

Pesticides Screening in Drinking Water by 2D LC/QToF

Jacob Samuel, Boston University School of Medicine, Biomedical Forensic Sciences
Sabra Botch-Jones, Boston University School of Medicine, Biomedical Forensic Sciences
Claude Mallet, Workflow Integration Group, Waters Corporation



Enrichment Extraction Protocol Class A (Circa 1990)



← During Graduate Years

Enrichment Extraction Protocol Class A (Circa 2013)



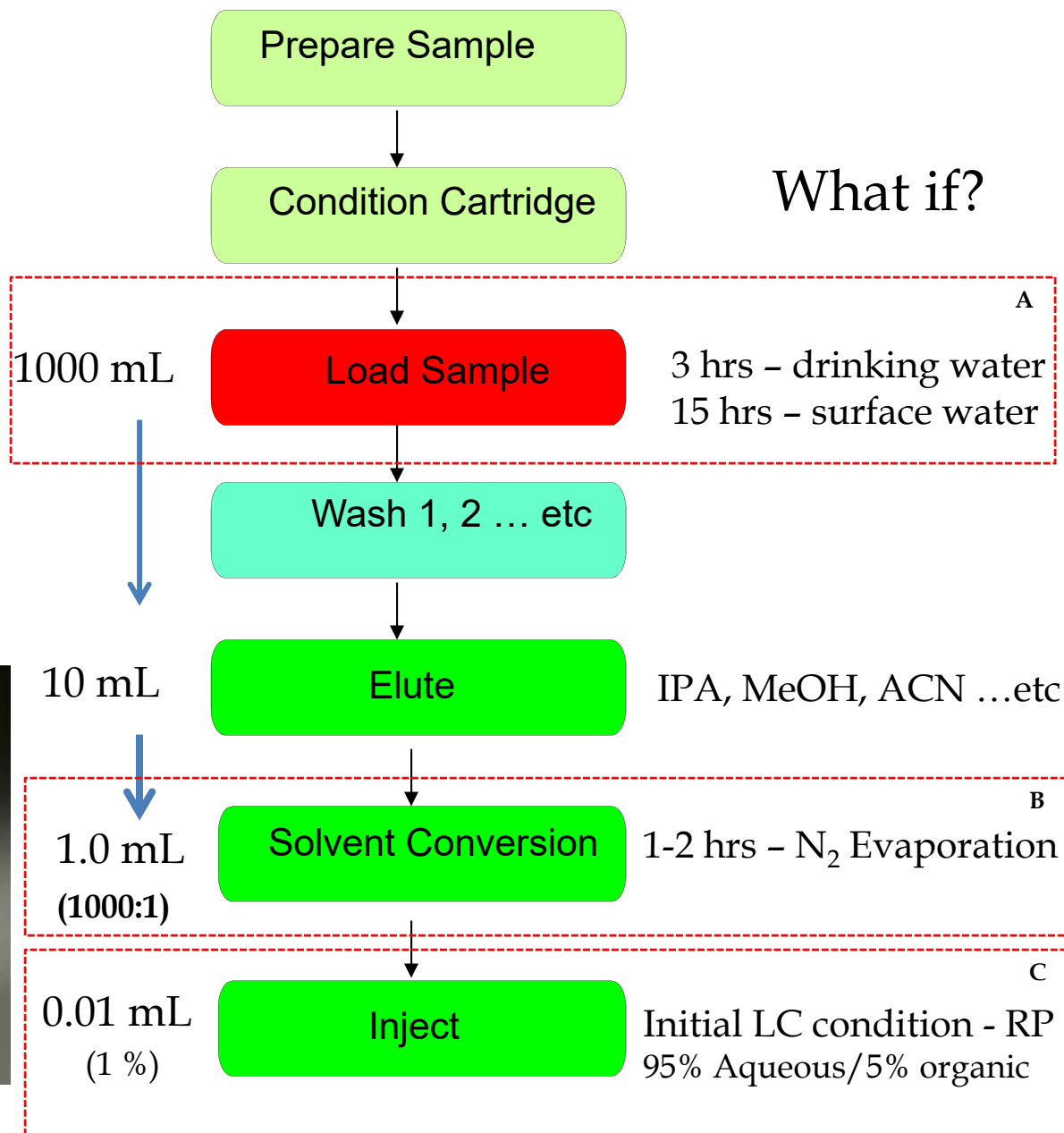
During Industrial Years →

The “dreadful” Extraction Procedure

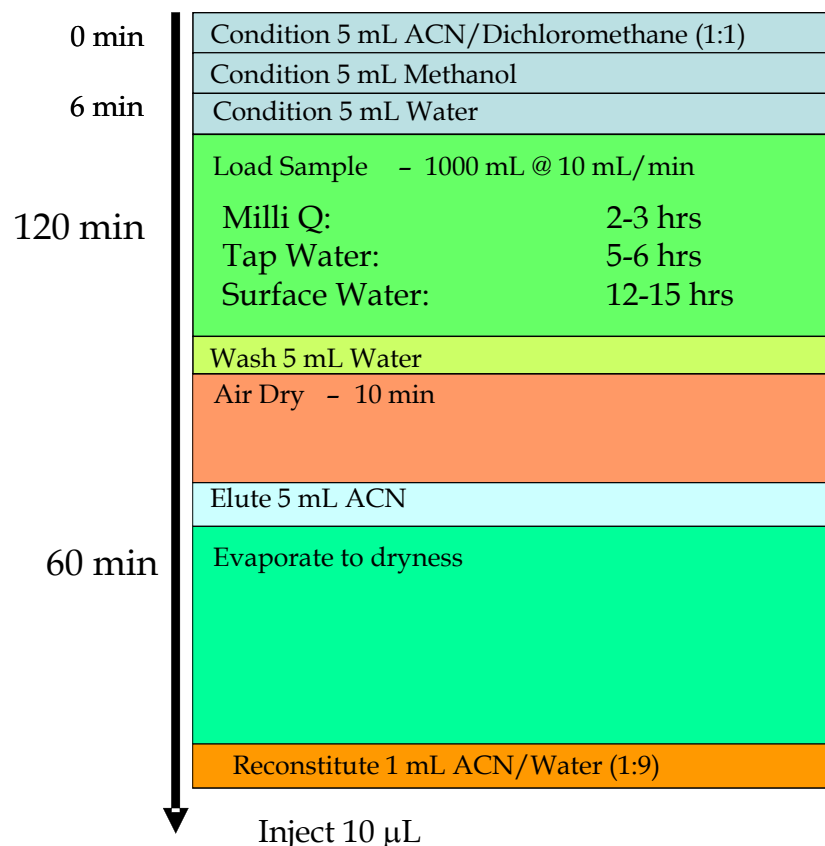
SPE Barrels



SPE Extraction Manifold

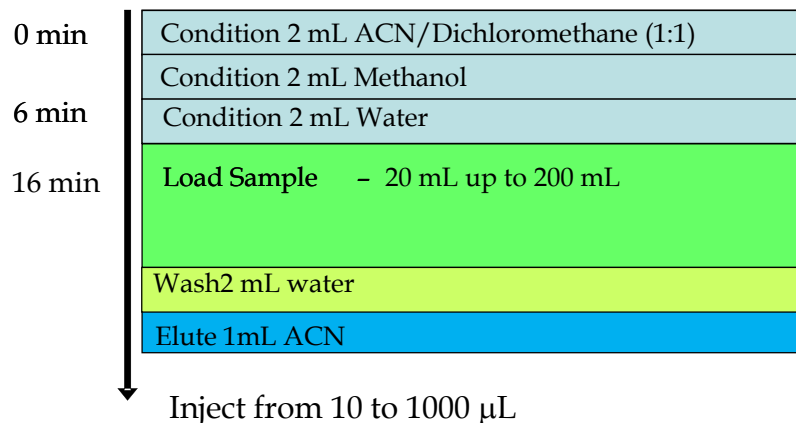


Macro vs Micro Extraction Protocol



3.0 to 15 hrs

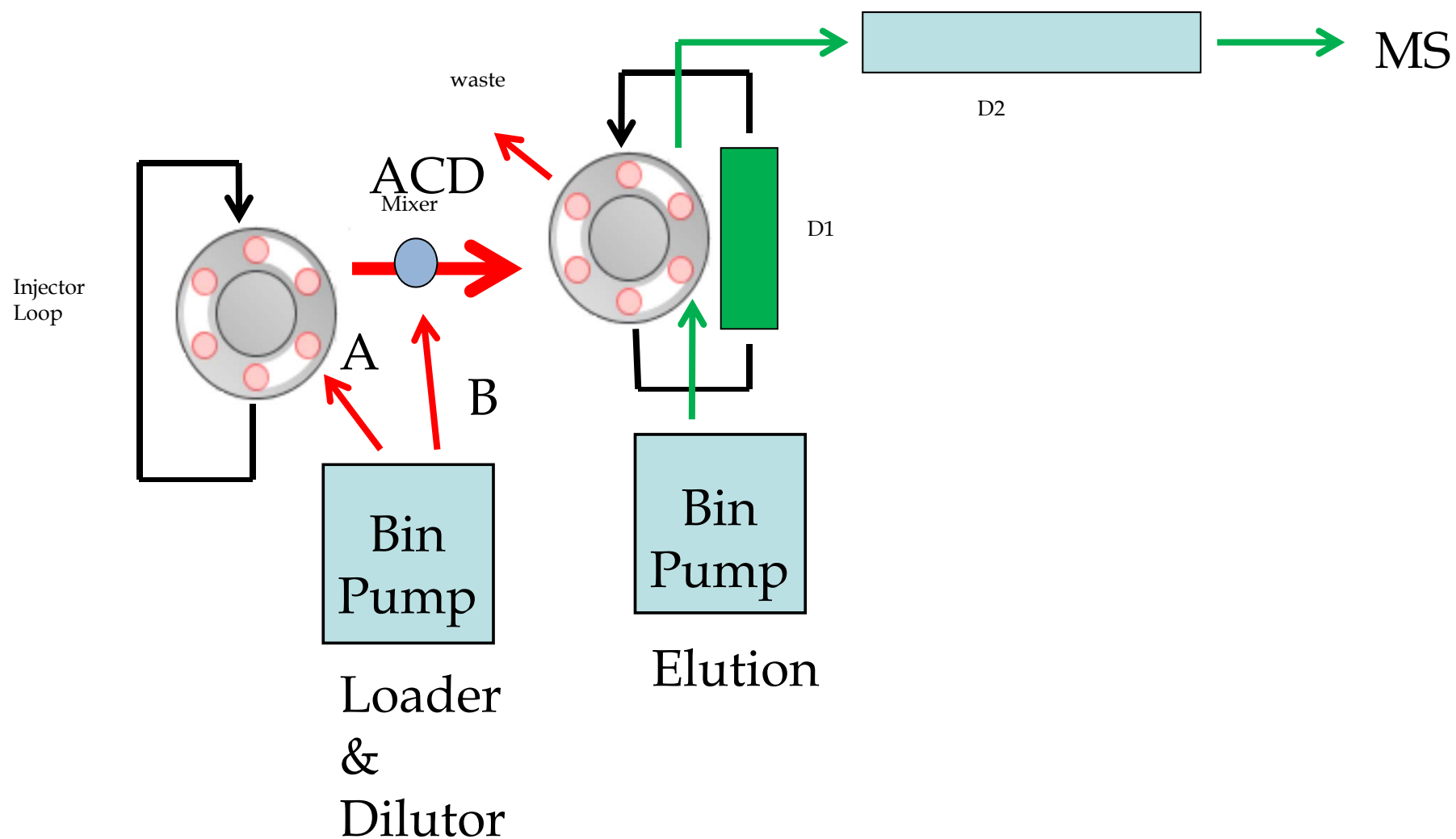
1000:1 enrichment from sample protocol
1% of final extract use for analysis



