

Analisi GC/MS/MS rapida e affidabile in 10 minuti di 203 pesticidi negli spinaci



Autori

Anastasia A. Andrianova,
Bruce D. Quimby
e Limian Zhao
Agilent Technologies, Inc.

Abstract

Questa nota applicativa descrive due approcci mirati a garantire l'affidabilità dell'analisi multiresiduale di pesticidi in 10 minuti tramite GC/MS/MS, preservando al tempo stesso una risoluzione cromatografica sufficiente ad analizzare oltre 200 pesticidi negli spinaci, ossia in una complessa matrice fresca ad alto tenore di clorofilla. È stata innanzitutto usata la configurazione convenzionale con backflush a metà colonna da 15 x 15 m (0,25 mm x 0,25 µm) con una rampa accelerata di temperatura del forno, ottenendo un tempo di analisi di 10 minuti. Successivamente è stata usata una configurazione minibore con backflush a metà colonna da 10 x 10 m (0,18 mm x 0,18 µm), che ha permesso di ottenere un tempo di analisi rapido di 10 minuti. Quest'ultimo metodo è stato riportato precisamente in scala utilizzando la tecnica di conversione del metodo GC Agilent. È stato provato che il backflush a metà colonna ha garantito la robustezza del metodo e ha prolungato il funzionamento del sistema senza manutenzione riducendo al minimo l'accorciamento della colonna e la pulizia della sorgente. I risultati dimostrano che i sistemi GC/MS a triplo quadrupolo Agilent 7000E e 7010C hanno fornito un'eccellente linearità in un intervallo di concentrazione tra 0,1 e 1.000 parti per miliardo (ppb). La robustezza del metodo è stata provata tramite 700 iniezioni consecutive di un estratto di spinaci, con aggiunta di pesticidi a 20 ppb, effettuate in un arco di oltre 175 ore di funzionamento ininterrotto del sistema GC/TQ.

Introduzione

È in continua crescita la domanda di metodi più rapidi per l'identificazione e la quantificazione dei residui chimici nell'analisi di alimenti senza che a farne le spese siano la robustezza del metodo e le prestazioni cromatografiche. I metodi convenzionali per l'analisi multiresiduale di pesticidi in genere richiedono almeno 20 minuti, cosa che prolunga la durata dei cicli di analisi dei campioni. Di conseguenza, il tempo di analisi GC/MS per un lotto di campioni potrebbe facilmente protrarsi per vari giorni. Ciò genera un rallentamento nell'analisi dei campioni e pone limiti alla produttività del laboratorio. Pertanto, riducendo il tempo di analisi GC/MS si migliora senza alcun dubbio la produttività analitica e, di conseguenza, la produttività del laboratorio. In genere, tuttavia, i metodi GC più veloci impongono compromessi in termini di prestazioni o robustezza del metodo. Questa nota applicativa si propone di illustrare due metodi GC/MS/MS rapidi utilizzando (a) il sistema GC/MS a triplo quadrupolo **Agilent 8890 GC e 7000E** e (b) il sistema GC/MS a triplo quadrupolo **Agilent 8890 GC e 7010C**. I metodi presentati riducono il tempo di analisi a 10 minuti, preservando al contempo le robuste prestazioni del sistema con l'estratto complesso di spinaci, senza perdita di sensibilità o di prestazioni del metodo.

Le due configurazioni con backflush a metà colonna dei sistemi GC/TQ descritte in questa nota applicativa permettono di ottenere tempi di analisi di 10 minuti, mantenendo una risoluzione cromatografica e una selettività MS sufficienti per l'analisi di 203 composti. Il metodo GC/MS/MS convenzionale da 20 minuti, bloccato sui tempi di ritenzione con il database MRM per pesticidi e residui di inquinanti ambientali (database MRM P&EP) Agilent MassHunter, è servito da punto di riferimento per le analisi rapide ottimizzate.

È stata innanzitutto usata la configurazione convenzionale con backflush a metà colonna da 15 x 15 m (0,25 mm x 0,25 µm) con una rampa accelerata di temperatura del forno, ottenendo un tempo di analisi

di 10 minuti. Questa configurazione non ha richiesto alcuna modifica hardware. Successivamente è stata usata una configurazione minibore con backflush a metà colonna da 10 x 10 m (0,18 mm x 0,18 µm) che ha permesso di ottenere un tempo di analisi di 10 minuti. Questa configurazione ha richiesto un nuovo set di colonne rispetto a quella convenzionale da 15 x 15 m e un inserto per forno GC (imbottitura). La seconda configurazione, tuttavia, ha permesso una previsione più accurata dei tempi di ritenzione e ha preservato l'ordine di eluizione per tutti i composti testati.

Con entrambi i metodi rapidi, i tempi di ritenzione sono stati previsti accuratamente sulla base di quelli disponibili nel database MRM P&EP.¹ Utilizzando la tecnica di conversione del metodo GC e mantenendo lo stesso rapporto di fase della colonna è stato possibile prevedere accuratamente i tempi di ritenzione e preservare l'ordine di eluizione dei 203 pesticidi analizzati con la configurazione da 10 x 10 m. Per aggiornare i tempi di ritenzione per il metodo da 10 minuti con la configurazione convenzionale da 15 x 15 m è stata utilizzata una combinazione di pesticidi ed n-alcane.

Il backflush a metà colonna per entrambe le configurazioni delle colonne ha migliorato la robustezza dei metodi riducendo la frequenza degli interventi di manutenzione periodica, per esempio l'accorciamento della testa della colonna e la pulizia della sorgente. Inoltre, in abbinamento all'uso di un iniettore multimode (MMI) a temperatura programmabile, la sostituzione del liner e altre procedure di manutenzione dell'iniettore possono essere eseguite molto più rapidamente senza raffreddamento della sorgente MS e della transfer line rispetto al caso di una configurazione convenzionale in cui una colonna collega l'iniettore direttamente allo spettrometro di massa.

È stato possibile applicare i metodi sviluppati all'analisi di pesticidi così da coprire l'ampio intervallo dei limiti massimi di residui (MRL) per i diversi pesticidi negli spinaci e ottenere eccellenti prestazioni di calibrazione in un range dinamico compreso tra 0,1 e 1.000 ppb.

Per valutare la robustezza dei metodi è stato effettuato un test con 700 iniezioni continue dell'estratto di spinaci con aggiunta di bassi livelli di pesticidi. La deviazione standard relativa (RSD) della risposta di molti analiti complessi è risultata inferiore al 15% su oltre 700 iniezioni. Non è stato necessario accorciare la colonna, pulire la sorgente o calibrare il sistema MS per la durata del test. L'unico intervento di manutenzione effettuato è stata la sostituzione del liner e del setto ogni 100 iniezioni.

Condizioni sperimentali

Analisi GC/TQ

Le due configurazioni delle colonne usate con le combinazioni GC/TQ 8890/7000E e 8890/7010C sono mostrate in Figura 1. Il gascromatografo è stato configurato con campionatore automatico per liquidi (ALS) Agilent 7693A e vassoio a 150 posizioni; un MMI, funzionante in modalità di iniezione splitless a temperatura programmata (splitless a freddo); una funzionalità di backflush a metà colonna resa possibile dal raccordo purged Ultimate (PUU) Agilent, installato tra due colonne identiche da 15 o 10 m; e il modulo pneumatic switching device (PSD) GC 8890. I parametri operativi dello strumento sono elencati in Tabella 1. I dati sono stati acquisiti in modalità dynamic MRM (dMRM), che permette di eseguire estesi metodi multianalitici e di quantificare accuratamente i picchi stretti tramite una distribuzione dei dwell time automatizzata e caratterizzata dalla massima efficienza.

La funzionalità dynamic MRM ha consentito di analizzare correttamente un ampio pannello di 203 pesticidi con un totale di 614 transizioni MRM. Il numero massimo di transizioni MRM concorrenti con la configurazione convenzionale da 15 x 15 m e l'analisi tradizionale da 20 minuti era 52. Per l'analisi in 10 minuti, il numero massimo di transizioni MRM concorrenti con le configurazioni convenzionale da 15 x 15 m e minibore da 10 x 10 m era pari rispettivamente a 127 e 83 (Figura 2). Con la modalità dynamic MRM, inoltre, l'analista può

aggiungere e rimuovere facilmente ulteriori analiti. L'uso del database MRM P&EP ha semplificato e accelerato l'impostazione di un metodo dynamic MRM mirato.

In questo lavoro è stato utilizzato Agilent MassHunter Workstation versioni 10.1 e 10.2 con i pacchetti software MassHunter Acquisition per sistemi GC/MS 10.2, MassHunter Quantitative Analysis 10.1 e MassHunter Qualitative Analysis 10.

