

# Analyse multi-résidus de pesticides dans de l'avocat avec Agilent Bond Elut EMR—Lipid par GC/MS/MS

## Note d'application

Analyse alimentaire et agriculture

### Auteurs

Limian Zhao et Derick Lucas  
Agilent Technologies, Inc.

### Extrait

Agilent Bond Elut QuEChERS Enhanced Matrix Removal—Lipid (EMR—Lipid) (élimination améliorée de la matrice lipidique) est un produit de préparation d'échantillons nouvelle génération, qui simplifie l'extraction en phase solide dispersive (dSPE) permettant d'éliminer la matrice de manière ultra-sélective sans affecter le rendement des analytes, particulièrement dans le cas d'échantillons à teneur élevée en lipides. Cette étude illustre l'utilisation de ce nouveau produit pour l'analyse de 23 pesticides analysables par GC/MS/MS. La procédure comporte une extraction QuEChERS AOAC suivie d'une extraction en phase solide dispersive dSPE EMR—Lipid et d'une étape de finition. Le traitement par EMR—Lipid permet d'obtenir une élimination de la matrice en termes de poids, une qualité de spectre GC/MS full scan et une détermination des effets-matrice bien meilleurs par rapport aux adsorbants à base de C18/PSA et de zirconium. De plus, moins de matrice est introduite dans le circuit analytique. Les données montrent également une amélioration très importante de la reproductibilité pour les analytes sur 100 injections par rapport aux adsorbants à base de C18/PSA et surtout par rapport à l'adsorbant à base de zirconium, qui présentent des déviations de réponse significatives.

EMR—Lipid est hautement sélectif pour les lipides et n'affecte pas négativement le rendement des analytes. Le rendement des analytes est élevé et la précision exceptionnelle. Ce travail montre qu'une extraction en phase solide dispersive dSPE EMR—Lipid s'intègre dans un protocole QuEChERS et permet d'obtenir une préparation d'échantillons rapide, robuste et efficace avec l'élimination de la matrice la plus complète qui soit pour l'analyse multi-résidus de pesticides dans de l'avocat.



**Agilent Technologies**

## Introduction

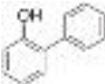
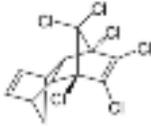
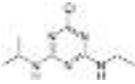
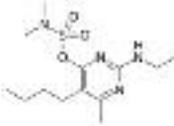
L'analyse de résidus de pesticides dans les aliments est un travail de routine pour de nombreux laboratoires qui utilisent la méthode QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) [1,2]. Cette méthode permet l'analyse de centaines de pesticides à faible concentration après une seule extraction. Bien que la méthode donne de bons résultats pour divers fruits et légumes, les aliments riches en lipides tels que l'avocat, les oléagineux et les aliments d'origine animale présentent de nouveaux défis [3,4]. Faire face à ces défis est une priorité pour les laboratoires qui doivent répondre aux critères de validation rigoureux des agences gouvernementales afin de s'assurer que les aliments sont propres à la consommation.

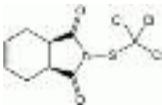
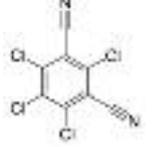
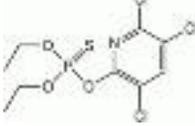
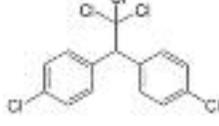
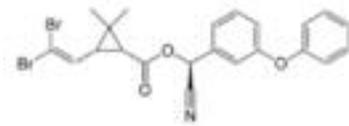
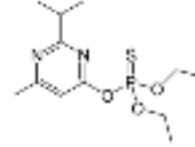
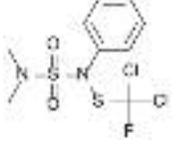
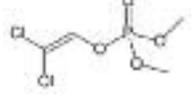
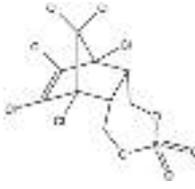
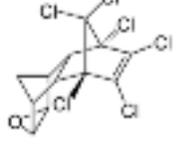
Afin de pouvoir analyser la totalité des pesticides volatils, semi-volatils et non-volatils rencontrés dans de nombreuses méthodes multi-classes et multi-résidus, il peut être nécessaire d'utiliser en parallèle la LC et la GC [4]. Bien que de nombreux pesticides soient analysables à la fois par LC et GC, ce n'est pas le cas pour tous. Chaque technique chromatographique a ses avantages et ses désavantages en termes de quantification et d'effets indésirables associés à la matrice co-extraite. L'élimination des lipides co-extraits est essentielle pour une quantification exacte dans les matrices alimentaires complexes et nécessite une purification avec des adsorbants tels que C18, PSA et GCB [5]. D'autres adsorbants contenant du zirconium sont disponibles dans le commerce et améliorent généralement l'élimination des lipides par rapport

aux adsorbants typiquement utilisés pour éliminer la matrice. Cependant, ce produit ne cible pas toutes les classes de lipides et peut retenir certains des analytes d'intérêt [6,7]. Les échantillons riches en lipides peuvent aussi nécessiter une purification avec des cartouches d'extraction en phase solide (SPE) [7,8,9] ou par chromatographie par perméation sur gel (GPC) [10], ce qui augmente le temps et le coût d'une analyse qui serait par ailleurs une analyse de routine.

Agilent Bond Elut EMR—Lipid est un nouvel adsorbant qui élimine sélectivement les principales classes de lipides de l'extrait d'échantillon sans perte indésirable d'analytes. L'élimination des interférences lipidiques dans les matrices complexes est particulièrement importante pour QuEChERS, où de grandes quantités de matrice sont extraites avec les analytes cibles. L'avocat connu pour être une matrice difficile en raison de sa haute teneur en lipides (15 à 20 %), a été sélectionné comme échantillon représentatif pour l'évaluation de l'adsorbant EMR—Lipid. Cette étude vise à évaluer la préparation d'échantillons pour l'analyse par GC de 23 pesticides dans de l'avocat en utilisant une extraction de type QuEChERS AOAC suivie d'un traitement par dSPE EMR—Lipid et d'une étape de finition. Les pesticides appartiennent à 10 classes différentes afin d'élargir le champ de la méthode (Tableau 1). Cette note d'application fait preuve de la propreté exceptionnelle obtenue avec l'adsorbant EMR—Lipid pour les matrices grasses complexes telles que l'avocat, ainsi que de la capacité de récupération élevée et de la grande précision pour les 23 résidus de pesticides multi-classes à trois concentrations.

Tableau 1. Analytes cibles, classe, log P, solubilité dans l'eau et structure chimique [11].