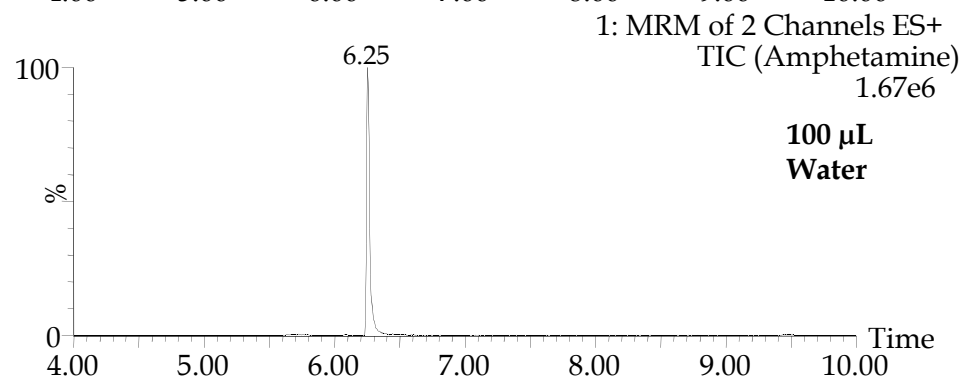
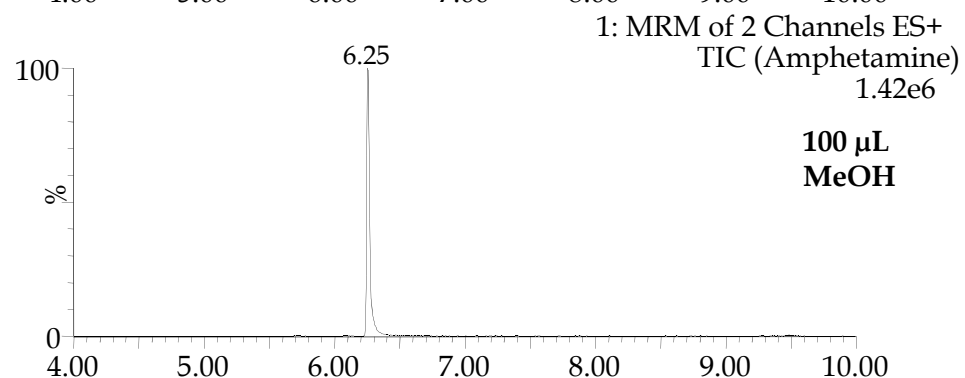
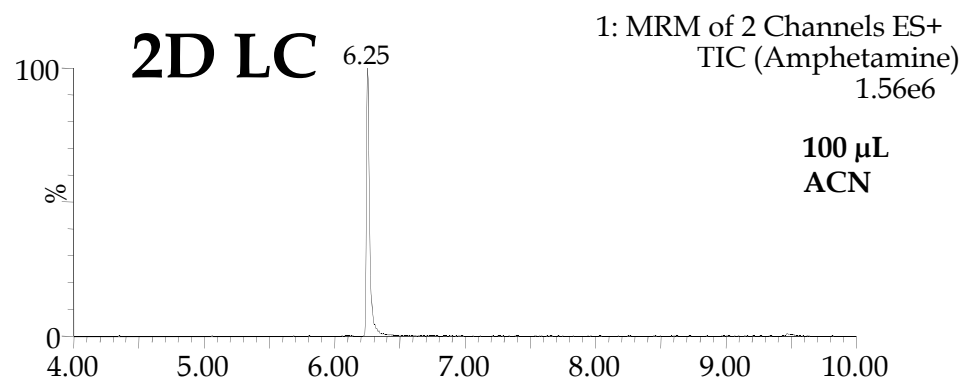
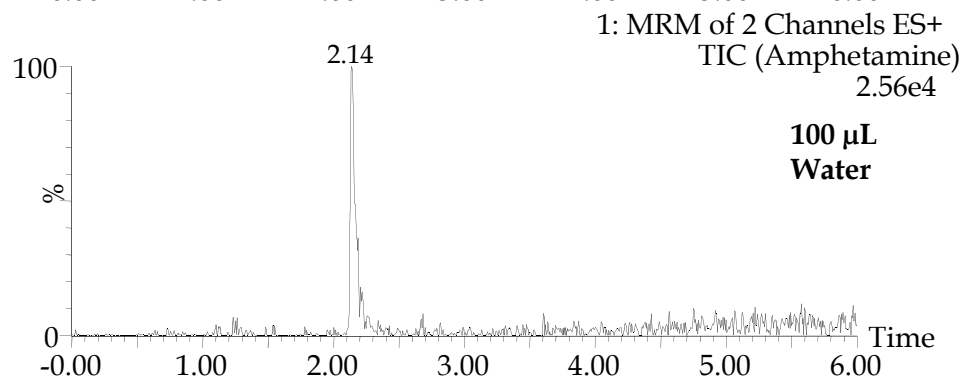
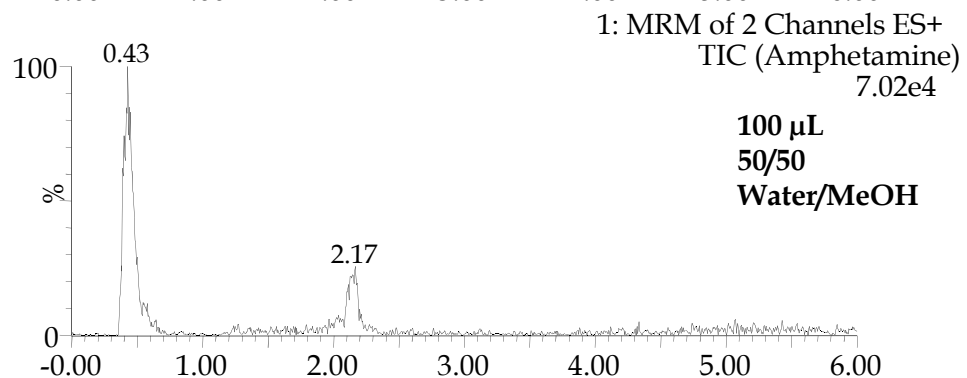
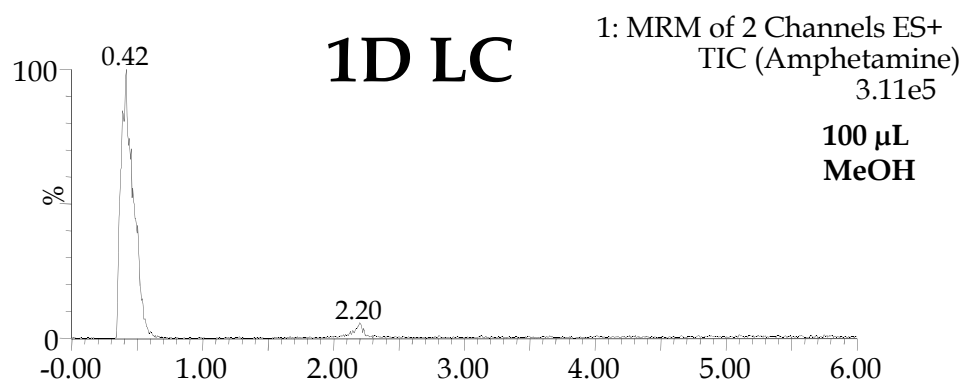
30 min

20:1 enrichment from sample protocol
100:1 enrichment from injection volume
2000:1 final enrichment
Up to 100% of final extract use for analysis

2D LC AT Column Dilution – Hardware



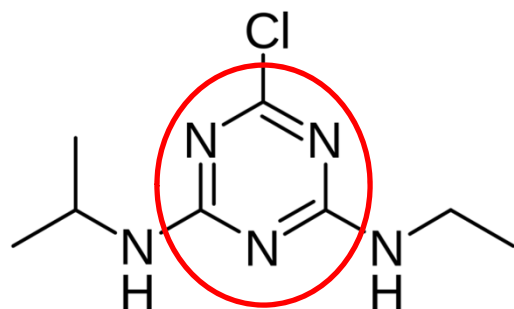
1D vs 2D Workflow Parameters



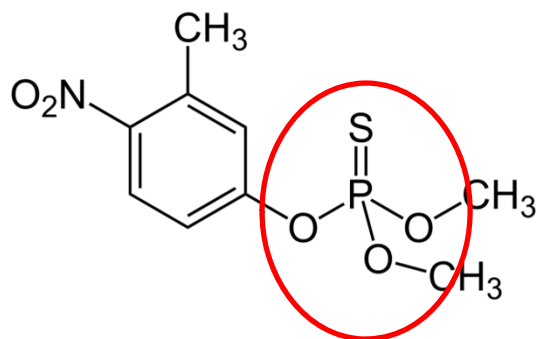
What's next? How to optimize?

OP's	Carbamate	Phenyl Urea	Triazole	Triazine
Azinphos-methyl	Carbofuran	Diuron	Carbendazim	Atrazine
Azinphos-ethyl	Carbofuran 3-keto	Linuron	Cyproconazole	Atrazine Desethyl
Mevinphos	Carboruran 3-hydroxy	Monolinuron	Propiconazole	Atrazine Desisopropyl
Parathion	Methiocarb	Monuron	Tebuconazole	Atrazine Desisopropyl 2- hydroxy
Parathion-methyl	Prosulfocarb	Chlortoluron	Difenoconazole	Atrazine Desethyl desisopropyl
Propetamphos	Cabetamide	Isoproturon	Ketoconazole	Atrazine Desethyl Desisopropyl 2- hydroxy
Dichlorovos	Aminocarb	Metoxuron	Itraconazole	Propazine
Dimethoate	Carbaryl	Metsulfuron-Methyl	Voriconazole	Simazine
Malathion	Fenubucarb	Thifensulfuron-methyl	Posaconazole	Terbutryn
Diazinon	Oxamyl	Buturon	Ravuconazole	Trietazine
Fenitrothion	Aldicarb	Chlorbromuron		Ametryn
Dicrotophos	Aldicarb-Sulfoxide	Chloroxuron	10	Prometryn
Chlorpyrifos	Aldicarb-Sulfone	Difenoхuron		Terbuthylazine
13	Fenoxycarb	Dimefuron		Simetryn
	14	Fenuron		14
		Fluometuron		
		Metobromuron		
		Siduron		
		Thidiazuron		
		20		
Others				
Bromoxynil				
Propyzamide				
Diflufenican				
Flufenacet				
Chloridazon				
Flusilazole				
Asulam				
Bentazon				
Florasulam				
Pendimethalin				
10				
Total of 91				

