

Multirückstandsanalytik von Pestiziden in Avocado mit Agilent Bond Elut EMR—Lipid durch LC/MS/MS

Application Note

Lebensmittelprüfung und Landwirtschaft

Autoren

Limian Zhao und Derick Lucas
Agilent Technologies, Inc.

Zusammenfassung

Agilent Bond Elut QuEChERS Enhanced Matrix Removal-Lipid (EMR—Lipid) gehört zur nächsten Generation der Produkte zur Probenvorbereitung und verwendet ein praktisches Verfahren der dispersiven Festphasenextraktion (dSPE) zur hochselektiven Matrixentfernung, ohne die Wiederfindung der Analyten zu beeinflussen, vor allem für fettreiche Proben. Diese Studie zeigt die Anwendung dieses neuartigen Produkts für die Analyse von 44 Pestiziden verschiedener chemischer Klassen in Avocado durch LC/MS/MS. Das Verfahren umfasst eine QuEChERS AOAC-Extraktion, gefolgt vom Einsatz von EMR—Lipid dSPE und EMR—Lipid-Feinaufreinigung mit Salzen, womit eine schnelle und effektive Probenaufreinigung ermöglicht wird. Die Matrixaufreinigung wurde bewertet durch Ermittlung der Menge der nicht flüchtigen mitextrahierten Stoffe aus einem Avocado-Extrakt nach diversen dSPE-Aufreinigungen und durch Bewertung der chromatographischen Matrixeffekte für Zielanalyten. Im Vergleich zu anderen Matrixaufreinigungsprodukten ermöglicht die EMR—Lipid dSPE eine wesentlich effizientere Matrixaufreinigung, ohne die Wiederfindung der Analyten zu beeinflussen. Durch diese optimierte Methode werden herausragende Genauigkeit und Präzision für alle 44 LC-nachweisbaren Pestizide in Avocado durch LC/MS/MS gewährleistet. Die EMR—Lipid dSPE fügt sich exakt in ein QuEChERS-Protokoll ein und ermöglicht so eine schnelle, robuste und effiziente Probenvorbereitung für die Analyse von Pestizidrückständen in fettreichen Avocado-Proben.



Agilent Technologies

Einführung

Die Analyse von Pestizidrückständen im Lebensmittelbereich mittels der QuEChERS-Methode (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) [1,2] ist für viele Labors zur Routine geworden. Dadurch können hunderte Pestizide niedriger Konzentrationen mit einer einzigen Extraktion analysiert werden. Während sich die Methode bei verschiedenen Obst- und Gemüsesorten als gut geeignet erwiesen hat, stellen fettreiche Lebensmittel wie Avocados, Nüsse und Lebensmittel tierischen Ursprungs neue Herausforderungen dar [3,4]. Diese Herausforderungen zu überwinden hat höchste Priorität für die Labors, denen die Aufgabe übertragen wurde, die Einhaltung der strengen, von Regierungsbehörden geforderten, Validierungskriterien zu erreichen und so zu gewährleisten, dass die Lebensmittel für den menschlichen Verzehr unbedenklich sind.

Die Analyse kann mittels einer Kombination aus LC und GC durchgeführt werden, um sowohl flüchtige, halbflüchtige als auch nicht flüchtige Pestizide mit Multirückstandsmethoden zur Analyse von Pestiziden unterschiedlicher chemischer Klassen abzudecken [4]. Viele Pestizide sind durch LC und GC zu erfassen, viele andere jedoch nicht. Jedes chromatographische Verfahren hat seine inhärenten Vor- und Nachteile, was die Quantifizierung der Analyten und die Beeinträchtigungen durch die mitextrahierte Matrix betrifft. Die Entfernung dieser mitextrahierten Stoffe ist wesentlich für die exakte Quantifizierung in komplexen Lebensmittelmatrices, was die Bearbeitung mit matrixbeseitigenden Sorbenzien wie C18, PSA und GCB erforderlich macht [5]. Andere Materialien, die Zirkonoxid enthalten, sind im Handel verfügbar und verbessern im Vergleich zu den typischen matrixbeseitigenden Sorbenzien normalerweise die Lipidentfernung. Jedoch gilt das nicht für alle Lipidklassen und es können für die Analyse wesentliche Analyten adsorbiert werden [6,7]. Proben mit hohem Lipidanteil müssen gegebenenfalls mit Festphasenextraktionskartuschen (SPE-Kartuschen) [7,8,9] oder mittels Gelpermeationschromatographie (GPC) [10] aufgereinigt werden, was zu steigenden Kosten und höherem Zeitaufwand für normalerweise routinemäßig durchzuführende Analysen führt.

Agilent Bond Elut EMR—Lipid ist ein neuartiges Sorbens-Material, das selektiv wichtige Lipidklassen aus der Probenmatrix entfernt, und zwar ohne unerwünschten Analytverlust. Die Entfernung von Lipidinterferenzen aus komplizierten Matrices ist für Verfahren wie die QuEChERS-Methode und die Proteinfällung von besonderer Bedeutung, weil durch diese Methoden große Mengen von Matrix zusammen mit den Zielanalyten extrahiert werden. Diese Studie untersucht die Probenvorbereitung für die Analyse von 44 LC-nachweisbaren repräsentativen Pestiziden in Avocado mittels einer QuEChERS AOAC-Extraktion, gefolgt von einer EMR—Lipid dSPE-Aufreinigung. Die Pestizide repräsentieren zwölf unterschiedliche chemische Substanzklassen, um den Machbarkeitsnachweis auch für Analyten zu führen, die in dieser Application Note nicht berücksichtigt worden sind. In Tabelle 1 werden die LC-nachweisbaren Pestizide und ihre Klassen aufgelistet. Diese Application Note zeigt die außergewöhnliche Aufreinigung, die EMR—Lipid für komplexe und fetthaltige Proben wie Avocado erzielt, sowie die hohe Wiederfindung und Präzision für 44 Pestizidrückstände unterschiedlicher chemischer Klassen in drei Konzentrationsbereichen.

Tabelle 1. LC-nachweisbare in dieser Studie eingesetzte Pestizide und ihre entsprechenden chemischen Klassen.