Nom	Catégorie	Log P	Solubilité dans		Formule moléculaire	Structure
			l'eau (mg/L)			
2-Phénylphénol	Phénol	3,18	560		$C_{12}H_{10}O$	
Aldrine	Organochloré	6,5	0,003		$C_{12}H_8Cl_6$	
Atrazine	Triazine	2,7	33		$C_8H_{14}ClN_5$	
Bupirimate	Pyrimidine	2,2	22		$C_{13}H_{24}N_4O_3S$	

Nom	Catégorie	Log P	Solubilité dans l'eau (mg/L)	Formule moléculaire	Structure
Captane	Phthalimide	2,5	5,1	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>2</sub> S	
Chlorothalonil	Chloronitrile	2,94	1,0	C <sub>8</sub> Cl <sub>4</sub> N <sub>2</sub>	
Chlorpyrifos méthyle	Organophosphoré	4,0	2,74	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>3</sub> PS	
DDT	Organochloré	6,91	0,006	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> Cl <sub>5</sub>	
Deltaméthrine	Pyréthroïde	4,6	0,0002	C <sub>22</sub> H <sub>19</sub> Br <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	
Diazinon	Organophosphoré	3,69	60	C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> PS	
Dichlofluamide	Sulfamide	3,7	1,3	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	
Dichlorvos	Organophosphoré	1,9	18 000	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>4</sub> P	
Sulfate d'endosulfan	Organochloré	3,13	0,48	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>6</sub> O <sub>3</sub> S	
Endrine	Organochloré	3,2	0,24	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>6</sub> O	

Nom	Catégorie	Log P	Solubilité dans l'eau (mg/L)	Formule moléculaire	Structure
Ethalfluraline	Dinitroaniline	5,11	0,01	$C_{13}H_{14}F_3N_3O_4$	
Folpet	Phthalimide	3,02	0,8	$C_9H_4Cl_3NO_2S$	
Iprodione	Dicarboximide	3,1	12,0	$C_{13}H_{13}Cl_2N_3O_3$	
Lindane	Organochloré	3,5	8,52	$C_6H_6Cl_6$	
Perméthrine	Pyréthrianoïde	6,1	0,006	$C_{21}H_{20}Cl_2O_3$	
Procymidone	Dicarboximide	3,3	2,46	$C_{13}H_{11}Cl_2NO_2$	
Sulfotep	Organophosphoré	3,99	10	$C_8H_{20}O_5P_2S_2$	
Tolyfluanide	Sulfamide	3,9	0,9	$C_{10}H_{13}Cl_2FN_2O_2S_2$	
Trichlorfon	Organophosphoré	0,43	120 000	$C_4H_8Cl_3O_4P$	

## Données expérimentales

Tous les réactifs et solvants sont de grade HPLC ou analytique. L'acétonitrile (ACN) et le méthanol proviennent de Honeywell (Muskegon, MI, USA). L'acide acétique (AA) de grade réactif, les étalons de pesticides et les étalons internes sont achetés auprès de Sigma-Aldrich, Corp. (St Louis, MO, USA).

### Solutions et étalons

L'acide acétique (1 %) dans de l'ACN est préparé en ajoutant 10 mL d'acide acétique à 990 mL d'ACN. Les solutions mères d'étalons et d'étalons internes sont préparées dans de l'ACN ou dans du méthanol à une concentration de 2,0 mg/mL. Une solution d'étalons de travail est préparée dans de l'ACN à une concentration de 25 µg/mL, excepté pour le captane, le folpet, le trichlorfon et le bupirimate. En raison de leur réponse relativement faible sur l'instrument, la solution étalon de travail pour ces quatre composés est préparée à une concentration cinq fois plus élevée, c'est-à-dire 125 µg/mL. Une aliquote de 25 µg/mL de solution de travail pour les étalons internes est préparée dans de l'ACN, avec du triphénylphosphate (TPP), du parathion éthyle d<sub>10</sub> et du <sup>13</sup>C-DDT.

### Équipement

L'équipement utilisé pour la préparation d'échantillons comprend :

- Broyeur Geno/Grinder (SPEX, Metuchen, NJ, USA)
- Centrifugeuse Centra CL3R (Thermo IEC, MA, USA)
- Microcentrifugeuse Eppendorf, Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA
- Agitateur vortex et agitateur vortex multi-tubes, VWR, Radnor, PA, USA
- Distributeur pour flacon, VWR, So. Plainfield, NJ, USA
- Pipettes et répéteur Eppendorf
- Tubes Agilent Bond Elut EMR—Lipid (Réf. 5982-1010) et Agilent Bond Elut Final Polish pour l'étape de finition (Réf. 5982-0101)

### Instruments

L'analyse est effectuée sur un système Agilent 7890A GC équipé d'un passeur automatique d'échantillons Agilent 7693B et d'un triple quadripôle Agilent 7000C. Le backflush de la colonne qui est hautement recommandé pour les matrices d'échantillons complexes, est utilisé [12]. La durée totale de l'analyse pour un échantillon dopé avec un étalon était de 23 minutes, avec deux minutes pour le backflush de la colonne.

## Conditions relatives à l'instrument

### Conditions GC

Passeur automatique d'échantillons :	passeur automatique d'échantillons et portoir Agilent 7693 seringue de 10 µL (Réf. G4513-80220), 1 µL de volume d'injection. Trois rinçages post-injection avec le solvant A (acétonitrile) Trois pompages d'échantillons Trois rinçages post-injection avec le solvant B (isopropanol)
Colonne :	Agilent J&W DB-5ms Ultra Inert, 0,25 mm × 15 m, 0,25 µm (Réf. 122-5512UI)
Gaz vecteur :	Hélium, pression constante
Filtre à gaz :	Kit Gas Clean, 1/8 de pouce (Réf. CP17974)
Insert d'injection :	insert Agilent Ultra Inert à simple rétreint sans division, garni de laine de verre (réf. 5190-2293)
Injecteur :	injecteur MMI, mode splitless pulsé à froid, température initiale 75 °C, maintenir pendant 0,02 min, puis augmenter jusqu'à 350 °C à 75 °C/min
Pulse de pression à l'injection :	36 psi jusqu'à 0,75 min
Débit de purge vers la fuite :	60 mL/min à 0,75 min
Pression de l'injecteur :	17 psi pendant l'analyse et 1,0 psi pendant le backflush,
Four :	60 °C pendant 2,57 min, puis jusqu'à 150 °C à 50 °C/min, jusqu'à 200 °C à 6 °C/min, jusqu'à 300 °C à 16 °C/min, maintenir pendant 3 min
Temps post-analyse :	2 min à 300 °C
Technologie de flux capillaire :	Union Ultimate purgée désactivée Ultimetal Plus (Réf. G3182-61581) pour backflush de la colonne analytique et de l'injecteur
Gaz EPC auxiliaire :	hélium relié à l'union Ultimate purgée
Ligne de purge :	0,0625 pouces de d.e. × 0,010 pouces de d.i. × 100 cm, tube inox 316, au-dessus du four
Pression auxiliaire :	4 psi pendant l'analyse, 75 psi pendant le backflush
Connexion :	entre l'injecteur et l'union Ultimate purgée
Restriction :	tube en silice fondue inerte, 0,65 m × 0,15 mm (Réf. 160-7625-5)
Connexion :	entre l'union Ultimate purgée et le MSD
<b>Conditions MSD</b>	
MSD :	Agilent 7000C à triple quadripôle inerte à électronique performante
Pompe à vide :	turbo Performance
Mode :	MRM
Fichier pour l'autotune :	Atune.u
Température de ligne de transfert :	280 °C
Température de la source :	300 °C
Température du quad. :	150 °C pour Q1 et Q2
Délai du solvant :	2,57 min
Débit gaz de collision :	gaz He d'extinction à 2,35 mL/min, gaz N <sub>2</sub> de collision à 1,5 mL/min
Résolution MS :	MS1 et MS2 = 1,2u

