

# Analisi multiresiduale di pesticidi nell'avocado con Agilent Bond Elut EMR—Lipid tramite LC/MS/MS

## Nota applicativa

Analisi alimentare e agricoltura

### Autori

Limian Zhao e Derick Lucas  
Agilent Technologies, Inc.

### Abstract

Agilent Bond Elut QuEChERS EMR—Lipid (Enhanced Matrix Removal-Lipid = rimozione più efficiente dei lipidi dalla matrice) rappresenta l'ultima generazione di prodotti per la preparazione del campione e viene usato in un apposito formato per l'estrazione in fase solida dispersa (dSPE) per una rimozione dalla matrice estremamente selettiva, evitando ripercussioni sul recupero degli analiti, in particolare nel caso di campioni ad alto contenuto di grassi. Questo studio dimostra l'applicazione di questo nuovo prodotto per l'analisi di 44 pesticidi multiclasse nell'avocado tramite LC/MS/MS. La procedura comprende un'estrazione QuEChERS con metodo AOAC seguita dall'uso di dSPE EMR—Lipid e sali di purificazione EMR—Lipid, offrendo una purificazione del campione rapida ed efficace. La purificazione della matrice è stata valutata determinando la quantità di coestrattivi non volatili da un estratto di avocado dopo differenti purificazioni dSPE, e valutando gli effetti matrice sulla cromatografia per gli analiti target. Rispetto ad altri prodotti di purificazione dalla matrice, dSPE EMR—Lipid offre una purificazione dalla matrice molto più efficiente. Questo metodo ottimizzato assicura un'accuratezza e una precisione eccellenti per tutti i 44 pesticidi nell'avocado cromatografabili e analizzati tramite LC/MS/MS. La dSPE EMR—Lipid è adatta al protocollo QuEChERS, consentendo una preparazione del campione rapida, affidabile ed efficace per l'analisi dei residui di pesticidi in campioni di avocado ad alto contenuto di grassi.



**Agilent Technologies**

## Introduzione

Per molti laboratori che usano il metodo QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe), l'analisi dei residui di pesticidi nei prodotti alimentari è un'operazione di routine [1,2]. Esso permette di analizzare centinaia di pesticidi a basse concentrazioni con una singola estrazione. Sebbene il metodo abbia funzionato bene per vari tipi di frutta e verdura, i cibi ad alto contenuto di grassi come l'avocado, le noci e i cibi di origine animale presentano nuove sfide [3,4]. Riuscire a superarle rappresenta la massima priorità per i laboratori che devono rispettare i rigidi criteri di validazione richiesti dalle agenzie governative per assicurare che i cibi siano sicuri per il consumo.

L'analisi può far uso di una combinazione di LC e GC per adattarsi a pesticidi volatili, semivolatili e non volatili associati a svariati metodi multi-classe, multiresiduo [4]. Sebbene molti pesticidi siano adatti sia alla tecnica LC che GC, molti altri non lo sono. Ogni tecnica cromatografica presenta specifici vantaggi e svantaggi in termini di quantificazione degli analiti ed effetti avversi degli interferenti della matrice. La rimozione di questi composti è essenziale per una quantificazione accurata in complesse matrici alimentari e necessita di un trattamento con adsorbenti come C18, PSA e GCB [5]. Sono disponibili in commercio altri materiali contenenti zirconia, che generalmente migliorano la rimozione dei lipidi rispetto ai tipici adsorbenti usati per queste matrici. Tuttavia, essi non mirano a tutte le classi lipidiche e possono trattenere gli analiti di interesse [6,7]. I campioni con un alto contenuto lipidico possono richiedere anche una purificazione per mezzo di cartucce SPE [7,8,9] o la cromatografia a permeazione di gel (GPC) [10], allungando i tempi e aumentando i costi per un'analisi di routine.

Agilent Bond Elut EMR—Lipid è un nuovo materiale adsorbente che rimuove selettivamente le principali classi di lipidi dalla matrice del campione senza perdita di analiti. La rimozione delle interferenze lipidiche da matrici complesse riveste una particolare importanza in tecniche come QuEChERS e precipitazione delle proteine, perché questi metodi coestraggono grandi quantità di matrice assieme agli analiti target. Questo studio analizza la preparazione del campione per l'analisi di 44 pesticidi rappresentativi, compatibili con la LC, nell'avocado usando un'estrazione QuEChERS con metodo AOAC seguita da purificazione dSPE EMR—Lipid. I pesticidi rappresentano 12 differenti classi chimiche per stabilire la verifica per gli analiti non inclusi in questa nota applicativa. La Tabella 1 elenca i pesticidi analizzati e le classi di appartenenza. Questa nota applicativa dimostra l'eccezionale purificazione offerta da EMR—Lipid per campioni lipidici complessi, come l'avocado, e il livello elevato di recupero e precisione per 44 residui di pesticidi multiclasse a tre diversi livelli di concentrazione.

Tabella 1. Pesticidi adatti alla LC usati in questo studio e relative classi chimiche.

Rappresentante	Classe chimica	Gruppo di pesticidi
Metamidofos	Organofosfati	Insetticida
Acefato	Organofosfati	Insetticida
Ometoato	Organofosfati	Insetticida
Dimetoato	Organofosfati	Insetticida
Malatione	Organofosfati	Insetticida
EPN	Organofosfati	Insetticida
Tepp-A	Organofosfati	Insetticida
Monocrotofo	Organofosfati	Insetticida
Mexacarbato	Carbammato	Insetticida
Carbaril	Carbammato	Insetticida
Propoxur	Carbammato	Insetticida
Carbofuran	Carbammato	Insetticida
Metiocarb	Carbammato	Insetticida
Clorprofam	Carbammato	Insetticida
Propham	Carbammato	Insetticida
Aminocarb	Carbammato	Insetticida
Oxamyl	Carbammato	Insetticida
Methomyl	Carbammato	Insetticida
Aldicarb	Carbammato	Insetticida
Terbutilazina	Triazina	Algicida
Simazina	Triazina	Erbicida
Sebutilazina	Triazina	Erbicida
Monuron	Urea	Erbicida
Clortoluron	Urea	Erbicida
Diuron	Urea	Erbicida
Fluometuron	Urea	Erbicida
Isoproturon	Urea	Erbicida
Metobromuron	Urea	Erbicida
Siduron	Urea	Erbicida
Linuron	Urea	Erbicida
Neburon	Urea	Erbicida
Fenuron	Urea	Erbicida
Metoxuron	Urea	Erbicida
Carbendazim	Benzimidazolo	Fungicida
Tiabendazolo	Benzimidazolo	Fungicida
Tiofanato metile	Benzimidazolo	Fungicida
Ciprodinil	Anilino pirimidine	Fungicida
Imazalil	Imidazolo	Fungicida
Penconazolo	Triazolo	Fungicida
Imidacloprid	Neonicotinoidi	Insetticida
Metazaclor	Cloracetanilide	Erbicida
Acido 2,4-D	Acido clorofenossiacetico	Erbicida
Diclorprop	Acido clorofenossiacetico	Erbicida
Bentazone	Non classificato	Erbicida

