

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

## Nota applicativa

Analisi alimentare e agricoltura

### Autori

Limian Zhao e Derick Lucas  
Agilent Technologies, Inc.

### Abstract

Agilent Bond Elut QuEChERS Enhanced Matrix Removal—Lipid (EMR—Lipid) rappresenta l'ultima generazione di prodotti per la preparazione del campione e viene usato in un apposito formato per l'estrazione in fase solida dispersa (dSPE) per una rimozione estremamente selettiva della matrice, evitando ripercussioni sul recupero degli analiti, in particolare nel caso di campioni ad alto contenuto di grassi. Questo studio dimostra l'applicazione di questo nuovo prodotto per l'analisi di 23 pesticidi per GC nell'avocado tramite GC/MS/MS. La procedura prevede un'estrazione QuEChERS con metodo AOAC, seguita da dSPE con EMR—Lipid e sali di purificazione. EMR—Lipid fornisce maggiore rimozione della matrice in peso, scansione completa in GC/MS e determinazione dell'effetto della matrice rispetto a C18/PSA e agli adsorbenti a base di zirconia. Inoltre, una minore quantità di matrice viene introdotta nel sistema analitico. I dati dimostrano inoltre un netto miglioramento della riproducibilità per gli analiti, per 100 iniezioni, rispetto a C18/PSA e soprattutto alla zirconia, in cui si osservano significative variazioni di risposta. EMR—Lipid ha un'elevata selettività per i lipidi e non influisce negativamente sul recupero degli analiti. Il recupero degli analiti è infatti elevato e la precisione eccezionale. Questo lavoro dimostra che la dSPE con EMR—Lipid si integra facilmente nel flusso di lavoro QuEChERS e consente una preparazione del campione rapida, robusta ed efficace, con la rimozione della matrice più efficace disponibile per l'analisi multiresiduale di pesticidi nell'avocado.



**Agilent Technologies**

## Introduzione

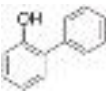
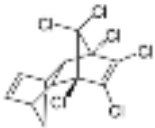
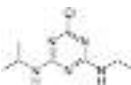
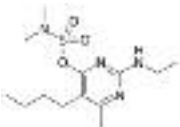
L'analisi dei residui di pesticidi nei prodotti alimentari è un'operazione di routine per molti laboratori che utilizzano il metodo QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) [1,2]. Esso permette di analizzare centinaia di pesticidi a basse concentrazioni con una singola estrazione. Sebbene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

L'analisi può essere svolta combinando metodi LC e GC per adattarsi a pesticidi volatili, semivolatili e non volatili associati a svariati metodi multi-classe, multiresiduali [4]. Sebbene molti pesticidi siano adatti sia alla LC che alla GC, molti altri non lo sono. Ogni tecnica cromatografica presenta specifici vantaggi e svantaggi in termini di quantificazione degli analiti ed effetti avversi degli interferenti della matrice. La rimozione di questi interferenti è essenziale per una quantificazione accurata in matrici alimentari complesse, e necessita di un trattamento con adsorbenti per la rimozione dalle matrici come C18, PSA e GCB [5]. Sono disponibili in commercio altri materiali contenenti zirconia, che generalmente migliorano la rimozione dei lipidi

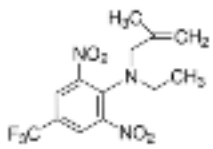
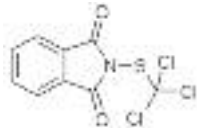
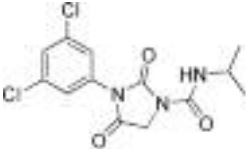
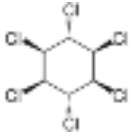
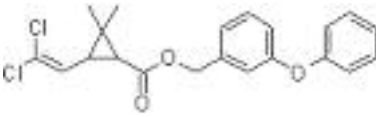
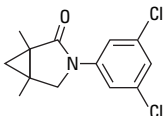

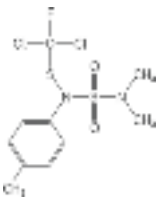
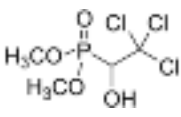
rispetto ai tipici adsorbenti usati per la loro rimozione dalle matrici. Tuttavia, essi non mirano a tutte le classi lipidiche e possono trattenere anche gli analiti di interesse [6,7]. I campioni con un alto contenuto lipidico possono richiedere anche una purificazione per mezzo di cartucce SPE [7,8,9] o la cromatografia a permeazione di gel (GPC) [10], allungando i tempi e aumentando i costi di un'analisi altrimenti di routine.

Agilent Bond Elut EMR—Lipid è un nuovo materiale adsorbente che rimuove selettivamente le principali classi di lipidi durante l'estrazione del campione senza perdita di analiti. L'eliminazione delle interferenze dovute ai lipidi dalle matrici complesse è di particolare importanza per il metodo QuEChERS, in cui grandi quantità di matrici vengono estratte assieme agli analiti target. L'avocado è noto per essere una matrice difficile, a causa dell'elevato contenuto di lipidi (dal 15 al 20%) ed è stato perciò scelto come campione rappresentativo per la valutazione di EMR—Lipid. Questo studio analizza la preparazione del campione per le analisi di 23 pesticidi compatibili con la GC nell'avocado usando un'estrazione QuEChERS con metodo AOAC seguita da dSPE con EMR—Lipid e sali di purificazione. I pesticidi provengono da 10 classi diverse, per estendere l'ambito dell'applicazione (Tabella 1). Questa nota applicativa dimostra l'eccezionale purificazione offerta da EMR—Lipid per campioni lipidici complessi come l'avocado e il livello elevato di recupero e precisione per 23 residui di pesticidi multiclasse a tre livelli diversi.

Tabella 1. Analiti target, classe, log P, solubilità in acqua e struttura chimica [11].

Nome	Categoria	Log P	Solubilità in acqua (mg/l)	Formula molecolare	Struttura
2-fenilfenolo	Fenolo	3,18	560	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> O	
Aldrin	Organoclorurato	6,5	0,003	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>6</sub>	
Atrazina	Triazina	2,7	33	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>5</sub>	
Bupirimate	Pirimidinolo	2,2	22	C <sub>13</sub> H <sub>24</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> S	

Nome	Categoria	Log P	Solubilità in acqua (mg/l)	Formula molecolare	Struttura
Captano	Ftalimmide	2,5	5,1	$C_9H_8Cl_3NO_2S$	
Clorotalonil	Cloronitrile	2,94	1,0	$C_8Cl_4N_2$	
Clorpirifos metile	Organofosfato	4,0	2,74	$C_7H_7Cl_3NO_3PS$	
DDT	Organoclorurato	6,91	0,006	$C_{14}H_9Cl_5$	
Deltametrina	Piretroide	4,6	0,0002	$C_{22}H_{19}Br_2NO_3$	
Diazinone	Organofosfato	3,69	60	$C_{12}H_{21}N_2O_3PS$	
Diclofluanide	Sulfamidico	3,7	1,3	$C_9H_{11}Cl_2FN_2O_2S_2$	
Dichlorvos	Organofosfato	1,9	18.000	$C_4H_7Cl_2O_4P$	
Endosulfan solfato	Organoclorurato	3,13	0,48	$C_9H_6Cl_6O_3S$	
Endrin	Organoclorurato	3,2	0,24	$C_{12}H_8Cl_6O$	

