

Benefícios da limpeza de EMR— Lipídios com pós-tratamento avanzado na análise de pesticidas por GC/MS/MS

Nota de aplicação

Testes de alimentos

Autor

Limian Zhao
Agilent Technologies, Inc.

Resumo

A Remoção de matrizes otimizada Agilent Bond Elut— Lipídios (EMR—Lipídios) é um produto de -preparo de amostras de próxima geração desenvolvido para a limpeza seletiva de lipídios em amostras com alto teor de gordura. O produto é implementado em um formato de extração de fase sólida dispersiva (dSPE) prático para o tratamento de extratos de fluxos de trabalho amplamente aceitos, como QuEChERS e precipitação de proteína. O protocolo de EMR é modificado após a limpeza de EMR—Lipídios, com o uso de $MgSO_4$ anidro em formato de bolsa. O $MgSO_4$ anidro é usado na separação das fases aquosa e de solvente de acetonitrila, e a fase de secagem remove completamente a água residual e qualquer resíduo solúvel em água. O tratamento de amostra avançado- causa um grande impacto em aplicações de GC, uma vez que aumenta a reprodutibilidade da análise instrumental, principalmente em analitos instáveis. Este estudo investiga o protocolo de EMR modificado para a análise de pesticidas em abacate por GC/MS/MS. O protocolo de EMR modificado aumenta a reprodutibilidade analítica instrumental, a confiabilidade e o uso a longo prazo, principalmente para pesticidas instáveis, além de manter a eficiência da remoção de matrizes complexas e a recuperação de analitos aceitável.



Agilent Technologies

Introdução

A análise de resíduos de pesticida em produtos alimentícios é uma rotina para muitos laboratórios. A adoção do método Rápido, Fácil, Barato, Efetivo, Robusto e Seguro (QuEChERS) [1,2], permite a análise de centenas de pesticidas em concentrações baixas. A metodologia funciona bem para diversas frutas e hortaliças. No entanto, alimentos com muita gordura, como o abacate, nozes e alimentos de origem animal apresentam novos desafios [3,4]. Superar esses desafios é a prioridade para laboratórios encarregados de atingir os rígidos critérios de validação exigidos pelas agências governamentais para garantir que o alimento seja seguro para o consumo.

A Remoção de matrizes otimizada Agilent Bond Elut—Lipídios (EMR—Lipídios) é um novo material sorbente que remove de forma seletiva as principais classes de lipídios da amostra sem a indesejada retenção de analitos. A nota de aplicação anterior demonstrou a limpeza excepcional que a EMR—Lipídios proporciona para amostras complexas e com alto teor de gordura, como o abacate. AEMR—Lipídios também atende aos requisitos de recuperação e precisão para resíduos de pesticida multiclasse [5]. Avanços no tratamento pós-amostra determinaram que a remoção de NaCl da etapa de polimento oferece vantagens. A presença de NaCl permite uma pequena porcentagem de água e, portanto, resíduos dissolvidos em água não matriciais estariam presentes no extrato final. A remoção completa de resíduos de água é importante para a análise confiável de GC e GC/MS.

O tratamento pós-amostra avançado incorpora $MgSO_4$ anidro para a separação de fase e a secagem da amostra, o que melhora bastante a remoção de água e resíduos -dissolvidos em água sem afetar a remoção de matrizes da limpeza de EMR—Lipídios. Esse estudo demonstra os benefícios de usar o tratamento pós-amostra avançado após a limpeza de EMR—Lipídios na análise de pesticidas em abacate por GC/MS/MS. Os quatro pesticidas instáveis complexos, captafol, fosmete, coumafós e piraclorobina, foram adicionados para avaliar o impacto de resíduos de água na análise de pesticidas instáveis.

Parte experimental

Reagentes e produtos químicos

Todos os reagentes e solventes usados apresentam grau analítico ou HPLC. A acetonitrila (ACN) e o metanol usados são da Honeywell (Muskegon, MI, EUA). O ácido acético (AA) de grau reagente usado é da Sigma-Aldrich. Os padrões de pesticida e o padrão interno foram comprados da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA).

Solução e padrões

Uma solução de AA 1% em ACN foi preparada adicionando 10 mL de ácido acético em 990 mL de ACN. As soluções de material padrão e padrão interno (IS) foram feitas em acetonitrila ou em metanol a 2,0 mg/mL. Uma solução de trabalho combinada foi preparada em ACN a 25 µg/mL. Uma solução de 25 µg/mL de solução de trabalho IS foi preparada em ACN, incluindo TPP, paration-etil d10 e ^{13}C -DDT.

