

# Análisis multirresiduo de pesticidas en aguacate con el sistema Bond Elut con extracción mejorada en matriz de lípidos mediante GC/MS/MS

## Nota de aplicación

Agricultura y ciencia de los alimentos

### Autores

Limian Zhao y Derick Lucas  
Agilent Technologies, Inc.

### Resumen

El sistema Bond Elut QuEChERS con extracción mejorada en matriz de lípidos (EMR—Lipid) de Agilent es la nueva generación en productos de preparación de muestras y se utiliza en una práctica extracción en fase sólida dispersiva (dSPE) destinada a una eliminación de la matriz muy selectiva sin afectar la recuperación de los analitos, especialmente para muestras grasas. Este estudio muestra la aplicación de este nuevo producto en el análisis de 23 pesticidas diferentes que se pueden analizar con GC en aguacate mediante GC/MS/MS. El procedimiento implica una extracción QuEChERS AOAC seguida del uso de extracción en fase sólida dispersiva (dSPE) y sales de pulido EMR—Lipid. EMR—Lipid proporciona una extracción de la matriz muy superior por peso, barrido completo mediante GC/MS, y determinación del efecto de la matriz en comparación con absorbentes basados en circonio y C18/PSA. Además, se introduce menos matriz en la ruta de flujo analítica. Los datos también demuestran una reproducibilidad muy mejorada de los analitos al cabo de 100 inyecciones en comparación con C18/PSA y especialmente con circonio, que experimenta significativas desviaciones en la respuesta. EMR—Lipid es muy selectivo para lípidos, y no afecta negativamente la recuperación de los analitos. La recuperación de los analitos es elevada y la precisión es notable. Este trabajo demuestra que la dSPE EMR—Lipid encaja en el flujo de trabajo QuEChERS y proporciona una preparación de muestras rápida, robusta y eficaz con la eliminación de matriz más completa disponible para el análisis multirresiduos de pesticidas en aguacate.



**Agilent Technologies**

## Introducción

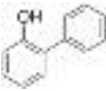
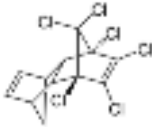
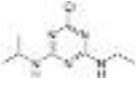
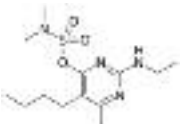
El análisis de residuos de pesticidas en productos alimenticios es un procedimiento rutinario en muchos laboratorios que utilizan el método “Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe” [rápido, sencillo, económico, eficaz, sólido y seguro] (QuEChERS) [1,2]. Este procedimiento permite el análisis de cientos de pesticidas a bajas concentraciones con una única extracción. Aunque el método es satisfactorio para diversas frutas y hortalizas, los alimentos con un alto contenido de grasa tal como aguacate, nueces, y alimentos de origen animal suponen nuevos desafíos [3,4]. Superarlos es muy importante para los laboratorios encargados de alcanzar los estrictos criterios de validación que requieren las agencias gubernamentales para garantizar que el alimento es seguro para el consumo.

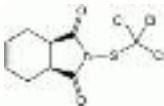
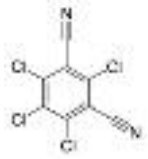
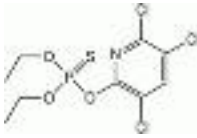
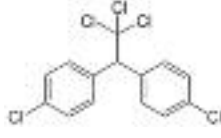
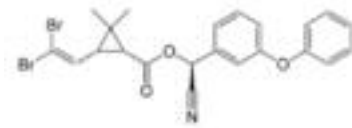
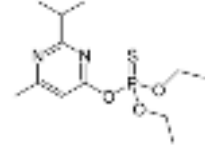
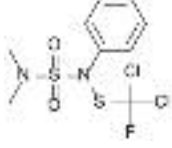
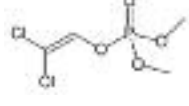
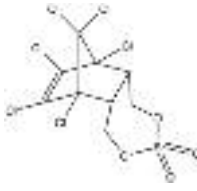
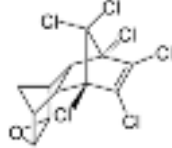
El análisis puede utilizar una combinación de LC y GC para detectar pesticidas volátiles, semivolátiles y no volátiles asociados con muchos métodos multiclasa y multiresiduo [4]. Aunque muchos pesticidas se pueden analizar tanto mediante LC como GC, otros no lo permiten. Cada técnica cromatográfica tiene sus ventajas y desventajas inherentes en términos de cuantificación de analito y efectos adversos derivados de la matriz extraída simultáneamente. La eliminación de estas sustancias extraídas simultáneamente es esencial para conseguir una cuantificación precisa en marices alimentarias complejas, lo que requiere tratamiento con adsorbentes de extracción de matriz tales como C18, PSA, y GCB [5]. Se comercializan otros materiales que contienen circonio y, por

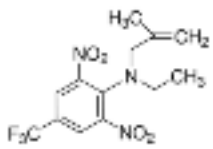
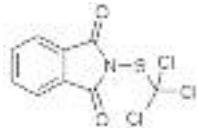
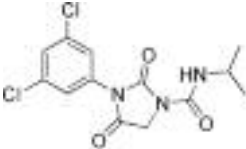
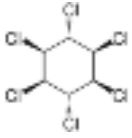
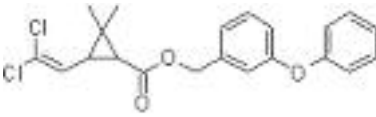
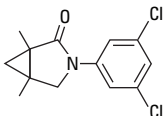

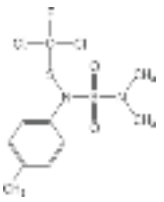
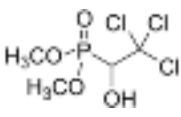
lo general, mejoran la extracción de lípidos en comparación con los absorbentes típicos para extracción de la matriz. Sin embargo, no son adecuados para todas las clases de lípidos diana y pueden retener analitos de interés [6,7]. Las muestras que tienen un elevado contenido en lípidos también pueden requerir limpieza usando cartuchos de extracción en fase sólida (SPE) [7,8,9] o cromatografía de permeación en gel (GPC) [10], añadiendo tiempo y coste a lo que es, por otra parte, un análisis de rutina.

El sistema Bond Elut EMR—Lipid de Agilent es un nuevo material absorbente que elimina selectivamente la mayoría de tipos de lípidos del extracto de la muestra sin una pérdida indeseada del analito de interés. La eliminación de interferencias lipídicas en matrices complicadas es especialmente importante en la técnica de QuEChERS, en la que se extraen grandes cantidades de la matriz junto con los analitos objetivo. Se sabe que el aguacate es una matriz difícil debido a su elevado contenido en lípidos (15 a 20 %) y por tanto, se seleccionó como muestra representativa para la evaluación de EMR—Lipid. Este estudio investiga la preparación de muestras para el análisis de 23 pesticidas que se pueden analizar mediante GC en aguacate usando una extracción QuEChERS AOAC seguido por dSPE EMR—Lipid y sales de pulido. Los pesticidas pertenecen a 10 clases diferentes para ampliar el ámbito de aplicación (Tabla 1). Esta nota de aplicación demuestra la excepcional limpieza que proporciona EMR—Lipid para muestras grasas complejas tales como aguacate, y la alta recuperación y precisión de los 23 residuos de pesticidas multiclasa en tres niveles.

Tabla 1. Analitos objetivo, clase, log P, solubilidad en agua, y estructura química [11].