Les paramètres MRM sont facilement optimisés pour chaque analyte à l'aide de la base de données MRM d'Agilent pour les pesticides et polluants environnementaux (G9250AA), contenant les conditions MS/MS et les temps de rétention de

plus de 1 070 composés [13]. Le tableau 2 énumère les transitions MRM pour les analytes cibles utilisés dans cette étude. Un exemple de chromatogramme GC/MS/MS type est donné dans la figure 1 pour les 23 pesticides à l'étude.

Tableau 2. Conditions MRM et temps de rétention pour l'analyse de pesticides par GC/MS/MS.

Analyte	TR (min)	MRM			
		Canal quant.	CE (V)	Canal qual.	CE (V)
Dichlorvos	4,70	184,9 → 93	10	109 → 79	5
Trichlorfon	5,94	110,8 → 47	30	81,8 → 47	50
2-Phénylphénol	6,39	169 → 115,1	25	170 → 141,1	25
Éthalfuraline	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
Atrazine	8,69	214,9 → 58,1	10	214,9 → 200,2	5
Lindane	8,83	181 → 145	15	216,9 → 181	5
Chlorothalonil	9,20	263,8 → 168	25	265,8 → 231	20
Diazinon	9,22	137,1 → 54	20	199,1 → 93	20
Chlorpyrifos méthyle	10,30	285,9 → 92,9	20	124,9 → 47	15
Dichlorfluamide	11,31	223,9 → 123,1	20	123 → 77	20
Aldrine	11,55	262,9 → 192,9	35	254,9 → 220	35
Parathion éthyle D <sub>10</sub> (étalon interne)	11,96	98,7 → 67	10	114,9 → 82,9	20
Tolylfluamide	12,80	136,9 → 91	20	136,9 → 65	30
Captane	12,96	151 → 79,1	15	149 → 79,1	10
Forpet	13,13	259,8 → 130,1	15	261,8 → 130,1	15
Procymidone	13,13	282,8 → 96	10	96 → 67,1	10
Bupirimate	15,44	272,9 → 193,1	15	272,9 → 108	5
Endrine	15,68	316,7 → 280,8	5	244,8 → 173	30
Sulfate d'endosulfan	17,44	273,9 → 238,9	15	271,9 → 237	15
<sup>13</sup> C-DDT (étalon interne)	17,69	246,5 → 177,1	15	248,5 → 177,1	15
DDT	17,69	235 → 165,2	20	237 → 165,2	20
TPP (étalon interne)	18,20	325,9 → 169	30	325,9 → 233	27
Iprodione	18,82	313,8 → 55,9	20	187 → 124	25
Perméthrine	20,68	183,1 → 153,1	15	183,1 → 153,1	15
Deltaméthrine	22,51	252,9 → 93	15	181 → 152,1	25

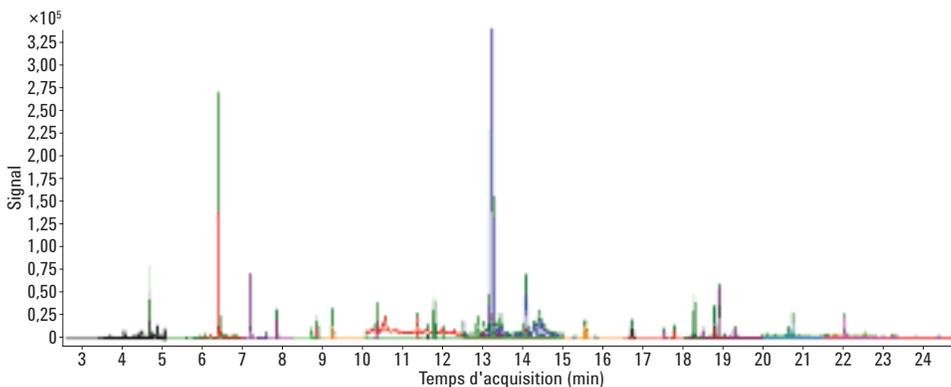


Figure 1. Chromatogramme GC/TQ (MRM) type d'un échantillon d'avocat dopé avec 50 ng/g d'étalons de pesticides. La préparation d'échantillons est basée sur une extraction QuEChERS suivie d'un traitement avec Agilent Bond Elut EMR—Lipid.

## Préparation d'échantillons

La procédure finale de préparation d'échantillons est optimisée comme suit :

1. Peser 15 g ( $\pm 0,1$  g) d'avocat homogénéisé dans des tubes à centrifugeuse de 50 mL.
2. Ajouter 15 mL d'acétonitrile contenant 1 % d'AA, et agiter au vortex pendant 10 sec.
3. Ajouter le sachet de sels d'extraction AOAC.
4. Mélanger sur un agitateur mécanique pendant 2 min.
5. Centrifuger à 5 000 rpm pendant 5 minutes.
6. Ajouter 5 mL d'eau à un tube dSPE EMR—Lipid de 15 mL, puis y transférer 5 mL de surnageant.
7. Agiter au vortex immédiatement pour disperser l'échantillon puis pendant 60 sec supplémentaires avec le lot entier sur un agitateur vortex multi-tubes.
8. Centrifuger à 5 000 rpm pendant 3 minutes.
9. Transférer 5 mL de surnageant dans un tube de finition EMR—Lipid de 15 mL contenant 2 g de sels (1:4, NaCl:MgSO<sub>4</sub>) et agiter au vortex pendant 1 min.
10. Centrifuger à 5 000 rpm pendant 3 minutes.
11. Transférer la couche d'ACN supérieure dans un flacon à échantillon pour l'injection GC/MS/MS.