Equipamentos e materiais

Equipamento e material usados para o preparo de amostras:

- Geno/Grinder (Metuchen, NJ, USA)
- Centrifuga Centra CL3R (Thermo IEC, MA, EUA)
- Microcentrifuga Eppendorf (Brinkmann Instruments, Westbury, NY, EUA)
- Vórtex e vórtex multitubos (VWR, Radnor, PA, EUA)
- Dispensador de frasco (VWR, So. Plainfield, NJ, EUA)
- Repetidor e pipetas Eppendorf
- Kit de extração AOAC Agilent Bond Elut (p/n 5982–5755)
- Agilent Bond Elut EMR—Lipídios dSPE (p/n 5982–1010) e EMR—Bolsas de polimento de $MgSO_4$ (p/n 5982–0102)

Condições do instrumento

As condições de GC e MS foram usadas em notas de aplicação anteriores [5]. A análise foi concluída em um GC Agilent 7890A equipado com um amostrador automático Agilent 7693B e um sistema GC/MS triplo quadrupolo Agilent 7000C. Foi utilizado o backflush de coluna, altamente recomendado para matrizes de amostras complexas.

Condições do GC

Parâmetro	Valor
GC:	GC Agilent 7890A
Coluna:	Agilent J&W DB-5ms Ultra Inert, 0,25 mm × 15 m, 0,25 µm (p/n 122-5512UI)
Gás de arraste:	Hélio, pressão constante
Filtro de gás:	Kit de filtro de gás de arraste para limpeza de gás, 1/8 polegada (P/N CP17974)
Liner do injetor:	Liner splitless de cone único com lâ Agilent Ultra Inert (P/N 5190-2293)
Injetor:	Injetor MMI em modo splitless a frio pulsado, inicialmente a 75 °C, retenção por 0,02 min., depois a 350 °C a 750 °C/min.
Injeção splitless pulsada:	36 psi até 0,75 min.
Fluxo de purga para split vent:	60 mL/min. a 0,75 min.
Pressão do injetor:	17 psi durante a execução e 1,0 psi durante o backflush
Forno:	60 °C por 2,57 min, depois a 150 °C a 50 °C/min, a 200 °C a 6 °C/min, a 300 °C a 16 °C/min, manter por 3 min.
Pós-corrida:	2 min. a 300 °C
Tecnologia de fluxo capilar:	UltiMetal Plus Purged Ultimate Union (p/n G3182-61581) para o backflush da coluna analítica e do injetor
Amostrador automático:	Amostrador automático Agilent 7693 e bandeja de amostras Seringa de 10 µL (p/n G4513-80220), volume de injeção de 1 µL

Condições do MSD

Parâmetro	Valor
MSD:	GC/MS Agilent 7000C Triplo Quadrupolo, inerte, com componentes eletrônicos de desempenho
Bomba de vácuo:	Desempenho turbo
Modo:	MRM
Temperatura da linha de transferência:	280 °C
Temperatura da fonte:	300 °C
Temperatura do quadrupolo:	150 °C para Q1 e Q2
Delay de solvente:	2,57 min
Resolução MS:	MS1 e MS2 = 1,2u

A tabela 1 enumera as transições MRM para os quatro pesticidas instáveis utilizados neste estudo. As transições MRM de outros pesticidas foram listadas na referência [5].

Tabela 1. Parâmetros de MRM de GC/MS/MS e tempos de retenção dos pesticidas adicionais instáveis usados nesse estudo.

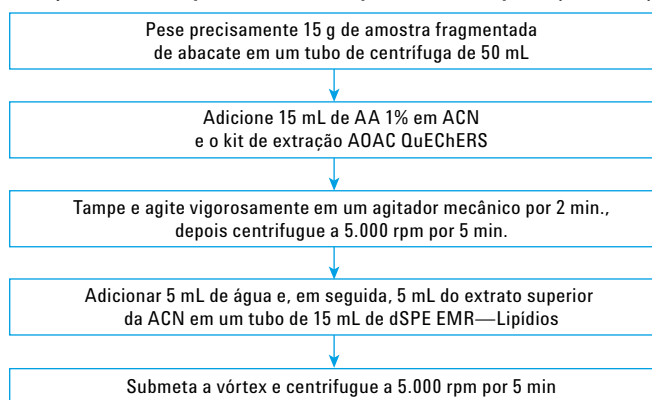
Análito instável	RT (min)	MRMs			
		Canal de quant.	CE (v)	Canal de qual.	CE (v)
Captafol	18,20	183 → 79	10	150 → 79	5
Fosmete	18,77	160 → 77,1	20	160 → 133,1	20
Coumafós	20,67	361,9 → 109	10	210 → 182	10
Piraclostrobina	22,03	132 → 77,1	20	164 → 132	15