Le prestazioni di calibrazione sono state valutate impiegando una serie di standard di calibrazione in matrice nell'intervallo compreso tra 0,1 e 1.000 ppb, includendo 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 50, 100, 250, 500 e 1.000 ppb (p/v). Per preparare gli standard di calibrazione in matrice è stato utilizzato il kit di pesticidi per l'analisi GC multiresiduale contenente 203 composti (Restek, Bellefonte, PA, USA), soggetti a regolamentazione da parte di FDA, USDA e altri enti governativi internazionali. L' α -BHC-d6, alla concentrazione finale di 20 ppb in vial, è stato usato come standard interno per la quantificazione dei pesticidi

target (standard IS numero 6 Agilent Bond Elut QuEChERS IS; codice PPS-610-1). A tutte le curve di calibrazione è stato applicato un fattore di ponderazione 1/x.

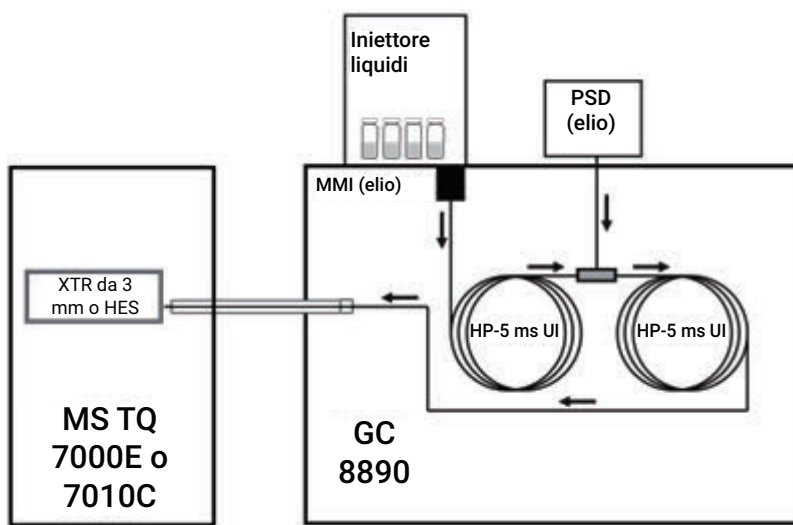
Blocco del tempo di ritenzione nei metodi da 10 minuti

Il blocco del tempo di ritenzione fa sì che una nuova colonna o un nuovo strumento possiedano tempi di ritenzione che corrispondono esattamente a quelli del database MRM o di un metodo esistente, agevolando il trasferimento dei metodi da uno strumento a un altro e tra strumenti diversi a livello globale. Ciò semplifica la manutenzione del metodo e la configurazione del sistema. I tempi di ritenzione per l'analisi convenzionale dei pesticidi in 20 minuti sono disponibili nel database MRM per pesticidi e residui di inquinanti ambientali. Con il metodo da 10 minuti e la configurazione convenzionale da 15 x 15 m è stato utilizzato lo stesso flusso nella colonna GC al quale l'analisi di 20 minuti era bloccata sul database MRM P&EP. Ciò ha

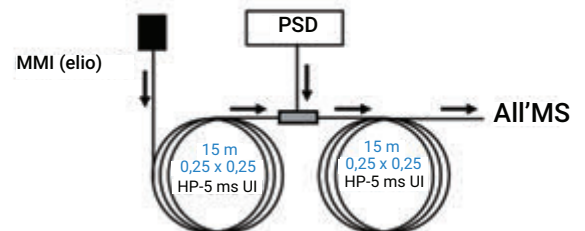
determinato un nuovo valore di blocco del tempo di ritenzione per il clorpirifos metile pari a 5,520 minuti. Per aggiornare i tempi di ritenzione per i restanti analiti, si è utilizzata una combinazione di pesticidi ed n-alcani per prevedere i tempi di ritenzione per il nuovo metodo in base ai tempi di ritenzione per un metodo di 20 minuti dal database MRM P&EP.

L'analisi di 10 minuti con la configurazione minibore da 10 x 10 m è stata riportata precisamente in scala mediante lo strumento di conversione del metodo, ottenendo un guadagno di velocità pari a 2. La regolazione fine del metodo ha permesso di ottenere la migliore corrispondenza tra tempi di ritenzione previsti e osservati nell'intervallo di eluizione dei 203 pesticidi, con un offset risultante di 0,09 minuti. I nuovi tempi di ritenzione (RT) sono stati calcolati tramite la seguente equazione:

$$RT_{\text{nuovo}} = RT_{\text{precedente}} \div 2 + 0,09 \text{ minuti.}$$



Configurazione convenzionale con backflush a metà colonna da 15 x 15 m:



Configurazione convenzionale con backflush a metà colonna da 10 x 10 m:

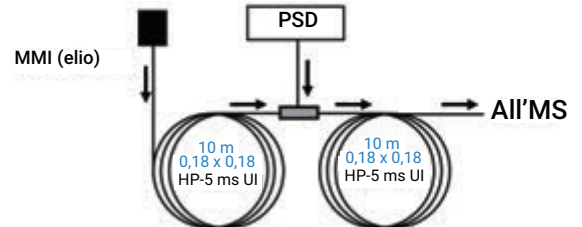


Figura 1. Sistema GC/TQ Agilent caratterizzato dall'uso di due configurazioni con backflush a metà colonna (destra).

Tabella 1. Condizioni del sistema GC Agilent 8890 e GC/TQ serie 7000 e del sistema GC Agilent 8890 e GC/TQ 7010C che consentono l'analisi dei pesticidi in 10 minuti.

GC		
GC Agilent 8890 (forno da 220 V) con forno rapido, iniettore automatico e vassoio		
Iniettore	Iniettore multimode (MMI)	
Modalità	Splitless a freddo	
Flusso di spurgo allo split vent	60 mL/min a 0,75 min	
Flusso di spurgo del setto	3 mL/min	
Modalità del flusso di spurgo del setto	Commutato	
Volume di iniezione	1,0 µL	
Tipo di iniezione	Standard	
Air gap S1	0,2 µL	
Gas Saver	Attivo a 30 mL/min dopo 3 min	
Temperatura dell'iniettore	60 °C per 0,1 min, quindi fino a 280 °C a 600 °C/min	
Temperatura dell'iniettore post-analisi	310 °C	
Flusso totale post-analisi	25 mL/min	
Gas di trasporto	Elio	
Liner per iniettore	Liner dimpled Agilent Ultra Inert da 2 mm	
Codice del liner per iniettore	5190-2297	
Forno		
	Con 15 x 15 m	Con 10 x 10 m
Temperatura iniziale del forno	60 °C	60 °C
Mantenimento della temperatura iniziale del forno	1 min	0,5 min
Velocità di rampa 1	80 °C/min	80 °C/min
Temperatura finale 1	170 °C	170 °C
Mantenimento della temperatura finale 1	0 min	0 min
Velocità di rampa 2	35 °C/min	20 °C/min
Temperatura finale 2	310 °C	310 °C
Mantenimento della temperatura finale 2	3,625 min	1,125 min
Tempo di analisi totale	10 min	10 min
Tempo post-analisi	1,5 min	1,5 min
Tempo di equilibratura	0,25 min	0,25 min
		Inserto per il forno ad alta velocità (imbottitura)

Colonna 1		
	Con 15 x 15 m	Con 10 x 10 m
Tipo	Agilent J&W HP-5ms Ultra Inert	Agilent J&W HP-5ms Ultra Inert
Codice Agilent	19091S-431UI-KEY	Colonna personalizzata ²
Lunghezza	15 m	10 m
Diametro	0,25 mm	0,25 mm
Spessore del film	0,25 µm	0,25 µm
Modalità di controllo	Flusso costante	Flusso costante
Flusso	1,016 mL/min	1,3 mL/min
Collegamento in ingresso	Iniettore multimode (MMI)	Iniettore multimode (MMI)
Collegamento in uscita	PSD (PUU)	PSD (PUU)
Flusso di spurgo del PSD	5 mL/min	5 mL/min
Flusso post-analisi (backflush)	-7,873	-3,174
Colonna 2		
	Con 15 x 15 m	Con 10 x 10 m
Tipo	Agilent J&W HP-5ms Ultra Inert	Agilent J&W HP-5ms Ultra Inert
Codice Agilent	19091S-431UI-KEY	Colonna personalizzata ²
Lunghezza	15 m	10 m
Diametro	0,25 mm	0,25 mm
Spessore del film	0,25 µm	0,25 µm
Modalità di controllo	Flusso costante	Flusso costante
Flusso	1,216 mL/min	1,5 mL/min
Collegamento in ingresso	PSD (PUU)	PSD (PUU)
Collegamento in uscita	MSD	MSD
Flusso post-analisi (backflush)	8,202	3,290