Nome	Categoria	Log P	Solubilità in acqua (mg/l)	Formula molecolare	Struttura
Etalfuralina	Dinitroanilina	5,11	0,01	$C_{13}H_{14}F_3N_3O_4$	
Folpet	Ftalimide	3,02	0,8	$C_9H_4Cl_3NO_2S$	
Iprodione	Dicarbossimide	3,1	12,0	$C_{13}H_{13}Cl_2N_3O_3$	
Lindano	Organoclorurato	3,5	8,52	$C_6H_6Cl_6$	
Permetrina	Piretroide	6,1	0,006	$C_{21}H_{20}Cl_2O_3$	
Procimidone	Dicarbossimide	3,3	2,46	$C_{13}H_{11}Cl_2NO_2$	
Sulfotep	Organofosfato	3,99	10	$C_8H_{20}O_5P_2S_2$	
Tolilfluamide	Sulfamidico	3,9	0,9	$C_{10}H_{13}Cl_2FN_2O_2S_2$	
Triclorfon	Organofosfato	0,43	120.000	$C_4H_8Cl_3O_4P$	

## Risultati sperimentali

Tutti i reagenti e i solventi utilizzati erano di grado HPLC o analitico. Acetonitrile (ACN) e metanolo sono stati acquistati da Honeywell (Muskegon, MI, USA). L'acido acetico (AA) di grado reagente, gli standard di pesticidi e lo standard interno sono stati acquistati da Sigma-Aldrich, Corp. (St Louis, Missouri, USA).

## Soluzioni e standard

L'acido acetico all'1% in ACN è stato preparato aggiungendo 10 mL di acido acetico a 990 mL di ACN. Le soluzioni stock di standard e standard interni (IS) sono state preparate in ACN o metanolo a 2,0 mg/mL. È stata preparata una soluzione di lavoro combinata in ACN a 25 µg/mL, eccetto per captano, folpet, triclorfon e bupirimate. A causa delle risposte relativamente basse sullo strumento, nella soluzione di lavoro combinata la concentrazione è stata aumentata di cinque volte per questi quattro composti, pari a 125 µg/mL. Un'aliquota di 25 µg/mL di soluzione di lavoro IS combinata è stata preparata in ACN, comprendente TPP, paratione etile d<sub>10</sub> e <sup>13</sup>C-DDT.

## Apparecchiature

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

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

## Strumentazione

L'analisi è stata condotta su un sistema GC Agilent 7890A dotato di autocampionatore Agilent 7693B e su un sistema GC/MS Agilent 7000C a triplo quadrupolo. È stato utilizzato il backflush della colonna, altamente raccomandato per matrici di campione complesse [12]. Il tempo totale di analisi per un campione con aggiunta di standard è stato di 23 minuti, con due minuti per il backflush della colonna.

## Condizioni della strumentazione

### Condizioni della GC

Autocampionatore:	Autocampionatore Agilent 7693 e vassoio portacampioni Siringa da 10 µL (codice G4513-80220), volume di iniezione 1 µL Tre lavaggi post-iniezione con solvente A (acetonitrile) Tre pompe campione Tre lavaggi post- iniezione con solvente B (isopropanolo)
Colonna:	Agilent J&W DB-5ms Ultra Inert, 15 m × 0,25 mm, 0,25 µm (codice 122-5512UI)
Gas di trasporto:	Elio, pressione costante
Filtro gas:	Kit di filtri di purificazione del gas di trasporto, 1/8" (codice CP17974)
Liner per iniettore:	Liner splitless single gooseneck Agilent Ultra Inert con lana di vetro (codice 5190-2293)
Iniettore:	Iniettore MMI in modalità splitless a freddo pulsata, 75 °C inizialmente, tenuta per 0,02 min, poi rampa a 350 °C a 750 °C/min
Pressione di impulso di iniezione:	36 psi fino a 0,75 min
Flusso di spurgo allo spurgo split:	60 mL/min a 0,75 min
Pressione in ingresso:	17 psi durante il ciclo e 1,0 psi durante il backflush
Forno:	60 °C per 2,57 min, fino a 150 °C a 50 °C/min, a 200 °C a 6 °C/min, a 300 °C a 16 °C/min, mantenuti per 3 min
Post-analisi:	2 min a 300 °C
Capillary Flow Technology:	UltiMetal Plus Purged Ultimate Union (codice G3182-61581) per il backflush della colonna analitica e dell'iniettore
Gas EPC aus.:	Elio collegato a Purged Ultimate Union
Linea di spurgo:	d.e. 0,0625" × d.i. 0,010" × 100 cm, tubi 316SS sul forno
Pressione aus.:	4 psi durante il ciclo, 75 psi durante il backflush
Collegamenti:	Tra l'iniettore e Purged Ultimate Union
Restrittore:	Tubi in silice fusa disattivata inerte, 0,65 m × 0,15 mm (codice 160-7625-5)
Collegamenti:	Tra Purged Ultimate Union e l'MSD

### Condizioni dell'MSD

MSD:	Sistema GC/MS Agilent 7000C a triplo quadrupolo, inerte con elettronica ad alte prestazioni
Pompa per vuoto:	Turbo ad alta efficienza
Modalità:	MRM
File di calibrazione:	Atune.u
Temp. linea di trasferimento:	280 °C
Temp. sorgente:	300 °C
Temp. del quad:	150 °C per Q1 e Q2
Ritardo solvente:	2,57 min
Flusso di gas di collisione:	Gas di raffreddamento He a 2,35 mL/min, gas di collisione N <sub>2</sub> a 1,5 mL/min
Risoluzione MS:	MS1 e MS2 = 1,2 u

I parametri MRM sono stati facilmente individuati per ogni analita utilizzando il database MRM per pesticidi e residui di inquinanti ambientali (G9250AA), che contiene informazioni sulle condizioni di MS/MS e sui tempi di ritenzione per oltre 1.070 composti [13].

La Tabella 2 elenca le transizioni MRM per gli analiti target utilizzati in questo studio. Un esempio di un tipico cromatogramma GC/MS/MS è riportato nella Figura 1 per i 23 pesticidi in esame.

Tabella 2. Condizioni e tempo di ritenzione MRM GC/MS/MS per l'analisi dei pesticidi.

Analita	RT (min)	MRM			
		ione quant	CE (v)	ione qual	CE (v)
Dichlorvos	4,70	184,9 → 93	10	109 → 79	5
Triclorfon	5,94	110,8 → 47	30	81,8 → 47	50
2-fenilfenolo	6,39	169 → 115,1	25	170 → 141,1	25
Etalfuralina	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
Atrazina	8,69	214,9 → 58,1	10	214,9 → 200,2	5
Lindano	8,83	181 → 145	15	216,9 → 181	5
Clorotalonil	9,20	263,8 → 168	25	265,8 → 231	20
Diazinone	9,22	137,1 → 54	20	199,1 → 93	20
Clorpirifos metile	10,30	285,9 → 92,9	20	124,9 → 47	15
Diclofluanide	11,31	223,9 → 123,1	20	123 → 77	20
Aldrin	11,55	262,9 → 192,9	35	254,9 → 220	35
Paration etile D <sub>10</sub> (SI)	11,96	98,7 → 67	10	114,9 → 82,9	20
Tolilfluanide	12,80	136,9 → 91	20	136,9 → 65	30
Captano	12,96	151 → 79,1	15	149 → 79,1	10
Forpet	13,13	259,8 → 130,1	15	261,8 → 130,1	15
Procimidone	13,13	282,8 → 96	10	96 → 67,1	10
Bupirimato	15,44	272,9 → 193,1	15	272,9 → 108	5
Endrin	15,68	316,7 → 280,8	5	244,8 → 173	30
Endosulfan solfato	17,44	273,9 → 238,9	15	271,9 → 237	15
<sup>13</sup> 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 (SI)	18,20	325,9 → 169	30	325,9 → 233	27
Iprodione	18,82	313,8 → 55,9	20	187 → 124	25
Permetrina	20,68	183,1 → 153,1	15	183,1 → 153,1	15
Deltametrina	22,51	252,9 → 93	15	181 → 152,1	25

