



# Análisis multirresiduo de pesticidas en aguacate con el sistema Bond Elut con extracción mejorada en matriz de lípidos de Agilent mediante LC/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 44 pesticidas diferentes en aguacate mediante LC/MS/MS. El procedimiento implica una extracción QuEChERS AOAC seguida del uso de extracción en fase sólida dispersiva (dSPE) EMR—Lipid y sales de pulido EMR—Lipid y proporciona una limpieza rápida y eficaz de la muestra. La limpieza de la matriz se evaluó determinando la cantidad de sustancias no volátiles extraídas simultáneamente de un extracto de aguacate tras realizar diferentes limpiezas dSPE, así como mediante la evaluación de los efectos de la matriz cromatográfica en los analitos objetivo. En comparación con otros productos para limpiar la matriz, la dSPE EMR—Lipid proporciona una limpieza de la matriz mucho más eficaz sin afectar las recuperaciones de los analitos. El método optimizado proporciona una exactitud y precisión excelentes para los 44 pesticidas que se pueden analizar en el aguacate mediante cromatografía de líquidos utilizando la técnica de LC/MS/MS. La dSPE EMR—Lipid encaja cómodamente en un protocolo QuEChERS, proporcionando una preparación de muestras rápida, robusta y eficaz para analizar residuos de pesticidas en muestras de aguacate muy grasas.



**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 multiclase 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.

Bond Elut EMR—Lipid de Agilent es un nuevo material absorbente que elimina selectivamente la mayoría de tipos de lípidos de la matriz de la muestra sin una pérdida indeseada del analito de interés. La eliminación de interferencias lipídicas en matrices complicadas es especialmente importante en técnicas tales como QuEChERS y precipitación de proteínas, ya que estos métodos extraen simultáneamente grandes cantidades de la matriz junto con los analitos objetivo. Este estudio investiga la preparación de muestras para el análisis de 44 pesticidas representativos en aguacate que se pueden analizar mediante LC usando una extracción QuEChERS AOAC seguida de limpieza con dSPE EMR—Lipid. Los pesticidas representan 12 clases químicas diferentes, con el fin de establecer la prueba conceptual para los analitos no incluidos en esta nota de aplicación. La Tabla 1 relaciona los pesticidas que se pueden analizar mediante LC y sus clases. Esta nota de aplicación demuestra la excepcional limpieza que proporciona EMR—Lipid para muestras grasas complejas tales como aguacate, y la elevada recuperación y precisión de los 44 residuos de pesticidas multiclase en tres niveles.

Tabla 1. Pesticidas que se pueden analizar mediante LC usados en este estudio y sus clases químicas asociadas

Pesticida representativo	Clase química	Grupo de pesticidas
Metamidofos	Organofosfato	Insecticida
Acefato	Organofosfato	Insecticida
Ometoato	Organofosfato	Insecticida
Dimetoato	Organofosfato	Insecticida
Malatión	Organofosfato	Insecticida
EPN	Organofosfato	Insecticida
Tepp-A	Organofosfato	Insecticida
Monocrotofos	Organofosfato	Insecticida
Mexacarbato	Carbamato	Insecticida
Carbarilo	Carbamato	Insecticida
Propoxur	Carbamato	Insecticida
Carbofurano	Carbamato	Insecticida
Metiocarb	Carbamato	Insecticida
Clorprofam	Carbamato	Insecticida
Profam	Carbamato	Insecticida
Aminocarb	Carbamato	Insecticida
Oxamilo	Carbamato	Insecticida
Metomilo	Carbamato	Insecticida
Aldicarb	Carbamato	Insecticida
Terbutilazina	Triazina	Algicida
Simacina	Triazina	Herbicida
Sebutilazina	Triazina	Herbicida
Monurón	Urea	Herbicida
Clorotolurón	Urea	Herbicida
Diurón	Urea	Herbicida
Fluometurón	Urea	Herbicida
Isoproturón	Urea	Herbicida
Metobromurón	Urea	Herbicida
Sidurón	Urea	Herbicida
Linurón	Urea	Herbicida
Neburón	Urea	Herbicida
Fenuron	Urea	Herbicida
Metoxurón	Urea	Herbicida
Carbendacima	Benzimidazol	Fungicida
Tiabendazol	Benzimidazol	Fungicida
Metiltiofanato	Benzimidazol	Fungicida
Ciprodinilo	Anilino pirimidina	Fungicida
Imazalilo	Imidazol	Fungicida
Penconazol	Triazol	Fungicida
Imidacloprida	Neonicotinoide	Insecticida
Metazaclor	Cloracetanilida	Herbicida
Ácido 2,4-D	Ácido clorofenoxi	Herbicida
Dicloropropeno	Ácido clorofenoxi	Herbicida
Bentazona	Sin clasificar	Herbicida

## 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 era de Sigma-Aldrich, Corp. (St Louis, MO, EE.UU.). Los patrones de pesticidas y los patrones internos eran de Sigma-Aldrich, Corp. y AccuStandard (New Haven, CT, EE.UU.).

## Disoluciones y patrones

Se preparó acetonitrilo que contenía AA al 1 % por adición de 10 ml de ácido acético a 990 ml de ACN. Se prepararon disoluciones madre de patrones y patrones internos (PI) de algunos pesticidas, bien en ACN o bien en metanol a una concentración de 2,0 mg/ml. El resto de patrones de pesticidas procedía de disoluciones madre de patrón comerciales, que se utilizaron directamente para preparar la disolución de trabajo normalizada. Se preparó una disolución de trabajo combinada en ACN a 25 µg/ml. Se preparó una alícuota de 25 µg/ml de PI TPP en ACN.

