

Cinco práticas para alcançar o desempenho máximo na análise de mais de 200 pesticidas em matrizes alimentares desafiadoras por GC/MS/MS



Autores

Anastasia A. Andrianova
e Limian Zhao
Agilent Technologies, Inc.

Resumo

Esta nota de aplicação descreve cinco práticas recomendadas para melhorar o desempenho analítico na análise de mais de 200 pesticidas em matrizes desafiadoras, incluindo espinafre, noz e pimenta caiena. O novo procedimento de limpeza por permeabilidade Agilent EMR Captiva após a extração AOAC Agilent permitiu um sinal de background da matriz mais limpo. A limpeza e extração reduziram as interferências da matriz nos analitos alvo e estenderam o tempo de operação sem manutenção do instrumento. O desempenho da calibração foi demonstrado em uma ampla faixa dinâmica de mais de quatro ordens de magnitude. Foi demonstrado que o sistema GC/MS Agilent 8890/7000E triplo quadrupolo alcançou excelente linearidade em uma faixa de concentração de 0,1 a 5.000 ppb. O sistema GC/MS Agilent 8890/7010C triplo quadrupolo demonstrou sensibilidade superior, produzindo uma razão sinal-ruído mais alta em concentrações mais baixas.

Introdução

A indústria agrícola global utiliza mais de mil pesticidas diferentes na produção de alimentos. Os produtores precisam dos pesticidas para atender à crescente demanda por alimentos com preços razoáveis. Essa crescente demanda causou aumento no uso de pesticidas e incentivou práticas agrícolas problemáticas que trazem riscos consideráveis ao suprimento de alimentos e ao meio ambiente. As preocupações com a presença de contaminantes químicos em nível de traços em alimentos estão impulsionando a demanda por métodos mais rápidos e confiáveis para a identificação e quantificação de resíduos químicos. Os sistemas de GC/MS triplo quadrupolo (GC/TQ) **Agilent 8890/7000E** e **8890/7010C** são ideais para atender a essa necessidade.

A Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos EUA define tolerâncias como parte das considerações de segurança alimentar.¹ A tolerância corresponde ao nível máximo de resíduo (MRL), que é o limite máximo de resíduos de pesticidas permitidos no produto alimentício tratado. Os MRLs podem variar em uma ampla faixa de concentração, que depende de diferentes pesticidas e produtos alimentares. Por exemplo, os MRLs estabelecidos para 68 pesticidas regulamentados no espinafre variam de 10 ppb de fludioxonil a 60.000 ppb de boscalid.² Esses limites criam um desafio para a análise, exigindo alta sensibilidade e capacidade de calibração em uma ampla faixa dinâmica.

Os cinco componentes principais para uma análise de pesticidas bem-sucedida discutidos nesta nota de aplicação são:

- 1 Eficiência na extração de amostras e limpeza de matrizes, minimizando o sinal de background e interferências da matriz enquanto mantém altas recuperações dos pesticidas. Além disso, um método analítico robusto que atinja o desempenho do método necessário enquanto aumenta o tempo em atividade sem necessidade de manutenção.

- 2 Avaliação da matriz no modo de aquisição de dados de varredura completa para garantir o desempenho mais eficiente, especialmente com a fonte de alta eficiência (HES).
- 3 Backflush entre colunas para estender uma operação ininterrupta e livre de manutenções. Essa técnica minimiza a necessidade de corte da coluna e limpeza da fonte, enquanto permite reduzir o tempo de análise.
- 4 Um sistema de GC/TQ sem vazamentos prolonga a vida útil da coluna para GC e facilita o desempenho de MS consistente e confiável, com menos manutenção.
- 5 Uso do injetor multimodal (MMI) Agilent de temperatura programável com um liner com fenda de 2 mm (sem lã de vidro) para garantir a volatilização eficiente até mesmo de compostos termicamente lábeis.

Esta nota de aplicação demonstra a análise de mais de 200 pesticidas em três matrizes desafiadoras, incluindo espinafre com matriz fresca com alto teor de clorofila, pimenta caiena com matriz complexa seca e noz com matriz oleosa seca. As amplas faixas dinâmicas alcançadas com a alta sensibilidade do método permitiram a quantificação precisa de pesticidas nessas matrizes, em seus MRLs.

Calibrações de matrizes combinadas com $R^2 > 0,99$ em uma ampla faixa dinâmica de 0,1 a 5.000 ppb foram alcançadas com o GC/TQ 7000E e de 0,1 a 1.000 ppb com o GC/TQ 7010C. O GC/TQ 7010C com HES apresentou sensibilidade superior, produzindo alta razão sinal-ruído mesmo em baixas concentrações e permitiu a quantificação precisa em concentrações abaixo de 0,1 ppb. No entanto, isso não foi uma exigência neste trabalho, pois os MRLs para pesticidas regulamentados para os produtos de interesse não exigem quantificação abaixo de 0,1 ppb.

Parte Experimental

Análise de GC/TQ

Os sistemas GC/TQ 8890/7000E e 8890/7010C (Figura 1A) foram usados e configurados para obter o melhor desempenho em uma ampla faixa de calibração. Essa faixa de calibração incluiu os diversos MRLs para pesticidas regulamentados nos produtos analisados. O GC foi configurado com amostrador automático de líquidos Agilent 7693A (ALS) e bandeja de 150 posicionamentos. O sistema utilizou um injetor multimodal (MMI) operado no modo de injeção splitless com temperatura programável. O recurso de backflush entre coluna foi fornecido pelo Agilent Purged Ultimate Union (PUU) instalado entre duas colunas idênticas de 15 m e o módulo de dispositivo pneumático de alternância (PSD) do 8890 (Figura 1B). Os parâmetros operacionais do instrumento são mostrados na Tabela 1.

Os dados foram adquiridos no modo MRM dinâmico (dMRM), que permite analisar grandes ensaios com diversos analitos e quantificar com precisão picos estreitos através de uma distribuição automatizada e eficiente de mínimo de dwell time para MRM. O recurso dMRM permitiu uma análise bem-sucedida para um grande painel de 203 pesticidas com 614 transições MRM totais com até 52 MRMs simultâneos (Figura 2). Além disso, o dMRM permite que o analista adicione e remova analitos com facilidade. O método de aquisição foi configurado com travamento do tempo de retenção para corresponder aos tempos de retenção do banco de dados MRM de pesticidas e contaminantes ambientais (P&EP 4) Agilent MassHunter, que foi utilizado para criar o método MS de forma transparente. O uso do P&EP 4 aumentou a facilidade e a velocidade de configuração de um método dMRM direcionado. O método de aquisição foi travado pelo tempo de retenção com a biblioteca P&EP.

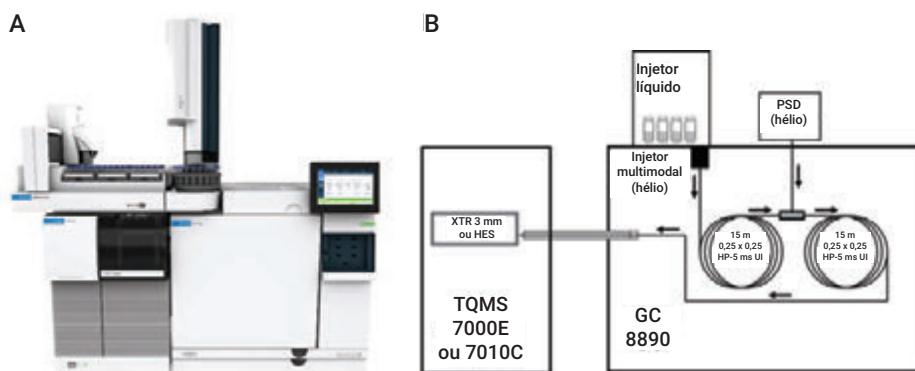


Figura 1. O sistema GC/TQ Agilent 8890/7000E e 8890/7010C (A) e a configuração de sistema (B).

Tabela 1. Condições do cromatógrafo gasoso e espectrômetro de massas Agilent 8890/7000E e 8890/7010C para a análise de pesticidas.