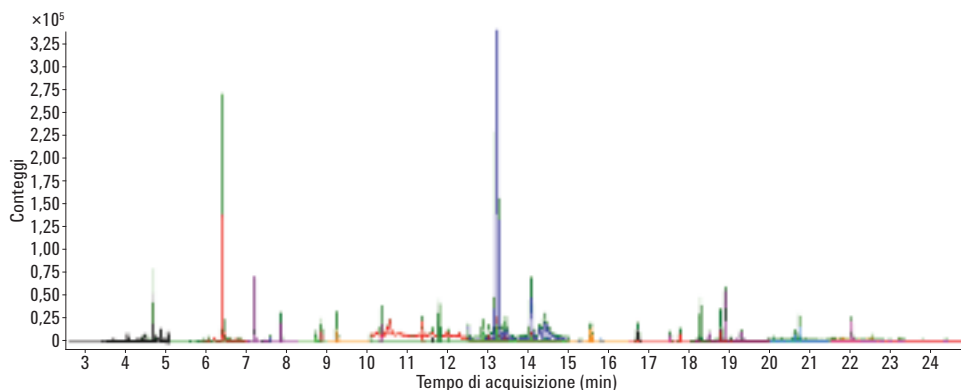


Figura 1. Tipico cromatogramma GC triplo quadrupolo (MRM) di un campione di avocado arricchito con uno standard di pesticidi di 50 ng/g. Per la preparazione del campione è stato utilizzato il protocollo QuEChERS, seguito da purificazione Agilent Bond Elut EMR—Lipid.

## Preparazione del campione

La procedura di preparazione del campione finale è stata così ottimizzata:

1. Pesare 15 g ( $\pm 0,1$  g) di avocado omogeneizzato in tubi per centrifuga da 50 mL.
2. Aggiungere 15 mL di acetonitrile (1% AA) e agitare in vortex per 10 secondi.
3. Aggiungere il pacchetto di sali per estrazione AOAC.
4. Miscelare in un agitatore meccanico per 2 min.
5. Centrifugare a 5.000 giri/min per 5 min.
6. Aggiungere 5 mL di acqua a una provetta per dSPE EMR—Lipid da 15 mL e trasferire 5 mL di surnatante alla provetta EMR—Lipid.
7. Agitare in vortex immediatamente per disperdere il campione, quindi per altri 60 s con l'intero batch in vortexer multitubo.
8. Centrifugare a 5.000 giri/min per 3 min.
9. Trasferire 5 mL di surnatante in un tubo di purificazione per EMR—Lipid da 15 mL contenente 2 g di sali (1:4, NaCl:MgSO<sub>4</sub>) e agitare in vortex per 1 min.
10. Centrifugare a 5.000 giri/min per 3 min.
11. Trasferire lo strato superiore di ACN in un vial campione per l'iniezione GC/MS/MS.

Il protocollo di lavoro completo per la preparazione del campione viene mostrato nella Figura 2.

## Standard di calibrazione e campioni di controllo qualità

I campioni di QC precedentemente arricchiti sono stati arricchiti con la soluzione di lavoro standard combinata, a concentrazioni adeguate, dopo il punto 1, in sei analisi replicate. I campioni di QC corrispondono a 5, 50 e 300 ng/g in avocado. I campioni di QC erano 25, 250 e 1.500 ng/g per captano, folpet, triclorfon e bupirimato. Una soluzione contenente lo standard interno è stata inoltre aggiunta a tutti i campioni, eccetto la matrice in bianco, corrispondente a 250 ng/g in avocado.

Gli standard di calibrazione in matrice, preparati con soluzioni di lavoro standard e standard interno, sono stati opportunamente aggiunti ai campioni di matrice in bianco dopo il punto 10, corrispondenti a 1, 5, 10, 50, 100, 200, 300 e 400 ng/g in avocado e a 250 ng/g di standard interno. I quattro composti hanno utilizzato standard di calibrazione a 5, 25, 50, 250, 500, 1.000, 1.500 e 2.000 ng/g.

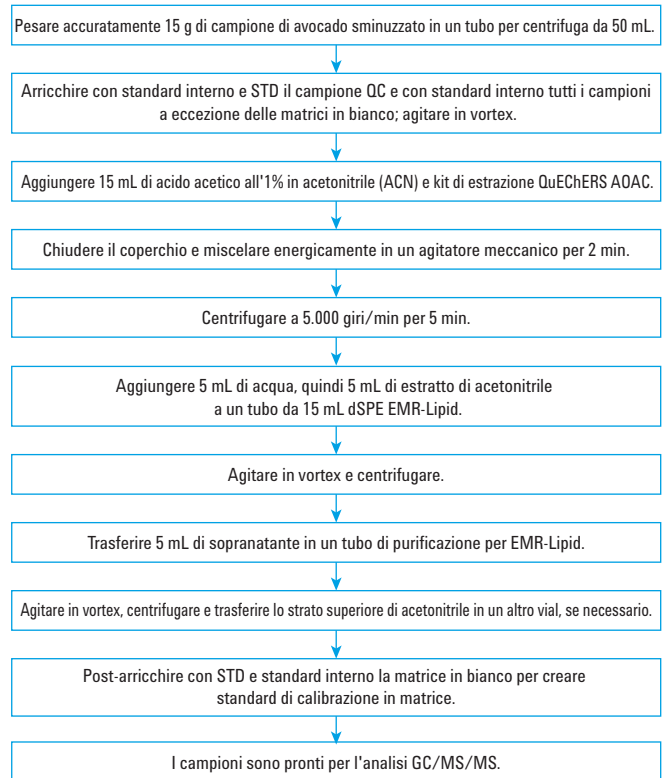


Figura 2. Protocollo di lavoro di preparazione del campione che mostra un'estrazione QuEChERS con purificazione Agilent Bond Elut EMR—Lipid, per l'analisi di pesticidi nell'avocado mediante GC/MS/MS.

## Valutazione della purificazione della matrice

Gli estratti di avocado sono stati applicati a tre diversi materiali di purificazione, dSPE fatty (C18/PSA), adsorbente a base di zirconia ed EMR—Lipid. Un esperimento ha confrontato il profilo GC/MS in scansione completa dell'estratto finale, prima e dopo la purificazione. I cromatogrammi sono stati sovrapposti per confrontare la purificazione della matrice rispetto al fondo cromatografico. Per valutare quantitativamente l'efficienza di purificazione della matrice, il cromatogramma GC/MS in scansione completa è stato integrato manualmente sull'intera finestra e l'efficienza di rimozione della matrice è stata poi calcolata secondo l'Equazione 1.

$$\% \text{ rimozione della matrice} = \frac{\text{Area di picco totale picco Campione senza purificazione} - \text{Area di picco totale picco Campione con purificazione}}{\text{Area di picco totale picco Campione senza purificazione}} \times 100$$

### Equazione 1

È stato pubblicato un esperimento gravimetrico, che ha confrontato il peso degli interferenti di avocado dopo il trattamento con EMR—Lipid, C18/PSA e adsorbente a base di zirconia [14].