## 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 llevó a cabo en un cromatógrafo de líquidos Agilent 1290 Infinity que incluía:

- Bomba cuaternaria Agilent 1290 Infinity (G4204A)
- Muestreador automático de alto rendimiento Agilent 1290 Infinity (G4226A) provisto de un termostato Agilent 1290 Infinity (G1330B), y un compartimento termostatizado de columna Agilent 1290 Infinity (G1316C)

El sistema UHPLC se acopló a un sistema de LC/MS de triple cuadrupolo Agilent 6490 provisto de una fuente de ionización por electrospray Agilent Jet Stream y tecnología iFunnel. Se utilizó el software de estación de trabajo MassHunter de Agilent para adquisición y análisis de datos.

## Condiciones del instrumento

### Condiciones de HPLC

Columna: Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2,1 × 150 mm, 1,8 µm (ref. 959759-902), precolumna Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 UHPLC, 5 × 2,1 mm, 1,8 µm (ref. 821725-902)

Fase móvil: A) FA al 0,1 % en agua  
B) FA al 0,1 % en acetonitrilo

Velocidad de flujo: 0,3 ml/min

Temp. columna: 35 °C

Temp. del muestreador automático: 4 °C

Vol. iny.: 3 µl

Lavado de la aguja: ACN:MeOH:IPA:H<sub>2</sub>O 1:1:1:1 con FA al 0,2 %

Gradiente:	Tiempo (min)	%B
	0	10
	15	95
	15,01	100

Tiempo de parada: 16 min

Tiempo posterior: 3 min

### Condiciones de MS:

Modo positivo/negativo

Temp. gas: 120 °C

Flujo de gas: 14 l/min

Nebulizador: 40 psi

Calentador del gas de impulsión: 400 °C

Flujo de gas de impulsión: 12 l/min

Capilar: 3.000 V

Parámetros de iFunnel:	Positivo	Negativo
RF de alta presión:	100 V	90 V
RF de baja presión:	70 V	60 V

Las condiciones de monitorización de reacción múltiple (MRM) por MS relativas a los analitos se relacionan en la Tabla 2. En la Figura 1 se muestra un cromatograma típico.

Tabla 2. Parámetros MRM de LC con MRM de triple cuadrupolo y tiempos de retención de los pesticidas utilizados en este estudio.

Analito	TR (min)	Delta TR (min)	Polaridad	Ión precursor (m/z)	Ión producto (m/z)	CE (v)
Metamidofós	1,83	2	Positivo	142	94,1	9
Aminocarb	2,03	2	Positivo	209,1	137,2	24
Acefato	2,13	2	Positivo	184	143	9
Ometoato	2,54	2	Positivo	214	124,9	17
Carbendazim	3,40	2	Positivo	192,1	132	33
Tiabendazol	3,89	2	Positivo	202	131,1	41
Mexacarbato	3,99	2	Positivo	223,1	151,1	20
Oxamilo	4,24	2	Positivo	237,1	72	12
Monocrotofós	4,46	2	Positivo	224,1	127	10
Metomilol	4,64	2	Positivo	163,1	106	4
Fenuron	6,17	2	Positivo	165,1	72	20
Imidacloprid	6,43	2	Positivo	256,1	209,1	13
Dimetoato	6,63	2	Positivo	230	199	5
TEPP-A	7,69	2	Positivo	291,1	179	20
Aldicarb	7,87	2	Positivo	213,1	89,1	15
Metoxurón	7,89	2	Positivo	229	46,1	12
Imazalilo	7,99	2	Positivo	297,1	158,9	25
Simazina	8,31	2	Positivo	202,1	132	22
Monurón	8,37	2	Positivo	199,1	46,1	16
Metiltiofanato	8,95	2	Positivo	343,1	151,2	4
Propoxur	9,15	2	Positivo	210,1	111,1	9
Carbofurano	9,30	2	Positivo	222,1	123,1	30
Clorotoluron	9,54	2	Positivo	213,1	72	20
Diuron	9,65	2	Positivo	233	72,1	20
Carbarilo	9,73	2	Positivo	202,1	145,1	9
Bentazona	9,73	2	Negativo	239	132	15
Isoproturón	9,96	2	Positivo	207,1	46,1	20
Ácido 2,3-D	10,06	2	Negativo	219	161	15
Fluometurón	10,10	2	Positivo	233,1	72	16
Metobromurón	10,48	2	Positivo	259	148	10
Ciprodinilo	10,53	2	Positivo	226,1	93,1	41
Metazaclor	10,71	2	Positivo	278,1	134,2	15
Profam	10,80	2	Positivo	180,1	138,1	4
Terbutilazina	10,98	2	Positivo	230,1	174,1	15
Diclorprop	10,99	2	Negativo	233	161	10
Siduron	11,26	2	Positivo	233,2	137,1	12
Sebutilazina	11,47	2	Positivo	230,1	174,1	16
Metiocarb	11,47	2	Positivo	226,1	169	4
Linurón	11,69	2	Positivo	249	160,1	20
Clorprofam	12,53	2	Positivo	214,1	172	5
Penconazol	12,76	2	Positivo	284,1	70	17
Malatión	12,85	2	Positivo	331	126,9	5
Neburón	13,29	2	Positivo	275,1	57,1	20
TPP (PI)	13,99	2	Positivo	327,1	51,1	80
EPN	14,96	2	Positivo	324,1	296,1	8