## Risultati sperimentali

Tutti i reagenti e i solventi erano di grado HPLC o analitico. Acetonitrile (ACN) e metanolo sono stati acquistati da Honeywell (Muskegon, MI, USA). L'acido acetico (AA) di grado reagente è stato acquistato da Sigma-Aldrich, Corp. (St Louis, MO, USA). Gli standard dei pesticidi e gli standard interni sono stati acquistati da Sigma-Aldrich, Corp. e AccuStandard (New Haven, CT, USA).

## Soluzioni e standard

L'acetonitrile all'1% di AA è stato preparato aggiungendo 10 mL di acido acetico a 990 mL di acetonitrile. Le soluzioni stock di standard e standard interni (IS) sono state preparate per alcuni dei pesticidi in acetonitrile o metanolo a 2,0 mg/mL. I restanti standard dei pesticidi erano soluzioni standard miscelate presenti in commercio che sono state usate direttamente per preparare la soluzione standard di lavoro. È stata preparata una soluzione di lavoro combinata in acetonitrile a 25 µg/mL. È stata preparata una soluzione di lavoro con volume frazionato da 25 µg/mL di TPP IS in acetonitrile.

## Apparecchiature

Le apparecchiature e i materiali usati per la preparazione del campione comprendevano:

- Geno/Grinder (SPEX, Metuchen, NJ, USA)
- Centrifuga Centra CL3R (Thermo IEC, MA, USA)
- Microcentrifuga Eppendorf (Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA)
- Vortexer e vortexer multitubo (VWR, Radnor, PA, USA)
- Dosatore per bottiglia (VWR, So. Plainfield, NJ, USA)
- Pipette e ripetitore Eppendorf
- Tubi Agilent Bond Elut EMR—Lipid (codice 5982-1010) e Agilent Bond Elut Final Polish per tubi EMR—Lipid (codice 5982-0101)

## Strumentazione

Le analisi sono state effettuate su un Sistema LC Agilent 1290 Infinity costituito da:

- Pompa quaternaria Agilent 1290 Infinity (G4204A)
- Autocampionatore ad alte prestazioni Agilent 1290 Infinity (G4226A) dotato di Termostato Agilent 1290 Infinity (G1330B) e comparto colonna termostato Agilent 1290 Infinity (G1316C)

Il sistema UHPLC è stato abbinato a un sistema LC/MS Agilent 6490 a triplo quadrupolo dotato di sorgente di ionizzazione elettrospray Agilent Jet Stream e tecnologia iFunnel. Per l'acquisizione dei dati e relativa analisi è stato usato il software Agilent MassHunter Workstation.

## Condizioni della strumentazione

### Condizioni dell'HPLC

Colonna:	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2,1 × 150 mm, 1,8 µm (codice 959759-902), Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 UHPLC Guard, 5 × 2,1 mm, 1,8 µm (codice 821725-902)	
Fase mobile:	A) 0,1% di FA in acqua B) 0,1% di FA in acetonitrile	
Flusso:	0,3 mL/min	
Temp. colonna:	35 °C	
Temp. autocampionatore:	4 °C	
Volume di iniezione:	3 µL	
Lavaggio dell'ago:	1:1:1 ACN:MeOH:IPA:H <sub>2</sub> O con 0,2% di FA	
Gradiente:	Tempo (min)	%B
	0	10
	15	95
	15,01	100
Tempo finale:	16 min	
Posttime (Tempo post-analisi):	3 min	

### Condizioni MS

Modalità positiva/negativa		
Temp. gas:	120 °C	
Flusso di gas:	14 L/min	
Nebulizzatore:	40 psi	
Riscaldatore sheath gas:	400 °C	
Flusso dello sheath gas:	12 L/min	
Capillari:	3.000 V	
Parametri iFunnel:	Positivo	Negativo
RF alta pressione:	100 V	90 V
RF bassa pressione:	70 V	60 V

Le condizioni MRM relative agli analiti sono elencate nella Tabella 2 e la Figura 1 mostra un cromatogramma tipico.

Tabella 2. Parametri MRM per LC a triplo quadrupolo e tempi di ritenzione per i pesticidi usati in questo studio.