Nombre	Categoría	Log P	Solubilidad en agua (mg/l)	Fórmula molecular	Estructura
2-Fenilfenol	Fenol	3,18	560	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> O	
Aldrina	Organoclorado	6,5	0,003	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>6</sub>	
Atrazina	Triazina	2,7	33	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>5</sub>	
Bupirimate	Pirimidinol	2,2	22	C <sub>13</sub> H <sub>24</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> S	

Nombre	Categoría	Log P	Solubilidad en agua (mg/l)	Fórmula molecular	Estructura
Captan	Ftalimida	2,5	5,1	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>2</sub> S	
Clorotalonil	Cloronitrilo	2,94	1,0	C <sub>8</sub> Cl <sub>4</sub> N <sub>2</sub>	
Clorpirifós metilo	Organofosforado	4,0	2,74	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>3</sub> PS	
DDT	Organoclorado	6,91	0,006	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> Cl <sub>5</sub>	
Deltametrina	Piretroide	4,6	0,0002	C <sub>22</sub> H <sub>19</sub> Br <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	
Diazinón	Organofosforado	3,69	60	C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> PS	
Diclofluánida	Sulfamida	3,7	1,3	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	
Diclorvós	Organofosforado	1,9	18,000	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>4</sub> P	
Endosulfán sulfato	Organoclorado	3,13	0,48	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>6</sub> O <sub>3</sub> S	
Endrina	Organoclorado	3,2	0,24	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>6</sub> O	

Nombre	Categoría	Log P	Solubilidad en agua (mg/l)	Fórmula molecular	Estructura
Etalfluralin	Dinitroanilina	5,11	0,01	$C_{13}H_{14}F_3N_3O_4$	
Folpet	Ftalimida	3,02	0,8	$C_9H_4Cl_3NO_2S$	
Iprodiona	Dicarboximida	3,1	12,0	$C_{13}H_{13}Cl_2N_3O_3$	
Lindano	Organoclorado	3,5	8,52	$C_6H_6Cl_6$	
Permetrina	Piretroide	6,1	0,006	$C_{21}H_{20}Cl_2O_3$	
Procimidona	Dicarboximida	3,3	2,46	$C_{13}H_{11}Cl_2NO_2$	
Sulfotep	Organofosforado	3,99	10	$C_8H_{20}O_5P_2S_2$	
Tolilfluánida	Sulfamida	3,9	0,9	$C_{10}H_{13}Cl_2FN_2O_2S_2$	
Triclorfón	Organofosfato	0,43	120,000	$C_4H_8Cl_3O_4P$	

## Experimento

Todos los reactivos y disolventes fueron de calidad HPLC o calidad analítica. El acetonitrilo (ACN) y el metanol eran de Honeywell (Muskegon, MI, EE.UU.). El ácido acético (AA) de calidad reactivo, los patrones de pesticidas, y el patrón interno se adquirieron de Sigma-Aldrich, Corp. (St Louis, MO, EE.UU.).

## Disoluciones y patrones

Se preparó ácido acético al 1 % en ACN por adición de 10 ml de ácido acético a 990 ml de ACN. Se prepararon disoluciones madre de patrones y patrones internos (PI) bien en ACN o metanol a una concentración de 2,0 mg/ml. Se preparó una solución de trabajo combinada en ACN a 25 µg/ml, excepto para captan, folpet, triclorfón, y bupirinato. Debido a las respuestas relativamente bajas del instrumento, la concentración se preparó cinco veces mayor para estos cuatro compuestos en la solución de trabajo combinada, que fue de 125 µg/ml. Se preparó una alícuota de 25 µg/ml de solución de trabajo combinada de PI en ACN, que incluía TPP, paratión etilo  $d_{10}$ , y  $^{13}C$ -DDT.

## Equipo

El equipo y el material utilizados en la preparación de muestras incluyó:

- Geno/Grinder (SPEX, Metuchen, NJ, EE.UU.)
- Centrífuga Centra CL3R (Thermo IEC, MA, EE.UU.)
- Microcentrífuga Eppendorf (Brinkmann Instruments, Westbury, NY, EE.UU.)
- Vortizador y vortizador multitubo (VWR, Radnor, PA, EE.UU.)
- Dispensador vertical para viales, (VWR, So. Plainfield, NJ, EE.UU.)
- Pipetas y repetidor Eppendorf
- Tubos Bond Elut EMR—Lipid de Agilent (ref. 5982-1010) y tubos para pulido final Bond Elut para extracción mejorada en matriz de lípidos (ref. 5982-0101)

## Instrumentación

El análisis se realizó en un cromatógrafo de gases Agilent 7890A GC provisto de un muestreador automático Agilent 7693B y un sistema GC/MS Agilent 7000C de triple cuadrupolo. Se usó retroflujo de la columna, algo muy recomendado en matrices de muestras complejas [12]. El tiempo total de análisis de una muestra marcada con patrón fue de 23 minutos con dos minutos de retroflujo de columna.

## Condiciones del instrumento

### Condiciones de GC

Muestreador automático:	Muestreador automático Agilent 7693 y bandeja de muestra de 10 µl con jeringa (ref: G4513-80220), volumen de inyección de 1 µl Tres lavados después de la inyección con el disolvente A (acetonitrilo) Tres bombeos de muestra Tres lavados después de la inyección con el disolvente B (isopropanol)
Columna:	Agilent J&W DB-5ms Ultra Inerte, 0,25 mm × 15 m, 0,25 µm (ref: 122-5512UI)
Gas portador:	Helio, presión constante
Filtro de gas:	Kit de filtración para gas portador Gas Clean de 1/8 pulgada (ref: CP17974)
Liner de inyección:	Liner de punta cónica splitless Ultra Inerte de Agilent con lana (n.º de referencia 5190-2293)
Inyector:	Inyector multimodo (MMI) en modo splitless frío, 75 °C inicialmente, mantener durante 0,02 min, después aumentar hasta 350 °C a 750 °C/min
Presión del pulso de inyección:	36 psi hasta 0,75 min
Flujo de purga hacia la purga de split:	60 ml/min a 0,75 min
Presión en el inyector:	17 psi durante el análisis, y 1,0 psi durante el retroflujo
Horno:	60 °C durante 2,57 min, después hasta 150 °C a 50 °C/min, hasta 200 °C a 6 °C/min, hasta 300 °C a 16 °C/min, mantener durante 3 min
Tiempo posterior al análisis:	2 min a 300 °C
Tecnología de flujo capilar:	UltiMetal Plus con unión definitiva purgada (ref: G3182-61581) para retroflujo de la columna analítica y del inyector
Gas EPC auxiliar:	Helio conectado a la unión definitiva purgada
Línea de sangrado:	Conducción 316SS de 0,0625 pulgadas d.e. × 0,010 pulgadas d.i. × 100 cm, en la parte superior del horno
Presión auxiliar:	4 psi durante el análisis, 75 psi durante el retroflujo
Conexiones:	Entre el inyector y la unión definitiva purgada
Restrictor:	Tubo de sílice fundida inerte, 0,65 m × 0,15 mm (ref. 160-7625-5)
Conexiones:	Entre la unión definitiva purgada y el MSD

### Condiciones de MSD

MSD:	Sistema GC/MS de triple cuadrupolo 7000C de Agilent, inerte, con electrónica de alto rendimiento
Bomba de vacío:	Turbo de alto rendimiento
Modo:	MRM
Archivo de sintonización:	Atune.u
Temperatura de línea de transferencia:	280 °C
Temp de la fuente:	300 °C
Temp cuadrupolo:	150 °C para Q1 y Q2
Retardo del disolvente:	2,57 min
Flujo de gas de colisión:	He gas inactivación a 2,35 ml/min, gas de colisión $N_2$ a 1,5 ml/min
Resolución de MS:	MS1 y MS2 = 1,2 u

Los parámetros de monitorización de reacción múltiple (MRM) se optimizaron fácilmente para cada analito usando la base de datos de MRM de pesticidas y contaminantes medioambientales (G9250AA), que incluye información sobre las condiciones MS/MS y el tiempo de retención para más de

1.070 compuestos [13]. La Tabla 2 relaciona las transiciones MRM de los analitos objetivo usados en este estudio. Se muestra en la Figura 1 un ejemplo de cromatograma GC/MS/MS típico para los 23 pesticidas objeto de la investigación.