GC		Coluna 1		MSD	
Agilent 8890 com forno rápido, amostrador automático e bandeja		Tipo	Agilent HP-5ms UI (p/n 19091S-431UI-KEY)	Modelo	Agilent 7000E ou 7010C
Injetor	Injetor multimodal (MMI)	Comprimento	15 m	Fonte	Fonte de extração inerte com lente de 3 mm ou HES
Modo	Splitless	Diâmetro	0,25 mm	Bomba de vácuo	Desempenho turbo
Fluxo de purga para split vent	60 mL/min em 0,75 min	Espessura do filme	0,25 µm	Arquivo de tuning	Atunes.eiex.jtune.xml ou Atunes.eihs.jtune.xml
Fluxo de purga do septo	3 mL/min	Modo de controle	Fluxo constante	Delay de solvente	3 min
Modo de fluxo de purga do septo	Alternado	Fluxo	1,016 mL/min	Temperatura quad (MS1 e MS2)	150 °C
Volume de injeção	1,0 µL	Conexão de entrada	Injetor multimodal (MMI)	Temperatura da fonte	280 °C
Tipo de injeção	Padrão	Conexão de saída	PSD (PUU)	Modo	dMRM ou varredura
Airgap L1	0,2 µL	Fluxo de purga do PSD	5 mL/min	Gás quench He	2,25 mL/min
Economia de gás	Ligado em 30 mL/min após 3 min	Fluxo pós-corrida (Backflush)	-7,873	Gás de colisão N ₂	1,5 mL/min
Temperatura do injetor	60 °C para 0,1 min, então até 280 °C a 600 °C/min	Coluna 2		Estatísticas de MRM	
Temperatura do injetor pós-corrida	310 °C	Tipo	Agilent HP-5ms UI (p/n 19091S-431UI-KEY)	Total de MRMs (modo dMRM)	614
Fluxo total pós-corrida	25 mL/min	Comprimento	15 m	Mínimo de dwell time para MRM	6,85 ms
Gás de arraste	Hélio	Diâmetro	0,25 mm	Tempo do ciclo mínimo	69,8 ms
Liner do injetor	Liner Agilent Ultra Inert com fenda de 2 mm (p/n 5190-2297)	Espessura do filme	0,25 µm	Máximo de MRMs simultâneos	52
Forno		Modo de controle	Fluxo constante	Modo de ganho de tensão EM	10
Temperatura inicial do forno	60 °C	Fluxo	1,216 mL/min	Parâmetros de varredura	
Tempo de espera inicial do forno	1 min	Conexão de entrada	PSD (PUU)	Tipo de varredura	MS1 Scan
Taxa de aumento 1	40 °C/min	Conexão de saída	MSD	Faixa de scan	m/z 45 a 450
Temp final 1	170 °C	Fluxo pós-corrida (Backflush)	8,202	Tempo de varredura (ms)	220
Tempo de espera final 1	0 min			Tamanho da etapa	0,1 amu
Taxa de aumento 2	10 °C/min			Limiar	0
Temp final 2	310 °C			Modo de ganho de tensão EM	1
Tempo de espera final 2	2,25 min				
Tempo de corrida total	20 min				
Tempo pós-corrida	1,5 min				
Tempo de equilíbrio	0,25 min				

O modo de aquisição de dados de varredura completa foi usado para a verificação preliminar do extrato da matriz. Essa verificação foi usada para avaliar o carregamento na fonte e para monitorar a eficiência da limpeza de amostras.

O Agilent MassHunter Workstation revisão 10.1 e 10.2, incluindo o software MassHunter Acquisition 10.2 para sistemas GC/MS, e pacotes MassHunter Quantitative 10.1 e MassHunter Qualitative 10, foram usados neste trabalho.

O desempenho da calibração foi avaliado usando uma série de padrões de calibração de matrizes combinadas variando de 0,1 a 5.000 ppb, incluindo 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 50, 100, 250, 500, 1.000 e 5.000 ppb. O padrão α -BHC- d_6 a uma concentração final de 20 ppb no vial foi usado como padrão interno para quantificação dos pesticidas-alvo. Um ajuste de regressão linear ou quadrática com fator de ponderação de $1/x$ foi aplicado a todas as curvas de calibração.

Preparo de amostras

Um fluxo de trabalho de preparo de amostras é mostrado na Figura 3. O preparo de amostras incluiu duas etapas principais: extração de amostras pela extração AOAC tradicional, seguida pela limpeza por permeabilidade do EMR Captiva. Diferentes produtos EMR Captiva foram usados para diferentes matrizes de acordo com os diferentes desafios de matriz. Um cartucho EMR Captiva-HCF foi usado para a matriz fresca com alto teor de clorofila do espinafre. EMR Captiva-LPD foi usado para a matriz oleosa seca de baixa pigmentação da noz. EMR Captiva-GPD foi usado para a matriz seca muito desafiadora da pimenta caiena. O novo fluxo de trabalho de preparo de amostras demonstra um procedimento simplificado com melhoria na remoção de matriz de amostras e na qualidade de dados de quantificação de compostos de interesse.

Conforme mostrado na Figura 3, as amostras foram extraídas primeiro pelo kit de extração QuEChERS EN tradicional (part number 5892-5650). Para espinafre fresco, 10 g de amostra homogeneizada de espinafre foi usada para extração. Para a noz, foram utilizados 5 g de pó de noz, seguido da adição de 10 mL de água e 10 minutos de vórtex. Para pimenta caiena, foram usados 2 g de pó de pimenta caiena, seguido da adição de 10 mL de água e 10 minutos de vórtex. Os 10 mL de ACN com ácido acético 1% foram então adicionados para extração, seguidos de extração QuEChERS EN. Após a extração, 3 mL de extrato bruto ou com 10% de mistura com água foram transferidos para cartuchos EMR Captiva para limpeza por permeabilidade. Os seguintes cartuchos foram utilizados: Remoção avançada de

matriz Captiva para matriz fresca com alto teor de clorofila, com NH_2 , (EMR Captiva-HCF1, part number 5610-2088) para o espinafre, remoção avançada de matriz Captiva para matriz seca com baixo teor de pigmentos (EMR Captiva-LPD, part number 5610-2092) para a noz e remoção avançada de matriz Captiva para matriz seca com pigmentos em geral (EMR Captiva-GPD, part number 5610-2091) para a pimenta caiena. O eluente da amostra foi coletado e seco usando $MgSO_4$ anidro, (part number 5982-0102) e então, as amostras estavam prontas para análise por GC/TQ. O manifold de pressão positiva com 48 processadores (PPM-48, part number 5191-4101) foi usado para o processamento de limpeza por permeabilidade do EMR Captiva.



Figura 2. A distribuição de 614 transições de MRM com até 52 MRMs simultâneos monitorados durante a análise, permitindo uma distribuição mais eficiente de mínimo de dwell time para MRM.

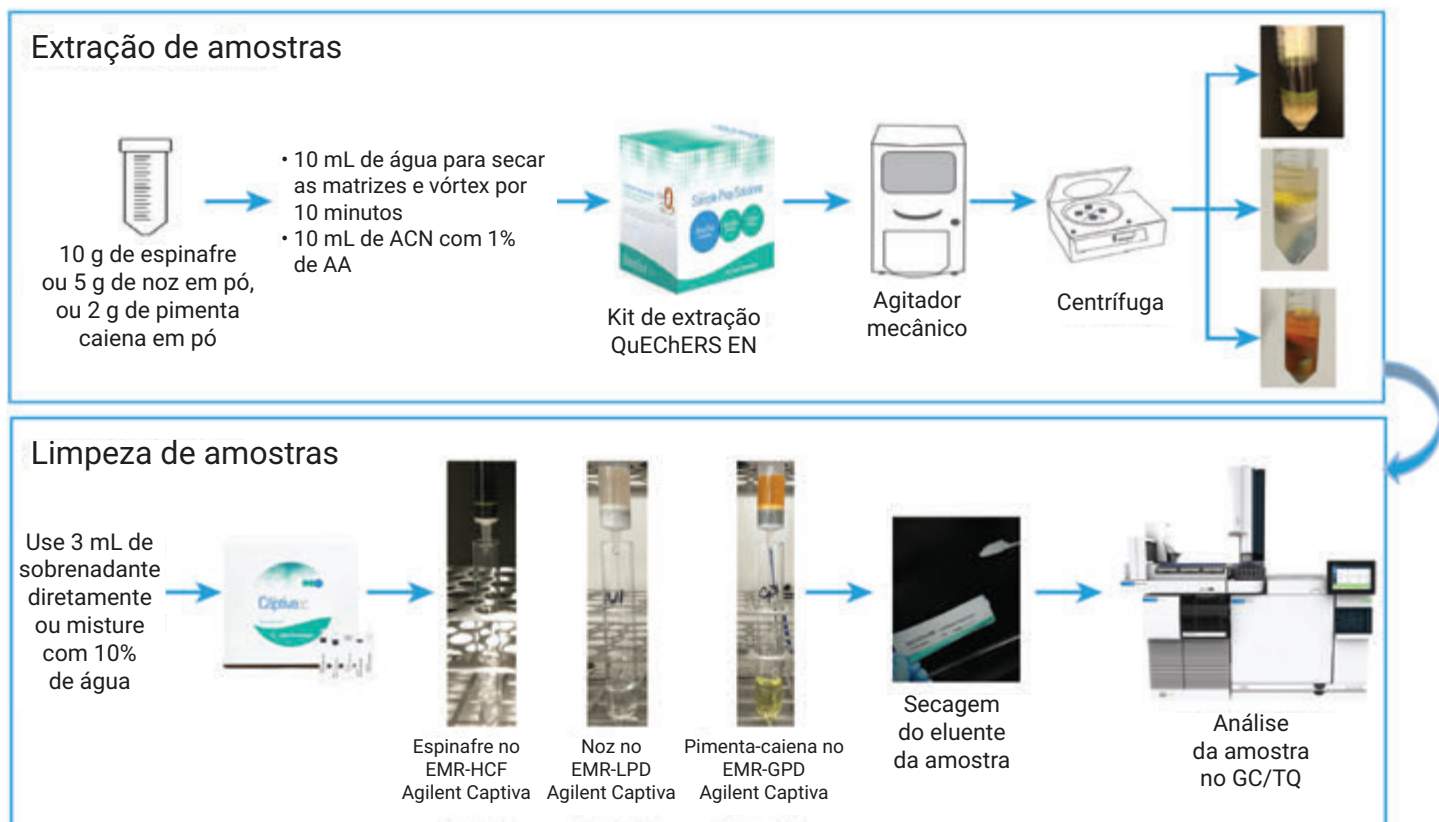


Figura 3. Fluxograma de preparo de amostras, incluindo extração AOAC tradicional, seguida de limpeza por permeabilidade EMR Captiva.