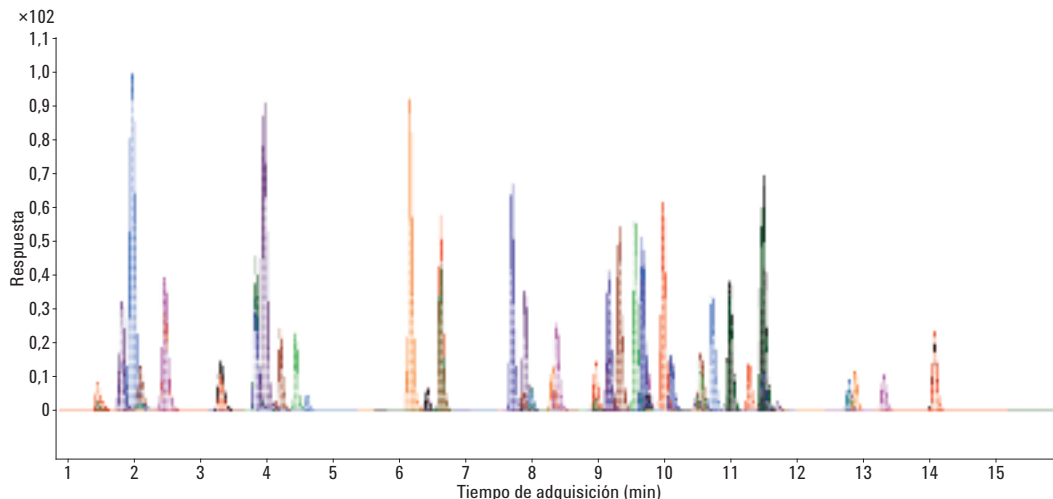


Figura 1. Cromatograma LC/MS/MS (MRM) típico de una muestra de aguacate reforzada con 50 ng/g de pesticidas y extraída mediante QuEChERS seguido por limpieza con Bond Elut EMR—Lipid de Agilent.

## Preparación de muestras

El procedimiento final de preparación de muestras se optimizó mediante un flujo de trabajo QuEChERS con las siguientes etapas:

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.
7. Transfiera 5 ml de sobrenadante a un tubo de dSPE EMR—Lipid.
8. Mezcle en vórtex inmediatamente para dispersar la mezcla, y posteriormente durante 60 s más en un vortizador multitubo.
9. Centrifugue a 5.000 rpm durante 3 min.
10. 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.
11. Centrifugue a 5.000 rpm durante 3 min.
12. Combine 200  $\mu\text{l}$  de la capa sobrenadante de ACN con 800  $\mu\text{l}$  de agua en un vial de muestras de 2 ml y mezcle en vórtex.

La muestra ya estará lista para el análisis de LC/MS/MS. El flujo de trabajo completo para preparación de muestras se muestra en la Figura 2.

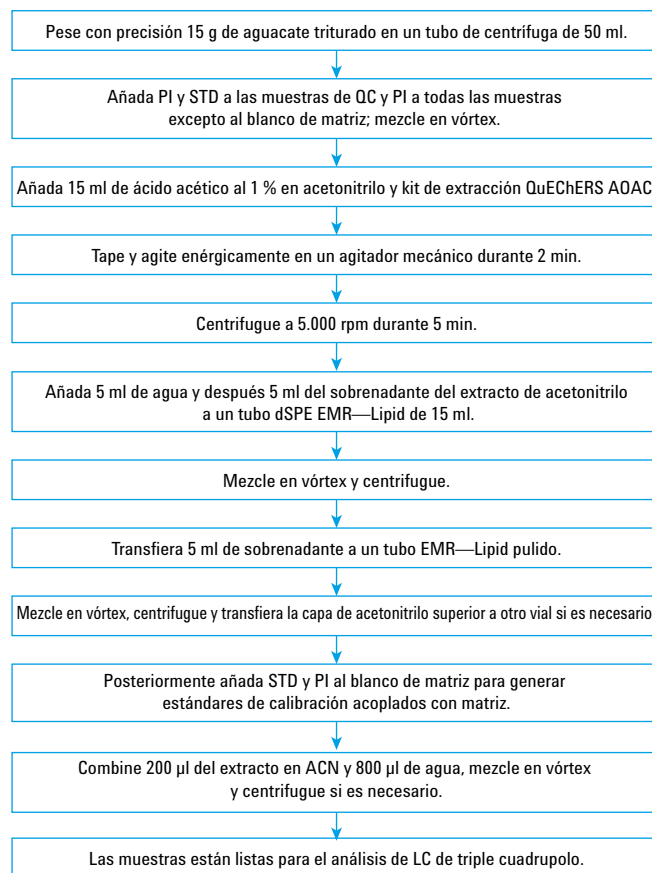


Figura 2. Procedimiento para la preparación de muestras usando Bond Elut EMR—Lipid de Agilent para el análisis de pesticidas en aguacate.

## Patrones de calibración y muestras de control de calidad

Muestras de control de calidad (QC) previamente marcadas se reforzaron adecuadamente con la disolución de trabajo combinada normalizada, después de la etapa 1, para seis réplicas. Las muestras de QC corresponden a 5, 50, y 200 ng/g en aguacate. La disolución de PI también se introdujo en todas las muestras, salvo el blanco de matriz, correspondiente a 100 ng/g de TPP en aguacate.