MSD		
Modello	GC/MS a triplo quadrupolo Agilent serie 7000 (7000D e 7000E) o 7010C	
Sorgente	Sorgente Extractor inerte con lente da 3 mm o HES	
Pompa per vuoto	Turbo ad alta efficienza	
File di calibrazione	Atunes.eiex.jtune.xml o Atunes.eihs.jtune.xml	
Solvent delay	3 min	
Temperatura quadrupolo (MS1 ed MS2)	150 °C	
Temperatura sorgente	280 °C	
Modalità	Dynamic MRM	
Gas di quenching He	2,25 mL/min	
Gas di collisione N ₂	1,5 mL/min	
Statistiche MRM		
	Con 15 x 15 m	Con 10 x 10 m
MRM totali (modalità dynamic MRM)	614	614
Dwell time minimo	2,33 ms	3,99 ms
Durata minima del ciclo	167,86 ms	110,38 ms
MRM concorrenti massime	127	83
Modalità di guadagno tensione EM	10	10

Preparazione del campione

In Figura 3 è riportato un diagramma del flusso di lavoro per la preparazione del campione. La preparazione del campione ha incluso due fasi principali: estrazione QuEChERS tradizionale del campione, seguita da purificazione Captiva EMR (rimozione più efficiente dalla matrice) pass-through. Per la matrice fresca ad alto tenore di clorofilla (spinaci) è stata utilizzata la cartuccia Agilent Captiva EMR-High Chlorophyll Fresh con NH₂ (Captiva EMR-HCF1). Il nuovo flusso di lavoro di preparazione del campione è la dimostrazione di una procedura semplificata che migliora sia la rimozione della matrice del campione sia la qualità dei dati di quantificazione degli analiti target.

Come mostrato in Figura 3, i campioni sono stati innanzitutto estratti con il tradizionale kit di estrazione Agilent Bond Elut QuEChERS EN (codice 5982-5650CH). Per l'estrazione sono stati utilizzati spinaci freschi omogeneizzati (10 g). Sono stati quindi aggiunti 10 mL di ACN con acido acetico 1%; è seguita poi l'estrazione. Dopo l'estrazione, 3 mL di estratto grezzo sono stati trasferiti in una cartuccia Captiva EMR-HCF1 (codice 5610-2088) per la purificazione pass-through. L'eluente è stato raccolto e ulteriormente disidratato mediante MgSO₄ anidro (codice 5982-0102). A questo punto i campioni erano pronti per l'analisi GC/TQ. Per la procedura di purificazione Captiva EMR pass-through è stato utilizzato il processore per collettore a pressione positiva 48 (PPM-48; codice 5191-4101) di Agilent.

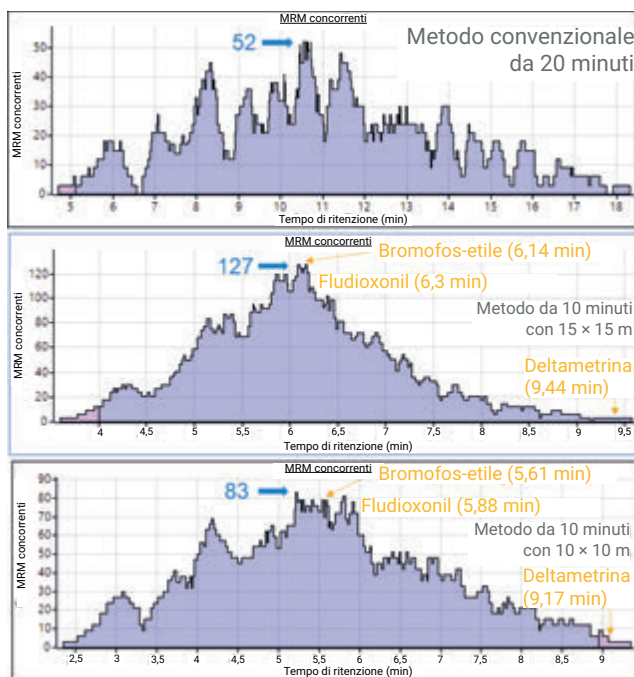


Figura 2. Distribuzione delle 614 transizioni dynamic MRM con l'analisi convenzionale dei pesticidi in 20 minuti, con l'analisi di 10 minuti e la configurazione convenzionale da 15 x 15 m e con il metodo da 10 minuti e la configurazione delle colonne minibre da 10 x 10 m.

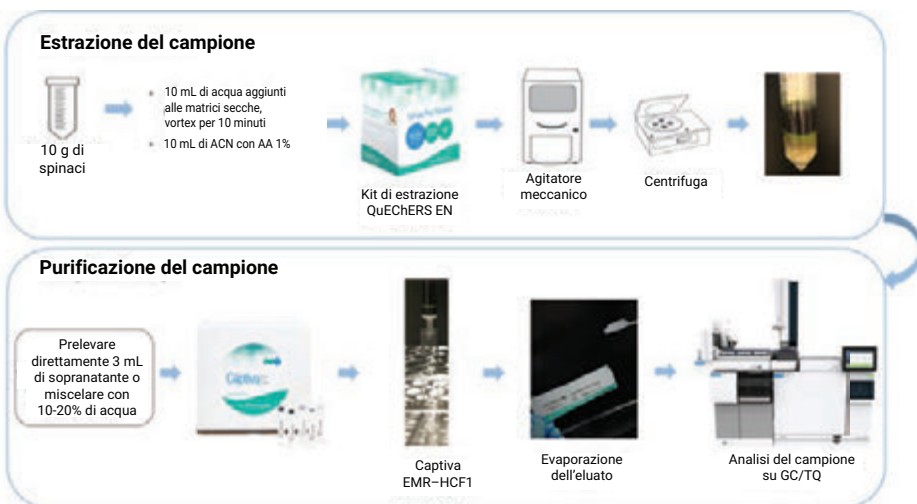


Figura 3. Diagramma di flusso della preparazione del campione articolata nell'estrazione Agilent QuEChERS tradizionale seguita dalla purificazione Agilent Captiva EMR pass-through.

Risultati e discussione

Mantenimento della risoluzione cromatografica con l'analisi di 10 minuti di oltre 200 pesticidi

Le configurazioni GC con backflush a metà colonna qui presentate, ossia la convenzionale da 15 x 15 m e la minibore da 10 x 10 m, hanno permesso l'analisi in 10 minuti di 203 pesticidi con tre transizioni MRM acquisite per ciascun composto. La Figura 4 dimostra come la risoluzione cromatografica con il metodo rapido della durata di 10 minuti sia stata in grande misura mantenuta con la configurazione convenzionale da 15 x 15 m (Figura 4A) e completamente preservata con quella minibore da 10 x 10 m (Figure 4B). La tecnica di conversione del metodo GC usata per trasferire il metodo alla configurazione da 10 x 10 m ha permesso di preservare l'ordine di eluizione relativo dei composti.

Sensibilità e prestazioni di calibrazione in un ampio range dinamico con le separazioni da 10 minuti

La sensibilità dei metodi ottenuta con le diverse configurazioni delle colonne e le separazioni da 10 minuti è risultata comparabile a quella osservata con il metodo convenzionale da 20 minuti. Entrambi i metodi da 10 minuti configurati con colonne da 15 x 15 m e 10 x 10 m

hanno permesso la rivelazione di tutti i pesticidi target a livelli inferiori ai rispettivi MRL regolamentati, anche nel caso delle specie più complesse. La deltametrina, per esempio, un composto difficile da analizzare tramite GC/MS, è stata quantificata accuratamente negli spinaci fino a 0,1 ppb con il sistema GC/TQ 7010C e tra 1 e 5 ppb con il sistema GC/TQ serie 7000 (Figura 5A). Mentre per la deltametrina non è fissato un MRL negli spinaci, questo principio attivo è regolamentato in molti altri prodotti alimentari inclusi gli ortaggi dei gruppi 8 e 9, nonché dei sottogruppi IB e IC, con MRL variabili tra 40 e 300 ppb.³ Gli intervalli di calibrazione osservati con i sistemi GC/TQ 7010 e serie 7000 consentirebbero agli analisti di soddisfare i requisiti di analisi della deltametrina in svariate matrici alimentari.