## Confronto dei metodi e validazione

Un esperimento di recupero degli analiti ha confrontato campioni pre-arricchiti e post-arricchiti a 50 ng/g in avocado. I campioni sono stati trattati mediante la procedura di estrazione QuEChERS con metodo AOAC, seguita da purificazione EMR—Lipid, C18/PSA o zirconia. Per la purificazione EMR—Lipid è stato seguito il protocollo mostrato nella Figura 2. Per gli altri materiali è stata applicata la stessa estrazione QuEChERS, con purificazione con C18/PSA e adsorbente in zirconia. Un'aliquota di 1 mL di estratto grezzo in ACN è stata poi trasferita in una provetta per dSPE di C18/PSA da 2 mL (codice 5982-5122) o un vial da 2 mL contenente 100 mg di adsorbente a base di zirconia. Tutti i campioni sono stati agitati in vortex per un minuto e centrifugati a 13.000 giri/min per tre minuti, in una microcentrifuga. Lo strato di ACN è stato poi trasferito in un vial per l'analisi GC/MS/MS. Gli standard di calibrazione in matrice sono stati preparati aggiungendo successivamente l'estratto di avocado in bianco con standard e standard interni. I recuperi sono stati calcolati con il rapporto delle aree del picco dell'analita dai campioni pre- e post-arricchimento.

Il metodo EMR—Lipid è stato validato in avocado su tre livelli, in sei analisi replicate, utilizzando una curva di calibrazione in matrice su 8 punti. Per la quantificazione è stato usato uno standard interno (IS) e sono stati riportati i dati di accuratezza e precisione.

## Impatto della matrice sulle prestazioni del sistema GC/MS/MS

L'impatto della matrice sulle prestazioni del sistema GC/MS/MS è stato studiato valutando la coerenza della risposta degli analiti su più iniezioni di campioni di avocado. L'esperimento ha confrontato la risposta degli analiti in GC/MS/MS nel tempo, eseguendo più iniezioni di estratti di avocado trattati con EMR—Lipid, C18/PSA o adsorbente a base di zirconia. Ogni batch di test comprendeva matrici in bianco e campioni di QC arricchiti post estrazione a 50 ppb. La sequenza ha previsto l'iniezione di quattro bianchi con un campione di QC alla quinta iniezione ed è stata eseguita per 100 iniezioni in totale. Lo scopo era determinare l'effetto esercitato dalla matrice non rimossa accumulata sulle superfici del sistema GC/MS sulla risposta strumentale degli analiti, utilizzando diverse opzioni di purificazione. Per ogni purificazione, la risposta degli analiti (area del picco) è stata utilizzata per calcolare l'RSD % nel ciclo di 100 iniezioni. Per escludere il contributo del percorso del flusso GC, si sono utilizzati prodotti di consumo Inert Flow Path di Agilent, con un nuovo liner e una nuova colonna Ultra Inert di Agilent per ogni metodo di purificazione.

## Risultati e discussione

### Valutazione della purificazione della matrice

Le matrici complesse hanno un impatto significativo sulle prestazioni della GC/MS, dal momento che la matrice forma siti attivi lungo le superfici percorse dal flusso GC, induce effetti specifici nello spettrometro di massa e introduce interferenze nel cromatogramma finale. Anche se la GC/MS (SIM) e la GC/MS/MS (MRM) mostrano una maggiore selettività per gli ioni target, la matrice non rimossa può comunque causare interferenze e un decadimento delle prestazioni nel corso del tempo. Per ovviare agli effetti negativi delle matrici ad alto contenuto di grassi, come l'avocado, è necessario applicare metodi più completi per la purificazione della preparazione del campione, al fine di rendere i campioni più adatti all'analisi GC/MS.

La Figura 3A mostra i cromatogrammi GC/MS in scansione completa sovrapposti per una matrice in bianco di avocado e i profili cromatografici ottenuti dai metodi di purificazione EMR—Lipid, C18/PSA e zirconia. Il cromatogramma del campione senza ulteriore purificazione (traccia nera) mostra abbondanti interferenze dovute alla matrice, che ostacolano l'analisi degli analiti target. I cromatogrammi degli estratti sottoposti a purificazione con C18/PSA (blu) e adsorbente a base di zirconia (verde) evidenziano una rimozione della matrice rispettivamente del 36% e 55%, come determinato dall'Equazione 1. Tuttavia, la traccia della dSPE con EMR—Lipid (rosso) mostra una rimozione quasi vicina alla linea di base delle interferenze sul cromatogramma GC/MS in scansione completa, corrispondente a una rimozione della matrice del 95%. L'elevato livello di purificazione raggiunto con EMR—Lipid ha evidenti implicazioni per l'analisi dei pesticidi nell'avocado, dato che vi è una quantità di matrice nel campione notevolmente minore che può influire sulle prestazioni dello strumento. Inoltre, ciò si realizza utilizzando una semplice dSPE con EMR—Lipid, in un flusso di lavoro QuEChERS convenzionale.

La Figura 3B mostra i cromatogrammi MRM GC/MS/MS sovrapposti per i campioni di avocado arricchiti con 50 ppb di standard di pesticidi. Grazie alla migliore selettività del sistema MS/MS, il fondo della matrice è meno influenzato rispetto a un cromatogramma GC/MS SIM o in scansione completa. Nonostante la superiore selettività per gli analiti di interesse, sono comunque presenti picchi di interferenze tra 11 e 20 minuti sul cromatogramma per C18/PSA (blu) e zirconia (verde). Tali interferenze influiscono sull'accuratezza dell'integrazione per alcuni segnali degli analiti. Gli estratti con EMR—Lipid mostrano uno sfondo sostanzialmente più pulito, che risulta evidente nella traccia rossa nella Figura 3B, migliorando notevolmente l'accuratezza dell'integrazione.



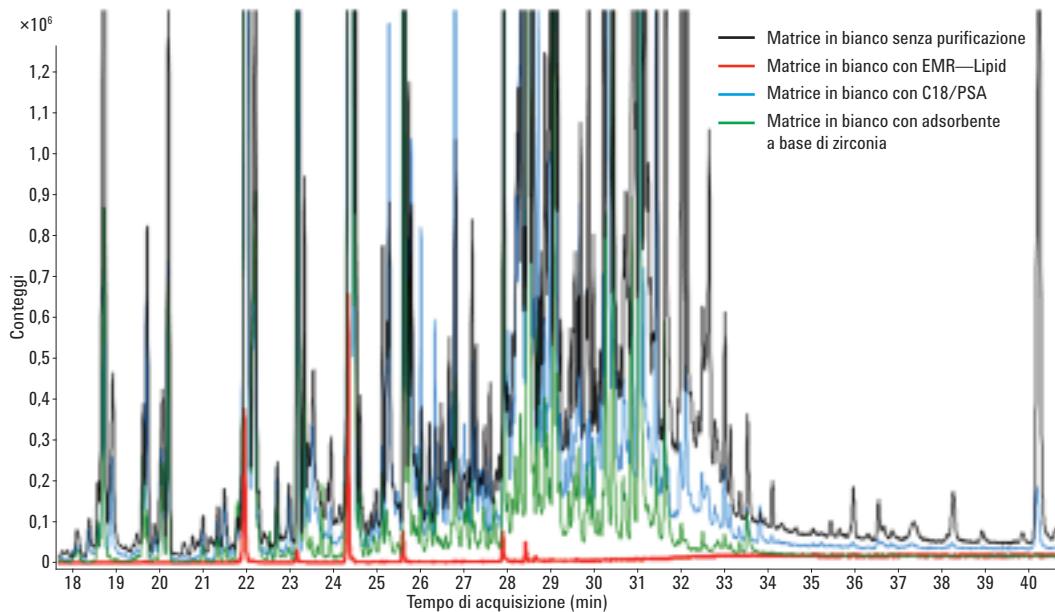


Figura 3A. Sovrapposizione dei cromatogrammi GC/MS in scansione completa di matrici in bianco di avocado, preparate mediante estrazione QuEChERS con metodo AOAC seguita da dSPE con l'uso di Agilent Bond Elut EMR—Lipid (rosso), zirconia (verde), PSA/C18 (blu) o senza purificazione (nero).