Preparo de amostras

As modificações somente se aplicam à etapa de polimento após a limpeza de EMR—Lipídios. Não há mudanças na etapa de extração QuEChERS e na etapa de limpeza de EMR—Lipídios. Após a limpeza de EMR—Lipídios, a camada de ACN foi separada em fases da fase aquosa e foi seca com $MgSO_4$ anidro. A Figura 1 mostra o diagrama do protocolo. Há dois pontos que devem ser enfatizados no procedimento modificado após a limpeza de EMR—Lipídios:

- Em primeiro lugar, adicionar $MgSO_4$ à amostra minimiza o efeito exotérmico do $MgSO_4$ e da água, além de reduzir o acúmulo de sal.
- Em segundo lugar, secar os tubos que foram pesados previamente em tubos de 2 mL usando 300 mg de $MgSO_4$ sal anidro (de uma bolsa de EMR—Polimento) para 1 mL de extrato de ACN após a Limpeza EMR—Lipídios.

Extração QuEChERS e procedimento de limpeza de EMR—Lipídios (inalterado)



Pós-tratamento de amostra avançado (modificado)

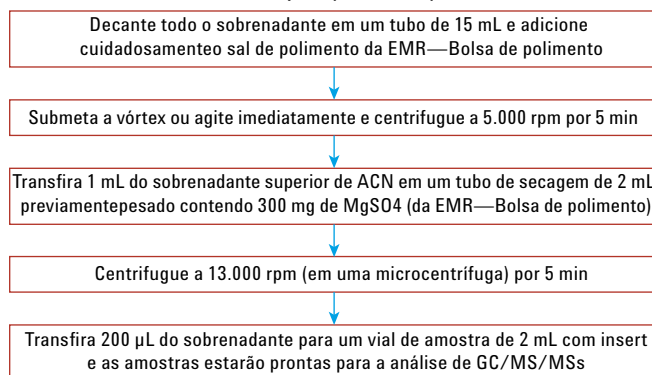


Figura 1. Fluxo de trabalho de preparo de amostras mostrando o protocolo recomendado para a análise de pesticidas em abacate por GC/MS/MS, usando extração de QuEChERS inalterada e as etapas da limpeza de EMR—Lipídios seguida pelo procedimento de pós-tratamento avançado de amostra.

Impacto da matriz de amostras no desempenho do sistema de GC/MS/MS

Para medir diretamente o impacto da matriz de amostras no desempenho do sistema do instrumento de GC/MS/MS, uma amostra em branco de matriz de abacate foi preparada após a etapa de polimento original e o tratamento de pós-amostra avançado foi feito após a limpeza EMR—Lipídios. Foram adicionados padrões de pesticida a 50 ppb à matriz em branco para determinar efeitos de matriz no desempenho do sistema GC/MS/MS.

Compostos instáveis foram investigados em relação a respostas de analito (área do pico), formato do pico e reprodutibilidade após várias injeções.

A sequência de injeção consistiu na injeção de quatro amostras de matrizes em branco seguida de uma amostra pós-adicionada. Esse padrão de injeção foi repetido até 100 injeções, portanto, 80 injeções de amostras de matriz em branco e 20 injeções de amostra pós-adicionadas foram executadas na sequência de testes. O liner foi substituído e a cabeça da coluna foi cortada entre as sequências usando o polimento original ou o tratamento pós-amostra avançado. Uma vez que tanto o liner UI de cone único com lâ quanto o liner UI com reentrâncias foram usados na análise de amostras de matrizes complexas, eles foram avaliados após 100 injeções de amostras de abacate preparadas usando o tratamento de pós-amostra avançado.

