

Multirückstandsanalytik von Pestiziden in Avocado mit Agilent Bond Elut EMR—Lipid durch GC/MS/MS

Application Note

Lebensmittelprüfung und Landwirtschaft

Autoren

Limian Zhao und Derick Lucas
Agilent Technologies, Inc.

Zusammenfassung

Agilent Bond Elut QuEChERS Enhanced Matrix Removal—Lipid (EMR—Lipid) gehört zur nächsten Generation der Produkte zur Probenvorbereitung und verwendet ein praktisches Verfahren der dispersiven Festphasenextraktion (dSPE) zur hochselektiven Matrixentfernung, ohne die Wiederfindung der Analyten zu beeinflussen, vor allem für fettreiche Proben. Diese Studie zeigt die Anwendung dieses neuartigen Produkts für die Analyse von 23 GC-nachweisbaren Pestiziden in Avocado durch GC/MS/MS. Das Verfahren umfasst eine QuEChERS AOAC-Extraktion, gefolgt von EMR—Lipid dSPE und Feinaufreinigung mit Salzen. EMR—Lipid ermöglicht eine bedeutend bessere Matrixentfernung pro Gewichtseinheit, GC/MS-Full-Scan und die Bestimmung von Matrixeffekten im Vergleich zu C18/PSA- und Zirkonoxid-basierten Sorbenzien. Außerdem wird weniger Matrix in den Analyse-Flussweg eingebracht. Die Daten demonstrieren außerdem eine deutlich verbesserte Reproduzierbarkeit der Analyten über 100 Injektionen verglichen mit C18/PSA und besonders Zirkonoxid, welche zu signifikanten Response-Abweichungen führen.

EMR—Lipid ist hoch selektiv bezüglich Lipiden und hat keinen negativen Einfluss auf die Wiederfindung der Analyten. Die Wiederfindungswerte der Analyten sind hoch und die Präzision ausgezeichnet. Diese Arbeit demonstriert, dass EMR—Lipid dSPE sich gut in einen QuEChERS-Arbeitsablauf einfügt und eine schnelle, robuste und effektive Probenvorbereitung mit der vollständigsten Entfernung der Matrix, die für die Multirückstandsanalytik von Pestiziden in Avocado zur Verfügung steht, ermöglicht.



Agilent Technologies

Einführung

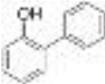
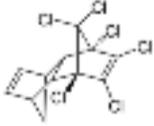
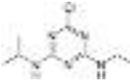
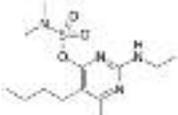
Die Analyse von Pestizidrückständen im Lebensmittelbereich mittels der QuEChERS-Methode (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) [1,2] ist für viele Labors zur Routine geworden. Dadurch können hunderte Pestizide niedriger Konzentrationen mit einer einzigen Extraktion analysiert werden. Während sich die Methode bei verschiedenen Obst- und Gemüsesorten als gut geeignet erwiesen hat, stellen fettreiche Lebensmittel wie Avocados, Nüsse und Lebensmittel tierischen Ursprungs neue Herausforderungen dar [3,4]. Diese Herausforderungen zu überwinden hat höchste Priorität für die Labors, denen die Aufgabe übertragen wurde, die Einhaltung der strengen, von Regierungsbehörden geforderten Validierungskriterien zu erreichen und so zu gewährleisten, dass die Lebensmittel für den menschlichen Verzehr unbedenklich sind.

Die Analyse kann mittels einer Kombination aus LC und GC durchgeführt werden, um sowohl flüchtige, halbflüchtige als auch nicht flüchtige Pestizide mit Multirückstandsmethoden zur Analyse von Pestiziden unterschiedlicher chemischer Klassen abzudecken [4]. Viele Pestizide sind sowohl durch LC als auch durch GC zu erfassen, viele andere jedoch nicht. Jedes chromatographische Verfahren hat seine inhärenten Vor- und Nachteile, was die Quantifizierung der Analyten und die Beeinträchtigungen durch die mitextrahierte Matrix betrifft. Die Entfernung dieser mitextrahierten Stoffe ist wesentlich für die exakte Quantifizierung in komplexen Lebensmittelmatrices, was die Bearbeitung mit matrixbeseitigenden Sorbenzien wie C18, PSA und GCB erforderlich macht [5]. Andere Materialien, die Zirkonoxid enthalten, sind im Handel verfügbar und verbessern im

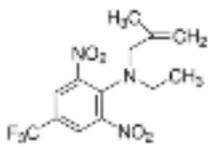
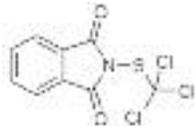
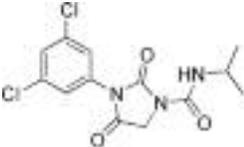
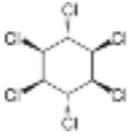
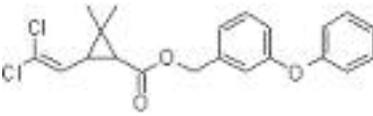
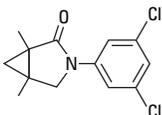
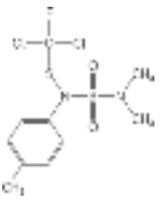
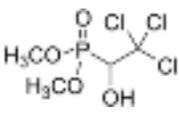
Vergleich zu den typischen matrixbeseitigenden Sorbenzien normalerweise die Lipidentfernung. Jedoch gilt das nicht für alle Lipidklassen und es können für die Analyse wesentliche Analyten adsorbiert werden [6,7]. Proben mit hohem Lipidanteil müssen gegebenenfalls mit Festphasenextraktionskartuschen (SPE-Kartuschen) [7,8,9] oder mittels Gelpermeationschromatographie (GPC) [10] aufgereinigt werden, was zu steigenden Kosten und höherem Zeitaufwand für normalerweise routinemäßig durchzuführende Analysen führt.

Agilent Bond Elut EMR—Lipid ist ein neuartiges Sorbens-Material, das selektiv wichtige Lipidklassen aus dem Probenextrakt entfernt, und zwar ohne unerwünschten Analytverlust. Die Entfernung von Lipidinterferenzen aus komplizierten Matrices ist für QuEChERS von besonderer Bedeutung, weil große Mengen von Matrix zusammen mit den Zielanalyten extrahiert werden. Avocados sind wegen ihres hohen Lipidgehalts (15 - 20 %) als schwierige Matrix bekannt und wurden deshalb als repräsentative Probe für die Evaluierung von EMR—Lipid ausgewählt. Diese Studie untersucht die Probenvorbereitung für die Analyse von 23 GC-nachweisbaren Pestiziden in Avocado mittels einer QuEChERS AOAC-Extraktion, gefolgt von einer EMR—Lipid-dSPE und Feinaufreinigung mit Salzen. Die Pestizide stammen aus 10 verschiedenen Klassen, um den Umfang der Applikation zu erweitern (Tabelle 1). Diese Application Note zeigt die außergewöhnliche Aufreinigung, die EMR—Lipid für komplexe und fetthaltige Proben wie Avocados ermöglicht, sowie die hohe Wiederfindung und Präzision bei 23 Pestizidrückständen verschiedener chemischer Klassen über drei Konzentrationsbereiche.

Tabelle 1. Zielanalyten, Klasse, log P, Wasserlöslichkeit und chemische Struktur [11].

