

Analyse multi-résidus de pesticides dans de l'avocat avec Agilent Bond Elut EMR—Lipid par LC/MS/MS

Note d'application

Agriculture et test alimentaire

Auteurs

Limian Zhao et Derick Lucas
Agilent Technologies, Inc.

Extrait

Agilent Bond Elut QuEChERS Enhanced Matrix Removal-Lipid (EMR—Lipid) (élimination améliorée de la matrice lipidique) est un produit de préparation d'échantillons nouvelle génération, qui simplifie l'extraction en phase solide dispersive (dSPE) permettant d'éliminer la matrice de manière ultra-sélective sans affecter le rendement des analytes. Cette étude illustre l'utilisation de ce nouveau produit pour l'analyse LC/MS de 44 pesticides multi-classes dans l'avocat par LC/MS/MS. Cette procédure comprend une extraction QuEChERS AOAC suivie d'un traitement par dSPE EMR—Lipid et l'utilisation de sels de finition EMR—Lipid assurant ainsi un traitement rapide et efficace des échantillons. L'efficacité du traitement est évaluée en mesurant la quantité d'interférences non-volatiles co-extraites dans un extrait d'avocat après différents traitements par dSPE, et en évaluant les effets-matrice pour les analytes cibles. Comparé à d'autres produits utilisés pour traiter la matrice, dSPE EMR—Lipid permet un traitement beaucoup plus efficace sans affecter le rendement des analytes. La méthode optimisée offre une exactitude et une précision excellentes en LC/MS/MS pour les 44 pesticides analysables par LC, présents dans l'avocat. La dSPE EMR—Lipid s'intègre de manière pratique au protocole QuEChERS, offrant une méthode de préparation d'échantillons rapide, rigoureuse et efficace pour l'analyse de résidus de pesticides dans les échantillons d'avocat à haute teneur en lipides.



Agilent Technologies

Introduction

L'analyse de résidus de pesticides dans les aliments est un travail de routine pour de nombreux laboratoires qui utilisent la méthode Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe (QuEChERS) [1,2]. Cette méthode permet l'analyse de centaines de pesticides à faible concentration après une seule extraction. Bien que la méthode ait bien marché pour divers fruits et légumes, les aliments riches en lipides tels que l'avocat, les oléagineux et les aliments d'origine animale présentent de nouveaux défis [3,4]. Faire face à ces défis est une grande priorité pour les laboratoires qui doivent répondre aux critères de validation rigoureux des agences gouvernementales afin d'assurer la sécurité des aliments à la consommation.

L'analyse peut utiliser un mélange de LC et de GC pour convenir aux pesticides volatils, semi-volatils et non volatils que l'on retrouve dans de nombreuses méthodes multi-classes et multi-résidus [4]. Bien que de nombreux pesticides soient analysables à la fois par LC et GC, ce n'est pas le cas pour tous. Chaque technique chromatographique a ses avantages et ses désavantages en termes de quantification des analytes et d'effets indésirables dues aux interférences co-extraites. L'élimination de ces interférences co-extraites est essentielle pour une quantification exacte dans les matrices alimentaires complexes qui nécessitent un traitement avec des adsorbants tels que C18, PSA et GCB [5]. D'autres adsorbants à base de zirconium sont disponibles dans le commerce et améliorent généralement l'élimination des lipides par rapport aux adsorbants typiquement utilisés. Cependant, ce produit ne cible pas toutes les classes de lipides et peut retenir certains des analytes recherchés [6,7]. Les échantillons riches en lipides peuvent aussi nécessiter un traitement avec des cartouches d'extraction en phase solide (SPE) [7,8,9] ou par chromatographie par perméation sur gel (GPC) [10], ce qui augmente le temps et le coût d'une analyse qui serait sans cela une analyse de routine.

Agilent Bond Elut EMR—Lipid est un nouvel adsorbant qui élimine sélectivement les principales classes de lipides des échantillons sans perte indésirable d'analytes. L'élimination des lipides dans les matrices complexes est particulièrement importante en complément de techniques comme QuEChERS et la précipitation de protéines car ces méthodes co-extraient de grandes quantités d'interférences en même temps que les analytes cibles. Cette étude vise à évaluer la préparation d'échantillons pour l'analyse de 44 pesticides caractéristiques présents dans l'avocat et analysables par LC, en utilisant une extraction de type QuEChERS AOAC suivie d'un traitement par dSPE EMR—Lipid. Les pesticides représentent 12 classes de composés chimiques différentes afin de pouvoir établir la preuve de concept pour les analytes non inclus dans la note d'application. Le tableau 1 énumère les pesticides analysables par LC et leurs classes. Cette note d'application fait la preuve de la propreté exceptionnelle obtenue avec EMR—Lipid pour les matrices grasses complexes telles que l'avocat, de la capacité de récupération élevée et de la grande précision pour 44 résidus de pesticides multi-classes à trois niveaux de concentrations.

Tableau 1 : Pesticides analysables par LC utilisés dans cette étude et classes chimiques associées.

Représentatif Pesticide	Classe de composé chimique	Pesticide Groupe de
Méthamidophos	Organophosphate	Insecticide
Acéphate	Organophosphate	Insecticide
Ométhoate	Organophosphate	Insecticide
Diméthoate	Organophosphate	Insecticide
Malathion	Organophosphate	Insecticide
EPN	Organophosphate	Insecticide
Tepp-A	Organophosphate	Insecticide
Monocrotophos	Organophosphate	Insecticide
Mexacarbate	Carbamate	Insecticide
Carbaryl	Carbamate	Insecticide
Propoxur	Carbamate	Insecticide
Carbofuran	Carbamate	Insecticide
Méthiocarbe	Carbamate	Insecticide
Chlorprophame	Carbamate	Insecticide
Prophame	Carbamate	Insecticide
Aminocarbe	Carbamate	Insecticide
Oxamyl	Carbamate	Insecticide
Méthomyl	Carbamate	Insecticide
Aldicarbe	Carbamate	Insecticide
Terbuthylazine	Triazine	Algicide
Simazine	Triazine	Herbicide
Sébutylazine	Triazine	Herbicide
Monuron	Urée	Herbicide
Chlortoluron	Urée	Herbicide
Diuron	Urée	Herbicide
Fluométuron	Urée	Herbicide
Isoproturon	Urée	Herbicide
Métobromuron	Urée	Herbicide
Siduron	Urée	Herbicide
Linuron	Urée	Herbicide
Néburon	Urée	Herbicide
Fénuron	Urée	Herbicide
Métoxuron	Urée	Herbicide
Carbendazime	Benzimidazole	Fongicide
Thiabendazole	Benzimidazole	Fongicide
Thiophanate méthyle	Benzimidazole	Fongicide
Cyprodinil	Anilinopyrimidine	Fongicide
Imazalil	Imidazole	Fongicide
Penconazole	Triazole	Fongicide
Imidaclopride	Néonicotinoïde	Insecticide
Métazachlore	Chloracétanilide	Herbicide
2,4-D	Chlorophénoxyacide	Herbicide
Dichlorprop	Chlorophénoxyacide	Herbicide
Bentazone	Non classifié	Herbicide