Eficiência da remoção de matrizes e recuperação de analitos

A eficiência da remoção de matrizes foi confirmada ao executar a matriz em branco de abacate por GC/MS no modo de varredura completa e comparar todo o perfil cromatográfico usando o cálculo de eficiência, como descrito anteriormente [5]. A recuperação de analitos foi avaliada comparando a área do pico pré e pós-adicionado de cada analito a 50 ppb.

Resultados e discussão

Respostas do analito mais altas e melhor formato do pico

O pós-tratamento avançado após a limpeza de EMR—Lipídios remove a água residual e os resíduos dissolvidos em água. A Figura 2 mostra a comparação cromatográfica entre a resposta do composto instável e o formato do pico em GC/MS/MS

usando o pós-tratamento avançado em relação à etapa de polimento original. As respostas dos analitos aumentaram mais de três vezes, principalmente para a piraclostrobina e o triclorfon, que apresentaram aumento de 10 vezes. A cromatografia também foi aprimorada, apresentando uma área do pico mais simétrica e com menos cauda, o que facilitou o processamento de dados. Essas melhorias indicaram que esses compostos instáveis passaram pela trajetória de fluxo de GC sem grandes interações na superfície da trajetória de fluxo.

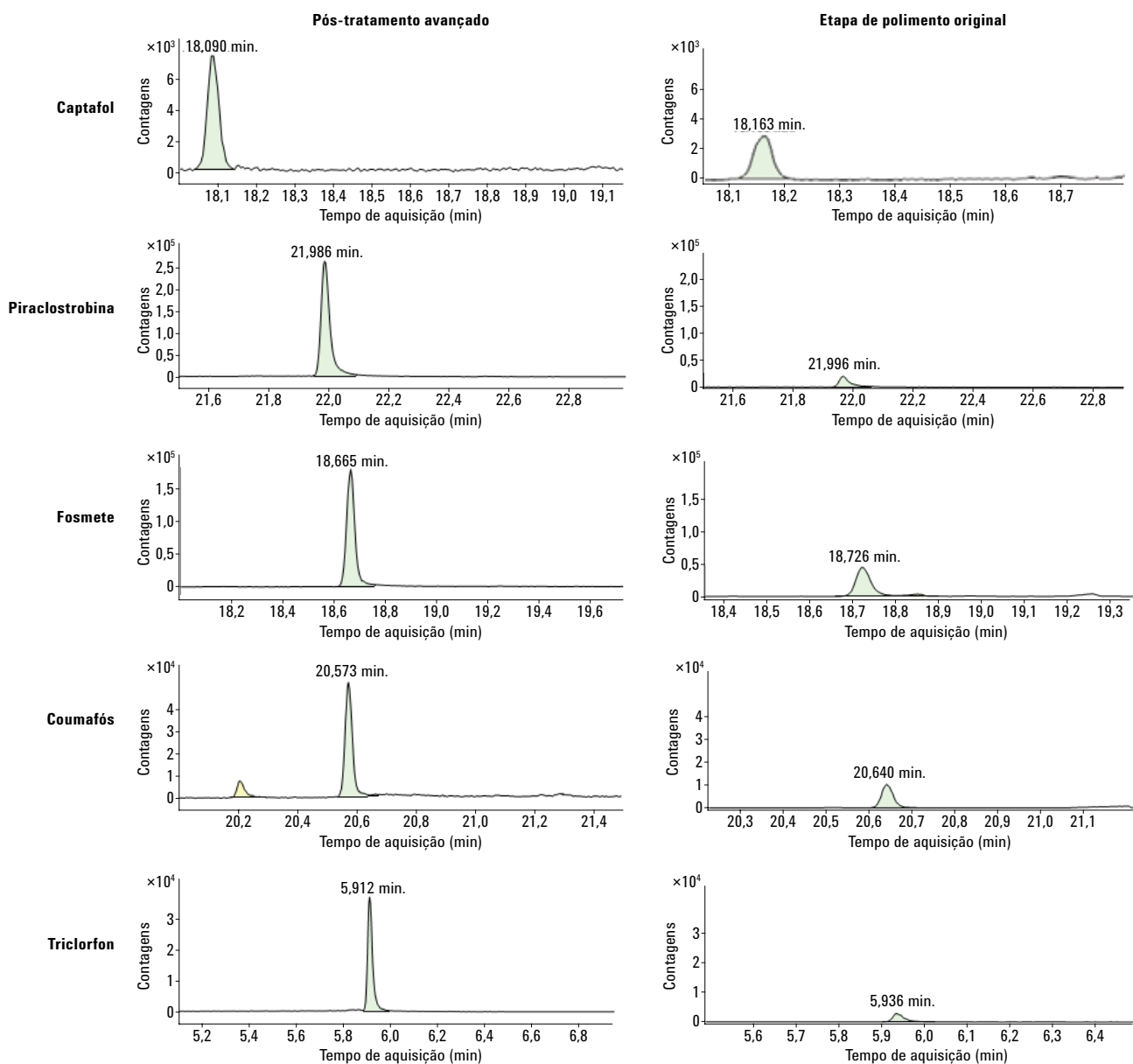


Figura 2. Comparação cromatográfica para respostas de compostos instáveis e formato do pico no GC/MS/MS usando o pós-tratamento avançado e a etapa de polimento original após a limpeza de EMR—Lipídios.

Reprodutibilidade do sistema aprimorada

A reprodutibilidade do método é possivelmente o aspecto mais importante da análise, uma vez que afeta diretamente a confiabilidade de resultados de quantificação. Como a matriz se acumula na trajetória de fluxo após várias injeções, as respostas do analito podem variar, principalmente para compostos instáveis. Essas respostas inconsistentes tornam a quantificação difícil e