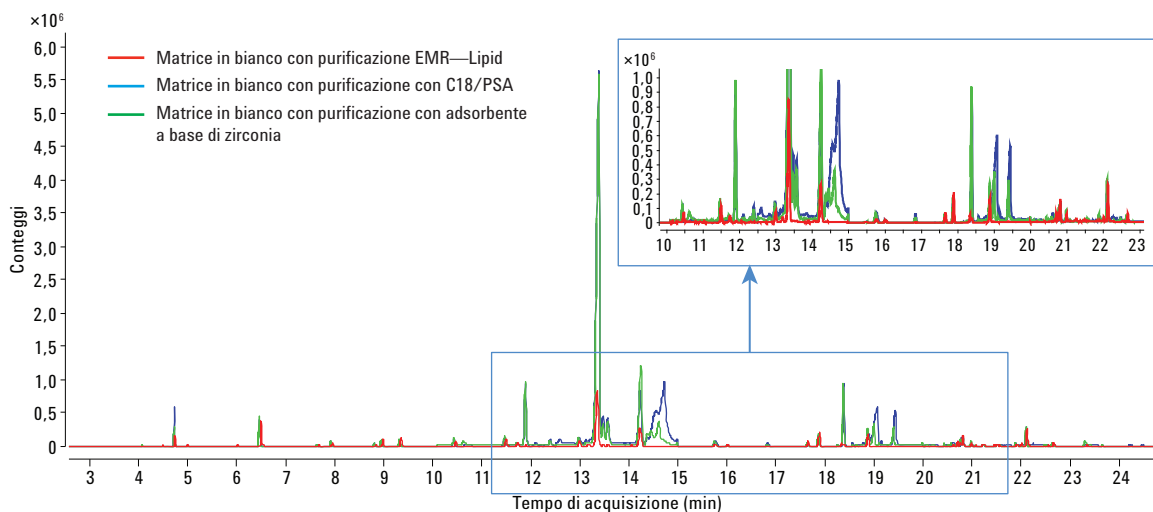


Figura 3B. Sovrapposizione dei cromatogrammi MRM GC/MS/MS di un campione di avocado preparato mediante estrazione QuEChERS con metodo AOAC seguita da Agilent Bond Elut EMR—Lipid (rosso), C18/PSA (blu) e adsorbente a base di zirconia (verde). Tutti i campioni sono stati arricchiti con uno standard di pesticidi a 50 ppb.

La Figura 4 dimostra la migliore purificazione della matrice offerta da EMR—Lipid e l'effetto positivo della rimozione più efficace per i tre analiti di esempio. In tutti i casi, i cromatogrammi che hanno utilizzato la purificazione EMR—Lipid evidenziano minori picchi di interferenza, un migliore rapporto segnale/rumore e un'integrazione della linea di base coerente. Questi miglioramenti accelerano e semplificano l'elaborazione e la revisione dei dati, aumentando il livello di affidabilità del metodo analitico.

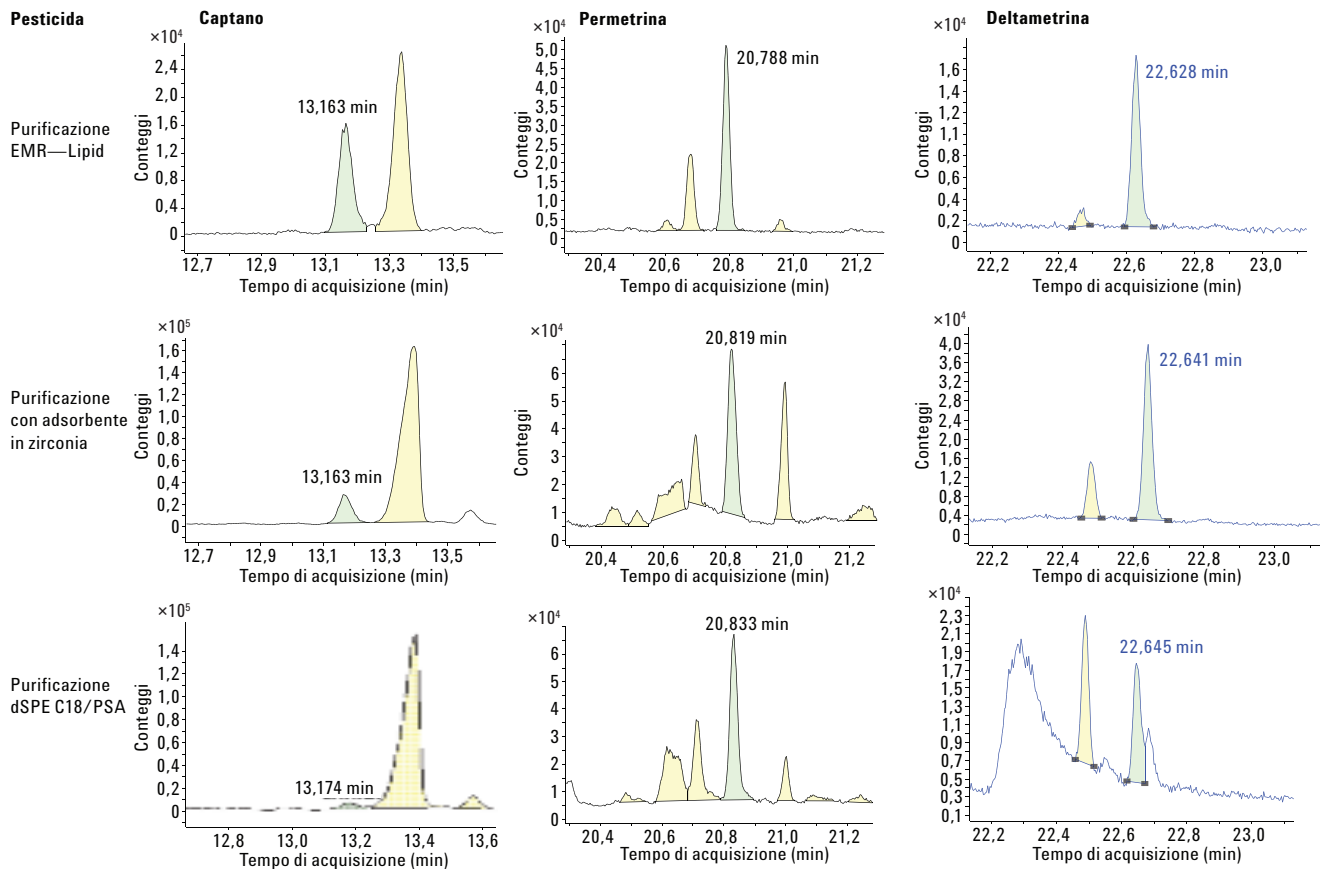


Figura 4. Confronto dei cromatogrammi per gli analiti di interesse ed effetto della matrice sulla risposta e qualità del picco e interferenze nella finestra MRM. I campioni in bianco sono stati trattati con Agilent Bond Elut EMR—Lipid, zirconia o C18/PSA e il campione finale arricchito dopo l'estrazione con uno standard di pesticidi a 50 ppb.