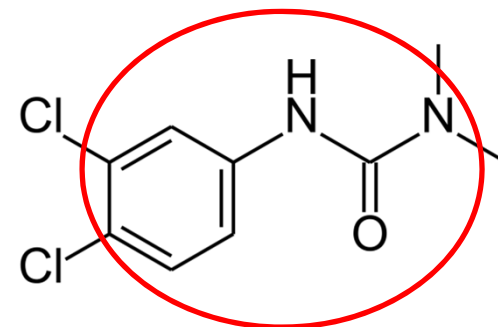
Triazines



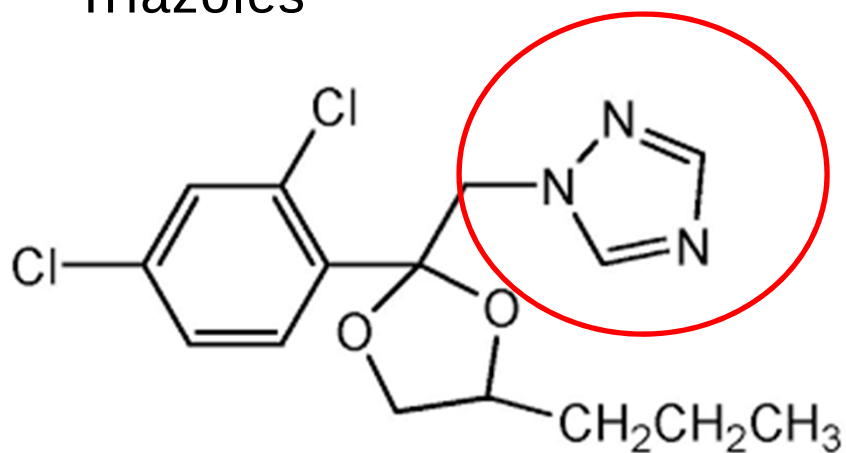
Organophosphorous



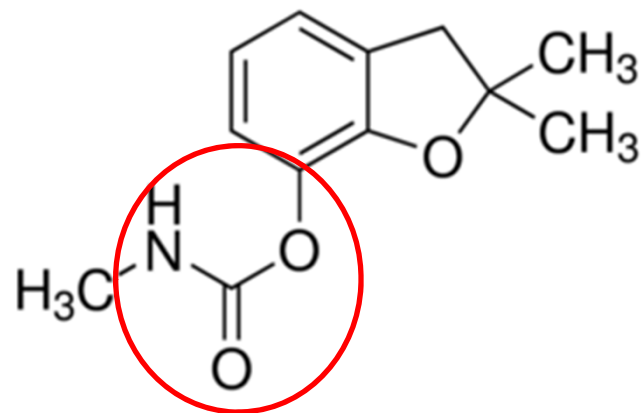
Phenyl Urea



Triazoles



Carbamates



Wide selection of chemical and physical properties

2D LC & Trap Column - Hardware

2D UPLC

2.1 x 20 mm



2.1 x 30 mm



Trap Column

> 10 μm particle

2.0 μm Fritz



Analytical Column

2.1 x 50 mm – UPLC

1.7 μm particle

0.2 μm Fritz

0.1 – 1 mL/min flow rate

2D Workflow – Method Optimization

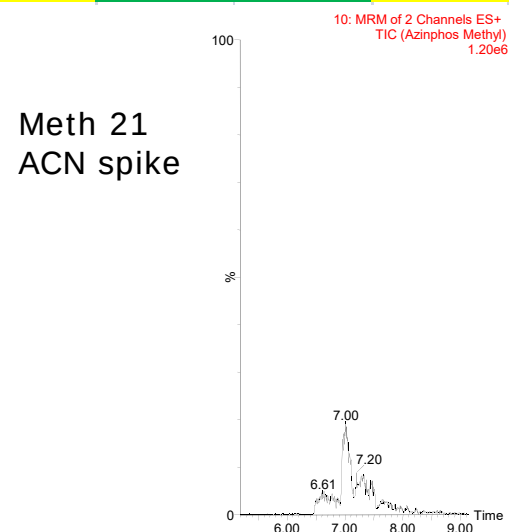
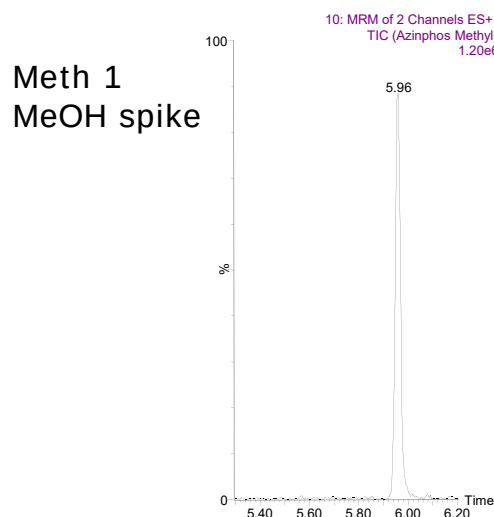
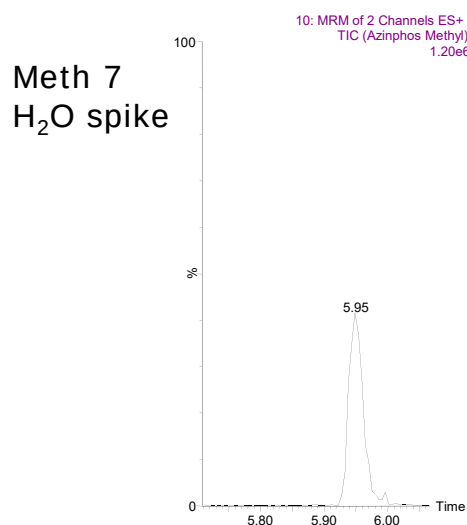
Loading pH Condition	Loading Chemistries	Eluting Chemistries	Eluting Organic & pH Condition
pH 3 (2% FA)	Polymer (20 µm) (high retention)	C₁₈ (1.7 µm)	Low pH mobile phase (0.5 % FA, pH 3.2)
pH 7 (no additive)	Si-C₁₈ (10 µm) (intermediate retention)	C ₈ (1.7 µm)	Hi pH mobile phase (0.5 % NH ₄ OH, pH 10)
pH 10 (2% NH ₄ OH)	Si-C₈ (10 µm) (low retention)	HSS T3	Ion Pair mobile phase 20 mM NH ₄ Formate pH 3.2 20 mM NH ₄ Acetate pH 5.2 20 mM NH ₄ Bicarbonate pH 10 Elution Strength Methanol , Acetonitrile , Acetone

> 400 possible permutations: Start with top 36 methods

2D Workflow – Method Optimization

Analyte vs 36 methods

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Azinphos-methyl(Water)	e5	e6	e5	e5	e5	e4	e5	e5	e5
Azinphos-methyl(ACN)	e6	e6	e5	e5	e5	e5	e6	e6	e5
Azinphos-methyl(MeOH)	e6	e6	e5	e5	e5	e5	e6	e6	e5
	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Azinphos-methyl(Water)	e5	e5	e5	e5	e5	e5	e5	e5	e5
Azinphos-methyl(ACN)	e6	e6	e5	e5	e5	e5	e6	e5	e5
Azinphos-methyl(MeOH)	e6	e6	e5	e6	e5	e5	e6	e6	e5
	19	20	21	22	23	24	25	26	27
Azinphos-methyl(Water)	e5	e5	tail	e5	e5		e5	e5	tail
Azinphos-methyl(ACN)	e5	e6	tail	e5	e6	blob	e5	e6	tail
Azinphos-methyl(MeOH)	e5	e6	tail	e5	e6	blob	e5	e6	tail
	28	29	30	31	32	33	34	35	36
Azinphos-methyl(Water)	e5	e5	tail	e5	e5	tail	e5	e5	RB
Azinphos-methyl(ACN)	e6	e6	tail	e5	e6	tail	e5	e6	tail
Azinphos-methyl(MeOH)	e6	e6	tail	e5	e6	tail	e5	e6	tail



2D Workflow – Method Optimization

Classes vs 36 methods

Organophosphorous

Azinphos-methyl(Water)

Azinphos-methyl(ACN)

Azinphos-methyl(MeOH)

Carbarmate

Carbofuran(Water)

Carbofuran(ACN)

Carbofuran(MeOH)

Phenyl Urea

Diuron(Water)

Diuron(ACN)

Diuron(MeOH)

Triazole

Carbendazim(Water)

Carbendazim(ACN)

Carbendazim(MeOH)

Triazine

Atrazine(Water)

Atrazine(ACN)

Atrazine(MeOH)

Others

Bromoxynil(Water)

Bromoxynil(ACN)

Bromoxynil(MeOH)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Azinphos-methyl(Water)	e5	e6	e5	e5	e5	e4	e5	e5	e5
Azinphos-methyl(ACN)	e6	e6	e5	e5	e5	e5	e6	e6	e5
Azinphos-methyl(MeOH)	e6	e6	e5	e5	e5	e5	e6	e6	e5
Carbarmate	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Carbofuran(Water)	e8	e8	e7	e8	e8	e8	e8	e8	e8
Carbofuran(ACN)	e8	e8	e7	e8	e8	e8	e8	e8	e8
Carbofuran(MeOH)	e8	e8	e8	e8	e8	e8	e8	e8	e8
Phenyl Urea	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Diuron(Water)	e6	e6	e6	e7	e6	e7	e6	e7	e7
Diuron(ACN)	e6	e6	e6	e7	e7	e7	e7	e7	e7
Diuron(MeOH)	e6	e6	e6	e7	e7	e7	e7	e7	e7
Triazole	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Carbendazim(Water)			e5	e6	e5	e6	e5	e4	e6
Carbendazim(ACN)			e5	e5	e6	e6			e6
Carbendazim(MeOH)			e5	e6	e6	e6	e4	e4	e6
Triazine	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Atrazine(Water)	e6	e6	e6	e8	e8	e8	e7	e8	e7
Atrazine(ACN)	e6	e6	e6	e8	e8	e8	e7	e8	e7
Atrazine(MeOH)	e6	e6	e6	e8	e8	e8	e7	e8	e7
Others	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Bromoxynil(Water)							e4 MP	split	e4 MP
Bromoxynil(ACN)							e4 MP	split	e4 MP
Bromoxynil(MeOH)							e4 MP	split	e4 MP

2D Workflow – Method Optimization

One Class vs 36 methods

	Azinphos-Methyl		Azinphos-Ethyl		Mevinphos		Parathion		Parathion-Methyl		Propetamphos			Dichlorvos		Dimethoate		Malathion			Diazinon		Fenitrothion		Dicrotophos		Chlorpyrifos				
	MeOH	ACN	MeOH	ACN	MeOH	ACN	MeOH	ACN	MeOH	ACN	MeOH	ACN	MeOH	ACN	MeOH	ACN	MeOH	ACN	MeOH	ACN	MeOH	ACN	MeOH	ACN	MeOH	ACN	MeOH	ACN			
ACN pH 3																															
1- C8 pH 3	e6	e6	e6	e6	e6	e7	e6	e6	e5	e5	e6	e6	e6	e6	e6	e7	e7	e7	e7	e8	e8	e6	e6	e7	e8	e7	e7			13	
2- C18 pH 3	e6	e6	e6	e6	e6	e6	e6	e6	e5	e5	e6	e6	e6	e6	e6	e7	e7	e7	e7	e8	e8	e5	e5	e7	e8	e7	e7			13	
3- HLB pH3	e5	e5	e5	e6	e7	e6	e6	e5	e5	e5	e6	e6	e6	e6	e6	e7	e7	e7	e7	e8	e8	e5	e5		e7	e6	e6			13	
4- C8 pH 7	e5	e5	e6	e6	e6	e7	e6	e6	e6	e5	e6	e6	e6	e6	e6	e6	e7	e8	e8	e8	e6	e6	e7	e8	e7	e7				13	
5- C18 pH 7	e5	e5	e6	e6	e6	e6	e6	e6	e5	e6	e6	e6	e7	e7	e7	e7	e7	e8	e8	e6	e6	e8	e8	e7	e8	e7	e7			13	
6- HLB pH 7	e5	e5	e5	e5	e6	e7	e6	e6	e5	e5	e5	e5	e6	e6	e6	e7	e7	e7	e8	e8	e5	e5	e7	e7	e6	e5				13	
7- C8 pH 10	e6	e6	e6	e6	e6	e7	e6	e6	e5	e5	e6	e6	e6	e6	e7	e6	e8	e8	e8	e8	e6	e6	e7	e8	e7	e7				13	
8- C18 pH 10	e6	e6	e6	e6	e6	e6	e6	e6	e5	e5	e6	e6	e6	e6	e7	e7	e8	e8	e8	e8	e6	e6	e7	e8	e7	e7				13	
9- HLB pH 10	e5	e5	e5	e5	e6	e7	e6	e6	e5	e5	e5	e5	e6	e6	e7	e7	e7	e7	e7	e8	e8	e5	e5	e7	e7	e7	e7				13
ACN pH 10																															
10- C8 pH 3	e6	e6	e6	e6	e7	e7	e6	e6	e5	e5	e6	e6	e6	e6	e6	e6	e8	e8	e8	e8	e5	e5	e7	e7	e7	e7				13	
11- C18 pH 3	e6	e6	e6	e6	e7	e7	e6	e6	e5	e5	e6	e6	e6	e6	e6	e7	e7	e8	e8	e8	e5	e5	e8	e8	e7	e7				13	
12- HLB pH 3	e5	e5	e6	e6	e7	e7	e5	e5	e4	e4	e6	e6	e6	e6	e6	e7	e7	e7	e7	e8	e8	e4	e5	e8	e8	e7	e7			12	
13- C8 pH 7	e5	e6	e6	e6	e7	e7	e6	e6	e4	e4	e6	e6	e6	e6	e6	e7	e7	e8	e8	e8	e8	e5	e5	e7	e8	e7	e7			12	
14- C18 pH 7	e5	e5	e6	e6	e7	e7	e6	e6	e5	e5	e6	e6	e6	e6	e7	e7	e7	e8	e8	e8	e8	e5	e5	e7	e8	e7	e7			13	
15- HLB pH 7	e5	e5	e5	e5	e7	e7	e5	e5	e4	e4	e6	e6	e6	e6	e6	e7	e7	e7	e7	e8	e8	e4	e5	e7	e8	e7	e7			12	
16- C8 pH 10	e6	e6	e6	e6	e6	e7	e6	e6	e4	e4	e6	e6	e6	e6	e6	e6	e7	e8	e8	e8	e8	e5	e5	e7	e7	e7	e7			12	
17- C18 pH 10	e5	e6	e6	e6	e7	e7	e6	e6	e4	e5	e6	e6	e5	e6	e7	e7	e8	e8	e8	e8	e5	e5	e7	e8	e7	e7				13	
18- HLB pH 10	e5	e5	e5	e5	e6	e7	e6	e6	e4	e4	e6	e6	e6	e6	e7	e7	e7	e7	e7	e8	e8		e5	e7	e8	e7	e7			12	
MeOH pH 3																															
19- C8 pH 3	e5	e5	e5	e5	e6	e6	e7	e7	e6	e6	e6	e6	e7	e7	e6	e6	e7	e7	e8	e8	e6	e6	e7	e7	e7	e7				13	
20- C18 pH 3	e6	e6	e6	e6			e7	e7	e6	e6	e6	e6	e7	e7		e6	e8	e7	e8	e8	e6	e6	e7	e7	e8	e8				12	
21- HLB pH3			e5	e5			e6	e6																e7						3	
22- C8 pH 7	e5	e5	e5	e5	e6	e6	e7	e7	e6	e6	e5	e5	e7	e7	e6	e6	e7	e7	e8	e8	e6	e6	e7	e7	e7	e7				13	
23- C18 pH 7	e6	e6	e6	e6	e6	e7	e7	e7	e6	e6	e6	e6	e6	e7	e7		e7	e7	e7	e8	e8	e6	e6	e7	e7	e8	e8			13	
24- HLB pH 7																	e7	e7							e7	e7				1	
25- C8 pH 10	e5	e5	e5	e5	e6	e6	e7	e6	e6	e6	e5	e5	e7	e7		e6	e7	e7	e7	e8	e8	e6	e6	e7	e7	e7	e7			13	
26- C18 pH 10	e6	e6	e6	e6	e6	e7	e7	e7	e6	e6	e6	e6	e6	e7	e7		e7	e7	e8	e8	e8	e6	e6	e7	e7	e8	e8			13	
27- HLB pH 10																			e7							e7	e7			2	
MeOH pH 10																															
28- C8 pH 3	e6	e6	e5	e5	e6	e7	e6	e6	e5	e5	e6	e6	e7	e7	e6	e6	e7	e7	e8	e8	e6	e6	e8	e7	e7	e7				13	
29- C18 pH 3	e6	e6	e6	e6	e6	e7	e7	e7	e5	e5	e6	e6	e7	e7	e6	e7	e7	e7	e8	e8	e6	e6	e7	e7	e7	e7				13	
30- HLB pH 3																															
31- C8 pH 7	e5	e5	e5	e5	e6	e7	e6	e6	e5	e5	e6	e6	e7	e7	e6	e6	e7	e7	e8	e8	e5	e5	e7	e7	e7	e7				13	
32- C18 pH 7	e6	e6	e6	e6	e7	e7	e6	e6	e5	e5	e6	e6	e7	e7		e7	e7	e7	e8	e8	e6	e6	e7	e7	e7	e7				13	
33- HLB pH 7																															
34- C8 pH 10	e5	e5	e5	e5	e6	e7	e6	e6	e5	e5	e5	e5	e7	e7	e7	e6	e7	e7	e7	e7	e7	e5	e5	e7	e7	e7	e7			13	
35- C18 pH 10	e6	e6	e6	e6	e6	e7	e6	e6	e5	e5	e6	e6	e7	e7		e7	e5		e6	e8	e8	e6	e6	e7	e7	e7	e7			13	
36- HLB pH 10																															