Repräsentatives Pestizid	Chemische Klasse	Pestizidgruppe
Methamidophos	Organophosphat	Insektizid
Acephat	Organophosphat	Insektizid
Omethoat	Organophosphat	Insektizid
Dimethoat	Organophosphat	Insektizid
Malathion	Organophosphat	Insektizid
EPN	Organophosphat	Insektizid
TEPP-A	Organophosphat	Insektizid
Monocrotophos	Organophosphat	Insektizid
Mexacarb	Carbamat	Insektizid
Carbaryl	Carbamat	Insektizid
Propoxur	Carbamat	Insektizid
Carbofuran	Carbamat	Insektizid
Methiocarb	Carbamat	Insektizid
Chlorpropham	Carbamat	Insektizid
Propham	Carbamat	Insektizid
Aminocarb	Carbamat	Insektizid
Oxamyl	Carbamat	Insektizid
Methomyl	Carbamat	Insektizid
Aldicarb	Carbamat	Insektizid
Terbuthylazin	Triazin	Algizid
Simazin	Triazin	Herbizid
Sebuthylazin	Triazin	Herbizid
Monuron	Harnstoff	Herbizid
Chlortoluron	Harnstoff	Herbizid
Diuron	Harnstoff	Herbizid
Fluometuron	Harnstoff	Herbizid
Isoproturon	Harnstoff	Herbizid
Metobromuron	Harnstoff	Herbizid
Siduron	Harnstoff	Herbizid
Linuron	Harnstoff	Herbizid
Neburon	Harnstoff	Herbizid
Fenuron	Harnstoff	Herbizid
Metoxuron	Harnstoff	Herbizid
Carbendazim	Benzimidazol	Fungizid
Thiabendazol	Benzimidazol	Fungizid
Thiophanat-methyl	Benzimidazol	Fungizid
Cyprodinil	Anilinopyrimidin	Fungizid
Imazail	Imidazol	Fungizid
Penconazol	Triazol	Fungizid
Imidacloprid	Neonicotinoid	Insektizid
Metazachlor	Chloracetanilid	Herbizid
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure	Chlorphenol-Säure	Herbizid
Dichlorprop	Chlorphenol-Säure	Herbizid
Bentazon	Nicht klassifiziert	Herbizid

Experimentelles

Alle Reagenzien und Lösemittel waren von HPLC- oder Analysenqualität. Acetonitril (ACN) und Methanol wurden von Honeywell (Muskegon, MI, USA) bezogen. Essigsäure zur Synthese (AA) von Sigma-Aldrich, Corp. (St. Louis, MO, USA). Pestizidstandards und interne Standards von Sigma-Aldrich, Corp. und AccuStandard (New Haven, CT, USA).

Lösung und Standards

Acetonitril mit einem Gehalt von 1 % AA wurde erhalten durch Zugabe von 10 ml Essigsäure zu 990 ml ACN. Stammlösungen für Standards und interne Standards (IS) wurden für einige der Pestizide entweder in ACN oder in Methanol mit 2,0 mg/ml hergestellt. Die übrigen Pestizidstandards stammen aus handelsüblichen Stammlösungen gemischter Standards, die unmittelbar für die Bereitung der Standardarbeitslösung verwendet wurden. Eine kombinierte Arbeitslösung wurde in ACN mit 25 µg/ml bereitete. Ein 25 µg/ml Aliquot der Arbeitslösung TPP IS wurde in ACN bereitete.

Ausstattung

Für die Probenvorbereitung eingesetzte Geräte und Materialien:

- Geno/Schleifer (SPEX, Metuchen, NJ, USA)
- Centra CL3R Zentrifuge (Thermo IEC, MA, USA)
- Eppendorf Mikrozentrifuge (Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA)
- Vortexer und Multiröhrchen-Vortexer (VWR, Radnor, PA, USA)
- Flaschenaufsatzdispenser (VWR, So. Plainfield, NJ, USA)
- Eppendorf-Pipetten und Mehrkanalpipette
- Agilent Bond Elut EMR —Lipid-Röhrchen (Best.-Nr.: 5982-1010) und Agilent Bond Elut Final Polish for Enhanced Matrix Removal —Lipid-Röhrchen (Best.-Nr.: 5982-0101)

Geräte

Die Analyse wurde mit einem Agilent 1290 Infinity LC durchgeführt, bestehend aus:

- Agilent 1290 Infinity quaternäre Pumpe (G4204A)
- Agilent 1290 Infinity High Performance Probengeber (G4226A), ausgestattet mit einem Agilent 1290 Infinity Thermostat (G1330B) und einem Agilent 1290 Infinity Säulenthmostat (G1316C)

Das UHPLC-System wurde mit einem Agilent 6490 Triple Quadrupol LC/MS-System gekoppelt, ausgestattet mit einer Agilent Jet Stream Elektrospray-Ionenquelle und iFunnel-Technologie. Die Agilent MassHunter Workstation-Software wurde für die Datenakquisition und die Analyse eingesetzt.

Bedingungen für das Gerät

HPLC-Bedingungen

Säule:	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2,1 × 150 mm, 1,8 µm (Best.-Nr.: 959759-902), Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 UHPLC Guard, 5 × 2,1 mm, 1,8 µm (Best.-Nr.: 821725-902)	
Mobile Phase:	A) 0,1 % FA in Wasser B) 0,1 % FA in Acetonitril	
Flussrate:	0,3 ml/min	
Säulentemp.:	35 °C	
Temperatur des automatischen Probengebers:	4 °C	
Inj. Vol.:	3 µl	
Nadelspülung:	1:1:1:1 ACN:MeOH:IPA:H ₂ O mit 0,2 % FA	
Gradient:	Zeit (Min)	%B
	0	10
	15	95
	15,01	100
Stopzeit:	16 Min	
Posttime (Wartezeit):	3 Min	

MS-Bedingungen

Positiv-/Negativ-Modus		
Gastemp.:	120 °C	
Gasstrom:	14 l/Min	
Zerstäuber:	40 psi	
Sheathgas-Heizung:	400 °C	
Sheathgas-Fluss:	12 l/Min	
Kapillare:	3000 V	
iFunnel-Parameter:	Positiv	Negativ
Hochdruck RF:	100 V	90 V
Tiefdruck RF:	70 V	60 V

MS MRM-Bedingungen zu den Analyten werden in Tabelle 2 aufgelistet, und ein typisches Chromatogramm zeigt Abbildung 1.

Tabelle 2. LC Triple Quadrupol MRM Parameter und Retentionszeiten für die in dieser Studie eingesetzten Pestizide.