Resultados e discussão

Uma análise robusta de pesticidas que suporta um fluxo de trabalho de alta produtividade deve fornecer uma operação estendida sem necessidade de manutenção, com tempo de parada mínimo. O fluxo de trabalho também deve atender à sensibilidade necessária que pode chegar a níveis de sub-ppb. Também deve permitir bom desempenho de calibração em uma ampla faixa dinâmica que inclua os MRLs para os compostos monitorados no produto, que geralmente variam em uma ampla faixa dinâmica. As cinco principais estratégias descritas nesta nota de aplicação permitiram atingir limites de quantificação (LOQs) de até 0,1 ppb, mantendo o desempenho de calibração em uma faixa de até 5.000 ppb para o 7000E e 1.000 ppb para o 7010C. Além disso, as estratégias minimizam o tempo de inatividade do instrumento, apenas com a substituição do liner e do septo a cada ~100 injeções.

O trabalho apresentado nesta nota de aplicação e o estudo de robustez do sistema com 700 injeções consecutivas³ resultaram em mais de 1.000 injeções de extratos de matriz complexa, incluindo espinafre, noz e pimenta caiena. Durante esse período, não houve necessidade de realizar o tune do MS TQ, limpeza da fonte ou corte da coluna para GC.

Preparo de amostras

A extração de amostras e a limpeza de matrizes eficientes são essenciais para uma análise de pesticidas bem-sucedida. A análise de extratos QuEChERS brutos, especialmente para matrizes complexas pigmentadas e oleosas, pode aumentar significativamente a necessidade de substituição de liner, limpeza do injetor, corte da coluna para GC e limpeza da fonte do MS. Esses procedimentos de manutenção diminuem a taxa de transferência da análise. Uma limpeza eficiente de matrizes após uma extração

AOAC reduz o carregamento da matriz na fonte e as interferências nos compostos alvo, enquanto melhora a razão sinal-ruído, a precisão e a reprodutibilidade dos pesticidas-alvo. Neste trabalho foi usada a limpeza por permeabilidade do EMR Captiva após a extração AOAC tradicional. O novo protocolo de limpeza de amostras é um procedimento simplificado que demonstra melhoria na remoção da matriz de amostras e na recuperação geral e reprodutibilidade dos compostos alvo. Conforme mostrado na Figura 4, a abundância do sinal TIC no modo de aquisição de dados de varredura completa foi visivelmente reduzida para extratos de espinafre, noz e pimenta caiena após a limpeza, comparado aos extratos brutos antes da limpeza.

Verificação da matriz no modo de aquisição de dados de varredura completa

A realização de uma verificação de amostra no modo de aquisição de dados de varredura completa facilita a avaliação do carregamento da matriz na fonte. Cada fonte MS tem uma limitação na quantidade de material suportado pela fonte, em qualquer momento da análise, para manter um desempenho ideal. A precisão da quantificação da análise pode ser significativamente comprometida se a fonte for sobrecarregada com matriz. Portanto, é essencial analisar a matriz no modo de varredura completa para avaliação do TIC e para manter o desempenho ideal do GC/TQ. Recomenda-se que a abundância do TIC no modo de varredura completa não exceda 7×10^7 contagens ao analisar com ganho de EM definido como 1. Das três matrizes analisadas, a pimenta caiena apresentou o maior sinal de background da matriz, embora visivelmente reduzido após o procedimento de limpeza. Esta avaliação revelou que os pesticidas que eluem entre 11 e 12,5 minutos deveriam ter desempenho sacrificado na matriz de pimenta caiena em relação a sensibilidade e a faixa dinâmica. Por exemplo, Endosulfan I eluiu em 11,273 minutos, e pode ser quantificado apenas a partir de 5 ppb na matriz de pimenta caiena no 7000E e 7010C, enquanto as matrizes de espinafre e noz tiveram coeluição dos níveis de matriz significativamente mais baixos, junto com Endosulfan I, com LOQ observado de 0,1 ppb. As práticas recomendadas sobre o uso do sistema de GC/TQ Agilent no modo de aquisição de dados de varredura completa podem ser encontradas na nota de aplicação 5994-3859EN.⁴

Algumas das práticas que podem ser empregadas para diminuir o sinal de background da matriz incluem limpeza adequada da amostra, diluição da amostra e redução do volume de injeção. As duas últimas abordagens geralmente resultam em LOQs melhores, especialmente no sistema de GC/TQ 7010C equipado com HES.

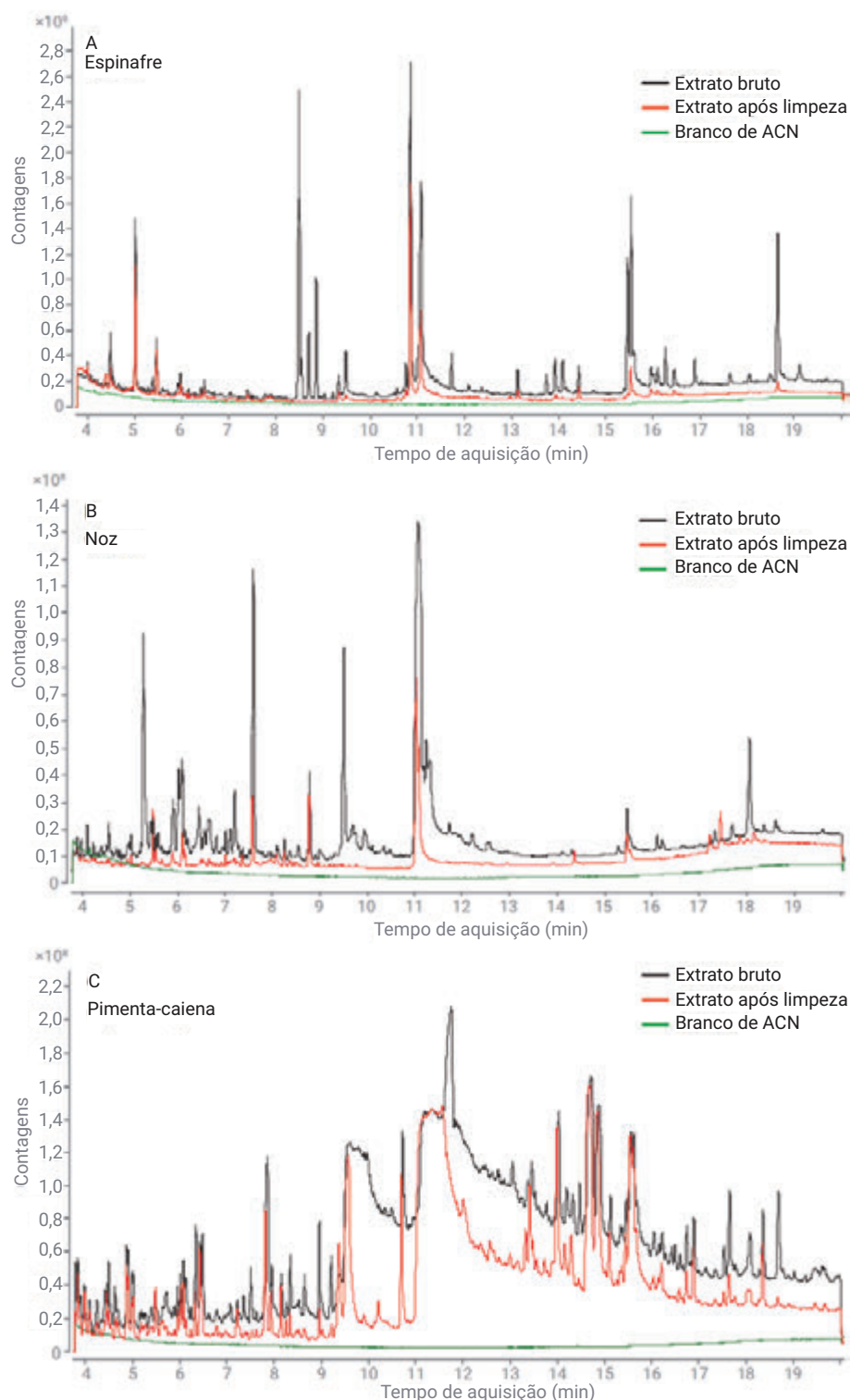


Figura 4. TIC de varredura dos extratos de espinafre (A), noz (B) e pimenta caiena (C). O traço vermelho corresponde à amostra de matriz com limpeza EMR Captiva e o traço preto corresponde à amostra de matriz sem limpeza. O traço verde corresponde ao branco de solvente de acetonitrila.