Se prepararon patrones de calibración acoplados con matriz con disoluciones de trabajo de patrón y de PI. Las concentraciones adecuadas en las muestras del blanco de matriz después de la etapa 10 correspondieron a 1, 5, 10, 50, 100, 150, y 200 ng/g y 100 ng/g IS (TPP). Se diluyó el extracto final de la muestra con agua para que la muestra se pudiera analizar mediante LC/MS/MS en gradiente y para mantener la integridad de la forma del pico para los analitos eluidos al principio del cromatograma. El sistema LC/MS/MS proporcionó una sensibilidad excelente usando la dilución final descrita, y satisfizo los límites de detección exigidos. Si la sensibilidad del instrumento no puede satisfacer las exigencias por el método de dilución de la muestra se deberá aplicar una etapa de concentración de muestras (evaporación y reconstitución), aunque no es algo recomendable.

## Determinación de la cantidad de sustancias extraídas simultáneamente

La cantidad de sustancias extraídas simultáneamente se determinó por medida gravimétrica [2] realizada para tres técnicas de limpieza diferentes: Absorbente de circonio C18/PSA y EMR—Lipid. Las muestras se prepararon por duplicado de la siguiente forma para recopilar datos.

1. Caliente los tubos de vidrio durante ~ 1 h a 110 °C para eliminar la humedad.
2. Enfríe los tubos a temperatura ambiente.
3. Tare los tubos.
4. Transfiera con precisión 1 ml del extracto inicial de blanco de matriz (sin limpieza) y de los blancos de matriz sometidos a las diferentes técnicas de limpieza, por duplicado.
5. Seque todas las muestras en un equipo CentriVap a 50 °C durante 1 h, o hasta sequedad.
6. Caliente los tubos durante ~ 1 h a 110 °C para eliminar la humedad.
7. Enfríe los tubos a temperatura ambiente.
8. Vuelva a pesar los tubos.

La diferencia de peso después de la etapa 8 y después de la etapa 3 es la cantidad de muestra extraída simultáneamente. La cantidad de sustancias extraídas simultáneamente mediante la limpieza es la diferencia del peso promedio entre las sustancias extraídas simultáneamente de la matriz antes y después de la limpieza.

## Evaluación del efecto de la matriz

Adicionalmente, se comparó la respuesta del analito (área de pico) entre los extractos de aguacate después del marcado y las disoluciones originales equivalentes. Los extractos de aguacate después del marcado se prepararon introduciendo disolución de pesticida normalizada en el extracto de blanco de matriz de aguacate. La diferencia en la respuesta (área de pico) se correlaciona directamente con los efectos de la matriz.

## Comparación y validación del método

En la actualidad, el método QuEChERS recomienda la dSPE grasa, que incluye PSA, EC-C18, y  $MgSO_4$ , para la limpieza de muestras grasas como el aguacate. Análogamente, se indica que los absorbentes de circonio son más eficaces para extraer lípidos que la dSPE C18/PSA. Nuestra comparación de métodos se centró en la limpieza EMR—Lipid así como en otras técnicas de limpieza. La recuperación de datos comparó las muestras antes y después del marcado correspondientes a 50 ng/g en aguacate. La extracción se llevó a cabo mediante el procedimiento AOAC QuEChERS, seguido por dSPE, para cada uno de los protocolos de limpieza; EMR—Lipid, C18/PSA dSPE, y absorbente de circonio. Para la limpieza con EMR—Lipid se siguió el protocolo descrito en la Figura 2. La dSPE con EMR—Lipid, a diferencia de los absorbentes dSPE tradicionales, requiere adición de agua para activar el material, lo que mejora de forma importante el rendimiento de extracción de la matriz. El sobrenadante de EMR—Lipid se transfirió a las sales de pulido EMR—Lipid para realizar la separación de fases ACN/agua, y eliminar los sólidos disueltos. Para la limpieza mediante QuEChERS con C18/PSA y circonio, se transfirió 1 ml del extracto de ACN bruto a un tubo de dSPE graso de 2 ml (ref. 5982-5122), o a un vial de 2 ml que contenía 100 mg absorbente de circonio. A continuación, las muestras se mezclaron en vórtex durante un minuto y se centrifugaron a 13.000 rpm durante tres minutos en una microcentrífuga. A continuación se transfirió una alícuota de 200  $\mu$ l de sobrenadante a un vial de muestra que contenía 800  $\mu$ l de agua. En esta etapa se generó un precipitado, tanto con el protocolo de limpieza para dSPE C18/PSA como con el protocolo que utiliza absorbente de circonio. Las muestras se tuvieron que filtrar con un filtro de 0,45  $\mu$ m de celulosa regenerada a un vial antes del análisis mediante LC/MS/MS. Se cree que los precipitados estaban originados por los lípidos no extraídos durante la limpieza con dSPE grasa y circonio. Este no fue el caso para la limpieza mediante EMR—Lipid del extracto bruto que, tras dilución, proporcionó una disolución transparente y sin precipitados. Por tanto, no se requirió filtración. Esto es importante para preparar los calibrantes añadidos posteriormente a los correspondientes blancos de matriz, y para preparar patrones de calibración acoplados con matriz. 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 de 5, 50, y 200 ng/g en seis réplicas usando una curva de calibración acoplada con matriz de siete puntos. Se utilizó un patrón interno para cuantificación, y los datos se notificaron en forma de exactitud y precisión.

## Resultados y comentarios

### Cantidad de sustancias extraídas simultáneamente

Los resultados de la determinación del peso de las sustancias extraídas simultáneamente se muestran en la Tabla 3. Estos resultados demuestran claramente que la dSPE EMR—Lipid proporciona la mejor eficiencia de limpieza de la matriz por peso.

Tabla 3. Pesos de las sustancias que se extraen simultáneamente del aguacate en una extracción QuEChERS con diferentes materiales de limpieza (n = 2).