Analyte	RT (Min)	Delta RT (Min)	Polarität	Vorläufer-Ion (m/z)	Produkt-Ion (m/z)	CE (v)
Methamidophos	1,83	2	Positiv	142	94,1	9
Aminocarb	2,03	2	Positive	209,1	137,2	24
Acephat	2,13	2	Positiv	184	143	9
Omethoat	2,54	2	Positiv	214	124,9	17
Carbendazim	3,40	2	Positiv	192,1	132	33
Thiabendazol	3,89	2	Positiv	202	131,1	41
Mexacarb	3,99	2	Positiv	223,1	151,1	20
Oxamyl	4,24	2	Positiv	237,1	72	12
Monocrotophos	4,46	2	Positiv	224,1	127	10
Methomyl	4,64	2	Positiv	163,1	106	4
Fenuron	6,17	2	Positiv	165,1	72	20
Imidacloprid	6,43	2	Positiv	256,1	209,1	13
Dimethoat	6,63	2	Positiv	230	199	5
TEPP-A	7,69	2	Positiv	291,1	179	20
Aldicarb	7,87	2	Positiv	213,1	89,1	15
Metoxuron	7,89	2	Positiv	229	46,1	12
Imazalil	7,99	2	Positiv	297,1	158,9	25
Simazin	8,31	2	Positiv	202,1	132	22
Monuron	8,37	2	Positiv	199,1	46,1	16
Thiophanat-methyl	8,95	2	Positiv	343,1	151,2	4
Propoxur	9,15	2	Positiv	210,1	111,1	9
Carbofuran	9,30	2	Positiv	222,1	123,1	30
Chlortoluron	9,54	2	Positiv	213,1	72	20
Diuron	9,65	2	Positiv	233	72,1	20
Carbaryl	9,73	2	Positiv	202,1	145,1	9
Bentazon	9,73	2	Negativ	239	132	15
Isoproturon	9,96	2	Positiv	207,1	46,1	20
2,3-Dichlorphen- oxyessigsäure	10,06	2	Negativ	219	161	15
Fluometuron	10,10	2	Positiv	233,1	72	16
Metobromuron	10,48	2	Positiv	259	148	10
Cyprodinil	10,53	2	Positiv	226,1	93,1	41
Metazachlor	10,71	2	Positiv	278,1	134,2	15
Propham	10,80	2	Positiv	180,1	138,1	4
Terbuthylazin	10,98	2	Positiv	230,1	174,1	15
Dichlorprop	10,99	2	Negativ	233	161	10
Siduron	11,26	2	Positiv	233,2	137,1	12
Sebuthylazin	11,47	2	Positiv	230,1	174,1	16
Methiocarb	11,47	2	Positiv	226,1	169	4
Linuron	11,69	2	Positiv	249	160,1	20
Chlorpropham	12,53	2	Positiv	214,1	172	5
Penconazol	12,76	2	Positiv	284,1	70	17
Malathion	12,85	2	Positiv	331	126,9	5
Neburon	13,29	2	Positiv	275,1	57,1	20
TPP (IS)	13,99	2	Positiv	327,1	51,1	80
EPN	14,96	2	Positiv	324,1	296,1	8

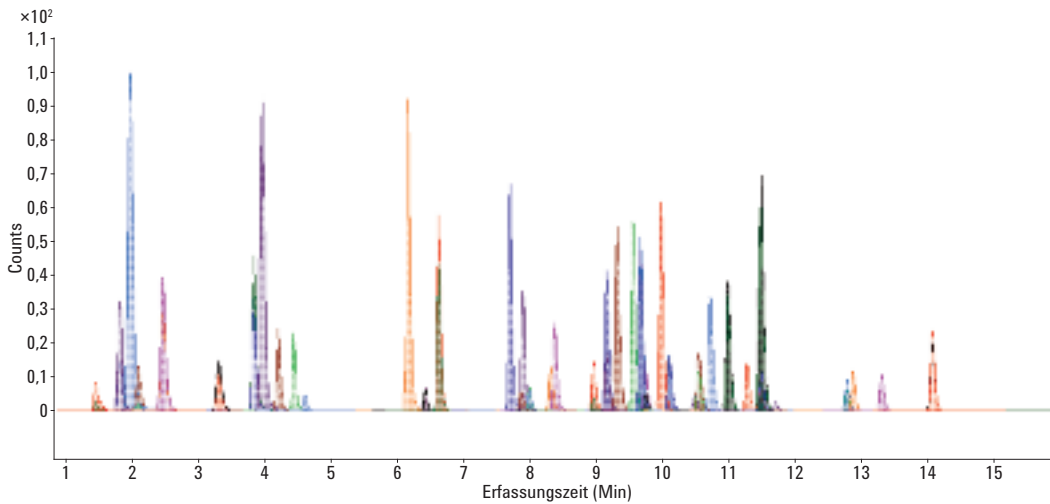


Abbildung 1. Ein typisches LC/MS/MS-Chromatogramm (MRM) von Avocado-Proben, angereichert mit 50 ng/g Pestiziden und mit QuEChERS extrahiert, gefolgt von einer Aufreinigung mit Agilent Bond Elut EMR—Lipid.

Probenvorbereitung

Das endgültige Verfahren für die Probenvorbereitung wurde für einen QuEChERS-Arbeitsablauf mit folgenden Schritten optimiert:

1. 15 g ($\pm 0,1$ g) homogenisierte Avocado in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen geben.
2. 15 ml Acetonitril (1 % AAS) zugeben und 10 Sek. lang vortexen.
3. Ein Paket AOAC-Extraktionssalz zugeben.
4. Zum Mischen auf einem mechanischen Schüttler 2 Min. lang schütteln.
5. Bei 5000 U/Min 5 Min. lang zentrifugieren.
6. 5 ml Wasser in ein 15 ml EMR—Lipid dSPE-Röhrchen geben.
7. 5 ml Überstand in ein EMR—Lipid dSPE-Röhrchen geben.
8. Sofort vortexen, um die Probe zu dispergieren, und dann weitere 60 Sek. lang auf einem Multiröhrchenvortexer vortexen.
9. Bei 5000 U/Min 3 Min. lang zentrifugieren.
10. 5 ml Überstand in ein 15 ml EMR—Lipid Feinaufreinigungsröhrchen geben, das 2 g Salz enthält (1:4, NaCl:MgSO₄), und 1 Min. lang vortexen.
11. Bei 5000 U/Min 3 Min. lang zentrifugieren.
12. 200 μ l der oberen ACN-Phase und 800 μ l Wasser zusammen in eine 2 ml Probenflasche geben und vortexen.

Die Probe ist nun für LC/MS/MS-Analysen einsatzbereit. Der ganze Arbeitsablauf der Probenvorbereitung wird in Abbildung 2 gezeigt.