L'ensemble du protocole de préparation d'échantillons est illustré dans la figure 2.

## Étalons pour la calibration et échantillons de contrôle

Les échantillons de contrôle sont enrichis avec une solution de travail d'étalons de pesticides après l'étape 1, en six réplicats à des concentrations correspondant à 5, 50 et 300 ng/g dans de l'avocat. Les échantillons de contrôle de captane, folpet, trichlorfon et bupirimate ont des concentrations de 25, 250, et 1 500 ng/g. Tous les échantillons excepté le blanc de matrice sont également enrichis avec une solution d'étalons internes à 250 ng/g dans de l'avocat.

Les solutions d'étalonnage dans la matrice sont préparées à partir des solutions de travail d'étalons et d'étalons internes qui sont ajoutés aux blancs de matrice après l'étape 10. Des solutions de concentrations de 1, 5, 10, 50, 100, 200, 300 et 400 ng/g dans de l'avocat et 250 ng/g d'étalons internes sont ainsi obtenues. Pour les quatre composés captane, folpet, trichlorfon et bupirimate, les solutions d'étalonnage utilisées sont à une concentration de 5, 25, 50, 250, 500, 1 000, 1 500 et 2 000 ng/g.

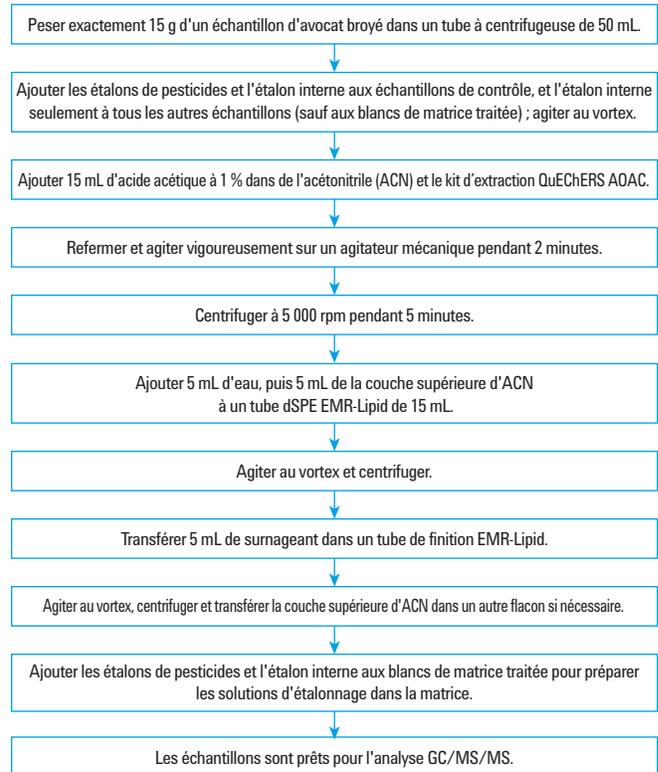


Figure 2. Protocole de préparation d'échantillons montrant une extraction QuEChERS avec Agilent Bond Elut EMR—Lipid pour l'analyse de pesticides dans de l'avocat par GC/MS/MS.

## Évaluation du traitement de la matrice

Les extraits d'avocat sont traités avec trois adsorbants différents, dSPE lipidique (C18/PSA), un adsorbant à base de zirconium et l'adsorbant EMR—Lipid. Une expérience a permis de comparer le profil full scan GC/MS de l'extrait avant et après le traitement. Les chromatogrammes ont été superposés pour comparer le degré de traitement de la matrice par rapport au profil chromatographique de base. Afin d'évaluer l'efficacité du traitement de la matrice de manière quantitative, le chromatogramme full scan GC/MS a été intégré manuellement sur toute la fenêtre, et l'efficacité d'élimination de la matrice calculée selon l'équation 1.

$$\% \text{ d'élimination de la matrice} = \frac{\text{Surface de pic totale}_{\text{Échantillon sans traitement}} - \text{Surface de pic totale}_{\text{Échantillon avec traitement}}}{\text{Surface de pic totale}_{\text{Échantillon sans traitement}}} \times 100$$

### Équation 1

Une expérience gravimétrique comparant le poids des interférences co-extraites de l'avocat après traitement avec l'adsorbant EMR—Lipid, C18/PSA et l'adsorbant à base de zirconium a été publiée [14].

## Comparaison des méthodes et validation

Une expérience sur le rendement des analytes a servi à comparer des échantillons pré- et post-dopés à une concentration de 50 ng/g dans de l'avocat. Les échantillons sont extraits par la procédure QuEChERS AOAC, puis traités par EMR—Lipid, C18/PSA ou l'adsorbant à base de zirconium. Pour le traitement par EMR—Lipid, le protocole suivi est celui indiqué dans le figure 2. Les autres protocoles utilisent la même extraction QuEChERS. Une aliquote de 1 mL d'extrait brut dans l'ACN est ensuite transférée dans un tube dSPE C18/PSA de 2 mL (Réf. 5982-5122) ou un flacon de 2 mL contenant 100 mg d'adsorbant à base de zirconium. Les échantillons sont agités au vortex pendant une minute et centrifugés à 13 000 rpm pendant trois minutes dans une microcentrifugeuse. La couche d'ACN est ensuite transférée dans un flacon à échantillon pour l'analyse par GC/MS/MS. Des solutions d'étalonnage dans la matrice sont préparées en enrichissant le blanc d'extraction d'avocat avec des étalons et des étalons internes, après traitement par l'adsorbant dSPE. Le rendement est calculé à partir du rapport des surfaces de pic entre échantillons enrichis avant et après le traitement.

La méthode EMR—Lipid a été validée pour l'avocat pour trois concentrations en six réplicats avec une courbe d'étalonnage dans la matrice de 8 points. Un étalon interne a été utilisé pour la quantification et les données ont été rapportées en termes d'exactitude et de précision.