Técnica de limpieza	Sustancias extraídas simultáneamente por 1 ml de extracto final en ACN (mg)	Eficiencia de extracción de la sustancias de la matriz que se extraen simultáneamente según la limpieza (%)
Sin limpieza adicional	14,7	—
Limpieza con EMR—Lipid	4,2	71,4
Limpieza con circonio	7,0	52,4
Limpieza con C18/PSA	9,5	35,4

Eficiencia de extracción de las sustancias de la matriz que se extraen simultáneamente (%)  

$$\frac{\text{Cantidad de sustancias extraídas simultáneamente sin limpieza} - \text{Cantidad de sustancias extraídas simultáneamente con limpieza}}{\text{Cantidad de sustancias extraídas simultáneamente sin limpieza}} \times 100$$

### Evaluación del efecto de la matriz

Para evaluar el efecto de la matriz se comparó la respuesta del analito entre los blancos de matriz después del marcado y los patrones originales. Puesto que la mayoría de los lípidos extraídos simultáneamente eluyen tarde en la técnica de LC en gradiente (fase reversa, % de materia orgánica de baja a elevada), los analitos hidrofóbicos se ven afectados en mayor medida por la matriz de la muestra. Este efecto se conoce habitualmente como supresión iónica, que se correlaciona con una baja respuesta del analito. Debido a la extracción ineficaz de los lípidos de la matriz mediante C18/PSA y el absorbente de circonio, se observó una supresión iónica significativamente más importante en los compuestos de elución tardía. La Figura 3 muestra tres compuestos como ejemplos de la supresión iónica reducida que resulta de la limpieza con EMR—Lipid. Los tres pesticidas son compuestos con valores del log P relativamente elevados; clorprofamo (log P 3,6), penconazol (log P 3,7), y EPN (log P 4,5). Cuanto mayor es el valor del log P, más hidrofóbico es el compuesto. Estos pesticidas muestran una supresión iónica de hasta el 80 % causada por interferencias de la matriz, especialmente debidas a lípidos, que no se eliminan eficazmente mediante dSPE con C18/PSA y el absorbente de circonio. Para estos compuestos, EMR—Lipid no produjo efectos significativos de la matriz, como puede observarse en la Figura 3.

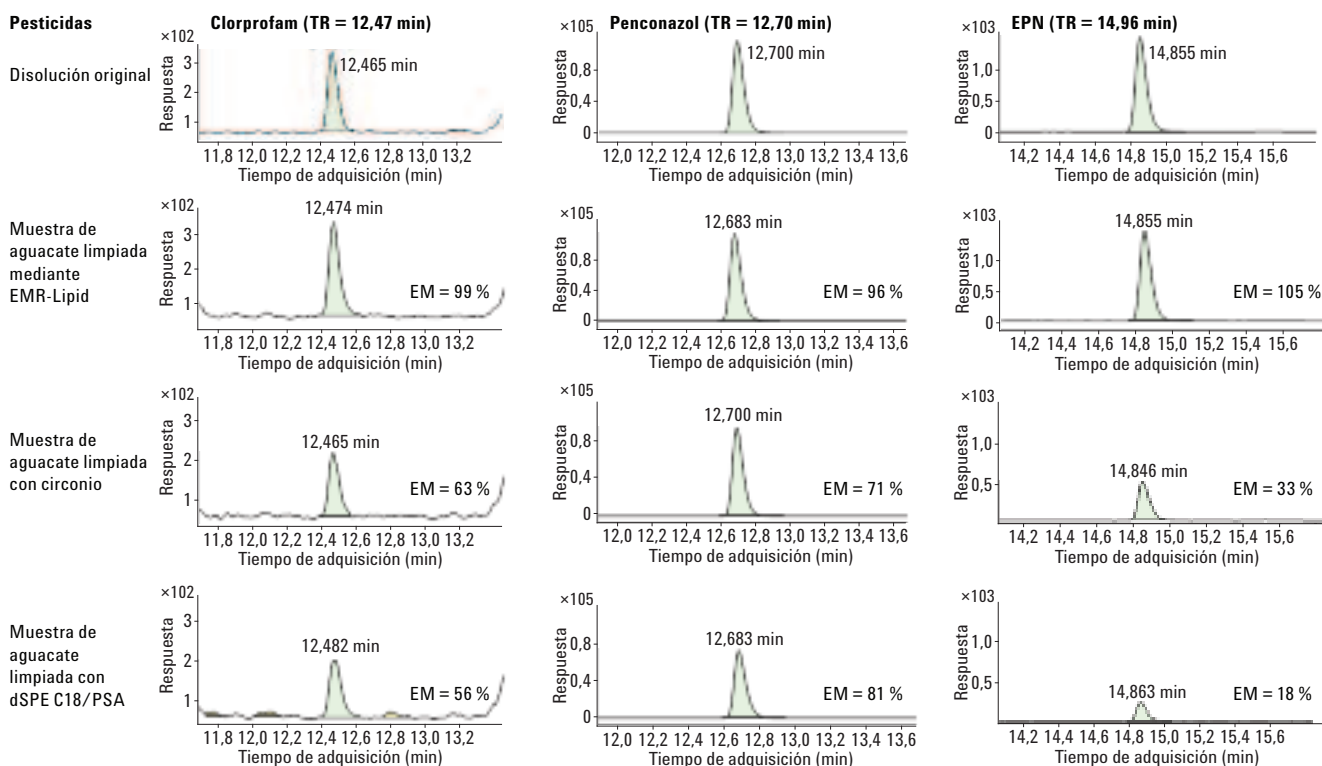


Figura 3. Comparación del efecto de la matriz para analitos hidrofóbicos. Las muestras de matriz recibieron posteriormente 50 ng/g de patrón de pesticidas en un blanco de matriz.