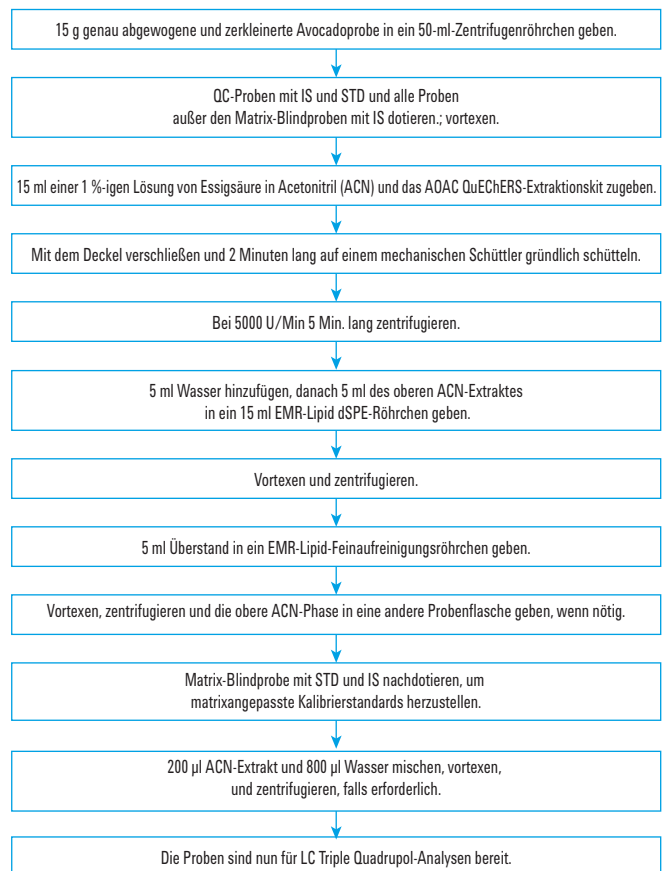


Abbildung 2. Probenvorbereitungsverfahren unter Einsatz von Agilent Bond Elut EMR—Lipid für die Analyse von Pestiziden in Avocado.

Kalibrierungsstandards und Qualitätskontrollproben

Vordotierte QC-Proben wurden entsprechend mit einer kombinierten Standardarbeitslösung nach Schritt 1 für sechs Replikate vorangereichert. Die QC-Proben entsprechen 5, 50 und 200 ng/g in Avocado. Alle Proben wurden auch mit der IS-Lösung versetzt, bis auf die Matrix-Blindprobe, entsprechend 100 ng/g des TPP in Avocado.

Matrixangepasste Kalibrierungsstandards wurden mit Standards und IS-Arbeitslösungen hergestellt. Entsprechende Konzentrationen in den Matrix-Blindproben nach Schritt 10 entsprachen 1, 5, 10, 50, 100, 150 und 200 ng/g und 100 ng/g IS (TPP). Die endgültigen Probenextrakte wurden mit Wasser verdünnt, um die Proben für den LC/MS/MS-Gradienten zugänglich zu machen und um unbeeinträchtigte Peakformen auch für früh eluierende Analyten zu erhalten. Das LC/MS/MS-System erreichte bei Verwendung der beschriebenen abschließenden Verdünnung eine ausgezeichnete Empfindlichkeit und erreichte die erforderlichen Nachweisgrenzen. Entspricht die Empfindlichkeit des Geräts mit der Probenverdünnung nicht den gewünschten Anforderungen, ist ein Probenkonzentrationsschritt (Eindampfen und Rekonstituieren) in Betracht zu ziehen, auch wenn dies nicht ideal ist.

Bestimmung der Menge an mitextrahierten Stoffen

Die Menge der mitextrahierten Stoffe wurde durch gravimetrische Messungen [2] für drei unterschiedliche Methoden zur Aufreinigung bestimmt: C18/PSA, Zirkonoxid-Sorbens und EMR—Lipid. Die Proben wurden wie folgt vorbereitet, um die Daten in zweifacher Ausführung zu erhalten:

1. Glasröhrchen für ~1 Std. bei 110 °C erhitzen, um die Feuchtigkeit zu entfernen.
2. Röhrchen bis auf Zimmertemperatur abkühlen lassen.
3. Teströhrchen vorwiegen.
4. Exakt 1 ml Extrakt der ursprünglichen Matrix-Blindprobe (ohne Aufreinigung) und die Matrix-Blindproben mit diversen Aufreinigungen zugeben, alles in zweifacher Ausführung.
5. Alle Proben auf einer CentriVap-Vakuumzentrifuge bei 50 °C für 1 Std. trocknen lassen, oder ggf. bis sie getrocknet sind.
6. Die Röhrchen für ~ 1 Std. bei 110 °C erhitzen, um die Feuchtigkeit zu entfernen.
7. Röhrchen bis auf Zimmertemperatur abkühlen lassen.
8. Die Röhrchen erneut wiegen.

Der Gewichtsunterschied zwischen Schritt 8 und Schritt 3 entspricht der Menge der mitextrahierten Stoffe. Die Menge der mitextrahierten Stoffe, die durch die Aufreinigung entfernt wurde, entsprach dem durchschnittlichen Gewichtsunterschied der mit der Matrix extrahierten Stoffen vor und nach der Aufreinigung.

Beurteilung des Matrixeffekts

Außerdem wurde die Analyt-Response (Peakfläche) zwischen nachdotierten Avocado-Extrakten und den entsprechenden reinen Lösungen verglichen. Nachdotierte Avocado-Extrakte wurden wie folgt hergestellt: Eine Pestizid-Standardlösung wurde in den Blindwert-Extrakt der Avocado nachdotiert. Der Response-Unterschied (Peakfläche) ist direkt mit den Matrixeffekten korreliert.

Vergleichs- und Validierungsmethoden

Derzeit empfiehlt die QuEChERS-Methode für die Aufreinigung von Proben mit hohem Fettgehalt wie Avocado dSPE für fetthaltige Proben, die PSA, EC-C18 und MgSO₄ enthalten. Auch das Zirkonoxid-Sorbens soll für die Lipidentfernung effizienter sein als C18/PSA dSPE. Unser Methodenvergleich konzentrierte sich auf die Aufreinigung mit EMR—Lipid und den anderen Aufreinigungsmethoden. Wiederfindungsdaten verglichen vor- und nachdotierte Proben, die 50 ng/g in Avocado entsprachen. Die Extraktion wurde mit dem AOAC QuEChERS-Verfahren durchgeführt, gefolgt von der dSPE mit entsprechendem Aufreinigungsprotokoll; EMR—Lipid, C18/PSA dSPE und Zirkonoxid-Sorbens. Für die Aufreinigung mit EMR—Lipid wurde das in Abbildung 2 gezeigte Protokoll befolgt. Die EMR—Lipid dSPE erfordert im Gegensatz zu traditionellen dSPE-Sorbentien zusätzliches Wasser, um das Material zu aktivieren, wodurch die Leistung der Matrixentfernung deutlich gesteigert wird. Der Überstand im EMR—Lipid-Röhrchen wird in das EMR—Lipid Feinaufreinigungsröhrchen mit Salzen überführt, um die Phasen von Wasser und ACN zu separieren und die gelösten Feststoffe zu entfernen. Für QuEChERS mit C18/PSA- und Zirkonoxid-Aufreinigung wurde 1 ml ACN-Rohextrakt in ein 2 ml dSPE-Röhrchen für fetthaltige Proben (Best.-Nr.: 5982-5122) oder in eine 2-ml-Probenflasche mit 100 mg Zirkonoxid-Sorbens gegeben. Die Proben wurden dann für eine Minute gevortext und bei 13 000 U/Min drei Minuten lang in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert. Ein 200 µl Aliquot des Überstands wurde dann in eine Probenflasche mit 800 µl Wasser übertragen. In diesem Schritt entstand ein Niederschlag sowohl in den C18/PSA dSPE- als auch den Zirkonoxid-Sorbens-Aufreinigungsprotokollen und die Proben mussten über ein Filterröhrchen mit 0,45 µm Filter aus Zellulose regenerat vor der LC/MS/MS-Analyse filtriert werden. Es wird davon ausgegangen, dass die Niederschläge sich aufgrund der nicht entfernten Lipide aus den dSPE- und Zirkonoxid-Aufreinigungen gebildet haben. Das war bei der Rohextraktaufreinigung mit EMR—Lipid nicht der Fall. Diese ergab nach der Verdünnung eine klare Lösung ohne Niederschläge. Aus diesem Grund war eine Filtration nicht erforderlich. Es ist wichtig, die nachdotierten Kalibrierlösungen aus den entsprechenden Matrix-Blindproben herzustellen, um matrixangepasste Kalibrierungsstandards zu erhalten. Die Wiederfindung wurde durch das Verhältnis der Analyt-Peakflächen aus vor- und nachdotierten Proben kalkuliert.