duvidosa. Nossos resultados anteriores demonstraram melhorias significativas na reprodutibilidade do sistema GC/MS/MS após várias injeções de amostras complexas preparadas usando a limpeza de EMR—Lipídios [5]. Apesar dessas melhorias, alguns compostos instáveis ainda demonstraram variabilidade após várias injeções. Essa variabilidade é principalmente causada por quantidades em nível de traços de resíduos de água que ficam no extrato final da amostra. O pós-tratamento avançado após a limpeza de EMR—Lipídios, a partição do sal $MgSO_4$ e as etapas de secagem foram implementadas para eliminar o resíduo de água e os resíduos sólidos dissolvidos em água do extrato final da amostra, melhorando a reprodutibilidade do sistema GC/MS/MS.

Na Figura 3, a piraclostrobina foi usada como exemplo para mostrar a maior reprodutibilidade ao injetar amostras de abacate preparadas pelo pós-tratamento avançado após a limpeza de EMR—Lipídios. A comparação inclui resultados de amostras preparadas usando o pós-tratamento avançado e a etapa de polimento original após a limpeza de EMR—Lipídios, assim como a limpeza PSA/C18 tradicional. Os dados demonstram claramente o grande aumento da reprodutibilidade da resposta da piraclostrobina em amostras preparadas usando o pós-tratamento avançado após a limpeza de EMR—Lipídios. Ao usar a limpeza PSA/C18 tradicional ou o protocolo de EMR original para preparar amostras, o sinal de piraclostrobina cai para 30–40% da resposta inicial após 100 injeções. Essa inconsistência afetará negativamente a análise quantitativa desse composto. No entanto, ao usar o pós-tratamento avançado após a limpeza de EMR—Lipídios, uma reprodutibilidade de sinal excelente para a piraclostrobina (desvios de $\pm 10\%$) foi obtida. A melhor reprodutibilidade obtida usando o pós-tratamento avançado após a limpeza de EMR—Lipídios torna a análise quantitativa de analitos instáveis confiável e robusta.