2D Workflow – Method Optimization

Top 4 methods Total Coverage

Group 1 – Method 9

Group 2 - Method 5 (14) & 9 (12)

Group 3 - Method 14 & 5

Group 4 - Method 14

Group 5 - Method 14

Group 6 - Method 12 (9)

Green box: highest signal

Blue box: 1/10 lower

Methods:

	Group 1 (13)	Group 2 (14)	Group 3 (20)	Group 4 (12)	Group 5 (14)	Group 6 (10)
ACN pH 3						
1- C8 pH 3	13	13	19	10	13	8
2- C18 pH 3	13	12	20	10	14	7
3- HLB pH3	13	12	19	11	14	8
4- C8 pH 7	13	12	20	11	13	8
5- C18 pH 7	13	14	20	11	13	9
6- HLB pH 7	13	12	19	11	13	7
7- C8 pH 10	13	12	19	10	14	7
8- C18 pH 10	13	13	20	10	14	7
9- HLB pH 10	13	12	15	11	14	6
ACN pH 10						
10- C8 pH 3	13	12		11	13	8
11- C18 pH 3	13	13	20	11	13	8
12- HLB pH 3	12	9	17	11	13	9
13- C8 pH 7	12	12	20	12	13	10
14- C18 pH 7	13	13	20	12	13	8
15- HLB pH 7	12	11	20	11	13	10
16- C8 pH 10	12	12	20	10	13	8
17- C18 pH 10	13	14	20	11	13	8
18- HLB pH 10	12	11	19	11	14	8
MeOH pH 3						
19- C8 pH 3	13	11	19	10	13	8
20- C18 pH 3	12	13	20	10	13	8
21- HLB pH3	3		4	3	6	1
22- C8 pH 7	13	13	19	10	13	7
23- C18 pH 7	13	14	20	11	13	8
24- HLB pH 7	1	12	1	7	6	2
25- C8 pH 10	13	12	16	11	14	7
26- C18 pH 10	13	12	19	11	14	7
27- HLB pH 10	2	1	3	9	7	3
MeOH pH 10						
28- C8 pH 3	13	11	18	9	13	8
29- C18 pH 3	13	12	19	10	13	8
30- HLB pH 3		2	4	7	4	6
31- C8 pH 7	13	10	20	9	13	9
32- C18 pH 7	13	13	20	10	13	7
33- HLB pH 7		1	4	8	6	7
34- C8 pH 10	13	11	18	10	13	8
35- C18 pH 10	13	13	19	11	13	8
36- HLB pH 10		1		8	7	5

2D Workflow

Instrument LOD QQQ (MRM's)

Group 1	LOD
Chlorpyrifos	1 ppt
Diazinon	1 ppt
Dichlorvos	5 ppt
Dicrotophos	1 ppt
Dimethoate	1 ppt
Fenitrothion	20 ppt
Malathion	2 ppt
Mevinphos	5 ppt
Parathion	10 ppt
Parathion Methyl	10 ppt
Propetamphos	50 ppt

Group 4	LOD
Fluconazole	1 ppt
Tebuconazole	1 ppt
Propiconazole	1 ppt
Voriconazole	1 ppt
Difenoconazole	1 ppt
Ravuconazole	1 ppt
Ketoconazole	1 ppt
Posaconazole	1 ppt
Itraconazole	5 ppt

Group 2	LOD
Carbaryl	50 ppt
Fenobucarb	1 ppt
Aminocarb	1 ppt
Aldicarb	10 ppt
Carbofuran	1 ppt
Aldicarb Sulfone	10 ppt
Methiocarb	20 ppt
Carbetamide	1 ppt
Carbofuran-3-OH	5 ppt
Oxamyl	10 ppt
Prosulfocarb	1 ppt
Fenoxycarb	5 ppt

Group 5	LOD
Prometryn	1 ppt
Terbutryn	1 ppt
Propazine	1 ppt
Trietazine	1 ppt
Terbuthylazine	1 ppt
Ametryn	1 ppt
Simetryn	1 ppt
Simazine	1 ppt
Atrazine Desethyl	5 ppt
Atrazine Desisopropyl	5 ppt

Group 3	LOD
Monuron	100 ppt
Thidiazuron	20 ppt
Fluometuron	1 ppt
Siduron	1 ppt
Metobromuron	1 ppt
Difenozone	1 ppt
Chloroxuron	1 ppt
Chlorobromuron	1 ppt
Dimefuron	1 ppt
Tribenuron-methyl	1 ppt
Fenuron	50 ppt
Isoproturon	1 ppt
Chlortoluron	1 ppt
Monolinuron	2 ppt
Metoxuron	1 ppt
Diuron	1 ppt
Buturon	10 ppt
Linuron	5 ppt
Metsulfuron Methyl	1 ppt

Group 6	LOD
Chloridazon	1 ppt
Asulam	1 ppt
Bentazon	200 ppt
Propysamide	2 ppt
Pendimethallin	20 ppt
Flusilazole	1 ppt
Florasulam	1 ppt
Flufenacet	1 ppt
Diflufenican	1 ppt

2D Workflow

Instrument LOD QToF (Scan)

Group 1	LOD
Chlorpyrifos	1 ppb
Malathion	10 ppb
Diazinon	1 ppb
Parathion	10 ppb
Propetamphos	10 ppb
Fenitrothion	100 ppb
Parathion	
Methyl	10 ppb
Dicrotophos	1 ppb
Dimethoate	1 ppb
Mevinphos	10 ppb
Dichlorvos	10 ppb

Group 4	LOD
Fluconazole	1 ppb
Tebuconazole	1 ppb
Propiconazole	1 ppb
Voriconazole	1 ppb
Difenoconazole	1 ppb
Ravuconazole	1 ppb
Ketoconazole	1 ppb
Posaconazole	1 ppb
Itraconazole	1 ppb

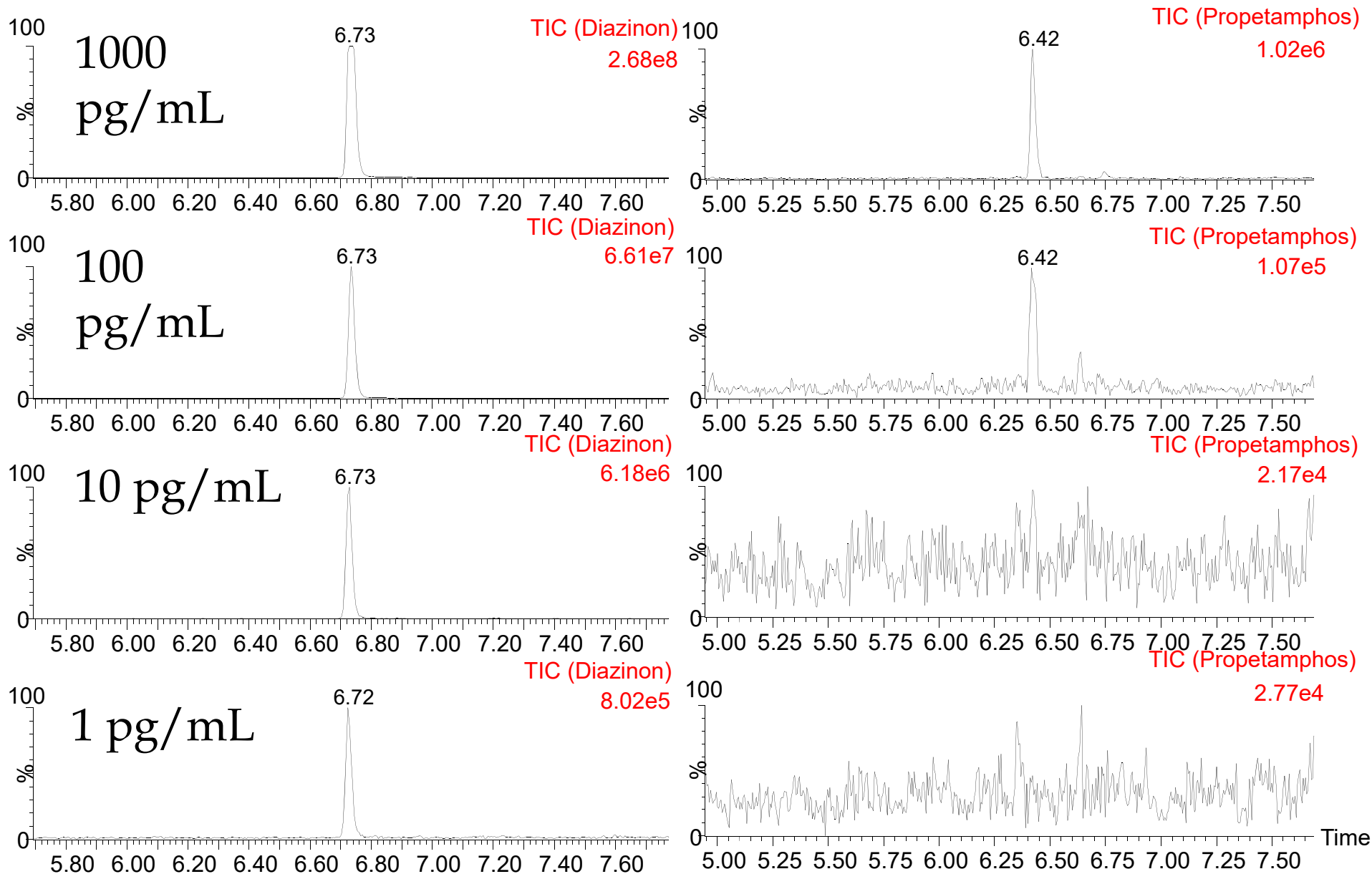
Group 2	LOD
Carbaryl	100 ppb
Fenobucarb	10 ppb
Aminocarb	1 ppb
Aldicarb	10 ppb
Carbofuran	1 ppb
Aldicarb Sulfone	100 ppb
Methiocarb	100 ppb
Carbetamide	1 ppb
Carbofuran-3-OH	10 ppb
Oxamyl	100 ppb
Prosulfocarb	1 ppb
Fenoxycarb	1 ppb

Group 5	LOD
Prometryn	1 ppb
Terbutryn	1 ppb
Propazine	1 ppb
Trietazine	1 ppb
Terbuthylazine	1 ppb
Ametryn	1 ppb
Simetryn	1 ppb
Simazine	1 ppb
Atrazine Desethyl	1 ppb
Atrazine Desisopropyl	1 ppb

