentration abweichen darf. Ist dies gegeben bleibt sie unkommentiert.²⁹

2.5.2 Ion-Ratio

Für die Quantifizierung wird der Massenübergang verwendet, der die höchste Spezifität und/oder Empfindlichkeit aufweist. Der zugehörige Peak wird als Quantifier bezeichnet, während zusätzliche, weniger empfindliche Massenübergänge als Qualifier dienen und die Identität des Analyten absichern.

Die Ion-Ratio beschreibt das Verhältnis der Response des Quantifiers zur Response eines Qualifiers. Sie ist unter konstanten Messbedingungen charakteristisch für den jeweiligen Massenübergang. Die Ion-Ratio des Kalibrierstandards mit der höchsten Dotierung wird auf 100 % normiert und die Ion-Ratios der Proben relativ dazu angegeben.

Nach den Vorgaben der SANTE-Leitlinie sollte die Abweichung einer Dotierung vom Standard nicht mehr als ± 30 % betragen. Für die Berechnung der Ion-Ratio sind mindestens zwei Massenübergänge pro Analyt erforderlich. Da Matrixeffekte oder eine unzureichende Signalqualität die Ion-Ratio verfälschen können, sollte sie stets im Zusammenhang mit weiteren Identifikationskriterien bewertet werden.^{30,31}

²⁹ (Dr. Gross 2019, 119).

³⁰ (SANTE 2021, 20).

³¹ (SANTE 2021, 12).

3 Validierungskriterien Leitgrößen zur Methodenanpassung

3.1 Richtigkeit einer Messung

Die Richtigkeit einer analytischen Methode beschreibt, inwieweit die gemessenen Werte mit dem tatsächlichen oder erwarteten Gehalt der Analytik übereinstimmen. Sie wird im Rahmen der Validierung durch die Wiederfindung (WDF) representiert. Diese gibt das Verhältnis des in einer Probe gemessenen Analyten bezogen auf den dotierten Gehalt an.

Gemäß der SANTE-Leitlinie gelten Wiederfindungen im Bereich von 70 % bis 120 % als akzeptabel. Werte außerhalb dieses Bereichs deuten auf systematische Verzerrungen oder unzureichende methodische Kontrolle hin und erfordern Veränderung des Clean-Ups siehe (2.1) bei Verlusten oder beispielsweise Verdünnung zur Verringerung des Matrixgehalts bei Matrixstörungen.³²

$$WDF = \frac{C_{AoI,mess}}{C_{AoI,soll}} \quad [\quad 5 \quad]$$

3.2 Präzision und Reproduzierbarkeit

Die Präzision einer analytischen Methode beschreibt, wie gut wiederholte Messungen unter vergleichbaren Bedingungen übereinstimmen. Sie wird als relative Standardabweichung (RSD) angegeben, die sich aus der Standardabweichung (s) im Verhältnis zu \overline{WDF} der Messreihe berechnet.

Je kleiner die RSD, desto präziser und damit auch reproduzierbarer ist die Methode. Für die Dotierungen sollte die RSD der WDF um nicht mehr als $\pm 20\%$ vom Mittelwert des Dotierniveaus abweichen.³³

$$RSD_{WDF} = \frac{s}{\overline{WDF}} = \frac{\sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (WDF_i - \overline{WDF})^2}}{\overline{WDF}} = \frac{STABW.S()}{MITTELWERT()} \quad [\quad 6 \quad]$$

³² (SANTE 2021, 19–20).

³³ (Barwick et al. 2014, 33).

3.2.1 Empfindlichkeit

Die Messempfindlichkeit beschreibt, wie stark die Detektorantwort auf Änderungen der Analytenkonzentration reagiert. In der Chromatographie ist für die Identifikation eines Zielanalyten entscheidend, dass der Peak deutlich aus dem allgemeinen Messrauschen hervorsticht, wodurch die Peakhöhe an praktischer Bedeutung gewinnt.

Im Rahmen dieser Untersuchung wird der Begriff der Empfindlichkeit um die Signal-to-Noise Ratio (SNR) erweitert und teilweise synonym verwendet. Die SNR ist besonders nützlich, wenn das Signal bei bekannten Konzentrationen auf das Niveau der Bestimmungsgrenze skaliert wird, da sich dadurch die Bestimmungsgrenze abschätzen lässt.

Sie wird definiert als Verhältnis des analytischen Signals eines Zielanalyten zum Hintergrundrauschen außerhalb des Peaks. Das Rauschen umfasst sowohl zufällige Schwankungen des Detektorsignals als auch chemisch bedingte Störungen, etwa durch Matrixbestandteile oder unvollständig getrennte Substanzen.

Zur Berechnung der SNR wurde der Peak-to-Peak-Algorithmus mit der Signaldefinition „Höhe“ angewendet. Die Rauschbereiche lagen zwei bis fünf Sekunden vor und nach dem Peak und hatten jeweils eine Dauer von 60 Sekunden, um eine repräsentative Abschätzung des Rauschpegels zu gewährleisten. Bei nachfolgenden Peaks mit identischem Massenübergang wurde der Rauschbereich entsprechend verkürzt.

Bei allgemein niedrigem Rauschen führt die Skalierung zufälliger Schwankungen zu verzerrten Ergebnissen, sodass die SNR als Maß für die Empfindlichkeitssteigerung von Lösemittelstandards nur eingeschränkt aussagekräftig ist. Ebenso bewirkt eine Erniedrigung der Basislinie bei gleichzeitig überproportionalem Signalverlust keine tatsächliche Empfindlichkeitssteigerung. Daher ist die Entwicklung der SNR stets im Zusammenhang mit der Signalfäche zu beurteilen und im Versuch nur bei Matrixstandards angewandt worden.³⁴

³⁴ (Matissek und Fischer 2021, 70–77).

3.3 Linearität, Arbeitsbereich

Im Rahmen der Validierung wird der Arbeitsbereich der Methode definiert. Er umfasst den Konzentrationsbereich, in dem die Leistungsfähigkeit der Methode nachgewiesen ist. Nach oben begrenzt das Ende des linearen Zusammenhangs zwischen Analytenkonzentration und Detektorsignal diesen Bereich, nach unten vor allem Signalrauschen und Matrixunterdrückungseffekte.

Die günstigste Beziehung zwischen Analyt und Messsignal ist linear und lässt sich innerhalb eines bestimmten Konzentrationsbereichs häufig als solche darstellen. Die Linearität wird durch eine Regressionsanalyse gemessener Kalibrierpunkte überprüft, die in Matrix und in Konzentrationen angesetzt sind. Aus den Punkten wird eine Regressionsgerade berechnet, deren Abweichung zwischen rückgerechneten und angesetzten Konzentrationen bewertet wird.

3.3.1 Regressionsanalyse

Die Kalibrierpunkte des Arbeitsbereichs werden in der Regel durch eine lineare Regression beschrieben, sofern kein anderer Zusammenhang erkennbar ist. Die Regressionsgerade wird durch die Steigung die die Empfindlichkeit der Methode angibt, und den Achsenabschnitt der Matrixeffekte widerspiegelt, charakterisiert. Beide Parameter werden nach der Methode der kleinsten Quadrate berechnet, die die Summe der quadrierten Abweichungen zwischen gemessenen und modellierten Werten minimiert.³⁵

$$a_1 = \frac{n \cdot \sum(C_i \cdot RR_i) - \sum C_i \cdot \sum RR_i}{n \cdot \sum(C_i^2) - \sum(C_i)^2} = \text{STEIGUNG}() \quad [\quad 7 \quad]$$

$$a_0 = \overline{RR} - a_1 \cdot (\bar{C}) = \text{ACHSENABSCHNITT}() \quad [\quad 8 \quad]$$

³⁵ (Barwick et al. 2014, 28–30).

Insbesondere bei weiten Arbeitsbereichen führen Abweichungen in höheren Konzentrationsbereichen typischerweise zu Verzerrungen der Gehalte und damit zu inakzeptablen, systematisch abweichenden Gehalten siehe (3.1). Wenn sich die Abweichung zwischen berechneter und erwarteter Konzentration heteroskedastisch verhält, werden die Messpunkte entsprechend gewichtet. Gewichtete lineare Regressionen entstehen, indem die unabhängigen Konzentrationswerte mit einem passenden Gewicht (ω) multipliziert werden, welches eine Funktion der Konzentration ist: $\omega_i := C^n$ mit $n \in \mathbb{R}$. Die gewichteten Koeffizienten werden über den folgenden Zusammenhang bestimmt.^{36,37}

$$a_1 = \frac{\sum(\omega_i \cdot C_i \cdot RR_i) - \frac{\sum(\omega_i \cdot C_i) \cdot \sum(\omega_i \cdot RR_i)}{\sum \omega_i}}{\sum \omega_i \cdot C_i^2 - \frac{\sum(\omega_i \cdot C_i)^2}{\sum \omega_i}} \quad [\quad 9 \quad]$$

$$a_0 = \frac{\sum(\omega_i \cdot RR_i) - a_1 \cdot \sum(\omega_i \cdot C_i)}{\sum \omega_i} \quad [\quad 10 \quad]$$

Die Berechnung rückgerechneter Gehalte erfolgt mithilfe der ermittelten Regressionskoeffizienten (Formel 7 bis Formel 9). Durch Umstellung der linearen Funktion wird ein Ausdruck abgeleitet, der die Bestimmung der Analytkonzentration in Abhängigkeit von der RR des Analyten ermöglicht.³⁸

$$C_{\text{calc}}(RR) = \frac{RR - a_0}{a_1} \quad [\quad 11 \quad]$$

Der lineare Arbeitsbereich (AB) der Methode zur Quantifizierung der untersuchten Analyten wird nach der SANTE-Leitlinie als der Konzentrationsbereich der Kalibriergeraden definiert, in dem die Abweichungen der experimentell gemessenen relativen Residuen (rrel) der Standards um nicht mehr als $\pm 20\%$ von den über die Regressionsanalyse bestimmten Gehalten abweichen.³⁹

$$r_{\text{rel}} = \frac{C_{\text{STD}} - C_{\text{calc}}}{C_{\text{calc}}} \quad [\quad 12 \quad]$$

³⁶ (Chapra und Canale 2015, 460).

³⁷ (Stocker und Steinke 2017, 155–164).

³⁸ (Barwick et al. 2014, 29).

³⁹ (SANTE 2021, 44).

3.3.2 Ausreißer nach Grubbs

Vor der Regressionsanalyse werden die Messreihen von Ausreißern bereinigt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit für den Ausschluss eines Werts beträgt 5 %. Der Test bildet das arithmetische Mittel der relativen Abweichungen in Bezug auf die größten Abweichungen und die Standardabweichung der Messreihe ab. Damit ein Wert als gültig eingestuft wird, muss die Prüfgröße kleiner sein als der zugehörige Tabellenvergleichswert. Der verwendete Ausreißertest erfolgt nach dem Verfahren nach Grubbs.⁴⁰

$$\text{Prüfgröße} = \frac{|\bar{r}_{\text{rel}} - r_{\text{relExtrema}}|}{s} \quad [\quad 13 \quad]$$

3.4 Bestimmungsgrenze der Methode und Spezifität

Die BG definiert den kleinsten validiert quantifizierbaren Gehalt. Nach SANTE-Leitlinie dürfen in Proben ohne Analyten höchstens 30 % der BG als Störung gleichzeitig eluieren. Zur Kontrolle werden ACN-, Labor- und Matrixblindwerte geprüft. Die BG entspricht dem niedrigsten Gehalt, der unter Berücksichtigung der zuvor beschriebenen Kenngrößen innerhalb der festgelegten Kriterien liegt.⁴¹

3.4.1 Methodenfortschritt Gain

Die Entwicklung der finalen Messmethode umfasst mehrere Änderungen und erfolgt über verschiedene Methodenversionen. Deren Einfluss auf Zielgrößen wie Signalfäche oder SNR wird als Gain bezeichnet. Dieser Wert quantifiziert die relative Änderung einer Größe im Vergleich zur Referenzmethode. Ein positiver Gain zeigt eine Zunahme, ein negativer Wert einen Verlust der Ausgangsgröße an.

$$\text{Gain} = \frac{x_{\text{neu}}}{x_{\text{Referenz}}} - 1 \quad [\quad 14 \quad]$$

⁴⁰ (Matissek und Fischer 2021, 70–75).

⁴¹ (SANTE 2021, 20).

3.5 Messunsicherheit der Analytik

Die Messunsicherheit (u) des Gehalts von Validierungsproben wird aus den kombinierten Unsicherheiten der Präzision (u_P) und der Richtigkeit (u_R) berechnet.

$$u = \sqrt{u_P^2 + u_R^2} \quad [\quad 15 \quad]$$

Der Term u_P berücksichtigt die quadratischen Abweichungen im Verhältnis zum Mittelwert sowie konstante Anteile für Volumen und Konzentration. Die Unsicherheit u_R wird als Variationskoeffizient aus dem Mittelwert der Einzelwiederfindungen und deren Standardabweichung ermittelt. Für die erweiterte Unsicherheit (U) wird ein Erweiterungsfaktor von zwei genutzt.⁴²

$$U \cong 2 \cdot u \quad [\quad 16 \quad]$$

Gemäß ISO/IEC 17025 ist die Angabe der erweiterten Messunsicherheit verpflichtend. Nach SANTE darf U nicht größer als 50 % des Messwerts sein. Sie beschreibt den Bereich, in dem der wahre Wert eines Rückstandsbefundes mit einer festgelegten Wahrscheinlichkeit (Signifikanzniveau 95 %) liegt. Überschreitet die Messunsicherheit den Schwellenwert, kann sie durch Wiederfindungsfaktoren korrigiert werden.

Dabei ist zu berücksichtigen, dass für die Validierung dotierte Proben verwendet werden, die sich in Zusammensetzung und Extraktionsgrad von Rückständen vom Vergleichsmaterial unterscheiden können.^{43,44}

3.6 Vorgehen bei manueller Datenbearbeitung

Die Integration der Signalpeaks in den Chromatogrammen erfolgt überwiegend automatisiert mit dem Integrationsalgorithmus „General“. Werden Peaks nicht oder nur teilweise erkannt oder Störungen mitintegriert, erfolgt eine manuelle Nachintegration. Dabei wird der Integrationsbereich einheitlich vom sichtbaren Beginn des Peaks auf Basislinienniveau bis zu dessen Ende auf der gegenüberliegenden Basislinienhöhe definiert.

⁴² (Matissek und Fischer 2021, 75–77).

⁴³ (SANTE 2021, 15).

⁴⁴ (SANTE 2021, 32).

4 Entwicklung der MRM-Methode

Im Rahmen MRM-Methodenentwicklung werden zehn Zielanalyten (Tabelle 1) in einer statischen MRM-Ausgangsmethode zusammengeführt und für die Anwendung in Hopfenmatrix unter Verwendung der APCI-Ionisierung optimiert.

Ziel ist es, eine LC-APCI-MS/MS-Parametereinstellung zu entwickeln, die auf BG-Niveau eine ausreichende Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit für die Zielanalyten gewährleistet und nach den SANTE-Kriterien validiert werden kann. Die Einstellungen werden dabei so weit wie möglich an die spezifischen Eigenschaften der Analyten angepasst. Vorrangig werden Parameter optimiert, die den größten Einfluss oder vergleichbar viele Abhängigkeiten auf die Gesamtanalytik aufweisen.

Das methodische Vorgehen erfolgt in mehreren Schritten. Zunächst wird das Gradientenprofil angepasst. Anschließend werden Flussrate, Vaporizer-Temperatur und Nebulizer-Druck gemeinsam optimiert. Die Anpassung der Gastemperatur erfolgt erst danach. Fortfolgend werden die Analyten in mentale Gruppen eingeteilt, die später in gemeinsamen Messfenstern zusammengefasst werden sollen. Diese Gruppierung dient dazu, die Optimierung so auszurichten, dass alle Analyten einer zukünftigen Gruppe aufeinander abgestimmt angepasst werden können. Die Bewertung der Anpassungen stützt sich überwiegend auf die Messung der Signalflächen sowie den Daraus bestimmten SNR oder ME werten. Diese Kriterien bilden die Grundlage für methodische Entscheidungen, während die detaillierten Berechnungen in den folgenden Abschnitten erläutert werden.

Die Auswertung der Messdaten erfolgte teilweise zeitlich versetzt, da reservierte Sequenzfenster sowie parallel durchgeführte Versuchsteile eine unmittelbare Auswertung verhinderten. Die Optimierungen wurden nach Anpassung der Vorquelleinstellungen zunächst separat dokumentiert und anschließend modular in die konsolidierte MRM-Methode integriert. Die Zusammenführung der einzelnen Anpassungen in einem Schritt war eine Folge der hohen Systemauslastung und nicht methodisch bedingt.

4.1 Gradienten Optimierung (V0607→V1107)

Die Bewertung der Gradientenprofile basiert auf den bestimmten ME sowie den relativen Änderungen der SNR gegenüber der Ausgangsmethode V0607. Der Analytgehalt im Hopfenextrakt beträgt 1 mg/kg. Die untersuchten Gradientenprofile sind eingestellt auf 7,7 %/min (G09), 7,1 %/min (V0607), 6,7 %/min (G10), 5,3 %/min (G12), 4,3 %/min (G14) und 3,7 %/min (G16). Die Analyten Phthalimid und THPI eluieren außerhalb des Einflussbereichs des Gradienten und werden daher nicht berücksichtigt. Rohdaten des Versuchsteils sind im Anhang unter (II) dokumentiert.

4.1.1 Gradienten Ergebnisse

Die in der Ausgangsmethode unempfindlichsten Analyten MilbemectinA3, MilbemectinA4, Folpet und Fenpyroximat zeigten ausgeprägte ME mit Suppressionen von etwa -25 % bis -50 %. Gleichzeitig lag die SNR dieser Substanzen unterhalb von 20, für MilbemectinA4 knapp bei 30 (Tabelle 2).

Die unter den Testgradienten besonders hervorzuhebenden Profile waren G14 und G16, die sich insgesamt als günstig erwiesen (Tabelle 3). Unter G16 wuchs die Empfindlichkeit von MilbemectinA3 um +41 %, begleitet von einer moderaten Signalsuppression von -13 %.

Unter G14 blieb die Empfindlichkeit dieses kritischen Analyten unverändert, jedoch bei leicht schwächerer Suppression. Fenpyroximat reagierte unter G14 mit der höchsten beobachteten Empfindlichkeitssteigerung von +255 %, während G16 einen Zuwachs von +84 % bewirkte, allerdings bei anhaltend starker Suppression von -39 %. Hexythiazox zeigte unter G14 eine Verbesserung der Empfindlichkeit um +99 %, während G16 lediglich +7 % erreichte. MilbemectinA4 blieb über alle Profile hinweg stabil. Acequinocyl und Diphenylamin reagierten robust mit nur geringen Änderungen in Empfindlichkeit und ME.

Tabelle 2 Gemessene Matrixeffekte (ME) und Signal-to-Noise Ratios (SNR) für die Methode V0607 bei einer Analytenkonzentration von 1 mg/kg in einem dotierten Matrixstandard. Gradientensteigung: 7,1 %/min.

Compound Name	ME V0607 [%]	SNR V060725
Acequinocyl	-6	217
Diphenylamin	+61	1347
Fenpyroximat	-44	13
Hexythiazox	+1	66
MilbemectinA3	-47	7
MilbemectinA4	-26	29
Captan	-12	79
Folpet	-38	7

Tabelle 3 Matrixeffekte und relative Änderung der Signal-to-Noise Ratio (SNRGain) für verschiedene Gradientenprofile im Vergleich zur Ausgangsmethode V0607, gemessen bei einer Analytenkonzentration von 1 mg/kg in Matrixstandards.