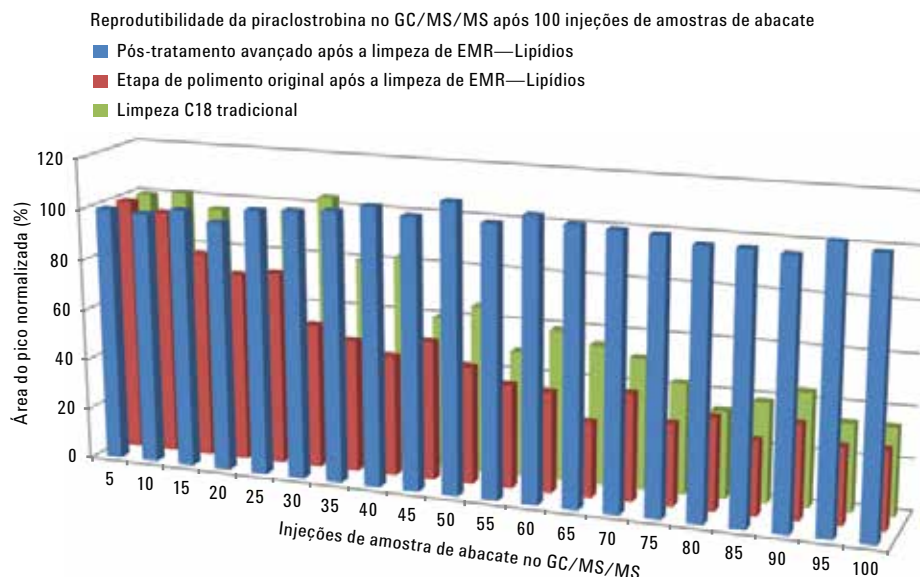


Figura 3. Reprodutibilidade da resposta do composto instável piraclostrobina no GC/MS/MS após 100 injeções de amostra de abacate preparadas com o pós-tratamento avançado e a etapa de polimento original após a limpeza de EMR—Lipídios e a limpeza C18 tradicional.

A Tabela 2 relaciona todos os pesticidas testados nesse estudo e seu RSD respectivo após 100 injeções de abacate usando o método descrito. A limpeza de EMR—Lipídios seguida do pós-tratamento avançado oferece RSDs menores que 10% para 24 dos 29 compostos. O captano, folpeto, captafol e DDT são compostos complexos no GC/MS/MS, e os RSDs altos, principalmente da limpeza PSA/C18,

refletem uma grande variação de sinal com 100 injeções. No entanto, a redução de sinal para amostras preparadas com a limpeza de EMR—Lipídios e pós-tratamento avançado foi maior e a reprodutibilidade desses quatro pesticidas instáveis em 50 injeções atenderam aos critérios de aceitação, com RSD menor que 10%.

Tabela 2. Reprodutibilidade de analitos por GC/MS/MS (RSD % da área do pico) após 100 injeções de amostras de abacate.

Pesticida	RSD do analito após 100 injeções (n = 20)		
	Limpeza EMR-Lipídios com pós-tratamento avançado	Limpeza EMR-Lipídios com etapa de polimento original	Limpeza C18/PSA
Diclorvos	8,5	6,2	10,5
Triclorfon	9,2	35,0	73,0
2-Fenil fenol	2,5	7,0	13,6
Etalfluralina	4,6	12,4	18,8
Sulfotepe	3,1	7,1	11,8
Atrazina	2,1	6,8	12,2
Lindano	3,1	8,5	10,8
Clorotanol	2,2	12,5	11,7
Diazinon	2,6	6,6	11,7
Clorpirifós-Me	2,6	8,4	8,9
Diclofluanida	5,4	11,7	9,0
Aldrin	2,1	9,8	19,3
Tolifluanida	6,6	10,5	6,6
Captano	29,8	29,9	51,9
Folpeto	22,0	53,8	52,2
Procimidona	2,1	6,8	14,3
Bupirinato	3,1	6,8	10,4
Endrina	4,0	8,3	12,6
Sulfato de endosulfan	3,6	8,5	12,1
DDT	16,1	21,6	22,4
Captafol	38,5	53,8	63,7
Iprodiona	3,7	11,0	10,7
Fosmete	6,2	24,0	12,5
Coumafós	4,3	19,8	9,7
Permetrina	3,0	6,8	11,8
Piraclostrobina	3,7	43,7	38,8
Deltametrina	8,7	22,5	9,8
Paration-etil-d10 (IS)	4,9	11,8	7,2
TPP (IS)	2,1	9,1	19,1

Vida útil mais longa do liner do injetor e da coluna de GC

Outra vantagem de usar o pós-tratamento avançado após a limpeza de EMR—Lipídios é a redução de resíduos de sal não voláteis, que podem ficar dissolvidos em resíduos de nível de traços de água. Testamos dois tipos de liners UI para 100 injeções de amostras de abacate: liner splitless de cone único com lâ Agilent Ultra Inert (p/n 5190--2293) e o liner com reentrâncias Agilent UI (p/n 5190--2297). Após o teste, o liner foi verificado para observar se houve deposição de resíduo. A Figura 4 mostra que ambos os liners estão praticamente limpos após 100 injeções. Esses resultados confirmam a limpeza excepcional obtida com a limpeza de EMR—Lipídios seguida do pós-tratamento avançado, o que resulta em uma vida útil mais longa do liner e da coluna e menos manutenção do sistema.