<b>Analita</b>	<b>RT (min)</b>	<b>Delta RT (min)</b>	<b>Polarità</b>	<b>Ione precursore (m/z)</b>	<b>Ione prodotto (m/z)</b>	<b>CE (v)</b>
Metamidofos	1,83	2	Positiva	142	94,1	9
Aminocarb	2,03	2	Positiva	209,1	137,2	24
Acefato	2,13	2	Positiva	184	143	9
Ometoato	2,54	2	Positiva	214	124,9	17
Carbendazim	3,40	2	Positiva	192,1	132	33
Tiabendazolo	3,89	2	Positiva	202	131,1	41
Mexacarbato	3,99	2	Positiva	223,1	151,1	20
Oxamyl	4,24	2	Positiva	237,1	72	12
Monocrotofo	4,46	2	Positiva	224,1	127	10
Methomyl	4,64	2	Positiva	163,1	106	4
Fenuron	6,17	2	Positiva	165,1	72	20
Imidacloprid	6,43	2	Positiva	256,1	209,1	13
Dimetoato	6,63	2	Positiva	230	199	5
TEPP-A	7,69	2	Positiva	291,1	179	20
Aldicarb	7,87	2	Positiva	213,1	89,1	15
Metoxuron	7,89	2	Positiva	229	46,1	12
Imazalil	7,99	2	Positiva	297,1	158,9	25
Simazina	8,31	2	Positiva	202,1	132	22
Monuron	8,37	2	Positiva	199,1	46,1	16
Tiofanato metile	8,95	2	Positiva	343,1	151,2	4
Propoxur	9,15	2	Positiva	210,1	111,1	9
Carbofuran	9,30	2	Positiva	222,1	123,1	30
Clortoluron	9,54	2	Positiva	213,1	72	20
Diuron	9,65	2	Positiva	233	72,1	20
Carbaril	9,73	2	Positiva	202,1	145,1	9
Bentazone	9,73	2	Negativa	239	132	15
Isoproturon	9,96	2	Positiva	207,1	46,1	20
Acido 2,3-D	10,06	2	Negativa	219	161	15
Fluometuron	10,10	2	Positiva	233,1	72	16
Metobromuron	10,48	2	Positiva	259	148	10
Ciprodinil	10,53	2	Positiva	226,1	93,1	41
Metazaclor	10,71	2	Positiva	278,1	134,2	15
Propham	10,80	2	Positiva	180,1	138,1	4
Terbutilazina	10,98	2	Positiva	230,1	174,1	15
Diclorprop	10,99	2	Negativa	233	161	10
Siduron	11,26	2	Positiva	233,2	137,1	12
Sebutilazina	11,47	2	Positiva	230,1	174,1	16
Metiocarb	11,47	2	Positiva	226,1	169	4
Linuron	11,69	2	Positiva	249	160,1	20
Clorprofam	12,53	2	Positiva	214,1	172	5
Penconazolo	12,76	2	Positiva	284,1	70	17
Malatione	12,85	2	Positiva	331	126,9	5
Neburon	13,29	2	Positiva	275,1	57,1	20
TPP (IS)	13,99	2	Positiva	327,1	51,1	80
EPN	14,96	2	Positiva	324,1	296,1	8

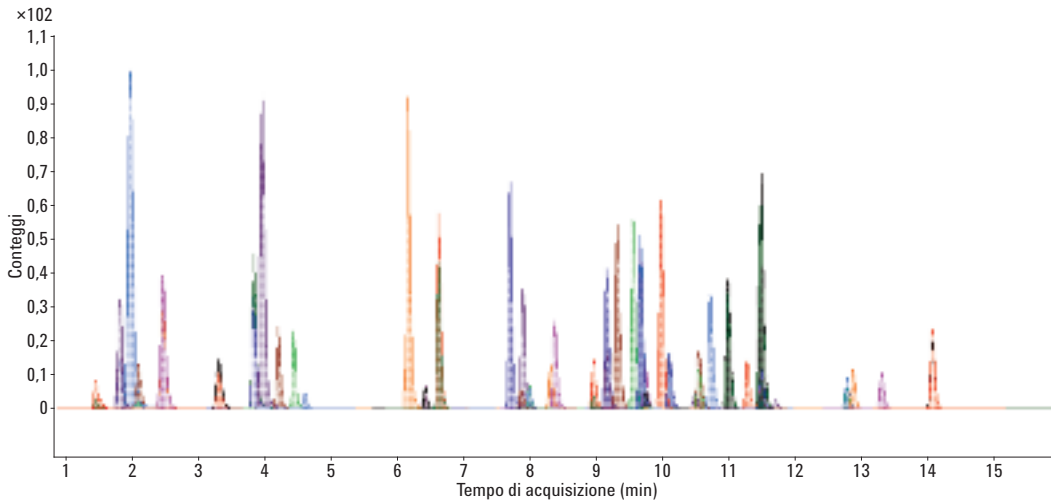


Figura 1. Un tipico cromatogramma LC/MS/MS (MRM) di un campione di avocado arricchito con 50 ng/g di pesticidi ed estratto con QuEChERS seguito da purificazione con Agilent Bond Elut EMR—Lipid.

### Preparazione del campione

La procedura definitiva di preparazione del campione è stata ottimizzata usando un flusso di lavoro QuEChERS con i passaggi seguenti:

1. Pesare 15 g ( $\pm 0,1$  g) di avocado omogeneizzato in tubi per centrifuga da 50 mL.
2. Aggiungere 15 mL di acetonitrile (1% AA), e agitare in vortex per 10 s.
3. Aggiungere un pacchetto di sali per estrazione AOAC.
4. Miscelare in un agitatore meccanico per 2 min.
5. Centrifugare a 5.000 giri/min per 5 min.
6. Aggiungere 5 mL di acqua a un tubo dSPE EMR—Lipid da 15 mL.
7. Trasferire 5 mL di soprannatante al tubo dSPE EMR—Lipid.
8. Agitare in vortex immediatamente per disperdere il campione, quindi per altri 60 s in vortexer multitubo.
9. Centrifugare a 5.000 giri/min per 3 min.
10. Trasferire 5 mL di soprannatante in un tubo di purificazione EMR—Lipid da 15 mL contenente 2 g di sali (1:4, NaCl:MgSO<sub>4</sub>) e agitare in vortex per 1 min.
11. Centrifugare a 5.000 giri/min per 3 min.
12. Combinare 200  $\mu$ L di acetonitrile dello strato superiore e 800  $\mu$ L di acqua in un vial di campione da 2 mL e agitare in vortex.

Il campione è ora pronto per l'analisi LC/MS/MS. Il percorso completo del flusso di preparazione del campione viene mostrato nella Figura 2.