## Impact de la matrice sur la performance du système de GC/MS/MS

L'impact de la matrice sur la performance du système de GC/MS/MS a été étudié en évaluant l'homogénéité de la réponse des analytes sur plusieurs injections d'échantillons d'avocat. L'expérience permet d'évaluer l'évolution dans le temps de la réponse des analytes en GC/MS/MS en effectuant de nombreuses injections d'extrait d'avocat traité par EMR—Lipid, C18/PSA, ou l'adsorbant à base de zirconium. Chaque lot d'analyse comprend des blancs d'extraction de matrice et des échantillons de contrôle enrichis après le traitement à hauteur de 50 ppb. La séquence injectée comporte quatre blancs et un échantillon de contrôle en cinquième position, et est répétée pour un total de 100 injections. Cette expérience a été réalisée afin d'étudier l'effet de l'accumulation de la matrice dans le GC/MS sur la réponse des analytes, et ceci pour les différents traitements. Pour chaque traitement, la réponse des analytes (surfaces de pic) est utilisée pour calculer le % de RSD sur la série de 100 injections. Afin d'exclure toute interférence liée au circuit de GC, tous les consommables utilisés étaient de la gamme Agilent Ultra Inert. Pour chaque méthode de traitement, une colonne et un insert Ultra Inert neufs sont utilisés.

## Résultats et discussion

### Évaluation du traitement de la matrice

Les matrices complexes affectent de manière significative la performance GC/MS par formation de sites actifs à la surface du circuit de GC, ce qui induit des effets-matrice dans le spectromètre de masse et provoque des interférences dans le chromatogramme final. Bien que les systèmes de GC/MS (SIM) et de GC/MS/MS (MRM) montrent une meilleure sélectivité pour les ions cibles, la matrice non éliminée peut tout de même provoquer des interférences et diminuer la performance dans le temps. Pour remédier à ces effets négatifs des matrices d'échantillons riches en lipides telles que l'avocat, des méthodes plus complètes de préparation des échantillons doivent être utilisées pour rendre ceux-ci plus adaptés à l'analyse par GC/MS.

Le figure 3 montre une superposition des chromatogrammes de balayage complet par GC/MS pour un blanc de matrice d'avocat et les profils chromatographiques obtenus avec les méthodes de traitement par EMR—Lipid, C18/PSA et l'adsorbant à base de zirconium. Le chromatogramme de l'échantillon sans traitement supplémentaire (tracé noir) présente beaucoup d'interférences dues à la matrice, qui vont gêner l'analyse des analytes cibles. Les chromatogrammes d'extraits traités C18/PSA (bleu) et l'adsorbant à base de zirconium (vert) présentent une élimination de la matrice de 36 % et 55 % respectivement, selon le calcul effectué en utilisant l'équation 1. Cependant, le tracé de l'extraction en phase solide dispersive dSPE EMR—Lipid (rouge) présente une élimination de ces interférences proche de la ligne de base, ce qui correspond à une élimination de 95 % de la matrice. La purification importante obtenue par EMR—Lipid a des implications évidentes pour l'analyse des pesticides dans l'avocat puisqu'il y a beaucoup moins de matrice dans l'échantillon pouvant affecter la performance de l'instrument. En outre, ceci est obtenu à l'aide d'une simple extraction en phase solide dispersive dSPE avec EMR—Lipid dans un protocole QuEChERS.

La figure 3B montre les chromatogrammes MRM GC/MS/MS superposés pour les échantillons d'avocat dopés avec 50 ppb d'étalons de pesticides. Grâce à la plus grande sélectivité du système MS/MS, le bruit de fond de la matrice est moins important que sur un chromatogramme SIM ou Full Scan. Cependant, malgré la plus grande sélectivité du système, des pics d'interférence sont encore présents entre 11 et 20 minutes pour les traitements à base de C18/PSA (bleu) et de zirconium (vert). Ces interférences affectent l'intégration pour certains des composés d'intérêt. Les extraits d'EMR—Lipid donnent un bruit de fond beaucoup plus propre comme le montre le tracé de la figure 3B, améliorant de manière drastique l'exactitude de l'intégration.

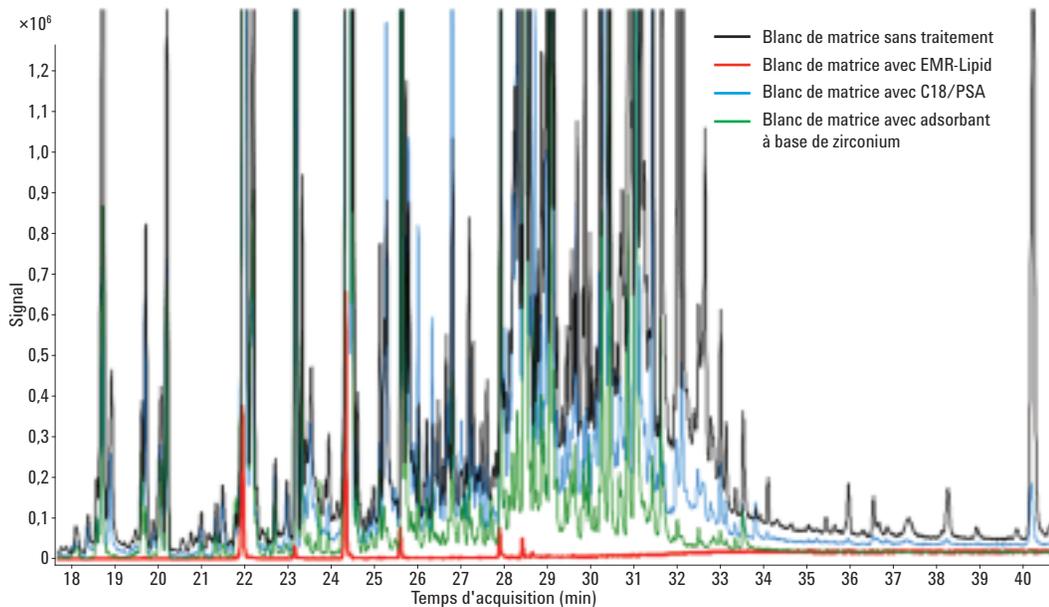


Figure 3A. Superposition de chromatogrammes GC/MS Full-Scan pour des blancs de matrice d'avocat préparés par extraction QuEChERS AOAC, suivie d'une dSPE avec Agilent Bond Elut EMR—Lipid (rouge), adsorbant à base de zirconium (vert), PSA/C18 (bleu), ou sans traitement (noir).