Données expérimentales

Tous les réactifs et solvants sont de grade HPLC ou analytique. L'acétonitrile (ACN) et le méthanol proviennent de Honeywell (Muskegon, MI, USA). L'acide acétique (AA) de grade réactif provient de Sigma-Aldrich, Corp. (St Louis, MO, USA). Les étalons de pesticides et les étalons internes proviennent de Sigma-Aldrich, Corp. et AccuStandard (New Haven, CT, USA).

Solutions et étalons

L'acétonitrile contenant de l'AA à 1 % est préparé en ajoutant 10 mL d'acide acétique à 990 mL d'ACN. Les solutions mères d'étalons et d'étalons internes sont préparées pour certains pesticides dans de l'ACN ou dans du méthanol à une concentration de 2,0 mg/mL. Le reste des étalons de pesticides provient de mélanges étalons obtenus dans le commerce et utilisés directement pour préparer la solution étalon de travail. Une solution de travail combinée est préparée dans de l'ACN à une concentration de 25 µg/mL. Une solution de travail d'étalon interne TPP (triphenylphosphate) à 25 µg/mL est préparée dans de l'ACN.

Équipement

L'équipement et les matériaux utilisés pour la préparation d'échantillons comprennent :

- Broyeur Geno/Grinder (SPEX, Metuchen, NJ, USA)
- Centrifugeuse Centra CL3R (Thermo CIE, MA, USA)
- Microcentrifugeuse Eppendorf, Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA
- Agitateur vortex et agitateur vortex multi-tubes, VWR, Radnor, PA, USA
- Distributeur pour flacon, VWR, So. Plainfield, NJ, USA
- Pipettes et répéteur Eppendorf
- Tubes Agilent Bond Elut dSPE EMR—Lipid (réf. 5982-1010) et tubes de finition Agilent Bond Elut Final Polish (réf. 5982-0101)

Instruments

L'analyse est effectuée sur un instrument Agilent 1290 Infinity LC comportant :

- Une pompe quaternaire Agilent 1290 Infinity (G4204A)
- Un passeur automatique d'échantillons Agilent 1290 Infinity haute performance (G4226A) équipé d'un thermostat Agilent 1290 Infinity (G1330B) et d'un compartiment à colonne thermostaté Agilent 1290 Infinity (G1316C)

Le système UHPLC est couplé à un système LC/MS à triple quadripôle Agilent 6490 équipé d'une source d'ionisation électrospray Agilent Jet Stream et d'une technologie Agilent iFunnel. Un logiciel de station de travail Agilent MassHunter est utilisé pour l'acquisition et l'analyse des données.

Conditions relatives à l'instrument

Conditions de HPLC

Colonne :	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2,1 × 150 mm, 1,8 µm (réf. 959759-902), Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 UHPLC Guard, 5 × 2,1 mm, 1,8 µm (réf. 821725-902)	
Phase mobile :	A) acide formique (AF) à 0,1 % dans de l'eau B) acide formique (AF) à 0,1 % dans de l'acétonitrile	
Débit :	0,3 ml/min	
Température de colonne :	35 °C	
Température du passeur automatique d'échantillons :	4 °C	
Volume d'injection :	3 µL	
Rinçage de l'aiguille :	1:1:1 ACN:MeOH:IPA:H2O avec de l'acide formique à 0,2 %	
Gradient :	Temps (min)	%B
	0	10
	15	95
	15,01	100
Fin d'analyse :	16 min	
Temps post-analyse :	3 min	

Conditions de MS

Mode positif/négatif		
Température de gaz :	120 °C	
Débit :	14 L/min	
Nébuliseur :	40 psi	
Chauffage pour gaz de gainage :	400 °C	
Débit gaz de gainage :	12 L/min	
Capillaire :	3 000 V	
Paramètres de iFunnel :	Positif	Négatif
RF haute pression :	100 V	90 V
RF basse pression :	70 V	60 V

Les conditions de MS MRM pour les analytes sont indiquées dans le tableau 2, et la figure 1 montre un chromatogramme type.

Tableau 2. Paramètres MRM et temps de rétention en LC triple quadripôle pour les pesticides utilisés dans cette étude.