Backflush entre colunas

O uso da configuração de backflush entre colunas permite que o analista limite o tempo de análise ao tempo de retenção do último eluente de interesse. Matrizes desafiadoras, especialmente as oleosas, como a noz, são ricas em componentes de alto ponto de ebulição, com longos tempos de retenção. Esses tempos de retenção geralmente excedem os dos pesticidas-alvo. Uma maneira comum de evitar picos fantasma nas próximas corridas seria o condicionamento térmico de coluna estendido após o último analito alvo eluir da coluna. No entanto, esta abordagem tem várias desvantagens, incluindo a deposição de compostos de alto ponto de ebulição e da fase estacionária da coluna para GC na fonte de EI, contaminação da cabeça da coluna para GC, diminuição da vida útil da coluna e um tempo do ciclo mais longo devido ao condicionamento térmico prolongado.

O backflush entre colunas permite que componentes da matriz com alto ponto de ebulição eluam da coluna sem os problemas encontrados com a abordagem de condicionamento térmico. O backflush entre colunas é uma técnica na qual o fluxo de gás de arraste é revertido após o último analito sair da coluna. Depois que os dados de MS são coletados, o forno é mantido na temperatura final no modo pós-corrida e o fluxo de gás de arraste da primeira coluna é revertido. Esse fluxo reverso remove qualquer composto com elevado ponto de ebulição que estava na coluna após o final da coleta de dados. Os compostos com elevado ponto de ebulição são levados da cabeça da coluna para dentro do trap do split vent (Figura 5A). A capacidade de reversão do fluxo é fornecida pela Agilent Purged Ultimate Union (PUU). O PUU é um T posicionado, neste caso, entre duas colunas idênticas de 15 m.

Durante a análise, um pequeno fluxo makeup de gás de arraste do módulo do dispositivo pneumático de alternância (PSD) 8890 é usado para limpar a conexão. Durante o backflush, o fluxo makeup do PSD é aumentado consideravelmente, empurrando os compostos com elevado ponto de ebulição para trás na primeira

coluna enquanto simultaneamente fornece fluxo direto na segunda coluna. Para a configuração nesta aplicação, o tempo de backflush foi de 1,5 minutos. Mais detalhes sobre o uso do PSD para backflush no sistema GC 8890 podem ser encontrados na nota de aplicação 5994-0550EN.⁵

Os cromatogramas mostrados na Figura 5B ilustram a eficácia da técnica de backflush na redução do carryover da amostra no tempo do ciclo. O tempo do ciclo foi reduzido em 50% e as colunas não precisaram ser expostas a temperaturas mais altas de condicionamento térmico por tempo prolongado. Ao usar o backflush, o excesso de sangramento da coluna e resíduos pesados não entrarão no MSD, reduzindo o risco de contaminação da fonte de íons.

Além disso, a configuração de backflush entre colunas oferece um benefício significativo de economia de tempo quando acoplada ao injetor MMI. Procedimentos de manutenção, como troca de septo e liner, e corte de coluna podem ser realizados sem a necessidade de resfriar a linha de transferência e a fonte MS. Quando o septo é removido, o PSD fornece o gás de arraste fluindo para trás através da coluna 1. O PSD também evita que o ar entre nas colunas para GC e no MS. A capacidade de resfriamento rápido do MMI permite uma maior economia de tempo. Por esse motivo, a substituição do liner e do septo, que são os procedimentos de manutenção mais comuns, pode ser realizada em poucos minutos.

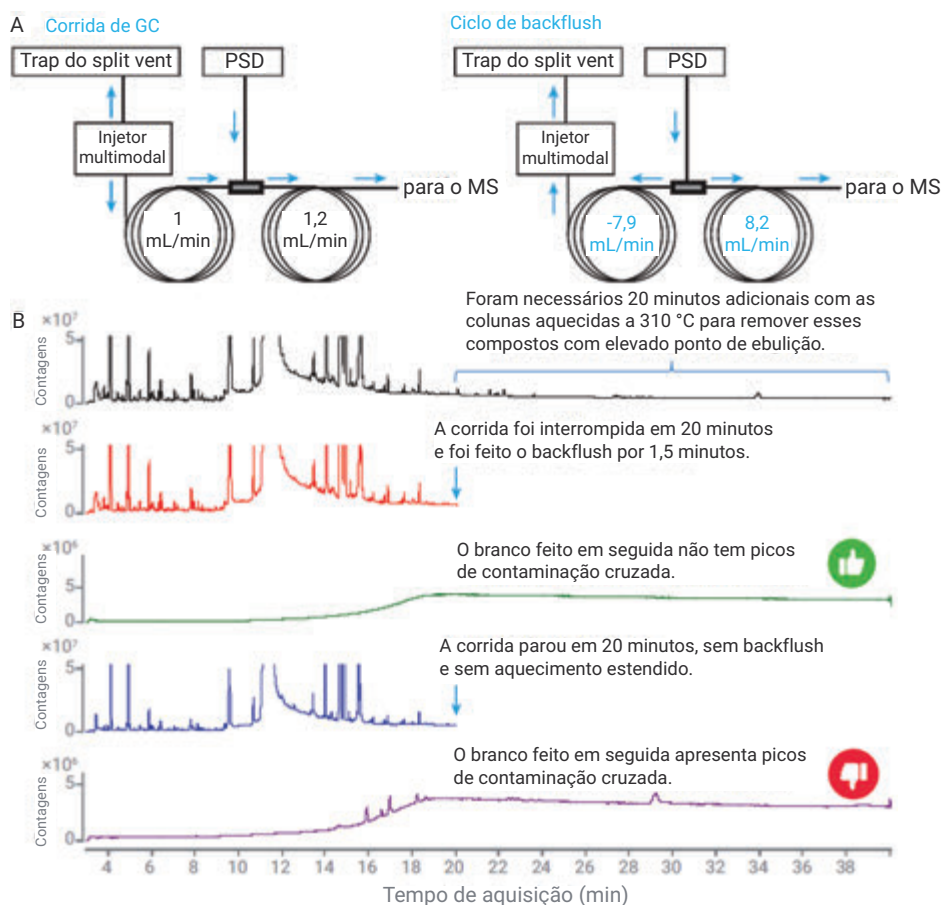


Figura 5. Configuração do backflush entre colunas e fluxo de gás durante a corrida do GC e o ciclo de backflush (A); cromatograma TIC de varredura do extrato de pimenta caiena seguido pelo branco do instrumento com aquecimento estendido da coluna, com backflush e sem backflush e condicionamento térmico (B).

Sistema de GC/TQ sem vazamentos

Manter o sistema GC/MS livre de vazamento é essencial para o desempenho do instrumento a longo prazo. Vazamentos indesejados reduzem a vida útil da coluna para GC e causam a oxidação da fonte de EI, comprometendo seu desempenho.

As ferramentas que permitem uma conexão firme tornam a instalação fácil e reproduzível, incluindo as porcas da coluna com autoajuste e colar para GC (Figuras 6A e 6B part number G3440-81011 e G3440-81013) e anilhas de metal flexível revestidas em ouro CFT (Figura 6C, part number G2855-28501).

As porcas da coluna com autoajuste e colar possuem um inovador pistão acionado por mola. O pistão pressiona continuamente contra a anilha curta de grafite/poliimida, mantendo uma tela de vedação sem vazamentos mesmo após centenas de ciclos de temperatura do forno. A adição do colar facilita a instalação da coluna no injetor do GC e na linha de transferência do MS, reduzindo a possibilidade de variações. O colar de travamento permite manter a coluna no lugar, para resultados de instalação precisos e reproduzíveis, sempre. A simplicidade do processo de instalação da coluna com as porcas da coluna com autoajuste e colar é demonstrada nestes vídeos.^{6,7} Quando a manutenção na fonte MS não é necessária, a porca com colar em conjunto com a ferramenta de instalação da coluna (part number G1099-20030) permite a instalação da coluna no MS sem abrir a porta lateral.

As anilhas de metal flexível revestidas em ouro são inertes e proporcionam uma vedação excepcionalmente confiável. Eles evitam a formação de micro vazamentos na conexão CFT (PUU) e permitem manter a alta sensibilidade do GC/TQ.



Figura 6. Porcas da coluna com autoajuste e colar para o injetor (A) e para conexão da linha de transferência do MS (B) e anilhas de metal flexível revestidas em ouro (C).

Para confirmar que o sistema está sem vazamentos, a verificação de ar/água ou o relatório autotune são frequentemente avaliados para determinar quanto de um vazamento é detectado pelo MS. No entanto, essa abordagem não ajuda a identificar a origem do vazamento. Além disso, é possível que micro vazamentos passem despercebidos, como os que podem estar presentes nas conexões do usuário.