Compound Name	ME G09 [%]	SNRGain G09 [%]	ME G10 [%]	SNRGain G10 [%]	ME G12 [%]	SNRGain G12 [%]	ME G14 [%]	SNRGain G14 [%]	ME G16 [%]	SNRGain G16 [%]
Acequinocyl	-10	-38	-10	+20	+2	-16	+7	+2	+8	+4
Diphenylamin	+20	-1	+74	+14	+49	-26	+97	-7	+73	+7
Fenpyroximat	+20	-18	+30	+189	-19	+99	+31	+255	-39	+84
Hexythiazox	-40	-18	-16	-4	+34	+88	+24	+99	+30	+7
MilbemectinA3	-22	+30	-40	+31	-35	+53	-33	0	-13	+41
MilbemectinA4	-11	-24	-16	+3	-8	+3	-7	+2	-6	-8
Captan	-6	+2	-12	-30	+8	-22	+2	+58	+4	-54
Folpet	-55	-77	-35	+47	-24	+55	-7	+66	-8	+15

4.1.2 Gradienten Einstellungswahl

Die Auswahl des Gradientenprofils fiel auf G16 (3,7 %/min), da im Vergleich zu den anderen getesteten Gradienten eine insgesamt ausgewogene analytische Performance in Bezug auf die Leitgrößen ME und SNR erreicht wurde, mit besonders günstigen Ergebnissen für den unempfindlichsten Analyten MilbemectinA3, die in Abgrenzung zu G14 nicht erzielt werden konnten. Die mit dem Gradienten G16 ausgestattete Methode erhielt nachfolgend die Bezeichnung V1107.

4.1.3 Gradienten Diskussion

Es bleibt zu beachten, dass ME sortenabhängig variieren können. Die hier verwendete Hopfenmatrix stellte eine vereinfachte Modellierung dar; bei anderen Sorten sind abweichende Effekte möglich.

Unter den getesteten Profilen erwies sich G14 ebenfalls als leistungsfähig, insbesondere durch deutliche SNR-Gewinne bei Fenpyroximat und Hexythiazox. Dennoch bot G16 unter den gegebenen Bedingungen den besten Kompromiss aus Empfindlichkeit, Stabilität und Matrixkompatibilität, insbesondere für MilbemectinA3, und wurde daher als neues Standardprofil festgelegt.

4.2 Flussrate Vaporizer und Nebulizer Optimierung (V1107→V1407)

Hinweis: Einige in diesem Kapitel, den Vaporizer betreffenden dargestellten Einstellungen wurden im Zuge der finalen Methodenentwicklung (V1508B) angepasst siehe (4.2.3).

Im Rahmen der Methodenentwicklung wird eine gemeinsame Flussrate für alle Analyten festgelegt, da das eingesetzte LC-APCI-MS/MS-System keine segmentierte Flusssteuerung erlaubt. Ziel des Teilversuchs ist es, die Geräteeinstellungen Flussrate, Nebulizer-Druck und Vaporizer-Temperatur so festzulegen, dass für alle Zielanalyten ein möglichst hohes Detektorsignal erreicht wird.

Untersucht werden Flussraten von 0,35 mL/min bis 0,72 mL/min, Nebulizer-Drucke zwischen 20 psi und 44 psi sowie Vaporizer-Temperaturen von 220 °C bis 490 °C. Die Bewertung erfolgt anhand der Signalflächen eines Lösemittelstandards mit einer Konzentration von 0,025 ng/μL in ACN. Zur Unterstützung der Parameterauswahl werden farbkodierte vierdimensionale Plots und daraus abgeleitete Ebenenansichten eingesetzt. Rohdaten des Versuchsteils sind im Anhang unter (III) dokumentiert.

4.2.1 Flussrate Nebulizer Vaporizer Ergebnisse

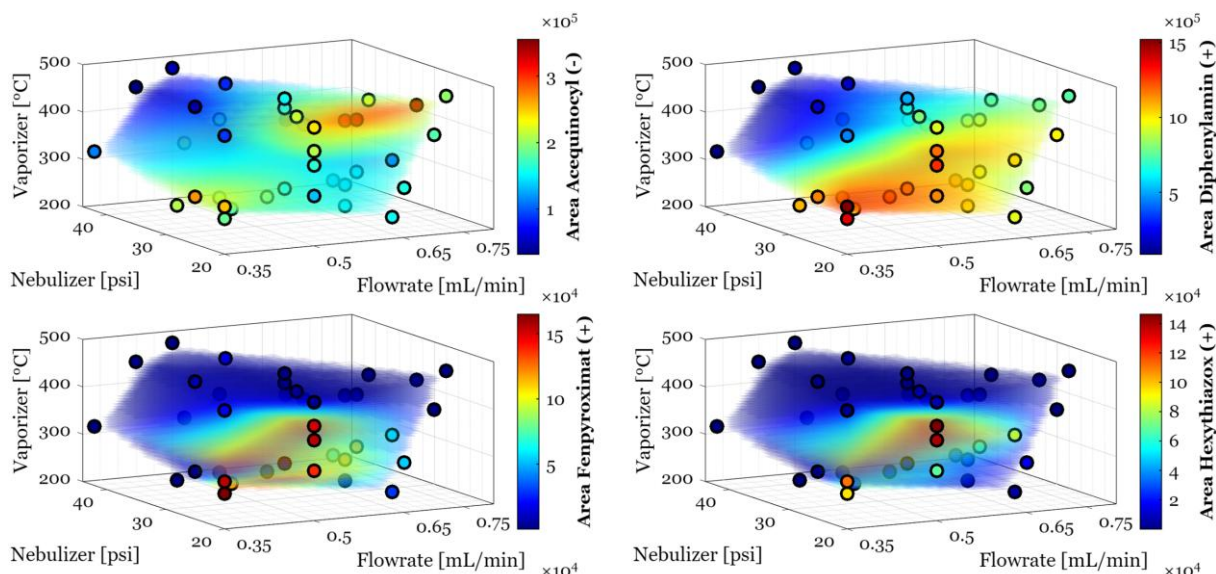


Abbildung 4 Visualisierung der gemessenen Detektorsignale (Area) für Acequinocyl, Diphenylamin, Fenpyroximat und Hexythiazox in Abhängigkeit von variierenden Geräteeinstellungen am Agilent 6495 TQMS (Methode V1407). Die Raumachsen stellen den Nebulizer-Druck (psi), die Flussrate (mL/min) und die Vaporizer-Temperatur (°C) dar. Die Area eines Lösemittelstandards (0,025 ng/μL in ACN) wurde durch einen kontinuierlichen Farbverlauf dargestellt, wobei höhere Signalflächen wärmeren Farben entsprechen. Zur Darstellung von Trends im Parameterraum wurde zwischen den diskreten Messpunkten eine Natural-Neighbor-Interpolation angewendet. Die Farbbalken rechts neben den Plots zeigen die Signalwerte sowie die zugehörigen Analytenamen.

Acequinocyl zeigte über weite Teile des untersuchten Bereichs akzeptable Signalflächen im sechsstelligen Bereich. Besonders hohe Signalstärken traten bei niedrigem Nebulizer-Druck in Kombination mit erhöhter Vaporizer-Temperatur und mittleren bis hohen Flussraten auf. Diphenylamin wies ebenfalls über große Teile des Abtastbereichs eine stabile Signalstärke mit Signalflächen im oberen sechs- bis unteren siebenstelligen Bereich auf. Eine Erhöhung des Nebulizer-Drucks führte jedoch zu einer erkennbaren Reduktion der Signalfläche (Abbildung 4).

Fenpyroximat und Hexythiazox lieferten dagegen nur in engen Einstellbereichen ausreichende Signalstärken, wobei die Maximalwerte im unteren sechsstelligen Bereich lagen. Messungen mit für die Bestimmungsgrenze ausreichender Signalfläche waren nahezu ausschließlich bei einer Flussrate von 0,5 mL/min und niedrigen Vaporizer-Temperaturen möglich. Daher wurde von Einstellungen abweichend von einer Flussrate von 0,5 mL/min abgesehen (Abbildung 4).

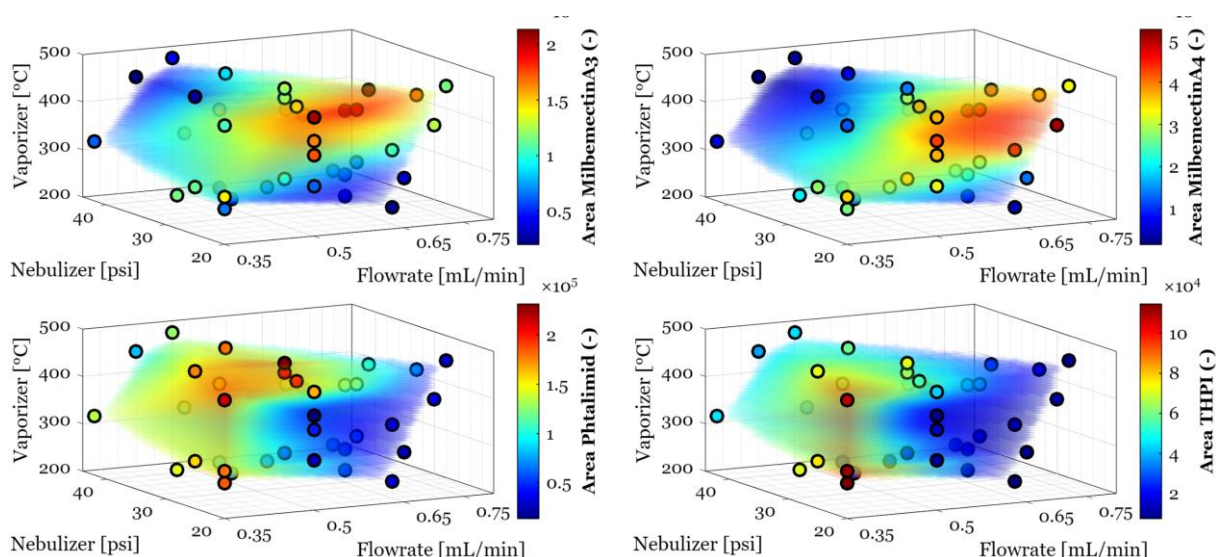


Abbildung 5 Visualisierung der gemessenen Detektorsignale (Area) für Milbemectin A3, Milbemectin A4, Phthalimid und THPI in Abhängigkeit von den Geräteeinstellungen am Agilent 6495 TQMS (Methode V1407). Die Raumachsen repräsentieren den Nebulizer-Druck (psi), die Flussrate (mL/min) und die Vaporizer-Temperatur (°C). Die Signalfläche eines Lösemittelstandards (0,025 ng/μL in Acetonitril) wurde durch einen kontinuierlichen Farbverlauf dargestellt, wobei größere Signalflächen wärmeren Farben entsprachen. Zwischen den diskreten Messpunkten erfolgte eine Natural-Neighbor-Interpolation, um Trends im Parameterraum zu verdeutlichen. Die Farbbalken rechts neben den Plots zeigen die Signalwerte und zugehörigen Analytenamen.

MilbemectineA3 und MilbemectinA4 zeigten ab einer Flussrate von 0,5 mL/min in Kombination mit moderaten bis hohen Vaporizer-Temperaturen ein Signaloptimum, das zu höheren Flussraten tendierte (Abbildung 5). Im Gegensatz dazu verhielten sich THPI und Phthalimid gegenteilig: Ihr Optimum lag bei einer Flussrate von 0,35 mL/min, und mit zunehmender Flussrate traten verstärkte Signalverluste auf. Dieser Effekt ließ sich durch eine Erhöhung der Vaporizer-Temperatur moderat kompensieren.

4.2.2 Flussrate Nebulizer Vaporizer Einstellungswahl

Die Gesamtschau der Ergebnisse aus (Abbildung 4 und Abbildung 5) zeigte, dass die Ebene bei einer Flussrate von 0,5 mL/min als einzige ausreichend hohe Signalflächen für Fenpyroximat und Hexythiazox bot, um das Erreichen des BG-Niveaus für diese Analyten zu ermöglichen. Gleichzeitig stellte sie einen Kompromiss für die Milbemectine dar, deren Anforderungen denjenigen von THPI und Phthalimid entgegenstanden. Diese Einstellung führte erwartungsgemäß zu einer Reduktion der Signalfläche bei THPI und Phthalimid, jedoch konnten durch gezielte Anpassungen des Nebulizer-Drucks und der Vaporizer-Temperatur kompensierende Effekte erzielt werden. Um eine Verschlechterung der Messung von Hexythiazox und Fenpyroximat bei erhöhter Vaporizer-Temperatur zu vermeiden, wurde zunächst ein Temperaturgradient in die Methode integriert.

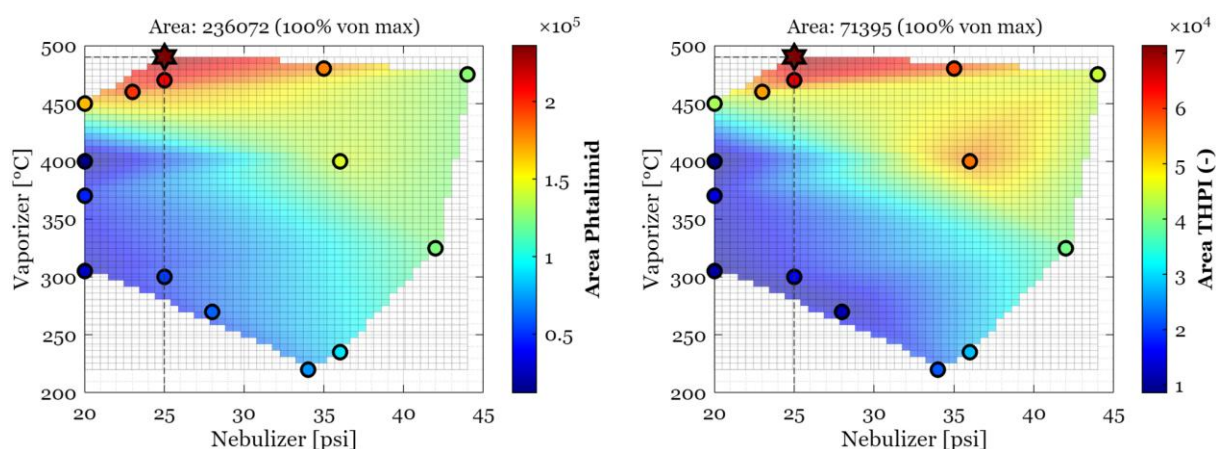


Abbildung 6 Ebene der gemessenen Area für die Analyten Phthalimid und THPI (Methode V1107) bei einer Flussrate von 0,5 mL/min aus (Abbildung 5), in Abhängigkeit vom Nebulizer-Druck (psi) und der Vaporizer-Temperatur (°C) in einem Lösemittelstandard (0,025 ng/μL in Acetonitril). Die Messwerte sind farbcodiert dargestellt; die Zwischenbereiche wurden mithilfe der Natural-Neighbor-Interpolation eingefärbt, um Trends sichtbar zu machen und die Auswahl geeigneter Einstellwerte zu unterstützen. Die Farbbalken rechts neben den Plots zeigen die Signalwerte sowie die zugehörigen Analyten an.

Gruppe1 umfasste die früh eluierenden Analyten THPI (2,5 min) und Phthalimid (2,9 min). Für diese Gruppe wurden zunächst eine Vaporizer-Temperatur von 490 °C und ein Nebulizer-Druck von 25 psi als günstig ermittelt (Abbildung 6). *In der finalen Methode V1508B wurde die Vaporizer-Temperatur jedoch auf 420 °C festgelegt.*

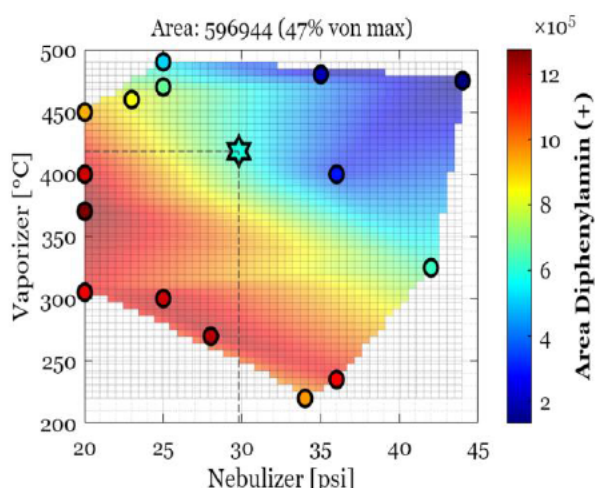


Abbildung 7 Ebene der gemessenen Area von Diphenylamin (Methode V1107) bei einer Flussrate von 0,5 mL/min aus (Abbildung 4), in Abhängigkeit vom Nebulizer-Druck (psi) und der Vaporizer-Temperatur (°C) in einem Lösemittelstandard (0,025 ng/μL in Acetonitril). Die Messwerte sind farbcodiert dargestellt; die Zwischenbereiche wurden mithilfe der Natural-Neighbor-Interpolation eingefärbt, um Trends sichtbar zu machen und die Auswahl geeigneter Einstellwerte zu unterstützen. Die Farbbalken rechts neben dem Plot zeigen die Signalwerte sowie den zugehörigen Analyten an.

Gruppe2 umfasste die Analyten Diphenylamin (6,0 min), Captan (6,1 min) und Folpet (7,5 min), bewertet über THPI und Phthalimid. Im Gegensatz zu THPI und Phthalimid zeigte Diphenylamin eine Präferenz für niedrigere Vaporizer-Temperaturen (Abbildung 7). Aufgrund der ausreichend hohen Signalfäche von Diphenylamin und der erwarteten Detektion von Captan und Folpet innerhalb desselben Messfensters wurde eine Vaporizer-Temperatur von 420 °C bei einem Nebulizer-Druck von 30 psi gewählt.

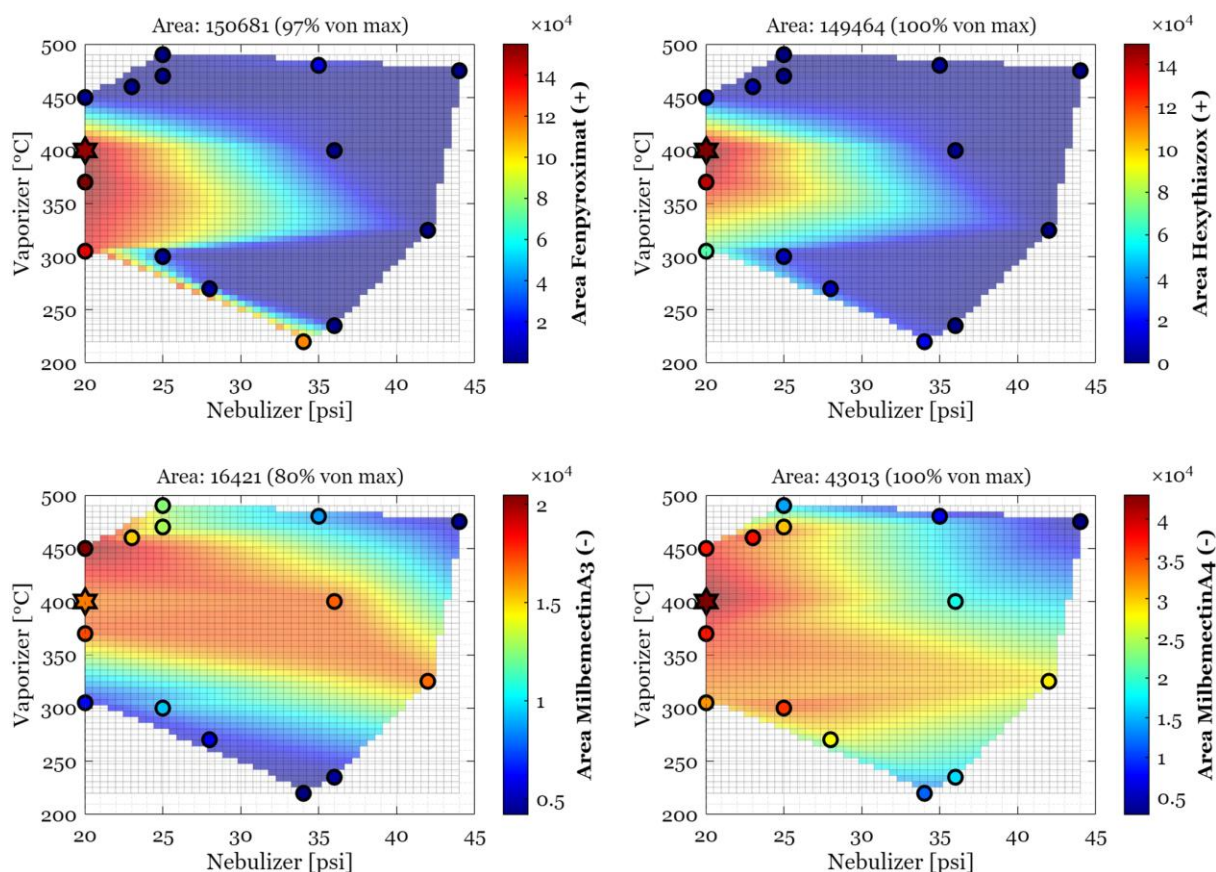


Abbildung 8 Ebene der gemessenen Area für die Analyten Fenpyroximat, Hexythiazox, MilbemectinA3 und MilbemectinA4 (Methode V1107) bei einer Flussrate von 0,5 mL/min aus (Abbildung 4 und Abbildung 5), in Abhängigkeit vom Nebulizer-Druck (psi) und der Vaporizer-Temperatur (°C) in einem Lösemittelstandard (0,025 ng/μL in Acetonitril). Die Messwerte sind farbcodiert dargestellt; die Zwischenbereiche wurden mithilfe der Natural-Neighbor-Interpolation eingefärbt, um Trends sichtbar zu machen und die Auswahl geeigneter Einstellwerte zu unterstützen. Die Farbbalken rechts neben den Plots zeigen die Signalwerte sowie den zugehörigen Analyten an.