Die EMR—Lipid-Methode wurde in Avocado bei Konzentrationen von 5, 50, und 200 ng/g Konzentrationsbereichen in sechs Replikaten validiert, wobei eine matrixangepasste 7-Punkte-Kalibrierungskurve eingesetzt wurde. Ein interner Standard wurde für die Quantifizierung benutzt, und die Daten wurden in Form von Genauigkeit und Präzision dargestellt.

Ergebnisse und Diskussion

Menge an mitextrahierten Stoffen

Die Ergebnisse der Bestimmung des Gewichts der mitextrahierten Stoffe aus der Probe werden in Tabelle 3 gezeigt, wodurch eindeutig nachgewiesen wird, dass die EMR—Lipid dSPE die beste Matrixaufreinigungseffektivität nach Gewicht bietet.

Tabelle 3. Gewichte von aus Avocado mitextrahierten Stoffen aus QuEChERS-Extraktion mit verschiedenen Aufreinigungsmaterialien (n = 2).

Aufreinigungsmethode	Mitextrahierte Stoffe pro 1 ml ACN Extrakt (mg)	Effizienz der Entfernung der matrixextrahierten Stoffe durch Aufreinigung (%)
Keine weitere Aufreinigung	14,7	–
EMR—Lipid-Aufreinigung	4,2	71,4
Zirkonoxid-Aufreinigung	7,0	52,4
C18/PSA-Aufreinigung	9,5	35,4

Effizienz der Entfernung der matrixextrahierten Stoffe (%)

$$\frac{(\text{Menge der mitextrahierten Stoffe ohne Aufreinigung} - \text{Menge der mitextrahierten Stoffe mit Aufreinigung})}{\text{Menge der mitextrahierten Stoffe ohne Aufreinigung}} \times 100$$

Beurteilung des Matrixeffekts

Die Analyt-Response zwischen vordotierten Matrix-Blindproben und reinen Standards wurde verglichen, um die Matrixeffekte zu evaluieren. Da der Großteil der mitextrahierten Lipide in einem LC-Gradienten später eluiert (Umkehrphase, organischer Anteil von niedrig nach hoch), werden die hydrophoben Analyten stärker durch die Probenmatrix beeinträchtigt. Dieser Effekt wird in der Regel Ionensuppression genannt, die mit einer niedrigen Analyt-Response korreliert. Wegen der ineffizienten Matrix-Lipidentfernung durch C18/PSA und Zirkonoxid-Sorbens wurde eine wesentlich höhere Matrix-Ionensuppression bei den später eluierten Verbindungen festgestellt. Abbildung 3 zeigt drei Verbindungen als Beispiel für die Reduzierung der Ionensuppression durch die EMR—Lipid-Aufreinigung. Die drei Pestizide sind Verbindungen mit relativ hohen log P-Werten; Chlorpropham (log P-Wert 3,6), Penconazol (log P-Wert 3,7) und EPN (log P-Wert 4,5). Je höher der log P-Wert, desto hydrophober ist die Verbindung. Die Ionensuppression dieser Pestizide beträgt bis zu 80 %, verursacht durch Matrixinterferenzen und insbesondere durch Lipide, die bei der Verwendung von C18/PSA dSPE und Zirkonoxid-Sorbens nicht effektiv entfernt wurden. Dagegen zeigten diese Verbindungen nach Aufreinigung mit EMR—Lipid keine signifikanten Matrixeffekte, wie in Abbildung 3 gezeigt wird.