## Confronto dei metodi per il recupero degli analiti

Il metodo EMR—Lipid ottimizzato è stato poi confrontato con un metodo QuEChERS tradizionale, utilizzando C18/PSA o un adsorbente a base di zirconia. La Figura 5 mostra il confronto del recupero per tutti i 23 pesticidi, utilizzando questi diversi materiali di purificazione. I risultati dimostrano che la purificazione EMR—Lipid non causa una significativa perdita di analiti, fornendo perciò risultati di recupero paragonabili alla purificazione con C18/PSA. Tuttavia, abbiamo dimostrato che C18/PSA e i sorbenti a base di zirconia non forniscono una rimozione della matrice efficiente.

Esistono alcuni analiti con recuperi assoluti inferiori, indipendentemente dal metodo di purificazione. Aldrin, endrin e DDT hanno avuto un recupero inferiore al 60%, mentre quello di permetrina e deltametrina è stato pari rispettivamente al 63% e al 75%. La purificazione con C18/PSA ha prodotto un recupero leggermente più elevato rispetto alla purificazione EMR—Lipid e adsorbente a base di zirconia. Questi pesticidi sono altamente lipofili (log P elevato) con scarsissima solubilità in acqua e vengono facilmente incorporati in matrici di campione ad alto contenuto di lipidi, come l'avocado, rendendone difficile l'estrazione con solventi polari, come l'acetone nitrile. L'uso di solventi più forti può aumentare l'efficienza di estrazione di questi analiti lipofili dalla matrice grassa, aumentando l'efficienza di estrazione e migliorando il recupero assoluto. Il lavoro futuro approfondirà lo studio dell'efficienza di estrazione dei composti lipofili con matrici ad alto contenuto di grassi, seguita da un'ulteriore rimozione della matrice.

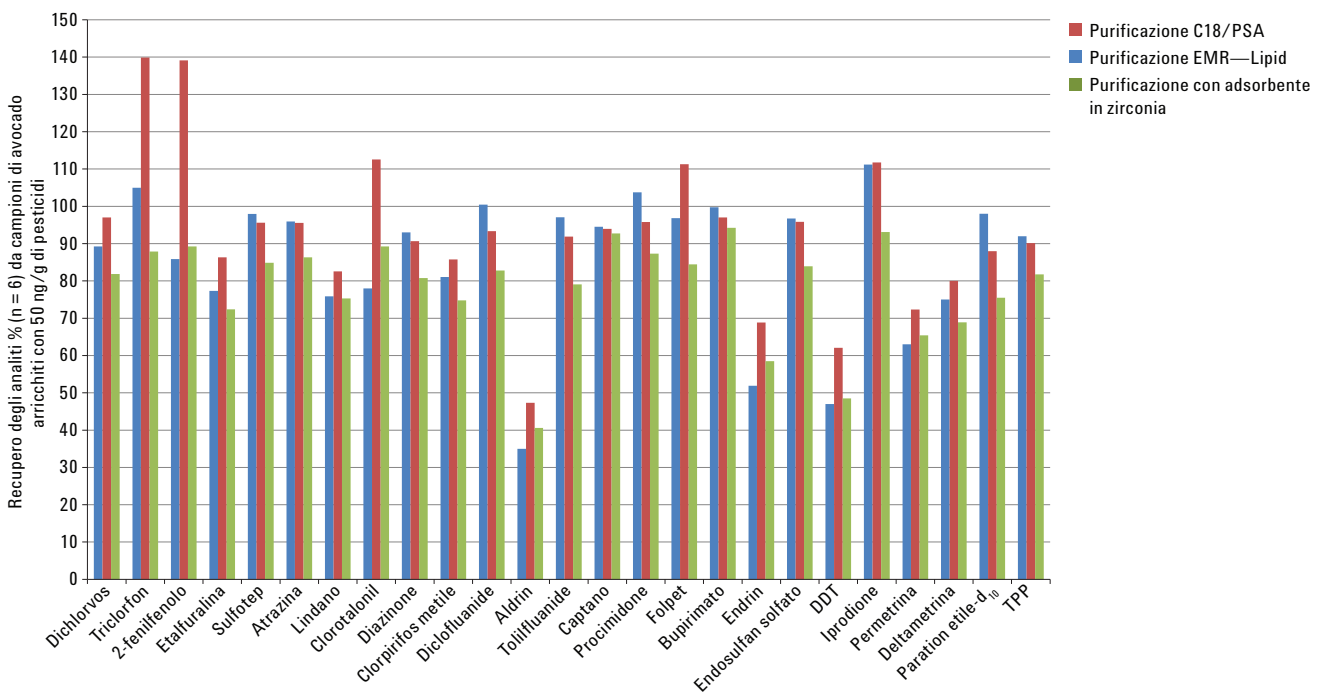


Figura 5. Confronto del recupero tra la purificazione con Agilent Bond Elut EMR—Lipid, C18/PSA e zirconia a 50 ppb in avocado.

Ai fini di introdurre una correzione per questi composti con basso recupero assoluto, si è utilizzato uno standard interno marcato stabile, <sup>13</sup>C-DDT, per migliorare l'accuratezza dei risultati di quantificazione finale di DDT, aldrin ed endrin. L'uso di TPP come standard interno per la permetrina e la deltametrina è risultato idoneo per la quantificazione.

## Validazione del metodo

Il metodo EMR—Lipid è stato validato eseguendo un lotto di quantificazione completo. Per la quantificazione sono stati utilizzati standard interni e sono stati riferiti i risultati di accuratezza e precisione. Sono stati utilizzati tre standard interni per la quantificazione, precisamente paration etile-D<sub>10</sub>, <sup>13</sup>C-DDT e TPP. Come standard interno per gli analiti con tempi di ritenzione

prima di 12 minuti è stato utilizzato paration etile-D<sub>10</sub>, per quelli successivi a 12 minuti è stato utilizzato TPP. Come accennato in precedenza, <sup>13</sup>C-DDT è stato utilizzato come standard interno per aldrin, endrin e DDT, per correggere la perdita di analiti dovuta alla scarsa efficienza di estrazione.

I risultati di validazione sono riportati in dettaglio nella Tabella 3. La Figura 6 è un riepilogo generato utilizzando l'accuratezza e la precisione medie calcolate per 18 analisi replicate totali di QC (tre livelli, n = 6). L'accuratezza dei pesticidi era compresa fra 70% e 120% per tutti gli analiti eccetto uno (67%), mentre la precisione era inferiore a RSD del 20% per tutti gli analiti, con l'80% inferiore a RSD del 10%. L'accuratezza di aldrin era ancora leggermente inferiore al 70%, ma con una buona precisione (RSD<6%) ed è accettabile secondo le linee guida SANCO [15].