O novo recurso de teste de vazamento está disponível com o GC/TQ 7000E e 7010C com MassHunter Data Acquisition 10.2 e superior. O teste de vazamento pode identificar a fonte e a magnitude do vazamento. A ferramenta monitora até 10 íons especificados pelo usuário (Figura 7A), incluindo íons de um gás para teste de vazamento, como poeiras do ar (m/z 69 e 83, Figura 7B). A ferramenta plota os cromatogramas correspondentes, incluindo EICs e TIC (Figura 7C).

Injeção otimizada com a injetor multimodal (MMI) com temperatura programável

A volatilização eficiente da amostra no injetor do GC é um componente essencial para uma análise de GC/MS bem-sucedida. Alguns pesticidas, como captafol, captano, dicofol, folpeto e deltametrina, são conhecidos por serem termicamente lábeis. É previsto que eles sofram degradação térmica durante a injeção. Iniciar a injeção a uma temperatura mais baixa, de 60 °C, e aumentar até 280 °C permite a volatilização de todos os analitos alvo, mantendo sua integridade química após a entrada na coluna para GC. Além disso, a capacidade de programação da temperatura do injetor permite um aquecimento do injetor até 310 °C na pós-corrida enquanto ocorre o backflush. Este aquecimento permite que o sistema elimine qualquer resíduo de matriz que ainda possa estar no injetor.

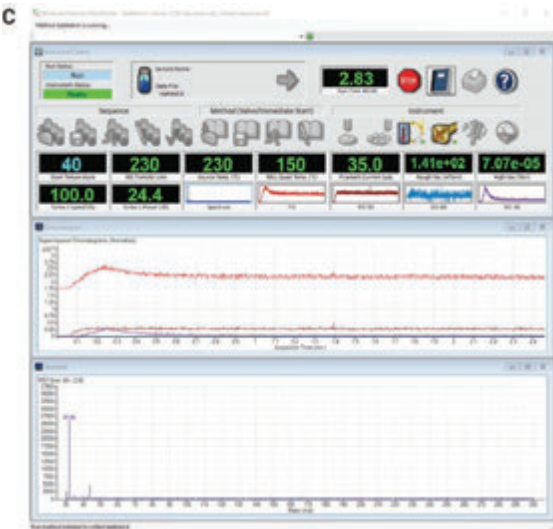
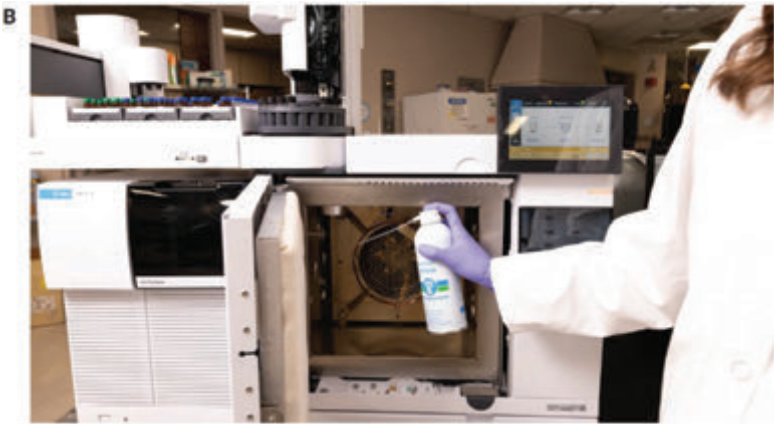
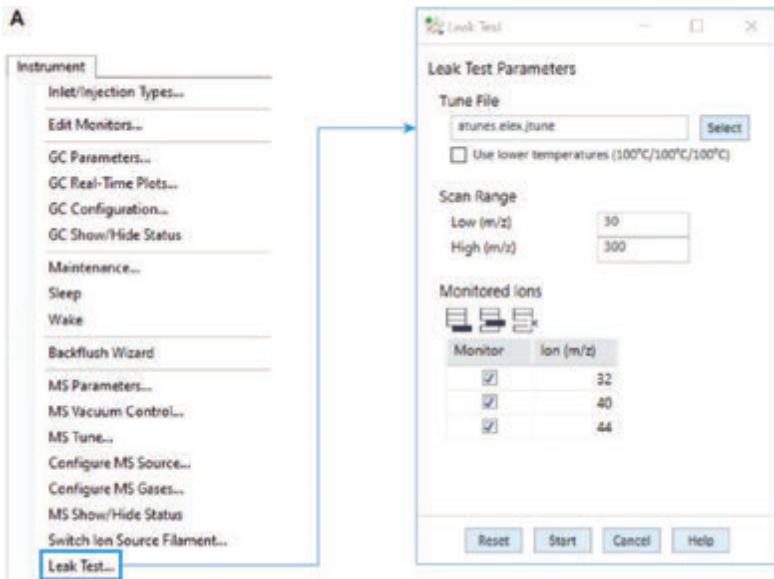


Figura 7. Nova ferramenta para teste de vazamento que permite o monitoramento dos íons especificados pelo usuário para identificar a origem e a quantidade de vazamento.

A combinação de injeção com temperatura programável com um liner Ultra Inert com fendas de 2 mm resultou em alta sensibilidade mesmo para pesticidas desafiadores como deltametrina em uma matriz complexa de noz. A Figura 8A demonstra a resposta da deltametrina, um pesticida com MRL estabelecido em noz, em 0,5 ppb com o GC/TQ 7000E e

7010C. O GC/TQ 7010C foi equipado com o HES que permite uma sensibilidade mais alta, resultando em uma razão sinal-ruído (S/N) mais alta.

O pentacloronitrobenzeno é um pesticida que é comumente analisado por GC/MS em vários produtos alimentícios, pois tem MRLs estabelecidos em diversos vegetais e frutas (Grupo de cultivo 8 Grupo

de vegetais com frutos), amendoins e sementes de soja que variam de 20 ppb a 1 ppm.⁸ O pentacloronitrobenzeno é desafiador para a análise de LC/MS, portanto, a análise de GC/MS é a técnica de preferência. A Figura 8B mostra os cromatogramas para uma transição MRM seletiva para pentacloronitrobenzeno em um extrato de noz com o 7000E e o 7010C.