Analyte	TR (min)	Delta de TR (min)	Polarité	Ion parent (m/z)	Ion fils (m/z)	CE (v)
Méthamidophos	1,83	2	Positive	142	94,1	9
Aminocarbe	2,03	2	Positif	209,1	137,2	24
Acéphate	2,13	2	Positif	184	143	9
Ométhoate	2,54	2	Positif	214	124,9	17
Carbendazime	3,40	2	Positif	192,1	132	33
Thiabendazole	3,89	2	Positif	202	131,1	41
Mexacarbate	3,99	2	Positif	223,1	151,1	20
Oxamyl	4,24	2	Positif	237,1	72	12
Monocrotophos	4,46	2	Positif	224,1	127	10
Méthomyl	4,64	2	Positif	163,1	106	4
Fénuron	6,17	2	Positif	165,1	72	20
Imidaclopride	6,43	2	Positif	256,1	209,1	13
Diméthoate	6,63	2	Positif	230	199	5
TEPP-A	7,69	2	Positif	291,1	179	20
Aldicarbe	7,87	2	Positif	213,1	89,1	15
Métoxuron	7,89	2	Positif	229	46,1	12
Imazalil	7,99	2	Positif	297,1	158,9	25
Simazine	8,31	2	Positif	202,1	132	22
Monuron	8,37	2	Positif	199,1	46,1	16
Thiophanate méthyle	8,95	2	Positif	343,1	151,2	4
Propoxur	9,15	2	Positif	210,1	111,1	9
Carbofuran	9,30	2	Positif	222,1	123,1	30
Chlortoluron	9,54	2	Positif	213,1	72	20
Diuron	9,65	2	Positif	233	72,1	20
Carbaryl	9,73	2	Positif	202,1	145,1	9
Bentazone	9,73	2	Négatif	239	132	15
Isoproturon	9,96	2	Positif	207,1	46,1	20
2,3-D acide	10,06	2	Négatif	219	161	15
Fluométuron	10,10	2	Positif	233,1	72	16
Métobromuron	10,48	2	Positif	259	148	10
Cyprodinil	10,53	2	Positif	226,1	93,1	41
Métazachlore	10,71	2	Positif	278,1	134,2	15
Prophame	10,80	2	Positif	180,1	138,1	4
Terbuthylazine	10,98	2	Positif	230,1	174,1	15
Dichlorprop	10,99	2	Négatif	233	161	10
Siduron	11,26	2	Positif	233,2	137,1	12
Sébutylazine	11,47	2	Positif	230,1	174,1	16
Méthiocarbe	11,47	2	Positif	226,1	169	4
Linuron	11,69	2	Positif	249	160,1	20
Chlorprophame	12,53	2	Positif	214,1	172	5
Penconazole	12,76	2	Positif	284,1	70	17
Malathion	12,85	2	Positif	331	126,9	5
Néburon	13,29	2	Positif	275,1	57,1	20
TPP (étalon interne)	13,99	2	Positif	327,1	51,1	80
EPN	14,96	2	Positif	324,1	296,1	8

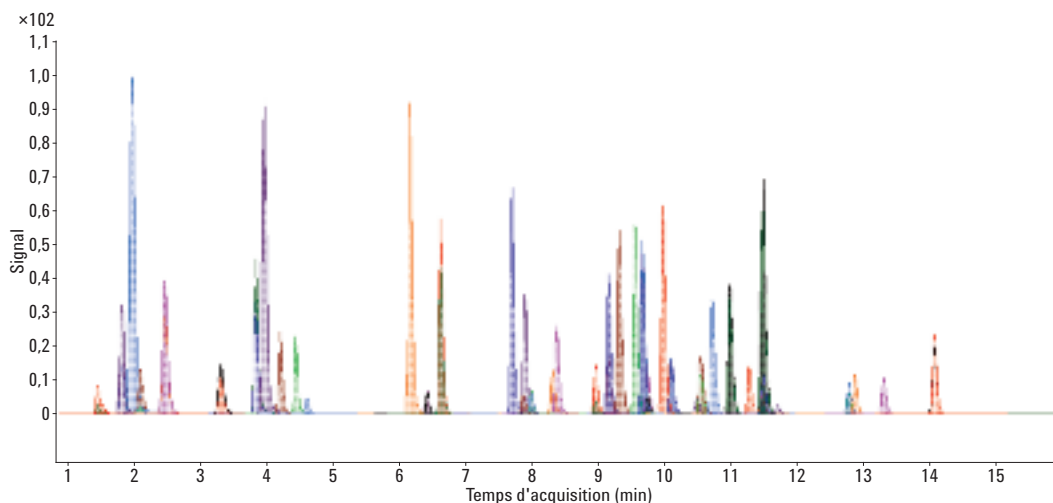


Figure 1. Chromatogramme LC/MS/MS (MRM) type d'échantillon d'avocat dopé avec 50 ng/g de pesticides et extrait par QuEChERS puis traité avec Agilent Bond Elut EMR—Lipid.

Préparation d'échantillons

La procédure finale de préparation d'échantillons a été optimisée en utilisant le protocole QuEChERS comportant les étapes suivantes :

1. Peser 15 g ($\pm 0,1$ g) d'avocat homogénéisé dans des tubes à centrifugeuse de 50 mL.
2. Ajouter 15 mL d'acétonitrile (AA à 1 %), et agiter au vortex pendant 10 sec.
3. Ajouter un sachet de sels d'extraction AOAC.
4. Mélanger sur un agitateur mécanique pendant 2 min.
5. Centrifuger à 5 000 rpm pendant 5 minutes.
6. Ajouter 5 mL d'eau à un tube dSPE EMR—Lipid de 15 mL.
7. Transférer 5 mL de surnageant dans un tube dSPE EMR—Lipid.
8. Agiter au vortex immédiatement pour disperser l'échantillon puis pendant 60 sec supplémentaires sur un agitateur vortex multi-tubes.
9. Centrifuger à 5 000 rpm pendant 3 minutes.
10. Transférer 5 mL de surnageant dans un tube de finition EMR—Lipid pour touche finale de 15 mL contenant 2 g de sels (1:4, NaCl:MgSO₄) et agiter au vortex pendant 1 min.
11. Centrifuger à 5 000 rpm pendant 3 minutes.
12. Mélanger 200 μ L de la couche d'ACN supérieure et 800 μ L d'eau dans un flacon d'échantillon de 2 mL et agiter au vortex.

L'échantillon est prêt pour une analyse LC/MS/MS. L'ensemble des étapes de la préparation d'échantillons est illustré dans la figure 2.