Tabla 2. Condiciones de GC/MS/MS MRM y tiempo de retención para el análisis de pesticidas.

Analito	TR (min)	MRM			
		Canal cuant	CE (V)	Canal cual	CE (V)
Diclorvos	4,70	184,9 → 93	10	109 → 79	5
Triclorfón	5,94	110,8 → 47	30	81,8 → 47	50
2-fenilfenol	6,39	169 → 115,1	25	170 → 141,1	25
Etalfuralin	7,58	275,9 → 202,1	15	315,9 → 275,9	10
Sulfotep	7,83	237,8 → 145,9	10	201,8 → 145,9	10
Atrazina	8,69	214,9 → 58,1	10	214,9 → 200,2	5
Lindano	8,83	181 → 145	15	216,9 → 181	5
Clorotalonil	9,20	263,8 → 168	25	265,8 → 231	20
Diacinón	9,22	137,1 → 54	20	199,1 → 93	20
Clorpirifos metil	10,30	285,9 → 92,9	20	124,9 → 47	15
Diclorfluánida	11,31	223,9 → 123,1	20	123 → 77	20
Aldrina	11,55	262,9 → 192,9	35	254,9 → 220	35
Paratión etilo D <sub>10</sub> (PI)	11,96	98,7 → 67	10	114,9 → 82,9	20
Tolilfluánida	12,80	136,9 → 91	20	136,9 → 65	30
Captan	12,96	151 → 79,1	15	149 → 79,1	10
Forpet	13,13	259,8 → 130,1	15	261,8 → 130,1	15
Procimidona	13,13	282,8 → 96	10	96 → 67,1	10
Bupirimato	15,44	272,9 → 193,1	15	272,9 → 108	5
Endrina	15,68	316,7 → 280,8	5	244,8 → 173	30
Sulfato de endosulfán	17,44	273,9 → 238,9	15	271,9 → 237	15
<sup>13</sup> C-DDT (PI)	17,69	246,5 → 177,1	15	248,5 → 177,1	15
DDT	17,69	235 → 165,2	20	237 → 165,2	20
TPP (PI)	18,20	325,9 → 169	30	325,9 → 233	27
Iprodiona	18,82	313,8 → 55,9	20	187 → 124	25
Permetrina	20,68	183,1 → 153,1	15	183,1 → 153,1	15
Deltametrina	22,51	252,9 → 93	15	181 → 152,1	25

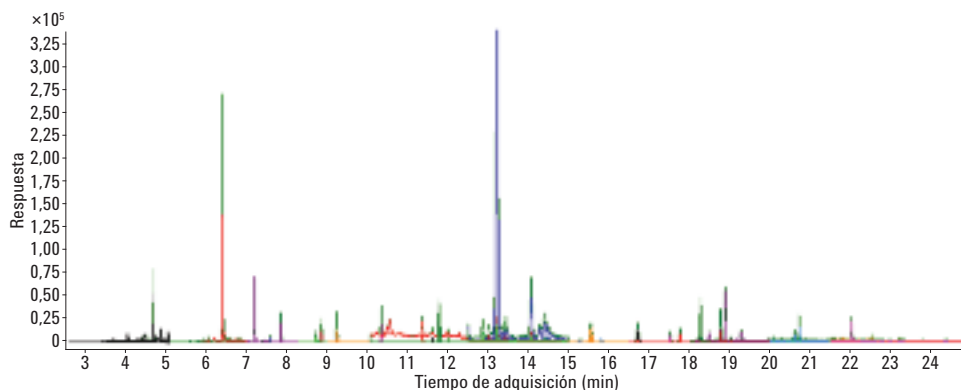


Figura 1. Cromatograma de GC triple cuadrupolo (MRM) típico de una muestra de aguacate reforzada con 50 ng/g de patrón de pesticidas. La preparación de muestras usó QuEChERS seguido de limpieza con Bond Elut EMR—Lipid de Agilent.

## Preparación de muestras

El procedimiento final de preparación de muestras se optimizó de la siguiente forma:

1. Pese 15 g ( $\pm 0,1$  g) de aguacate homogéneo en tubos de centrífuga de 50 ml.
2. Añada 15 ml de acetonitrilo (AA al 1 %) y mezcle en vórtex durante 10 s.
3. Añada un envase de sal de extracción AOAC.
4. Mezcle en un agitador mecánico durante 2 min.
5. Centrifugue a 5.000 rpm durante 5 min.
6. Añada 5 ml de agua a un tubo de dSPE EMR—Lipid de 15 ml, y transfiera 5 ml de sobrenadante a un tubo de EMR—Lipid.
7. Mezcle en vórtex inmediatamente para dispersar la mezcla, y posteriormente durante 60 s más junto con todo el lote en un vortizador multitubo.
8. Centrifugue a 5.000 rpm durante 3 min.
9. Transfiera 5 ml de sobrenadante a un tubo EMR—Lipid pulido de 15 ml que contenga 2 g de sales ( $\text{NaCl}:\text{MgSO}_4$  1:4), y mezcle en vórtex durante 1 min.
10. Centrifugue a 5.000 rpm durante 3 min.
11. Transfiera la capa superior de ACN a un vial de muestra para su inyección en el sistema GC/MS/MS.

El flujo de trabajo completo para preparación de muestras se muestra en la Figura 2.

## Patrones de calibración y muestras de control de calidad

Muestras de control de calidad (QC) previamente marcadas se reforzaron con las concentraciones adecuadas de disolución de trabajo combinada normalizada, después de la etapa 1, para seis réplicas. Las muestras de QC corresponden a 5, 50, y 300 ng/g en aguacate. Las muestras de QC fueron de 25, 250 y 1.500 ng/g para captan, folpet, triclorfón, y bupirimato. La disolución de PI también se introdujo en todas las muestras, salvo el blanco de matriz, correspondiente a 250 ng/g en aguacate.

Los patrones de calibración acoplados con matriz preparada con patrón y soluciones de trabajo de PI se añadieron adecuadamente a las muestras de blanco de matriz después de la etapa 10, correspondiente a 1, 5, 10, 50, 100, 200, 300, y 400 ng/g en aguacate, y 250 ng/g de PI. Los cuatro compuestos usaron patrones de calibración a 5, 25, 50, 250, 500, 1.000, 1.500, y 2.000 ng/g.

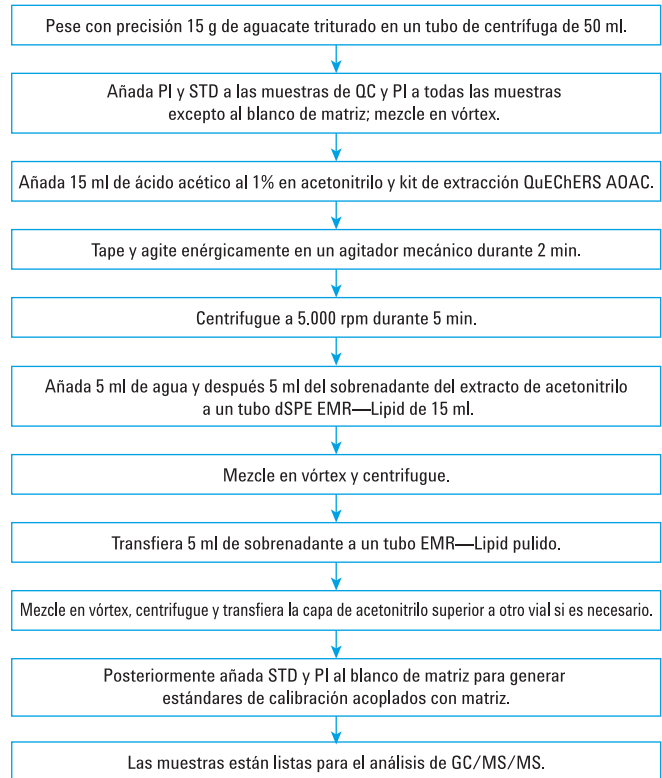


Figura 2. Flujo de trabajo de preparación de muestras usando una extracción QuEChERS con limpieza con Bond Elut EMR—Lipid de Agilent para el análisis de pesticidas en aguacate mediante GC/MS/MS.