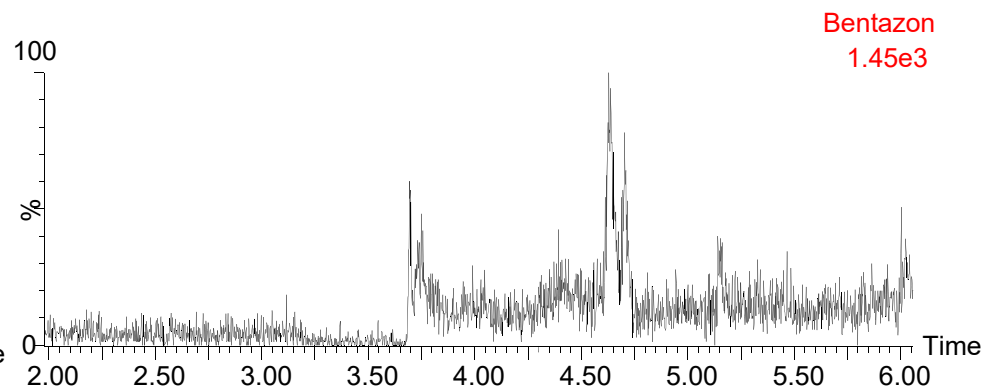
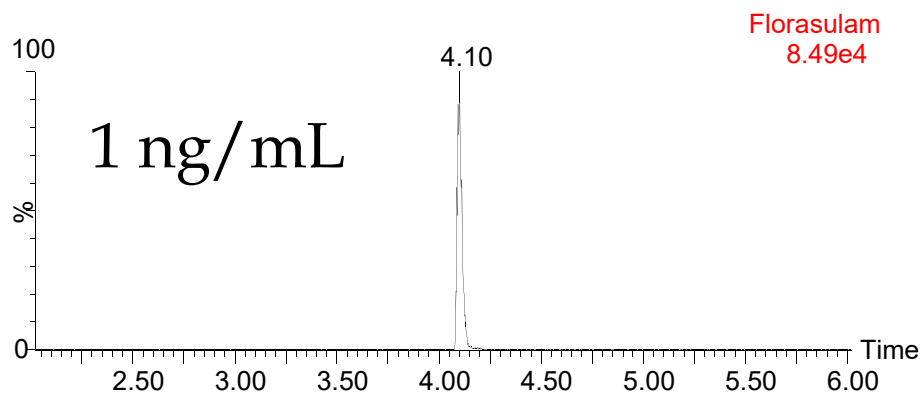
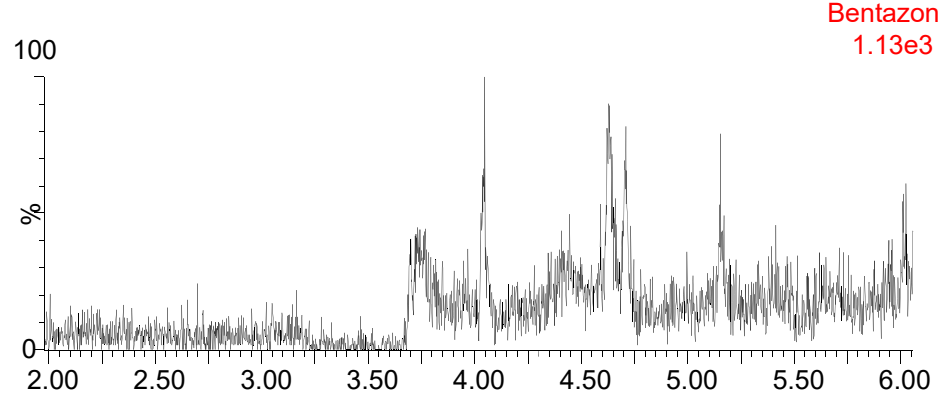
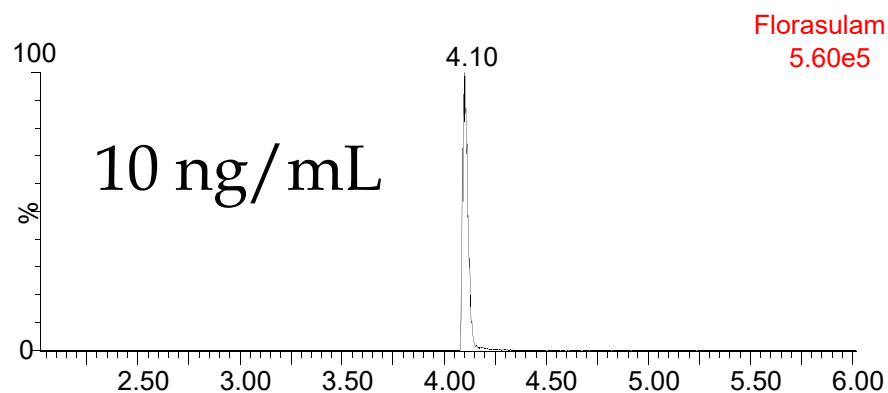
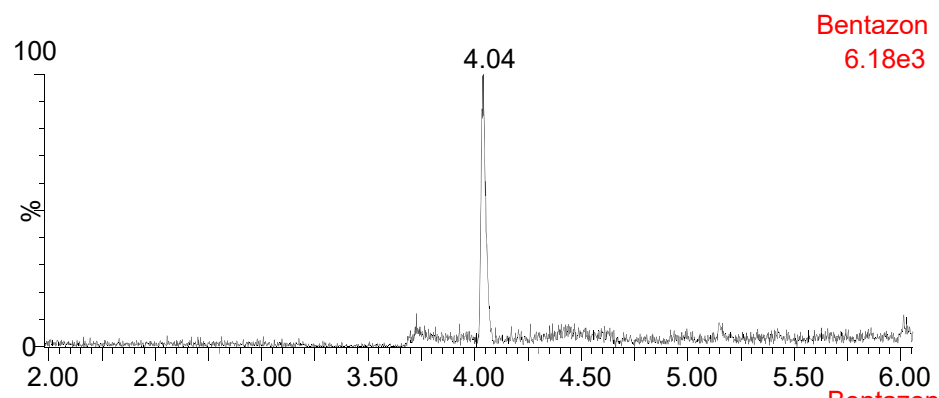
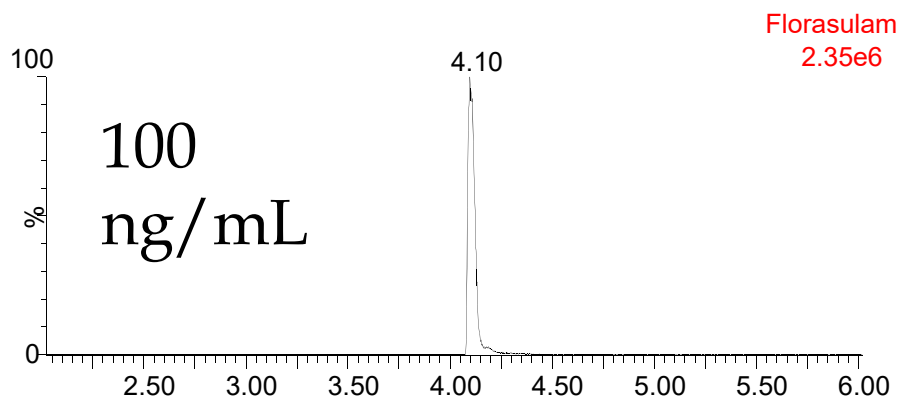
Group 3	LOD
Monuron	1 ppb
Thidiazuron	1 ppb
Fluometuron	1 ppb
Siduron	1 ppb
Metobromuron	1 ppb
Difenoxyuron	1 ppb
Chloroxyuron	1 ppb
Chlorobromuron	10 ppb
Dimefuron	1 ppb
Tribenuron-methyl	1 ppb
Fenuron	10 ppb
Isoproturon	1 ppb
Chlortoluron	1 ppb
Monolinuron	1 ppb
Metoxyuron	1 ppb
Diuron	1 ppb
Buturon	1 ppb
Linuron	10 ppb
Metsulfuron Methyl	1 ppb

Group 6	LOD
Chloridazon	1 ppb
Asulam	1 ppb
Bentazon	100 ppb
Propyzamide	10 ppb
Pendimethallin	10 ppb
Flusilazole	1 ppb
Florasulam	1 ppb
Flufenacet	1 ppb
Diflufenican	1 ppb

2D Workflow - LOD QQQ



2D Workflow - LOD QToF



2D Workflow RP Extraction

Few Facts

- 1- 100 mL drinking water
@ 10 mL/min flow rate
- 2- 10 minutes loading
minimum risk of clogging
- 3- quick wash step
- 4- Elute with 2 mL final volume
@ 50:1 enrichment
- 5- inject 250 μ L

if more sensitivity is needed:

Option 1:
200 mL loading at 20 min
for 100:1 enrichment

Option 2:
Inject 500 μ L

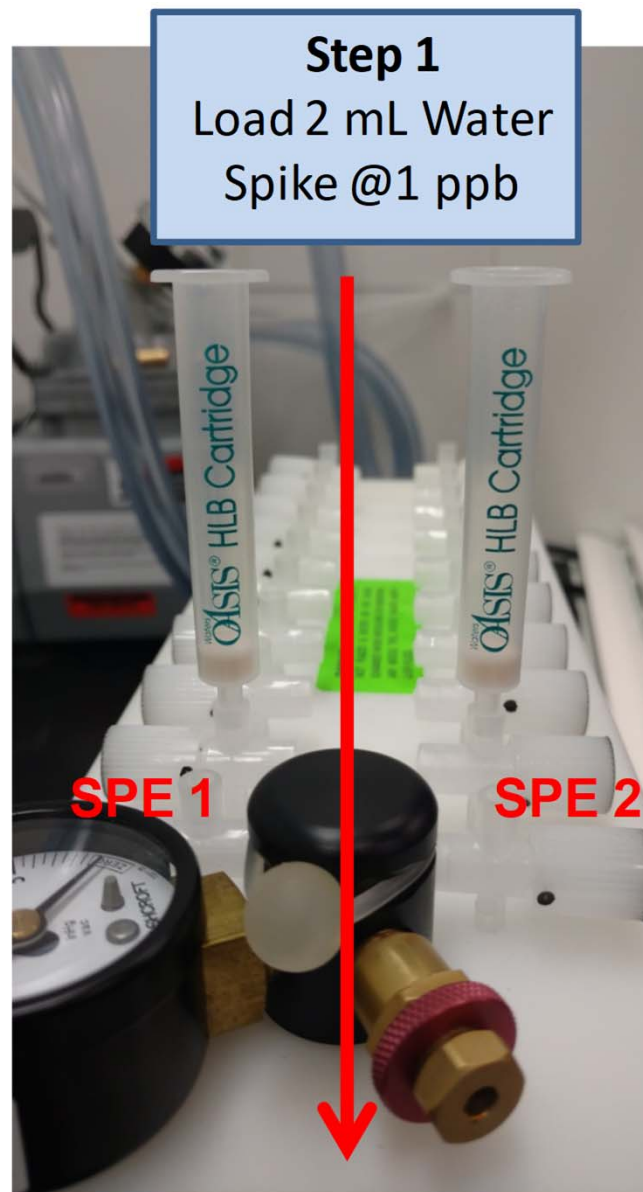
Step 3 Sequential Elution



- 1- 10 % ACN
- 2- 20 % ACN
- 3- 30 % ACN
- 4- 40 % ACN
- 5- 50 % ACN
- 6- 60 % ACN
- 7- 70 % ACN
- 8- 80 % ACN
- 9- 90 % ACN
- 10- 100 % ACN

All elution with
2% FA

Repeat
with MeOH



Step 2 Collect Load

Step 4 Sequential Elution



- 1- 10 % ACN
- 2- 20 % ACN
- 3- 30 % ACN
- 4- 40 % ACN
- 5- 50 % ACN
- 6- 60 % ACN
- 7- 70 % ACN
- 8- 80 % ACN
- 9- 90 % ACN
- 10- 100 % ACN

All elution with
2% NH_4OH

Repeat
with MeOH

2D Workflow Extraction Strategy

Wash: 10 % MeOH @ pH 10

Basic Functionality (green)
- High % organic elution at high pH
- low % organic elution at low pH

Polarity/solubility (yellow)

OP		0 %	10 %	20 %	30 %	40 %	50 %	60 %	70 %	80 %	90 %	100 %
Dichlorvos	ACN pH10	0.16	0.11	4.52	92.89	1.32	0.30	0.21	0.07	0.14	0.23	0.05
	ACN pH3	0.04	0.03	20.97	78.26	0.32	0.09	0.04	0.04	0.03	0.05	0.13
	MeOH pH10	1.59	1.59	1.59	50.49	1.59	3.50	6.73	8.16	0.42	8.68	15.65
	MeOH pH3	0.02	0.01	0.04	0.10	12.89	78.46	8.06	0.15	0.05	0.15	0.08
Mevinphos	ACN pH10	0.35	0.00	93.02	5.65	0.00	0.00	0.34	0.08	0.16	0.29	0.11
	ACN pH3	0.02	0.82	96.06	2.35	0.15	0.03	0.08	0.01	0.01	0.14	0.33
	MeOH pH10	0.00	0.02	0.00	98.97	0.10	0.21	0.13	0.16	0.06	0.16	0.20
	MeOH pH3	0.00	0.02	0.00	4.13	71.01	24.22	0.45	0.03	0.06	0.06	0.01
Dimethoate	ACN pH10	0.01	0.09	75.80	23.71	0.29	0.03	0.07	0.01	0.00	0.00	0.00
	ACN pH3	0.00	0.35	92.23	7.26	0.10	0.03	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01
	MeOH pH10	0.00	0.00	0.00	99.38	0.03	0.14	0.12	0.10	0.06	0.05	0.12
	MeOH pH3	0.00	0.00	0.02	6.13	68.22	24.54	0.74	0.10	0.08	0.13	0.05
Dicrotophos	ACN pH10	0.03	94.43	5.13	0.19	0.02	0.03	0.03	0.03	0.04	0.03	0.04
	ACN pH3	0.02	95.85	3.71	0.22	0.07	0.02	0.03	0.02	0.02	0.01	0.03
	MeOH pH10	0.01	0.04	0.87	98.37	0.21	0.14	0.08	0.10	0.06	0.04	0.09
	MeOH pH3	0.01	0.96	33.18	63.82	1.63	0.19	0.08	0.03	0.03	0.04	0.04

Elute: 30 % ACN @ pH 3

Objectives:

- 1- Maximum Organic for wash for zero analyte breakthrough
- 2- Minimum Organic for total elution and total coverage