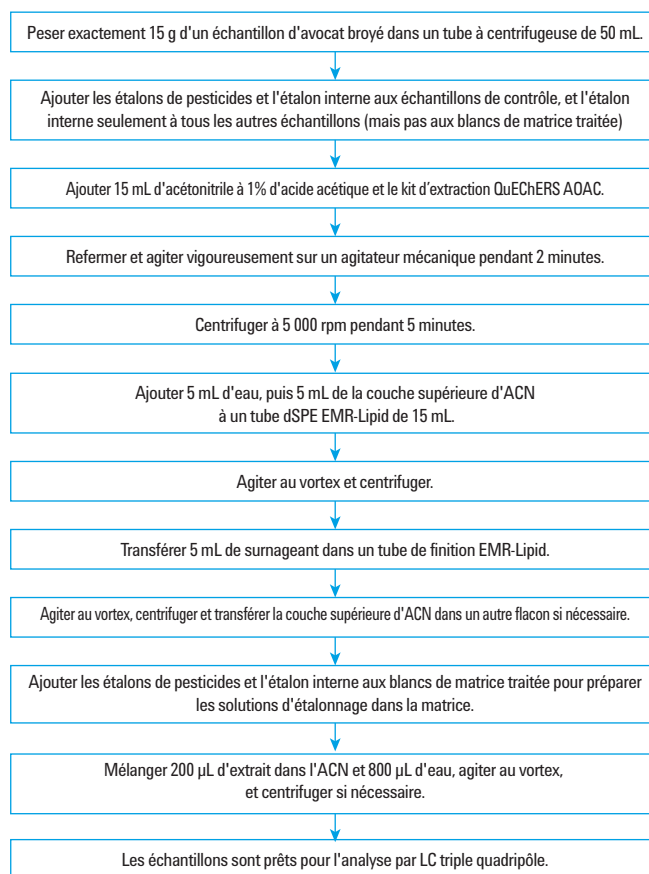


Figure 2. Procédure de préparation d'échantillons avec Agilent Bond Elut EMR—Lipid pour l'analyse de pesticides dans de l'avocat.

Étalons pour la calibration et échantillons de contrôle

Les échantillons de contrôle pré-dopés sont enrichis de manière appropriée avec une solution de travail d'étalons de pesticides après l'étape 1 et en 6 réplicats. Les niveaux de concentration correspondent à 5, 50 et 200 ng/g de pesticides dans de l'avocat. Tous les échantillons excepté les blancs de matrice sont enrichis avec la solution d'étalon interne à hauteur de 100 ng/g de TPP dans l'avocat.

Les solutions de calibration dans la matrice sont préparées à partir des solutions de travail d'étalon et d'étalon interne. Les concentrations après l'étape 10 correspondent à 1, 5, 10, 50, 100, 150 et 200 ng/g de pesticides et 100 ng/g d'étalon interne (TPP). L'extrait final est dilué avec de l'eau pour rendre l'échantillon analysable en gradient LC/MS/MS et maintenir l'intégrité de la forme des pics pour les premiers analytes élués. Le système LC/MS/MS permet d'obtenir une excellente sensibilité avec la dilution finale décrite et remplit les critères des limites de détection requises. Si la sensibilité de l'instrument ne peut pas remplir les critères nécessaires en raison de la dilution des échantillons, une étape de concentration des échantillons (évaporation et reprise), bien que loin d'être idéale, doit être envisagée.

Mesure de la quantité d'interférences co-extraites

La quantité d'interférences co-extraites est déterminée par des mesures gravimétriques [2] pour trois techniques de traitement : C18/PSA, adsorbant à base de zirconium et EMR—Lipid. Les échantillons sont préparés comme suit pour recueillir les données en double.

1. Chauffer les tubes à essai en verre pendant ~ 1 h à 110 °C pour éliminer l'humidité.
2. Refroidir les tubes à température ambiante.
3. Pré-peser les tubes.
4. Transférer exactement 1 mL d'extrait initial d'un blanc de matrice (sans traitement) et de blancs de matrice ayant subi différents traitements, en double à chaque fois.
5. Sécher tous les échantillons sur un CentriVap à 50 °C pendant 1 h ou jusqu'à ce qu'ils soient secs.
6. Chauffer les tubes pendant ~ 1 h à 110 °C pour éliminer l'humidité.
7. Refroidir les tubes à température ambiante.
8. Re-peser les tubes.

La différence entre le poids après l'étape 8 et le poids après l'étape 3 d'un blanc de matrice sans traitement correspond à la quantité totale d'interférences co-extraites dans l'échantillon. La quantité d'interférences co-extraites éliminées par le traitement est représentée par la différence moyenne de poids à l'étape 8 sans et avec traitement.

Évaluation de l'effet-matrice

En outre, la réponse de l'analyte (surface de pic) pour des extraits d'avocat post-dopés et pour des solutions-étalons sont comparées. Les extraits d'avocat post-dopés sont obtenus par ajout de solution-étalon de pesticide au blanc de matrice. La différence de réponse (surface de pic) est directement corrélée avec les effets-matrice.

Comparaison des méthodes et validation

Actuellement, la méthode QuEChERS recommande le kit dSPE Lipides, qui contient le PSA, l'EC-C18 et le MgSO₄ pour le traitement d'échantillons à haute teneur en lipides tels que l'avocat. De plus, l'adsorbant à base de zirconium est revendiqué comme étant plus efficace que la dSPE C18/PSA pour l'élimination des lipides. Notre méthode de comparaison s'est focalisée sur le traitement par EMR—Lipid et les autres techniques de traitement. Les rendements ont été comparés pour des échantillons d'avocat enrichis à 50 ng/g avant ou après le traitement. L'extraction a été effectuée par la méthode AOAC QuEChERS suivie d'une dSPE pour chaque protocole de traitement : EMR—Lipid, dSPE C18/PSA et adsorbant à base de zirconium. Pour le traitement par EMR—Lipid, le protocole suivi était celui indiqué dans la figure 2. La dSPE EMR—Lipid, contrairement aux adsorbants dSPE traditionnels, nécessite l'addition d'eau pour activer le support, ce qui améliore de manière spectaculaire l'élimination de la matrice. Après l'étape de dSPE, le surnageant est mélangé aux sels de finition EMR—Lipid pour séparer les phases ACN/eau et éliminer les solides dissous. Pour le traitement par C18/PSA et l'adsorbant à base de zirconium, 1 mL d'extrait brut dans de l'ACN est transféré dans un tube de dSPE de 2 mL (réf. 5982-5122) ou dans un flacon de 2 mL contenant 100 mg d'adsorbant à base de zirconium. Les échantillons sont agités sur vortex pendant une minute et centrifugés à 13 000 rpm pendant trois minutes dans une microcentrifugeuse. Une aliquote de 200 µL de surnageant est ensuite transférée dans un flacon contenant 800 µL d'eau. Un précipité se forme lors du traitement par dSPE C18/PSA ou par l'adsorbant à base de zirconium, et les échantillons doivent être filtrés avec un flacon à filtre de cellulose régénérée de 0,45 µm avant l'analyse par LC/MS/MS. Le précipité proviendrait de lipides non éliminés suite au traitement par le tube dSPE Lipides ou par adsorbant à base de zirconium. Ceci n'est pas le cas pour le traitement de l'extrait brut par EMR—Lipid, qui après dilution, donne une solution limpide sans précipité. La filtration n'est donc pas nécessaire. Il est important de préparer des étalons de calibration dans la matrice traitée et pour ce faire, il est nécessaire d'ajouter les étalons à l'extrait obtenu après traitement d'un blanc de matrice. Le rendement est calculé à partir du rapport des surfaces de pics des échantillons enrichis avant ou après le traitement. La méthode EMR—Lipid a été validée pour l'avocat à des concentrations de 5, 50 et 200 ng/g en six réplicats avec une courbe d'étalonnage dans la matrice de 7 points. Un étalon interne a été utilisé pour la quantification et les données ont été rapportées en termes d'exactitude et de précision.