Mentre l'analisi GC/MS della deltametrina presenta difficoltà, l'eluizione di questo pesticida alla fine dell'analisi di 10 minuti si traduce nella presenza di poche transizioni MRM concorrenti. Di conseguenza, le transizioni MRM monitorate per la deltametrina possiedono dwell time relativamente lunghi (superiori a 50 ms) anche con i metodi rapidi da 10 minuti (Figura 2). Al contrario, il fludioxonil, un fungicida con un MRL fissato pari a 10 ppb negli spinaci⁴, eluisce in un segmento affollato dei metodi MRM, con 120 e 80 transizioni MRM concorrenti

rispettivamente nelle configurazioni da 15 x 15 m e 10 x 10 m. Nonostante i dwell time relativamente brevi pari a 3 e 4,9 ms nelle due configurazioni, il fludioxonil è stato quantificato accuratamente fino a 0,1 ppb con entrambi i sistemi GC/TQ 7010C e serie 7000 e con almeno dieci punti acquisiti sul picco (Figura 5B). Il sistema GC/TQ 7010C dotato di sorgente ad alta efficienza (HES) ha evidenziato una sensibilità superiore rispetto al sistema GC/TQ serie 7000. Consente la quantificazione accurata a livelli inferiori a 0,1 ppb, sebbene in questo lavoro non fosse necessario raggiungere tali valori in quanto gli MRL dei pesticidi regolamentati dall'Agenzia per la protezione dell'ambiente degli Stati Uniti nella maggior parte dei prodotti alimentari non richiedono la quantificazione a livelli inferiori a 0,1 ppb. Analogamente, il bromofos-etile eluiva in una finestra affollata con un alto numero di transizioni MRM monitorate concorrenti, determinando un dwell time breve pari a 2,7 e 4,7 ms con le configurazioni da 15 x 15 m e 10 x 10 m rispettivamente. Le tolleranze consigliate per il bromofos-etile sono comprese tra 20 e 2.000 ppb in vari prodotti alimentari.⁵ La Figura 5B e la Figura 5C dimostrano che fludioxonil e bromofos-etile sono stati quantificati accuratamente nell'ampio intervallo di concentrazione tra 0,1 e 1.000 ppb con linearità e sensibilità eccellenti nella matrice complessa di spinaci e almeno nove punti sul picco.

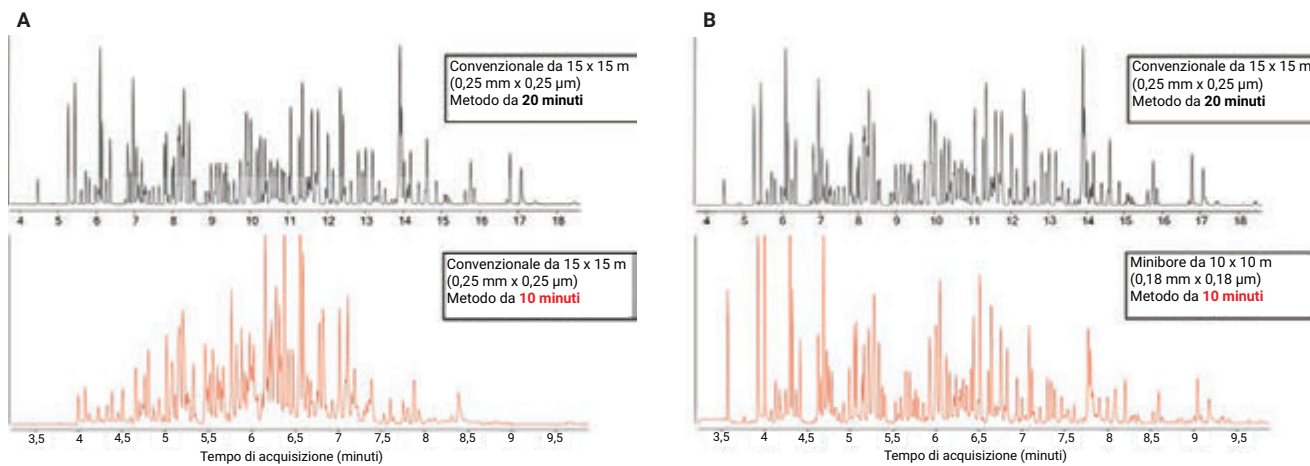
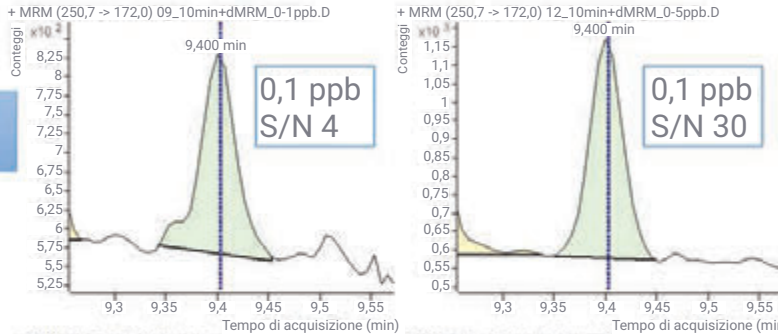


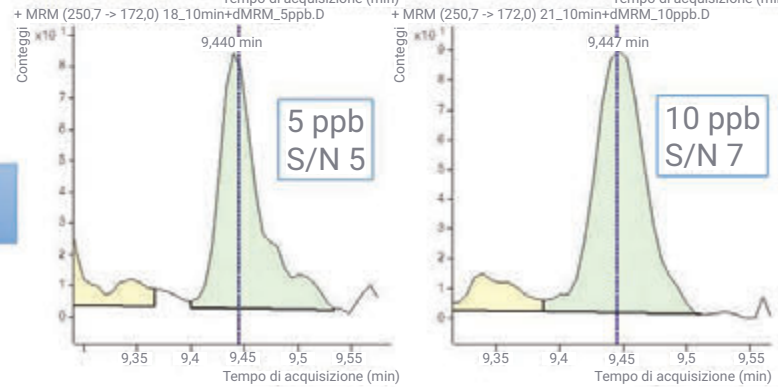
Figura 4. Cromatogrammi ionici totali (TIC) MRM di una miscela di 203 pesticidi acquisiti con (A) la configurazione convenzionale da 15 x 15 m e (B) la configurazione minibore da 10 x 10 m.

A) Deltametrina

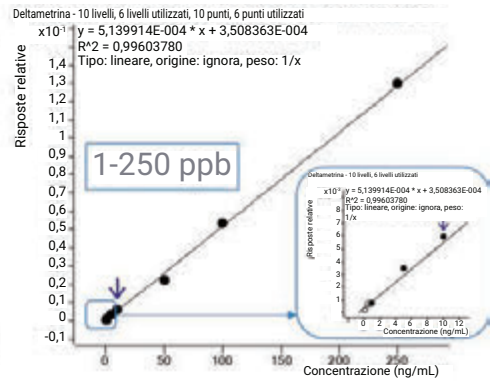
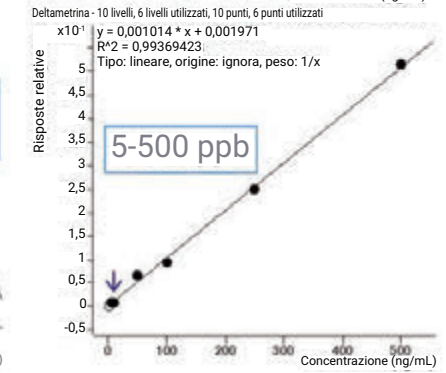
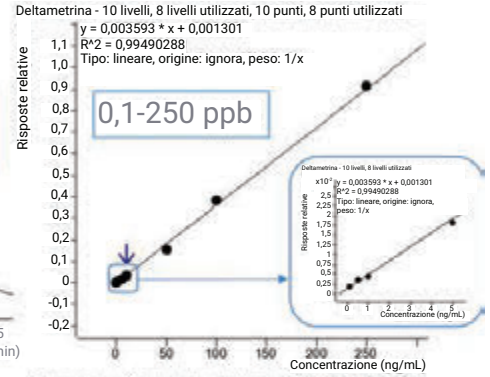
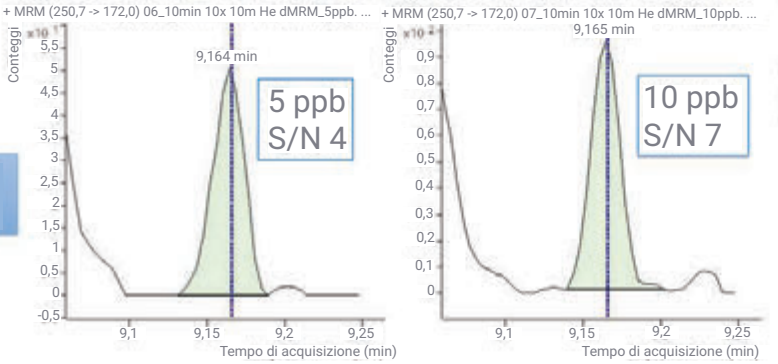
7010C
15 x 15 m