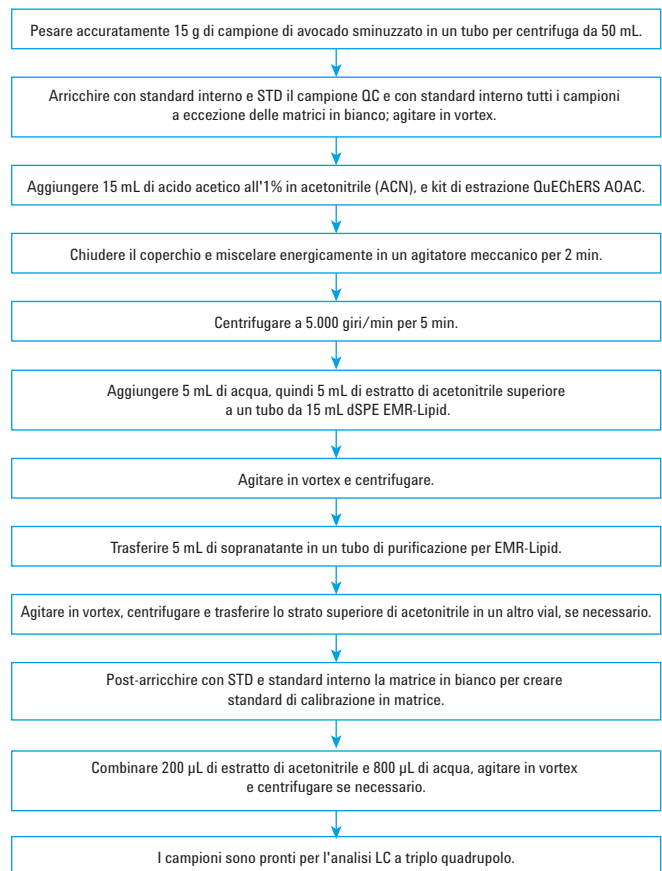


Figura 2. Procedura di preparazione del campione con Agilent Bond Elut EMR—Lipid per l'analisi dei pesticidi nell'avocado.

## Standard di calibrazione e campioni di controllo qualità

I campioni QC precedentemente arricchiti sono stati aggiunti con soluzioni standard di lavoro appropriatamente combinate, dopo la fase 1, per sei replicati. I campioni QC corrispondono a 5, 50 e 200 ng/g in avocado. Anche la soluzione IS è stata aggiunta in tutti i campioni eccetto la matrice in bianco, corrispondendo a 100 ng/g di TPP in avocado.

Gli standard di calibrazione in matrice sono stati preparati con standard e soluzioni di lavoro di IS. Le concentrazioni nei campioni di matrice in bianco dopo la fase 10 corrispondono a 1, 5, 10, 50, 100, 150 e 200 ng/g e a 100 ng/g IS (TPP). Abbiamo diluito l'estratto di campione finale con acqua per rendere il campione adatto al gradiente LC e mantenere l'integrità della forma dei picchi per gli analiti che eluiscono per primi. Il sistema LC/MS/MS ha offerto una sensibilità eccellente usando la diluizione finale descritta e ha soddisfatto i limiti di rivelazione richiesti. Se la sensibilità dello strumento non fosse in grado di soddisfare le esigenze legate alla diluizione del campione, si deve prendere in considerazione una fase di concentrazione del campione (evaporazione e ricostituzione), sebbene non sia l'ideale.

## Determinazione della quantità di interferenti estratti

La quantità di interferenti è stata determinata con misure gravimetriche [2] per tre differenti tecniche di purificazione: C18/PSA, adsorbente in zirconia ed EMR—Lipid. I campioni sono stati preparati come segue per raccogliere i dati in duplicato.

1. Scaldare i tubi di vetro per circa 1 h a 110 °C per eliminare l'umidità.
2. Raffreddare i tubi a temperatura ambiente.
3. Prepesare i tubi di analisi.
4. Trasferire accuratamente 1 mL di estratto iniziale di matrice in bianco (no purificazione) e le matrici in bianco con le differenti purificazioni, ognuna in duplicato.
5. Asciugare tutti i campioni con una CentriVap a 50 °C per 1 h, o fino a quando sono asciutti.
6. Scaldare i tubi per circa 1 h a 110 °C per eliminare l'umidità.
7. Raffreddare i tubi a temperatura ambiente.
8. Ripesare i tubi.

La differenza di peso tra la fase 8 e la fase 3 è la quantità di matrice estratta del campione. La quantità di matrice estratta rimossa dalla purificazione era la differenza media di peso degli interferenti della matrice prima e dopo la purificazione.

## Valutazione dell'effetto matrice

Abbiamo inoltre confrontato la risposta dell'analita (area del picco) tra gli estratti di avocado arricchiti post-estrazione e le soluzioni standard equivalenti. Gli estratti di avocado arricchiti post-estrazione sono stati fatti aggiungendo la soluzione pesticida standard all'estratto della matrice in bianco di avocado. La differenza nelle risposte (area del picco) è direttamente correlata all'effetto matrice.

## Confronto dei metodi e validazione

Al momento, il metodo QuEChERS raccomanda la dSPE specifica per grassi, che contiene PSA, EC-C18 e MgSO<sub>4</sub>, per la purificazione in campioni ad alto contenuto di grassi come l'avocado. Inoltre, l'adsorbente in zirconia viene ritenuto più efficiente nella rimozione dei lipidi rispetto alla dSPE C18/PSA. Il nostro confronto dei metodi si è concentrato sulla purificazione EMR—Lipid e sulle altre tecniche di purificazione. I dati sul recupero hanno confrontato campioni arricchiti pre e post-estrazione corrispondenti a 50 ng/g in avocado. L'estrazione è stata effettuata con la procedura QuEChERS con metodo AOAC, seguita da dSPE con ciascun protocollo di purificazione; EMR—Lipid, dSPE C18/PSA e adsorbente in zirconia. Per la purificazione EMR—Lipid è stato seguito il protocollo mostrato nella Figura 2. La dSPE EMR—Lipid, a differenza dei tradizionali adsorbenti dSPE, necessita di una quantità extra di acqua per attivare il materiale, migliorando drasticamente le prestazioni di rimozione dalla matrice. Il surmatante da EMR—Lipid viene trasferito ai sali di purificazione EMR—Lipid per la separazione di fase di acetonitrile/acqua e per rimuovere i solidi disciolti. Per la purificazione QuEChERS con C18/PSA e zirconia, 1 mL di estratto grezzo di acetonitrile è stato trasferito in un tubo da 2 mL per dSPE specifica per grassi (codice 5982-5122), o in un vial da 2 mL contenente 100 mg di adsorbente in zirconia. I campioni sono poi stati agitati in vortex per un minuto e centrifugati a 13.000 giri min per tre minuti in microcentrifuga. È stata poi trasferita un'aliquota del volume di 200 µL di soprannatante in un vial di campione contenente 800 µL di acqua. In questa fase è stato generato un precipitato con entrambi i protocolli di purificazione dSPE C18/PSA e adsorbente in zirconia: i campioni devono essere filtrati con un vial per filtrazione in cellulosa rigenerata da 0,45 µm prima dell'analisi LC/MS/MS. Si ritiene che i precipitanti siano causati da lipidi non rimossi dalle purificazioni con dSPE grassa e zirconia. Ciò non è successo nel caso della purificazione dell'estratto grezzo con EMR—Lipid che, alla diluizione, ha dato una soluzione limpida senza precipitato. Non è stata pertanto necessaria la filtrazione. Per preparare gli standard di calibrazione in matrice è importante fare i calibratori arricchiti nelle corrispondenti matrici in bianco dopo l'estrazione. I recuperi sono stati calcolati con il rapporto delle aree del picco dell'analita dai campioni arricchiti prima e dopo l'estrazione.