## Comparación de métodos para recuperación de los analitos

El método QuEChERS optimizado con dSPE con EMR—Lipid se comparó a continuación con la limpieza mediante dSPE con C18/PSA y absorbente de circonio. La Figura 4 muestra los resultados estadísticos de comparación de la recuperación, y la Figura 5 los resultados seleccionados de comparación para analitos problemáticos.

El protocolo EMR—Lipid proporcionó una recuperación total y precisión excelentes para la mayoría de pesticidas. Solamente dos pesticidas estuvieron por debajo de la ventana de recuperación del 70 al 120 %, concretamente ciprodinilo (64 %) y ácido 2,4-D (65 %), con un valor de DER inferior al 10 %. Sin embargo, se consideraron aceptables según las directrices SANCO [11] puesto que satisfacen criterios de reproducibilidad aceptables. Los resultados de recuperación para la limpieza mediante dSPE con C18/PSA fueron buenos, salvo para dos

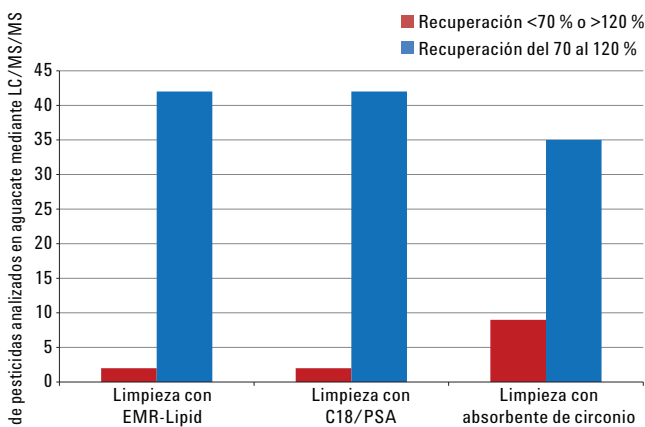


Figura 4. Resultados estadísticos de comparación de la recuperación, de Bond Elut EMR—Lipid de Agilent, dSPE con C18/PSA, y absorbente de circonio.

compuestos ácidos. El ácido 2,4-D y el dicloroprop proporcionaron una recuperación muy baja (<10 %) debido a PSA. Los resultados de recuperación para el absorbente de circonio mostraron más retención de analito, lo que dio como resultado recuperaciones inferiores al 70 % para nueve pesticidas.

## Validación de métodos

El protocolo EMR—Lipid se validó mediante el análisis de un lote de cuantificación completo. La metodología se ha descrito en la sección de preparación de muestras. Se usó un patrón interno (TPP) para la cuantificación y, por tanto, los resultados de la cuantificación se definen como exactitud y precisión. Sin embargo, la recuperación absoluta del PI (TPP) fue superior al 90 %, por lo que los resultados de exactitud corresponden a la recuperación absoluta.

Los resultados de validación detallados se relacionan en la Tabla 4, y también se proporcionan en una figura de resumen (Figura 6) generada por exactitud y precisión promedio calculadas para las 18 réplicas de muestras de QC marcadas con tres concentraciones diferentes. Los resultados de exactitud mostraron que el 95 % de los 44 pesticidas estuvieron comprendidos en la ventana de 70 a 120 %, salvo el ácido 2,4-D y el ciprodinilo, que proporcionaron recuperaciones algo inferiores al 70 % con buena DER. La reproducibilidad del método fue excepcional. Se consiguió un valor de DER inferior al 10 % (n = 6) en el 91 % de los pesticidas para una concentración de 5 ng/g, en el 100 % para 50 ng/g y en el 98 % para 200 ng/g. El resto de los valores de DER fueron inferiores al 20 % con el protocolo EMR—Lipid. El límite de detección del instrumento contribuye probablemente a la mayor variación de estos compuestos, superior al 10 % de DER para la menor concentración añadida. La etapa de pulido EMR—Lipid sin tampón (NaCl, MgSO<sub>4</sub>) es también una causa potencial de variación, y por tanto, las sales de pulido tamponadas se investigarán en un trabajo adicional.

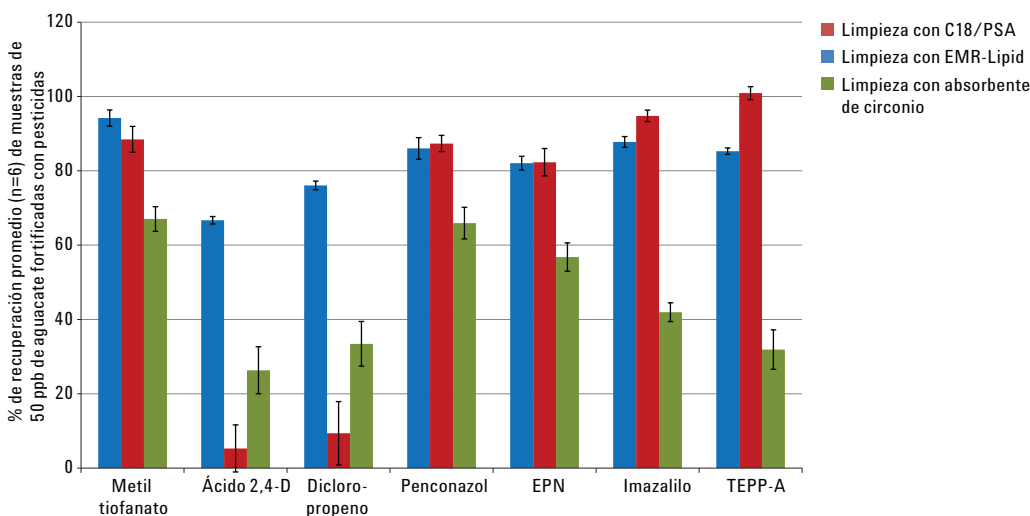


Figura 5. Resultados de comparación de la recuperación para las limpiezas dSPE realizadas con Bond Elut EMR—Lipid de Agilent (azul), C18/PSA (rojo), y absorbente de circonio (verde).