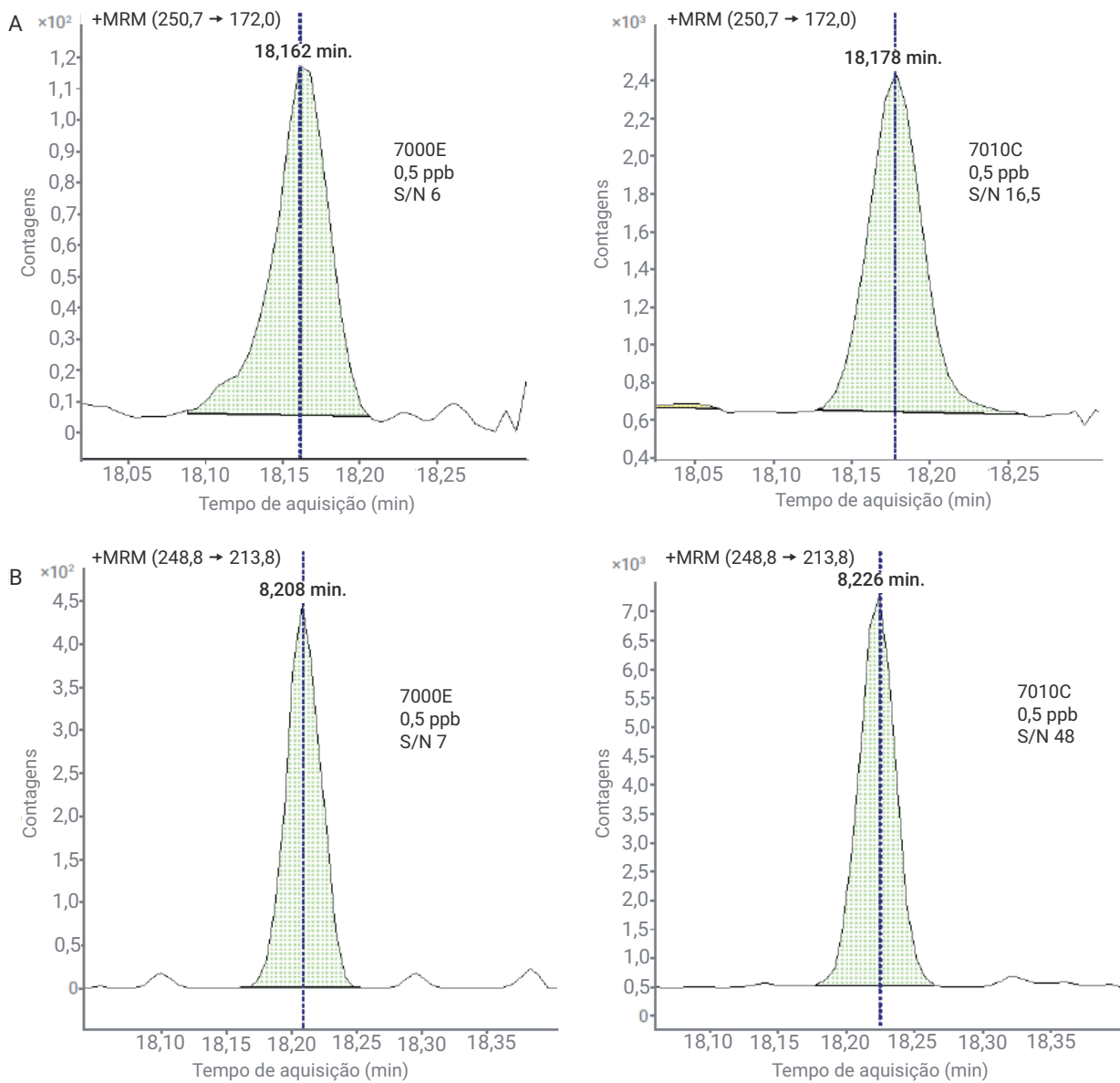


Figura 8. Cromatogramas MRM para deltametrina (A) e pentacloronitrobenzeno (B) a 0,5 ppb em extrato de noz analisados com o GC/TQ 7000E e o 7010C.

Desempenho de calibração em uma ampla faixa dinâmica com o GC/TQ 7000E e 7010C

O maior desafio com a análise multirresíduos de produtos alimentícios são os MRLs estabelecidos para os pesticidas, que variam em uma ampla faixa que pode exigir reanálise inconveniente de amostras. Alcançar uma ampla faixa de calibração dinâmica pode reduzir consideravelmente a necessidade de diluição da amostra e reanálise.

A bifentrina possui MRLs estabelecidos para espinafre, noz e pimenta caiena de 200, 50 e 500 ppb, respectivamente.

A Figura 9 mostra as curvas de calibração linear adquiridas com o 7000E ao longo das faixas de calibração de 0,1 a 1.000 ppb ($R^2 = 0,996$) para o espinafre, 0,1 a 5.000 ppb ($R^2 = 0,991$) para a noz e 0,1 a 5.000 ppb ($R^2 = 0,995$) para a pimenta caiena, abrangendo os valores de MRL estabelecidos.

Os MRLs apresentam variações não apenas para o mesmo pesticida em vários produtos, mas também para vários pesticidas regulamentados em um mesmo produto. Por exemplo, piriproxifeno e fludioxonil são monitorados no espinafre com MRLs de 3.000 e 10 ppb, respectivamente. A Figura 10A demonstra que o GC/TQ 7000E manteve o desempenho de calibração linear para piriproxifeno e fludioxonil no extrato de espinafre de 0,1 a 5.000 ppb, ao mesmo tempo que demonstra excelente precisão mesmo para baixas concentrações (veja a ampliação da calibração para fludioxonil).

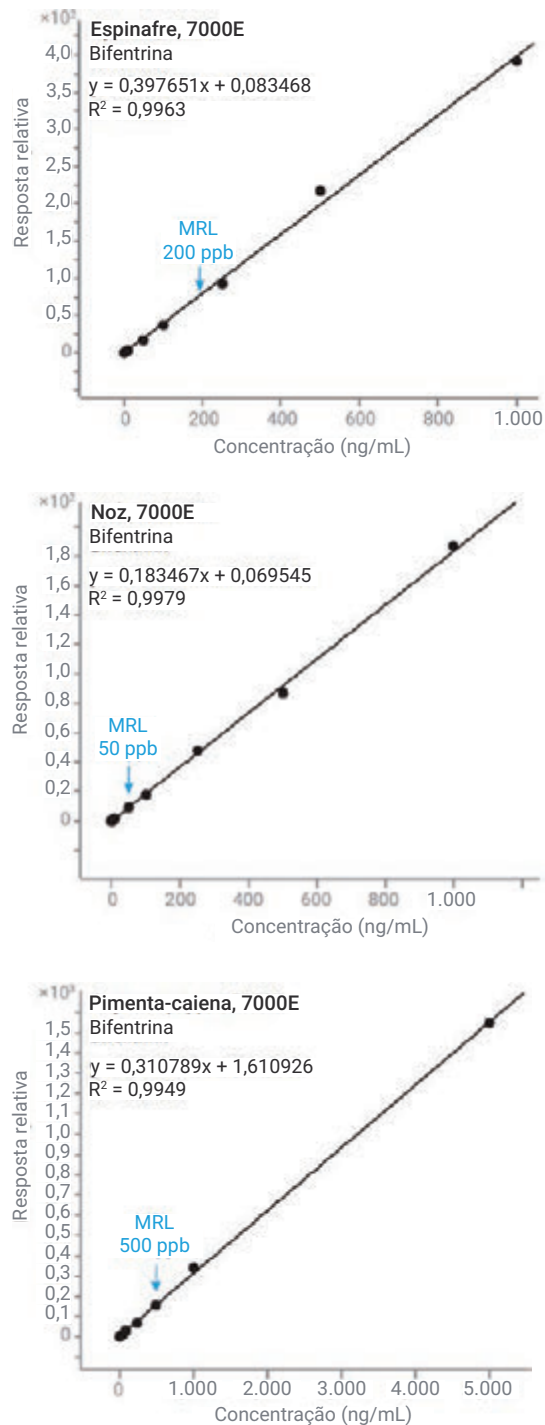


Figura 9. Curvas de calibração de matrizes combinadas para bifentrina em extratos de espinafre, noz e pimenta caiena com o GC/TQ 7000E.

Conforme mostrado na Figura 10B, o GC/TQ 7010C também permitiu alcançar uma curva de calibração linear em uma ampla faixa para ambos os pesticidas (0,1 a 1.000 ppb). No entanto, a faixa dinâmica do 7010C exigiria uma

injeção extra de uma amostra diluída para acomodar a quantificação precisa de piriproxifeno para seu MRL de 3.000 ppb. Mesmo que o limite superior da faixa de calibração alcançado com o 7010C para piriproxifeno e fludioxonil seja menor

que com o 7000E, o 7010C oferece uma sensibilidade mais alta em concentrações mais baixas. Isso é mostrado na Figura 10C e pode ser crítico para a análise desses pesticidas em produtos com MRLs estabelecidos mais baixos.