Gruppe3 umfasste die Analyten Hexythiazox (11,0 min), Fenpyroximat (11,8 min), MilbemectinA3 (11,5 min) und MilbemectinA4 (11,9 min). Hexythiazox und Fenpyroximat zeigten eine geringe Toleranz gegenüber der Vaporizer-Temperatur mit einem Bereich günstiger Einstellwerte von etwa 300 °C bis 430 °C (Abbildung 8). Beide verloren bei steigendem Nebulizer-Druck an Signalfäche und bevorzugten niedrige Werte um 20 psi. MilbemectinA3 wies dagegen ein breites Temperaturband auf, ähnlich MilbemectinA4, das jedoch bei höheren Nebulizer-Drucken an Signalfäche einbüßte. Für diese Gruppe wurden eine Vaporizer-Temperatur von 400 °C und ein Nebulizer-Druck von 20 psi gewählt. *In der finalen Methode V1508B wurde die Vaporizer-Temperatur auf 420 °C festgelegt.*

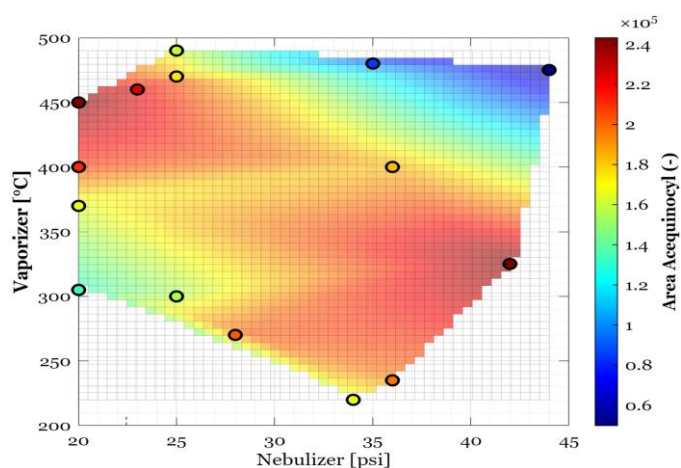


Abbildung 9 Ebene der gemessenen Area von Acequinocyl (Methode V1107) bei einer Flussrate von 0,5 mL/min aus (Abbildung 5), in Abhängigkeit vom Nebulizer-Druck (psi) und der Vaporizer-Temperatur (°C) in einem Lösemittelstandard (0,025 ng/ μ L in Acetonitril). Die Messwerte sind farbcodiert dargestellt; die Zwischenbereiche wurden mithilfe der Natural-Neighbor-Interpolation eingefärbt, um Trends sichtbar zu machen und die Auswahl geeigneter Einstellwerte zu unterstützen. Die Farbbalken rechts neben dem Plot zeigen die Signalwerte sowie den zugehörigen Analyten an.

Gruppe4 umfasste ausschließlich den Analyt Acequinocyl (13,4 min). Bei einer festgelegten Flussrate von 0,5 mL/min eluierte Acequinocyl mit ausreichendem Abstand zu den zuvor detektierten Substanzen, sodass ein separates Messfenster sinnvoll definiert werden konnte. Der Analyt reagierte gegenüber Änderungen des Nebulizer-Drucks und der Vaporizer-Temperatur weitgehend tolerant, wodurch keine spezifischen Einschränkungen bei der Wahl der Einstellparameter erforderlich waren (Abbildung 9). Ein Nebulizer-Druck von 21 psi wurde festgelegt. Um unnötige

Temperaturschwankungen zwischen

aufeinander folgenden Messungen zu vermeiden, wurde die Vaporizer-Temperatur analog zur Gruppe1 auf 490 °C eingestellt. Die Methode wurde unter Berücksichtigung der NVF-Parameter als V1407 benannt. *In der finalen Methode V1508B wurde die Vaporizer-Temperatur jedoch auf 420 °C festgelegt.*

4.2.3 Flussrate Nebulizer Vaporizer Diskussion

Die festgelegte Flussrate von 0,5 mL/min führte zu einem Zielkonflikt zwischen den Anforderungen der früh eluierenden Analyten Phthalimid und THPI und den gegenüber niedrigen Flussraten empfindlichen Substanzen Hexythiazox und Fenpyroximat. Während Hexythiazox und Fenpyroximat bei 0,5 mL/min ihr Signaloikum erreichten, lag dieses für THPI und Phthalimid deutlich niedriger bei etwa 0,35 mL/min. Eine gezielte Anpassung des Nebulizer-Drucks und insbesondere der Vaporizer-Temperatur konnte diesen Effekt teilweise kompensieren, indem die Aerosoltrocknung verbessert wurde.

Die für Gruppe1 gewählte Vaporizer-Temperatur von 490 °C brachte jedoch zwei Herausforderungen mit sich: Zum einen erhöhte sich das Risiko thermischer Belastung, zum anderen reagierten Hexythiazox und Fenpyroximat empfindlich auf Temperaturen oberhalb von etwa 430 °C. Eine zunächst eingesetzte Methode mit Temperaturgradient zeigte zwar eine grundsätzlich gute Reproduzierbarkeit, war jedoch anfällig für zufällige Schwankungen und Einschwingeffekte am Regler, die die Robustheit der Messungen beeinträchtigten.

Der Ansatz eines Temperaturgradienten wurde daher verworfen. Stattdessen wurde eine konstante Vaporizer-Temperatur von 420 °C als Kompromiss gewählt, um eine effiziente Trocknung zu gewährleisten und gleichzeitig temperaturlabile Analyten zu schützen. Diese Änderung wurde ab Methode V1508B implementiert. Die final in der Methode V1508B verwendeten Einstellungen sind in (Tabelle 4) dargestellt.

Tabelle 4 In der Methode V1508B verwendete Einstellungen für Nebulizer-Druck (psi), Vaporizer-Temperatur (°C) und Flussrate (mL/min) für die einzelnen Analyten-Gruppen.

Gruppe	Nebulizer [psi]	Vaporizer [°C]	Flussrate [mL/min]
Gruppe1	25	420	0,5
Gruppe2	30	420	0,5
Gruppe3	20	420	0,5
Gruppe4	21	420	0,5

Die methodische Entscheidung, Captan und Folpet nicht direkt, sondern über THPI beziehungsweise Folpet zu untersuchen, erwies sich retrospektiv als fehlerhaft. Die gleichzeitige Verwendung eines Lösemittelstandards und die Bestimmung über ihre Abbauprodukte wurde zunächst als zulässige Vereinfachung betrachtet. Die kombinierte Messung der Flussrate verhinderte eine unabhängige Untersuchung matrixbedingter Störungen bei unterschiedlichen Retentionszeiten. Eine Korrekturmessung erfolgte nicht, da die Problematik zum Zeitpunkt der Durchführung nicht erkannt wurde.

4.3 Gastemperatur-Optimierung (Modul)

Die Methode V1407 wird im Rahmen der methodischen Weiterentwicklung um eine Optimierung der global gesteuerten Gastemperatur ergänzt. Untersucht werden Gastemperaturen im Bereich von 180 °C bis 280 °C. Die Bewertung erfolgt anhand der relativen Zuwächse der Signalflächen und der SNR-Werte eines Matrixstandards mit 0,5 mg/kg. Zur Unterstützung der Parameterauswahl werden die Ergebnisse in temperaturgruppierten Säulendiagrammen dargestellt. In der Ausgangsmethode eingestellt ist eine Gastemperatur von 250 °C. Die Rohdaten des Versuchsteils sind im Anhang unter (IV) dokumentiert.

4.3.1 Gastemperatur Ergebnisse

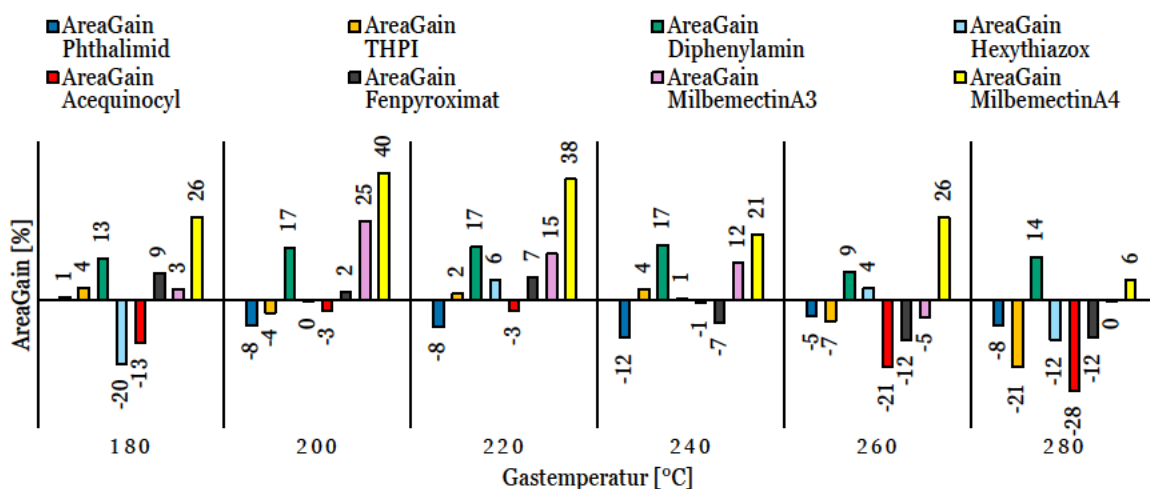


Abbildung 10 Gain der Signalfläche (AreaGain) in Abhängigkeit von der Gastemperatur für die Analyten Acequinocyl, Diphenylamin, Fenpyroximat, Hexythiazox, Milbemectin A3, Milbemectin A4, Phthalimid und THPI. Die Messungen erfolgten mit einem Matrixstandard von 0,5 mg/kg unter Anwendung der Methode V1407.

Phthalimid zeigte unter Berücksichtigung möglicher Schwankungen kaum Änderungen, ähnlich wie THPI, welches jedoch ab 260 °C deutlich negative Flächenentwicklungen aufwies. Hexythiazox zeigte in den Randbereichen der Gastemperaturen negative Entwicklungen, blieb jedoch zwischen 200 °C und 240 °C nahezu konstant. Die Signalfläche von Fenpyroximat nahm mit steigender Gastemperatur stetig ab. Signalzuwächse, traten hauptsächlich bei den Milbemectinen auf, die als einzige Analyten in relevantem Umfang positiv auf die Gastemperatur reagierten. Diese erreichten bei 200 °C den höchsten Zugewinn. Die für Diphenylamin beobachtete gleichmäßige Verbesserung über alle Temperaturen erscheint nicht plausibel (Abbildung 10).

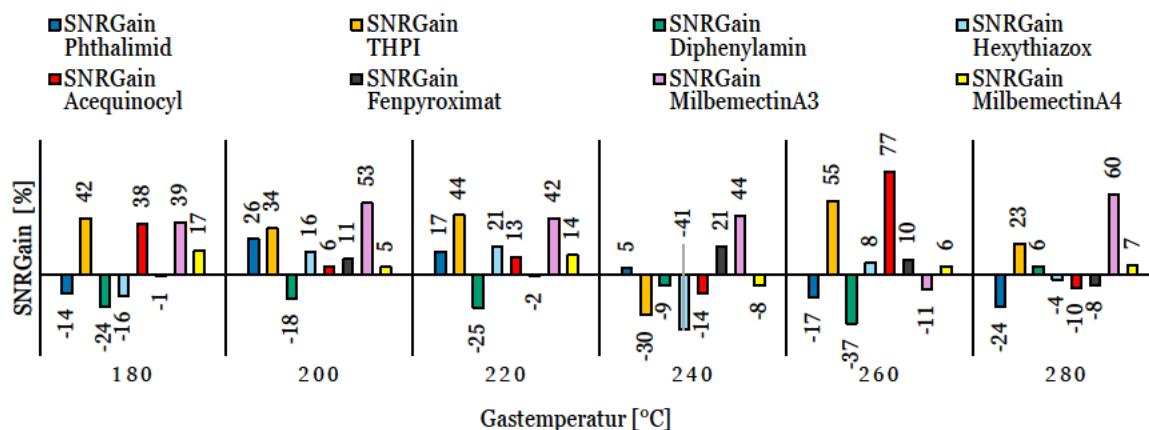


Abbildung 11 Gain der SNR (SNRGain) in Abhängigkeit von der Gastemperatur für die Analyten Acequinocyl, Diphenylamin, Fenpyroximat, Hexythiazox, MilbemectinA3, MilbemectinA4, Phthalimid und THPI. Die Messungen erfolgten mit einem Matrixstandard von 0,5 mg/kg unter Anwendung der Methode V1407.

Die Einstellung bei 200 °C wird im Folgenden beschrieben. Der SNRGain für MilbemectinA3 betrug +50 %. MilbemectinA4 zeigte hingegen bezogen auf die SNR kaum Veränderungen. Hexythiazox wies insgesamt eine erhöhte SNR bei nahezu unveränderter Signalfläche auf, ebenso wie Fenpyroximat. THPI und Phthalimid verzeichneten trotz geringer Flächenverluste einen leichten Anstieg der Empfindlichkeit (Abbildung 11).

4.3.2 Gastemperatur Einstellungswahl

Die Gastemperatur wurde auf 200 °C festgelegt, da MilbemectinA3 bei dieser Einstellung sowohl einen deutlichen Signalzuwachs als auch einen deutlichen SNRGain bezüglich MilbemectinA3 aufwies. Für die weniger empfindlichen Analyten ergaben sich insgesamt überwiegend vorteilhafte Bedingungen.

4.3.3 Gastemperatur Diskussion

Die bei steigenden Gastemperaturen abnehmenden Signalflächen für Phthalimid, insbesondere für THPI, waren unerwartet. Es wurde erwartet, dass eine höhere Gastemperatur eine schnellere Trocknung bewirkt und damit die Messbarkeit der in einer wasserreichen mobilen Phase befindlichen Analyten verbessert. Eine mögliche Ursache könnte in verbesserten Ionisierungseigenschaften von Matrixbestandteilen liegen, die bei höheren Gastemperaturen eine beeinträchtigende Wirkung entfalten.

4.4 Gasfluss Optimierung (Modul)

Die Flussrate des temperierten Gases in der APCI-Quelle beeinflusst die Trocknungseffizienz und damit die Ionisierung der Analyten.

Ziel des Teilversuches ist es, durch Variation des Gasstroms im Bereich von 11 L/min bis 20 L/min die Bedingungen für eine verbesserte Verdampfung der mobilen Phase zu optimieren. Als Leitgrößen dienen die relativen Zuwächse der Signalfäche und die SNR. Die Ausgangsgasflussrate beträgt 14 L/min (Methode V1407). Die Messungen basieren auf einem Matrixstandard mit einer Konzentration von 0,5 mg/kg. Der Gasfluss kann gruppenspezifisch eingestellt werden.

4.4.1 Gasfluss Ergebnisse

THPI und Phthalimid in Gruppe1 erreichten die höchsten Werte von AreaGain und SNRGain bei Gasflussraten zwischen 19 und 20 L/min (Tabelle 5). Gruppe2 zeigte für Diphenylamin ein entgegengesetztes Verhalten im Vergleich zu THPI (Captan) und Phthalimid (Folpet).

Tabelle 5 Relative Zuwächse der Signal-to-Noise Ratio (SNRGain) und der Signalfäche (AreaGain) im Vergleich zur Methode V1407. Dargestellt sind die Messergebnisse zur Anpassung des Gasflusses für die Analyten der Gruppen 1 und 2 unter Verwendung der Methode V1407. Die Messungen basieren auf einem Matrixstandard mit einer Konzentration von 0,5 mg/kg.

Gasfluss [L/min]	AreaGain Phthalimid (Folpet) [%]	SNRGain Phthalimid (Folpet) [%]	AreaGain THPI (Captan) [%]	SNRGain THPI (Captan) [%]	AreaGain Diphenylamin [%]	SNRGain Diphenylamin [%]
11	-20	-33	-32	-33	+36	-89
12	+25	-24	-4	-20	-6	-48
13	+33	-14	-2	-6	-9	-16
15	+14	+37	-16	+18	+6	+10
16	-5	+63	-25	+38	+5	+10
17	-5	+58	-19	+40	-13	+14
18	+39	+18	+6	+96	-19	-28
19	+41	+123	+28	+106	-12	+0
20	+18	+156	+31	+131	-35	+44

Während THPI und Phthalimid mit steigender Gasflussrate eine kontinuierliche Zunahme der Empfindlichkeit und der Signalfächen aufwiesen, nahm die Signalfäche von Diphenylamin bei höherem Gasstrom im Vergleich zur Ausgangsmethode ab, obwohl die SNR tendenziell anstieg (Tabelle 5).

Tabelle 6 Relative Zuwächse der Signal-to-Noise Ratio (SNRGain) und der Signalfläche (AreaGain) im Vergleich zur Methode V1407. Dargestellt sind die Messergebnisse zur Anpassung des Gasflusses für die Analyten der Gruppe3: Hexythiazox, Fenpyroximat, MilbemectinA3 und MilbemectinA4, Matrixstandard 0,5 mg/kg.

Gasfluss [L/min]	AreaGain Hexythia zox [%]	SNRGain Hexythia zox [%]	AreaGain Fenpyroxi mat [%]	SNRGain Fenpyroxi mat [%]	AreaGain Milbemecti nA3 [%]	SNRGain Milbemecti nA3 [%]	AreaGain Milbemecti nA4 [%]	SNRGain Milbemecti nA4 [%]
11	-47	-42	+52	+303	+46	+18	+43	+127
12	-33	-36	+8	-14	-33	-31	-29	-4
13	-14	+1	-15	-10	+1	-34	-15	+31
15	+10	+18	+3	-15	-19	-41	-11	+79
16	+31	+41	+12	+1	-38	-50	-20	+33
17	+48	+39	+8	+32	-62	-46	-49	+17
18	+20	-20	+4	+31	-85	-84	-73	+9
19	+22	+22	-6	+63	-92	-90	-87	-19
20	-37	-31	-2	+112	-95	-77	-93	-46

Hexythiazox zeigte insgesamt eine positive Reaktion auf steigende Gasflussraten und erreichte die höchsten Zuwächse der Signalfläche und SNR bei etwa 17 L/min. Fenpyroximat sowie die MilbemectineA3 und MilbemectinA4 erzielten ihre besten Ergebnisse bei niedrigen Gasflussraten um 11 L/min (Tabelle 6).