7000E
15 x 15 m

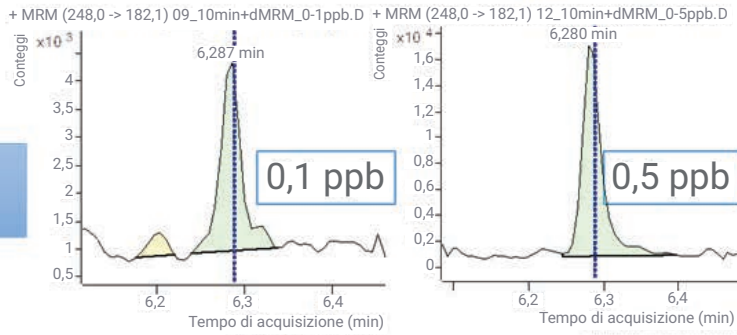


Serie 7000
10 x 10 m

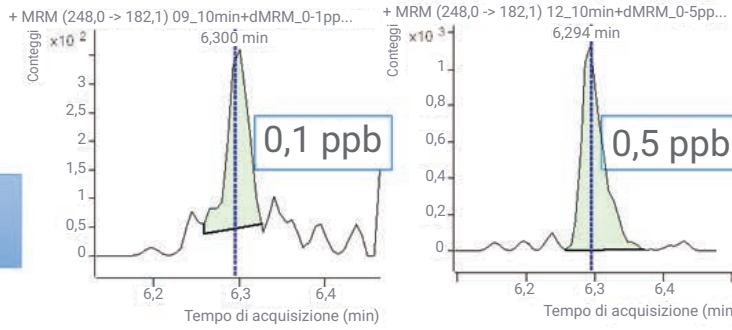


B) Fludioxonil

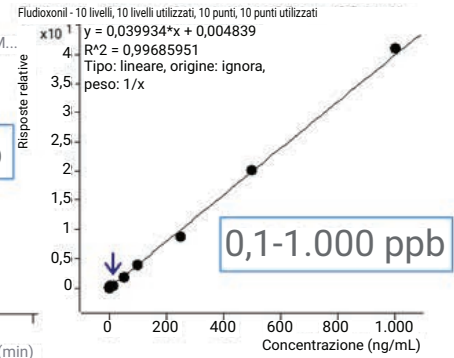
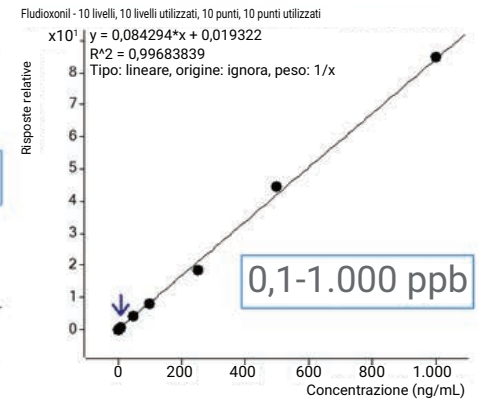
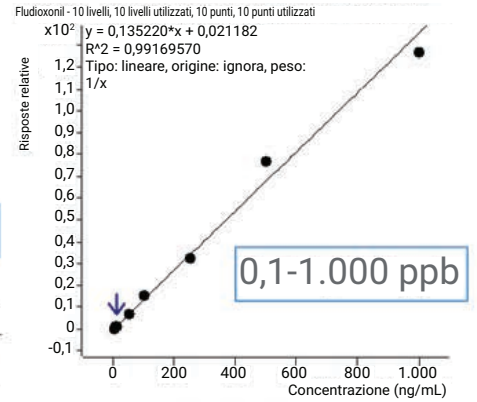
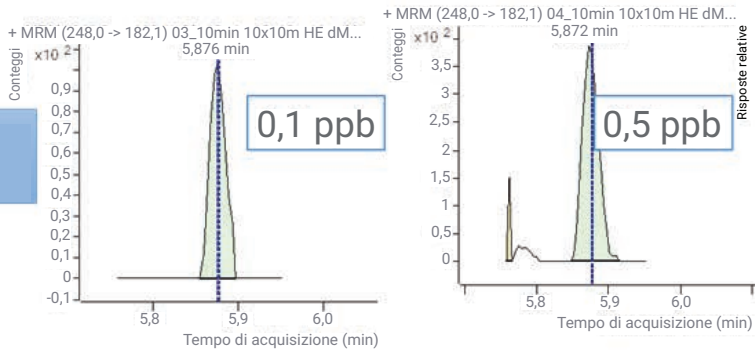
7010C
15 x 15 m



7010E
15 x 15 m

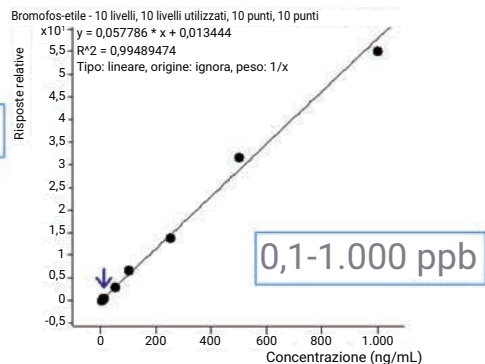
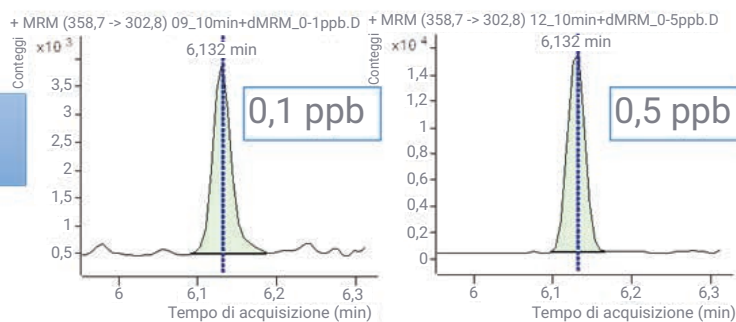


Serie 7000
10 x 10 m

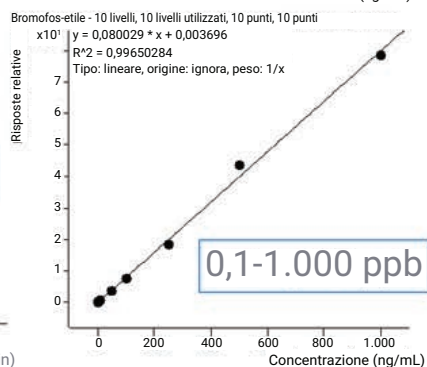
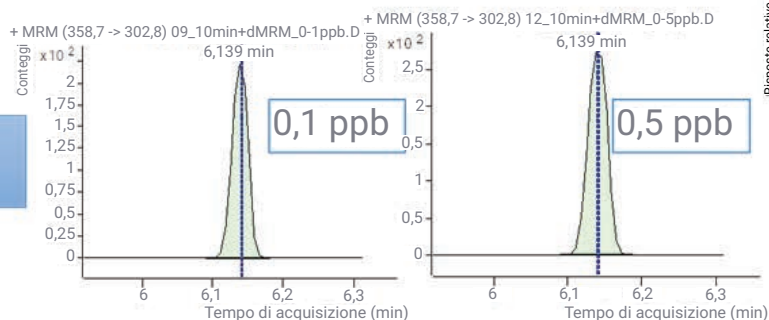


C) Bromofos-etile

7010C
15 x 15 m



7000E
15 x 15 m



Serie 7000
10 x 10 m

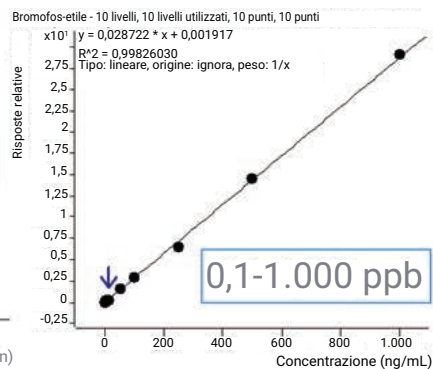
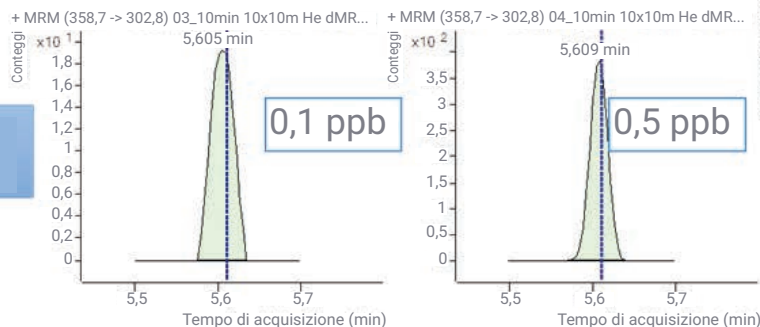


Figura 5. Cromatogrammi MRM e curve di calibrazione abbinati alla matrice negli spinaci per (A) deltametrina, (B) fludioxonil e (C) bromofos-etile osservati con configurazioni distinte delle colonne e separazioni di 10 minuti utilizzando i sistemi GC/MS a triplo quadrupolo Agilent 7010C e serie 7000.