Name	Kategorie	Log P	Löslichkeit in Wasser (mg/l)	Molekularformel	Struktur
2-Phenylphenol	Phenol	3,18	560	C ₁₂ H ₁₀ O	
Aldrin	Organochlor	6,5	0,003	C ₁₂ H ₈ Cl ₆	
Atrazin	Triazin	2,7	33	C ₈ H ₁₄ ClN ₅	
Bupirimat	Pyrimidinol	2,2	22	C ₁₃ H ₂₄ N ₄ O ₃ S	

Name	Kategorie	Log P	Löslichkeit in Wasser (mg/l)	Molekularformel	Struktur
Captan	Phthalimid	2,5	5,1	C ₉ H ₈ Cl ₃ NO ₂ S	
Chlorthalonil	Chloronitril	2,94	1,0	C ₈ Cl ₄ N ₂	
Chlorpyrifos-methyl	Organophosphat	4,0	2,74	C ₇ H ₇ Cl ₃ NO ₃ PS	
DDT	Organochlor	6,91	0,006	C ₁₄ H ₉ Cl ₅	
Deltamethrin	Pyrethroid	4,6	0,0002	C ₂₂ H ₁₉ Br ₂ NO ₃	
Diazinon	Organophosphat	3,69	60	C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₃ PS	
Dichlofluanid	Sulfamid	3,7	1,3	C ₉ H ₁₁ Cl ₂ FN ₂ O ₂ S ₂	
Dichlorvos	Organophosphat	1,9	18 000	C ₄ H ₇ Cl ₂ O ₄ P	
Endosulfansulfat	Organochlor	3,13	0,48	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S	
Endrin	Organochlor	3,2	0,24	C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O	

Name	Kategorie	Log P	Löslichkeit in Wasser (mg/l)	Molekularformel	Struktur
Ethalfuralin	Dinitroanilin	5,11	0,01	$C_{13}H_{14}F_3N_3O_4$	
Folpet	Phthalimid	3,02	0,8	$C_9H_4Cl_3NO_2S$	
Iprodion	Dicarboximid	3,1	12,0	$C_{13}H_{13}Cl_2N_3O_3$	
Lindan	Organochlor	3,5	8,52	$C_6H_6Cl_6$	
Permethrin	Pyrethroid	6,1	0,006	$C_{21}H_{20}Cl_2O_3$	
Procymidon	Dicarboximid	3,3	2,46	$C_{13}H_{11}Cl_2NO_2$	
Sulfotep	Organophosphat	3,99	10	$C_8H_{20}O_5P_2S_2$	
Tolyfluanid	Sulfamid	3,9	0,9	$C_{10}H_{13}Cl_2FN_2O_2S_2$	
Trichlorfon	Organophosphat	0,43	120 000	$C_4H_8Cl_3O_4P$	

Experimentelles

Alle Reagenzien und Lösemittel waren von HPLC- oder Analysenqualität. Acetonitril (ACN) und Methanol wurden von Honeywell (Muskegon, MI, USA), Essigsäure zur Synthese (AA), Pestizidstandards und interne Standards von Sigma-Aldrich, Corp. (St Louis, MO, USA) erworben.

Lösung und Standards

Essigsäure 1 % in ACN wurde erhalten durch Zugabe von 10 ml Essigsäure zu 990 ml ACN. Stammlösungen der Standards und internen Standards (IS) wurden entweder in ACN oder in Methanol mit 2,0 mg/ml hergestellt. Eine kombinierte Arbeitslösung wurde in ACN mit 25 µg/ml bereitete, außer für Captan, Folpet, Trichlorfon und Bupirimat. Aufgrund relativ schwachen Responses des Gerätes wurde in der kombinierten Arbeitslösung die Konzentration für diese vier Verbindungen um das Fünffache, nämlich auf 125 µg/ml, erhöht. Ein 25 µg/ml Aliquot der kombinierten IS-Arbeitslösung wurde in ACN einschließlich TPP, Parathion- ethyl- d₁₀ und ¹³C-DDT bereitete.

Geräteausrüstung

Für die Probenvorbereitung eingesetzte Geräte und Materialien:

- Geno/Schleifer (SPEX, Metuchen, NJ, USA)
- Centra CL3R Zentrifuge (Thermo IEC, MA, USA)
- Eppendorf Mikrozentrifuge (Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA)
- Vortexer und Multiröhrchen-Vortexer (VWR, Radnor, PA, USA)
- Flaschenaufsatzdispenser (VWR, So. Plainfield, NJ, USA)
- Eppendorf-Pipetten und Mehrkanalpipette
- Agilent Bond Elut EMR—Lipid-Röhrchen (Best.-Nr.: 5982-1010) und Agilent Bond Elut Final Polish for Enhanced Matrix Removal—Lipid-Röhrchen (Best.-Nr.: 5982-0101)

Analysensystem

Die Analyse wurde mit einem Agilent 7890A GC-System mit einem Agilent 7693B automatischen Probengeber und einem Agilent 7000C Triple Quadrupol GC/MS-System ausgeführt. Es wurde Säulen-Backflushing verwendet, was für komplexe Probenmatrices sehr zu empfehlen ist [12]. Die Gesamtlauzeit einer Probe, die mit einem Standard versetzt war, betrug 23 Minuten, wovon zwei Minuten dem Backflushing vorbehalten waren.

Gerätebedingungen

GC-Bedingungen

Automatischer Probengeber:	Agilent 7693 automatischer Probengeber und Probensteller 10 µl-Spritze (Best.-Nr.: G4513-80220), 1 µl Injektionsvolumen Drei Spülvorgänge nach der Injektion mit Lösemittel A (Acetonitril) Drei Probenpumpen Drei Spülgänge nach der Injektion mit Lösemittel B (Isopropanol)
Säule:	Agilent J&W DB-5ms Ultra Inert, 0,25 mm × 15 m, 0,25 µm (Best.-Nr.: 122-5512UI)
Trägergas:	Helium, konstanter Druck
Gasfilter:	Gas Clean Trägergasfilterkit, 1/8 Zoll (Best.-Nr.: CP17974)
Einlass-Liner:	Agilent Ultra Inert konischer Splitlos-Liner mit Glaswolle (Best.-Nr. 5190-2293)
Einlass:	MMI-Einlass im gepulsten Cold Splitless-Modus, 75 °C Anfangstemperatur, Verweilzeit 0,02 Min, dann Anstieg auf 350 °C mit 750 °C/Min
Injektions-Impulsdruck:	36 psi bis 0,75 Min
Purge-Fluss zur Splitentlüftung:	60 ml/min bei 0,75 Min
Einlassdruck:	17 psi während des Laufs, 1,0 psi während Backflush
Ofen:	60 °C für 2,57 Min, bis 150 °C mit 50 °C/Min, bis 200 °C mit 6 °C/Min, bis 300 °C mit 16 °C/Min und 3 Min Verweilzeit
Nachlaufzeit:	2 Min bei 300 °C
Capillary Flow-Technologie:	UltiMetal Plus Purged Ultimate Union (Best.-Nr.: G3182-61581) für Backflushing von Analysensäule und Einlass
Aux. EPC-Gas:	Helium, angeschlossen an Purged Ultimate Union
Entnahmeleitung:	0,0625 Zoll od × 0,010 Zoll id × 100 cm, 316SS Leitung oberhalb des Ofens
Aux. Druck:	4 psi während des Laufs, 75 psi während Backflush
Anschlüsse:	Zwischen Einlass und Purged Ultimate Union
Restriktor:	Inerte Fused Silica-Kapillare, 0,65 m × 0,15 mm (Best.-Nr.: 160-7625-5)
Anschlüsse:	Zwischen Purged Ultimate Union und dem MSD

MSD-Bedingungen

MSD:	Agilent 7000C Triple Quadrupol GC/MS, inert, mit Leistungselektronik
Vakuumpumpe:	Leistungs-Turbo
Modus:	MRM
Tuning-Datei:	Atune.u
Temp. Transferleitung:	280 °C
Temp. Quelle:	300 °C
Temp. Quad:	150 °C für Q1 und Q2
Solvent Delay:	2,57 Min
Kollisionsgasfluss:	Helium-Quenchgas bei 2,35 ml/Min, N ₂ -Kollisionsgas bei 1,5 ml/Min
MS-Auflösung:	MS1 und MS2 = 1,2 u

Die MRM-Parameter wurden für jeden Analyten mithilfe der Agilent-MRM-Datenbank für Pestizide und Umweltschadstoffe (G9250AA), in der MS/MS-Bedingungen und Retentionszeit-Informationen von mehr als 1070 Substanzen gespeichert sind

[13], leicht optimiert. Tabelle 2 führt die MRM-Übergänge für die Zielanalyten, die in dieser Studie verwendet wurden, auf. Ein Beispiel für ein typisches GC/MS/MS-Chromatogramm ist in Abbildung 1 für die 23 untersuchten Pestizide zu sehen.