Tabelle 7 Relative Zuwächse der Signal-to-Noise Ratio (SNRGain) und der Signalfläche (AreaGain) im Vergleich zur Methode V1407. Dargestellt sind die Messergebnisse zur Anpassung des Gasflusses für Acequinocyl, Matrixstandard 0,5 mg/kg.

Gasfluss [L/min]	AreaGain Acequinocyl [%]	SNRGain Acequinocyl [%]
11	+103	+31
12	+10	+192
13	+17	+41
15	-15	+54
16	-61	+3
17	-73	+436
18	-89	+211
19	-96	+38
20	-97	+64

Acequinocyl wurde als einziger Analyt in einem separaten Messfenster Gruppe4 gemessen. Während die höchsten Signalzuwächse bei 11 L/min erreicht wurde, zeigte sich bei der SNR ein eher unsteter Trend (Tabelle 7).

4.4.2 Gasfluss Einstellungswahl

Die gewählten Einstellungen der Gasflussraten sind in (Tabelle 8) dargestellt. Für die Gruppe1 und Gruppe2 wurde ein optimaler Gasfluss von 19 L/min ermittelt. Für Gruppe3 wurde ein Kompromisswert von 13 L/min gewählt, um die stabile Empfindlichkeit von Hexythiazox bei mittleren Flussraten zu berücksichtigen, ohne die Milbemectine übermäßig zu beeinträchtigen. Für Gruppe4 wurde ein Gasfluss von 11 L/min bestimmt.

Tabelle 8 Finale Gasfluss-Einstellungen für die Gruppen eins bis Gruppe vier in Methode V1508.

Gruppe	Gasfluss [L/min]
G1	19,0
G2	19,0
G3	13,0
G4	11,0

4.4.3 Gasfluss Diskussion

Für die früh eluierenden Metaboliten Phthalimid und THPI zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Signalfläche und der Empfindlichkeit mit zunehmendem Gasfluss. Beide Substanzen erreichten ihre höchsten Werte bei einer Flussrate von 19 L/min bis 20 L/min, was der Erwartung verbesserter, verkürzter Trocknungszeit durch erhöhte Gasflussgeschwindigkeit entsprach.

In Gruppe3 zeigten sich ausgeprägte Zielkonflikte. Hexythiazox reagierte positiv auf höhere Gasflüsse, während Fenpyroximat sowie MilbemectinA3 und MilbemectinA4 ihre besten Ergebnisse bei niedrigen Flussraten erzielten. Die Wahl eines Gasflusses von 13 L/min stellt einen möglichen Ausgleich dar. Bei ausreichender Empfindlichkeit von Hexythiazox auf Bestimmungsgrenzniveau könnte der Gasfluss weiter reduziert werden, um die Leistungsfähigkeit der Methode für die übrigen Analyten dieser Gruppe zu steigern.

4.5 iFunnel Optimierung (Modul)

Der iFunnel ist ein im Triple-Quadrupol-Massenspektrometer integriertes Bauteil, das die effiziente Übertragung von Ionen in den ersten Quadrupol unterstützt und somit die Signalqualität verbessert. Ziel war die Optimierung der iFunnel-Spannungen nach Gruppe und Polarität. Gemessen wurde ausgehend von V1407 bei einer Matrixstandardkonzentration von 0,5 mg/kg. Bewertet wurden die Signalfächen und die SNR, die in Form von Heatmaps visualisiert sind. Der Untersuchungsbereich umfasste HP/LP-Spannungen von 40/30 bis 200/200. Die Rohdaten sind im Anhang unter (VI) einsehbar.

4.5.1 iFunnel Ergebnisse

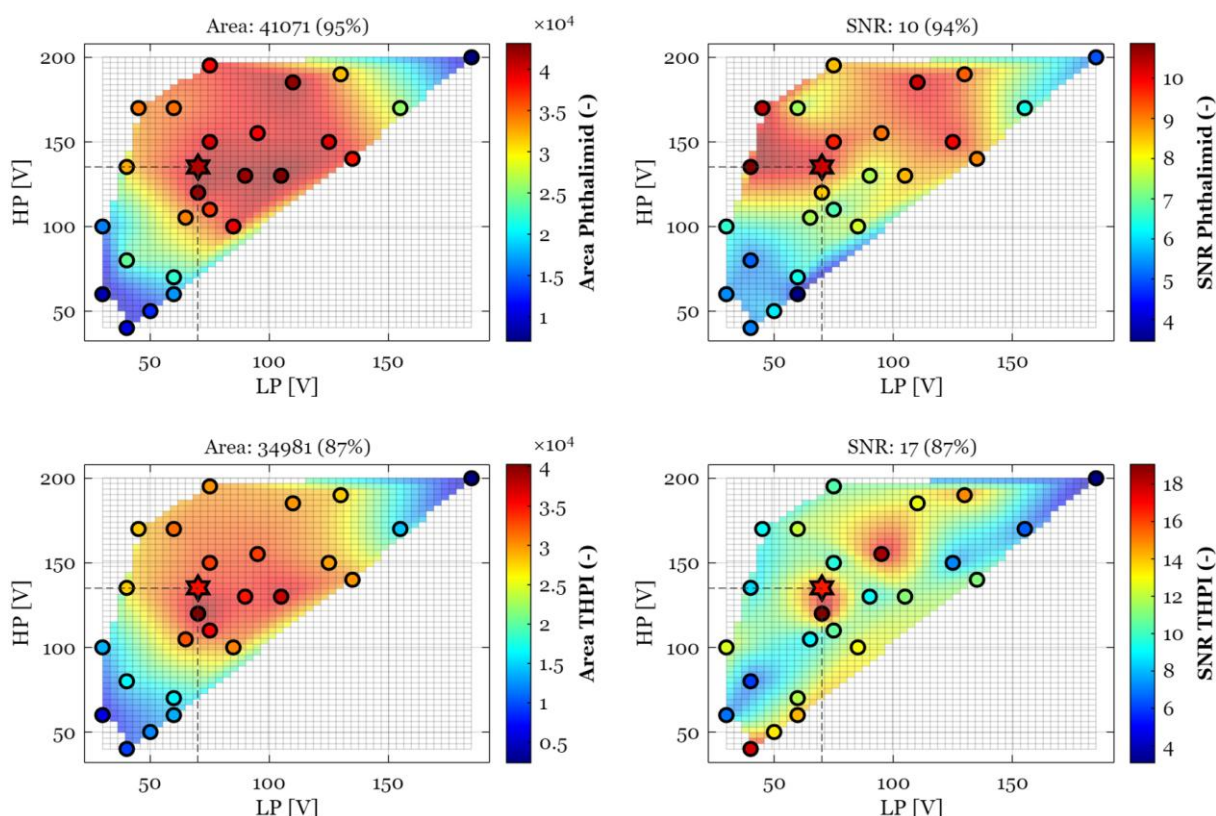


Abbildung 12 Heatmap der Messergebnisse zur Anpassung des iFunnels im Negativmodus Methode V1407. Gezeigt sind die Signale der Analyten Phthalimid (Folpet) und THPI (Captan) aus den Gruppen 1 und 2 in Abhängigkeit von den iFunnel-Spannungen (HP/LP). Die linke Seite stellt die Signalfächen (Area) dar, die rechte Seite die zugehörigen Signal-to-Noise Ratios (SNR). Die Messungen erfolgten mit Matrixstandard (0,5 mg/kg). Die Messwerte sind farbcodiert dargestellt; die Zwischenbereiche wurden mithilfe der Natural-Neighbor-Interpolation eingefärbt, um Trends sichtbar zu machen und die Auswahl geeigneter Einstellwerte zu unterstützen. Die Farbbalken rechts neben den Plots zeigen die Signalwerte sowie die zugehörigen Analyten an.

Gruppe1-2, Negativ: Im untersuchten Spannungsbereich zeigten THPI und Phthalimid eine breite Zone stabil erhöhter Signalfäche zwischen 130 V und 150 V in der Hochdruckstufe (HP) sowie zwischen 70 V und 105 V in der Niederdruckstufe (LP). Für Phthalimid deckte sich dieser Bereich weitgehend mit einer Zone erhöhter SNR. Bei THPI hingegen zeigte die SNR zusätzlich lokale Optima innerhalb desselben Spannungsbereichs (Abbildung 12).

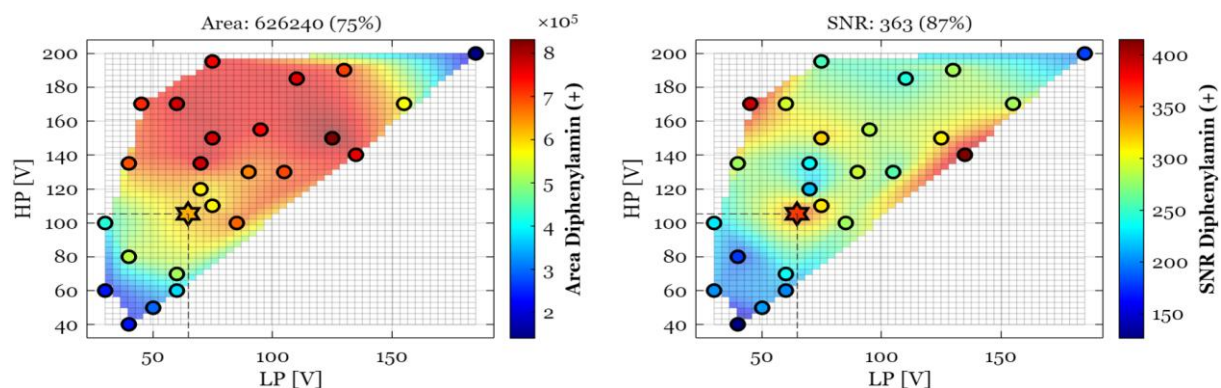


Abbildung 13 Heatmap der Messergebnisse zur Anpassung des iFunnels im Positivmodus basierend auf der Methode V1407. Dargestellt sind die Signale des Analyten Diphenylamin in Abhängigkeit von den iFunnel-Spannungen (HP/LP). Die linke Seite zeigt die Signalflächen (Area), die rechte Seite die entsprechenden Signal-to-Noise Ratios (SNR). Die Messungen erfolgten mit einem Matrixstandard (0,5 mg/kg). Die Messwerte sind farbcodiert dargestellt; die Zwischenbereiche wurden mithilfe der Natural-Neighbor-Interpolation eingefärbt, um Trends sichtbar zu machen und die Auswahl geeigneter Einstellwerte zu unterstützen. Die Farbbalken rechts neben den Plots zeigen die Signalwerte sowie den zugehörigen Analyten an.

Gruppe2, Positiv: Die Heatmap für Diphenylamin zeigte eine zusammenhängende Zone erhöhter Signalfläche mit günstigen Werten ab etwa 100 V in der Hochdruckstufe. Die SNR war im LP-Bereich weniger stabil und wies vereinzelte Optima erhöhter Empfindlichkeit auf, die jedoch unkritisch blieben und nicht unterhalb des dreistelligen Bereichs lagen (Abbildung 13).

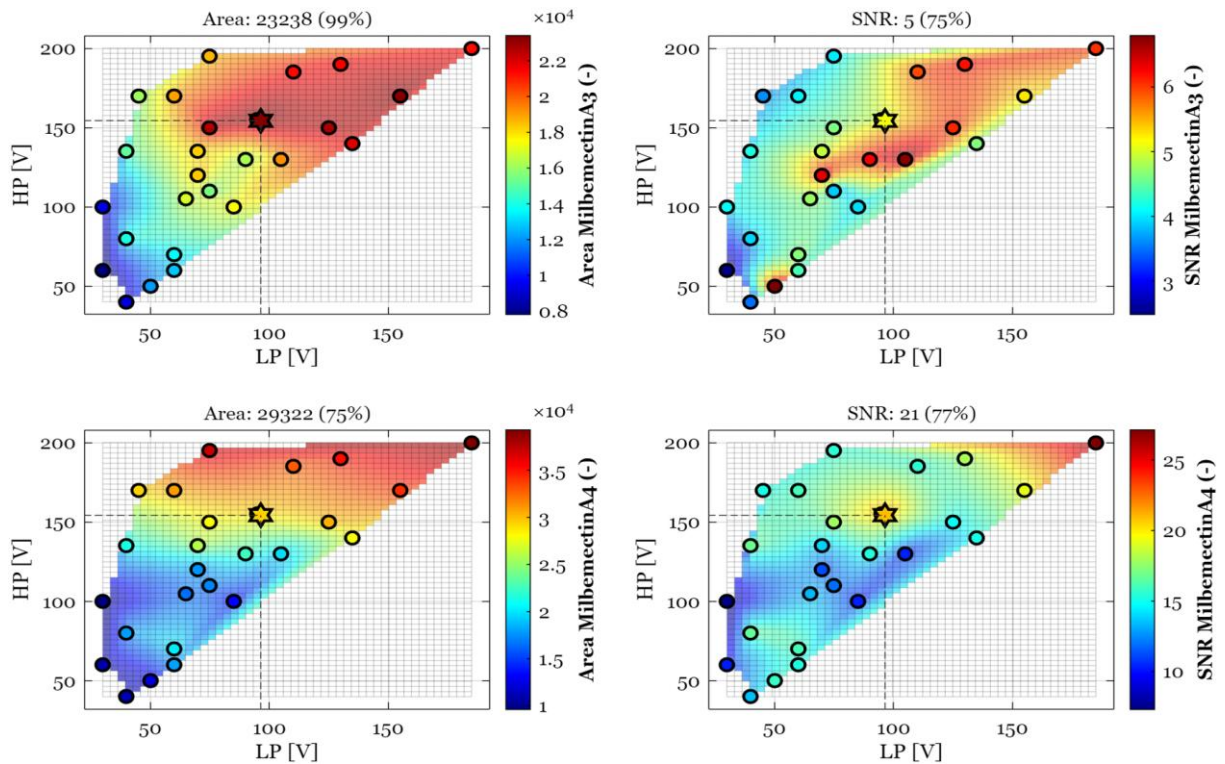


Abbildung 14 Heatmap der Messergebnisse zur Anpassung des iFunnel im Negativmodus basierend auf der Methode V1407. Dargestellt sind die Signale der Analyten Milbemectin A3 und Milbemectin A4 in Abhängigkeit von den iFunnel-Spannungen (HP/LP). Die linke Seite zeigt die Signalflächen (Area), die rechte Seite die entsprechenden Signal-to-Noise Ratios (SNR). Grundlage der Messungen war ein Matrixstandard mit einer Konzentration von 0,5 mg/kg. Die Messwerte sind farbcodiert dargestellt; die Zwischenbereiche wurden mithilfe der Natural-Neighbor-Interpolation eingefärbt, um Trends sichtbar zu machen und die Auswahl geeigneter Einstellwerte zu unterstützen. Die Farbbalken rechts neben den Plots zeigen die Signalwerte mit zugehörigen Analyten an.

Gruppe3, Negativ: Die Heatmap für MilbemectinA3 zeigte ab iFunnel-Spannungen oberhalb von 150/90 V einen Bereich mit vergrößerten Signalfläche und SNR. Ein ähnliches Verhalten wurde für MilbemectinA4 beobachtet, allerdings mit einem weniger stabilen SNR-Bereich und einzelnen lokalen Maxima (Abbildung 14).

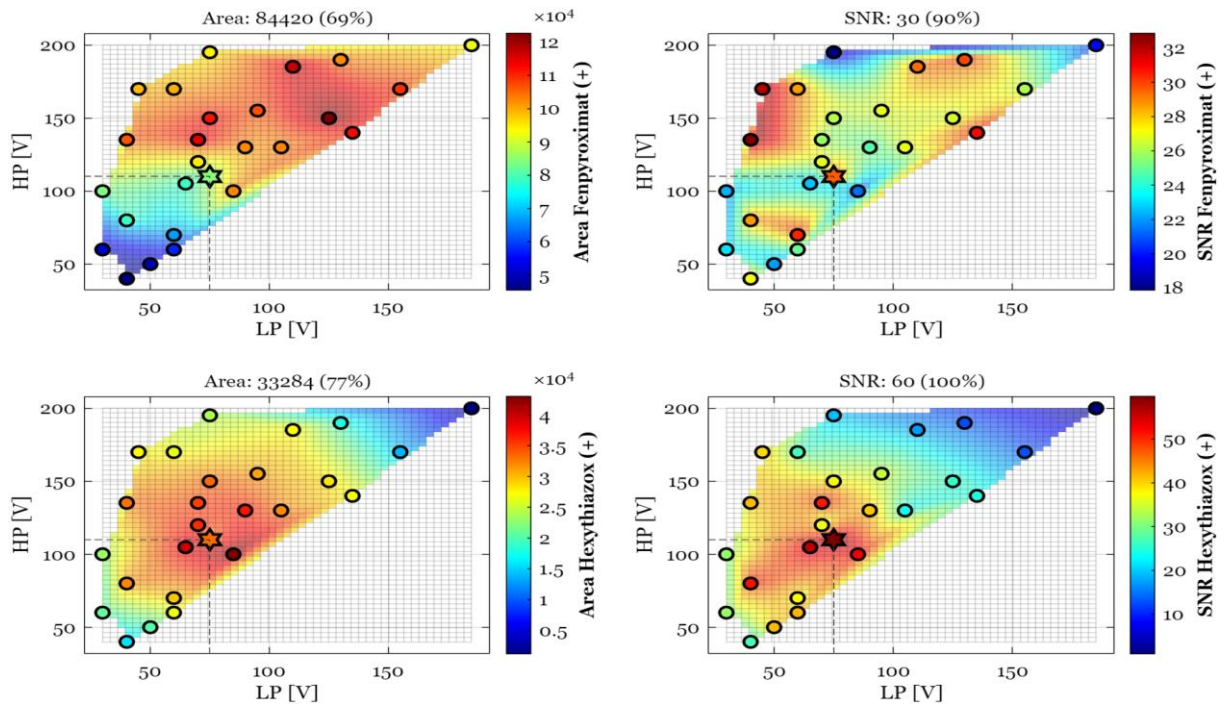


Abbildung 15 Heatmap der Messergebnisse zur Anpassung des iFunnels im Positivmodus, Methode V1407. Dargestellt sind die Signale der Analyten Fenpyroximat und Hexythiazox in Abhängigkeit von den iFunnel-Spannungen (HP/LP). Die linke Seite zeigt die Signalflächen (Area), die rechte Seite die entsprechenden Signal-to-Noise Ratios (SNR). Grundlage der Messungen war ein Matrixstandard mit einer Konzentration von 0,5 mg/kg. Die Messwerte sind farbcodiert dargestellt; die Zwischenbereiche wurden mithilfe der Natural-Neighbor-Interpolation eingefärbt, um Trends sichtbar zu machen und die Auswahl geeigneter Einstellwerte zu unterstützen. Die Farbbalken rechts neben den Plots zeigen die Signalwerte sowie die zugehörigen Analyten an.

Gruppe3, Positiv: Fenpyroximat zeigte einen breiten Bereich günstiger Signalflächen bei HP-Spannungen oberhalb von 100 V, während die SNR in diesem Bereich vereinzelte Optima aufwies, die zu den LP-Rändern verschoben waren. Für Hexythiazox wurde hingegen ein nahezu deckungsgleicher optimaler Bereich für Signalfläche und SNR gemessen, der um 110/75 V lag (Abbildung 15).