Il problema più complesso nell'analisi multiresiduale di pesticidi è rappresentato dal fatto che gli MRL fissati per i pesticidi in prodotti alimentari diversi variano in misura significativa. Pertanto, se gli intervalli di calibrazione del metodo non abbracciano gli MRL di tutti i composti di interesse potrebbe essere necessario ripetere l'iniezione dei campioni, un'operazione preferibilmente da evitare. Un ampio intervallo dinamico di calibrazione è preferibile per poter utilizzare il metodo di quantificazione più generico nell'analisi

di pesticidi differenti nel prodotto in questione oltre che in alimenti diversi e per semplificare il pretrattamento del campione, per esempio l'ulteriore diluizione, prima della rivelazione strumentale. In Figura 6 sono riassunte le prestazioni di calibrazione per i 203 pesticidi analizzati negli spinaci con le separazioni di 10 minuti utilizzando la configurazione convenzionale da 15 x 15 m abbinata ai sistemi GC/TQ 7010C e 7000E e la configurazione minibore da 10 x 10 m abbinata al sistema GC/TQ serie 7000. Il grafico mostra il

numero di composti con coefficiente di correlazione $R^2 > 0,99$, utilizzando le diverse interpolazioni a regressione (lineare o quadratica) della calibrazione nei diversi intervalli di calibrazione.

La maggior parte dei composti target presentava curve di calibrazione lineari in un ampio intervallo compreso tra 0,1 e 1.000 ppb o tra 0,5 e 1.000 ppb, il che ne ha permesso la quantificazione affidabile ai vari MRL fissati per i diversi composti.

Numero di composti con $R^2 > 0,99$ e rispettivi intervalli di calibrazione con i sistemi GC/TQ serie 7000 e 7010C utilizzando le due configurazioni delle colonne con separazioni da 10 minuti

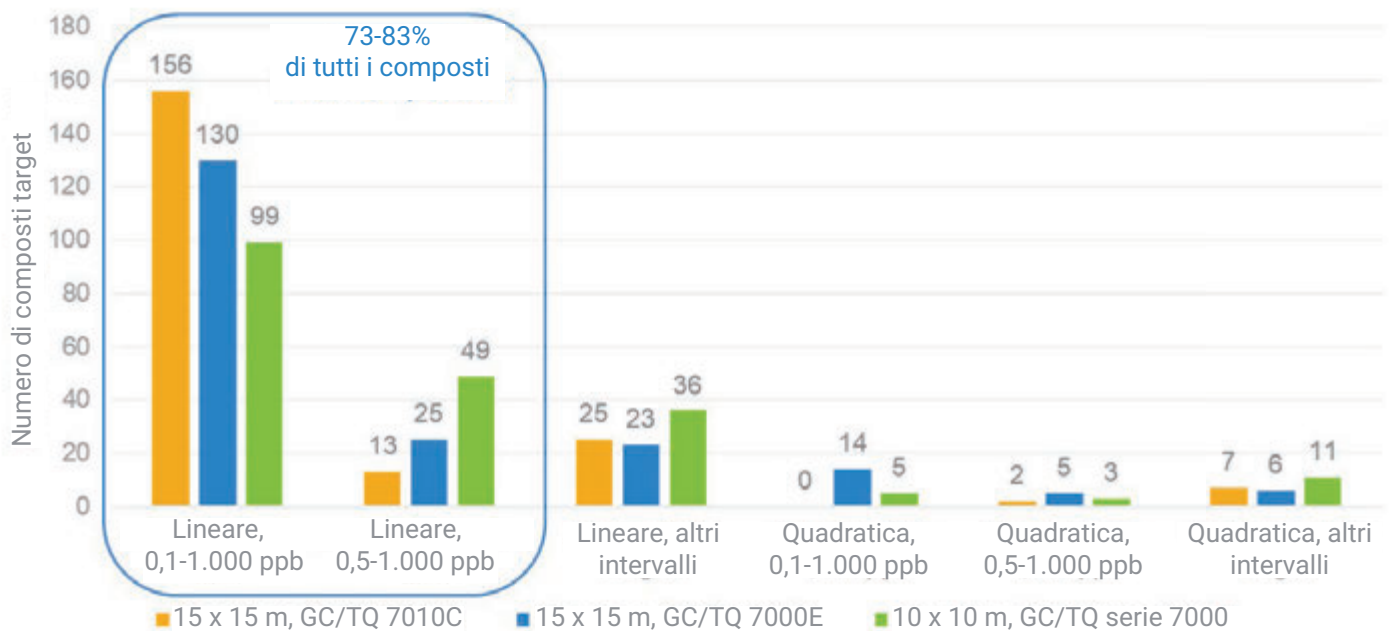


Figura 6. Prestazioni di calibrazione per i 203 pesticidi con i metodi da 10 minuti e la configurazione convenzionale da 15 x 15 m, abbinata ai sistemi GC/MS a triplo quadrupolo Agilent 7010C e 7000E, e con la configurazione minibore da 10 x 10 m, abbinata al sistema GC/MS a triplo quadrupolo Agilent serie 7000 negli spinaci. Il grafico riporta il numero di composti e i rispettivi intervalli di calibrazione.

Robustezza del metodo con 700 iniezioni di un estratto di spinaci

La robustezza dell'analisi in 10 minuti è stata dimostrata analizzando un estratto complesso di spinaci ricco di pigmenti con aggiunta di pesticidi a 20 ppb. L'area degli analiti è stata monitorata su 700 iniezioni consecutive. La risposta degli analiti, normalizzata dagli standard interni (ISTD), è rimasta uniforme su 700 iniezioni in un arco di oltre 175 ore di funzionamento ininterrotto con il metodo da 10 minuti utilizzando la configurazione convenzionale delle colonne da 15 x 15 m abbinata al sistema GC/TQ 7000E. L'unica procedura di manutenzione eseguita durante il test della robustezza è stata la sostituzione di liner e setto ogni 100 iniezioni.

Non è stato necessario pulire l'iniettore, accorciare la colonna per GC o pulire la sorgente MS, né ricalibrare il sistema MS per l'intera durata dello studio che ha comportato oltre 1.000 iniezioni (test di robustezza su 700 analisi e analisi supplementari eseguite per la calibrazione e la valutazione del sistema).

I fattori chiave per la riuscita e l'affidabilità dell'analisi dei pesticidi con prestazioni GC/TQ stabili per oltre 700 iniezioni sono descritti nella nota applicativa 5994-4965ITE.⁶ Le migliori pratiche adottate in questo lavoro hanno incluso:

- Preparazione del campione semplificata e migliorata resa possibile dalla purificazione innovativa e migliorata Captiva EMR pass-through eseguita dopo l'estrazione QuEChERS tradizionale.

- Valutazione del carico della matrice nella sorgente in modalità di acquisizione dei dati in scansione completa.
- Backflush post-analisi possibile con le configurazioni convenzionale da 15 x 15 m e minibore da 10 x 10 m con backflush a metà colonna.
- Sistema GC/TQ senza perdite con i dadi autoserranti per colonna con collare e le ferrule metalliche flessibili dorate CFT.
- Uso di MMI a temperatura programmabile con liner dimpled Ultra Inert da 2 mm (senza lana di vetro).