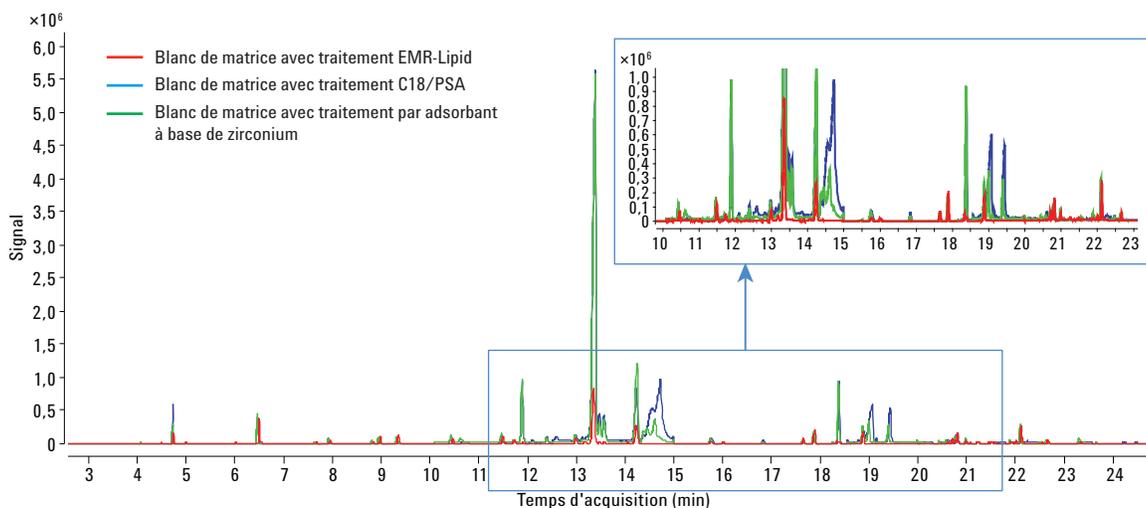


Figure 3B. Superposition de chromatogramme GC/MS/MS (MRM) pour des échantillons d'avocat préparés par extraction QuEChERS AOAC suivie d'un traitement par Agilent Bond Elut EMR—Lipid (rouge), C18/PSA (bleu) et l'adsorbant à base de zirconium (vert). Tous les échantillons sont enrichis avec 50 ppb d'étalons de pesticides.

La purification améliorée de la matrice par EMR—Lipid et l'effet positif d'une meilleure élimination de la matrice pour trois des composés sont présentés dans la figure 4. Dans tous les cas, les chromatogrammes après traitement par EMR—Lipid présentent moins de pics d'interférence, un meilleur rapport signal/bruit et une intégration de la ligne de base cohérente. Ces améliorations rendent le traitement et l'examen des données plus rapides et plus faciles et confère un plus haut degré de fiabilité à la méthode dans son ensemble.

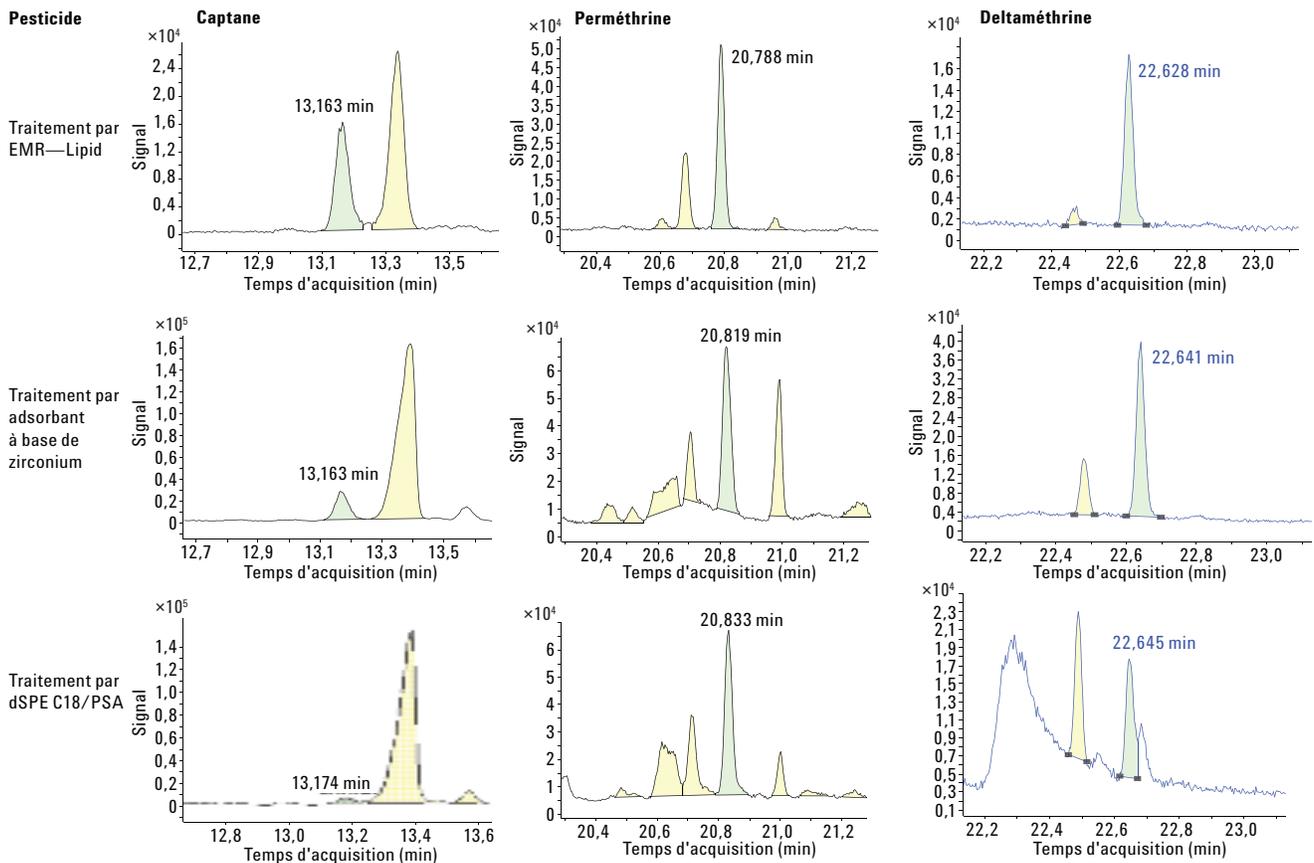


Figure 4. Comparaison de chromatogrammes d'analytes cibles et effet de la matrice sur la réponse des pics, la qualité des pics et les interférences dans la fenêtre MRM. Les blancs ont été traités avec Agilent Bond Elut EMR—Lipid, l'adsorbant à base de zirconium ou C18/PSA et l'échantillon final a été enrichi avec 50 ppb d'étalons de pesticides.

## Comparaison des méthodes pour le rendement des analytes

La méthode optimisée EMR—Lipid a ensuite été comparée à une méthode QuEChERS traditionnelle en utilisant C18/PSA ou l'adsorbant à base de zirconium. La figure 5 montre une comparaison du rendement des 23 pesticides après utilisation des ces différents adsorbants. Les résultats montrent que le traitement par EMR—Lipid ne provoque pas de rétention significative des analytes, et donc donne des résultats de rendement comparables à un traitement par C18/PSA. Cependant, nous avons montré que les traitements par les adsorbants C18/PSA et à base de zirconium ne permettent pas d'obtenir une élimination efficace de la matrice.