Tabella 3. Quantificazione dei risultati per i pesticidi nell'avocado arricchito a livelli di 5, 50 e 300 ng/g per sei analisi replicate.

Analita	Curva di calibrazione		Accuratezza e precisione del metodo (QC ng/g <sup>1</sup> )						
	Adatt. regressione/peso	R <sup>2</sup>	Intervallo cal. (ng/g)	5 (25)		50 (250)		300 (1.500)	
				Rec%	RSD	Rec%	RSD	Rec%	RSD
Dichlorvos	Lineare, 1/x	0,9967	1-400	97	8,2	108	4,9	111	12,7
Triclorfon	Lineare, 1/x	0,9964	5-2000 <sup>1</sup>	98	7,8	95	7,3	84	4,7
2-fenilfenolo	Lineare, 1/x	0,9996	10-400 <sup>2</sup>	97	14,0	104	1,7	105	5,1
Etalfuralina	Lineare, 1/x	0,9969	1-400	109	3,2	98	7,6	110	6,5
Sulfotep	Lineare, 1/x	0,9958	1-400	96	5,8	76	3,9	85	9,8
Atrazina	Lineare, 1/x	0,9967	1-400	91	5,0	80	2,1	76	3,9
Lindano	Lineare, 1/x	0,9991	1-400	92	6,7	104	4,0	98	12,5
Clorotalonil	Lineare, 1/x	0,9944	1-400	89	13,5	103	8,6	92	19,4
Diazinone	Lineare, 1/x	0,9993	1-400	102	6,8	116	5,1	108	8,9
Clorpirifos metile	Lineare, 1/x	0,9984	1-400	101	6,2	123	4,5	113	15,0
Diclofluanide	Lineare, 1/x	0,9989	1-400	96	10,2	85	5,1	91	4,3
Aldrin	Lineare, 1/x	0,9982	1-400	76	4,8	59	2,3	65	5,1
Tolilfluanide	Lineare, 1/x	0,9990	10-400	108	10,0	93	6,2	93	5,4
Captano	Lineare, 1/x	0,9959	25-2000 <sup>1,2</sup>	89	8,2	109	11,0	87	18,1
Folpet	Lineare, 1/x	0,9897	5-2000 <sup>1</sup>	76	9,5	79	9,9	87	13,2
Procimidone	Lineare, 1/x	0,9977	1-400	87	5,0	76	1,9	79	7,2
Bupirimato	Lineare, 1/x	0,9957	5-2000 <sup>1</sup>	101	6,5	100	5,6	85	10,3
Endrin	Lineare, 1/x	0,9967	1-400	75	10,8	88	6,7	80	13,6
Endosulfan solfato	Lineare, 1/x	0,9996	1-400	96	9,9	97	6,4	95	4,9
DDT	Lineare, 1/x	0,9995	1-400	103	4,5	105	2,6	107	4,6
Iprodione	Lineare, 1/x	0,9995	1-400	97	6,7	105	2,7	97	4,2
Permetrina	Lineare, 1/x	0,9992	1-400	87	6,6	97	4,3	84	14,0
Deltametrina	Lineare, 1/x	0,9963	1-400	89	13,8	92	8,3	98	11,5

<sup>1</sup> I composti sono stati preparati a una concentrazione cinque volte più elevata nella soluzione di lavoro standard combinata, a causa della bassa risposta. Pertanto, i livelli dell'arricchimento di QC e dell'arricchimento dello standard di calibrazione erano cinque volte più elevati rispetto a quelli degli altri composti.

<sup>2</sup> Limite di quantificazione (LOQ) più elevato a causa di una scarsa sensibilità o dell'effetto del picco di interferenza della matrice sulla rilevazione degli analiti al LOQ originario.

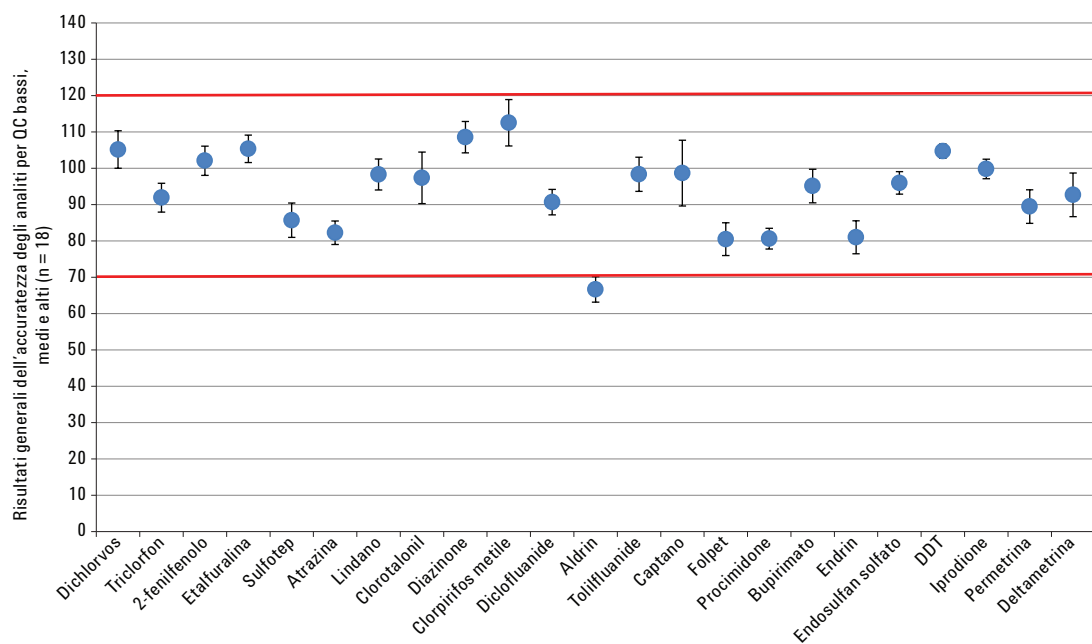


Figura 6. Risultati di quantificazione per 23 pesticidi nell'avocado, mediante estrazione QuEChERS con dSPE con Agilent Bond Elut EMR—Lipid. I dati rappresentano l'accuratezza e la precisione e sono stati calcolati su tre livelli in sei repliche. Barra errore = 95% CI.

## Impatto della matrice sulle prestazioni del sistema GC/MS/MS

Le interferenze dovute alla matrice influiscono sulle prestazioni del sistema GC/MS/MS nel corso del tempo, man mano che un maggior numero di campioni viene iniettato nel sistema. I siti attivi lungo il percorso del flusso GC possono avere un impatto negativo sulle prestazioni dello strumento. I componenti inerti Agilent forniscono la migliore disattivazione per l'intero percorso del flusso GC e riducono significativamente le interazioni negative tra gli analiti e i siti attivi, che si traducono in una perdita di analiti e in anomalie cromatografiche. Tuttavia, se la matrice è carica di composti con punto di ebollizione elevato (alto contenuto di grassi), si accumula sulla superficie del percorso del flusso e genera nuovi siti attivi. Nel tempo ciò può produrre variazioni nella risposta degli analiti, con un enorme impatto sull'affidabilità del metodo e una riduzione del numero di iniezioni per batch. Per correggerlo, i laboratori devono eseguire una maggiore manutenzione degli strumenti, quali sostituzione del liner o taglio/sostituzione della colonna, con conseguente riduzione della produttività del laboratorio.