Figura 4. Aparência típica de liners do injetor de GC após 100 injeções de amostras de abacate preparadas pela limpeza de EMR—Lipídios seguida do pós-tratamento avançado. A) Liner splitless de cone único com lâ Agilent Ultra Inert, B) Liner com reentrâncias Agilent UI.

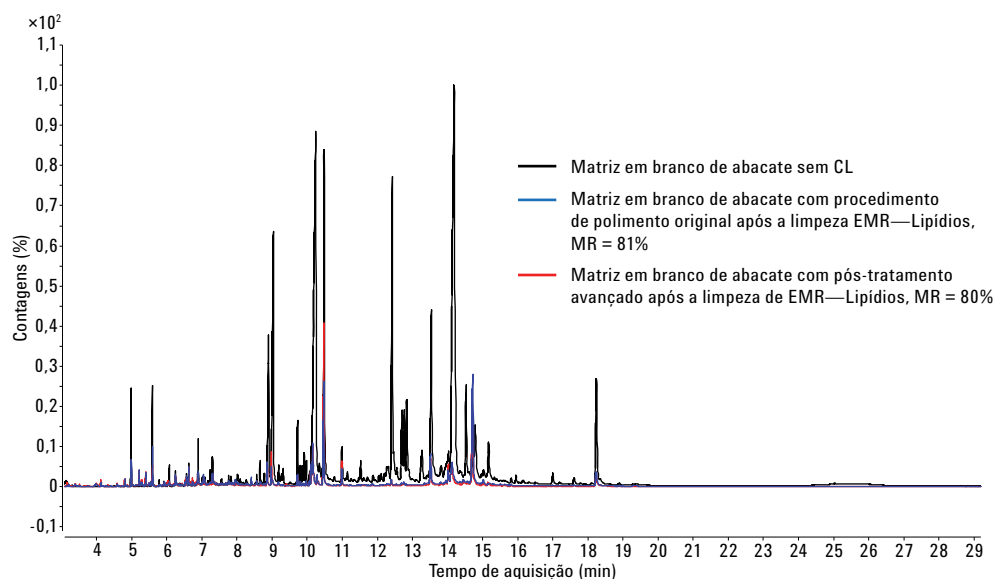


Figura 5. A comparação do cromatógrafo de varredura completa GC/MS demonstra a eficiência da remoção de matrizes equivalentes proporcionada pelo pós-tratamento avançado e a etapa de polimento original após a limpeza de EMR—Lipídios.

Eficiência da remoção de matrizes e recuperação de analitos equivalentes

A eficiência da remoção de matrizes foi avaliada usando a comparação do perfil de varredura completa de GC/MS antes e após a limpeza [5]. Os resultados mostraram que a eficiência da remoção de matrizes equivalentes pode ser obtida usando o pós-tratamento avançado e a etapa de polimento original após a limpeza de EMR—Lipídios (Figura 5).

A Figura 6 mostra a comparação da recuperação de pesticidas para amostras de abacate fortificadas com 50 ppb (n = 6) preparadas pela limpeza de EMR—Lipídios com o pós-tratamento avançado e a etapa de polimento original, respectivamente. Alguns analitos demonstram recuperações um pouco mais baixas usando o pós-tratamento avançado. No entanto, os grandes aumentos em reprodutibilidade com RSD menor que 5% para todos os compostos é significativo.