Tabelle 2. GC/MS/MS MRM-Bedingungen und Retentionszeit für Pestizidanalyse.

Analyt	RT (Min)	MRMs			
		Quant.-Kanal	CE (v)	Qual.-Kanal	CE (v)
Dichlorvos	4,70	184,9 → 93	10	109 → 79	5
Trichlorfon	5,94	110,8 → 47	30	81,8 → 47	50
2-Phenylphenol	6,39	169 → 115,1	25	170 → 141,1	25
Ethalfuralin	7,58	275,9 → 202,1	15	315,9 → 275,9	10
Sulfotep	7,83	237,8 → 145,9	10	201,8 → 145,9	10
Atrazin	8,69	214,9 → 58,1	10	214,9 → 200,2	5
Lindan	8,83	181 → 145	15	216,9 → 181	5
Chlorthalonil	9,20	263,8 → 168	25	265,8 → 231	20
Diazinon	9,22	137,1 → 54	20	199,1 → 93	20
Chlorpyrifos-methyl	10,30	285,9 → 92,9	20	124,9 → 47	15
Dichlorfluanid	11,31	223,9 → 123,1	20	123 → 77	20
Aldrin	11,55	262,9 → 192,9	35	254,9 → 220	35
Parathion-ethyl-D ₁₀ (IS)	11,96	98,7 → 67	10	114,9 → 82,9	20
Tolyfluanid	12,80	136,9 → 91	20	136,9 → 65	30
Captan	12,96	151 → 79,1	15	149 → 79,1	10
Forpet	13,13	259,8 → 130,1	15	261,8 → 130,1	15
Procymidon	13,13	282,8 → 96	10	96 → 67,1	10
Bupirimat	15,44	272,9 → 193,1	15	272,9 → 108	5
Endrin	15,68	316,7 → 280,8	5	244,8 → 173	30
Endosulfansulfat	17,44	273,9 → 238,9	15	271,9 → 237	15
¹³ C-DDT (IS)	17,69	246,5 → 177,1	15	248,5 → 177,1	15
DDT	17,69	235 → 165,2	20	237 → 165,2	20
TPP (IS)	18,20	325,9 → 169	30	325,9 → 233	27
Iprodion	18,82	313,8 → 55,9	20	187 → 124	25
Permethrin	20,68	183,1 → 153,1	15	183,1 → 153,1	15
Deltamethrin	22,51	252,9 → 93	15	181 → 152,1	25

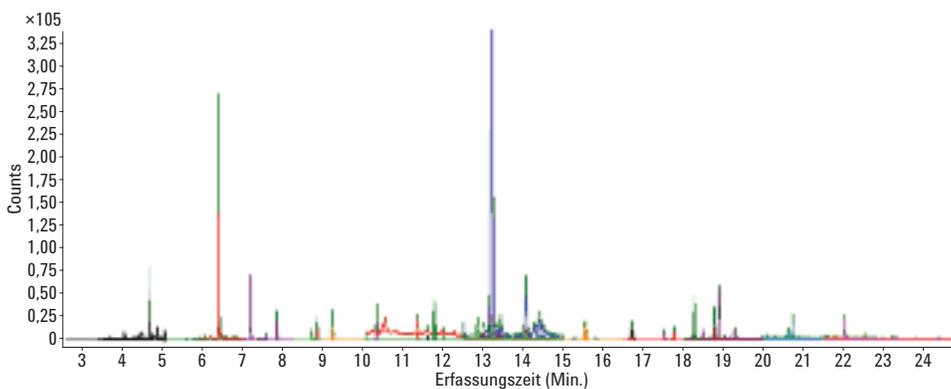


Abbildung 1. Ein typisches GC Triple Quadrupol Chromatogramm (MRM) einer Avocadoprobe, angereichert mit 50 ng/g Pestizidstandard. Die Probenvorbereitung verwendete QuEChERS, gefolgt von einer Aufreinigung mit Agilent Bond Elut EMR—Lipid.

Probenvorbereitung

Das Verfahren für die Probenvorbereitung wurde schließlich wie folgt optimiert:

1. 15 g ($\pm 0,1$ g) homogenisierte Avocado in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen geben.
2. 15 ml Acetonitril (1 % AA) zugeben und 10 Sek. lang vortexen.
3. AOAC Extraktionssalz-Paket zugeben.
4. Zum Mischen auf einem mechanischen Schüttler 2 Min. lang schütteln.
5. Bei 5000 U/Min 5 Min. lang zentrifugieren.
6. 5 ml Wasser in ein 15 ml EMR—Lipid dSPE-Röhrchen geben und 5 ml Überstand in EMR—Lipid-Röhrchen überführen.
7. Sofort vortexen, um die Probe zu dispergieren, und dann die gesamte Charge weitere 60 Sek. lang auf einem Multiröhrchenvortexer vortexen.
8. Bei 5000 U/Min 3 Min. lang zentrifugieren.
9. 5 ml Überstand in ein 15 ml EMR—Lipid-Feinaufreinigungsröhrchen geben, das 2 g Salz enthält (1:4, NaCl:MgSO₄), und 1 Min lang vortexen.
10. Bei 5000 U/Min 3 Min. lang zentrifugieren.
11. Die obere ACN-Schicht zur GC/MS/MS-Injektion in eine Probenflasche übertragen.

Der ganze Arbeitsablauf der Probenvorbereitung wird in Abbildung 2 gezeigt.

Kalibrierungsstandards und Qualitätskontrollproben

Vordotierte QC-Proben wurden entsprechend mit einer kombinierten Standardarbeitslösung in passender Konzentration nach Schritt 1 für sechs Replikate vorangereichert. Die QC-Proben entsprechen 5, 50 und 300 ng/g in der Avocadoprobe. Bei den QC-Proben handelte es sich um 25, 250 und 1500 ng/g für Captan, Folpet, Trichlorfon und Bupirimat. Alle Proben wurden auch mit einer IS-Lösung angereichert, bis auf die Matrix-Blindprobe, entsprechend 250 ng/g in den Avocadoproben.

Mit Standard- und IS-Arbeitslösungen zubereitete matrixangepasste Kalibrierstandards wurden entsprechend in die Matrix-Blindproben nach Schritt 10 gegeben, was jeweils 1, 5, 10, 50, 100, 200, 300 und 400 ng/g in der Avocadoprobe und 250 ng/g IS entsprach. Für die vier Verbindungen wurden Kalibrierstandards mit 5, 25, 50, 250, 500, 1000, 1500 und 2000 ng/g verwendet.