Il metodo EMR—Lipid è stato validato in avocado a 5, 50 e 200 ng/g in sei replicati usando una curva di calibrazione a 7 punti in matrice. Per la quantificazione è stato usato uno standard interno e sono stati riferiti i dati di accuratezza e precisione.

## Risultati e discussione

### Quantità di coestrattivi

I risultati relativi alla determinazione del peso della matrice interferente sono mostrati nella Tabella 3 e dimostrano chiaramente che la dSPE EMR—Lipid offre i migliori risultati in termini di efficienza nella purificazione della matrice per peso.

Tabella 3. Pesì degli interferenti di matrice da avocado con estrazione QuEChERS e diversi materiali di purificazione (n = 2).

Tecnica di purificazione	Interferenti per 1 mL di estratto finale ACN (mg)	Efficienza di rimozione della matrice per purificazione (%)
Nessuna purificazione ulteriore	14,7	–
Purificazione EMR—Lipid	4,2	71,4
Purificazione con adsorbente in zirconia	7,0	52,4
Purificazione C18/PSA	9,5	35,4

Efficienza di rimozione dei componenti della matrice (%)  

$$\frac{(\text{Quantità di interferenti senza purificazione} - \text{Quantità di interferenti con purificazione})}{\text{Quantità di interferenti della matrice senza purificazione}} \times 100$$

### Valutazione dell'effetto matrice

Abbiamo confrontato la risposta dell'analita tra matrici in bianco arricchite dopo l'estrazione e soluzioni standard per valutare gli effetti della matrice. Dato che la maggior parte dei lipidi coestratti eluisce tardi in un gradiente LC (fase inversa, % organica da bassa ad alta), gli analiti idrofobi subiscono maggiormente l'impatto della matrice del campione. Questo effetto è solitamente noto come soppressione ionica ed è correlato a una scarsa risposta dell'analita. A causa dell'inefficiente rimozione dei lipidi dalla matrice con C18/PSA e adsorbente in zirconia, abbiamo osservato una soppressione ionica della matrice significativamente maggiore nei composti a eluizione ritardata. La Figura 3 mostra tre composti come esempi di riduzione della soppressione ionica grazie alla purificazione EMR—Lipid. I tre pesticidi sono composti dai valori log P relativamente alti; clorprofam (log P 3,6), penconazolo (log P 3,7) ed EPN (log P 4,5). Quanto maggiore il valore log P, tanto più il composto sarà idrofobo. Questi pesticidi presentano fino all'80% di soppressione ionica causata dalle interferenze dovute alla matrice, in particolare dai lipidi, che non sono stati rimossi in modo efficace usando dSPE C18/PSA e adsorbente in zirconia. Come mostrato in Figura 3, EMR—Lipid non ha prodotto effetti matrice significativi per questi composti.