## Evaluación de la limpieza de la matriz

Los extractos de aguacate se aplicaron a tres materiales de limpieza diferentes, dSPE (C18/PSA) graso, absorbente de circonio, y EMR—Lipid. Un experimento comparó el perfil de GC/MS de barrido completo del extracto final, antes y después de la limpieza. Se superpusieron los cromatogramas para comparar la cantidad de limpieza de la matriz según el ruido de fondo del cromatograma. Para evaluar cuantitativamente la eficacia de limpieza de la matriz, el cromatograma de GC/MS de barrido completo se integró manualmente para la totalidad de la ventana, y la eficacia de extracción de la matriz se calculó a continuación de acuerdo con la Ecuación 1.

$$\% \text{ Eliminación matriz} = \frac{\text{Área total de pico Muestra sin limpieza} - \text{Área total de pico Muestra con limpieza}}{\text{Área total de pico Muestra sin limpieza}} \times 100$$

### Ecuación. 1

Está publicado [14] un experimento gravimétrico que compara el peso de las sustancias extraídas simultáneamente en aguacate después del tratamiento con EMR—Lipid, C18/PSA, y absorbente de circonio.

## Comparación y validación del método

Un experimento de recuperación de analitos comparó muestras antes y después del marcado a 50 ng/g en aguacate. Las muestras se trataron con el procedimiento de extracción QuEChERS AOAC seguido por limpieza con EMR—Lipid, C18/PSA, o circonio. Para la limpieza con EMR—Lipid se siguió el protocolo descrito en la Figura 2. Los demás materiales aplicaron la misma extracción QuEChERS con limpieza mediante absorbente de circonio y C18/PSA. Una alícuota de 1 ml de extracto de ACN bruto se transfirió a un tubo dSPE C18/PSA de 2 ml (ref: 5982-5122) o a un vial de 2 ml que contenía 100 mg de absorbente de circonio. Todas las muestras se mezclaron en vórtex durante un minuto y se centrifugaron a 13.000 rpm durante tres minutos en una microcentrifuga. La capa de ACN se transfirió a un vial de muestra para su análisis mediante GC/MS/MS. Se prepararon patrones de calibración acoplados con matriz mediante marcado posterior del extracto de blanco de aguacate con los patrones y los patrones internos. La recuperación se calculó a partir del cociente entre las áreas de pico del analito de las muestras antes y después del marcado.

El método EMR—Lipid se validó en aguacate a concentraciones en tres niveles para seis réplicas usando una curva de calibración acoplada con de ocho puntos. Se utilizó un patrón interno (PI) para cuantificación, y los datos se notificaron en forma de exactitud y precisión.

## Impacto de la matriz sobre el rendimiento del sistema GC/MS/MS

Se investigó el impacto de la matriz sobre el comportamiento del sistema GC/MS/MS mediante la evaluación de la uniformidad de la respuesta de los analitos para múltiples inyecciones de muestras de aguacate. El experimento comparó las respuestas de los analitos en el sistema GC/MS/MS a lo largo del tiempo realizando múltiples inyecciones de extractos de aguacate tratados con EMR—Lipid, C18/PSA, o absorbente de circonio. Cada lote de pruebas incluyó blancos de matriz y muestras de QC marcadas con 50 ppb. La secuencia inyectó cuatro blancos con una muestra de QC en la quinta inyección, y se realizó un total de 100 inyecciones. Esto se llevó a cabo para determinar el efecto de la acumulación de la matriz no extraída en las superficies de paso de flujo del GC/MS/MS sobre la respuesta del instrumento al analito usando las diferentes opciones de limpieza. Para cada limpieza, se usó la respuesta del analito (área del pico) para calcular el DER (%) para el lote de 100 inyecciones. Para eliminar la contribución del paso de flujo del GC se usaron consumibles Inert Flow Path de Agilent, con un liner Ultra Inerte de Agilent y una columna nuevos para cada método de limpieza.

## Resultados y comentarios

### Evaluación de la limpieza de la matriz

Las matrices complejas afectan significativamente al rendimiento del GC/MS ya que la matriz forma sitios activos en la superficie de paso de flujo del fluido, induce efectos de la matriz en el espectrómetro de masas, e introduce interferencias en el cromatograma final. Aunque los sistemas GC/MS (SIM) y GC/MS/MS (MRM) muestran mayor selectividad para los iones objetivo, la matriz no extraída puede seguir ocasionando interferencias y una disminución del rendimiento con el tiempo. Para poner fin a estos efectos negativos derivados de matrices grasas tales como aguacate, se deben aplicar métodos más completos de preparación y limpieza de las muestras, para que estas resulten más aptas para su análisis mediante GC/MS.

La Figura 3A muestra los cromatogramas GC/MS de barrido completo superpuestos para un blanco de matriz de aguacate y los perfiles cromatográficos obtenidos con los métodos de limpieza EMR—Lipid, C18/PSA, y circonio. El cromatograma de la muestra sin limpieza adicional (traza de color negro) muestra una gran abundancia de interferencias de la matriz, que impedirán el análisis de los analitos objetivo. Los cromatogramas de los extractos tratados con limpieza mediante C18/PSA (azul) y absorbente de circonio (verde) muestran una extracción de la matriz del 36 % y el 55 %, respectivamente, como se determina mediante la Ecuación 1. Sin embargo, la traza de la dSPE con EMR—Lipid (roja) muestra una eliminación de estas interferencias casi en la línea base del cromatograma GC/MS de barrido completo, lo que corresponde a una eliminación de la matriz del 95 %. La gran cantidad de limpieza conseguida con EMR—Lipid tiene implicaciones evidentes para el análisis de pesticidas en aguacate, ya que hay mucha menos matriz en la muestra que pueda afectar al rendimiento del instrumento. Además, esto se consigue usando una dSPE sencilla con EMR—Lipid en un flujo de trabajo QuEChERS convencional.

La Figura 3B muestra los cromatogramas MRM GC/MS/MS solapados para muestras de aguacate fortificadas con 50 ppb de patrón de pesticidas. Debido a la mayor selectividad del sistema MS/MS, el fondo de la matriz es menos significativo que en un cromatograma GC/MS SIM o de barrido completo. A pesar de la superior selectividad para los analitos de interés, siguen apareciendo picos de interferencia entre 11 y 20 minutos en el cromatograma de C18/PSA (azul) y circonio (verde). Estas interferencias afectan a la precisa integración de algunas señales de analito. Los extractos EMR—Lipid muestran un fondo sustancialmente más limpio, como se pone de manifiesto por la traza de color rojo mostrada en la Figura 3B, que mejora de forma importante la precisión de la integración.