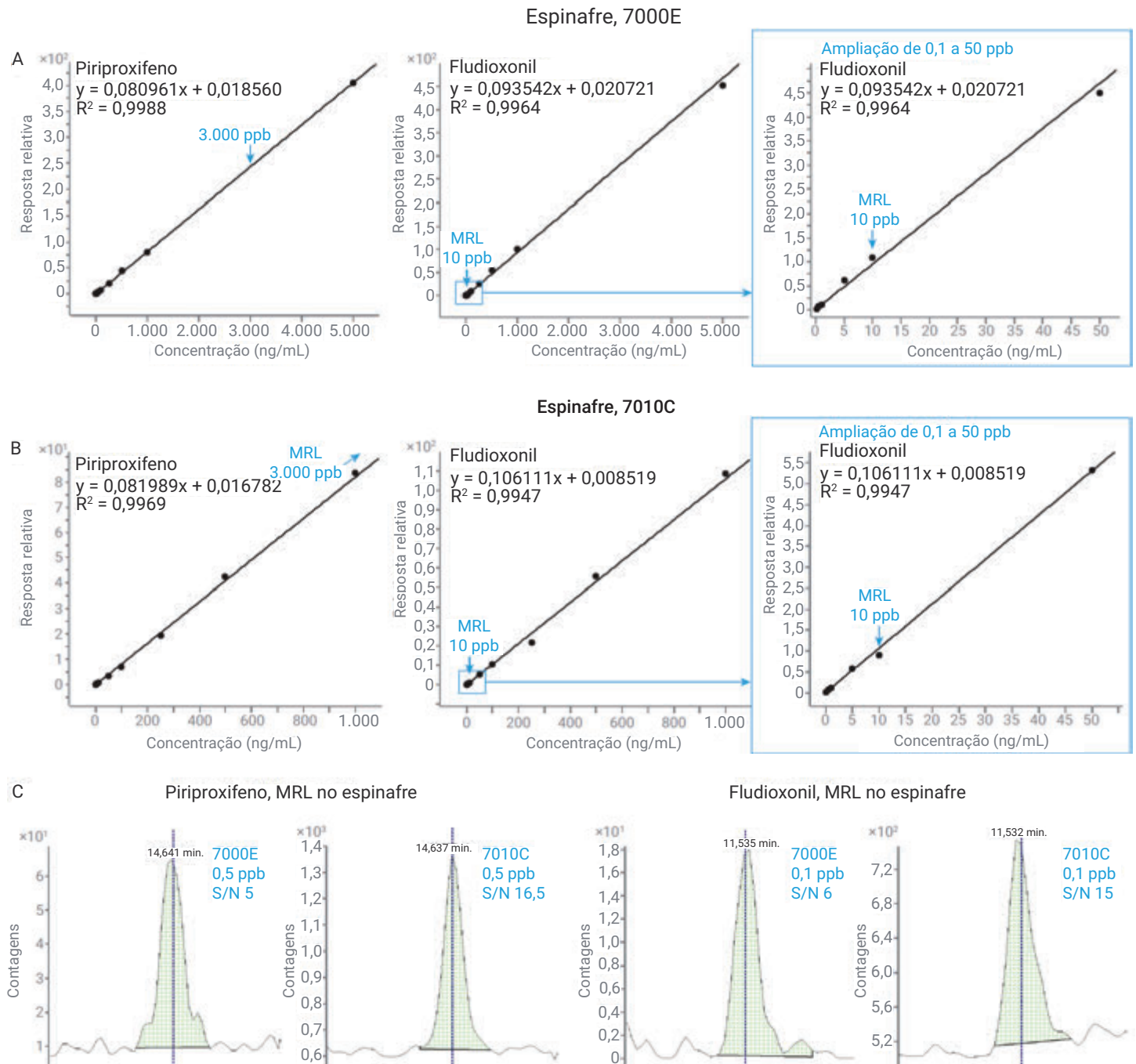


Figura 10. Curvas de calibração de matrizes combinadas para piriproxifeno e fludioxonil em extratos QuEChERS de espinafre com o GC/TQ 7000E (A) e GC/TQ 7010C (B); Cromatogramas MRM para piriproxifeno e fludioxonil a 0,5 e 0,1 ppb em extrato QuEChERS de espinafre analisados com o GC/TQ 7000E e o 7010C (C).

Alternativamente, amostras com MRLs acima de 1.000 ppb podem ser ainda mais diluídas antes da análise com o GC/TQ 7010C. A sensibilidade superior conferida pelo HES permite uma quantificação precisa, mantendo baixos LOQs mesmo na amostra diluída. Além disso, a injeção de amostras diluídas aumentou o tempo de operação sem manutenção e aumentou o número de injeções realizadas antes que o liner do injetor do GC precise ser substituído.

Um resumo na Figura 11 mostra o desempenho de calibração para os 203 pesticidas analisados nos extratos de espinafre, noz e pimenta caiena com os sistemas GC/TQ 7000E e 7010C. O gráfico ilustra o número de compostos com coeficiente de correlação de calibração $R^2 > 0,99$, o ajuste de calibração (linear ou quadrático) e a faixa de calibração.

Como esperado, considerando que é recomendado para o HES que a carga não exceda 1 ng por analito, o limite superior de calibração para o 7010C foi menor comparado ao 7000E (1.000 ppb versus 5.000 ppb). No entanto, a faixa de calibração alcançada com o 7010C foi de até quatro ordens de magnitude com ajuste linear para a maioria dos compostos analisados. O GC/TQ 7010C com HES apresenta sensibilidade superior, produzindo alta razão S/N mesmo em baixas concentrações e permite quantificação precisa em concentrações abaixo de 0,1 ppb. No entanto, isso não foi uma exigência neste trabalho, pois os MRLs para pesticidas regulamentados para os produtos de interesse não exigem quantificação abaixo de 0,1 ppb. Alternativamente, amostras com MRLs acima de 1.000 ppb podem ser ainda mais diluídas antes da análise com o GC/TQ 7010C. O HES permite manter alta sensibilidade no nível de LOQ mesmo para a amostra diluída.

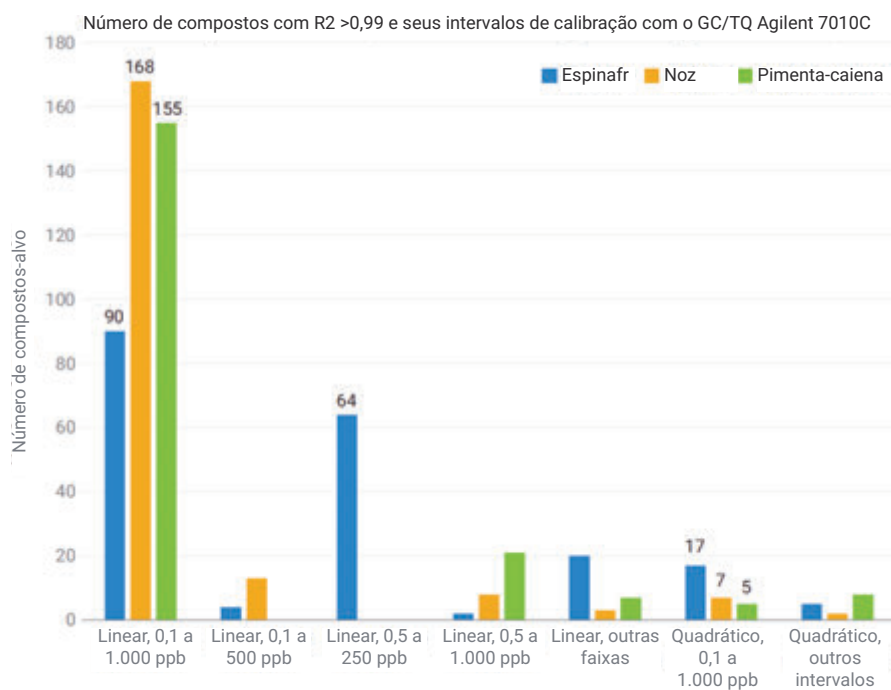
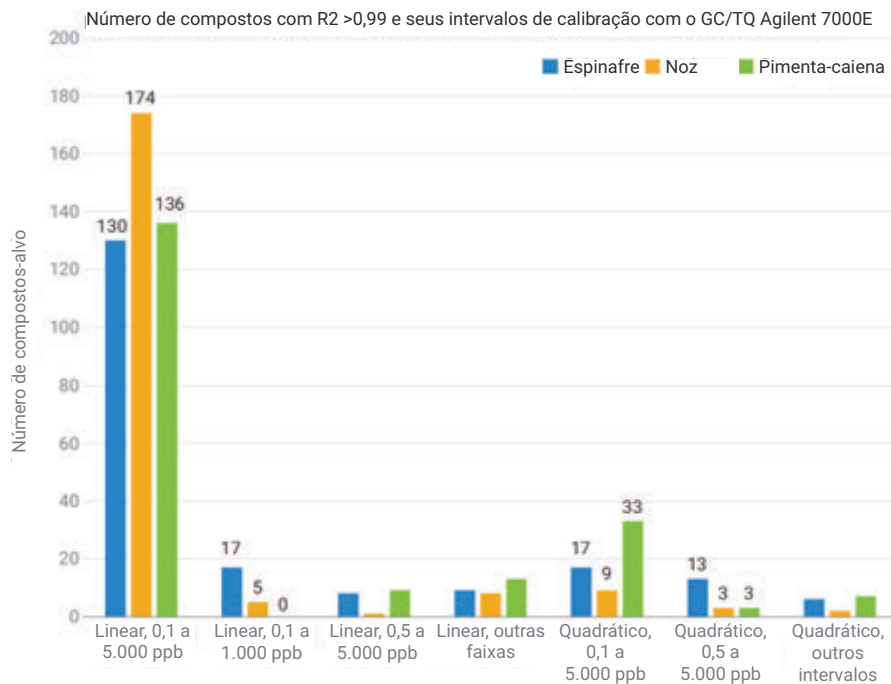


Figura 11. Desempenho de calibração para os 203 pesticidas em espinafre com o GC/TQ 7000E e 7010C. O gráfico mostra o número de compostos e seus intervalos de calibração.

Conclusão

Esta nota de aplicação descreveu cinco práticas recomendadas no preparo de amostras e na análise com o sistema GC/MS triplo quadrupolo Agilent 8890/7000E e 8890/7010C aplicado a 203 pesticidas em matrizes alimentares desafiadoras, incluindo espinafre, noz e pimenta caiena. Essas práticas incluem:

- Preparo de amostras simplificado e aprimorado alcançado com a nova e aprimorada limpeza por permeabilidade Agilent EMR Captiva após a extração AOAC tradicional Agilent.
- Avaliação do carregamento de matriz na fonte no modo de aquisição de dados de varredura completa.
- Backflush entre colunas.
- Sistema de GC/triplo quadrupolo sem vazamentos garantido pelas porcas da coluna com autoajuste e colar e pelas anilhas de metal flexível revestidas em ouro CFT.
- Uso do injetor multimodal com temperatura programável e liner com fenda de 2 mm (sem lâ de vidro).

O método resultante permitiu um excelente desempenho de calibração em uma ampla faixa dinâmica de até mais de quatro ordens de magnitude. O desempenho de calibração foi amplo, de 0,1 a 5.000 ppb e 0,1 a 1.000 para a maioria dos compostos com o 7000E e o 7010C, respectivamente. O 7010C demonstrou sensibilidade superior, apresentando razão sinal-ruído mais alta em concentrações mais baixas. As amplas faixas dinâmicas em combinação com a alta sensibilidade tornam o 7000E e o 7010C as ferramentas ideais para a análise de pesticidas em seus MRLs para vários produtos, incluindo os que apresentam matrizes complexas altamente pigmentadas e oleosas.