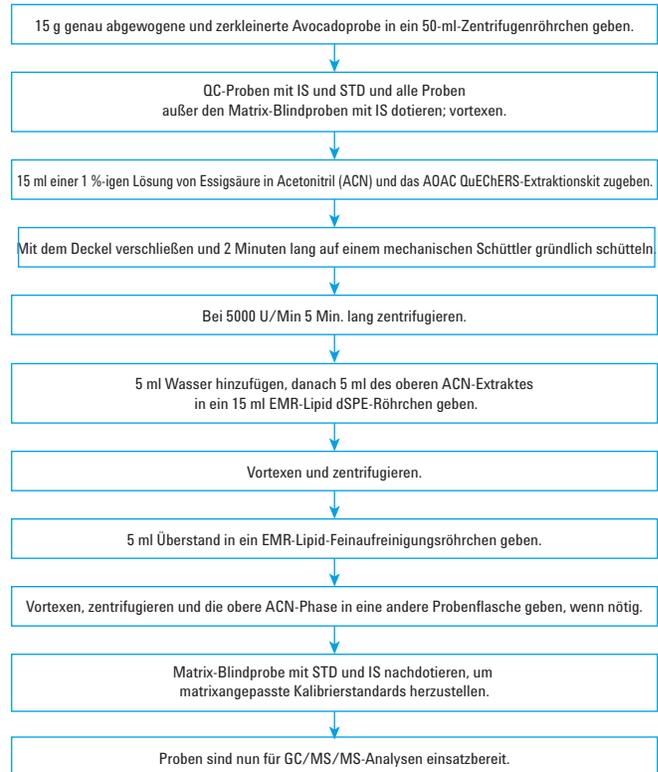


Abbildung 2. Der Probenvorbereitungs-Arbeitsablauf zeigt eine QuEChERS-Extraktion mit Agilent Bond Elut EMR—Lipid-Aufreinigung für die Analyse von Pestiziden in Avocado durch GC/MS/MS.

Beurteilung der Matrixaufreinigung

Die Avocadoextrakte wurden mit drei verschiedenen Aufreinigungsmaterialien behandelt: dSPE (C18/PSA) für fetthaltige Matrices, Zirkonoxid-Sorbens und EMR—Lipid. Ein Experiment verglich die GC/MS-Full-Scan-Profile der endgültigen Extrakte vor und nach der Aufreinigung. Um den Umfang der Matrixaufreinigung anhand des chromatographischen Hintergrunds zu vergleichen, wurden die Chromatogramme übereinandergelegt. Um die Matrixaufreinigung quantitativ beurteilen zu können, wurde das GC/MS-Full-Scan-Chromatogramm während des gesamten Zeitfensters manuell integriert. Danach wurde die Effizienz der Matrixentfernung entsprechend Gleichung 1 kalkuliert.

$$\% \text{ Entfernung der Matrix} = \frac{\text{Peakflächen, gesamt}_{\text{Probe ohne Aufreinigung}} - \text{Peakflächen, gesamt}_{\text{Probe mit Aufreinigung}}}{\text{Peakflächen, gesamt}_{\text{Probe ohne Aufreinigung}}} \times 100$$

Gleichung 1

Ein gravimetrisches Experiment, welches das Gewicht von mitextrahierter Avocadoprobe nach der Behandlung mit EMR—Lipid, C18/PSA und Zirkonoxid-Sorbens verglich, wurde veröffentlicht [14].

Vergleichs- und Validierungsmethoden

Ein Experiment zur Wiederfindung der Analyten verglich mit 50 ng/g vor- und nachdotierte Avocadoprobe. Die Probenbehandlung fand mit der QuEChERS AOAC-Extraktionsprozedur statt, gefolgt von einer Aufreinigung mit EMR—Lipid, C18/PSA oder Zirkonoxid. Für die Aufreinigung mit EMR—Lipid wurde das in Abbildung 2 gezeigte Protokoll befolgt. Die anderen Materialien erfuhren dieselbe QuEChERS-Extraktion mit einer C18/PSA- und Zirkonoxid-Sorbens-Aufreinigung. Ein Aliquot von 1 ml ACN-Rohextrakt wurde in ein 2-ml-C18/PSA dSPE-Röhrchen (Best.-Nr.: 5982-5122) oder in eine 2-ml-Probenflasche mit 100 mg Zirkonoxid-Sorbens übertragen. Alle Proben wurden eine Minute lang gevortext und bei 13 000 U/Min drei Minuten lang in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert. Die ACN-Schicht wurde dann zur GC/MS/MS-Analyse in eine Probenflasche überführt. Durch Nachdotierung des Avocado-Blindwertextrakts mit Standards und internen Standards wurden matrixangepasste Kalibrierstandards hergestellt. Die Wiederfindung wurde durch das Verhältnis der Analyt-Peakflächen aus vor- und nachdotierten Proben kalkuliert. Die EMR—Lipid-Methode wurde in Avocado in drei Konzentrationen mit sechs Replikaten validiert, wobei eine matrixangepasste Acht-Punkte-Kalibrierungskurve eingesetzt wurde. Ein interner Standard (IS) wurde für die Quantifizierung benutzt, und die Daten wurden als Genauigkeit und Präzision dargestellt.

Der Matrix-Effekt auf die GC/MS/MS-Systemleistung

Der Matrix-Effekt auf die GC/MS/MS-Systemleistung wurde untersucht, indem die Konsistenz der Analytresponse über mehrfache Injektionen von Avocadoprobe hinweg bewertet wurde. Das Experiment verglich die Analytresponse bei GC/MS/MS im zeitlichen Verlauf durch mehrfache Injektionen von Avocadoextrakten, die mit EMR—Lipid, C18/PSA oder Zirkonoxid-Sorbens behandelt wurden. In jeder Testcharge gab es Matrix-Blindproben und nachdotierte 50 ppb QC-Proben. Die Sequenz injizierte vier Blindproben und eine QC-Probe bei der fünften Injektion und wurde für insgesamt 100 Injektionen ausgeführt. Dies wurde durchgeführt, um den Effekt von nicht entfernter Matrixansammlung auf den Oberflächen des GC/MS-Flusswegs auf die Analytresponse des Systems für die verschiedenen Aufreinigungsoptionen zu bestimmen. Für jedes Aufreinigungsverfahren wurde die Analytresponse (Peakfläche) verwendet, um die %RSD (relative Standardabweichung) über den 100-Injektionen-Durchgang zu berechnen. Um einen Einfluss des GC-Flusswegs auszuschließen, wurden inerte Flussweg-Verbrauchsmaterialien von Agilent sowie neue Agilent Ultra Inert Liner und Säulen für jede Aufreinigungsmethode verwendet.

Ergebnisse und Diskussion

Beurteilung der Matrixaufreinigung

Komplexe Matrices haben entscheidende Auswirkungen auf die GC/MS-Leistung, da die Matrix aktive Stellen auf der GC-Oberfläche des Flusswegs bildet, Matrixeffekte im Massenspektrometer induziert und zu Interferenzen im Endchromatogramm führt. Während GC/MS (SIM) und GC/MS/MS (MRM) erhöhte Selektivität für die Zielionen zeigen, kann nicht entfernte Matrix noch immer Interferenzen verursachen und die Leistung im Laufe der Zeit schmälern. Um diesen negativen Auswirkungen von Matrices mit hohem Fettgehalt wie Avocado entgegenzuwirken, müssen verlässlichere Methoden zur Probenvorbereitungsaufreinigung angewendet werden, um die Proben einer GC/MS-Analyse besser zugänglich zu machen.