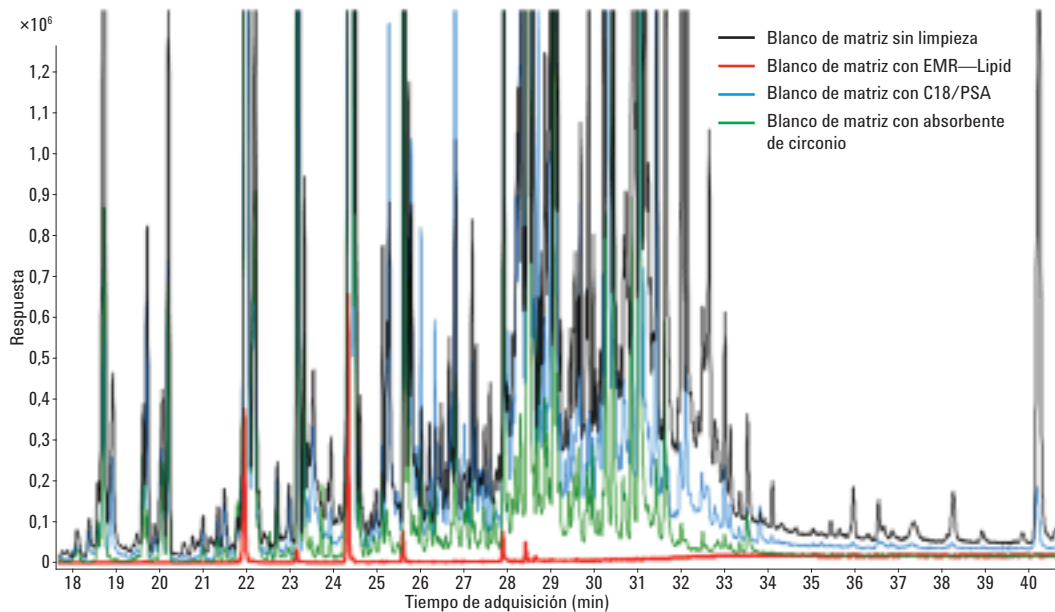


Figura 3A. Superposición de cromatogramas de GC/MS de barrido completo obtenidos con blancos de matriz de aguacate preparados mediante extracción QuEChERS AOAC seguida por limpieza dSPE usando Bond Elut EMR—Lipid de Agilent (rojo), circonio (verde), PSA/C18 (azul), o sin limpieza (negro).

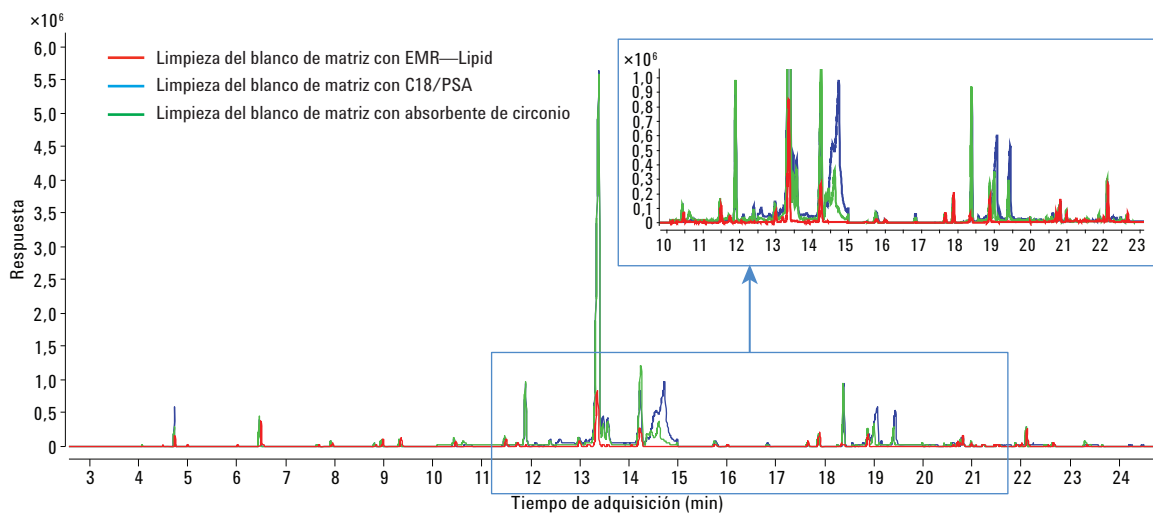


Figura 3B. Superposición de cromatogramas MRM de GC/MS/MS de una muestra de aguacate preparada mediante extracción QuEChERS AOAC seguido de Bond Elut EMR—Lipid de Agilent (rojo), C18/PSA (azul), y absorbente de circonio (verde). Todas las muestras se reforzaron con 50 ng/g de patrón de pesticidas.

En la Figura 4 se demuestra la limpieza mejorada de la matriz con EMR—Lipid y el efecto positivo de una mayor extracción de la matriz para tres analitos de ejemplo. En todos los casos, los cromatogramas obtenidos tras la limpieza con EMR—Lipid muestran menos picos de interferencia, mejor relación señal/ruido, y una integración coherente de la línea base. Estas mejoras hacen que el procesamiento y la revisión de los datos sea más rápida y sencilla, y proporciona un importante grado de confianza en el método analítico.

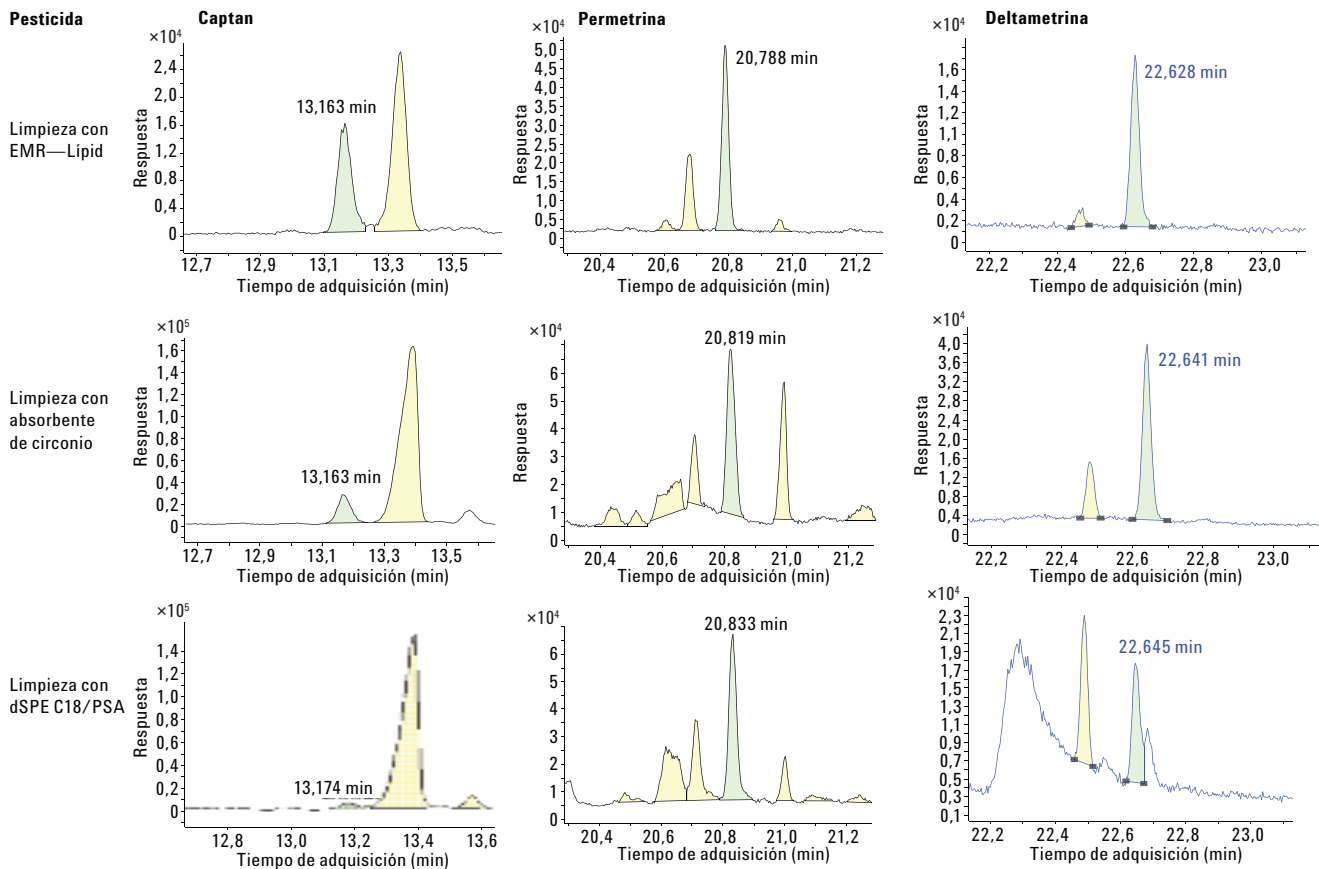


Figura 4. Comparación de cromatogramas para los analitos de interés y el efecto de la matriz sobre la respuesta del pico, calidad del pico, e interferencias en la ventana MRM. Las muestras de blanco se trataron bien con Bond Elut EMR—Lipid de Agilent, circonio o C18/PSA y la muestra final se marcó posteriormente con 50 ppb de patrón de pesticidas.