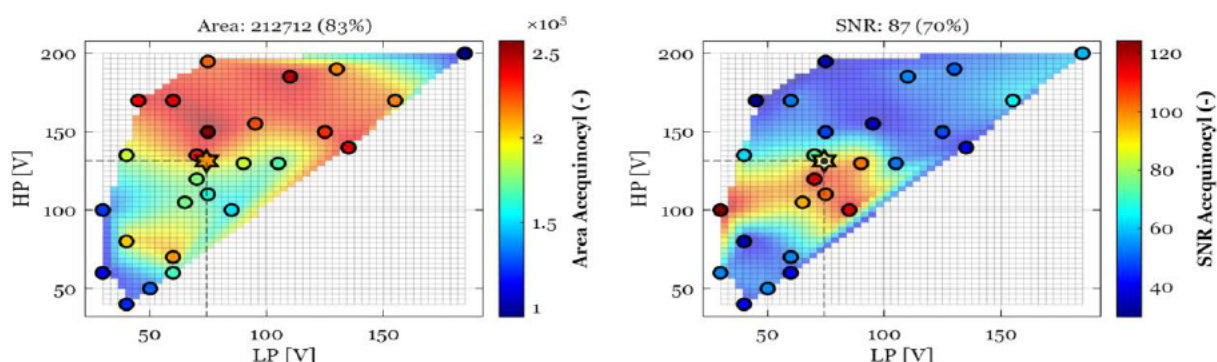


Abbildung 16 Heatmap der Messergebnisse zur Anpassung des iFunnel im Negativmodus auf Basis der Methode V1407. Gezeigt werden die Signale des Analyten Acequinocyl in Abhängigkeit von den iFunnel-Spannungen (HP/LP). Die linke Seite stellt die Signalfächen (Area) dar, die rechte Seite die zugehörigen Signal-to-Noise Ratios (SNR). Grundlage der Messungen war ein Matrixstandard mit einer Konzentration von 0,5 mg/kg. Zwischen den diskreten Messpunkten wurde eine Natural-Neighbor Interpolation durchgeführt, um lokale Trends im Parameterraum sichtbar zu machen. Die Farbbalken rechts neben den Plots zeigen die Signalwerte sowie den zugehörigen Analytennamen an.

Gruppe4, Negativ: Die höchsten Signalfächen für Acequinocyl traten bei HP-Spannungen oberhalb von etwa 130 V auf. Die besten SNR-Werte lagen im dreistelligen Bereich zwischen 100 V und 130 V in der Hochdruckstufe und sanken außerhalb dieses Bereichs rasch auf mittlere bis niedrige zweistellige Werte ab (Abbildung 16).

4.5.2 iFunnel Einstellungswahl

Für THPI und Phthalimid sowie für Captan und Folpet in den Gruppen 1 und 2 negativer Polarität wurde eine iFunnel-Spannung von 135/70 V gewählt. Diese Kombination lag in einem Bereich mit gleichmäßiger Signalverteilung und lokaler Empfindlichkeitssteigerung. Für Diphenylamin in Gruppe2 positiver Polarität wurde 105/70 V festgelegt. Diese Einstellung befand sich in einem Übergangsbereich mit stabiler Signalfächenentwicklung und lokaler Empfindlichkeitssteigerung bei LP. Für die Milbemectine Gruppe3 negativer Polarität wurde 155/90 V gewählt. Fenpyroximat und Hexythiazox in Gruppe3 positiver Polarität erhielten 110/80 V. In diesem Bereich lagen sowohl Signalfäche als auch SNR auf hohem Niveau, und die Heatmap zeigte eine Zone stabiler Empfindlichkeit. Acequinocyl in Gruppe4 negativer Polarität wurde mit 145/75 V betrieben. Die gewählten Spannungen sind in (Tabelle 9) zusammengefasst.

Tabelle 9 Gewählte iFunnel-Spannungen High Pressure (HP), Low Pressure (LP) für positive und negative Polarität in den Gruppen eins bis Gruppe vier.

Gruppe	HP Positiv [V]	LP Positiv [V]	HP Negativ [V]	LP Negativ [V]
G1	105	70	135	70
G2	105	70	170	80
G3	110	80	155	90
G4	110	80	145	75

4.6 Kapillarspannung und Corona-Strom (Modul)

Die Parameter Kapillarspannung und Corona-Strom wurden nicht im Screeningverfahren untersucht. Aufgrund von Maschinenproblemen und einer hohen Auslastung der Geräte konnten aufgenommene Sequenzen nicht verwertet und Wiederholungen nicht durchgeführt werden. Für die Fortführung der Methodenentwicklung wurden deshalb Einstellungen aus etablierten APCI-Methoden übernommen. Die gewählten Werte sind in (Tabelle 10) angegeben. Eine abschließende Überprüfung dieser Parameter ist im Rahmen der Validierung vorgesehen.

Tabelle 10 Übersicht der eingestellten Corona-Ströme (Corona Current) und Kapillarspannungen (Capillary Voltage) für die Gruppen 1 bis 4 im Positiv- und Negativmodus.

Gruppe	Corona Current Positiv [μ A]	Capillary Voltage Positiv [V]	Corona Current Negativ [μ A]	Capillary Voltage Negativ [V]
Gruppe1	+5	+2650	-10	-4500
Gruppe2	+5	+2650	-30	-4500
Gruppe3	+5	+4400	-15	-2650
Gruppe4	+5	+4400	-8	-1750

4.7 Finale MRM-Methode konsolidierung (V1407→V1508B)

Im letzten Teil der Methodenentwicklung wird Methode V1407 durch die in (4.3 bis 4.5) beschriebenen Module ergänzt und zur finalen Messmethode V1508B weiterentwickelt. Diese wird im folgenden Abschnitt der Ausgangsmethode V0607 gegenübergestellt, um die erzielten Fortschritte darzustellen. Für die Vergleichsmessung wurde ein Matrixstandard mit 0,2 mg/kg eingesetzt. Das Injektionsvolumen wurde zusätzlich von 4 μ L in V0607 auf 2,5 μ L in V1508B reduziert, um Matrixeinfüsse zu minimieren und die Empfindlichkeit zu erhöhen.

Die Bewertung erfolgt anhand der Unterschiede in Peakhöhe, Peakfläche, Basislinie, Matrixstörungen im Retentionszeitbereich sowie durch Veränderungen des Matrixeffekts.

4.7.1 Finale MRM-Methode Ergebnisse

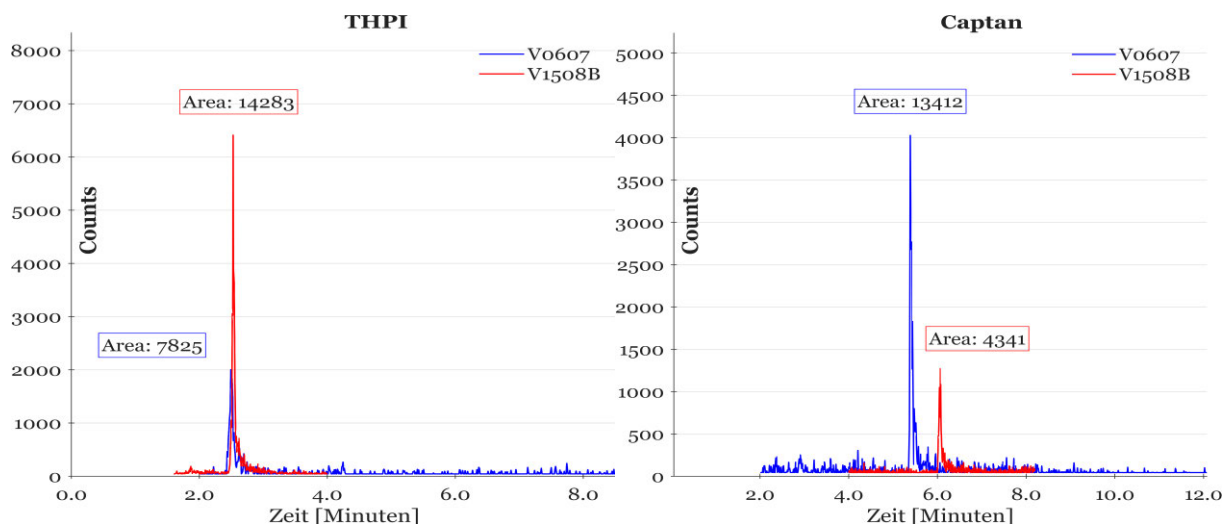


Abbildung 17 Massenspektren im Chromatogramm der Quantifier von THPI (150→96) links und Captan (150→96) rechts bei einem Gehalt von 0,2 mg/kg im Vergleich zwischen der Ausgangsmethode V0607 (blau) und der angepassten Methode V1508B (rot).

Im direkten Vergleich der Massenspektren der Quantifier zeigte THPI in V1508B einen etwa dreifach höheren Peak und eine rund doppelte Peakfläche gegenüber V0607. Basislinie und Peakform blieben dabei praktisch unverändert. Die Erwartung, dass sich diese Verbesserung auch auf Captan übertragen ließe, wurde nicht erfüllt: Captan erschien nach der Optimierung mit lediglich etwa einem Viertel der in V0607 erzielten Peakhöhe und einer um etwa zwei Drittel reduzierten Signalfäche. Basislinie und Peakform blieben praktisch unverändert (Abbildung 17). Die vermutete Ursache der analytischen Verschlechterung ist in (4.2.3) beschrieben.

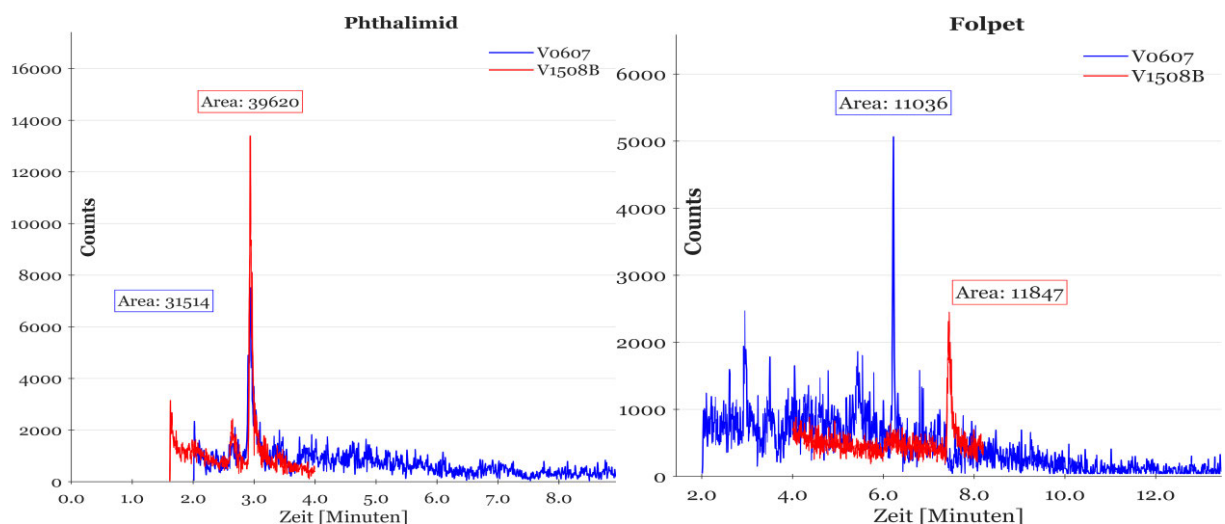


Abbildung 18 Massenspektren im Chromatogramm der Quantifier von Phthalimid (146→42) links und Folpet (146→42) rechts bei einem Gehalt von 0,2 mg/kg im Vergleich zwischen der Ausgangsmethode V0607 (blau) und V1508B (rot).

Für Phthalimid zeigte sich nach den Anpassungen ein Anstieg der Signalfäche um etwa ein Viertel sowie eine nahezu verdoppelte Peakhöhe, ohne dass die Basislinie oder die Peakform erkennbar beeinflusst wurden (Abbildung 18).

Im Gegensatz dazu stimmten die Verbesserungen im Abbauprodukt, ähnlich wie bei Captan und THPI, nicht mit denen des Vorläufers überein.

Bei Folpet führte eine in V1508B aufgetretene Peakverbreiterung dazu, dass die Signalflächen der verglichenen Chromatogramme nahezu unverändert blieben, während die Peakhöhe in V1508 um etwa die Hälfte abnahm. Positiv waren jedoch die abgesenkte Basislinie und eine Beseitigung einer in V0607 noch vorhandenen Massenspurstörung (Abbildung 18).

Zusätzliche Verbesserungen der Signalqualität könnten sich möglicherweise durch die Wahl von G14 (Tabelle 3) erzielen lassen.

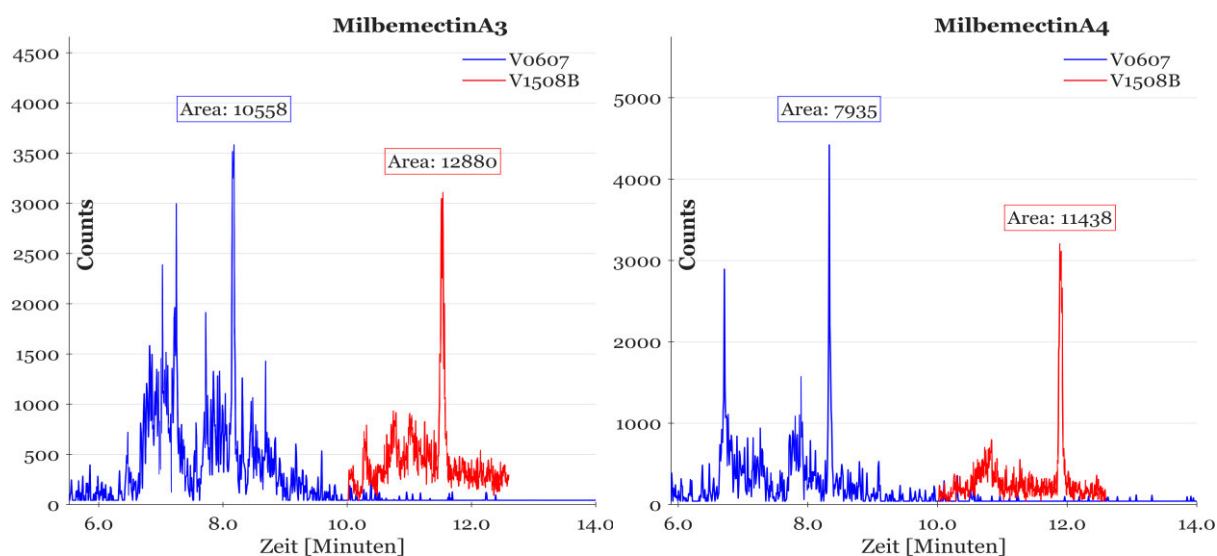


Abbildung 19 Massenspektren im Chromatogramm der Quantifier von MilbemectinA3 (527,5→491,5) links und MilbemectinA4 (541,2→431,3) rechts bei einem Gehalt von 0,2 mg/kg im Vergleich der Ausgangsmethode V0607 (blau) mit V1508B (rot).

Die Anpassungen führten bei MilbemectinA3 und MilbemectinA4 zu einer deutlichen Reduktion des Signalrauschens im unmittelbaren Peakbereich (Abbildung 19). Für MilbemectinA3 wurde bei vergleichbarer Signalthöhe ein Signalflächengewinn von etwas mehr als einem Fünftel erzielt. In der Ausgangsmethode stellten Störungen der Quantifier-Massenspur noch ein deutliches Identifikationshemmnis dar, welche in V1508B deutlich reduziert erschienen.

Für MilbemectinA4 zeigte sich die Massenspur vor dem Peak in V1508B deutlich abgeflacht. Der Signalflächengewinn lag bei etwas weniger als dem Eineinhalbfachen der in der Ausgangsmethode gemessenen Fläche.

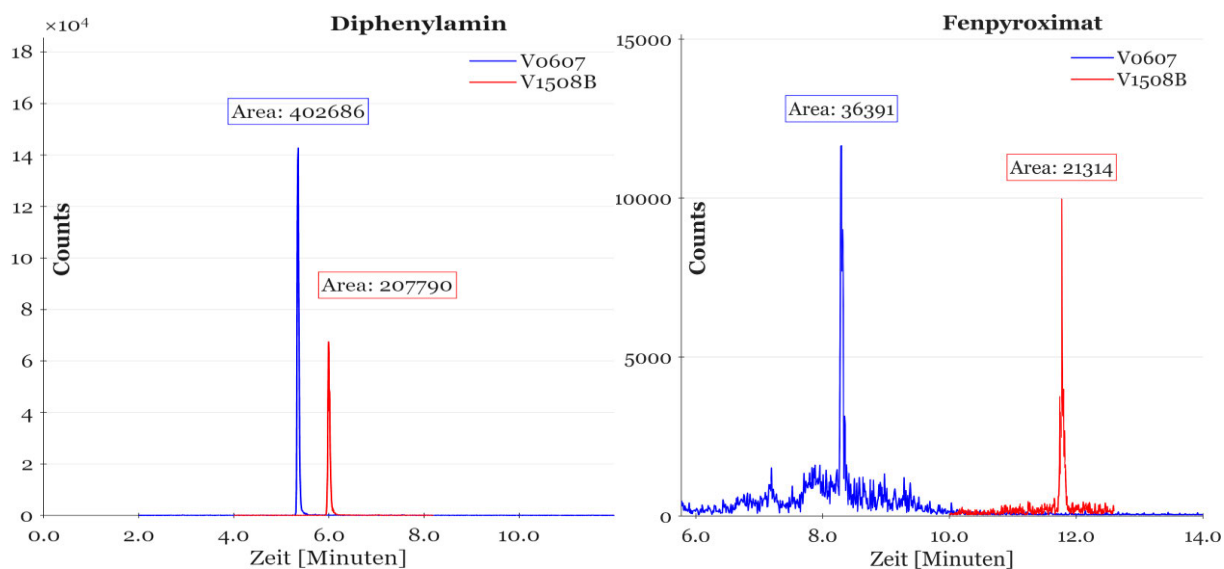


Abbildung 20 Massenspektren im Chromatogramm der Quantifizierung von Diphenylamin (169,9→92,9) links und Fenpyroximat (422,1→366) rechts bei einem Gehalt von 0,2 mg/kg im Vergleich der Ausgangsmethode V0607 (blau) mit V1508B (rot).

Diphenylamin zeigte im Vergleich zu V0607 eine Verringerung der Signalfäche und der Peakhöhe um etwa die Hälfte. Das Signal blieb stabil, ohne nennenswertes Rauschen oder erkennbare Änderungen der Peakform. Dieser Rückgang war aufgrund der in der Methodenentwicklung häufig ungünstig gewählten Parameter und der ausreichenden Messempfindlichkeit unkritisch und erwartbar (Abbildung 20).

Für Fenpyroximat wurde eine Reduktion der Signalfäche von knapp -40 % festgestellt. Trotz der Unerwartetheit dieses Effekts wurde er als unkritisch bewertet, da gleichzeitig die Basislinie deutlich abgesenkt und Störungen in der Massenspur vollständig beseitigt wurden (Abbildung 20). Beim Fenpyroximat im iFunnel wären zusätzliche Gewinne durch eine optimierte Wahl der Einstellwerte möglich gewesen (Abbildung 15).