Abbildung 3A zeigt die übereinandergelegten GC/MS-Full-Scan-Chromatogramme für eine Avocado-Matrix-Blindprobe sowie die chromatographischen Profile, die aus EMR—Lipid-, C18/PSA- und Zirkonoxid-Sorbens-Aufreinigungsmethoden gewonnen wurden. Das Chromatogramm der Probe ohne weitere Aufreinigung (schwarze Spur) zeigt eine Fülle von Matrixinterferenzen, was die Analyse der Zielanalyten behindern wird. Die Chromatogramme von Extrakten, die mit C18/PSA- (blau) und Zirkonoxid-Sorbens- (grün) Aufreinigung behandelt wurden, zeigen 36 % und 55 % Matrixentfernung, siehe auch Gleichung 1. Die EMR—Lipid dSPE-Spur (rot) zeigt jedoch eine Entfernung dieser Interferenzen bis fast zur Basislinie im GC/MS-Full-Scan-Chromatogramm, was einer Matrixentfernung von 95 % entspricht. Die weitgehende Aufreinigung, die mit EMR—Lipid erreicht wird, hat offensichtliche Auswirkungen auf die Pestizidanalyse in Avocado, da entscheidend weniger Matrixbestandteile in den Proben enthalten sind, welche die Geräteleistung beeinflussen können. Zudem wird dies durch die Verwendung einer einfachen dSPE mit EMR—Lipid in einem konventionellen QuEChERS-Arbeitsablauf erreicht.

Abbildung 3B zeigt die überlagerten GC/MS/MS-MRM-Chromatogramme für Avocadoprobe, die mit 50 ppb Pestizidstandard dotiert wurden. Aufgrund der höheren Selektivität des MS/MS-Systems ist der Matrixhintergrund weniger signifikant als für ein GC/MS-SIM oder ein Full-Scan-Chromatogramm. Trotz der hervorragenden Selektivität für die untersuchten Analyten sind zwischen 11 und 20 Minuten auf dem Chromatogramm für C18/PSA (blau) und Zirkonoxid (grün) noch immer Interferenz-Peaks sichtbar. Diese Interferenzen stören die genaue Integration mancher Analyt-Signale. Die EMR—Lipid-Extrakte zeigen einen wesentlich saubereren Hintergrund, wie die rote Spur in Abbildung 3B belegt, was die Integrationsgenauigkeit dramatisch verbessert.

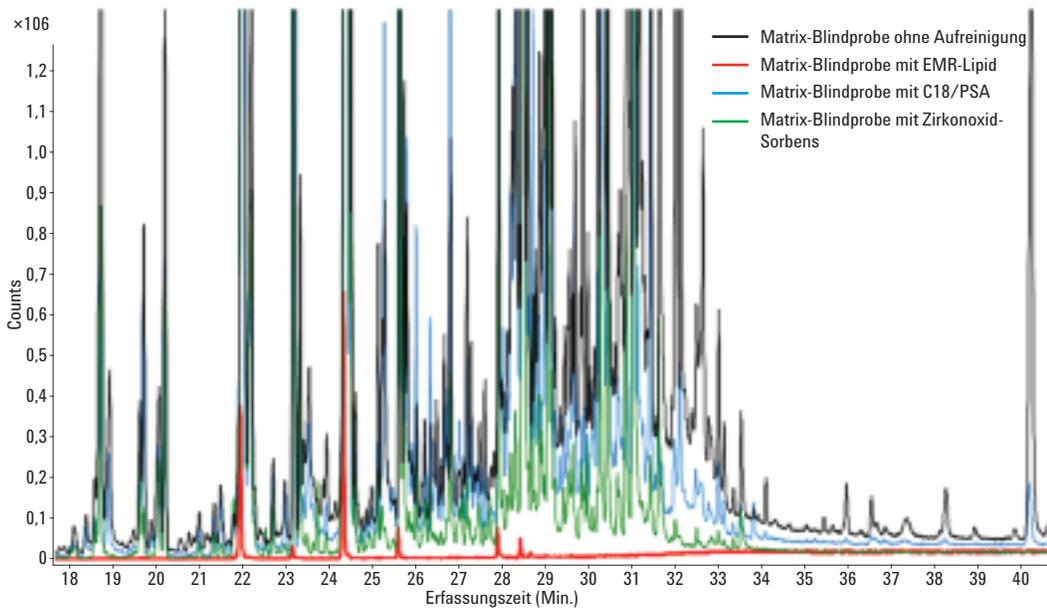


Abbildung 3A. GC/MS-Full-Scan-Chromatogramm, Überlagerung von Avocado-Blindproben vorbereitet mittels QuEChERS AOAC-Extraktion, mit anschließender dSPE mithilfe von Agilent Bond Elut EMR—Lipid (rot), Zirkonoxid (grün), PSA/C18 (blau) oder ohne Aufreinigung (schwarz).

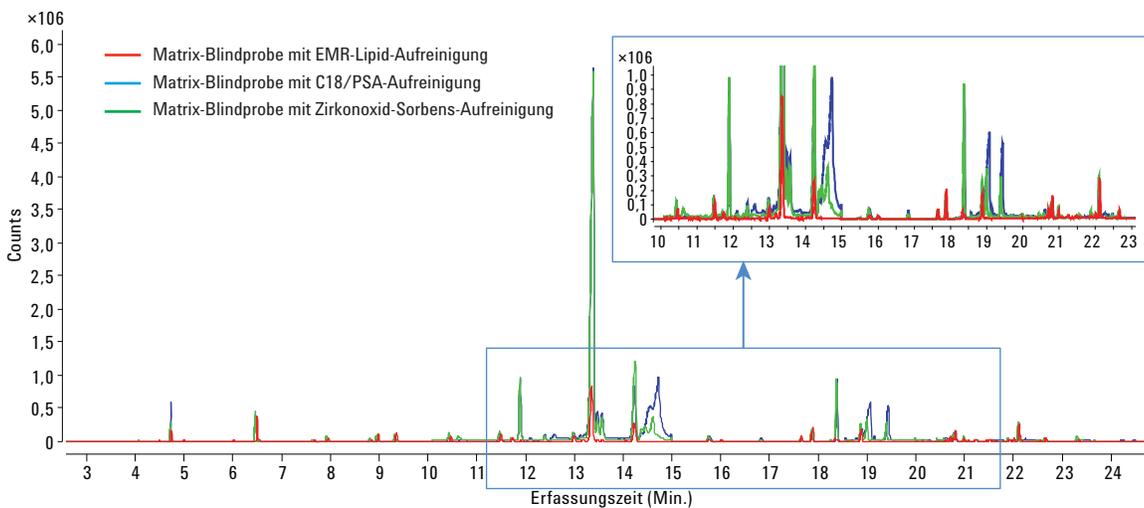


Abbildung 3B. GC/MS/MS-MRM-Chromatogramm, Überlagerung einer Avocado Probe, die unter Verwendung einer QuEChERS AOAC-Extraktion vorbereitet wurde, mit anschließendem Agilent Bond Elut EMR—Lipid (rot), C18/PSA (blau) und Zirkonoxid-Sorbens (grün). Alle Proben wurden mit einem 50-ppb-Pestizidstandard dotiert.

Die verbesserte Matrixaufreinigung durch EMR—Lipid und der positive Effekt einer ausgezeichneten Matrixentfernung für drei Beispielanalyten ist in Abbildung 4 dargestellt. Bei allen Chromatogrammen, in denen eine Aufreinigung mit EMR—Lipid erfolgte, zeigen sich weniger Interferenz-Peaks, ein besseres Signal/Rauschen-Verhältnis und stabilere Basislinienintegration. Diese Verbesserungen ermöglichen eine schnellere und einfachere Datenverarbeitung und -auswertung und erzeugen ein hohes Maß an Vertrauen in die analytische Methode.