Certains analytes donnent un rendement absolu inférieur quelle que soit la méthode de traitement. L'aldrine, l'endrine et le DDT donnent un rendement inférieur à 60 % et la perméthrine et la deltaméthrine des valeurs de 63 % et 75 %, respectivement. Le traitement à base de C18/PSA a permis d'obtenir un rendement légèrement supérieur à celui obtenu après traitement par EMR—Lipid et l'adsorbant à base de zirconium. Ces pesticides étant extrêmement lipophiles (log P élevé), ils sont peu solubles dans l'eau et sont facilement incorporés dans les matrices riches en lipides telles que l'avocat, ce qui les rend difficiles à extraire avec des solvants polaires tels que l'acétonitrile. L'utilisation de solvants plus puissants peut augmenter l'efficacité d'extraction des ces analytes lipophiles et améliorer le rendement absolu. Des études ultérieures porteront sur l'efficacité d'extraction des composés lipophiles à partir de matrices riches en lipides, suivie d'une élimination améliorée de la matrice.

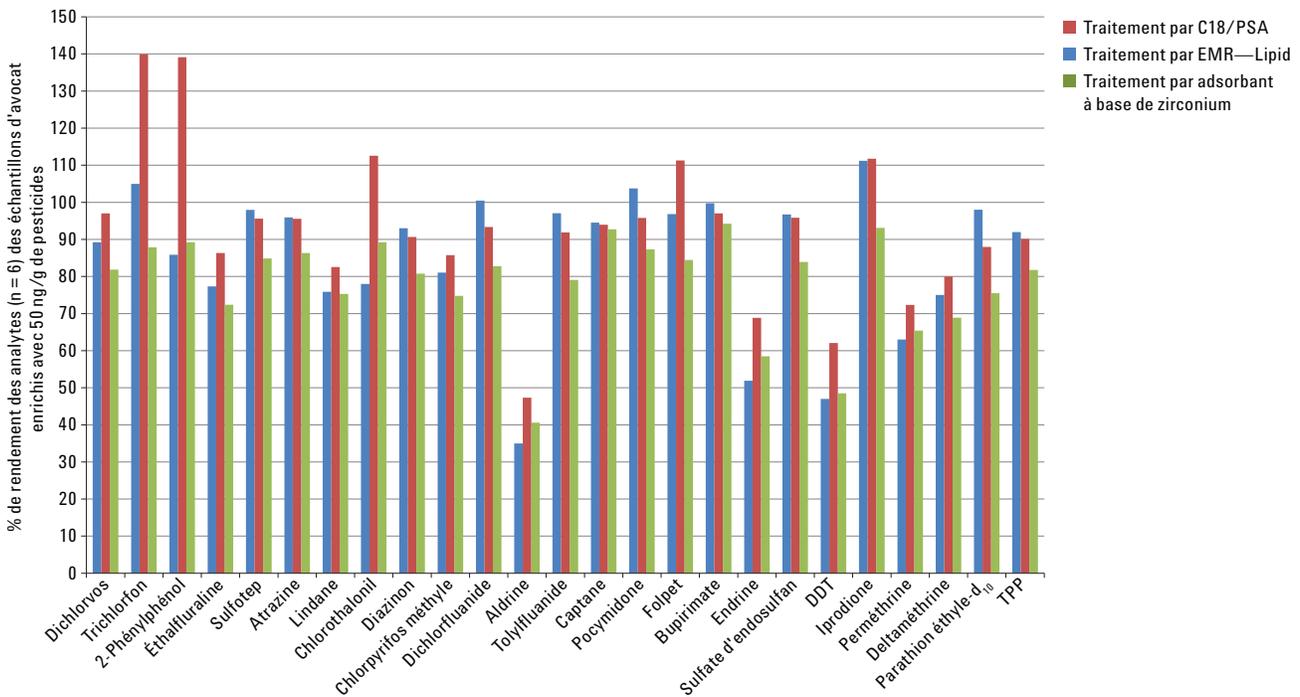


Figure 5. Comparaison du rendement après traitement avec Agilent Bond Elut EMR—Lipid, C18/PSA ou adsorbant à base de zirconium pour 50 ppb dans de l'avocat.

Afin d'apporter une correction pour les composés qui présentent un rendement absolu plus faible, un étalon interne stable et marqué, le <sup>13</sup>C-DDT, est utilisé pour améliorer l'exactitude des résultats de quantification pour le DDT, l'aldrine et l'endrine. L'utilisation de TPP comme étalon interne pour la perméthrine et la deltaméthrine est adéquate pour la quantification.

## Validation de la méthode

La méthode EMR—Lipid est validée en analysant un lot complet de quantification. Des étalons internes sont utilisés pour la quantification et les résultats sont rapportés en termes d'exactitude et de précision. Trois étalons internes sont utilisés pour la quantification, le parathion éthyle-D<sub>10</sub>, le <sup>13</sup>C-DDT, et le TPP. L'étalon interne utilisé est le parathion éthyle-D<sub>10</sub> pour les analytes avec des temps de rétention

inférieurs à 12 minutes, et le TPP pour ceux avec un temps de rétention supérieur à 12 minutes. Comme il est mentionné précédemment, le <sup>13</sup>C-DDT est utilisé comme étalon interne pour l'aldrine, l'endrine et le DDT pour corriger la perte d'analyte due à la faible efficacité d'extraction.

Les résultats détaillés de validation sont fournis dans le tableau 3. La figure 6 est un résumé généré en prenant la moyenne de l'exactitude et de la précision calculée pour un total de 18 réplicats d'échantillons de contrôle (trois concentrations, n = 6). L'exactitude varie entre 70 % et 120 % pour tous les pesticides sauf un (67 %), et la précision est inférieure à 20 % de RSD pour tous les composés, et inférieure à 10 % de RSD pour 80 % d'entre eux. L'exactitude pour l'aldrine est légèrement inférieure à 70 %, mais avec une précision satisfaisante (RSD < de 6 %), et se révèle acceptable selon les directives SANCO [15].

Tableau 3. Résultats de quantification pour les pesticides dans de l'avocat dopé avec des concentrations de 5, 50 et 300 ng/g en six réplicats.