Tabla 4. Resultados de validación del protocolo EMR—Lipid para 44 pesticidas en aguacate a concentraciones de 5, 50, y 200 ng/g (n = 6).

Analito	Curva de calibración		Intervalo cal. (ng/g)	Exactitud y precisión del método					
	Ajuste de regresión/peso	R <sup>2</sup>		QC de 5 ng/g		QC de 50 ng/g		QC de 200 ng/g	
				Rec. %	DER	Rec. %	DER	Rec. %	DER
Metamidofós	Cuadrática, 1/x	0,9993	1-200	69,1	9,5	93,8	8,4	109,8	6,0
Aminocarb	Lineal, 1/x	0,9990	1-200	74,6	8,4	88,0	2,7	87,0	2,0
Acefato	Lineal, 1/x	0,9948	1-200	55,8	12,4	88,8	2,3	86,6	4,0
Ometoato	Lineal, 1/x	0,9996	1-200	84,5	6,0	85,3	1,4	84,4	2,6
Carbendazim	Lineal, 1/x	0,9995	1-200	87,1	6,3	86,2	2,2	85,4	1,2
Tiabendazol	Lineal, 1/x	0,9995	1-200	49,4	24,3	76,7	1,7	79,0	2,0
Mexacarbato	Lineal, 1/x	0,9993	1-200	83,6	7,8	90,4	3,3	89,0	2,1
Oxamilo	Lineal, 1/x	0,9991	1-200	81,1	7,6	96,7	2,6	94,4	3,5
Monocrotofós	Lineal, 1/x	0,9979	1-200	85,2	6,1	85,1	1,9	101,5	4,6
Metomilol	Lineal, 1/x	0,9993	1-200	77,8	8,2	88,6	3,3	92,8	4,5
Fenuron	Lineal, 1/x	0,9969	1-200	86,5	9,9	103,4	2,5	91,7	1,7
Imidacloprid	Lineal, 1/x	0,9996	1-200	81,7	5,9	94,1	2,6	87,9	2,5
Dimetoato	Lineal, 1/x	0,9993	1-200	83,3	8,0	99,2	3,1	94,8	2,5
TEPP-A	Lineal, 1/x	0,9989	1-200	50,2	6,5	88,3	1,6	78,4	3,1
Aldicarb	Lineal, 1/x	0,9989	1-200	88,6	5,6	101,2	3,5	76,2	1,9
Metoxuón	Lineal, 1/x	0,9987	1-200	102,0	5,4	105,8	2,5	89,9	2,6
Imazalilo	Lineal, 1/x	0,9988	1-200	81,4	6,9	86,2	2,0	82,5	2,7
Simazina	Lineal, 1/x	0,9984	1-200	91,8	5,4	93,8	1,9	85,4	1,6
Monurón	Lineal, 1/x	0,9990	1-200	82,5	9,9	96,0	3,7	88,4	1,8
Metiltiofanato	Lineal, 1/x	0,9977	1-200	89,4	10,8	104,6	5,5	86,0	7,1
Propoxur	Lineal, 1/x	0,9993	1-200	84,7	8,1	97,6	1,4	94,5	2,2
Carbofurano	Lineal, 1/x	0,9993	1-200	88,3	8,5	98,9	5,1	97,2	2,4
Clorotolurón	Lineal, 1/x	0,9990	1-200	96,3	5,0	97,9	3,1	89,9	2,0
Diuron	Lineal, 1/x	0,9995	1-200	86,6	6,7	98,7	2,8	97,5	3,5
Carbarilo	Lineal, 1/x	0,9991	1-200	80,7	7,4	101,1	3,2	90,5	2,1
Bentazona	Cuadrática, 1/x	0,9993	1-200	111,2	5,5	102,3	4,7	97,4	7,9
Isoproturón	Lineal, 1/x	0,9993	1-200	98,7	4,1	98,9	2,3	92,1	2,6
Ácido 2,3-D	Lineal, 1/x	0,9985	1-200	64,3	7,6	65,4	5,1	65,6	2,6
Fluometurón	Lineal, 1/x	0,9975	1-200	86,2	5,7	87,8	3,9	88,0	3,0
Metobromurón	Lineal, 1/x	0,9977	1-200	96,0	6,6	100,3	4,6	92,4	4,5
Ciprodinilo	Lineal, 1/x	0,9986	1-200	60,3	8,3	67,0	2,6	65,5	3,6
Metazaclor	Lineal, 1/x	0,9992	1-200	99,8	5,7	99,4	3,4	94,3	2,8
Profam	Lineal, 1/x	0,9985	1-200	85,8	9,7	89,3	3,8	87,0	3,8
Terbutilazina	Lineal, 1/x	0,9993	1-200	90,7	6,5	91,1	2,6	85,8	2,0
Diclorprop	Lineal, 1/x	0,9992	1-200	75,6	9,7	73,3	4,6	76,9	2,3
Sidurón	Lineal, 1/x	0,9990	1-200	90,2	8,6	92,4	3,5	91,5	2,2
Sebutilazina	Lineal, 1/x	0,9992	1-200	95,3	4,8	89,5	2,5	83,7	2,1
Metiocarb	Lineal, 1/x	0,9984	1-200	77,6	8,8	94,7	3,2	86,3	1,9
Linurón	Lineal, 1/x	0,9984	1-200	84,7	7,4	85,2	3,6	84,6	3,6
Clorprofam	Lineal, 1/x	0,9994	5-200	91,6	10,0	84,3	9,3	81,1	3,8
Penconazol	Lineal, 1/x	0,9992	1-200	83,0	6,3	81,1	2,4	80,7	1,5
Malatión	Lineal, 1/x	0,9991	1-200	76,2	7,1	100,5	2,2	100,0	1,0
Neburón	Lineal, 1/x	0,9994	1-200	66,9	6,8	83,0	1,6	84,8	1,3
EPN	Lineal, 1/x	0,9995	1-200	76,4	4,7	73,8	3,9	62,9	13,2