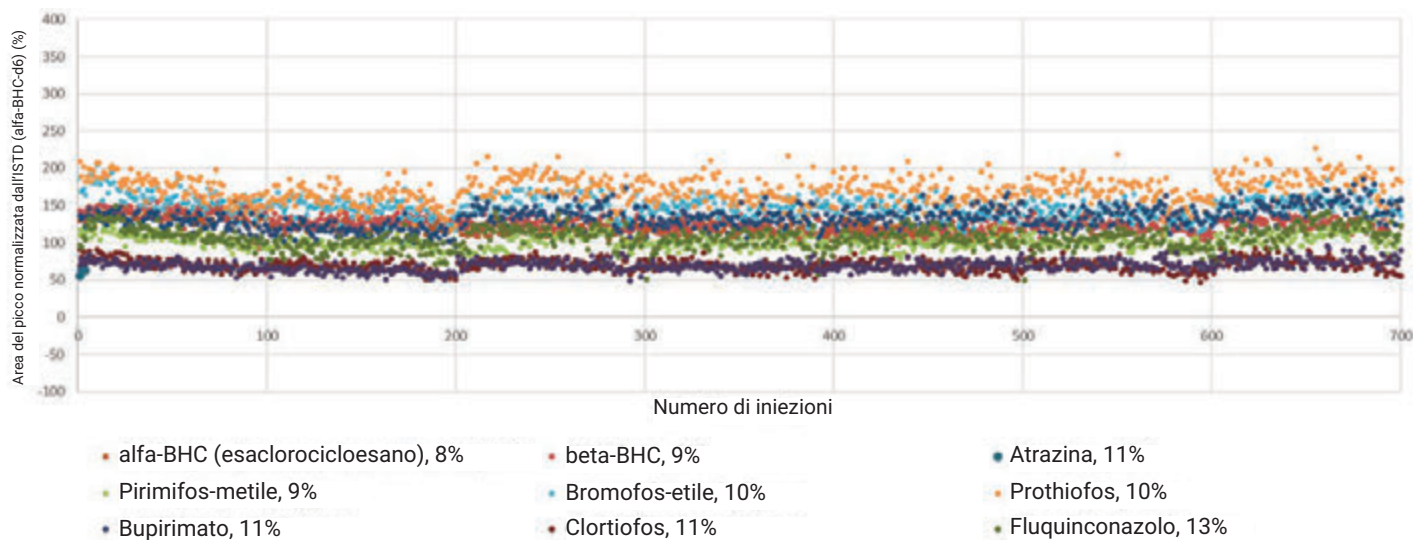


Figura 7. Stabilità dell'area del picco per i pesticidi aggiunti a 20 ppb all'estratto di spinaci, normalizzata dall'ISTD, su 700 iniezioni consecutive. Analisi in 10 minuti con la configurazione convenzionale delle colonne da 15 x 15 m abbinata al sistema GC/MS a triplo quadrupolo Agilent 7000E.

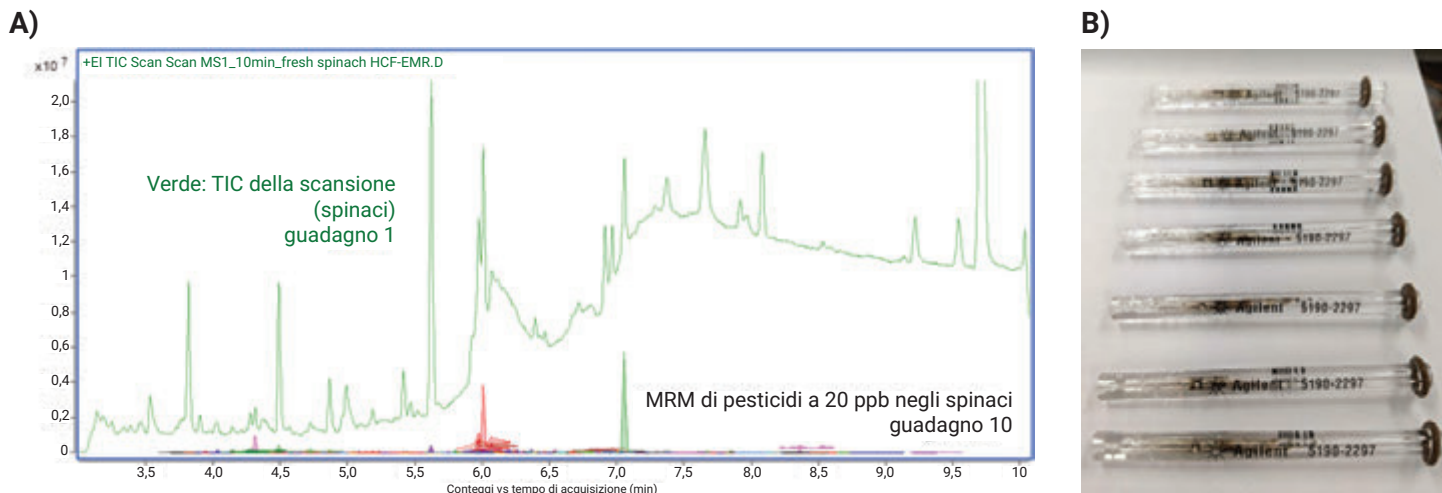


Figura 8. (A) TIC di un cromatogramma a scansione completa acquisito per l'estratto di spinaci e TIC MRM per pesticidi a 20 ppb. (B) I liner per iniettore GC sostituiti dopo 100 iniezioni nell'analisi dell'estratto di spinaci nel corso della valutazione della robustezza.

L'estratto di spinaci ricco di pigmenti selezionato per il test della robustezza possedeva un fondo relativamente elevato in modalità di acquisizione dei dati in scansione completa, come mostrato in Figura 8A, rispetto all'abbondanza del segnale MRM per i pesticidi a 20 ppb. I liner sostituiti dopo 100 iniezioni, sette volte nel corso dello studio della robustezza, sono mostrati in Figura 8B. Ciò indica che l'estratto di spinaci costituisce effettivamente un banco di prova complesso per l'analisi GC/MS e, pertanto, si è rivelato una matrice adeguata per la valutazione della robustezza delle prestazioni.

Conclusione

Questa nota applicativa ha descritto due configurazioni dei sistemi GC/TQ con backflush a metà colonna; entrambe consentono un'analisi affidabile dei pesticidi in 10 minuti, preservando al contempo una risoluzione cromatografica sufficiente per 203 composti. Le configurazioni convenzionale da 15 x 15 m (0,25 mm x 0,25 µm) e minibore da 10 x 10 m (0,18 mm x 0,18 µm) con backflush a metà colonna sono state

impiegate per ottenere un tempo di analisi pari a 10 minuti. I risultati dimostrano che è stata ottenuta un'eccellente linearità, in un range dinamico di calibrazione compreso tra 0,1 e 1.000 ppb o tra 0,5 e 1.000 ppb, con i sistemi GC/MS a triplo quadrupolo Agilent 7010C e serie 7000. La robustezza del metodo è stata provata tramite 700 iniezioni consecutive di estratto di spinaci con aggiunta di pesticidi a 20 ppb.

Bibliografia

1. Database MRM per pesticidi e residui di inquinanti ambientali (P&EP 4.0) Agilent MassHunter. G9250AA. <https://www.agilent.com/en/product/gas-chromatography-mass-spectrometry-gc-ms/gc-ms-application-solutions/gc-ms-ms-pesticides-analyzer>
2. Le colonne per GC personalizzate Agilent possono essere ordinate sul sito web <https://explore.agilent.com/individual-column>
3. 40 CFR § 180.435 - Deltamethrin; tolerances for residues. [https://www.law.cornell.edu/cfr/text/40/180.435#:~:text=\(2\)%20A%20tolerance%20of%200.05,establishments%20or%20as%20a%20wide](https://www.law.cornell.edu/cfr/text/40/180.435#:~:text=(2)%20A%20tolerance%20of%200.05,establishments%20or%20as%20a%20wide). Accesso effettuato in data 22 aprile 2022.
4. Index to Pesticide Chemical Names, Part 180 Tolerance Information, and Food and Feed Commodities (by Commodity), US EPA. 12 dicembre 2012. <https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-01/documents/tolerances-commodity.pdf>. Accesso effettuato in data 28 aprile 2022.
5. IPCS INCHEM. <https://incchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v072pr04.htm>. Accesso effettuato in data 28 aprile 2022.
6. Andrianova, A; Zhao, L. Cinque fattori chiave per ottenere le massime prestazioni nell'analisi GC/MS/MS di oltre 200 pesticidi in matrici alimentari complesse, *nota applicativa Agilent Technologies*, codice pubblicazione 5994-4965ITE, **2022**.

Appendice 1

Composti analizzati in questo lavoro e rispettivi tempi di ritenzione osservati con le configurazioni a due colonne e separazioni di 10 minuti.