2D Workflow Extraction Strategy

Red box – Minimum % for Elution
Blue Box – Maximum % for Wash

OP		0 %	10 %	20 %	30 %	40 %	50 %	60 %	70 %	80 %	90 %	100 %
Dichlorvos	ACN pH10	0.16	0.11	4.52	92.89	1.32	0.30	0.21	0.07	0.14	0.23	0.05
	ACN pH3	0.04	0.03	20.97	78.26	0.32	0.09	0.04	0.04	0.03	0.05	0.13
	MeOH pH10	1.59	1.59	1.59	50.49	1.59	3.50	6.73	8.16	0.42	8.68	15.65
	MeOH pH3	0.02	0.01	0.04	0.10	12.89	78.46	8.06	0.15	0.05	0.15	0.08
Mevinphos	ACN pH10	0.35	0.00	93.02	5.65	0.00	0.00	0.34	0.08	0.16	0.29	0.11
	ACN pH3	0.02	0.82	96.06	2.35	0.15	0.03	0.08	0.01	0.01	0.14	0.33
	MeOH pH10	0.00	0.02	0.00	98.97	0.10	0.21	0.13	0.16	0.06	0.16	0.20
	MeOH pH3	0.00	0.02	0.00	4.13	71.01	24.22	0.45	0.03	0.06	0.06	0.00
Dimethoate	ACN pH10	0.01	0.09	75.80	23.71	0.29	0.03	0.07	0.01	0.00	0.00	0.00
	ACN pH3	0.00	0.35	92.23	7.26	0.10	0.03	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01
	MeOH pH10	0.00	0.00	0.00	99.38	0.03	0.14	0.12	0.10	0.06	0.05	0.12
	MeOH pH3	0.00	0.00	0.02	6.13	68.22	24.54	0.74	0.10	0.08	0.13	0.01
Dicrotophos	ACN pH10	0.03	94.43	5.13	0.19	0.02	0.03	0.03	0.03	0.04	0.03	0.04
	ACN pH3	0.02	95.85	3.71	0.22	0.07	0.02	0.03	0.02	0.02	0.01	0.03
	MeOH pH10	0.01	0.04	0.87	98.37	0.21	0.14	0.08	0.10	0.06	0.04	0.09
Parathion	ACN pH10	0.11	0.96	33.18	63.82	1.63	0.19	0.08	0.03	0.03	0.04	0.04
	ACN pH3	0.16	0.13	0.16	0.19	0.36	39.56	50.70	5.83	1.01	0.80	0.49
	MeOH pH10	0.10	0.06	0.03	0.04	0.14	0.10	0.09	0.17	6.10	65.32	27.85
	MeOH pH3	0.08	0.05	0.14	0.03	0.09	0.12	0.10	0.06	12.94	71.34	15.04
Fenitrothion	ACN pH10	0.35	0.49	1.02	0.56	0.08	16.80	66.39	10.86	1.68	0.87	0.91
	ACN pH3	0.00	0.00	0.18	0.17	46.32	43.39	6.85	1.19	0.82	0.47	0.60
	MeOH pH10	0.07	0.05	0.08	0.29	0.26	0.22	0.24	0.14	2.03	59.22	37.40
	MeOH pH3	0.24	0.23	0.23	0.00	0.12	0.06	0.12	0.13	4.43	69.83	24.61
Propetamphos	ACN pH10	1.50	1.85	1.22	1.85	2.46	60.59	22.92	3.03	2.20	1.36	1.03
	ACN pH3	0.00	0.69	0.58	2.89	80.39	10.44	1.14	0.82	0.68	1.12	1.26
	MeOH pH10	0.40	0.18	0.17	1.65	0.00	0.82	0.83	8.50	59.25	21.36	6.84
	MeOH pH3	0.00	0.32	0.00	0.47	0.00	0.38	0.73	6.40	69.44	19.50	2.76

Late Eluters

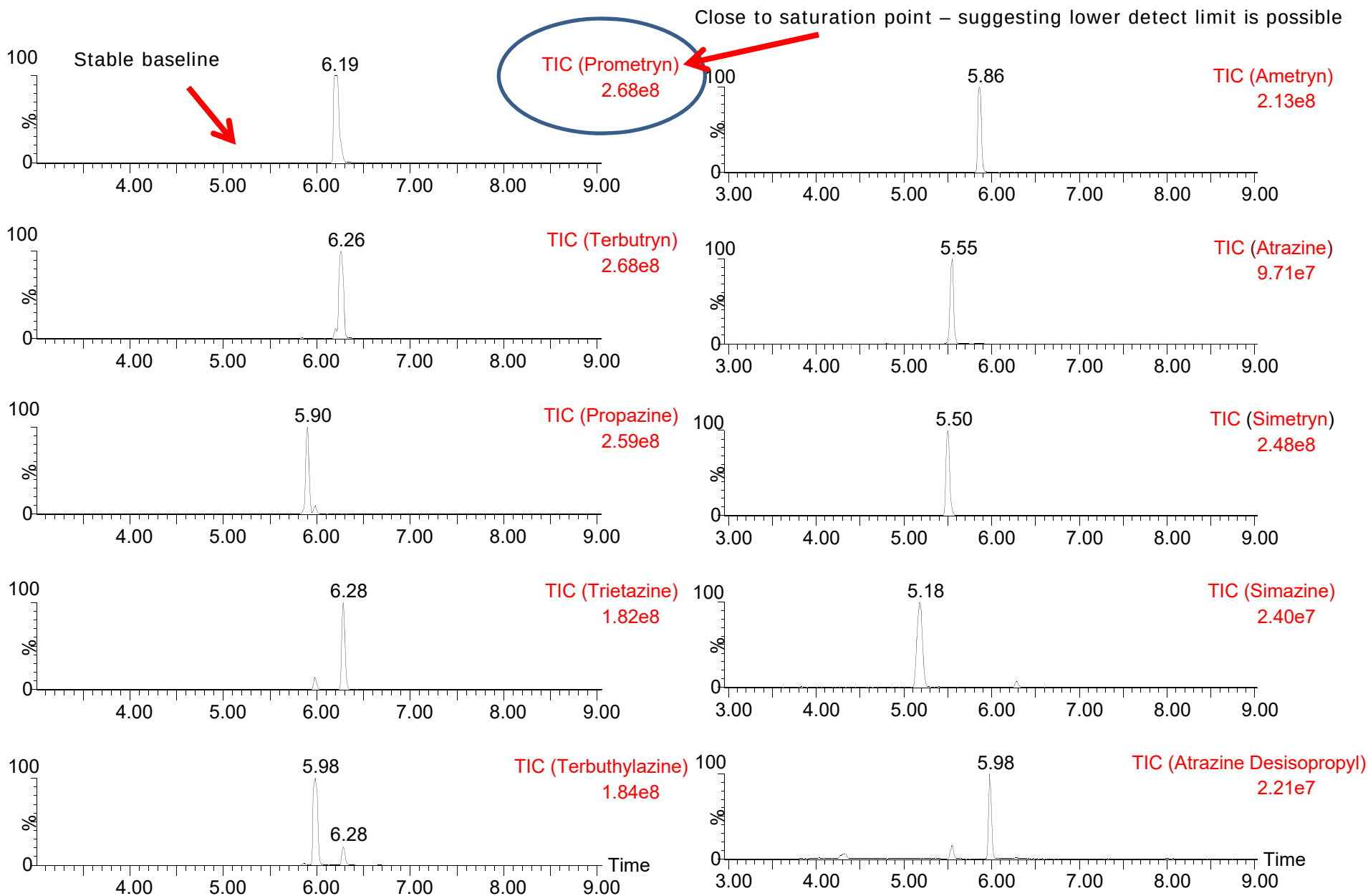
Early Eluters

2D Workflow Extraction Strategy – RP

	W1 (low pH)	W2 (high pH)	Elution
Organophosphorous	10% MeOH	20% MeOH	100% MeOH low pH
Carbamates	x	20% MeOH	100% MeOH low pH
Triazole	x	20% MeOH	100% MeOH low pH
Pheny urea (A)	40% MeOH	10% MeOH	100% MeOH low pH
Phenyl urea (B)	20% MeOH	x	100% MeOH low pH
Others	10% MeOH	x	90% MeOH low pH
Triazines	20 % MeOH	20 % MeOH	90% MeOH low pH

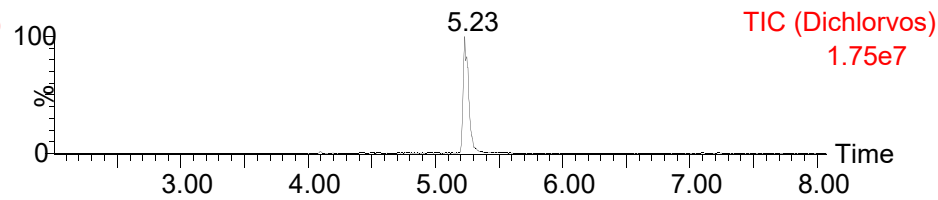
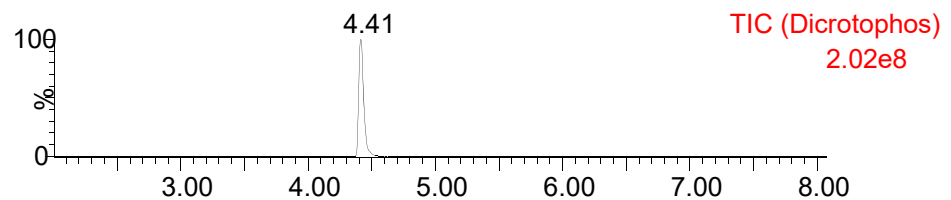
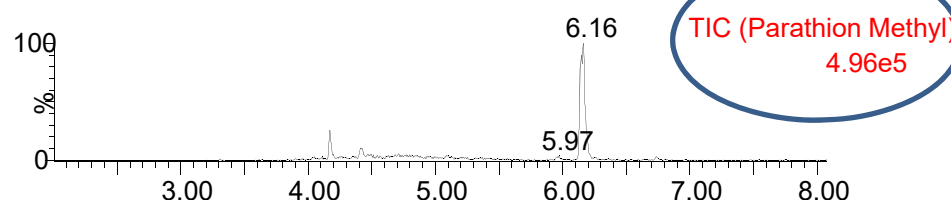
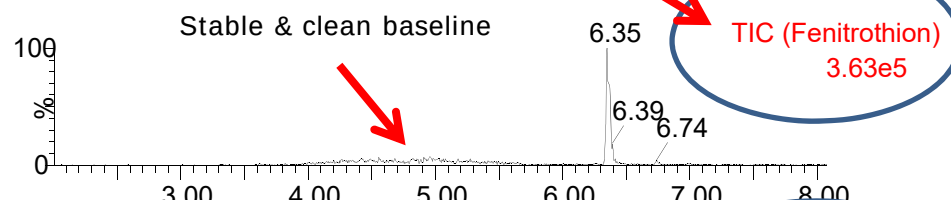
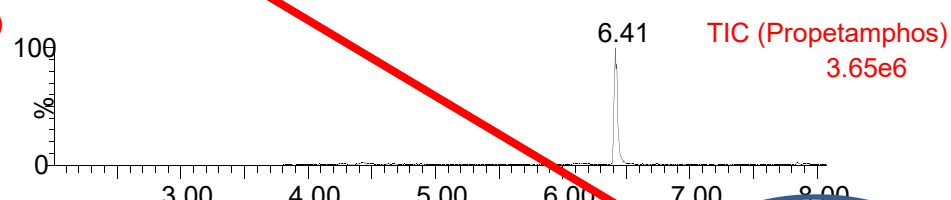
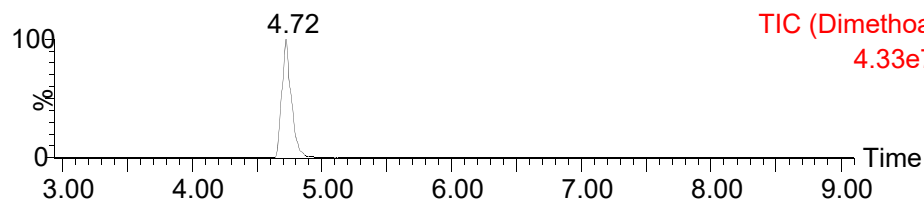
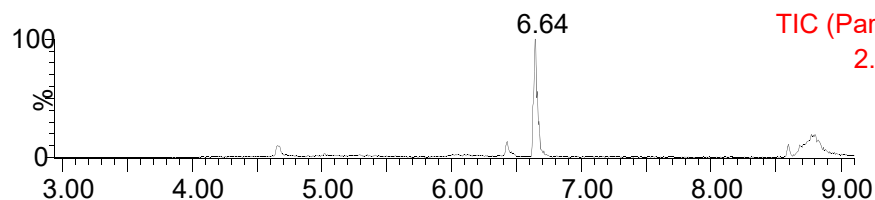
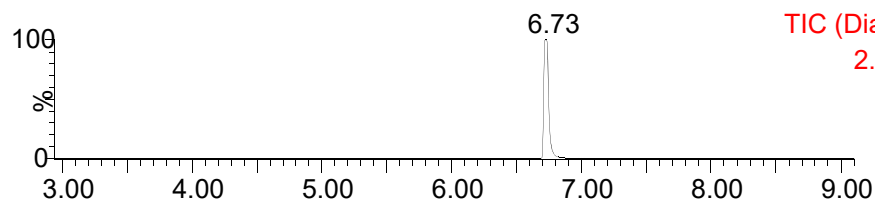
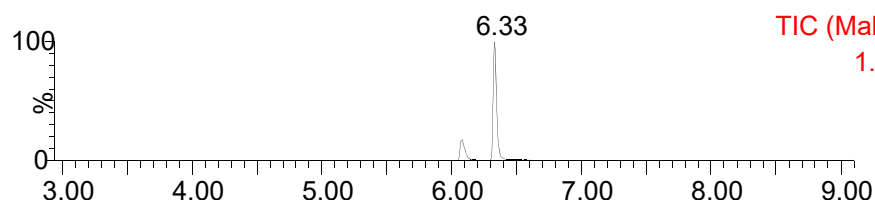
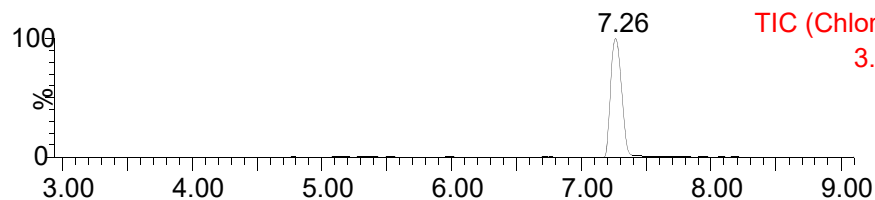
Six distinct extraction protocol for each classes