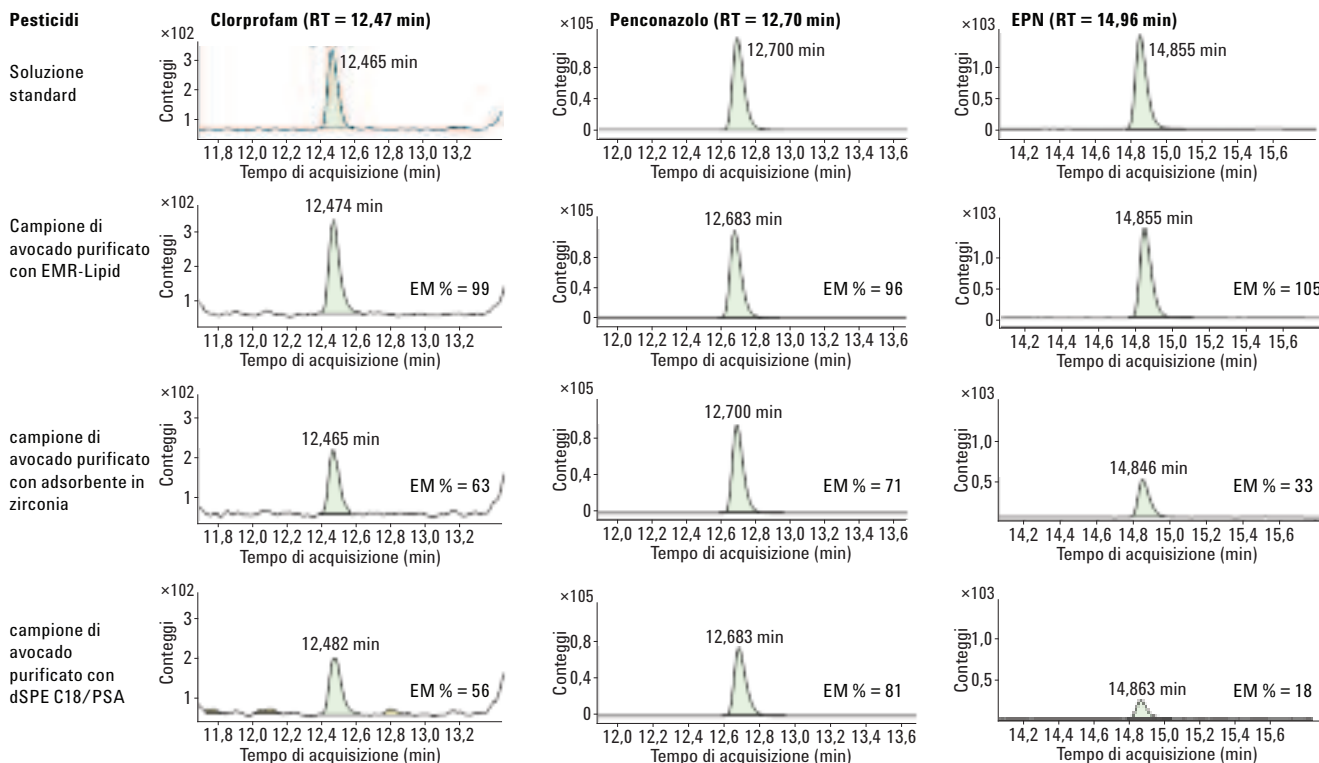


Figura 3. Confronto degli effetti matrice per gli analiti idrofobi. Le matrici sono state arricchite dopo l'estrazione a 50 ng/g con uno standard di pesticida in una matrice in bianco.

## Confronto dei metodi per il recupero degli analiti

Il metodo QuEChERS ottimizzato con dSPE EMR—Lipid è stato quindi confrontato con purificazione dSPE C18/PSA e adsorbente in zirconia. La Figura 4 mostra i risultati statistici dei confronti tra i recuperi e la Figura 5 i risultati del confronto tra gli analiti problematici selezionati.

Il protocollo EMR—Lipid ha offerto un recupero generale e una precisione eccellenti per la maggior parte dei pesticidi. Solamente due pesticidi sono ricaduti al di sotto della finestra di recupero tra il 70 e il 120 %, cioè ciprodinil (64%) e acido 2,4-D (65%), con un'RSD inferiore al 10%. Essi sono pertanto considerati accettabili sulla base delle linee guida SANCO [11], perché rispettano criteri di riproducibilità accettabili. I risultati dei recuperi per la purificazione dSPE C18/PSA erano buoni, tranne che per due composti acidi. Acido 2,4-D e diclorprop hanno avuto

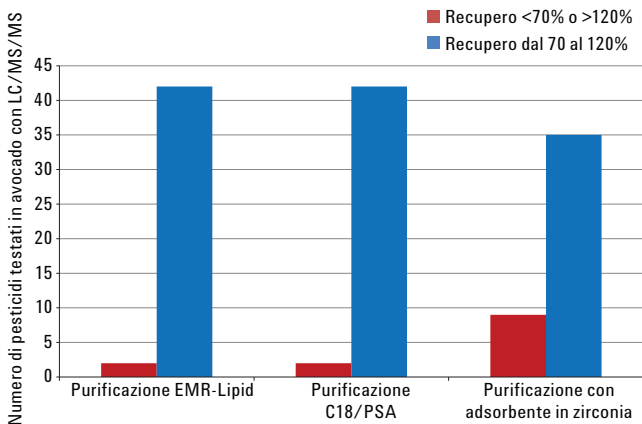


Figura 4. Risultati statistici del recupero per il confronto tra Agilent Bond Elut EMR—Lipid, dSPE C18/PSA e adsorbente in zirconia.

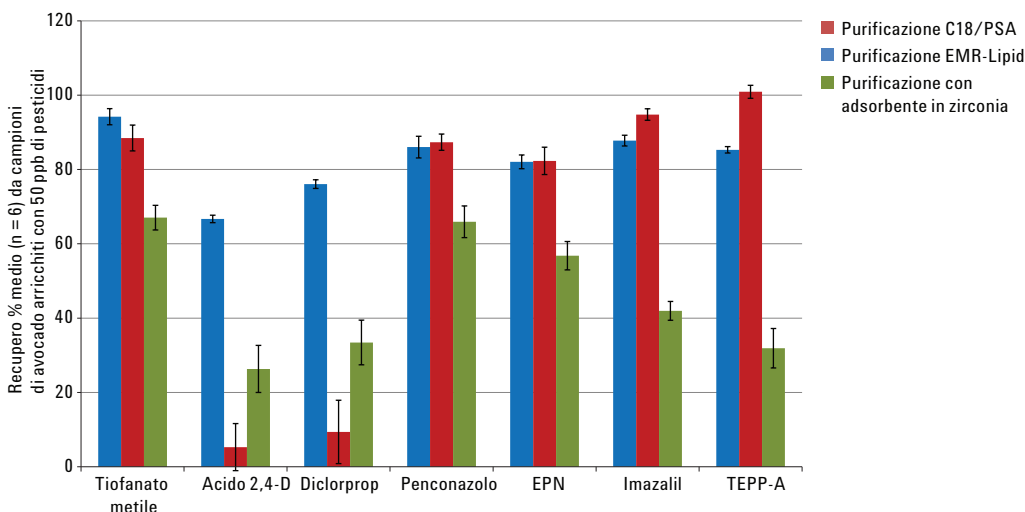


Figura 5. Risultati del confronto tra i recuperi per purificazione con Agilent Bond Elut EMR—Lipid (blu), C18/PSA (rosso) e adsorbente in zirconia (verde).

recuperi molto bassi (<10%) causati dalla PSA. I risultati dei recuperi dall'adsorbente in zirconia hanno mostrato una maggiore ritenzione dell'analita, che ha causato nove recuperi di pesticidi inferiori al 70%.

## Validazione del metodo

Il protocollo EMR—Lipid è stato validato eseguendo un lotto di quantificazione completo. La metodologia è stata descritta nella sezione relativa alla preparazione del campione. Per la quantificazione è stato usato uno standard interno (TPP); pertanto i risultati della quantificazione vengono definiti come accuratezza e precisione. Tuttavia, il recupero assoluto di IS (TPP) era superiore al 90%, pertanto i risultati di accuratezza corrispondono al recupero assoluto.