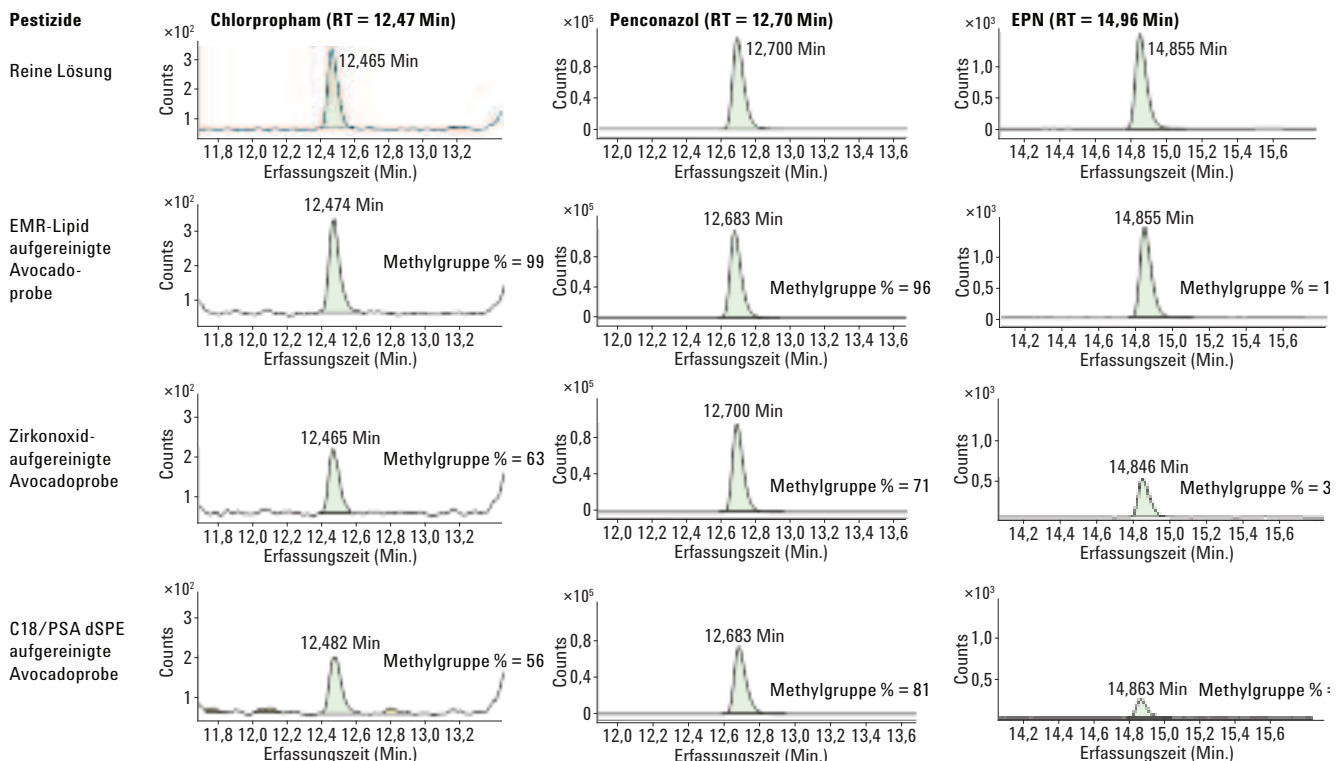


Abbildung 3. Vergleich der Matrixeffekte für hydrophobe Analyte. Die Matrixproben wurden bei 50 ng/g mit Pestizidstandard in einer Matrix-Blindprobe nachdotiert.

Methodenvergleich für die Wiederfindung der Analyten

Die optimierte QuEChERS-Methode mit EMR—Lipid dSPE wurde dann mit der C18/PSA- und Zirkonoxid-Sorbens dSPE-Aufreinigung verglichen. Abbildung 4 zeigt die Vergleichsergebnisse der statistischen Wiederfindung und Abbildung 5 die Vergleichsergebnisse der ausgewählten problematischen Analyten.

Das EMR—Lipid-Protokoll lieferte eine durchweg ausgezeichnete Wiederfindung und Präzision für die meisten Pestizide. Nur zwei Pestizide fielen unter das Wiederfindungsfenster von 70 bis 120 %, nämlich Cyprodinil (64 %), und 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (65 %), mit einer RSD (relativen Standardabweichung) von weniger als 10 %. Deswegen gelten die Ergebnisse gemäß den SANCO-Leitlinien als akzeptabel [11], weil sie akzeptable Reproduzierbarkeitskriterien erfüllen. Die Wiederfindungsergebnisse für die C18/PSA dSPE-Aufreinigung waren gut, bis auf zwei saure Substanzen. 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure und Dichlorprop ergaben eine sehr niedrige durch PSA verursachte Wiederfindung (<10 %). Die

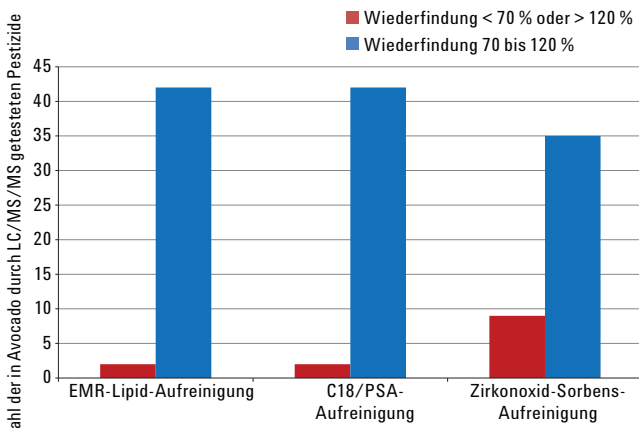


Abbildung 4, Statistische Wiederfindungsergebnisse für den Vergleich von Agilent Bond Elut EMR—Lipid, C18/PSA dSPE und Zirkonoxid-Sorbens.

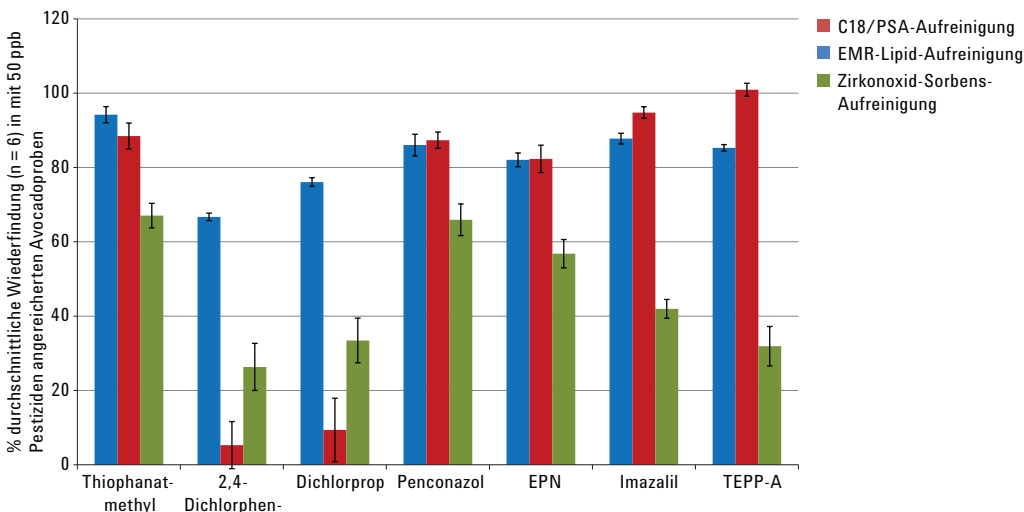


Abbildung 5, Vergleichsergebnisse der Wiederfindung für Agilent Bond Elut EMR—Lipid (blau), C18/PSA (rot) —und Zirkonoxid-Sorbens (grün) dSPE-Aufreinigung.

Wiederfindungsergebnisse aus Zirkonoxid-Sorbens zeigten eine höhere Analytretention, wodurch sich bei neun Pestiziden Wiederfindungen von weniger als 70 % ergaben.

Methodenvalidierung

Das EMR—Lipid Protokoll wurde durch ein komplettes Quantifizierungsbatch validiert. Die Methodik wurde im Kapitel Probenvorbereitung beschrieben. Ein interner Standard (TPP) wurde für die Quantifizierung eingesetzt und deswegen werden die Quantifizierungsergebnisse als Genauigkeit und Präzision definiert. Jedoch lag die absolute Wiederfindung von IS (TPP) bei über 90 %, sodass die Genauigkeit der absoluten Wiederfindung entspricht.