Referências

1. Setting Tolerances for Pesticide Residues in Foods, US EPA <https://www.epa.gov/pesticide-tolerances/setting-tolerances-pesticide-residues-foods>. Acessado em 28 de abril de **2022**.
2. Index to Pesticide Chemical Names, Part 180 Tolerance Information, and Food and Feed Commodities (by Commodity), US EPA. 12 de dezembro de 2012. <https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-01/documents/tolerances-commodity.pdf> Acessado em 28 de abril de **2022**.
3. Andrianova, A.; Quimby, B.; Zhao, L. A Fast and Robust GC/MS/MS Analysis of 203 Pesticides in 10 Minutes in Spinach. *Nota de aplicação da Agilent Technologies*, número de publicação 5994-4967EN, **2022**.
4. Andrianova, A.; Quimby, B. Full Scan Quantitative Analysis of Semivolatile Organic Compounds: Evaluating the Performance of an Agilent 7000D GC/TQ in Full Scan Data Acquisition Mode for SVOCs Analysis. *Nota de aplicação da Agilent Technologies*, número de publicação 5994-3859EN, **2021**.
5. Fritz, B. Usando o PSD para backflush no sistema de GC Agilent 8890. *Nota de aplicação da Agilent Technologies*, número de publicação 5994-0550EN, **2018**.
6. Self Tightening Column Nut Installation – Inlet & Detectors. <https://www.agilent.com/pt-br/video/stcn-inlet-detector> Acessado em 2 de maio de **2022**.
7. Self Tightening Column Nut Installation – MS Interface. <https://www.agilent.com/pt-br/video/stcn-mass-spec> Acessado em 2 de maio de 2022.
8. 40 CFR § 180.291 - Pentachloronitrobenzene; Tolerance for Residues. <https://www.law.cornell.edu/cfr/text/40/180.291> Acessado em 2 de maio de **2022**.

Apêndice 1

Compostos analisados neste trabalho e seus tempos de retenção observados.

Nome	Tempo de retenção (min)	Nome	Tempo de retenção (min)	Nome	Tempo de retenção (min)
Alidocloro	4,893	Pirimetanil	8,282	DCPA (Dacthal, Clortal-dimetil)	10,062
Diclorobenzonitrila, 2,6-	5,244	Diazinon	8,291	Fenson	10,201
Bifenil	5,423	Flucloralina	8,326	Difenamida	10,288
Mevinfós, E-	5,597	Disulfotom	8,427	Bromofós	10,297
3,4-Dicloroanilina	5,708	Teflutrina	8,431	Pirimifós-etílico	10,304
Pebulato	5,803	Terbacil	8,432	Isopropalina	10,358
Etridiazole	5,833	BHC- <i>delta</i>	8,504	Ciprodinil	10,407
cis-1,2,3,6-Tetra-hidroftalimida	5,966	Isazofos	8,527	MGK-264	10,443
N-(2,4-dimetilfenil)formamida	5,973	Trialato	8,569	Isodrin	10,455
Metacrifós	6,055	Clorotalonil	8,584	Metazaclor	10,532
Chloroneb	6,136	Éter endosulfan	8,857	Pendimetalina	10,535
2-Fenilfenol	6,246	Pentacloroanilina	8,913	Penconazol	10,562
Pentaclorobenzeno	6,343	Propanil	8,942	Clozolinato	10,584
Propacloro	6,888	Dimetacloro	8,996	Heptacloro exo-epóxido	10,621
Tecnazeno	6,889	Acetocloro	9,093	Tolilfluanida	10,646
Difenilamina	6,959	Vinclozolina	9,115	Aletrina	10,648
Cicloato	7,043	Transflutrina	9,129	Fipronil	10,662
2,3,5,6-Tetracloroanilina	7,059	Parationa metilica	9,145	Clorfenvinfós	10,676
Clorprofame	7,102	Clorpirifós-metil	9,146	Bromfenvinfos-metílico	10,683
Etalfluralina	7,139	Tolclofós-metil	9,233	Captano	10,732
Trifluralina	7,245	Alaclor	9,263	Triadimenol	10,746
Benfluralina	7,279	Propisocloro	9,333	Quinalfós	10,747
Sulfotep	7,376	Heptacloro	9,336	Triflumizol	10,77
Dialato I	7,481	Metalaxil	9,337	Folpeto	10,847
Forato	7,498	Ronnel	9,396	Procimidona	10,858
BHC-alfa (hexacloreto de benzeno)	7,636	Prodiamina	9,556	Chlorbenseide	10,918
Hexaclorobenzeno	7,768	Fenitrotona	9,596	Bromofós-etílico	11,041
Dicloran	7,798	Pirimifós-metílico	9,598	Clordano- <i>trans</i>	11,043
Pentacloroanisol	7,823	Linurom	9,668	DDE-o,p'	11,09
Atrazina	7,885	Malation	9,743	Paclobutrazol	11,106
Clomazone	7,982	Pentaclorotioanisol	9,758	Tetraclorvinfos	11,169
BHC-beta	8,025	Diclofluanida	9,764	Endosulfan I (isômero <i>alfa</i>)	11,273
Profluralina	8,117	Metolacloro	9,902	Clordano- <i>cis</i>	11,305
Terbutilazina	8,119	Antraquinona	9,916	Flutriafol	11,322
BHC-gama (Lindano, HCH <i>gama</i>)	8,146	Fentiona	9,928	Fenamifós	11,355
Terbufós	8,159	Aldrina	9,942	Clorfenson	11,382
Propizamida	8,175	Clorpirifós	9,964	Nonacloro, <i>trans</i> -	11,392
Pentacloronitrobenzeno	8,219	Paration	9,98	Bromfenvinfós	11,4
Fonofós	8,251	Triadimefon	10,011	Flutolanil	11,402
Pentaclorobenzonitrila	8,259	Diclorobenzofenona, 4,4'-	10,033	Iodofenós	11,479

Nome	Tempo de retenção (min)	Nome	Tempo de retenção (min)	Nome	Tempo de retenção (min)
Protiofós	11,514	Carbofenotiona	12,849	Fenotrina I	14,334
Fludioxonil	11,556	Carfentrazona-etílica	12,851	Tetradifona	14,445
Profenofós	11,56	Metoxiclorolefina	12,865	Fosalona	14,61
Pretilacloro	11,592	Edifenfós	12,949	Azinfos-metílico	14,64
DDE-p,p'	11,637	Norflurazon	12,964	Piriproxifeno	14,662
Triciclazol	11,645	Lenacil	12,976	Leptofós	14,666
Oxadiazona	11,659	Sulfato de endosulfan	13,04	Cialotrina (<i>lambda</i>)	14,731
Dieldrina	11,73	DDT-p,p'	13,054	Mirex	14,898
Oxifluorfenol	11,737	Hexazinona	13,23	Acrinatrina	15,076
Miclobutanil	11,747	Metoxicloro, o,p'-	13,241	Fenarimol	15,121
DDD-o,p'	11,799	Tebuconazol	13,294	Pirazofós	15,168
Flusilazol	11,8	Propargita	13,352	Azinfos-etílico	15,252
Bupirimato	11,831	Butóxido de piperonila	13,404	Piraclofós	15,303
Fluazifop-p-butil	12,007	Resmetrina	13,44	Permetrina, (1R)-cis-	15,656
Nitrofenol	12,023	Captafol	13,466	Permetrina, (1R)-trans-	15,772
Etilan	12,063	Nitralin	13,563	Piridabeno	15,807
Clorfenapir	12,064	Iprodiona	13,726	Floquinconazol	15,895
Endrin	12,127	Tetrametrina I	13,836	Cumafós	15,902
Clorbenzilato	12,194	Piridafentiona	13,838	Procloraz	15,958
Endosulfan I (isômero beta)	12,291	Endrin cetona	13,898	Ciflutrina I	16,207
DDD-p,p'	12,383	Fosmete	13,931	Cipermetrina I	16,421
Etiona	12,453	Bromopropilato	13,952	Flucitrinato I	16,75
DDT-o,p'	12,457	EPN	13,955	Etofenproxi	16,829
Clortiofós	12,503	Bifentrina	13,956	Fluridone	17,034
Nonacloro, cis-	12,508	Metoxicloro, p,p'-	14,062	Fenvalerato I	17,459
Endrin aldeído	12,618	Fenpropatrina	14,077	Fluvalinato-tau I	17,646
Sulprofós	12,669	Tebuftenpirada	14,142	Deltametrina	18,177
Triazofós	12,674				

www.agilent.com

DE10556921

Estas informações estão sujeitas a alterações sem aviso prévio.

© Agilent Technologies, Inc. 2022
 Impresso nos EUA, 13 de setembro de 2022
 5994-4965PTBR