Résultats et discussion

Quantité d'interférences co-extraites

Les résultats de détermination du poids des interférences présentes dans la matrice sont indiqués dans le tableau 3 et montrent clairement que la dSPE EMR—Lipid offre la meilleure efficacité de traitement de la matrice en termes de poids éliminé.

Tableau 3. Poids des interférences dans des échantillons d'avocat extraits par QuEChERS et différents adsorbants (n = 2).

Technique de traitement	Poids d'interférences dans 1 mL d'extrait final dans de l'ACN (mg)	Efficacité d'élimination des interférences de la matrice lors du traitement (%)
Pas de traitement supplémentaire	14,7	–
Traitement par EMR—Lipid	4,2	71,4
Traitement par l'adsorbant à base de zirconium	7,0	52,4
Traitement par C18/PSA	9,5	35,4

Efficacité d'élimination des interférences co-extraites (%)

$$\frac{(\text{Quantité d'interférences sans traitement} - \text{Quantité d'interférences après traitement})}{\text{Quantité d'interférences sans traitement}} \times 100$$

Évaluation de l'effet-matrice

La réponse de l'analyte pour les étalons dans la matrice traitée et les solutions standard a été comparée afin d'évaluer les effets-matrice. Puisque la plupart des lipides co-extraits éluent tardivement lors d'un gradient LC (phase inverse, % initial d'organique faible), les analytes hydrophobes sont plus sérieusement affectés par la matrice de l'échantillon. Cet effet est généralement connu sous le nom de suppression d'ions, qui est corrélée avec une faible réponse de l'analyte. Du fait de l'élimination inefficace des lipides de la matrice par C18/PSA et l'adsorbant à base de zirconium, une suppression d'ions plus importante a été observée pour les composés qui éluent tard. La figure 3 illustre la réduction de la suppression d'ions résultant du traitement avec EMR—Lipid. Les trois pesticides sont des composés avec des valeurs de log P relativement élevées ; chlorprophame (log P 3,6), penconazole (log P 3,7), et EPN (log P 4,5). Plus la valeur de log P est élevée, plus le composé est hydrophobe. Ces pesticides présentent jusqu'à 80 % de suppression d'ions en raison des interférences dues à la matrice, particulièrement par les lipides qui n'ont pas été efficacement éliminés par la dSPE C18/PSA et l'adsorbant à base de zirconium. Pour ces composés, l'EMR—Lipid ne présente aucun effet-matrice significatif (figure 3).