Die detaillierten Validierungsergebnisse sind in Tabelle 4 aufgelistet und als zusammenfassende Grafik (Abbildung 6) der Mittelwerte für Genauigkeit und Präzision, kalkuliert auf der Grundlage von 18 Replikaten von vordotierten QC-Proben in drei unterschiedlichen Konzentrationen. Die Genauigkeitsergebnisse zeigen, dass 95 % der 44 Pestizide in das Fenster von 70 bis 120 % fielen, ausgenommen 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure und Cyprodinil, bei denen die Wiederfindung knapp unter 70 % lag, mit einer guten RSD. Die Methodenreproduzierbarkeit war ausgezeichnet, mit weniger als 10 % RSD (n = 6) bei 91 % der Pestizide bei 5 ng/g, 100 % bei 50 ng/g und 98 % bei 200 ng/g. Alle übrigen RSD-Werte lagen weit unter 20 %, wenn das EMR—Lipid-Protokoll eingesetzt wurde. Die instrumentelle Nachweisgrenze trägt wahrscheinlich zu der größeren Streuung bei diesen Verbindungen mit über 10 % RSD bei niedrigstem Dotierungslevel bei. Der nicht gepufferte Feinaufreinigungsschritt mit EMR—Lipid (NaCl, MgSO₄) ist auch eine potenzielle Ursache für höhere Streuung, und aus diesem Grund werden gepufferte Feinaufreinigungssalze in zukünftigen Arbeiten erforscht.

Tabelle 4. Validierungsergebnisse aus EMR—Lipid-Protokoll für 44 Pestizide in Avocado bei Konzentrationen von 5, 50 und 200 ng/g (n = 6).

Analyt	Kalibrierungskurve		Kal. Bereich (ng/g)	Genauigkeit und Präzision der Methode					
	Regression Genauigkeit/ Gewicht	R ²		5 ng/g QCs		50 ng/g QCs		200 ng/g QCs	
				Wdf. %	RSD	Wdf. %	RSD	Wdf. %	RSD
Methamidophos	Quadrant, 1/x	0,9993	1-200	69,1	9,5	93,8	8,4	109,8	6,0
Aminocarb	Linear, 1/x	0,9990	1-200	74,6	8,4	88,0	2,7	87,0	2,0
Acephat	Linear, 1/x	0,9948	1-200	55,8	12,4	88,8	2,3	86,6	4,0
Omethoat	Linear, 1/x	0,9996	1-200	84,5	6,0	85,3	1,4	84,4	2,6
Carbendazim	Linear, 1/x	0,9995	1-200	87,1	6,3	86,2	2,2	85,4	1,2
Thiabendazol	Linear, 1/x	0,9995	1-200	49,4	24,3	76,7	1,7	79,0	2,0
Mexacarb	Linear, 1/x	0,9993	1-200	83,6	7,8	90,4	3,3	89,0	2,1
Oxamyl	Linear, 1/x	0,9991	1-200	81,1	7,6	96,7	2,6	94,4	3,5
Monocrotophos	Linear, 1/x	0,9979	1-200	85,2	6,1	85,1	1,9	101,5	4,6
Methomyl	Linear, 1/x	0,9993	1-200	77,8	8,2	88,6	3,3	92,8	4,5
Fenuron	Linear, 1/x	0,9969	1-200	86,5	9,9	103,4	2,5	91,7	1,7
Imidacloprid	Linear, 1/x	0,9996	1-200	81,7	5,9	94,1	2,6	87,9	2,5
Dimethoat	Linear, 1/x	0,9993	1-200	83,3	8,0	99,2	3,1	94,8	2,5
TEPP-A	Linear, 1/x	0,9989	1-200	50,2	6,5	88,3	1,6	78,4	3,1
Aldicarb	Linear, 1/x	0,9989	1-200	88,6	5,6	101,2	3,5	76,2	1,9
Metoxuron	Linear, 1/x	0,9987	1-200	102,0	5,4	105,8	2,5	89,9	2,6
Imazalil	Linear, 1/x	0,9988	1-200	81,4	6,9	86,2	2,0	82,5	2,7
Simazin	Linear, 1/x	0,9984	1-200	91,8	5,4	93,8	1,9	85,4	1,6
Monuron	Linear, 1/x	0,9990	1-200	82,5	9,9	96,0	3,7	88,4	1,8
Thiophanat-methyl	Linear, 1/x	0,9977	1-200	89,4	10,8	104,6	5,5	86,0	7,1
Propoxur	Linear, 1/x	0,9993	1-200	84,7	8,1	97,6	1,4	94,5	2,2
Carbofuran	Linear, 1/x	0,9993	1-200	88,3	8,5	98,9	5,1	97,2	2,4
Chlortoluron	Linear, 1/x	0,9990	1-200	96,3	5,0	97,9	3,1	89,9	2,0
Diuron	Linear, 1/x	0,9995	1-200	86,6	6,7	98,7	2,8	97,5	3,5
Carbaryl	Linear, 1/x	0,9991	1-200	80,7	7,4	101,1	3,2	90,5	2,1
Bentazon	Quadrant, 1/x	0,9993	1-200	111,2	5,5	102,3	4,7	97,4	7,9
Isoproturon	Linear, 1/x	0,9993	1-200	98,7	4,1	98,9	2,3	92,1	2,6
2,3-Dichlorphen- oxyessigsäure	Linear, 1/x	0,9985	1-200	64,3	7,6	65,4	5,1	65,6	2,6
Fluometuron	Linear, 1/x	0,9975	1-200	86,2	5,7	87,8	3,9	88,0	3,0
Metobromuron	Linear, 1/x	0,9977	1-200	96,0	6,6	100,3	4,6	92,4	4,5
Cyprodinil	Linear, 1/x	0,9986	1-200	60,3	8,3	67,0	2,6	65,5	3,6
Metazachlor	Linear, 1/x	0,9992	1-200	99,8	5,7	99,4	3,4	94,3	2,8
Propham	Linear, 1/x	0,9985	1-200	85,8	9,7	89,3	3,8	87,0	3,8
Terbuthylazin	Linear, 1/x	0,9993	1-200	90,7	6,5	91,1	2,6	85,8	2,0
Dichlorprop	Linear, 1/x	0,9992	1-200	75,6	9,7	73,3	4,6	76,9	2,3
Siduron	Linear, 1/x	0,9990	1-200	90,2	8,6	92,4	3,5	91,5	2,2
Sebuthylazin	Linear, 1/x	0,9992	1-200	95,3	4,8	89,5	2,5	83,7	2,1
Methiocarb	Linear, 1/x	0,9984	1-200	77,6	8,8	94,7	3,2	86,3	1,9
Linuron	Linear, 1/x	0,9984	1-200	84,7	7,4	85,2	3,6	84,6	3,6
Chlorpropham	Linear, 1/x	0,9994	5-200	91,6	10,0	84,3	9,3	81,1	3,8
Penconazol	Linear, 1/x	0,9992	1-200	83,0	6,3	81,1	2,4	80,7	1,5
Malathion	Linear, 1/x	0,9991	1-200	76,2	7,1	100,5	2,2	100,0	1,0
Neburon	Linear, 1/x	0,9994	1-200	66,9	6,8	83,0	1,6	84,8	1,3
EPN	Linear, 1/x	0,9995	1-200	76,4	4,7	73,8	3,9	62,9	13,2