I risultati di validazione dettagliati sono elencati nella Tabella 4 e come figura riassuntiva (Figura 6) generata con le medie di accuratezza e precisione calcolate sulla base di 18 replicati totali di QC pre-aricchiti a tre livelli differenti. I risultati di accuratezza mostravano che il 95% dei 44 pesticidi ricadeva nell'intervallo tra 70 e 120%, eccetto l'acido 2,4-D e ciprodinil, che presentavano recuperi appena inferiori al 70% con una buona RSD. La riproducibilità del metodo era eccezionale, con una RSD inferiore al 10% (n = 6) per il 91% dei pesticidi a 5 ng/g, 100% a 50 ng/g e 98% a 200 ng/g. Tutti gli altri valori RSD erano ben inferiori al 20% usando il protocollo EMR—Lipid. Il limite di rivelazione strumentale (IDL) è una probabile causa che ha contribuito alla maggior variazione, per questi composti, per una RSD al di sopra del 10% al livello di concentrazione più basso aggiunto. Anche la fase di purificazione EMR—Lipid senza tampone (NaCl, MgSO<sub>4</sub>) è una potenziale causa di variazione e pertanto in un lavoro futuro verranno studiati i sali di purificazione con tampone.

Tabella 4. Risultati di validazione dal protocollo EMR—Lipid per 44 pesticidi in avocado a 5, 50, e 200 ng/g (n = 6).

Analita	Curva di calibrazione			Accuratezza e precisione del metodo					
	Adatt. regressione/peso	R <sup>2</sup>	Intervallo cal. (ng/g)	5 ng/g QCs		50 ng/g QCs		200 ng/g QCs	
				Rec. %	RSD	Rec. %	RSD	Rec. %	RSD
Metamidofos	Quadratica, 1/x	0,9993	1-200	69,1	9,5	93,8	8,4	109,8	6,0
Aminocarb	Lineare, 1/x	0,9990	1-200	74,6	8,4	88,0	2,7	87,0	2,0
Acefato	Lineare, 1/x	0,9948	1-200	55,8	12,4	88,8	2,3	86,6	4,0
Ometoato	Lineare, 1/x	0,9996	1-200	84,5	6,0	85,3	1,4	84,4	2,6
Carbendazim	Lineare, 1/x	0,9995	1-200	87,1	6,3	86,2	2,2	85,4	1,2
Tiabendazolo	Lineare, 1/x	0,9995	1-200	49,4	24,3	76,7	1,7	79,0	2,0
Mexacarbato	Lineare, 1/x	0,9993	1-200	83,6	7,8	90,4	3,3	89,0	2,1
Oxamyl	Lineare, 1/x	0,9991	1-200	81,1	7,6	96,7	2,6	94,4	3,5
Monocrotofo	Lineare, 1/x	0,9979	1-200	85,2	6,1	85,1	1,9	101,5	4,6
Methomyl	Lineare, 1/x	0,9993	1-200	77,8	8,2	88,6	3,3	92,8	4,5
Fenuron	Lineare, 1/x	0,9969	1-200	86,5	9,9	103,4	2,5	91,7	1,7
Imidacloprid	Lineare, 1/x	0,9996	1-200	81,7	5,9	94,1	2,6	87,9	2,5
Dimetoato	Lineare, 1/x	0,9993	1-200	83,3	8,0	99,2	3,1	94,8	2,5
TEPP-A	Lineare, 1/x	0,9989	1-200	50,2	6,5	88,3	1,6	78,4	3,1
Aldicarb	Lineare, 1/x	0,9989	1-200	88,6	5,6	101,2	3,5	76,2	1,9
Metoxuron	Lineare, 1/x	0,9987	1-200	102,0	5,4	105,8	2,5	89,9	2,6
Imazalil	Lineare, 1/x	0,9988	1-200	81,4	6,9	86,2	2,0	82,5	2,7
Simazina	Lineare, 1/x	0,9984	1-200	91,8	5,4	93,8	1,9	85,4	1,6
Monuron	Lineare, 1/x	0,9990	1-200	82,5	9,9	96,0	3,7	88,4	1,8
Tiofanato metile	Lineare, 1/x	0,9977	1-200	89,4	10,8	104,6	5,5	86,0	7,1
Propoxur	Lineare, 1/x	0,9993	1-200	84,7	8,1	97,6	1,4	94,5	2,2
Carbofuran	Lineare, 1/x	0,9993	1-200	88,3	8,5	98,9	5,1	97,2	2,4
Clortoluron	Lineare, 1/x	0,9990	1-200	96,3	5,0	97,9	3,1	89,9	2,0
Diuron	Lineare, 1/x	0,9995	1-200	86,6	6,7	98,7	2,8	97,5	3,5
Carbaril	Lineare, 1/x	0,9991	1-200	80,7	7,4	101,1	3,2	90,5	2,1
Bentazone	Quadratica, 1/x	0,9993	1-200	111,2	5,5	102,3	4,7	97,4	7,9
Isoproturon	Lineare, 1/x	0,9993	1-200	98,7	4,1	98,9	2,3	92,1	2,6
Acido 2,3-D	Lineare, 1/x	0,9985	1-200	64,3	7,6	65,4	5,1	65,6	2,6
Fluometuron	Lineare, 1/x	0,9975	1-200	86,2	5,7	87,8	3,9	88,0	3,0
Metobromuron	Lineare, 1/x	0,9977	1-200	96,0	6,6	100,3	4,6	92,4	4,5
Ciprodinil	Lineare, 1/x	0,9986	1-200	60,3	8,3	67,0	2,6	65,5	3,6
Metazaclor	Lineare, 1/x	0,9992	1-200	99,8	5,7	99,4	3,4	94,3	2,8
Propham	Lineare, 1/x	0,9985	1-200	85,8	9,7	89,3	3,8	87,0	3,8
Terbutilazina	Lineare, 1/x	0,9993	1-200	90,7	6,5	91,1	2,6	85,8	2,0
Diclorprop	Lineare, 1/x	0,9992	1-200	75,6	9,7	73,3	4,6	76,9	2,3
Siduron	Lineare, 1/x	0,9990	1-200	90,2	8,6	92,4	3,5	91,5	2,2
Sebutilazina	Lineare, 1/x	0,9992	1-200	95,3	4,8	89,5	2,5	83,7	2,1
Metiocarb	Lineare, 1/x	0,9984	1-200	77,6	8,8	94,7	3,2	86,3	1,9
Linuron	Lineare, 1/x	0,9984	1-200	84,7	7,4	85,2	3,6	84,6	3,6
Clorprofam	Lineare, 1/x	0,9994	5-200	91,6	10,0	84,3	9,3	81,1	3,8
Pentaconazolo	Lineare, 1/x	0,9992	1-200	83,0	6,3	81,1	2,4	80,7	1,5
Malatione	Lineare, 1/x	0,9991	1-200	76,2	7,1	100,5	2,2	100,0	1,0
Neburon	Lineare, 1/x	0,9994	1-200	66,9	6,8	83,0	1,6	84,8	1,3
EPN	Lineare, 1/x	0,9995	1-200	76,4	4,7	73,8	3,9	62,9	13,2