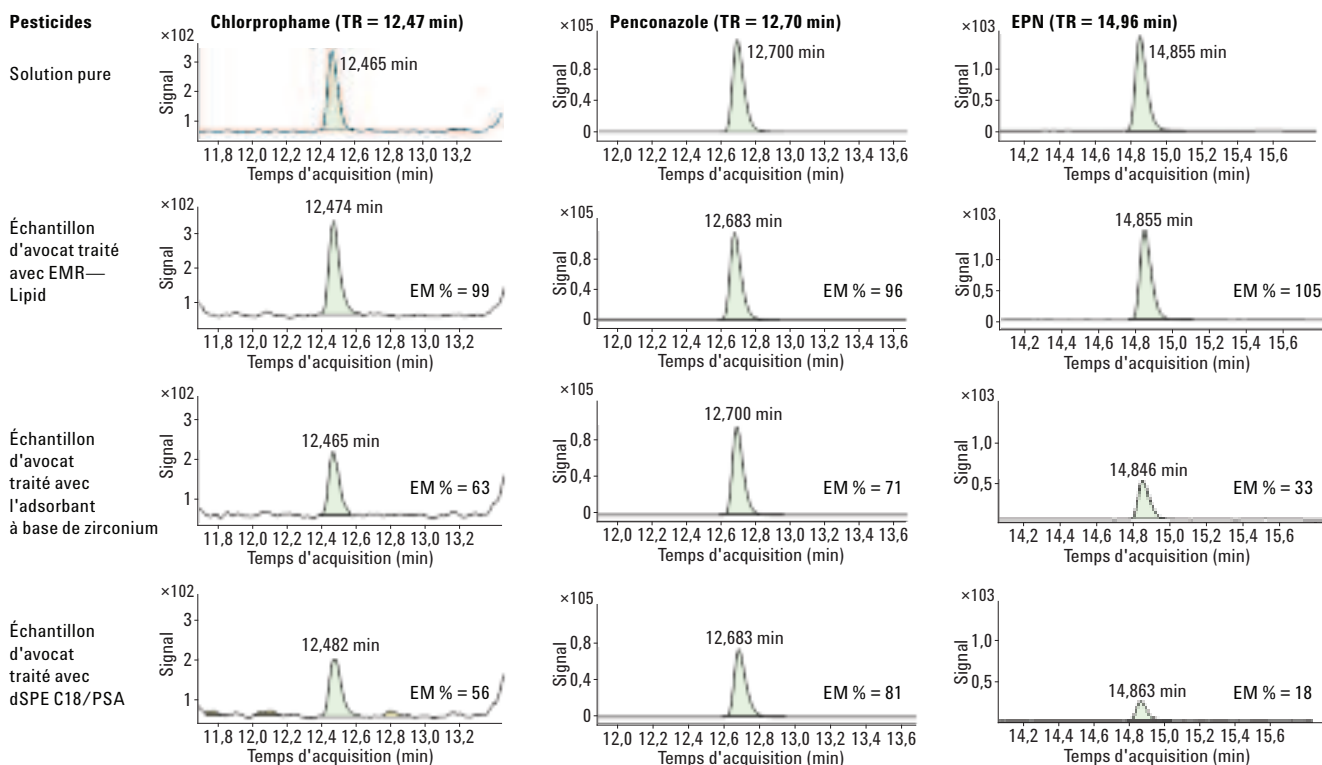


Figure 3 : Comparaison de l'effet-matrice pour les analytes hydrophobes. Les échantillons sont obtenus en ajoutant 50 ng/g de pesticide à un blanc de matrice traitée.

Comparaison des méthodes pour le rendement des analytes

La méthode QuEChERS optimisée avec la dSPE EMR—Lipid a été comparée au traitement par C18/PSA et l'adsorbant à base de zirconium. La figure 4 montre les résultats comparant le rendement statistique et la figure 5 les résultats comparant certains analytes problématiques.

Le protocole EMR—Lipid a permis d'obtenir globalement un excellent rendement et une très grande précision pour la plupart des pesticides. Seuls deux pesticides étaient en-dessous de la plage de rendement de 70 à 120 %, le cyprodinil (64%) et le 2,4-D (65%), avec des RSD de moins de 10 %. Par conséquent, ces résultats sont considérés comme recevables selon les recommandations SANCO [11] (car la reproductibilité est acceptable). Les résultats de rendement pour le traitement par dSPE C18/PSA étaient bons, excepté pour deux

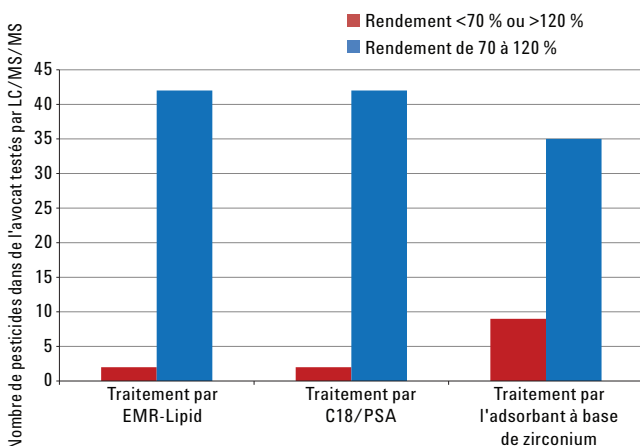


Figure 4. Résultats de recouvrement statistique pour la comparaison entre Agilent Bond Elut EMR—Lipid, dSPE C18/PSA et l'adsorbant à base de zirconium.

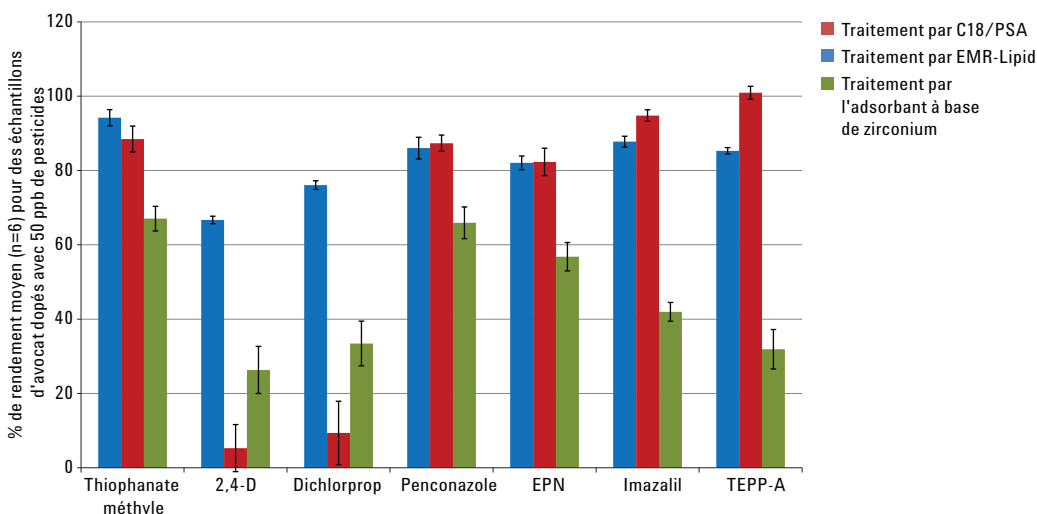


Figure 5. Résultats comparant le rendement après traitement dSPE entre Agilent Bond Elut EMR—Lipid (bleu), C18/PSA (rouge) et l'adsorbant à base de zirconium (vert).

composés acides. Le 2,4-D et le dichlorprop ont donné un très faible rendement (<10 %) à cause du PSA. Les résultats de rendement avec l'adsorbant à base de zirconium ont mis en évidence une adsorption des analytes plus importante si bien que le rendement de neuf pesticides était inférieur à 70 %.

Validation de la méthode

Le protocole d'EMR—Lipid a été validé par l'analyse d'un lot complet de quantification. La méthodologie est décrite dans la rubrique de préparation d'échantillons. Un étalon interne (TPP) a été utilisé pour la quantification et par conséquent, les résultats sont donnés en termes d'exactitude et de précision. Cependant, le rendement absolu de l'étalon interne (TPP) étant supérieur à 90 %, les résultats d'exactitude peuvent être assimilés au rendement absolu.