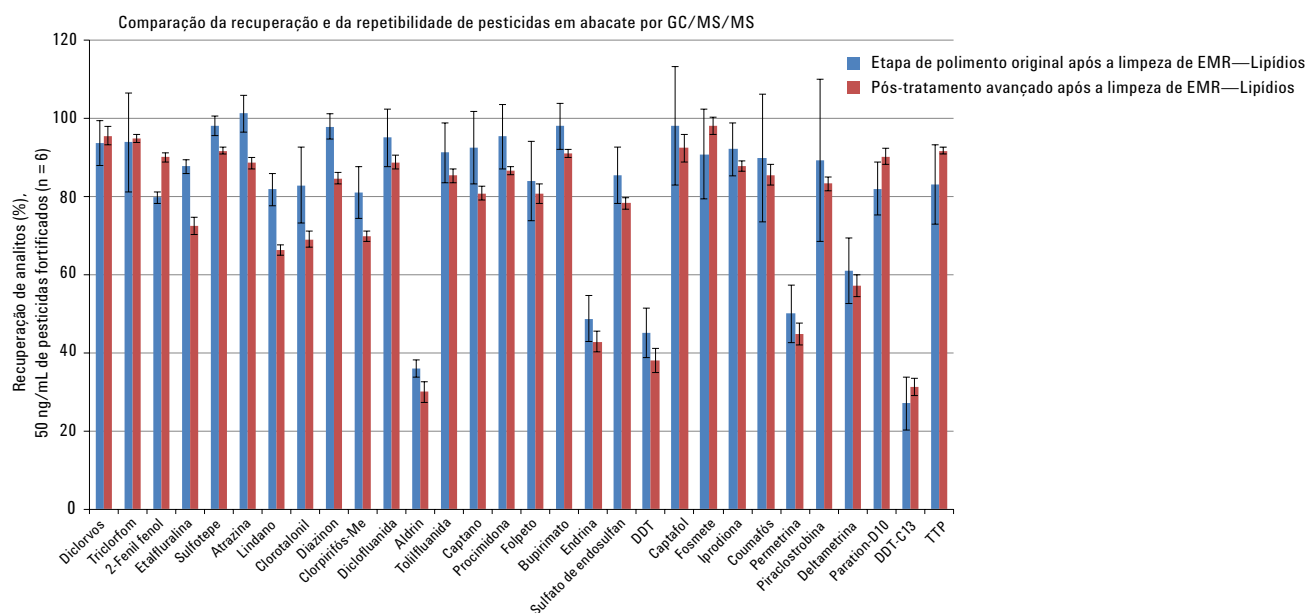


Figura 6. Recuperação de pesticidas de amostra de abacate fortificada a 50 ng/mL preparada pelo pós-tratamento avançado e a etapa de polimento original após a limpeza de EMR—Lipídios.

Conclusões

O pós-tratamento avançado de amostra após a limpeza de EMR—Lípidios implementa uma etapa de polimento e uma de secagem com $MgSO_4$ anidro para remover água residual e resíduos dissolvidos -em água antes da injeção da amostra no GC/MS/MS. Essas etapas melhoram a análise de GC/MS/MS proporcionando uma resposta mais alta do analito, melhor formato do pico e excelente reprodutibilidade do instrumento, além de prolongar a vida útil do liner do injetor e da coluna. Essa abordagem é ideal para os analistas que procuram melhorar o preparo de amostras complexas e com alto teor de gordura, principalmente quando analitos instáveis são os compostos de interesse. O tratamento pós-avançado de amostras após a limpeza de EMR—Lípidios também mantém a alta eficiência da remoção de matrizes em amostras complexas, além de proporcionar uma recuperação de analitos aceitável para a análise de pesticidas multirresíduo. O sal de polimento ($MgSO_4$ anidro) está disponível em uma bolsa para facilitar a distribuição nas amostras e o armazenamento.

Referências

1. Anastassiades, M.; Lehota, S. J.; Steinbahr, D.; Schenck, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC Int.* **2003**, *86*, 412.
2. Lehota, S. J.; Mastovská, K.; Lightfield, A. R. Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 615 & 60A.
3. Chamkasem, N.; Ollis, L. W.; Harmon, T.; Mercer, G. Analysis of 136 Pesticides in Avocado Using a Modified QuEChERS Method with LC-MS/MS and GC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61(10)*, 2315–2329.
4. Hildmann, F.; Gottert, C.; Frenzel, T.; Kempe, G.; Speer, K. Pesticide residues in chicken eggs - A sample preparation methodology for analysis by gas and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1403*, 1–20.
5. Zhao, L.; Lucas, D. *Multiresidue Analysis of Pesticides in Avocado with Agilent Bond Elut EMR—Lipid by GC/MS/MS*; Application Note, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5991-6097EN, **2015**.

Mais informações

Estes dados representam os resultados típicos. Para obter mais informações sobre nossos produtos e serviços, acesse o site www.agilent.com/chem.

www.agilent.com/chem

A Agilent Technologies não será responsável por erros contidos neste documento ou por danos incidentais ou consequenciais em relação ao fornecimento, desempenho ou uso deste material.

As informações, descrições e especificações nesta publicação estão sujeitas a mudanças sem aviso prévio.

© Agilent Technologies, Inc., 2016
Impresso nos EUA
20 de abril de 2016
5991-6707PTBR



Agilent Technologies