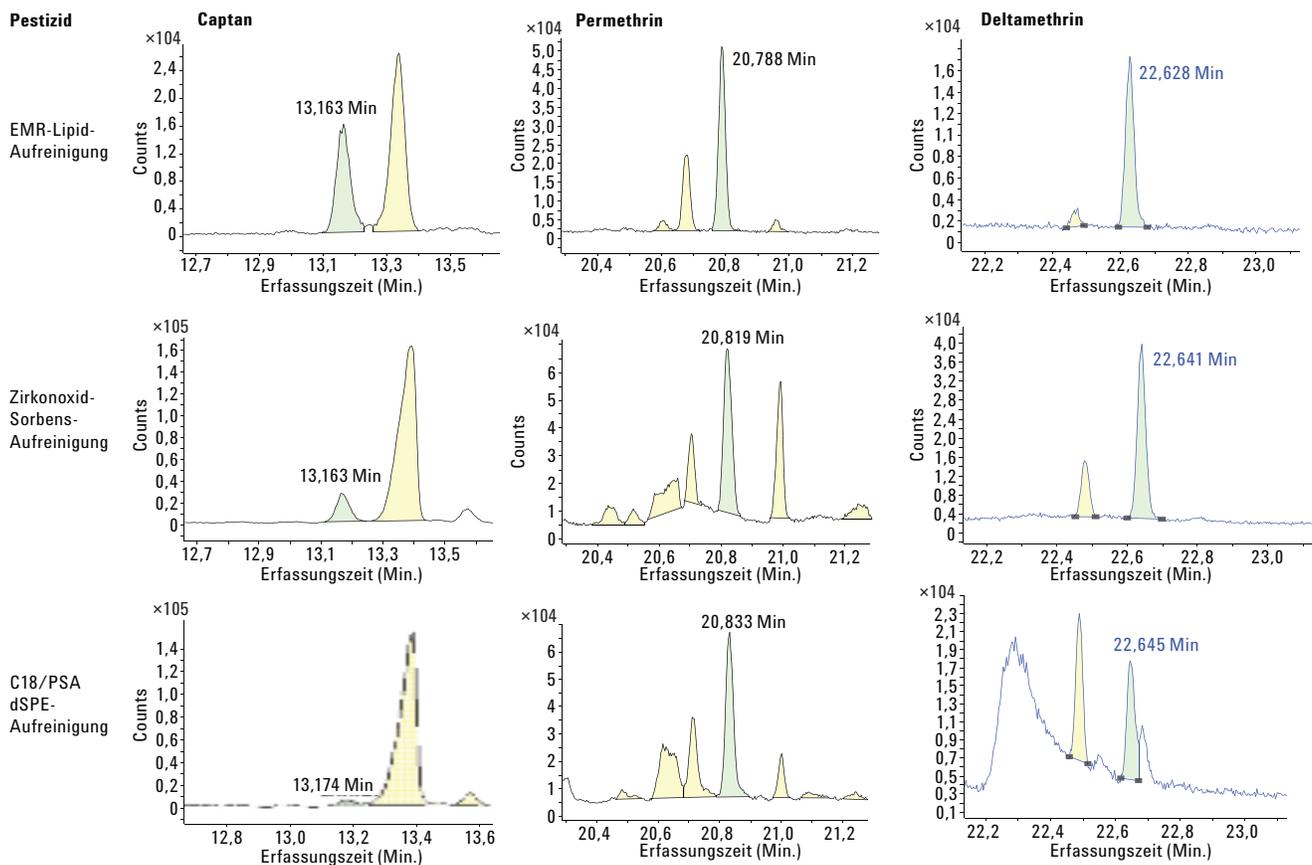


Abbildung 4. Chromatogrammvergleich für die untersuchten Analyten und den Einfluss der Matrix auf Peak-Response, Peak-Qualität und Interferenzen im MRM-Fenster. Blindproben wurden entweder mit Agilent Bond Elut EMR—Lipid, Zirkonoxid oder C18/PSA behandelt, und die endgültige Probe wurde mit einem 50 ppb-Pestizidstandard nachdotiert.

Methodenvalidierung

Die EMR—Lipid-Methode wurde durch ein komplettes Quantifizierungsbatch validiert. Interne Standards wurden für die Quantifizierung benutzt, und die Ergebnisse wurden in Form von Genauigkeit und Präzision dargestellt. Zur Quantifizierung wurden drei interne Standards genutzt: Parathion-ethyl-D₁₀, ¹³C-DDT und TPP. Für Analyten mit Retentionszeiten von weniger als 12 Minuten wurde Parathion-ethyl-D₁₀, für diejenigen mit einer Retentionszeit von mehr als 12 Minuten wurde TPP als IS eingesetzt. Wie bereits erwähnt, wurde ¹³C-DDT als IS für Aldrin, Endrin und DDT verwendet, um den Analytverlust durch schwache Extraktionseffizienz zu korrigieren.

Detaillierte Validierungsergebnisse sind in Tabelle 3 aufgeführt. Abbildung 6 stellt eine Zusammenfassung dar, die aus der durchschnittlichen Genauigkeit und Präzision generiert wurde, die für 18 Gesamtreplikate von QCs (drei Konzentrationen, n = 6) berechnet wurden. Die Genauigkeit für die Pestizide lag zwischen 70 % und 120 % für alle außer einem Analyten (67 %), und die Präzision lag unter 20 % RSD für alle Analyten, für 80 % sogar unter 10 % RSD. Die Genauigkeit für Aldrin betrug noch immer etwas unter 70 %, wies jedoch eine gute Präzision auf (RSD < 6 %) und ist gemäß der SANCO-Richtlinien akzeptabel [15].

Tabelle 3. Quantifizierungsergebnisse für Pestizide in Avocado, die mit den Mengen 5, 50 und 300 ng/g für sechs Replikate versetzt wurden.

Analyt	Kalibrierungskurve		Genauigkeit und Präzision der Methode (ng/g QCs ¹)						
	Regression Genauigkeit/Gewicht	R ²	Kal. Bereich (ng/g)	5 (25)		50 (250)		300 (1500)	
				Wdf %	RSD	Wdf %	RSD	Wdf %	RSD
Dichlorvos	Linear, 1/x	0,9967	1-400	97	8,2	108	4,9	111	12,7
Trichlorfon	Linear, 1/x	0,9964	5-2000 ¹	98	7,8	95	7,3	84	4,7
2-Phenylphenol	Linear, 1/x	0,9996	10-400 ²	97	14,0	104	1,7	105	5,1
Ethalfuralin	Linear, 1/x	0,9969	1-400	109	3,2	98	7,6	110	6,5
Sulfotep	Linear, 1/x	0,9958	1-400	96	5,8	76	3,9	85	9,8
Atrazin	Linear, 1/x	0,9967	1-400	91	5,0	80	2,1	76	3,9
Lindan	Linear, 1/x	0,9991	1-400	92	6,7	104	4,0	98	12,5
Chlorthalonil	Linear, 1/x	0,9944	1-400	89	13,5	103	8,6	92	19,4
Diazinon	Linear, 1/x	0,9993	1-400	102	6,8	116	5,1	108	8,9
Chlorpyrifos-methyl	Linear, 1/x	0,9984	1-400	101	6,2	123	4,5	113	15,0
Dichlofluanid	Linear, 1/x	0,9989	1-400	96	10,2	85	5,1	91	4,3
Aldrin	Linear, 1/x	0,9982	1-400	76	4,8	59	2,3	65	5,1
Tolylfluanid	Linear, 1/x	0,9990	10-400	108	10,0	93	6,2	93	5,4
Captan	Linear, 1/x	0,9959	25-2000 ^{1,2}	89	8,2	109	11,0	87	18,1
Folpet	Linear, 1/x	0,9897	5-2000 ¹	76	9,5	79	9,9	87	13,2
Procymidon	Linear, 1/x	0,9977	1-400	87	5,0	76	1,9	79	7,2
Bupirimat	Linear, 1/x	0,9957	5-2000 ¹	101	6,5	100	5,6	85	10,3
Endrin	Linear, 1/x	0,9967	1-400	75	10,8	88	6,7	80	13,6
Endosulfansulfat	Linear, 1/x	0,9996	1-400	96	9,9	97	6,4	95	4,9
DDT	Linear, 1/x	0,9995	1-400	103	4,5	105	2,6	107	4,6
Iprodion	Linear, 1/x	0,9995	1-400	97	6,7	105	2,7	97	4,2
Permethrin	Linear, 1/x	0,9992	1-400	87	6,6	97	4,3	84	14,0
Deltamethrin	Linear, 1/x	0,9963	1-400	89	13,8	92	8,3	98	11,5