Les résultats détaillés de validation sont fournis dans le tableau 4, et sous forme de figure récapitulative (Figure 6) générée par la moyenne de l'exactitude et de la précision calculée sur la base de 18 réplicats pour les échantillons de contrôle dopés avant le traitement à trois concentrations différentes. Les résultats d'exactitude ont montré que 95 % des 44 pesticides entraient dans la plage de 70 à 120 %, excepté le 2,4-D et le cyprodinil, qui ont donné des rendements juste en-dessous de 70% avec de bonnes RSD. La reproductibilité de la méthode est exceptionnelle avec moins de 10 % de RSD (n = 6) pour 91% des pesticides à 5 ng/g, 100% à 50 ng/g, et 98 % à 200 ng/g. Toutes les autres valeurs de RSD sont largement au-dessous de 20 % avec les protocoles d'EMR—Lipid. La limite de détection de l'instrument contribue probablement à la plus grande variation pour les composés au-dessus de 10 % de RSD au niveau de concentration le plus bas. L'étape de finition non tamponnée d'EMR—Lipid (NaCl, MgSO₄) est également une cause possible de variation. Les sels de finition tamponnés seront donc examinés dans les études à venir.

Tableau 4. Résultats de validation du protocole EMR—Lipid pour 44 pesticides dans de l'avocat à des concentrations de 5, 50 et 200 ng/g (n = 6).

Analyte	Courbe d'étalonnage		Plage d'étalonnage (ng/g)	Exactitude et précision de la méthode					
	Régression linéaire/poids	R ²		Contrôles qualité avec 5 ng/g		Contrôles qualité avec 50 ng/g		Contrôles qualité avec 200 ng/g	
				Rdt. %	RSD	Rdt. %	RSD	Rdt. %	RSD
Méthamidophos	Quadratique, 1/x	0,9993	1-200	69,1	9,5	93,8	8,4	109,8	6,0
Aminocarbe	Linéaire, 1/x	0,9990	1-200	74,6	8,4	88,0	2,7	87,0	2,0
Acéphate	Linéaire, 1/x	0,9948	1-200	55,8	12,4	88,8	2,3	86,6	4,0
Ométhoate	Linéaire, 1/x	0,9996	1-200	84,5	6,0	85,3	1,4	84,4	2,6
Carbendazime	Linéaire, 1/x	0,9995	1-200	87,1	6,3	86,2	2,2	85,4	1,2
Thiabendazole	Linéaire, 1/x	0,9995	1-200	49,4	24,3	76,7	1,7	79,0	2,0
Mexacarbate	Linéaire, 1/x	0,9993	1-200	83,6	7,8	90,4	3,3	89,0	2,1
Oxamyl	Linéaire, 1/x	0,9991	1-200	81,1	7,6	96,7	2,6	94,4	3,5
Monocrotophos	Linéaire, 1/x	0,9979	1-200	85,2	6,1	85,1	1,9	101,5	4,6
Méthomyl	Linéaire, 1/x	0,9993	1-200	77,8	8,2	88,6	3,3	92,8	4,5
Fénuron	Linéaire, 1/x	0,9969	1-200	86,5	9,9	103,4	2,5	91,7	1,7
Imidaclopride	Linéaire, 1/x	0,9996	1-200	81,7	5,9	94,1	2,6	87,9	2,5
Diméthoate	Linéaire, 1/x	0,9993	1-200	83,3	8,0	99,2	3,1	94,8	2,5
TEPP-A	Linéaire, 1/x	0,9989	1-200	50,2	6,5	88,3	1,6	78,4	3,1
Aldicarbe	Linéaire, 1/x	0,9989	1-200	88,6	5,6	101,2	3,5	76,2	1,9
Métoxuron	Linéaire, 1/x	0,9987	1-200	102,0	5,4	105,8	2,5	89,9	2,6
Imazalil	Linéaire, 1/x	0,9988	1-200	81,4	6,9	86,2	2,0	82,5	2,7
Simazine	Linéaire, 1/x	0,9984	1-200	91,8	5,4	93,8	1,9	85,4	1,6
Monuron	Linéaire, 1/x	0,9990	1-200	82,5	9,9	96,0	3,7	88,4	1,8
Thiophanate méthyle	Linéaire, 1/x	0,9977	1-200	89,4	10,8	104,6	5,5	86,0	7,1
Propoxur	Linéaire, 1/x	0,9993	1-200	84,7	8,1	97,6	1,4	94,5	2,2
Carbofuran	Linéaire, 1/x	0,9993	1-200	88,3	8,5	98,9	5,1	97,2	2,4
Chlortoluron	Linéaire, 1/x	0,9990	1-200	96,3	5,0	97,9	3,1	89,9	2,0
Diuron	Linéaire, 1/x	0,9995	1-200	86,6	6,7	98,7	2,8	97,5	3,5
Carbaryl	Linéaire, 1/x	0,9991	1-200	80,7	7,4	101,1	3,2	90,5	2,11
Bentazone	Quadratique, 1/x	0,9993	1-200	111,2	5,5	102,3	4,7	97,4	7,9
Isoproturon	Linéaire, 1/x	0,9993	1-200	98,7	4,1	98,9	2,3	92,1	2,6
2,3-D	Linéaire, 1/x	0,9985	1-200	64,3	7,6	65,4	5,1	65,6	2,6
Fluométuron	Linéaire, 1/x	0,9975	1-200	86,2	5,7	87,8	3,9	88,0	3,0
Métobromuron	Linéaire, 1/x	0,9977	1-200	96,0	6,6	100,3	4,6	92,4	4,5
Cyprodinil	Linéaire, 1/x	0,9986	1-200	60,3	8,3	67,0	2,6	65,5	3,6
Métazachlore	Linéaire, 1/x	0,9992	1-200	99,8	5,7	99,4	3,4	94,3	2,8
Prophame	Linéaire, 1/x	0,9985	1-200	85,8	9,7	89,3	3,8	87,0	3,8
Terbutylazine	Linéaire, 1/x	0,9993	1-200	90,7	6,5	91,1	2,6	85,8	2,0
Dichlorprop	Linéaire, 1/x	0,9992	1-200	75,6	9,7	73,3	4,6	76,9	2,3
Siduron	Linéaire, 1/x	0,9990	1-200	90,2	8,6	92,4	3,5	91,5	2,2
Sébutylazine	Linéaire, 1/x	0,9992	1-200	95,3	4,8	89,5	2,5	83,7	2,1
Méthiocarbe	Linéaire, 1/x	0,9984	1-200	77,6	8,8	94,7	3,2	86,3	1,9
Linuron	Linéaire, 1/x	0,9984	1-200	84,7	7,4	85,2	3,6	84,6	3,6
Chlorprophame	Linéaire, 1/x	0,9994	5-200	91,6	10,0	84,3	9,3	81,1	3,8
Penconazole	Linéaire, 1/x	0,9992	1-200	83,0	6,3	81,1	2,4	80,7	1,5
Malathion	Linéaire, 1/x	0,9991	1-200	76,2	7,1	100,5	2,2	100,0	1,0
Néburon	Linéaire, 1/x	0,9994	1-200	66,9	6,8	83,0	1,6	84,8	1,3
EPN	Linéaire, 1/x	0,9995	1-200	76,4	4,7	73,8	3,9	62,9	13,2