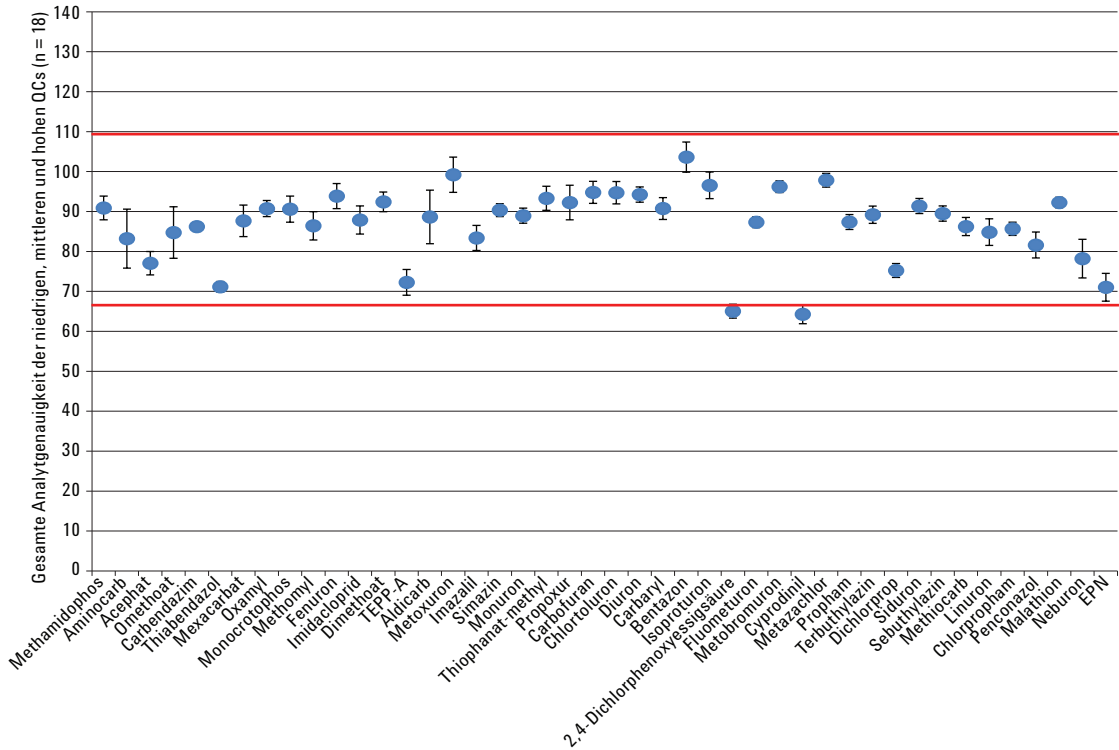


Abbildung 6, Quantifizierungsergebnisse für 44 repräsentative Pestizide in Avocado unter Einsatz des Agilent Bond Elut EMR—Lipid Arbeitsablaufs. Die Genauigkeits- und Präzisionsdaten wurden auf der Grundlage von insgesamt 18 Replikaten bei drei unterschiedlichen Konzentrationen kalkuliert.

Schlussfolgerungen

Eine schnelle, zuverlässige und robuste Methode unter Verwendung einer QuEChERS AOAC-Extraktion, gefolgt von einer Agilent Bond Elut EMR—Lipid dSPE-Aufreinigung, wurde für die Analyse von 44 LC-nachweisbaren Pestiziden in Avocado entwickelt und validiert. Der Matrixeffekt wurde sorgfältig bewertet und mit der traditionellen C18/PSA dSPE- und Zirkonoxid-Sorbens-Aufreinigung verglichen. Die Ergebnisse zeigen, dass EMR—Lipid hinsichtlich Gravimetrie und Matrixeffekten eine bessere Matrixaufreinigung gewährleistet als C18/PSA dSPE und Zirkonoxid-Sorbens. Die Analytwiederfindung und die Methodenpräzision wurden eingehend für die drei unterschiedlichen Aufreinigungstechniken verglichen. Die EMR—Lipid-Aufreinigung bietet vergleichbare Analytwiederfindungen im Vergleich zu C18/PSA dSPE mit wesentlich geringeren Mengen an mitextrahierten Stoffen. Sowohl die EMR—Lipid- als auch die dSPE-Aufreinigung für fetthaltige Proben lieferten eine viel höhere Wiederfindung als Zirkonoxid-Sorbens wegen der unselektiven Interaktionen der Analyten mit dem Zirkonoxid. Die Daten legen nahe, dass EMR—Lipid den Großteil der Matrix entfernt, vor allem Lipide, ohne die Wiederfindung der Analyten wesentlich zu beeinträchtigen.

Diese Studie zeigt die überragende Aufreinigung, die durch Einsatz von EMR—Lipid als dSPE-Sorbens in einem QuEChERS-Arbeitsablauf erreicht werden kann. Die hohe Selektivität des Sorbens für die mitextrahierten Lipide macht es für die Analyse von fetthaltigen Proben ideal, ungeachtet des Fettgehaltes und der Zusammenstellung der Zielanalyten. Durch EMR—Lipid werden eine hohe Wiederfindung, Präzision, eine überragende Matrixentfernung und eine hohe Benutzerfreundlichkeit für die Quantifizierung der Pestizide in Avocado erreicht. Zukünftige Arbeiten werden sich weiterhin auf die Multirückstands-Analyse in komplexen, hoch-fetthaltigen Proben konzentrieren.

Literatur

1. Anastassiades, M.; Lehota, S. J.; Štajnbaher, D.; Schenck, F. S. *J. AOAC Int.* **2003**, *86*, 412-431.
2. Lehota, 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. Lehota, S. J. *Mass Spec. in Food Safety Methods in Mol. Biol.* **2011**, *747*, 65-91.
6. Sapozhnikova, Y.; Lehota, 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. Anon. *Guidance Document on Analytical Quality Control and Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed, SANCO/12571/2013, 19 November 2013*; European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, Brussels, Belgium.

Weitere Informationen

Diese Daten stellen typische Ergebnisse dar. Weitere Informationen zu unseren Produkten und Leistungen finden Sie auf unserer Website unter www.agilent.com/chem.

www.agilent.com/chem

Agilent haftet weder für hierin enthaltene Fehler noch für Neben- oder Folgeschäden in Zusammenhang mit der Bereitstellung, Leistung oder Verwendung dieses Materials.

Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc., 2015
Gedruckt in den USA,
4. August 2015
5991-6098DEE



Agilent Technologies