Come dimostrato nella valutazione della purificazione della matrice e nella determinazione gravimetrica [14], i campioni trattati con EMR—Lipid hanno fornito uno sfondo significativamente più pulito, evidenziando una quantità di gran lunga ridotta di matrice introdotta nel sistema GC/MS/MS. Il numero di siti attivi che si accumulano nel percorso del flusso GC/MS si riduce, preservando l'integrità analitica dello strumento. Ciò è dimostrato con una migliore precisione analitica (RSD) per oltre 100 iniezioni di campioni di avocado su GC/MS/MS (Tabella 4). I campioni trattati con EMR—Lipid hanno raggiunto RSD <15% per il 91% degli analiti, la maggior parte a una cifra. Due composti, captano (RSD 29,9%) e DDT (RSD 21,6%) hanno evidenziato RSD più elevate nell'arco delle 100 iniezioni dell'esperimento, ma evidenziando RSD rispettivamente dell'11,1% e del 6,4% per le prime 50 iniezioni.

Tabella 4. Confronto della riproducibilità degli analiti (RSD) per 50 e 100 iniezioni di campioni di avocado trattati con Agilent Bond Elut EMR—Lipid, C18/PSA o adsorbente a base di zirconia mediante GC/MS/MS. Tre campioni sono stati arricchiti a 50 ng/g. Le aree dei picchi degli analiti sono state utilizzate per calcolare i risultati RSD.

Pesticidi	RSD analiti per 100 iniezioni (n = 20)			RSD per 50 iniezioni (n = 10)		
	EMR—Lipid purificazione	C18/PSA purificazione	Adsorbente in zirconia purificazione	EMR—Lipid purificazione	C18/PSA purificazione	Adsorbente in zirconia purificazione
Dichlorvos	6,2	10,5	16,8	2,2	9,4	6,3
2-fenilfenolo	7,0	13,6	19,5	5,0	12,4	8,4
Etafuralina	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
Atrazina	6,8	12,2	19,1	3,2	12,2	5,2
Lindano	8,5	10,8	20,0	4,6	10,9	5,1
Clorotalonil	12,5	11,7	37,4	8,0	12,9	11,0
Diazinone	6,6	11,7	16,9	4,4	10,5	5,6
Clorpirifos metile	8,4	8,9	14,9	3,8	8,6	6,6
Diclofluamide	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
Tolilfluamide	10,5	6,6	17,8	4,2	6,9	6,6
Captano	29,9	51,9	47,1	11,1	24,9	21,7
Procimidone	6,8	14,3	22,5	5,6	13,8	4,8
Bupirimate	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 solfato	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
Iprodione	11,0	10,7	40,0	8,2	10,9	16,3
Permetrina	6,8	11,8	18,8	5,2	11,2	8,6
Paratione etile-d <sub>10</sub> (SI)	11,8	7,2	13,0	4,7	6,8	7,0
TPP (SI)	9,1	19,9	28,3	9,0	22,5	12,8

In confronto, C18/PSA ha prodotto RSD <15% per il 74% degli analiti e zirconia una percentuale notevolmente inferiore, con solo il 9%. L'estratto trattato con zirconia è risultato particolarmente problematico, con il 100% degli analiti che presentava una RSD superiore al 10%, il 57% dei quali erano ben al di sopra di una RSD del 20% su 100 iniezioni. Ciò indica che il livello più elevato di matrice che rimane nell'estratto purificato con C18/PSA e zirconia influisce negativamente sulle prestazioni dello strumento, con conseguente variabilità significativa della risposta degli analiti. Questi risultati testimoniano l'eccellente rimozione della matrice fornita da EMR—Lipid, che si traduce in una minore attività del percorso del flusso GC, in una precisione più elevata nell'arco di diverse iniezioni e nell'analisi di un maggior numero di campioni prima che lo strumento necessiti di manutenzione.

## Conclusioni

Un metodo rapido, affidabile e robusto, che utilizza l'estrazione QuEChERS con metodo AOAC seguita dalla purificazione con Agilent Bond Elut EMR—Lipid, è stato sviluppato e validato per l'analisi di 23 pesticidi compatibili con la GC nell'avocado. Gli effetti della matrice sono stati valutati e confrontati con la purificazione tradizionale con C18/PSA e adsorbente a base di zirconia. I risultati dimostrano che EMR—Lipid fornisce una purificazione cromatografica di livello superiore, sia con GC/MS che con GC/MS/MS, rispetto a C18/PSA e all'adsorbente a base di zirconia. L'implementazione della purificazione EMR—Lipid facilita l'uso della GC/MS per l'analisi dei campioni nelle matrici ad alto contenuto di grassi. Il confronto del recupero dimostra che la purificazione EMR—Lipid produce un recupero degli analiti paragonabile a quello di C18/PSA e migliore rispetto all'adsorbente a base di zirconia. Il maggiore vantaggio di EMR—Lipid in questa applicazione è stato attribuito all'elevato livello di rimozione della matrice, che fornisce una riproducibilità eccezionale per 100 iniezioni alla GC/MS/MS. Le risposte degli analiti dei campioni trattati con C18/PSA e soprattutto con zirconia, hanno presentato un'elevata variabilità nell'arco delle 100 iniezioni di questo esperimento. L'uso di EMR—Lipid con materiale di purificazione dSPE in un flusso di lavoro QuEChERS migliora perciò la produttività generale del laboratorio, aumenta la velocità di analisi dei campioni, riduce l'elaborazione e la revisione dei dati, la ripetizione delle analisi dei batch e la manutenzione dello strumento. I lavori futuri prenderanno in esame i vantaggi di una rimozione della matrice potenziata per altri campioni complessi ad alto contenuto di grassi e analiti target.

## Bibliografia

1. Anastassiades, M.; Lehotay, S. J.; Štajnbaher, D.; Schenck, F. *S. J. AOAC Int.* **2003**, *86*, 412-431.
2. Lehotay, S. J.; Mastovská, K.; Lightfield, A. R. *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 615-629.
3. Chamkasem, N.; Ollis, L. W.; Harmon, T.; Mercer, G. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 2315-2329.
4. Hildmann, F.; Gottert, C.; Frenzel, T.; Kempe, G.; Speer, K. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1403*, 1–20.
5. Lehotay, S. J. *Mass Spec. in Food Safety Methods in Mol. Biol.* **2011**, *747*, 65-91.
6. Sapozhnikova, Y.; Lehotay, S. J. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *758*, 80–92.
7. Morris, B. D.; Schriener, R. B. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 5107–5119.
8. Wong, J. W. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 7636-7646.
9. Hayward, D. G.; Wong, J. W. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 4686-4693.
10. Saito, K.; Sjödin, A.; Sandau, C. D.; Davis, M. D.; Nakazawa, H.; Matsuki, Y.; Patterson Jr., D. G. *Chemosphere* **2004**, *57*, 373–381.
11. 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](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. Publication number 5989-1716EN, **2004**.
13. Meng, C-K. *The GC/MS/MS Analyzer and the Pesticides and Environmental Pollutants MRM Database*; Nota applicativa, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5990-9453EN, **2011**.
14. Zhao, L.; Lucas, D. *Multiresidue Analysis of Pesticides in Avocado with Bond Elut EMR—Lipid by LC/MS/MS*; Nota applicativa, Agilent Technologies, Inc. Publication number 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.

## **Ulteriori informazioni**

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

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

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

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

© Agilent Technologies, Inc. 2015  
Stampato negli Stati Uniti  
4 agosto 2015  
5991-6097ITE



**Agilent Technologies**