¹ Verbindungen wurden wegen geringer Response in der kombinierten Standard-Arbeitslösung mit fünffach erhöhter Konzentration eingesetzt. Darum lagen die Dotierungen für QC und Kalibrierungsstandards fünf Mal höher als für die der anderen Verbindungen.

² Erhöhtes LOQ aufgrund schwacher Empfindlichkeit, oder ein Matrixinterferenz-Peak störte die Detektion des Analyten bei ursprünglichem LOQ.

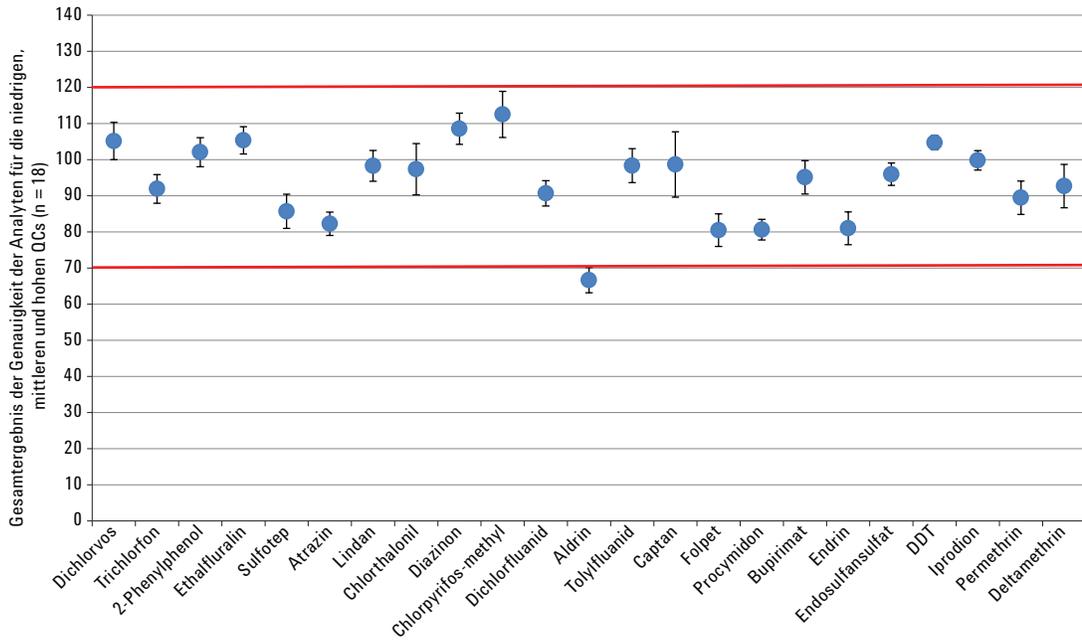


Abbildung 6. Quantifizierungsergebnisse für 23 Pestizide in Avocado unter Verwendung einer QuEChERS-Extraktion mit Agilent Bond Elut EMR—Lipid, dSPE. Die Datenpunkte repräsentieren Genauigkeit und Präzision und wurden für drei Konzentrationsbereiche aus sechs Replikaten kalkuliert. Fehlerbalken = 95 % KI.

Der Matrix-Effekt auf die GC/MS/MS-Systemleistung

Matrixinterferenzen beeinträchtigen die GC/MS/MS-Systemleistung im Laufe der Zeit umso stärker, je mehr Proben in das System injiziert werden. Aktive Stellen im GC-Flussweg können die Geräteleistung negativ beeinflussen. Inerte Flussweg-Komponenten von Agilent ergeben die beste Deaktivierung für den gesamten GC-Flussweg und reduzieren die negativen Wechselwirkungen zwischen Analyten und aktiven Stellen, die in Analytverlust und chromatographischen Anomalien resultieren, signifikant. Wenn die Matrix jedoch einen hohen Gehalt hochsiedender Verbindungen (hoher Fettgehalt) aufweist, wird sie sich auf der Oberfläche des Flusswegs ansammeln und neue aktive Stellen generieren. Mit der Zeit kann dies zu Änderungen der Analytresponse führen, welche die Methodenzuverlässigkeit entscheidend beeinflussen und die Anzahl der Injektionen je Charge einschränken. Um dies zu verhindern, müssen Labore verstärkt Gerätewartung wie Liner-Wechsel, Abschneiden oder Austauschen der Säulen durchführen, was zur Senkung der Produktivität im Labor führt.

Wie in der Bewertung der Matrixaufreinigung und gravimetrischen Bestimmung [14] demonstriert, erbrachten Proben, die mit EMR—Lipid behandelt wurden, einen signifikant saubereren Hintergrund, was beweist, dass wesentlich weniger Matrix in das GC/MS/MS-System eingebracht wird. Die Anzahl der aktiven Stellen, die sich im GC/MS-Flussweg ansammeln, wird verringert, was zur Erhaltung der analytischen Leistungsfähigkeit des Gerätes beiträgt. Dies zeigt sich in verbesserter Analyt-Präzision (RSDs) für über 100 Injektionen von Avocadoproben in das GC/MS/MS-System (Tabelle 4). Proben, die mit EMR—Lipid behandelt wurden, erreichten RSDs von <15 % für 91 % der Analyten, meist im einstelligen Bereich. Zwei Substanzen, Captan (RSD 29,9 %) und DDT (RSD 21,6 %) ergaben höhere RSDs während des 100-Injektionen-Experiments, jedoch 11,1 % bzw. 6,4 % RSD bei den ersten 50 Injektionen.

Tabelle 4. Vergleich der Analyt-Reproduzierbarkeit (RSDs) über 50 und 100 Injektionen von Avocadoproben, die mit Agilent Bond Elut EMR—Lipid, C18/PSA oder Zirkonoxid-Sorbens behandelt wurden, mittels GC/MS/MS. Die Proben wurden mit 50 ng/g angereichert. Analyt-Peakflächen wurden zur Kalkulation der RSD-Ergebnisse verwendet.