RP Extraction QQQ (Triazines @ 50 ppt)

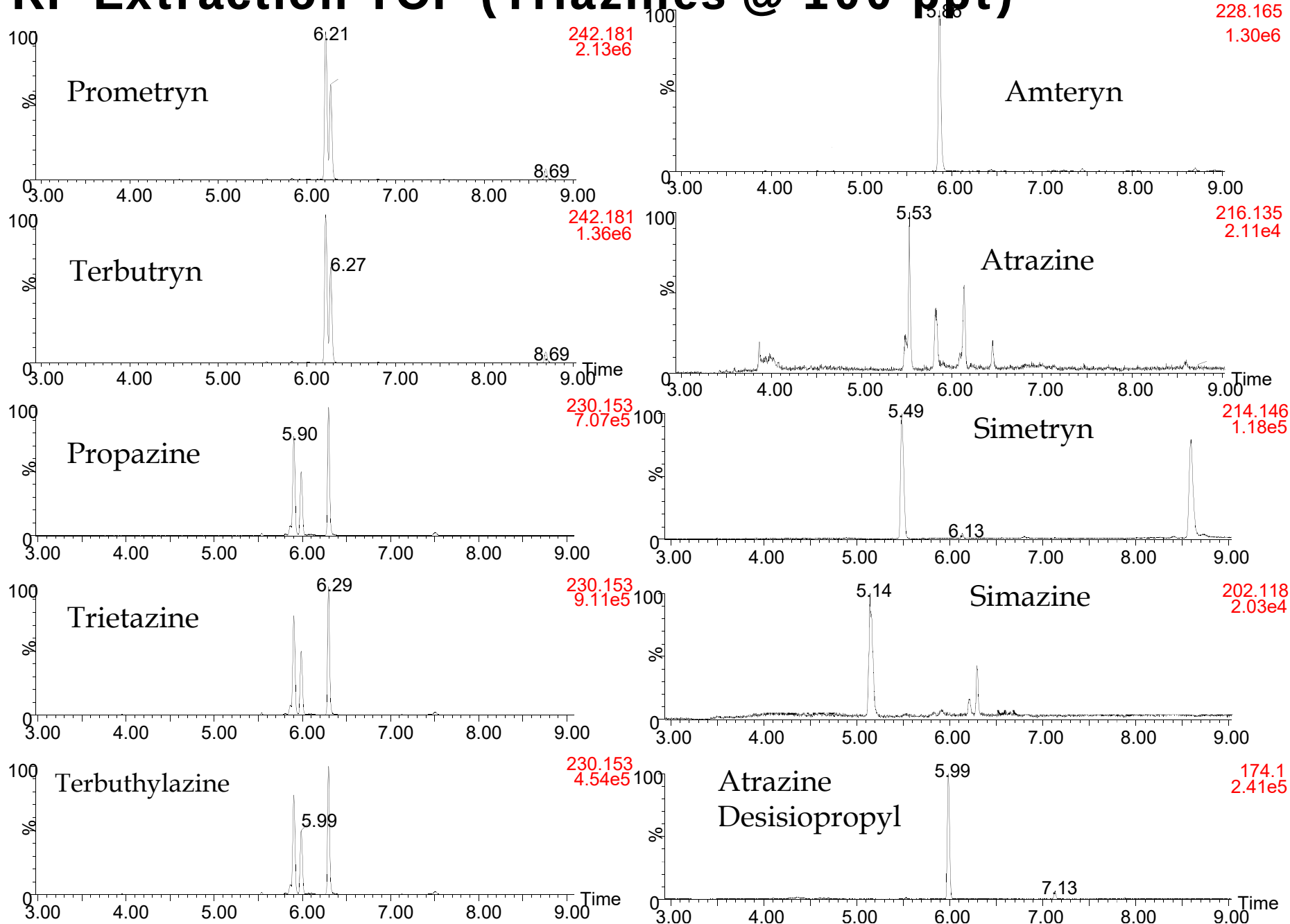


RP Extraction QQQ (OP's @ 50 ppt)

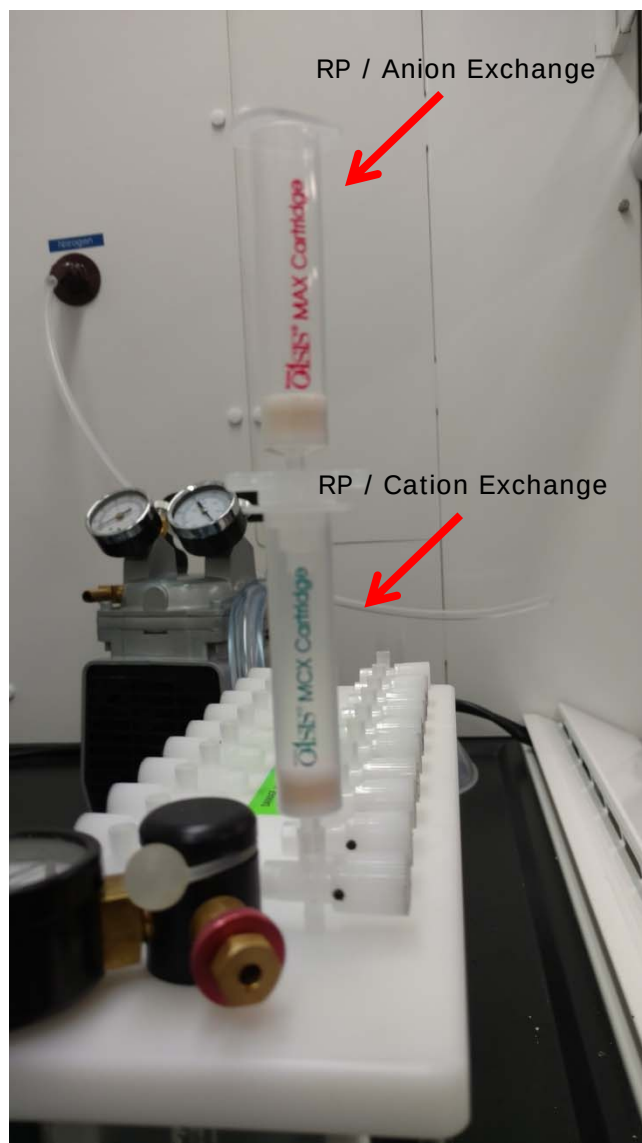
Close to background noise – reaching lower detect limit would be difficult



RP Extraction TOF (Triazines @ 100 ppt)



2D Workflow RP / IE Extraction



Step 1: Load 200 mL
Step 2: disconnect barrel

RP/Anion

Wash 1: 100% H₂O + 2% NH₄OH
Elute 1: 100 % MeOH + NH₄OH
Elute 2: 100 % MeOH + 2% FA

Elute 1: Neutral and Basic moities
Elute 2: Acidics moities

RP/Cation

Wash 1: 100% H₂O + 2% FA
Elute 1: 100 % MeOH + 2% FA
Elute 2: 100 % MeOH + NH₄OH

Elute 1: Neutral and Acidic moities
Elute 2: Basic moities

One Protocol – two fractions

Basic behavior	MAX	MAX	MCX	MCX
Zwitter behavior	Elute 1	Elute 2	Elute 1	Elute 2
Dichlorvos	91.79	8.14	0.03	0.04
Mevinphos	93.03	6.97	0.01	0.00
Dimethoate	91.02	8.96	0.01	0.01
Dicrotophos	94.53	5.05	0.40	0.01
Parathion Methyl	68.32	30.39	0.78	0.51
Fenitrothion	64.84	34.00	0.52	0.64
Propetamphos	71.96	27.80	0.09	0.16
Parathion	63.16	36.16	0.43	0.25
Diazinon	59.69	40.10	0.02	0.19
Chlorpyrifos	54.23	45.64	0.10	0.04
Malathion	70.92	28.94	0.13	0.01

2D Workflow

RP / IE Extraction

	MAX	MAX	MCX	MCX
Others	Elute 1	Elute 2	Elute 1	Elute 2
Chloridazon	84.06	15.80	0.14	0.00
Asulam	0.06	98.94	0.66	0.34
Propyzamide	64.79	35.12	0.05	0.04
Bentazon	41.42	55.42	3.16	0.00
Pendimethallin	53.44	46.52	0.03	0.01
Flusilazole	70.20	29.72	0.03	0.05
Florasulam	0.01	99.89	0.10	0.01
Flufenacet	62.83	36.96	0.21	0.00
Diflufenican	55.20	44.77	0.03	0.00

Acidic behavior

	MAX	MAX	MCX	MCX
Triazines	Elute 1	Elute 2	Elute 1	Elute 2
Prometryn	67.49	32.48	0.02	0.02
Terbutryn	63.08	36.85	0.04	0.04
Propazine	74.31	25.64	0.01	0.04
Trietazine	79.04	20.95	0.00	0.00
Terbutylazine	63.39	36.54	0.06	0.01
Ametryn	71.47	28.43	0.04	0.05
Atrazine	84.64	15.26	0.00	0.10
Simetryn	83.12	16.84	0.03	0.01
Simazine	90.54	9.05	0.04	0.37
Atrazine Desethyl	92.98	6.92	0.03	0.07
Atrazine Desisopropyl	84.14	15.84	0.01	0.01

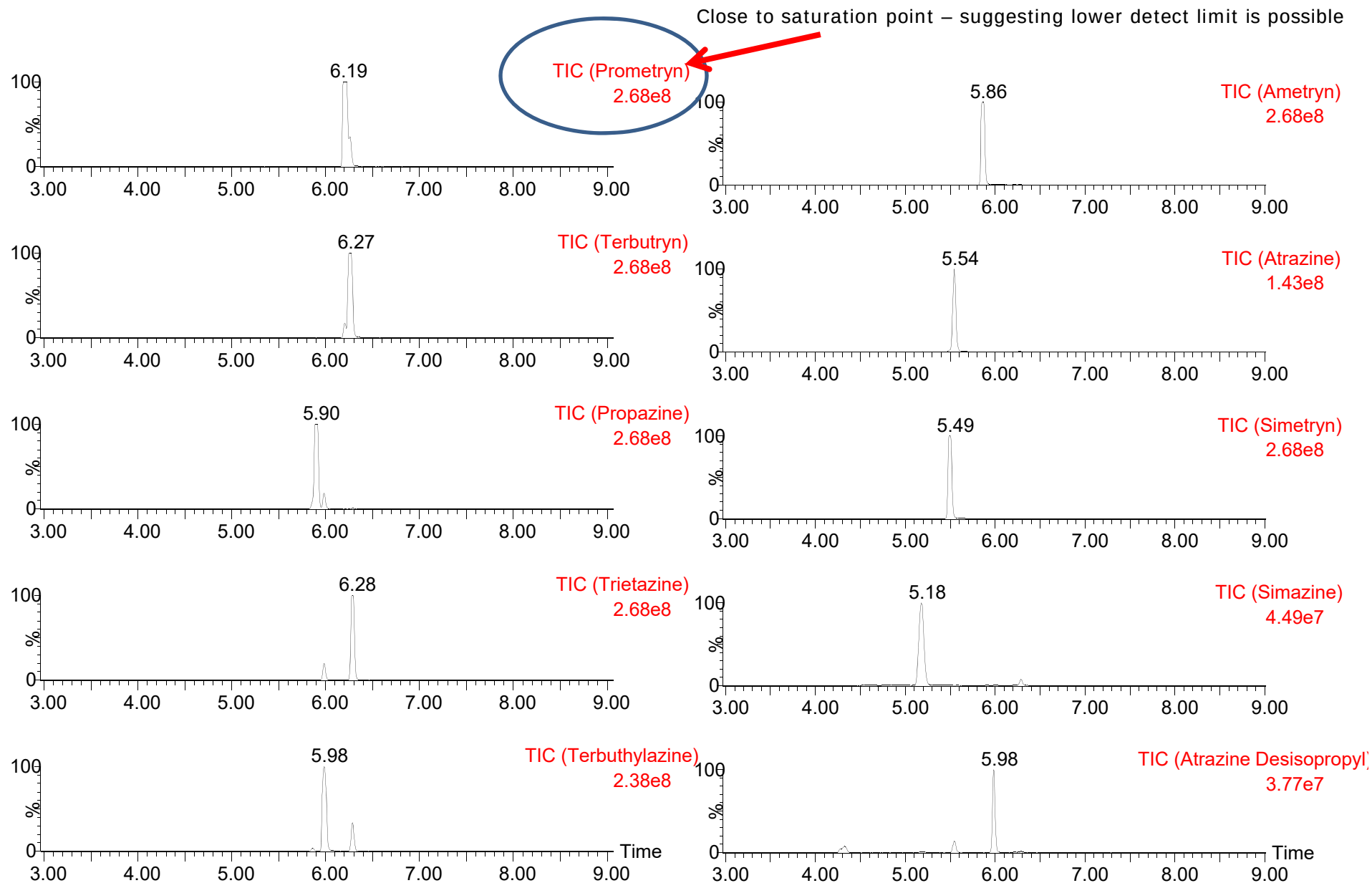
	MAX	MAX	MCX	MCX
Phenyl Urea	Elute 1	Elute 2	Elute 1	Elute 2
Tribenuron Methyl	0.00	99.97	0.03	0.00
Dimefuron	48.79	51.20	0.01	0.00
Chlorobromuron	29.86	70.10	0.02	0.02
Chloroxuron	34.62	65.37	0.01	0.00
Difenoxyuron	41.08	58.88	0.02	0.01
Metobromuron	58.86	41.06	0.03	0.04
Siduron	48.54	51.44	0.02	0.00
Fluometuron	83.15	16.76	0.07	0.02
Thidiazuron	2.39	7.17	83.04	7.40
Monuron	76.58	23.40	0.01	0.02
Fenuron	99.57	0.27	0.04	0.12
Isoproturon	85.43	14.57	0.00	0.00
Chlortoluron	90.82	9.17	0.01	0.00
Monolinuron	87.05	12.91	0.03	0.01
Metoxuron	94.02	5.86	0.08	0.04
Diruon	86.02	13.90	0.08	0.00
Buturon	81.42	18.34	0.08	0.15
Linuron	82.31	17.37	0.04	0.28
Metsulfuron Methyl	0.00	99.95	0.04	0.00