## Comparación de métodos para recuperación de los analitos

A continuación se comparó el método EMR—Lipid optimizado con un método QuEChERS tradicional con C18/PSA o absorbente de circonio. La Figura 5 muestra la comparación de las recuperaciones para los 23 pesticidas usando estos materiales de limpieza diferentes. Los resultados demuestran que la limpieza con EMR—Lipid no produce una retención significativa de analitos y, por tanto, proporciona resultados de recuperación comparables a la limpieza con C18/PSA. Sin embargo, hemos demostrado que los absorbentes C18/PSA y circonio no proporcionan una eliminación eficaz de la matriz.

Algunos analitos tuvieron menores recuperaciones absolutas independientemente del método de limpieza. Aldrina, endrina, y DDT tuvieron una recuperación menor del 60 %, y la permetrina y la deltametrina tienen valores del 63 % y 75 %, respectivamente. La limpieza con C18/PSA proporcionó una recuperación ligeramente mayor que la limpieza con EMR—Lipid y absorbente de circonio. Estos pesticidas son muy lipófilos (log P alto) y con baja solubilidad en agua, y se incorporan fácilmente a las matrices de las muestras grasas tales como el aguacate, haciendo que sea un desafío su extracción con disolventes polares como acetonitrilo. El uso de disolventes más fuertes puede aumentar la eficiencia de extracción de estos analitos lipófilos de la matriz grasa, aumentando la eficiencia de extracción y mejorando la recuperación absoluta. En un trabajo futuro se investigará la eficiencia de extracción de compuesto lipófilos de matrices grasas seguido por la extracción mejorada en matriz.

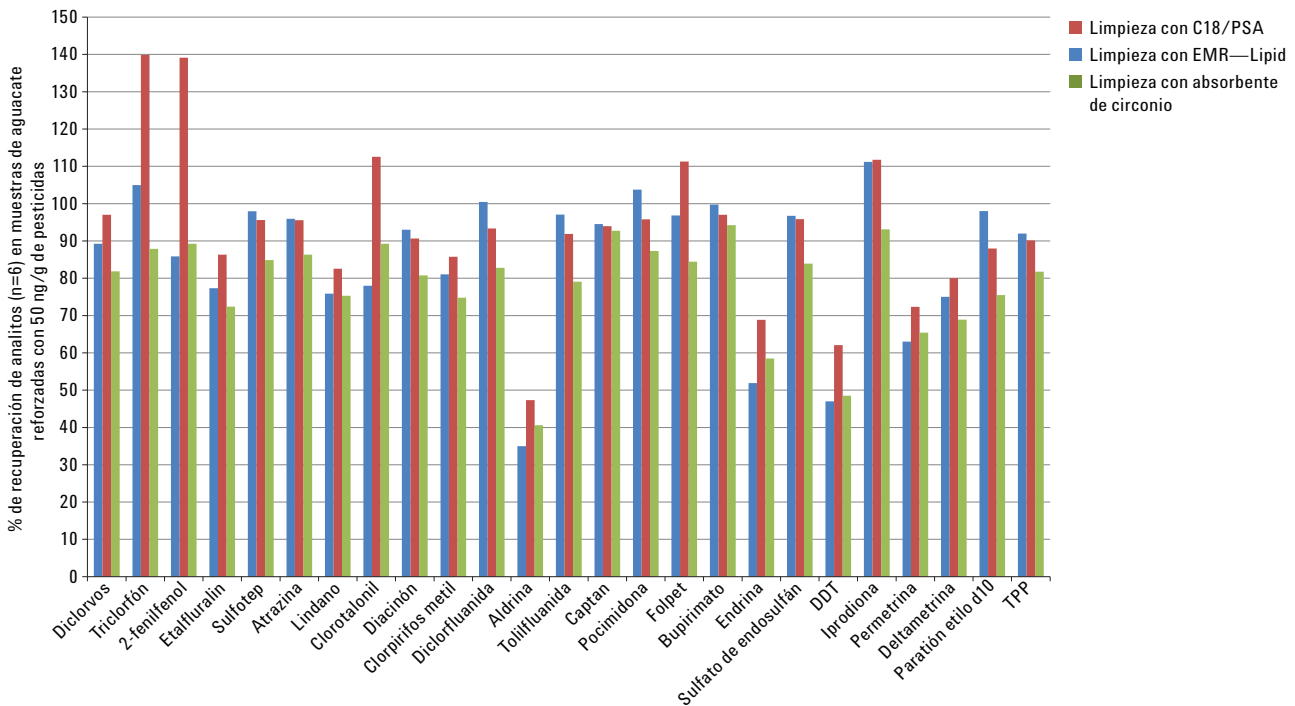


Figura 5. Comparación de la recuperación entre las limpiezas Bond Elut EMR—Lipid de Agilent, C18/PSA, y circonio a 50 ppb en aguacate.

Para corregir estos compuestos con un valor bajo de recuperación absoluta, se utilizó un patrón interno marcado, <sup>13</sup>C-DDT, para mejorar la precisión de DDT, aldrina, y endrina en los resultados de cuantificación finales. El uso de TPP como patrón interno de la permetrina y deltametrina fue adecuado para la cuantificación.

### Validación de métodos

El método EMR—Lipid se validó mediante el análisis de un lote de cuantificación completo. Se utilizaron patrones internos para cuantificación, y los datos se notificaron en forma de exactitud y precisión. Se utilizaron tres patrones internos para la cuantificación, concretamente, paratión etilo-D<sub>10</sub>, <sup>13</sup>C-DDT, y TPP. Los analitos con tiempos de retención menores de 12 minutos usaron paratión etilo-D<sub>10</sub> como PI, y

los de más de 12 minutos usaron TPP como PI. Como se ha mencionado anteriormente, se utilizó <sup>13</sup>C-DDT como PI para aldrina, endrina y DDT para corregir la pérdida de analito debido a la baja eficacia de extracción.

Los resultados detallados de la validación se relacionan en la Tabla 3. La Figura 6 es un resumen generado usando la exactitud y precisión promedio calculadas para 18 réplicas totales de los QC (tres niveles, n = 6). La exactitud de los pesticidas estuvo comprendida entre 70 % y 120 % para todos los analitos salvo uno (67 %), y la precisión fue inferior al 20 % de DER para todos los analitos, con un 80 % por debajo del 10 % de DER. La exactitud de la aldrina siguió estando ligeramente por debajo del 70 % pero con buena precisión (DER <6 %), y es aceptable según las directrices SANCO [15].

Tabla 3. Resultados de cuantificación para pesticidas en aguacate marcado a niveles de 5, 50, y 300 ng/g para seis réplicas.