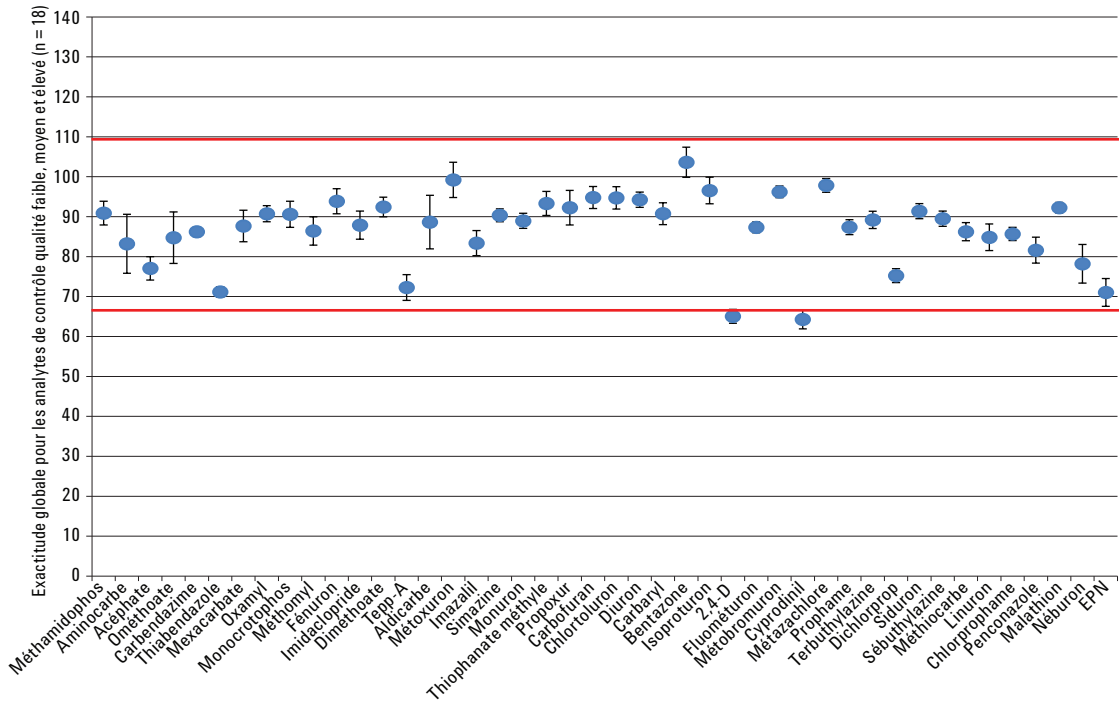


Figure 6. Résultats de quantification pour 44 pesticides représentatifs dans de l'avocat avec le protocole Agilent Bond Elut EMR—Lipid. Les données d'exactitude et de précision ont été calculées sur la base de 18 répliqués à trois concentrations différentes.

Conclusions

Une méthode rapide, fiable et robuste faisant appel à l'extraction QuEChERS AOAC suivie d'un traitement par dSPE Agilent Bond Elut EMR—Lipid a été développée et validée pour l'analyse de 44 pesticides présents dans l'avocat et analysables par LC. L'effet-matrice a été soigneusement évalué et comparé au traitement traditionnel par dSPE C18/PSA ou l'adsorbant à base de zirconium. Les résultats montrent qu'EMR—Lipid permet d'obtenir un meilleur traitement de la matrice que la dSPE C18/PSA ou l'adsorbant à base de zirconium en termes de poids et d'effet-matrice. Le rendement des analytes et la précision des trois techniques de traitement ont été comparés de manière approfondie. Le traitement par EMR—Lipid permet d'obtenir un rendement des analytes comparable à celui de la dSPE C18/PSA avec infiniment moins d'interférences co-extraites. Le traitement par EMR—Lipid et par kit dSPE Lipides a permis d'obtenir un bien meilleur rendement que l'adsorbant à base de zirconium en raison d'interactions non sélectives de celui-ci avec l'analyte. Les données indiquent qu'EMR—Lipid élimine la plus grande partie de la matrice, et en particulier les lipides, sans affecter de manière significative le rendement des analytes.

Ce travail montre la propreté supérieure que l'on peut obtenir avec EMR—Lipid comme adsorbant de dSPE dans un protocole QuEChERS. La sélectivité élevée de l'adsorbant pour les lipides le rend idéal pour l'analyse d'échantillons de matrices grasses quelles que soient la teneur en lipides et la liste d'analytes cibles. EMR—Lipid permet d'avoir une récupération élevée, une grande précision, une meilleure élimination de la matrice et une facilité d'utilisation pour la quantification de pesticides dans l'avocat. Les études à venir continueront à porter sur l'analyse multi-résidus dans des échantillons complexes à haute teneur en lipides.

Références

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.; Schriner, 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 novembre 2013*; Commission européenne, Direction générale pour la santé et la protection des consommateurs, Bruxelles, Belgique.

Pour plus d'informations

Ces données représentent des résultats types. Pour plus d'informations sur nos produits et services, consultez notre site Internet sur www.agilent.com/chem.

www.agilent.com/chem

Agilent décline toute responsabilité en cas d'erreurs dans le présent document, ainsi qu'en cas de dommages fortuits ou consécutifs à la fourniture, aux performances ou à l'utilisation de ce matériel.

Les informations, descriptions et spécifications de cette publication peuvent être modifiées sans préavis.

© Agilent Technologies, Inc., 2015
Imprimé aux USA, le 4 août 2015
5991-6098FR



Agilent Technologies