Basic behavior

Breakthrough behavior
60 mg SPE bed not enough

MAX / MCX Extraction QQQ (Triazines at 50 ppt)

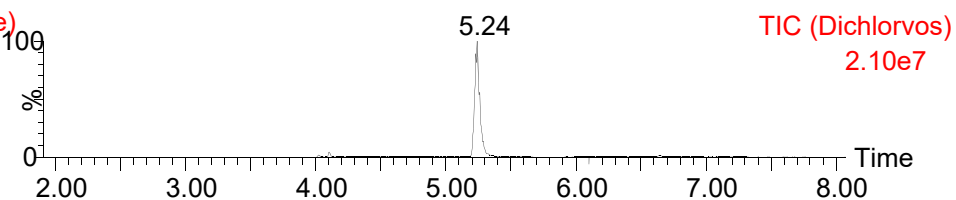
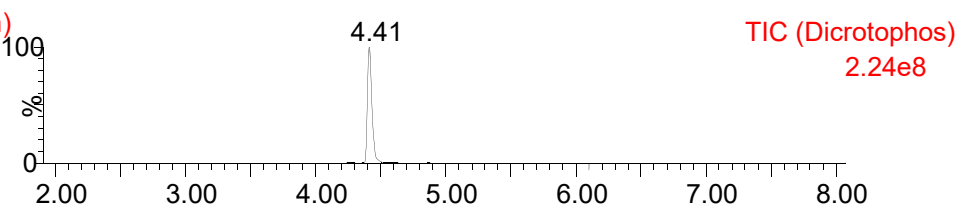
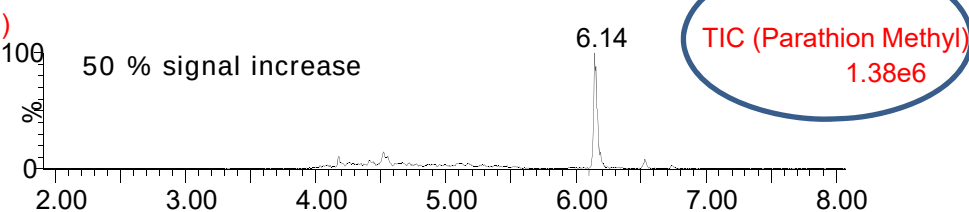
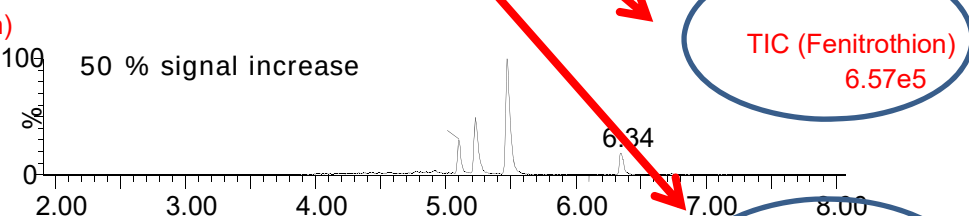
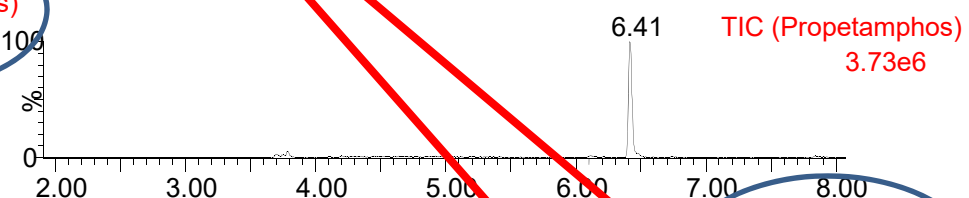
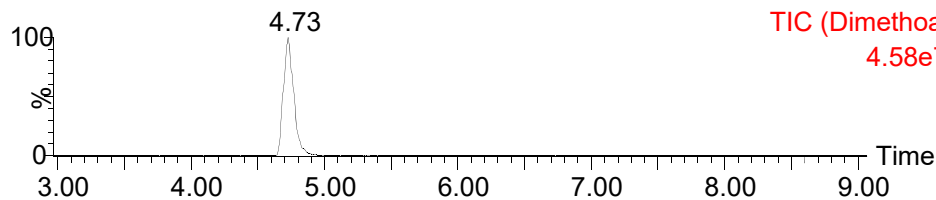
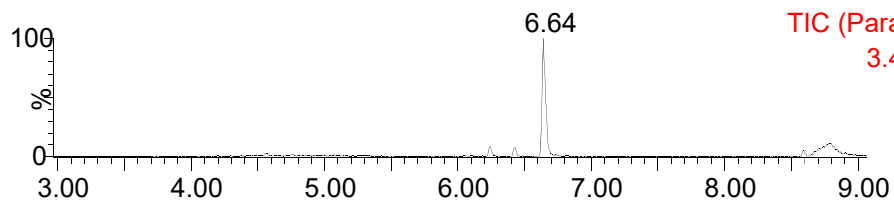
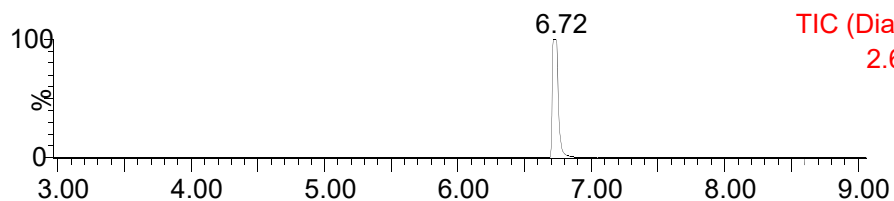
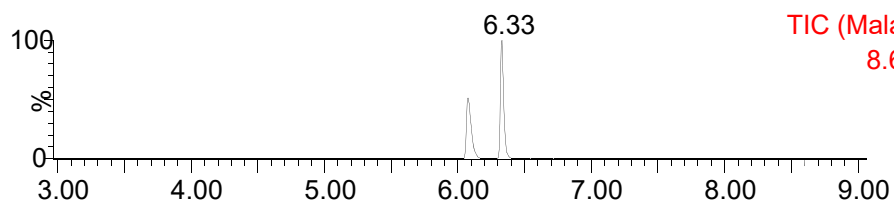
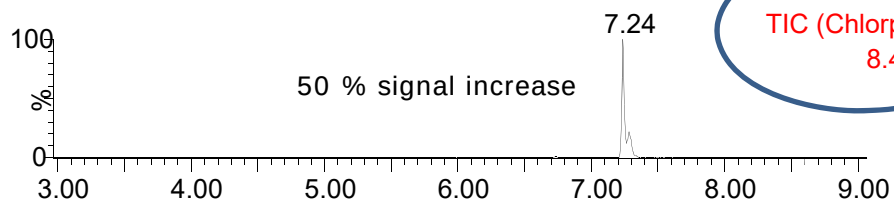
Elute 1 on MAX



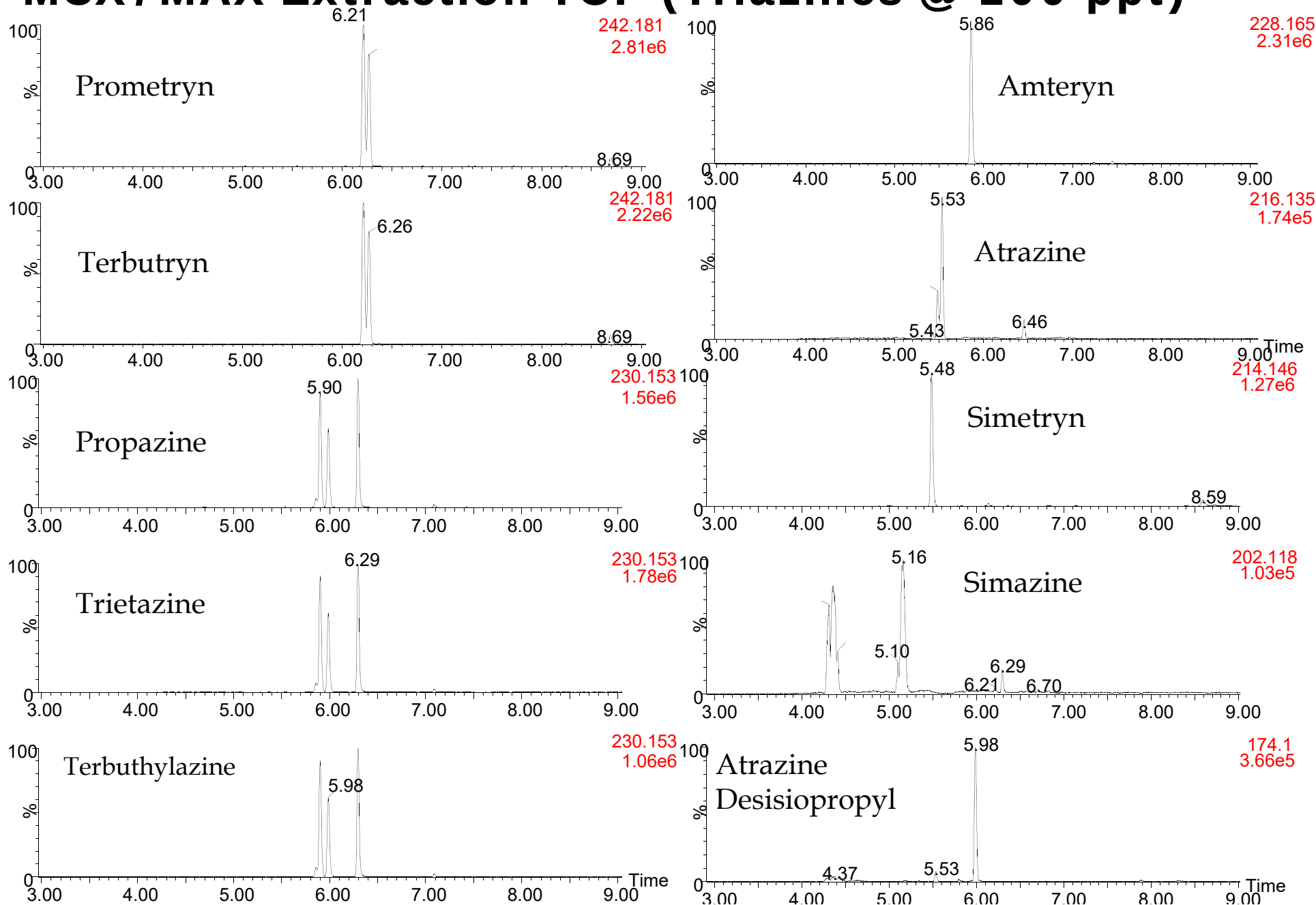
MAX / MCX Extraction QQQ (OP's @ 50 ppt)

Elute 1 on MAX

Higher signal than RP protocol – reaching lower detect limit would be possible



MCX / MAX Extraction TOF (Triazines @ 100 ppt)



Conclusions

- **Fast sample preparation protocol > 30 min**
- **100:1 enrichment factor**
- **No Evaporation to Dryness or Reconstitution**
- **No evaporative loss**
- **Large volume injection – 250 uL injection**
- **Sub ppb detection limits with ToF**