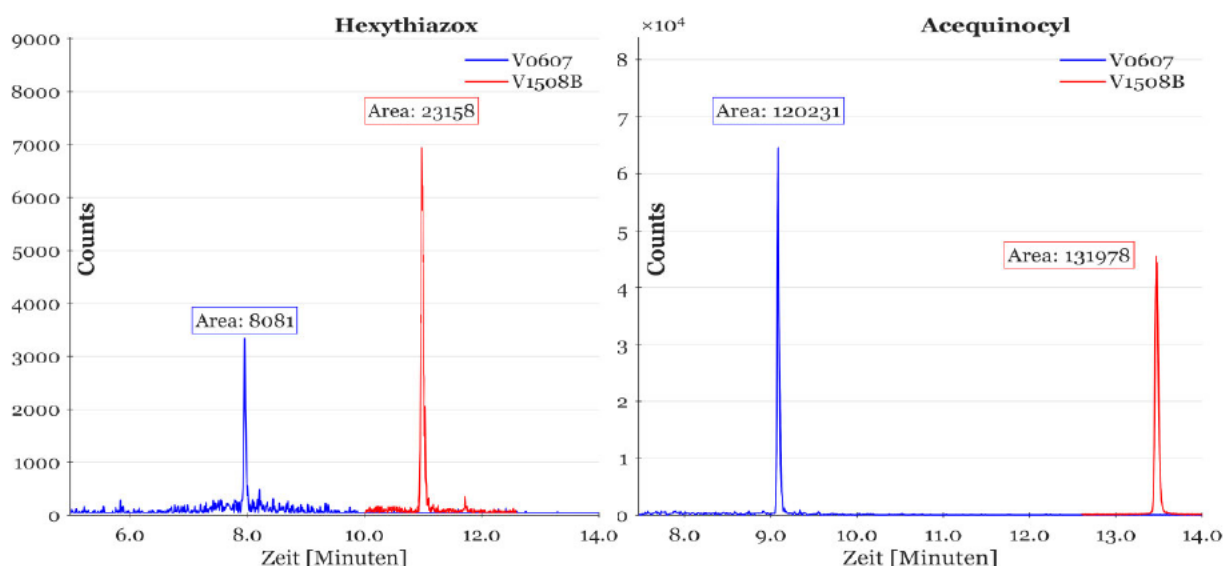


Abbildung 21 Massenspektren im Chromatogramm der Quantifizierung von Hexythiazox (353,1→227,9) links und Acequinocyl (384,1→342,1) rechts bei einem Gehalt von 0,2 mg/kg im Vergleich der Ausgangsmethode V0607 (blau) mit V1508B (rot).

Die Signalfäche für Hexythiazox wurde in V1508B nahezu verdreifacht, begleitet von einer Verdopplung der Peakhöhe und einer Absenkung der Basislinie. Acequinocyl zeigte im Vergleich zu V0607 eine leichte Verringerung der Peakhöhe bei nahezu unveränderten Signalfächen infolge einer Peakverbreiterung. Zusätzlich wurde das sichtbare Basislinienrauschen vollständig beseitigt, welches in V0607 jedoch bereits gering ausgeprägt war (Abbildung 21).

Nachfolgend sind die Entwicklungen der ME beschrieben (Tabelle 11). In der finalen Methode V1508B verschoben sich die Matrixeffekte für die Mehrheit der Analyten zu günstigeren Bedingungen, besonders deutlich bei THPI, Phthalimid, Folpet und Fenpyroximat. Der in V0607 ausgeprägte Suppressionseffekt von THPI wurde nahezu vollständig aufgehoben. Bei Phthalimid kehrte sich die zuvor bestehende Suppression in eine Signalverstärkung um. Für Folpet und Fenpyroximat zeigten sich ebenfalls erkennbare Verbesserungen, während die übrigen Analyten nur geringfügige Änderungen aufwiesen (Tabelle 11).

Tabelle 11 Matrixeffekte (ME) der Ausgangsmethode V0607 im Vergleich zur finalen Methode V1508B. Matrixstandardgehalt von 0,2 mg/kg.

Compound Name	ME V0607 [%]	ME V1508B [%]
THPI	-76	-8
Phthalimid	-48	46
Diphenylamin	61	26
Captan	-12	-3
Folpet	-38	33
Hexythiazox	1	-6
MilbemectinA3	-47	-16
Fenpyroximat	-44	-4
MilbemectinA4	-26	-20
Acequinocyl	-6	-5

5 Validierung

Die im oberen Abschnitt (4) entwickelte LC-APCI-MS/MS-Messmethode wird nachfolgend gemäß den SANTE-Kriterien validiert, um ihre Leistungsfähigkeit zu belegen.

5.1 Dotierungen

Der folgende Abschnitt bewertet dotierte, aufgearbeitete Hopfenproben, um die neue Messmethode hinsichtlich Richtigkeit, Präzision, erweiterter Messunsicherheit und Spezifität nachzuweisen und ihre Eignung für die spätere Routineanwendung zu beurteilen.

Die Dotierungen werden in sechsfacher Bestimmung auf den drei Leveln 0,05 mg/kg (L1), 0,1 mg/kg (L2) und 1 mg/kg (L3) aufgearbeitet, mit dem Ziel, die BG zu validieren (Tabelle 1). Das Vergleichsmaterial wurde mit einer Abweichung von $\pm 0,002$ g eingewogen, wobei die Berechnungen vereinfacht auf eine Einwaage von 0,5 g bezogen werden.

Die Validierungskenngrößen der Aufarbeitung dotierter Hopfenpellets ist in (Tabelle 12) dargestellt. Die Kalibrierung erfolgte jeweils mit Matrixstandards identischer Gehaltsstufe. Rohdaten und die Zuordnung der IS sind im Anhang unter (XI) und (VIII) aufgeführt.

5.1.1 Dotierungen Ergebnisse

Die Validierung der Methode V1508B an dotierten Hopfenpellets ergab levelübergreifend mittlere Wiederfindungen von 87 % bis 110 % und lag damit innerhalb der zulässigen Grenzen von 70 % bis 120 %. Die RSD betrugen 1 % bis 10 % und erfüllten den Grenzwert von höchstens 20 %. Die ermittelten Unsicherheiten lagen unterhalb der Grenze von 50 % zwischen 8,8 % und 31,5 % (Tabelle 12).

Bei sieben der zehn Analyten war ein genereller Trend abnehmender Unsicherheit mit steigender Konzentration erkennbar. Für Diphenylamin und Fenpyroximat änderte sich die Unsicherheit über den gesamten Aufarbeitungsbereich kaum. Die in L1 beobachtete geringe Streuung bei Hexythiazox führte dazu, dass bei höheren Gehalten trotz verbesserter Wiederfindung eine Zunahme der Unsicherheit bestimmt wurde.

Neben den Dotierungen wurden ACN-Injektionen und aufgearbeitete Leerproben in die Sequenz integriert. In den Quantifier-Massenspektren traten dabei keine Störpeaks zur exakten Retentionszeit eines Analyten auf. Die Ion-Ratios lagen innerhalb der zulässigen Abweichung von ± 30 %.

Tabelle 12 Validierungsergebnisse für dotierte Hopfenpellets ($n = 6$) mit der Messmethode V1508B. Angegeben sind die mittleren Wiederfindungen (WDF), deren relative Standardabweichung (RSD_{WDF}), sowie die erweiterte Messunsicherheit (U), getrennt nach Analyt und Gehalt.

Compound Name	Level [mg/kg]	WDF [%]	RSD [%]	U [%]
Acequinocyl	0,05	95	10	21,2
Acequinocyl	0,10	99	3	11,1
Acequinocyl	1,0	95	5	16,8
Captan	0,05	108	7	28,0
Captan	0,10	101	3	11,3
Captan	1,0	103	4	13,2
Diphenylamin	0,05	99	4	13,0
Diphenylamin	0,10	106	5	17,5
Diphenylamin	1,0	98	5	15,5
Fenpyroximat	0,05	109	3	21,0
Fenpyroximat	0,10	103	6	17,5
Fenpyroximat	1,0	91	4	21,8
Folpet	0,05	92	5	23,9
Folpet	0,10	102	6	18,8
Folpet	1,0	102	2	8,8
Hexythiazox	0,05	107	1	15,6
Hexythiazox	0,10	109	7	27,5
Hexythiazox	1,0	97	8	24,9
MilbemectinA3	0,05	110	6	24,6
MilbemectinA3	0,10	88	5	27,6
MilbemectinA3	1,0	96	5	17,9
MilbemectinA4	0,05	87	8	29,3
MilbemectinA4	0,10	88	7	31,5
MilbemectinA4	1,0	90	3	22,9
Phthalimid	0,05	108	5	19,5
Phthalimid	0,10	100	6	19,3
Phthalimid	1,0	104	2	11,3
THPI	0,05	110	6	27,8
THPI	0,10	103	6	19,5
THPI	1,0	103	2	11,8

5.1.2 Dotierungen Bewertung

Die Methode erfüllte im geprüften Bereich die Anforderungen an Richtigkeit, Präzision, Messunsicherheit und Spezifität. Die SNR des Qualifiers von THPI wurde durch das Signal des Quantifiers von Phthalimid aufgrund identischer m/z -Werte überlagert. Da der Ursprung des Signals bekannt war, wurde das Unterschreiten des geforderten Schwellenwertes von $SNR \geq 3$ für den Qualifier von THPI als akzeptabel bewertet.

5.2 Arbeitsbereich

Die Linearität im vorgesehenen AB der Methode wurde anhand einer Regressionsanalyse überprüft, die auf 20 Kalibrationsstufen im Gehaltsbereich von 0,04 mg/kg bis 30 mg/kg basiert. Für die Validierung gilt eine Mindestanforderung von 0,05 mg/kg bis 20 mg/kg, wobei die Abweichung der rückgerechneten Konzentrationen innerhalb von $\pm 20\%$ liegen sollte siehe (3.2). Die Zuweisung der IS ist im Anhang (VIII) dokumentiert, die Rohdaten zum Validierungsteil unter (VII).

5.3 Ergebnisse Arbeitsbereich

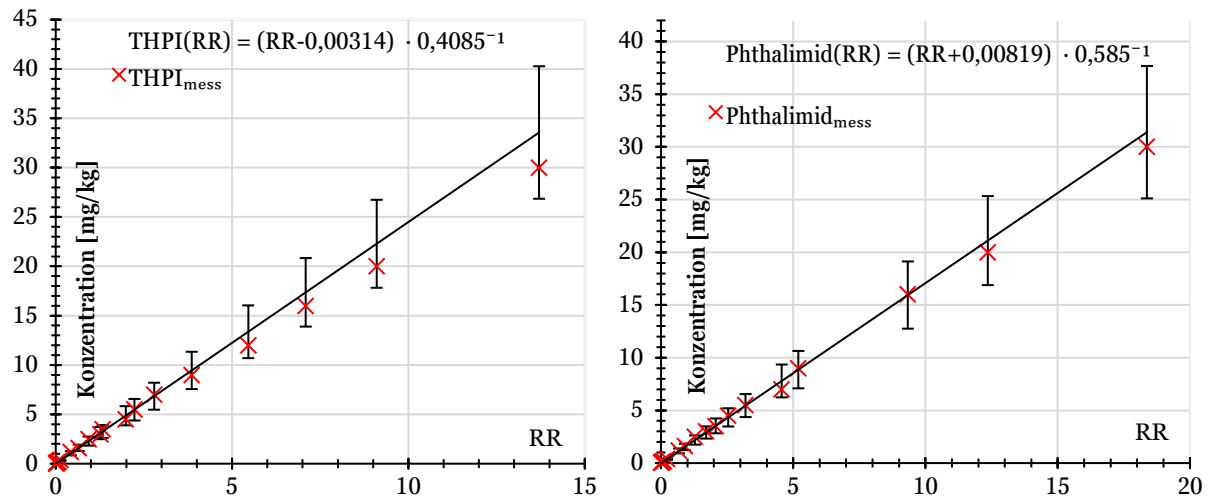


Abbildung 22 Validierungsbereich für THPI (links) und Phthalimid (rechts). Dargestellt ist die Konzentration in mg/kg in Abhängigkeit von der Response Rate (RR). Die roten Punkte markieren die experimentellen Messwerte, die schwarze durchgezogene Linie zeigt die Regressionsgerade. Die Balken stellen den Bereich von $\pm 20\%$ um die Regressionslinie dar und veranschaulichen die akzeptierte Abweichung zur Bewertung der Linearität.

Die Messreihen für THPI und Phthalimid zeigten im Konzentrationsbereich von 0,04 mg/kg bis 30 mg/kg ein lineares Verhalten (Abbildung 22). Die Abweichungen der Messwerte lagen vollständig innerhalb des Toleranzbereichs von $\pm 20\%$. Die Regression von THPI zeigte geringe tolerierbare Verzerrungen hin zu negativen Abweichungen bei erhöhten Gehalten.

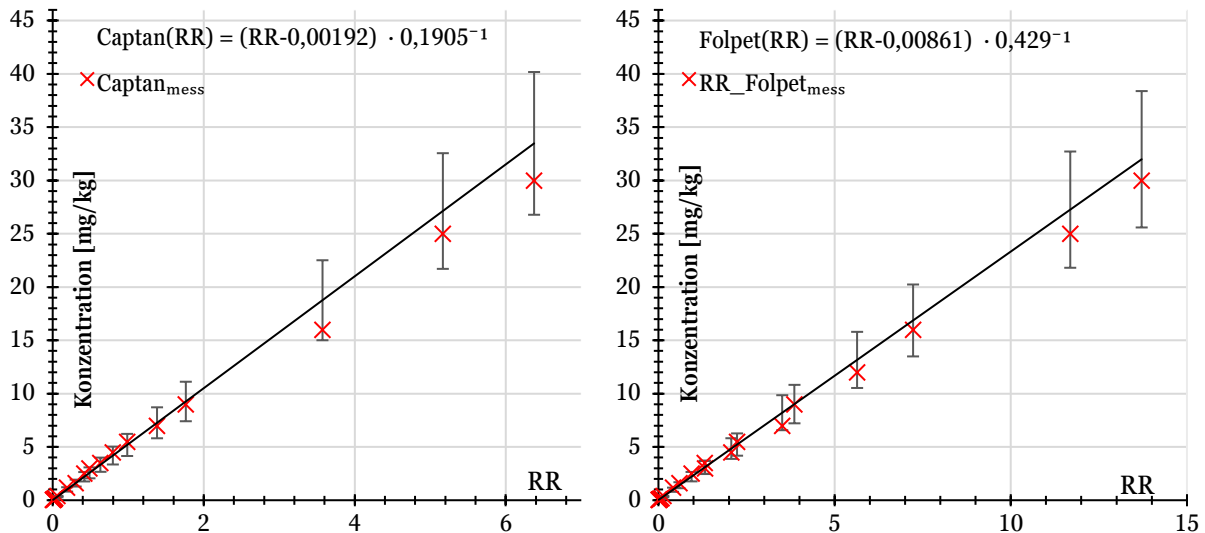


Abbildung 23 Validierungsbereich für Captan (links) und Folpet (rechts). Dargestellt ist die Konzentration in mg/kg in Abhängigkeit der Response Rate (RR). Die roten Punkte markieren die experimentellen Messwerte, die schwarze durchgezogene Linie zeigt die Regressionsgerade. Die Balken stellen den Bereich von $\pm 20\%$ um die Regressionslinie dar und veranschaulichen die akzeptierte Abweichung zur Bewertung der Linearität.

Die Messreihen für Captan und Folpet zeigten im Konzentrationsbereich von 0,04 mg/kg bis 30 mg/kg ein lineares Verhalten (Abbildung 23). Sämtliche Abweichungen der Messwerte lagen dort innerhalb des Toleranzbereichs von $\pm 20\%$. Die Regression von Captan zeigte bei höheren Konzentrationen, ähnlich wie THPI, eine Tendenz zu negativen Abweichungen.

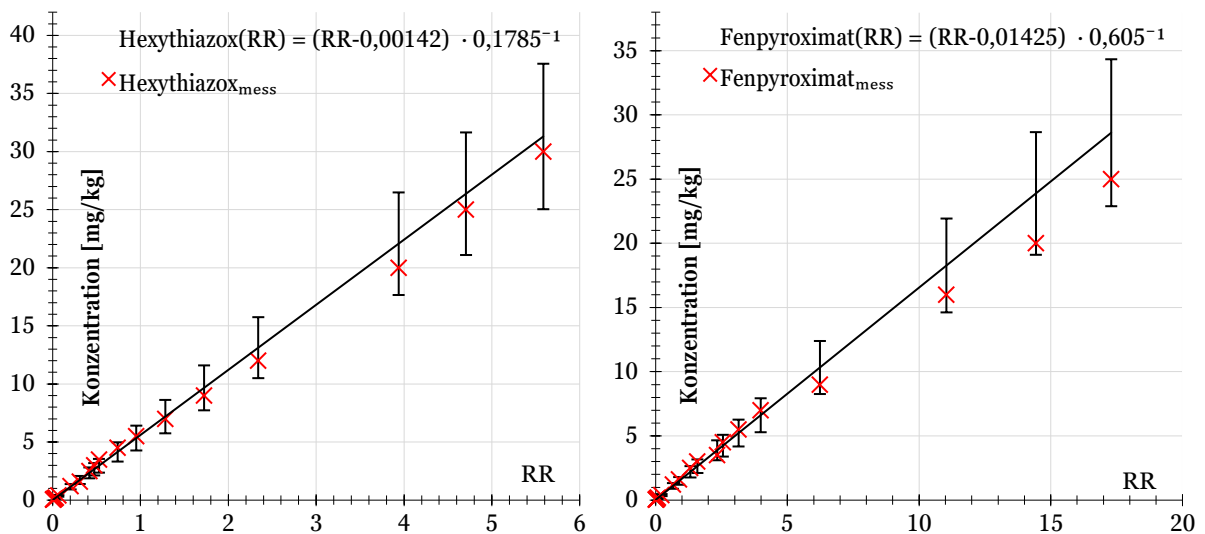


Abbildung 24 Validierungsbereich für Hexythiazox (links) und Fenpyroximat (rechts). Dargestellt ist die Konzentration in mg/kg in Abhängigkeit der Response Rate (RR). Die roten Punkte markieren die experimentellen Messwerte, die schwarze durchgezogene Linie zeigt die Regressionsgerade. Die Balken stellen den Bereich von $\pm 20\%$ um die Regressionslinie dar und veranschaulichen die akzeptierte Abweichung zur Bewertung der Linearität.

Die Messreihen für Hexythiazox und Fenpyroximat zeigten im Bereich von 0,04 mg/kg bis 25 mg/kg für Fenpyroximat und bis 30 mg/kg für Hexythiazox Abweichungen der rückgerechneten Konzentrationen, die innerhalb des Toleranzbereichs von $\pm 20\%$ zur Regressionsgeraden lagen (Abbildung 24). Bei höheren Konzentrationen traten für Fenpyroximat deutliche negative Verzerrungen auf.

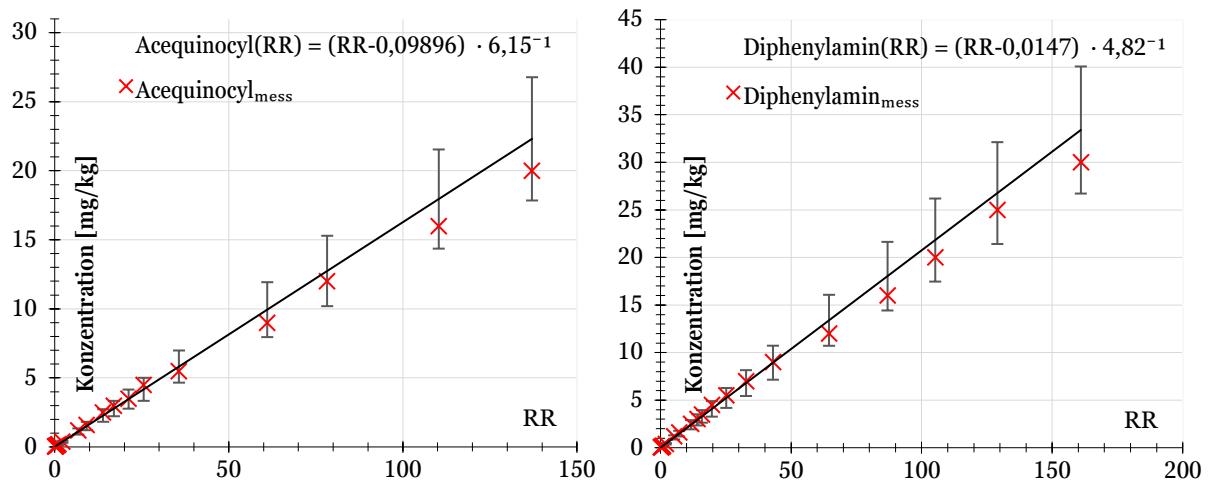


Abbildung 25 Validierungsbereich für Acequinocyl (links) und Diphenylamin (rechts). Dargestellt ist die Konzentration in mg/kg in Abhängigkeit der Response Rate (RR). Die roten Punkte markieren die experimentellen Messwerte, die schwarze durchgezogene Linie zeigt die Regressionsgerade. Die Balken stellen den Bereich von $\pm 20\%$ um die Regressionslinie dar und veranschaulichen die akzeptierte Abweichung zur Bewertung der Linearität.