Analito	Curva de calibración		Exactitud y precisión del método (ng/g QC <sup>1</sup> )						
	Ajuste de regresión/peso	R <sup>2</sup>	Intervalo cal. (ng/g)	5 (25)		50 (250)		300 (1.500)	
				% Rec	DER	% Rec	DER	% Rec	DER
Diclorvos	Lineal, 1/x	0,9967	1-400	97	8,2	108	4,9	111	12,7
Triclorfón	Lineal, 1/x	0,9964	5-2000 <sup>1</sup>	98	7,8	95	7,3	84	4,7
2-fenilfenol	Lineal, 1/x	0,9996	10-400 <sup>2</sup>	97	14,0	104	1,7	105	5,1
Etalfluralin	Lineal, 1/x	0,9969	1-400	109	3,2	98	7,6	110	6,5
Sulfotep	Lineal, 1/x	0,9958	1-400	96	5,8	76	3,9	85	9,8
Atrazina	Lineal, 1/x	0,9967	1-400	91	5,0	80	2,1	76	3,9
Lindano	Lineal, 1/x	0,9991	1-400	92	6,7	104	4,0	98	12,5
Clorotalonil	Lineal, 1/x	0,9944	1-400	89	13,5	103	8,6	92	19,4
Diacinón	Lineal, 1/x	0,9993	1-400	102	6,8	116	5,1	108	8,9
Clorpirifos metil	Lineal, 1/x	0,9984	1-400	101	6,2	123	4,5	113	15,0
Diclofluanida	Lineal, 1/x	0,9989	1-400	96	10,2	85	5,1	91	4,3
Aldrina	Lineal, 1/x	0,9982	1-400	76	4,8	59	2,3	65	5,1
Tolilfluanida	Lineal, 1/x	0,9990	10-400	108	10,0	93	6,2	93	5,4
Captan	Lineal, 1/x	0,9959	25-2000 <sup>1,2</sup>	89	8,2	109	11,0	87	18,1
Folpet	Lineal, 1/x	0,9897	5-2000 <sup>1</sup>	76	9,5	79	9,9	87	13,2
Procimidona	Lineal, 1/x	0,9977	1-400	87	5,0	76	1,9	79	7,2
Bupirimato	Lineal, 1/x	0,9957	5-2000 <sup>1</sup>	101	6,5	100	5,6	85	10,3
Endrina	Lineal, 1/x	0,9967	1-400	75	10,8	88	6,7	80	13,6
Sulfato de endosulfán	Lineal, 1/x	0,9996	1-400	96	9,9	97	6,4	95	4,9
DDT	Lineal, 1/x	0,9995	1-400	103	4,5	105	2,6	107	4,6
Iprodiona	Lineal, 1/x	0,9995	1-400	97	6,7	105	2,7	97	4,2
Permetrina	Lineal, 1/x	0,9992	1-400	87	6,6	97	4,3	84	14,0
Deltametrina	Lineal, 1/x	0,9963	1-400	89	13,8	92	8,3	98	11,5

<sup>1</sup> Se prepararon los compuestos a una concentración cinco veces mayor en la solución de trabajo de patrón combinada debido a la baja respuesta. Por tanto, el marcado QC y los niveles de marcado de patrón de calibración fueron cinco veces mayores que los del resto de compuestos.

<sup>2</sup> LOQ aumentado debido bien a una mala sensibilidad o bien a que los picos de interferencia de la matriz interfirieron en la detección del analito para el valor original de LOQ.

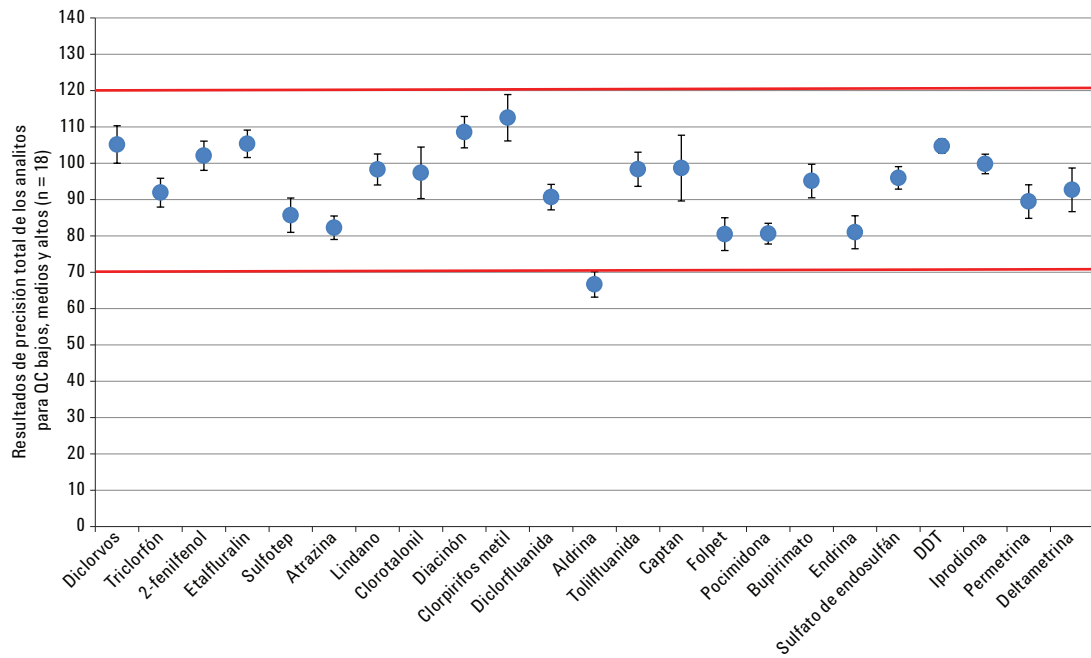


Figura 6. Resultados de cuantificación para 23 pesticidas en aguacate usando extracción con QuEChERS con Bond Elut EMR—Lipid de Agilent, dSPE. Los puntos de datos representan exactitud y precisión y se calcularon a tres niveles en seis réplicas. Barra de error = IC del 95 %.

## Impacto de la matriz sobre el rendimiento del sistema GC/MS/MS

Las interferencias de la matriz afectarán al rendimiento del sistema GC/MS/MS con el tiempo a medida que se inyecten más muestras en el sistema. Los sitios activos en el paso de flujo del GC pueden afectar significativamente al rendimiento del instrumento. Los componentes de ruta de flujo inerte de Agilent proporcionan la mejor desactivación posible para la totalidad del paso de flujo del GC y reducen significativamente las interacciones negativas entre los analitos y los sitios activos que dan como resultado pérdida de analito y anomalías cromatográficas. Sin embargo, si la matriz se carga de compuestos con alto punto de ebullición (alto contenido de grasa), estos se acumularán en la superficie del paso de flujo y generarán nuevos sitios activos. Con el tiempo, esto puede provocar variaciones en la respuesta de los analitos, lo que afecta en gran medida a la fiabilidad del método y reduce el número de inyecciones por lote. Para resolver este problema, los laboratorios deberán realizar más frecuentemente el mantenimiento del instrumento, tal como el cambio del liner o el cambio/corte de la columna, con lo que se reducirá la productividad del laboratorio.

Tal como se demuestra mediante la evaluación de la limpieza de la matriz y la determinación gravimétrica [14], las muestras tratadas con EMR—Lipid proporcionaron un fondo significativamente más limpio, mostrando mucha menos introducción de la matriz en el sistema GC/MS/MS. El número de sitios activos que se acumulan en el paso de flujo de GC/MS disminuyen, preservando la integridad analítica del instrumento. Esto se demostró con una mejor precisión del analito (DER) para más de 100 inyecciones de muestras de aguacate en el GC/MS/MS (Tabla 4). Las muestras tratadas con EMR—Lipid consiguieron valores de DER del <15 % para el 91 % de los analitos, la mayoría de un solo dígito. Dos compuestos, captan (DER 29,9 %) y DDT (DER 21,6 %) tuvieron valores de DER mayores en el experimento realizado con 100 inyecciones, pero proporcionaron valores de DER del 11,1 % y el 6,4 % para las 50 primeras inyecciones, respectivamente.

Tabla 4. Comparación de la reproducibilidad del analito (DER) en 50 y 100 inyecciones de muestras de analito tratado con Bond Elut EMR—Lipid de Agilent, C18/PSA, o absorbente de circonio mediante GC/MS/MS. Las muestras se reforzaron a 50 ng/g. Se usaron las áreas de pico del analito para calcular los resultados de DER.