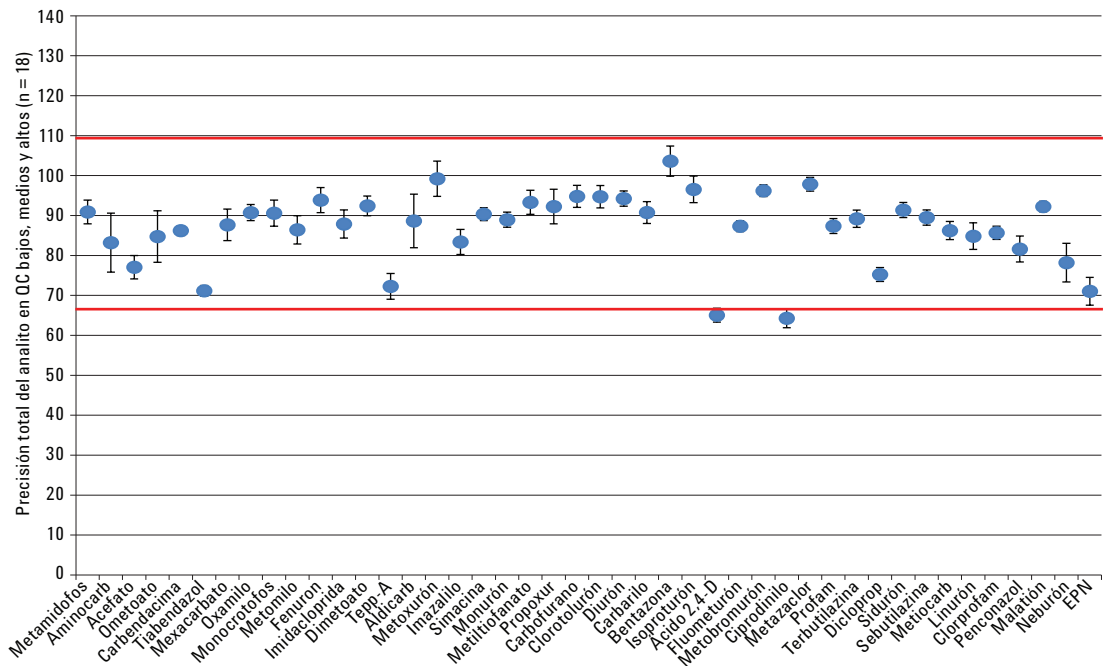


Figura 6. Resultados de cuantificación para 44 pesticidas representativos en aguacate usando el flujo de trabajo Bond Elut EMR—Lipid de Agilent. Los datos de exactitud y precisión se calcularon para un total de 18 réplicas para tres concentraciones diferentes.

## 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 con limpieza mediante dSPE. El método se ha validado para el análisis de 44 pesticidas que se pueden analizar mediante LC-en aguacate. El efecto de la matriz se ha evaluado cuidadosamente, y se ha comparado con la limpieza dSPE tradicional con C18/PSA y absorbente de circonio. Los resultados demuestran que EMR—Lipid proporciona una limpieza de la matriz superior a la dSPE con C18/PSA y absorbente de circonio en función del peso y el efecto de la matriz. La recuperación de los analitos y la precisión del método se han comparado exhaustivamente entre las tres técnicas de limpieza diferentes. La limpieza con EMR—Lipid proporciona una recuperación de los analitos comparable con respecto a la dSPE con C18/PSA, obteniéndose mucha menos cantidad de sustancias que se extraen simultáneamente. La limpieza realizada tanto mediante EMR—Lipid como dSPE grasa proporcionó una recuperación mucho mejor que la obtenida con el absorbente de circonio, debido a las interacciones no selectivas del analito con el circonio. Los datos sugieren que EMR—Lipid elimina la mayoría de la matriz, especialmente lípidos, sin afectar significativamente la recuperación de los analitos.

Este trabajo demuestra la limpieza superior que se puede conseguir usando EMR—Lipid como absorbente dSPE en un flujo de trabajo QuEChERS. La elevada selectividad del absorbente para los lípidos extraídos simultáneamente le convierte en un elemento ideal para el análisis de muestras grasas, independientemente del contenido de grasa y la lista de analitos objetivo. EMR—Lipid proporciona precisión y recuperación elevadas, una extracción de matriz superior, y facilidad de uso para la cuantificación de pesticidas en aguacate. El trabajo futuro seguirá centrándose en el análisis multirresiduo en muestras complejas- con un elevado contenido en grasa.

## 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. 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  
5991-6098ES



**Agilent Technologies**