Nome	Tempo di ritenzione (min)		Nome	Tempo di ritenzione (min)	
	15 x 15 m	10 x 10 m		15 x 15 m	10 x 10 m
Allidocloro	3,773	2,542	gamma-BHC (lindano, gamma-HCH)	5,201	4,174
Diclorobenzonitrile, 2,6-	3,972	2,720	Pirimetanil	5,222	4,246
Bifenile	4,055	2,812	Teflutrin	5,223	4,310
Mevinfos, E-	4,110	2,901	Fonofos	5,225	4,223
3,4-dicloroanilina	4,193	2,954	Pentacloronitrobenzene	5,227	4,210
Pebulato	4,223	3,006	Pentaclorobenzonitrile	5,247	4,228
Etridiazolo	4,246	3,016	Disulfoton	5,273	4,312
N-(2,4-dimetilfenil)formammide	4,305	3,091	Isazofos	5,285	4,361
cis-1,2,3,6-tetraidroftalimide	4,312	3,090	Terbacil	5,285	4,323
Metacrifos	4,321	3,129	Triallato	5,322	4,379
Cloroneb	4,375	3,171	delta-BHC	5,330	4,351
2-fenilfenolo	4,444	3,228	Clorotalonil	5,350	4,392
Pentaclorobenzene	4,495	3,276	Propanil	5,463	4,570
Propaclor	4,702	3,546	Endosulfan etere	5,466	4,523
Tecnazene	4,712	3,547	Transflutrina	5,476	4,658
Difenilammina	4,734	3,582	Dimetacloro	5,477	4,596
Cicloato	4,757	3,626	Pentacloroanilina	5,482	4,552
Clorprofam	4,769	3,656	Acetocloro	5,502	4,641
2,3,5,6-tetracloroanilina	4,793	3,633	Vinclozolin	5,503	4,654
Trifluralin	4,798	3,724	Paration-metile	5,526	4,668
Benfluralin	4,811	3,740	Clorpirifos metile	5,526	4,668
Etalfuralina	4,812	3,670	Tolclofos-metile	5,559	4,710
Sulfotep	4,869	3,789	Alaclor	5,564	4,725
Diallato I	4,928	3,846	Propisoclor	5,579	4,765
Phorate	4,932	3,852	Metalaxil	5,583	4,763
beta-BHC	5,010	4,115	Ronnel	5,614	4,791
alfa-BHC (esaclorocicloesano)	5,011	3,918	Prodiammina	5,622	4,871
Esaclorobenzene	5,069	3,987	Eptacloro	5,630	4,763
Atrazina	5,072	4,048	Pirimifos-metile	5,650	4,892
Dicloran	5,072	3,998	Fenitroton	5,676	4,891
Pentacloroanisolo	5,083	4,013	Malation	5,696	4,962
Clomazone	5,122	4,092	Linuron	5,708	4,927
Profluralin	5,123	4,156	Diclofluamide	5,745	4,980
Terbutilazina	5,155	4,163	Pentaclorotioanisolo	5,767	4,972
Terbufos	5,173	4,178	Aldrin	5,768	5,061
Propizamide	5,175	4,188	Fention	5,779	5,057
Diazinone	5,191	4,244	Metolaclor	5,783	5,046
Flucloralin	5,199	4,261	Clorpirifos	5,790	5,075

Nome	Tempo di ritenzione (min)		Nome	Tempo di ritenzione (min)	
	15 x 15 m	10 x 10 m		15 x 15 m	10 x 10 m
Parathion	5,793	5,081	Clorfensone	6,275	5,784
Triadimefon	5,811	5,100	Nonacloro, trans-	6,279	5,787
DCPA (dactal, clortal-dimetile)	5,829	5,124	Dieldrin	6,279	5,955
Antrachinone	5,831	5,053	Fludioxonil	6,294	5,876
Diclorobenzofenone, 4,4'-	5,840	5,110	Prothiofos	6,300	5,844
Pirimifos-etile	5,869	5,241	Oxadiazon	6,303	5,920
MGK-264	5,881	5,315	Pretilaclor	6,303	5,895
Isopropalina	5,898	5,267	Iodofenfos	6,304	5,828
Fenson	5,902	5,194	Profenofos	6,312	5,877
Difenamide	5,908	5,235	Ossifluorfen	6,314	5,960
Bromofos	5,918	5,237	DDE-p,p'	6,342	5,906
Ciprodinil	5,941	5,314	Bupirimato	6,361	6,014
Pendimetalin	5,975	5,356	Miclobutanil	6,364	5,970
Clozolinato	5,976	5,378	Clorfenapir	6,365	6,122
Alletrina	5,979	5,393	Flusilazolo	6,370	5,995
Triflumizolo	5,979	5,473	Fluazifop-p-butile	6,388	6,090
Fipronil	5,993	5,431	DDD-o,p'	6,404	5,990
Penconazolo	5,998	5,375	Triciclazolo	6,412	5,932
Metazaclor	5,999	5,358	Endrin	6,423	6,153
Clorfenvinfos	6,016	5,436	Ethylan	6,453	6,121
Eptacloro eso-epossido	6,016	5,402	Nitrofen	6,477	6,101
Isodrin	6,018	5,319	Clorobenzilato	6,506	6,189
Captano	6,020	5,472	Etion	6,571	6,315
Tolilfluamide	6,026	5,413	DDD-p,p'	6,582	6,280
Bromfenvinfos-metile	6,036	5,436	DDT-o,p'	6,582	6,318
Quinalfos	6,047	5,463	Clortiofos	6,587	6,338
Triadimenolo	6,053	5,476	Endosulfan II (isomero beta)	6,603	6,235
Procimidone	6,090	5,515	Triazofos	6,644	6,428
Folpet	6,127	5,513	Sulprofos	6,659	6,420
Paclobutrazolo	6,137	5,653	Nonacloro, cis-	6,667	6,341
Clorbenside	6,137	5,549	Carfentrazone-etile	6,668	6,509
Bromofos-etile	6,139	5,609	Metossicloro olefina	6,702	6,519
DDE-o,p'	6,176	5,631	Endrin-aldeide	6,709	6,402
Tetraclorvinfos	6,181	5,680	Carbofenontione	6,726	6,513
Clordano-trans	6,187	5,610	Norflurazon	6,754	6,576
Clordano-cis	6,196	5,744	Edifenfos	6,786	6,566
Fenamifos	6,227	5,797	Lenacil	6,787	6,588
Flutolanil	6,233	5,801	DDT-p,p'	6,805	6,615
Bromfenvinfos	6,252	5,800	Iprodione	6,826	6,947
Flutriafol	6,255	5,764	Metossicloro, o,p'-	6,846	6,703
Endosulfan I (isomero alfa)	6,274	5,724	Endosulfan solfato	6,852	6,610

Nome	Tempo di ritenzione (min)		Nome	Tempo di ritenzione (min)	
	15 x 15 m	10 x 10 m		15 x 15 m	10 x 10 m
Piperonil butossido	6,854	6,788	Acrinatrina	7,415	7,607
Propargite	6,856	6,760	Leptofos	7,417	7,413
Resmetrina	6,857	6,756	Pirazofos	7,556	7,660
Esazinone	6,861	6,708	Fenarimol	7,631	7,641
Tebuconazolo	6,886	6,739	Mirex	7,636	7,533
Captafol	6,890	6,805	Piraclofos	7,645	7,728
Nitralin	6,913	6,862	Azinfos-etile	7,675	7,700
Bifentrin	7,044	7,057	Permetrina, (1R)-cis-	7,785	7,901
Piridafention	7,048	7,004	Permetrina, (1R)-trans-	7,842	7,962
Tetrametrina I	7,052	6,999	Piridaben	7,916	7,980
Fenpropatrina	7,106	7,121	Cumafos	7,964	8,028
Bromopropilato	7,109	7,061	Fluquinconazolo	7,964	8,023
EPN	7,112	7,061	Procloraz	7,988	8,058
Tebufenpirad	7,130	7,152	Ciflutrina I	8,157	8,184
Metossicloro, p,p'-	7,131	7,111	Cipermetrina I	8,250	8,339
Fosmet	7,135	7,054	Flucitrinato I	8,359	8,444
Endrin-chetone	7,189	7,033	Acechinocil	8,409	8,534
Fenotrina I	7,230	7,243	Etofenprox	8,431	8,485
Azinfos-metile	7,330	7,405	Fluridone	8,708	8,662
Tetradifon	7,330	7,305	Fenvalerato I	8,881	8,799
Cialotrina (lambda)	7,334	7,438	Fluvalinato-tau I	8,970	8,894
Piriproxifen	7,358	7,406	Deltametrina	9,444	9,166
Fosalone	7,389	7,387			

www.agilent.com

DE13474802

Le informazioni fornite potrebbero variare senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2022
Stampato negli Stati Uniti, 29 settembre 2022
5994-4967ITE