Pesticidas	DER de analitos por encima de las 100 inyecciones (n = 20)			DER por encima de las 50 inyecciones (n = 10)		
	EMR—Lipid limpieza	C18/PSA limpieza	Absorbente de circonio limpieza	EMR—Lipid limpieza	C18/PSA limpieza	Absorbente de circonio limpieza
Diclorvos	6,2	10,5	16,8	2,2	9,4	6,3
2-fenilfenol	7,0	13,6	19,5	5,0	12,4	8,4
Etalfuralin	12,4	18,8	32,0	5,8	10,3	7,9
Sulfotep	7,1	11,8	17,2	3,1	6,4	10,8
Atrazina	6,8	12,2	19,1	3,2	12,2	5,2
Lindano	8,5	10,8	20,0	4,6	10,9	5,1
Clorotalonil	12,5	11,7	37,4	8,0	12,9	11,0
Diacinón	6,6	11,7	16,9	4,4	10,5	5,6
Clorpirifos metil	8,4	8,9	14,9	3,8	8,6	6,6
Diclorfluanida	11,7	9,0	25,9	5,4	9,9	5,5
Aldrina	9,8	19,3	25,7	8,6	19,3	7,1
Tolilfluanida	10,5	6,6	17,8	4,2	6,9	6,6
Captan	29,9	51,9	47,1	11,1	24,9	21,7
Procimidona	6,8	14,3	22,5	5,6	13,8	4,8
Bupirimato	6,8	10,4	20,7	7,6	11,0	6,2
Endrina	8,3	12,6	24,1	5,9	13,8	5,4
Endosulfano sulfato	8,5	12,1	22,4	5,3	12,7	6,4
DDT	21,6	22,4	42,6	6,4	12,0	11,8
Iprodiona	11,0	10,7	40,0	8,2	10,9	16,3
Permetrina	6,8	11,8	18,8	5,2	11,2	8,6
Paratión etilo-d <sub>10</sub> (PI)	11,8	7,2	13,0	4,7	6,8	7,0
TPP (PI)	9,1	19,9	28,3	9,0	22,5	12,8

En comparación, C18/PSA produjo valores de DER del <15 % en el 74 % de los analitos, y el circonio valores mucho menores, con solamente un 9 %. El extracto tratado con circonio resultó especialmente problemático. El 100 % de los analitos tuvo valores superiores al 10 % de DER, y un 57 % fueron incluso superiores al 20 % de DER para 100 inyecciones. Esto indica que el mayor nivel de matriz remanente en el extracto limpio mediante C18/PSA y circonio afecta negativamente al rendimiento del instrumento, dando como resultado una variabilidad significativa en la respuesta del analito. Estos resultados atestiguan la excelente extracción de la matriz que proporciona EMR—Lipid, que da como resultado menos actividad en el paso de flujo del GC, mayor precisión en múltiples inyecciones, y más muestras analizadas antes de realizar el mantenimiento de instrumento.

## Conclusiones

Se ha desarrollado un método rápido, fiable y robusto usando la extracción QuEChERS AOAC seguida de limpieza mediante el sistema Bond Elut EMR—Lipid de Agilent. El método se ha validado para el análisis de 23 pesticidas que se pueden analizar mediante GC-en aguacate. Los efectos de la matriz se evaluaron y se compararon con la limpieza dSPE tradicional con C18/PSA y absorbente de circonio. Los resultados demuestran que EMR—Lipid proporciona una limpieza cromatográfica superior tanto con GC/MS y con GC/MS/MS en comparación con C18/PSA y el absorbente de circonio. La implementación de la limpieza con EMR—Lipid facilita el uso de la técnica de GC/MS para el análisis de muestras en matrices grasas. Los resultados de comparación de las recuperaciones demuestran que la limpieza con EMR—Lipid produjo recuperaciones de analito comparables con respecto a C18/PSA, e incluso una recuperación mejor que con el absorbente de circonio. La mayor ventaja del EMR—Lipid en esta aplicación se atribuyó al alto grado de extracción de la matriz, que proporciona una reproducibilidad notable para 100 inyecciones realizadas en el sistema GC/MS/MS. Las respuestas de los analitos en C18/PSA y especialmente en las muestras tratadas con circonio fueron muy variables para este experimento de 100 inyecciones. El uso de EMR—Lipid como material de limpieza para dSPE en un flujo de trabajo QuEChERS mejora, por tanto, la productividad global del laboratorio, aumenta el procesamiento de las muestras, disminuye el procesamiento y la revisión de los datos, reduce el número de repeticiones del análisis de los lotes, y reduce el mantenimiento del instrumento. En futuros trabajos examinaremos las ventajas de la extracción mejorada en matriz en otras muestras complejas y otros analitos objetivo.

## Referencias

1. Anastassiades, M.; Lehotay, S. J.; Štajnbaher, D.; Schenck, F. S. *J. AOAC Int.* **2003**, *86*, 412-431.
2. Lehotay, S. J.; Mastovská, K.; Lightfield, A. R. *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 615-629.
3. Chamkasem, N.; Ollis, L. W.; Harmon, T.; Mercer, G. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 2315-2329.
4. Hildmann, F.; Gottert, C.; Frenzel, T.; Kempe, G.; Speer, K. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1403*, 1–20.
5. Lehotay, S. J. *Mass Spec. in Food Safety Methods in Mol. Biol.* **2011**, *747*, 65-91.
6. Sapozhnikova, Y.; Lehotay, S. J. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *758*, 80–92.
7. Morris, B. D.; Schriener, R. B. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 5107–5119.
8. Wong, J. W. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 7636-7646.
9. Hayward, D. G.; Wong, J. W. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 4686-4693.
10. Saito, K.; Sjödin, A.; Sandau, C. D.; Davis, M. D.; Nakazawa, H.; Matsuki, Y.; Patterson, Jr., D. G. *Chemosphere* **2004**, *57*, 373–381.
11. Kegley, S.E.; Hill, B.R.; Orme, S.; Choi, A. H. *PAN Pesticide Database*; Pesticide Action Network, North America, Oakland, CA, EE.UU., **2014**.  
[http://www.pesticideinfo.org/Search\\_Chemicals.jsp](http://www.pesticideinfo.org/Search_Chemicals.jsp)
12. Szelewski, M. J.; Quimby, B. *New Tools for Rapid Pesticide Analysis in High Matrix Samples*; Nota de aplicación, Agilent Technologies, Inc. Número de publicación 5989-1716EN, **2004**.
13. Meng, C-K. *The GC/MS/MS Analyzer and the Pesticides and Environmental Pollutants MRM Database*; Nota de aplicación, Agilent Technologies, Inc. Número de publicación 5990-9453EN, **2011**.
14. Zhao, L.; Lucas, D. *Multiresidue Analysis of Pesticides in Avocado with Bond Elut EMR—Lipid by LC/MS/MS*; Nota de aplicación, Agilent Technologies, Inc. Número de publicación 5991-6098EN, **2015**.
15. Anon. *Guidance Document on Analytical Quality Control and Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed, SANCO/12571/2013, 19 November 2013*; Comisión Europea, Dirección General de Salud y Seguridad Alimentaria, Bruselas, Bélgica.

## Más información

Estos datos representan resultados típicos. Si desea obtener más información sobre nuestros productos y servicios, visite nuestra página web [www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem).

[www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)

Agilent no se hace responsable de ningún error incluido en este documento ni de ningún daño incidental o consecuencial relacionado con la distribución, la aplicación o el uso de este material.

La información, las descripciones y las especificaciones de esta publicación están sujetas a modificación sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2015  
Impreso en EE. UU.  
4 de agosto de 2015  
5991-6097ES



**Agilent Technologies**