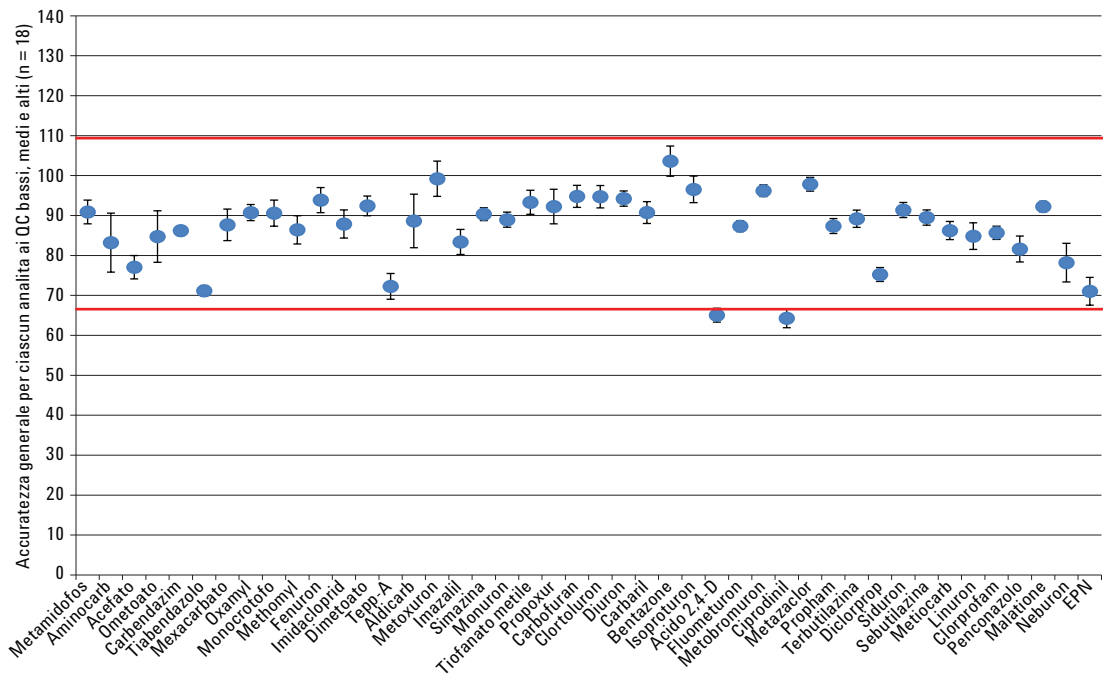


Figura 6. Risultati quantitativi per 44 pesticidi rappresentativi in avocado usando il protocollo di lavoro Agilent Bond Elut EMR—Lipid. I dati relativi ad accuratezza e precisione sono stati calcolati sulla base di 18 replicati totali a tre concentrazioni diverse.

## Conclusioni

Abbiamo sviluppato e validato un metodo rapido, affidabile ed efficace che usa un'estrazione QuEChERS con metodo AOAC seguita da purificazione con Agilent Bond Elut dSPE EMR—Lipid per l'analisi di 44 pesticidi compatibili con LC in avocado. L'effetto matrice è stato valutato con attenzione e confrontato con la purificazione tradizionale con dSPE C18/PSA e adsorbente in zirconia. I risultati dimostrano che EMR—Lipid offre una purificazione della matrice superiore a quanto offerto da dSPE C18/PSA e dall'adsorbente in zirconia sia per peso che per effetto matrice. Il recupero degli analiti e la precisione del metodo sono stati ampiamente confrontati tra le tre diverse tecniche di purificazione. La purificazione EMR—Lipid offre un recupero degli analiti confrontabile rispetto a dSPE C18/PSA, con un numero drasticamente inferiore di interferenti. Sia la purificazione EMR—Lipid che la purificazione con dSPE specifica per grassi hanno presentato un recupero molto migliore rispetto all'adsorbente in zirconia, a causa delle interazioni non selettive dell'analita con la zirconia. I dati suggeriscono che EMR—Lipid rimuove la maggior quantità di matrice, in particolare i lipidi, senza alterare in modo significativo il recupero degli analiti.

Questo lavoro dimostra l'eccezionale purificazione ottenibile usando EMR—Lipid come adsorbente dSPE in un protocollo di lavoro QuEChERS. L'alta selettività dell'adsorbente per i lipidi interferenti lo rende ideale per l'analisi dei campioni grassi, indipendentemente dal contenuto di grassi e dall'elenco di analiti target. EMR—Lipid offre un elevato recupero, precisione, eccezionale rimozione della matrice e facilità d'uso per la quantificazione dei pesticidi in avocado. Le ricerche future continueranno a concentrarsi sull'analisi multiresiduale in campioni complessi ad alto contenuto di grassi.

## Bibliografia

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*; European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, Brussels, Belgium.

## Ulteriori informazioni

Questi dati rappresentano i risultati tipici. Per ulteriori informazioni sui nostri prodotti e servizi, visitare il nostro sito web all'indirizzo [www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem).

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

Agilent non può essere ritenuta responsabile per errori contenuti nella presente pubblicazione o per danni accidentali o consequenziali derivanti dalla fornitura, dalle prestazioni o dall'utilizzo del presente materiale.

Le informazioni, descrizioni e specifiche fornite possono variare senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2015  
Stampato negli Stati Uniti  
4 agosto 2015  
5991-6098ITE



**Agilent Technologies**