Pestizide	RSD für Analyt nach 100 Injektionen (n = 20)			RSD nach 50 Injektionen (n = 10)		
	EMR-Lipid-Aufreinigung	C18/PSA-Aufreinigung	Zirkonoxid-Sorbens-Aufreinigung	EMR-Lipid-Aufreinigung	C18/PSA-Aufreinigung	Zirkonoxid-Sorbens-Aufreinigung
Dichlorvos	6,2	10,5	16,8	2,2	9,4	6,3
2-Phenylphenol	7,0	13,6	19,5	5,0	12,4	8,4
Ethalfuralin	12,4	18,8	32,0	5,8	10,3	7,9
Sulfotep	7,1	11,8	17,2	3,1	6,4	10,8
Atrazin	6,8	12,2	19,1	3,2	12,2	5,2
Lindan	8,5	10,8	20,0	4,6	10,9	5,1
Chlorthalonil	12,5	11,7	37,4	8,0	12,9	11,0
Diazinon	6,6	11,7	16,9	4,4	10,5	5,6
Chlorpyrifos-methyl	8,4	8,9	14,9	3,8	8,6	6,6
Dichlorfluorid	11,7	9,0	25,9	5,4	9,9	5,5
Aldrin	9,8	19,3	25,7	8,6	19,3	7,1
Tolyfluorid	10,5	6,6	17,8	4,2	6,9	6,6
Captan	29,9	51,9	47,1	11,1	24,9	21,7
Procymidon	6,8	14,3	22,5	5,6	13,8	4,8
Bupirimat	6,8	10,4	20,7	7,6	11,0	6,2
Endrin	8,3	12,6	24,1	5,9	13,8	5,4
Endosulfan sulfat	8,5	12,1	22,4	5,3	12,7	6,4
DDT	21,6	22,4	42,6	6,4	12,0	11,8
Iprodion	11,0	10,7	40,0	8,2	10,9	16,3
Permethrin	6,8	11,8	18,8	5,2	11,2	8,6
Parathion-ethyl-d10 (IS)	11,8	7,2	13,0	4,7	6,8	7,0
TPP (IS)	9,1	19,9	28,3	9,0	22,5	12,8

C18/PSA ergab im Vergleich dazu RSDs <15 % für 74 % der Analyten und bei Zirkonoxid waren es mit nur 9 % noch deutlich weniger. Der mit Zirkonoxid behandelte Extrakt war mit 100 % der Analyten über 10 % RSD besonders problematisch, wovon bei 100 Injektionen 57 % deutlich über 20 % RSD lagen. Dies weist darauf hin, dass die größere Menge der im C18/PSA- und Zirkonoxid-Aufreinigungsextrakt enthaltenen Matrix die Geräteleistung negativ beeinflusst, was zu einer signifikanten Variabilität der Analytresponse führt. Diese Ergebnisse bescheinigen die ausgezeichnete Matrixentfernung durch EMR—Lipid, was für weniger Aktivität im GC-Flussweg sorgt sowie zu höherer Präzision über eine Vielzahl von Injektionen und einer größeren Anzahl Probendurchläufe führt, bevor das Gerät gewartet werden muss.

Schlussfolgerungen

Eine schnelle, zuverlässige und robuste Methode unter Verwendung einer QuEChERS AOAC-Extraktion, gefolgt von einer Agilent Bond Elut EMR—Lipid-Aufreinigung, wurde für die Analyse von 23 GC-nachweisbaren Pestiziden in Avocado entwickelt und validiert. Die Matrixeffekte wurden bewertet und mit den traditionellen C18/PSA- und Zirkonoxid-Sorbens-Aufreinigungsmethoden verglichen. Die Ergebnisse zeigen, dass EMR—Lipid eine bessere chromatographische Aufreinigung für sowohl GC/MS als auch GC/MS/MS gegenüber C18/PSA und Zirkonoxid-Sorbens gewährleistet. Die Einführung der EMR—Lipid-Aufreinigung ermöglicht die Verwendung von GC/MS zur Analyse von Proben mit hohem Fettgehalt der Matrix. Der Vergleich der Wiederfindungen demonstriert, dass die EMR—Lipid-Aufreinigung vergleichbare Analytwiederfindungen wie C18/PSA und eine bessere Wiederfindung als bei Zirkonoxid-Sorbens ermöglicht. Der größte Vorteil von EMR—Lipid in dieser Applikation betraf die hohe Effektivität der Matrixentfernung, was für ausgezeichnete Reproduzierbarkeit über 100 Injektionen in das GC/MS/MS-System sorgt. Die Analytresponses von C18/PSA- und besonders von zirkonoxid-behandelten Proben während dieses 100-Injektionen-Experiments waren hoch variabel. Die Verwendung von EMR—Lipid als dSPE-Aufreinigungsmaterial in einem QuEChERS-Arbeitsablauf verbessert daher die allgemeine Produktivität im Labor, erhöht den Probendurchsatz, verringert Datenbearbeitung und -auswertung, reduziert erneute Analysen von Chargen und verringert den Wartungsaufwand der Analysensysteme. Zukünftige Arbeiten werden die Vorteile verbesserter Matrixentfernung für andere komplexe Proben und Zielanalyten mit hohem Fettgehalt untersuchen.

Literatur

1. Anastassiades, M.; Lehotay, S. J.; Štajnbaher, D.; Schenck, F. *S. J. AOAC Int.* **2003**, *86*, 412-431.
2. Lehotay, S. J.; Mastovská, K.; Lightfield, A. R. *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 615-629.
3. Chamkasem, N.; Ollis, L. W.; Harmon, T.; Mercer, G. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 2315-2329.
4. Hildmann, F.; Gottert, C.; Frenzel, T.; Kempe, G.; Speer, K. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1403*, 1–20.
5. Lehotay, S. J. *Mass Spec. in Food Safety Methods in Mol. Biol.* **2011**, *747*, 65-91.
6. Sapozhnikova, Y.; Lehotay, S. J. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *758*, 80–92.
7. Morris, B. D.; Schriener, R. B. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 5107–5119.
8. Wong, J. W. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 7636-7646.
9. Hayward, D. G.; Wong, J. W. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 4686-4693.
10. Saito, K.; Sjödin, A.; Sandau, C. D.; Davis, M. D.; Nakazawa, H.; Matsuki, Y.; Patterson Jr., D. G. *Chemosphere* **2004**, *57*, 373–381.
11. Kegley, S.E.; Hill, B.R.; Orme, S.; Choi, A. H. *PAN Pesticide Database; Pesticide Action Network, North America, Oakland, CA, USA, 2014.*
http://www.pesticideinfo.org/Search_Chemicals.jsp
12. Szelewski, M. J.; Quimby, B. *New Tools for Rapid Pesticide Analysis in High Matrix Samples; Application note, Agilent Technologies, Inc. Publikationsnummer 5989-1716EN, 2004.*
13. Meng, C-K. *The GC/MS/MS Analyzer and the Pesticides and Environmental Pollutants MRM Database; Application note, Agilent Technologies, Inc. Publikationsnummer 5990-9453EN, 2011.*
14. Zhao, L.; Lucas, D. *Multiresidue Analysis of Pesticides in Avocado with Bond Elut EMR—Lipid by LC/MS/MS; Application Note, Agilent Technologies, Inc. Publikationsnummer 5991-6098EN, 2015.*
15. Anon. *Guidance Document on Analytical Quality Control and Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed, SANCO/12571/2013, 19 November 2013; European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, Brussels, Belgium.*

Weitere Informationen

Diese Daten stellen typische Ergebnisse dar. Weitere Informationen zu unseren Produkten und Leistungen finden Sie auf unserer Website unter www.agilent.com/chem.

www.agilent.com/chem

Agilent haftet weder für hierin enthaltene Fehler noch für Neben- oder Folgeschäden in Zusammenhang mit der Bereitstellung, Leistung oder Verwendung dieses Materials.

Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc., 2015
Gedruckt in den USA,
4. August 2015
5991-6097DEE



Agilent Technologies