Die Messreihen für Acequinocyl und Diphenylamin zeigten im Konzentrationsbereich von 0,04 mg/kg bis 30 mg/kg ein lineares Verhalten. Die Abweichungen der Messwerte lagen vollständig innerhalb des Toleranzbereichs von $\pm 20\%$ (Abbildung 25).

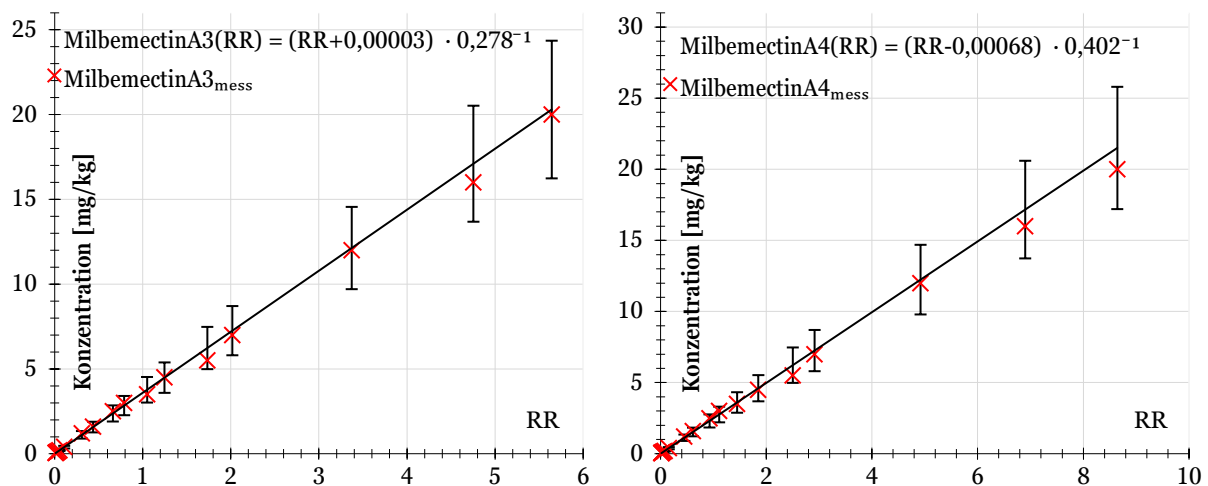


Abbildung 26 Validierungsbereich für MilbemectinA3 (links) und MilbemectinA4 (rechts). Dargestellt ist die Konzentration in mg/kg in Abhängigkeit der Response Rate (RR). Die roten Punkte markieren die experimentellen Messwerte, die schwarze durchgezogene Linie zeigt die Regressionsgerade. Die grauen Balken stellen den Bereich von $\pm 20\%$ um die Regressionslinie dar und veranschaulichen die akzeptierte Abweichung zur Bewertung der Linearität.

Die Messreihen für MilbemectinA3 und MilbemectinA4 zeigten über den Konzentrationsbereich von 0,04 mg/kg bis 30 mg/kg ein lineares Verhalten (Abbildung 26). Die Abweichungen der Messwerte lagen dort innerhalb des Toleranzbereichs von $\pm 20\%$.

5.3.1 Bewertung Arbeitsbereich

Im AB zeigte sich von 0,05 mg/kg bis 20 mg/kg für jeden Analyten ein lineares Verhalten. Die Achsenabschnitte lagen überwiegend in vergleichbarer geringer Größenordnung, mit Ausnahme von Acequinocyl, welches einen erhöhten Achsenabschnitt aufwies. Dies weist darauf hin, dass bei niedrigen Gehalten kein streng proportionales Verhältnis zwischen Gehalt und RR besteht, was für den betrachteten Arbeitsbereich jedoch ohne Relevanz ist.

6 Bewertung MRM-Methodenentwicklung und Validierung

Zusammenfassend wurde für alle zehn Analyten in der entwickelten Messmethode V1508B ein BG-Niveau von 0,05 mg/kg validiert. Damit erfüllte die Methodenentwicklung das Ziel, eine leistungsfähige Messmethode für die gemeinsame Bestimmung der Analyten bereitzustellen. Für MilbemectinA3 und MilbemectinA4 wurde dieses Ziel übertroffen, da beide auf der Hälfte des vorgesehenen Niveaus validiert werden konnten. Analytische Verbesserungen bei Analyten mit geringer Messempfindlichkeit wurden für alle Substanzen erreicht, mit Ausnahme der optionalen Parameter Captan und Folpet.

Literaturverzeichnis

Abdourahime, Himdata/Anastassiadou, Maria/Brancato (2019). Review of the existing maximum residue levels for hexythiazox according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005. EFSA. Online verfügbar unter <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdfdirect/10.2903/j.efsa.2019.5559?download=true> (abgerufen am 02.07.2025).

Agilent Technologies Inc. (2018). Agilent 6400 Series Triple Quadrupole LC/MS System. Concepts Guide The Big Picture. Online verfügbar unter https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/usermanual-triple%20quad%20concepts-MassHunter-G3335-90235EN_B-agilent.pdf (abgerufen am 08.07.2025).

Agilent Technologies Inc. (2025). Atmospheric Pressure Chemical Ionization Source (APCI). LC/MS Ion Sources. Online verfügbar unter <https://www.agilent.com/en/product/liquid-chromatography-mass-spectrometry-lc-ms/lc-ms-ion-sources/atmospheric-pressure-chemical-ionization-source-apci> (abgerufen am 30.08.2025).

BarthHaas GmbH & Co. KG (Hrsg.) (2025). Barthhaas Bericht 23/24. Online verfügbar unter <https://www.barthhaas.com/de/ressourcen/barthhaas-bericht> (abgerufen am 23.07.2025).

Barwick, Vicky/Morillas Bravo, Pedro/Ellison, Stephen/Gjengedal, Elin (2025). The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. Online verfügbar unter https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf (abgerufen am 15.07.2025).

Behrooz Zekavat/Charles Nichols/Anabel Fandino/Agilent (2019). Impact of Dwell Time and Ion Flux on Multiple Reaction Ion Monitoring (MRM) Measurement Precision. Santa Clara, CA, USA. Online verfügbar unter https://www.agilent.com/cs/library/posters/public/Agilent_ASMS_2019_WP444_Poster.pdf (abgerufen am 22.07.2025).

Chapra, Steven/Canale, Raymond (2025). Numerical methods for engineers. Online verfügbar unter <https://gdceboysang.ac.in/About/Droid/uploads/Numerical%20Methods.pdf> (abgerufen am 12.07.2025).

Dr. Gross, Jürgen (2019). Massenspektrometrie. Spektroskopiekurs kompakt. Online verfügbar unter <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-662-58635-8> (abgerufen am 22.07.2025).

Fisher, Steven/Perkins, Patrick (2025). Simultaneous Electrospray and Atmospheric Pressure Chemical Ionization. The Science Behind the Agilent Multimode Ion Source. (abgerufen am 29.06.2025).

Hägele/Mack/Scherbaum/Anastasiades (2020). Analysis of Captan/THPI and of Folpet/PI via GC-MS/MS and LC-MS/MS. Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart. Online verfügbar unter <https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/EPRW%202020-PD69.pdf> (abgerufen am 22.07.2025).

Katerina, Mastovska/John, Zulkoski/Jerry, Zweigenbaum (2025). Triggered MRM LC/MS/MS Method Development – Practical Considerations for MRM Optimization Using Agilent MassHunter Optimizer Software. Technical Overview. Online verfügbar unter <https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/5991-7195EN> (abgerufen am 22.07.2025).

Matissek, Reinhard/Fischer, Markus (2021). Lebensmittelanalytik. Springer-Verlag GmbH. (abgerufen am 01.09.2025).

MilliporeSigma (2013). Supel™ QuE (QuEChERS) Products. Online verfügbar unter <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/991/035/t706013.pdf> (abgerufen am 02.07.2025).

Professor Dr. Belitz/Hans-Dieter/Professor Dr. Grosch/Werner/Professor Dr. Schieberle, Peter (1982). Lehrbuch der Lebensmittelchemie. Sechste, vollständig überarbeitete Auflage. Online verfügbar unter <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-540-73202-0> (abgerufen am 31.06.2025).

Restek GmbH (Hrsg.) (2025). Raptor Biphenyl: Fast, Rugged Raptor Columns with Time-Tested Selectivity. Online verfügbar unter <https://www.restek.com/global/de/articles/raptor-biphenyl-lc-columns-brochure> (abgerufen am 17.08.2025).

SANTE (Hrsg.) (2021). Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed. Supersedes Document No. SANTE/11312/2021. Implemented by 01/01/2024. Generaldirektion Gesundheit und Lebensmittelsicherheit der Europäischen Kommission. Online verfügbar unter https://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/tmpl_article.asp?CntID=727 (abgerufen am 12.07.2025).

Stocker, Toni/Steinke, Ingo (2017). Statistik. Grundlagen und Methodik. (abgerufen am 01.09.2025).

Verordnung (EG) 2018/1515 vom 02.07.2025.

Verordnung (EU) 2016/452 vom 29.03.2016.

Verordnung (EU) 2017/623 vom 02.07.2025.

Verordnung (EU) 2020/856 vom 19.06.2025.

Verordnung (EU) 2023/1042 vom 26.05.2023.

Wanlong Zhou/Shuang Yang/Perry G Wang (2025). Matrix Effects and Application of Matrix Effect Factor. Online verfügbar unter <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.4155/bio-2017-0214?needAccess=true> (abgerufen am 31.07.2025).

Anhangsverzeichnis

I.	Einstellwerte der Ausgangsmethode.....	ii
II.	Gradientenanpassung Rohdaten.....	iii
III.	Nebulizer Vaporizer Flussrate Rohdaten.....	iv
IV.	Gastemperatur Rohdaten.....	v
V.	Gasfluss Rohdaten	vi
VI.	iFunnel Rohdaten	vii
VII.	Arbeitsbereich Rohdaten	ix
VIII.	Zuordnung der internen Standards.....	x
IX.	Ion-Ratio Rohdaten	xi
X.	Matrixeffekte der finalen Methode Rohdaten	xii
XI.	Aufarbeitung Rohdaten.....	xiii

I. Einstellwerte der Ausgangsmethode

Tabelle 13 Verlauf des Lösemittelgradienten, der Fließmittelgeschwindigkeit und Säulentemperatur V0607.

Zeit [min]	A [%]	B [%]	Flussrate [mL/min]	Säulentemperatur [°C]
0,00	95	5	0,5	55
0,25	95	5		
2,50	50	50		
9,50	0	100		
22,00	0	100		

Zur Erstellung der Ausgangsmethode wurden aus APCI-basierten Methoden Massenübergänge und Kollisionsenergien (CE) für die zehn Zielanalyten übernommen und in einer Methode zusammengeführt. In (Tabelle 13) ist der Verlauf des initialen Lösemittelgradienten sowie die eingestellte Fließmittelgeschwindigkeit und Säulentemperatur in V0607 eingetragen.

Tabelle 14 Transitionswerte der Quantifier-Signale. Massenübergänge, Ionisierungspolarität (eingeklammert) und Kollisionsenergien (CE) der in der Ausgangsmethode V060725 zusammengefassten Zielanalyten.

Compound Name	Precursor	Product Ion	CE [eV]	Dwell-Time [ms]	CAV [V]
Acequinocyl (–)	384,1	342,1	19	10	3
Captan (–)	150,0	96,0	26	10	3
Folpet (–)	146,0	42,0	38	10	3
Milbemectin–A3 (–)	527,5	491,5	24	10	3
Milbemectin–A4 (–)	541,2	431,3	22	10	3
Phthalimid (–)	146,0	42,0	38	10	3
THPI (–)	150,0	96,0	32	10	3
Diphenylamin (+)	169,9	92,9	28	10	3
Fenpyroximat (+)	422,1	366,0	22	10	3
Hexythiazox (+)	353,1	227,9	14	10	3

Aus den Quellmethoden übernommen wurden die Massenübergänge für Quantifier (Tabelle 14). Für alle Zielanalyten wurde eine einheitliche Dwell Time von 10 ms sowie eine Cell Accelerator Voltage von 3 V ausgewählt.

Tabelle 15 Einstellwerte der Ausgangsmethode V060725 an der APCI-Quelle und am Massenspektrometer. Für die Polarisationsmodi positiv und negativ, sowie die davon unabhängig einstellbaren Parameter.

QQQ-Parameter	Polarität		Gruppe
	Positiv	Negativ	
Capillary Voltage [V]	4500	4500	
Corona Current [µA]	5	20	
iFunnel HP [V]	150	150	
iFunnel LP [V]	80	80	
Gas Temperatur [°C]			250
Vaporizer-Temperatur [°C]			450
Gasfluss [L/min]			14
Nebulizer-Druck [psi]			20

Die in (Tabelle 15) dargestellten Einstellwerte umfassen die Quelleinstellungen iFunnel-Spannungen, Gas-temperatur für und -fluss, sowie die Einstellungen des Vaporizers und Nebulizers.

II. Gradientenanpassung Rohdaten

Die folgenden Tabellen enthalten die Messergebnisse der Gradientenanpassung für Matrix- und Lösemittelstandards. Sie zeigen die Signalflächen der Zielanalyten für die Ausgangsmethode V0607 und die Gradientenvarianten G09 bis G16.

Tabelle 16 Signalfläche (Area) der Analyten für die Ausgangsmethode V0607 und die Gradientenvarianten G09 bis G16; Matrixstandard 1 mg/kg.

Compound Name	Area V0607	Area G09	Area G10	Area G12	Area G14	Area G16
Acequinocyl	347463	410932	474193	420852	380261	396442
Diphenylamin	676755	868594	667976	764577	557808	732266
Fenpyroximat	94416	67884	66961	79081	93005	114254
Hexythiazox	39165	55139	43667	40629	49546	53860
MilbemectinA3	46786	38136	47717	41318	42845	35646
MilbemectinA4	64141	49731	57589	66971	69340	67667
Captan	55344	55425	58787	48165	47644	50099
Folpet	85200	80478	85165	85516	86367	89676

Tabelle 17 Signalfläche (Area) der Analyten für die Ausgangsmethode V0607 und die Gradientenvarianten G09 bis G16; Lösemittelkalibrierstandard (Acetonitril), 0,05 ng/µL.

Compound Name	Area V060725	Area G09	Area G10	Area G12	Area G14	Area G16
Acequinocyl	326195	369845	426045	430124	407881	429822
Diphenylamin	1086741	1042512	1164375	1135756	1097546	1270451
Fenpyroximat	52408	81569	87382	63762	121954	70194
Hexythiazox	39752	33113	36522	54625	61360	69963
MilbemectinA3	24616	29776	28835	26992	28658	30856
MilbemectinA4	47343	44226	48483	61443	64377	63320
Captan	48526	52119	51917	51899	48688	51973
Folpet	52811	36239	55773	65147	79927	82883

Tabelle 18 Signal-to-Noise Ratio der Analyten für die Ausgangsmethode V0607 und die Gradientenvarianten G09 bis G16; Matrixstandard 1 mg/kg.

Compound Name	SNR V060725	SNR G09	SNR G10	SNR G12	SNR G14	SNR G16
Acequinocyl	216,8	135,5	259,7	181,1	221,7	226,0
Diphenylamin	1346,7	1332,1	1530,8	1001,4	1246,8	1438,5
Fenpyroximat	12,5	10,3	36,1	24,9	44,4	23,0
Hexythiazox	66,0	54,2	63,3	124,1	131,1	70,3
MilbemectinA3	7,4	9,6	9,7	11,3	7,4	10,4
MilbemectinA4	28,9	22,1	29,7	29,8	29,4	26,5
Captan	78,7	80,1	55,3	61,2	124,4	36,4
Folpet	7,3	1,7	10,7	11,3	12,1	8,4

III. Nebulizer Vaporizer Flussrate Rohdaten

Tabelle 19 Signalfächen (Area) des Lösemittelstandards (0,025 ng/ μ L in Acetonitril) bei Variation von Flussrate, Vaporizer-Temperatur und Nebulizer-Druck, Methode V1107.

Flussrate [mL/min]	Vapo- rizer [°C]	Nebul- izer [psi]	Area Diphenyla- min	Area Acequino- cyl	Area Fenpyrox- imat	Area Hexythia- zox	Area Milberne- ctinA3	Area Milberne- ctinA4	Area Phthali- mid	Area THPI
0,35	270	28	1083117	209858	136	43	11494	19994	142989	70968
0,35	275	20	1377033	186766	165424	94810	6737	26716	184208	114712
0,35	300	20	1547970	252046	154814	111342	14212	35242	179102	112000
0,35	300	25	1154652	267149	136	273	11185	28032	157862	76852
0,35	325	42	85508	111888	24	14	6187	6901	135199	45392
0,35	450	20	444940	90013	18945	2035	10630	12240	214229	107541
0,35	490	25	193914	42314	6820	57	2653	3288	175533	71719
0,35	490	35	84762	32030	1662	227	1992	1500	81450	37772
0,50	220	34	956031	166816	114983	16732	4211	11676	71793	21585
0,50	235	36	1137678	197067	715	535	4631	16502	90261	28105
0,50	270	28	1212072	202035	3640	9021	5987	27589	61593	11363
0,50	300	25	1184166	155588	2669	7880	9357	35863	52935	16013
0,50	305	20	1146856	134295	137582	68094	6276	32044	26359	10482
0,50	325	42	625601	243208	98	51	16703	28479	123912	39323
0,50	370	20	1274380	167036	154998	139513	17281	37100	46518	13985
0,50	400	20	1183112	210871	150681	149464	16421	43013	12169	8578
0,50	400	36	298326	182530	173	1401	16866	18802	143467	56262
0,50	450	20	934353	241198	2291	5896	20473	37011	166623	42317
0,50	460	23	833353	224757	1996	5820	15074	37474	196556	53492
0,50	470	25	676576	175152	60	31	12950	30272	208239	65070
0,50	475	44	133445	49866	8	2	4490	2828	126038	44321
0,50	480	35	185627	85051	16178	3252	8709	7349	180060	59233
0,50	490	25	510374	157328	37	0	12469	14220	236072	71395
0,65	225	30	1048415	144051	2531	3875	2889	5966	49663	12058
0,65	235	22	940963	156496	29156	5115	2476	4702	34252	6406
0,65	270	30	1123356	130791	124198	22493	5733	21605	49601	13202
0,65	270	32	1165892	122727	53475	23858	6639	24953	53887	12446
0,65	305	20	808613	161271	54027	14935	3740	13477	27869	9815
0,65	305	28	976178	142633	120033	61644	6146	26233	59691	14781
0,65	355	22	1043438	112232	54149	86912	10681	44654	33230	12955
0,65	365	40	804846	370022	529	313	17582	38495	135199	49615
0,65	405	30	871303	316748	1047	9860	21818	49365	122381	36693
0,65	415	28	918379	333455	1145	5025	20208	46427	124938	37539
0,65	465	26	781346	232961	249	270	22495	42097	104516	24393
0,72	330	44	874066	159116	139	333	14450	53042	43223	17372
0,72	400	22	990034	178635	235	552	12715	50174	37450	12608
0,72	450	25	780180	340195	403	274	17596	38798	73786	17791
0,72	490	20	746243	199538	179	21	11569	32970	30267	9255

IV. Gastemperatur Rohdaten

Tabelle 20 Signalfäche (Area) der Analyten in Abhängigkeit von der Gastemperatur (°C); Messmethode V1407, Matrixstandard 0,5 mg/kg.

GasTemp [°C]	Area Phthali mid	Area THPI	Area Diphenyla min	Area Hexythiaz ox	Area Acequinoc yl	Area Fenpyroxi mat	Area Milbemect inA3	Area Milbemect inA4
180	37842	17475	552334	18187	241813	95437	20793	30844
200	34498	16140	569509	22627	269160	90037	25129	34250
220	34398	17145	570663	24181	269780	94283	23049	33784
240	33051	17411	572989	22872	276412	81801	22452	29549
260	35613	15686	532587	23581	220849	76932	19047	30833
280	34564	13253	555331	19884	199482	77577	20030	25992
250	37503	16801	488348	22724	278793	87871	20108	24446

Tabelle 21 Signal-to-Noise Ratio (SNR) der Analyten in Abhängigkeit von der Gastemperatur (°C); Messmethode V1407, Matrixstandard 0,5 mg/kg.

GasTemp [°C]	SNR Phthalimid	SNR THPI	SNR Diphenyla min	SNR Hexythiaz ox	SNR Acequinoc yl	SNR Fenpyroxi mat	SNR Milbemect inA3	SNR Milbemect inA4
180	5	12	169	26	16	13	7	10
200	8	11	182	36	13	15	8	9
220	7	12	166	37	13	13	7	9
240	6	6	202	18	10	16	7	7
260	5	13	140	34	21	15	5	9
280	5	10	234	30	11	12	8	9
250	6	8	221	31	12	13	5	8

V. Gasfluss Rohdaten

Tabelle 22 Signalfäche (Area) der Analyten in Abhängigkeit vom Gasfluss (L/min); Messmethode V1407, Lösemittelstandard in Acetonitril 0,25 ng/uL.

Gasfluss [L/min]	Area Phthalimid	Area THPI	Area Diphenyla min	Area Hexythiaz ox	Area Acequinoc yl	Area Fenpyroxi mat	Area Milbemect inA3	Area Milbemect inA4
11	31561	11417	801527	10767	393517	126462	33598	44428
12	48957	16167	553295	13636	213874	90047	15541	22157
13	52312	16475	536121	17561	226228	70502	23334	26512
14	39295	16797	589877	20466	193569	83168	23074	31070
15	44685	14070	622404	22427	163786	85248	18773	27618
16	37297	12631	616712	26837	76000	93400	14256	24949
17	37360	13635	512134	30215	52085	90141	8833	15834
18	54550	17874	479337	24619	21335	86295	3502	8475
19	55444	21503	518784	24937	8679	77866	1821	3998
20	46553	22006	382764	12945	6074	81150	1086	2113

Tabelle 23 Signal-to-Noise Ratio der Analyten in Abhängigkeit vom Gasfluss (L/min); Messmethode V1407, Matrixstandard 0,5 mg/kg.

Gasfluss [L/min]	SNR Phthalimid	SNR THPI	SNR Diphenyla min	SNR Hexythiaz ox	SNR Acequinoc yl	SNR Fenpyroxi mat	SNR Milbemect inA3	SNR Milbemect inA4
11	4	5	24	16	13	58	12	16
12	4	6	118	18	28	12	7	7
13	5	7	188	28	14	13	7	9
14	6	8	225	27	10	14	10	7
15	8	9	248	32	15	12	6	13
16	10	11	247	39	10	15	5	9
17	9	11	256	38	52	19	6	8
18	7	15	163	22	30	19	2	8
19	13	16	225	33	13	24	1	6
20	15	18	324	19	16	31	2	4

VI. iFunnel Rohdaten

Tabelle 24 iFunnel-Rohdaten mit High-Pressure- und Low-Pressure-Spannungen HP (V) und LP (V) sowie Area der Analyten Acequinocyl, Diphenylamin, Fenpyroximat, Hexythiazox, MilbemectinA3, MilbemectinA4, Phthalimid, THPI. Messbedingungen: Lösemittelstandard in Acetonitril 0,025 ng/ μ L, Methode V1407.

HP [V]	LP [V]	Area Phthalimid	Area THPI	Area Diphenylam in	Area Hexythiazox	Area Acequinocyl	Area Fenpyroximat	Area Milbeme ctinA3	Area Milbeme ctinA4
100	30	15948	13645	422373	23185	123437	83830	9398	9620
100	85	39295	30567	676771	43033	151407	102600	17534	13401
105	65	33961	32364	628017	39785	174451	78401	16900	16552
110	75	36639	35551	576247	33284	161018	84420	15544	17169
120	70	42040	40280	582029	35994	175167	94796	18311	17580
130	105	43127	37584	694157	32035	168932	102657	19212	19765
130	90	42023	34771	655975	36824	187247	102238	16227	22385
135	40	32408	27829	689547	32936	187054	106414	15088	21466
135	70	41071	34981	776635	35142	232248	115138	18239	25856
140	135	38012	30032	757524	26855	242348	112318	21918	27881
150	125	39546	29524	831489	28253	229780	122719	22727	30248
150	75	39814	33215	771792	33337	257197	111453	22676	28031
155	95	38720	33292	741777	30896	224242	106766	23414	29544
170	155	25879	14356	569643	13828	215789	109294	23248	34240
170	45	34370	28128	717104	27338	239877	98596	16057	29330
170	60	34633	31484	775978	26400	241879	99745	18990	30986
185	110	42386	29869	766648	27192	249537	117132	21281	32856
190	130	31823	27903	700181	18067	214287	102277	21519	35107
195	75	38410	30055	749407	23757	220439	94626	18616	37031
200	185	7029	2393	140579	1183	94396	92326	21250	39270
40	40	10508	9367	235396	15574	120745	45474	9157	11163
50	50	12879	12062	294886	20221	129752	49910	12081	12385
60	30	8731	6317	238409	20804	111224	51528	7809	11081
60	60	16845	13538	374555	26587	165606	57636	12772	18072
70	60	22225	16076	508413	29485	211877	66779	13660	20273
80	40	24024	16310	526102	32171	203971	78417	14076	17880

Tabelle 25 iFunnel-Rohdaten mit High-Pressure- und Low-Pressure-Spannungen HP (V) und LP (V) sowie Area der Analyten Acequinocyl, Diphenylamin, Fenpyroximat, Hexythiazox, MilbemectinA3, MilbemectinA4, Phthalimid, THPI. Messbedingungen: Matrixstandard 0,5 mg/kg, Methode V1407.

HP [V]	LP [V]	SNR Phthalimi d	SNR THPI	SNR Diphenylami n	SNR Hexythiazo x	SNR Acequinocy l	SNR Fenpyroxima t	SNR Milbemecti nA3	SNR Milbemecti nA4
100	30	7	12	229	32	124	22	4	7
100	85	8	13	279	53	116	21	4	10
105	65	7	9	366	56	96	23	5	13
110	75	7	11	313	60	103	30	4	12
120	70	8	19	216	37	116	27	6	11
130	105	9	11	257	24	53	27	7	10
130	90	7	9	290	41	101	25	6	15
135	40	11	8	280	41	62	33	4	17
135	70	10	17	235	51	74	26	5	14
140	135	9	11	415	25	38	31	5	15
150	125	10	7	309	26	48	27	6	15
150	75	10	10	320	37	47	26	5	18
155	95	9	18	286	34	35	27	5	21
170	155	6	7	280	13	64	26	5	19
170	45	10	9	394	40	30	32	4	15
170	60	7	12	293	27	53	29	4	16
185	110	10	13	243	17	54	29	6	16
190	130	9	15	281	13	50	30	6	18
195	75	9	10	255	19	35	18	4	16
200	185	5	3	180	1	58	20	6	27
40	40	5	18	127	27	42	27	3	13
50	50	6	13	206	42	54	22	7	16
60	30	5	7	203	32	54	23	2	10
60	60	3	14	201	42	42	25	4	15
70	60	6	12	236	38	54	30	5	16
80	40	5	6	178	51	33	29	4	17

VII. Arbeitsbereich Rohdaten

Tabelle 26 Arbeitsbereich für die untersuchten Analyten mit Rohdaten der Response Rate (RR) in Abhängigkeit von Konzentration in Lösung (ng/μL) und berechnetem Gehalt (mg/kg) für Matrixstandardlösungen von 0,04 mg/kg bis 30 mg/kg gemäß Messmethode V1508B. Analyten: Acequinocyl, Diphenylamin, Hexythiazox, Phthalimid, THPI. Felder mit „AR“ kennzeichnen Ausreißer, die nach dem Grubbs-Test identifiziert wurden.

Konz [ng/μL]	C [mg/kg]	RR Phthalimid	RR THPI	RR Diphenylamin	RR Hexythiazox	RR Acequinocyl
0,0020	0,04	0,0159	0,0155	0,1885	0,006	0,1586
0,0025	0,05	0,0237	0,0158	0,2238	0,0079	0,2190
0,0050	0,10	0,0442	0,0308	0,4257	0,016	0,4687
0,0075	0,15	0,0900	0,0545	0,7214	0,027	0,7970
0,0100	0,20	0,1118	0,0790	0,8793	0,036	1,1340
0,0200	0,40	0,2247	0,1305	1,9947	0,064	2,2171
0,0600	1,2	0,6824	0,4274	5,2095	0,205	6,7902
0,0800	1,6	0,9025	0,6528	7,1393	0,308	9,2258
0,125	2,5	1,2873	0,9309	11,6312	0,417	13,9188
0,150	3,0	1,7069	1,2653	14,1015	0,473	17,0043
0,175	3,5	2,0737	1,3301	15,8540	0,527	21,2057
0,225	4,5	2,5447	1,9817	19,6535	0,739	25,5648
0,275	5,5	3,2011	2,2307	25,1988	0,952	35,7069
0,350	7,0	4,5667	2,7897	32,7297	1,282	AR
0,450	9,0	5,1948	3,8573	43,0618	1,724	61,0503
0,60	12,0	AR	5,4581	64,5512	2,341	78,2779
0,80	16,0	9,3348	7,0894	86,9031	AR	110,3110
1,00	20,0	12,3575	9,0995	105,2069	3,938	137,1253
1,25	25,0	AR	AR	129,0055	4,706	AR
1,50	30,0	18,3735	13,7058	160,9641	5,586	AR

Tabelle 27 Arbeitsbereich für die untersuchten Analyten mit Rohdaten der Response Rate (RR) in Abhängigkeit von Konzentration in Lösung (ng/μL) und berechnetem Gehalt (C) (mg/kg) für Matrixstandardlösungen von 0,04 mg/kg bis 30 mg/kg gemäß Messmethode V1508B. Analyten: Captan, Fenpyroximat, Folpet, MilbemectinA3, MilbemectinA4. Felder mit „AR“ kennzeichnen Ausreißer, die nach dem Grubbs-Test identifiziert wurden.

Konz [ng/μL]	C [mg/kg]	RR MilbemectinA3	RR MilbemectinA4	RR Folpet	RR Captan	RR Fenpyroximat
0,0020	0,04	0,0113	0,0164	0,0082	0,0056	0,0115
0,0025	0,05	0,0137	0,0216	0,0113	0,0065	0,0148
0,0050	0,10	0,0244	0,0401	0,0345	0,0198	0,0495
0,0075	0,15	0,0380	0,0534	0,0551	0,0270	0,0611
0,0100	0,20	0,0539	0,0814	0,0876	0,0338	0,0832
0,0200	0,40	0,1078	0,1553	0,1389	0,0633	0,2243
0,0600	1,2	0,3095	0,4507	0,4142	0,1915	0,6544
0,0800	1,6	0,4368	0,6138	0,5951	0,3043	0,8914
0,125	2,5	0,6602	0,9258	0,9399	0,4177	1,3206
0,150	3,0	0,7891	1,1081	1,3213	0,4873	1,5842
0,175	3,5	1,0484	1,4478	1,3096	0,6329	2,3344
0,225	4,5	1,2474	1,8509	2,0707	0,7965	2,5499
0,275	5,5	1,7330	2,5021	2,2327	0,9861	3,1458
0,350	7,0	2,0174	2,9147	3,5141	1,3818	3,9850
0,450	9,0	AR	AR	3,8606	1,7629	6,2342
0,60	12,0	3,3722	4,9202	5,6389	AR	AR
0,80	16,0	4,7545	6,9002	7,2267	3,5722	11,0416
1,00	20,0	5,6430	8,6421	AR	AR	14,4338
1,25	25,0	AR	AR	11,6865	5,1665	17,2953
1,50	30,0	AR	AR	13,7133	6,3752	AR

VIII. Zuordnung der internen Standards

Die untere Tabelle zeigt die über Flächen bestimmte WDF auf dem Gehaltsniveau 0,1 mg/kg sowie die daraus abgeleitete Zuordnung passender IS. Für Captan und Folpet wurde zusätzlich ihre chemische Ähnlichkeit zu den isotoopenmarkierten IS von THPI und Phthalimid berücksichtigt.

Tabelle 28 Zuordnung interner Standards (IS) auf Basis der Wiederfindung (WDF) aus Matrixkalibrierung und Dotierungen auf dem Gehaltsniveau L2 (0,1 mg/kg, n = 3). Angegeben sind die bestimmten Detektorantworten als Signalfäche (Area) in Dotierungen und Matrixstandards sowie die daraus abgeleitete WDF.

CompundName	mean Area IS	Area L2a	Area L2b	Area L2c	WDFArea [%]	ISTD
Captan	2608	2049	2007	2024	78	THPI [IS]
MilbemectinA3	3522	2948	2598	2809	79	THPI [IS]
MilbemectinA4	4820	3849	3636	3939	79	THPI [IS]
THPI	5233	4910	4253	4851	89	THPI [IS]
Hexythiazox	7634	6838	6587	7781	93	Pyriproxyfen [IS]
Diphenylamin	84426	85181	85695	87415	102	Pyrimethanil [IS]
Fenpyroximat	7845	7114	7748	8853	101	Pyrimethanil [IS]
Acequinocyl	68540	46455	48554	49548	70	Phthalimid [IS]
Folpet	7402	5713	5506	6094	78	Phthalimid [IS]
Phthalimid	10498	7780	7931	7304	73	Phthalimid [IS]
Fipronil [IS]	70054	66893	64127	66009	94	–
Phthalimid [IS]	104287	71960	70609	70075	68	–
Pyrimethanil [IS]	93353	86701	88815	92762	96	–
Pyriproxyfen [IS]	207826	187998	176972	195603	90	–
THPI [IS]	70509	63157	56927	65291	88	–

IX. Ion-Ratio Rohdaten

Tabelle 29 Ion-Ratio (QIR) der Analyten für MxCal und Level 3 (a–c); Messmethode V1508B, Matrixstandard 1 mg/kg.

Compound Name	QIR MxCal [%]	QIR L3 a [%]	QIR L3 b [%]	QIR L3 c [%]
Acequinocyl	20	20	20	19
Phthalimid	225	182	181	213
THPI	91	78	85	70
Hexythiazox	80	91	88	98
Fenpyroximat	61	55	54	56
Diphenylamin	25	26	25	25
MilbemectinA3	84	80	70	69
MilbemectinA4	51	56	52	57
Captan	56	53	49	50
Folpet	341	261	284	337

X. Matriceffekte der finalen Methode Rohdaten

Tabelle 30 Signalfächen bestimmt aus acht Standards für Captan Folpet und restlichen APCI–Milbemectin Mix zusammengefasst. Gemessen mit der Ausgangsmethode und der finalen Validierungsmethode.

Compound Name	Area V0607 Cal (C=1 mg/kg)	Area V0607 MxCal (C=1 mg/kg)	Area V1508B Cal (C=0,2 mg/kg)	Area V1508B MxCal (C=0,2 mg/kg)
THPI	62405	14791	15474	14198
Phthalimid	145777	75553	22132	32241
Diphenylamin	422972	679213	148462	186463
Captan	34590	30329	14754	14299
Folpet	53250	33007	23662	31463
Hexythiazox	24478	24845	20540	19302
MilbemectinA3	29241	15385	10373	8739
Fenpyroximat	59010	32755	14670	14118
MilbemectinA4	40088	29589	12068	9605
Acequinocyl	217164	203872	134017	127218

XI. Aufarbeitung Rohdaten

Tabelle 31 Response–Ratios (RR) der Aufarbeitung bei Dotierleveln von 0,05 mg/kg bis 1,0 mg/kg als Grundlage für die Berechnung von Wiederfindung und Gehalt. Eingetragen sind die Einzelwerte der aufgearbeiteten Dotierungen (DOT a–f) sowie die zusammengefassten Werte für den Matrixstandard (mean RR MxCal).

Analyt	DOT–Level [mg/kg]	mean RR MxCal	RR DOT a	RR DOT b	RR DOT c	RR DOT d	RR DOT e	RR DOT f
Acequinocyl	0,05	0,2464	0,2231	0,2114	0,2282	0,2322	0,2771	0,2274
Phthalimid	0,05	0,0492	0,0519	0,0506	0,0550	0,0546	0,0569	0,0495
THPI	0,05	0,0357	0,0361	0,0422	0,0388	0,0379	0,0384	0,0412
Hexythiazox	0,05	0,0162	0,0172	0,0171	0,0174	0,0174	0,0175	0,0175
Fenpyroximat	0,05	0,0304	0,0345	0,0331	0,0331	0,0311	0,0331	0,0331
Diphenylamin	0,05	0,4471	0,4344	0,4312	0,4346	0,4388	0,4422	0,4740
MilbemectinA3	0,05	0,0200	0,0212	0,0215	0,0238	0,0212	0,0234	0,0202
MilbemectinA4	0,05	0,0329	0,0314	0,0260	0,0303	0,0287	0,0255	0,0296
Captan	0,05	0,0167	0,0163	0,0189	0,0196	0,0172	0,0177	0,0187
Folpet	0,05	0,0295	0,0275	0,0276	0,0271	0,0287	0,0269	0,0243
Acequinocyl	0,10	0,7075	0,7020	0,6674	0,7095	0,7017	0,6797	0,7290
Phthalimid	0,10	0,1084	0,1120	0,1010	0,1118	0,1186	0,1044	0,1029
THPI	0,10	0,0822	0,0785	0,0811	0,0885	0,0896	0,0830	0,0891
Hexythiazox	0,10	0,0343	0,0374	0,0368	0,0333	0,0406	0,0386	0,0384
Fenpyroximat	0,10	0,0844	0,0788	0,0843	0,0883	0,0863	0,0922	0,0921
Diphenylamin	0,10	0,9082	0,9955	0,9660	0,9895	0,9415	0,8760	0,9845
MilbemectinA3	0,10	0,0528	0,0442	0,0502	0,0446	0,0463	0,0444	0,0482
MilbemectinA4	0,10	0,0722	0,0593	0,0609	0,0598	0,0678	0,0659	0,0688
Captan	0,10	0,0387	0,0374	0,0406	0,0394	0,0397	0,0379	0,0397
Folpet	0,10	0,0741	0,0688	0,0796	0,0776	0,0707	0,0781	0,0778
Acequinocyl	1,0	8,1914	7,5122	7,6731	7,8908	7,6547	8,5371	7,3904
Phthalimid	1,0	0,9631	0,9876	1,0057	0,9798	0,9912	1,0307	1,0266
THPI	1,0	0,8185	0,8730	0,8374	0,8589	0,8473	0,8200	0,8259
Hexythiazox	1,0	0,4039	0,3684	0,3566	0,3846	0,4413	0,3947	0,4128
Fenpyroximat	1,0	1,2538	1,1396	1,1321	1,2419	1,1205	1,1308	1,1099
Diphenylamin	1,0	9,6750	9,3519	9,5786	8,8517	9,9541	9,3348	10,0520
MilbemectinA3	1,0	0,5298	0,4715	0,4884	0,5300	0,5327	0,5142	0,5059
MilbemectinA4	1,0	0,8449	0,7765	0,7624	0,7500	0,7236	0,7596	0,7915
Captan	1,0	0,3863	0,4070	0,4028	0,4159	0,3934	0,3697	0,4065
Folpet	1,0	0,6506	0,6533	0,6770	0,6588	0,6471	0,6866	0,6534

Erklärungen

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit ohne fremde Hilfe selbständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht.

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass ein Exemplar meiner Bachelor-Thesis in die Bibliothek des Fachbereichs aufgenommen wird; Rechte Dritter werden dadurch nicht verletzt.

Hamburg, den 22.09.2025

Unterschrift des Studierenden

A large black rectangular box redacting the signature of the student.