Analyte	Courbe d'étalonnage		Plage d'étalonnage (ng/g)	Exactitude et précision de la méthode (ng/g CQ <sup>1</sup> )					
	Régression linéaire/poids	R <sup>2</sup>		5 (25)		50 (250)		300 (1 500)	
				% Réc.	RSD	% Réc.	RSD	% Réc.	RSD
Dichlorvos	Linéaire, 1/x	0,9967	1-400	97	8,2	108	4,9	111	12,7
Trichlorfon	Linéaire, 1/x	0,9964	5-2000 <sup>1</sup>	98	7,8	95	7,3	84	4,7
2-Phénylphénol	Linéaire, 1/x	0,9996	10-400 <sup>2</sup>	97	14,0	104	1,7	105	5,1
Éthalfuraline	Linéaire, 1/x	0,9969	1-400	109	3,2	98	7,6	110	6,5
Sulfotep	Linéaire, 1/x	0,9958	1-400	96	5,8	76	3,9	85	9,8
Atrazine	Linéaire, 1/x	0,9967	1-400	91	5,0	80	2,1	76	3,9
Lindane	Linéaire, 1/x	0,9991	1-400	92	6,7	104	4,0	98	12,5
Chlorothalonil	Linéaire, 1/x	0,9944	1-400	89	13,5	103	8,6	92	19,4
Diazinon	Linéaire, 1/x	0,9993	1-400	102	6,8	116	5,1	108	8,9
Chlorpyrifos méthyle	Linéaire, 1/x	0,9984	1-400	101	6,2	123	4,5	113	15,0
Dichlofluanide	Linéaire, 1/x	0,9989	1-400	96	10,2	85	5,1	91	4,3
Aldrine	Linéaire, 1/x	0,9982	1-400	76	4,8	59	2,3	65	5,1
Tolylfluanide	Linéaire, 1/x	0,9990	10-400	108	10,0	93	6,2	93	5,4
Captane	Linéaire, 1/x	0,9959	25-2000 <sup>1,2</sup>	89	8,2	109	11,0	87	18,1
Folpet	Linéaire, 1/x	0,9897	5-2000 <sup>1</sup>	76	9,5	79	9,9	87	13,2
Procymidone	Linéaire, 1/x	0,9977	1-400	87	5,0	76	1,9	79	7,2
Bupirimate	Linéaire, 1/x	0,9957	5-2000 <sup>1</sup>	101	6,5	100	5,6	85	10,3
Endrine	Linéaire, 1/x	0,9967	1-400	75	10,8	88	6,7	80	13,6
Sulfate d'endosulfan	Linéaire, 1/x	0,9996	1-400	96	9,9	97	6,4	95	4,9
DDT	Linéaire, 1/x	0,9995	1-400	103	4,5	105	2,6	107	4,6
Iprodione	Linéaire, 1/x	0,9995	1-400	97	6,7	105	2,7	97	4,2
Perméthrine	Linéaire, 1/x	0,9992	1-400	87	6,6	97	4,3	84	14,0
Deltaméthrine	Linéaire, 1/x	0,9963	1-400	89	13,8	92	8,3	98	11,5

<sup>1</sup> Les composés sont préparés à une concentration cinq fois supérieure dans la solution étalon de travail en raison de leur faible réponse. Par conséquent, les concentrations de dopage des échantillons de contrôle et des solutions d'étalonnage sont cinq fois plus élevées que celles des autres composés.

<sup>2</sup> LOQ plus élevée en raison d'une faible sensibilité ou d'un pic d'interférence de la matrice ayant gêné la détection de l'analyte à la LOQ d'origine.

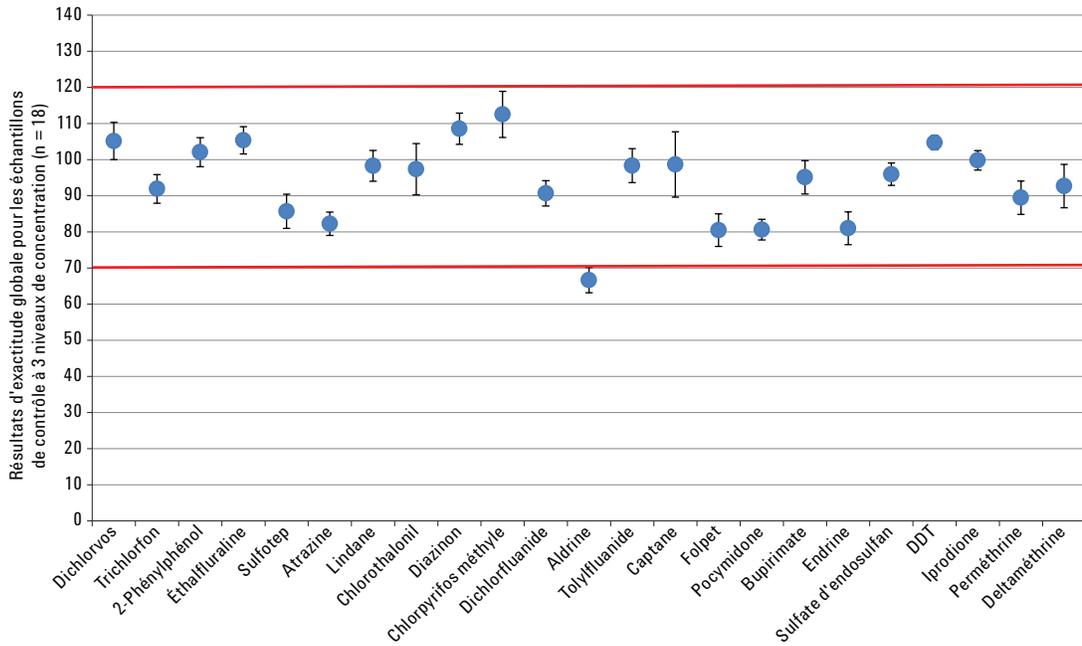


Figure 6. Résultats de quantification pour 23 pesticides dans de l'avocat avec extraction QuEChERS et dSPE Agilent Bond Elut EMR—Lipid. Les points de données représentent l'exactitude et la précision et ont été calculés à trois concentrations en six répliqués. Barre d'erreur = Intervalle de confiance à 95 %.

## Impact de la matrice sur la performance du système de GC/MS/MS

Les interférences de la matrice affecteront la performance du système de GC/MS/MS avec le temps, au fur et à mesure que les échantillons sont injectés dans le système. Les sites actifs du circuit de GC peuvent avoir un impact négatif sur la performance de l'instrument. Les composantes du circuit Agilent Inert Flow Path offrent la meilleure désactivation et réduisent de manière significative les interactions négatives entre les analytes et les sites actifs, entraînant une perte d'analytes et des anomalies chromatographiques. Cependant, si la matrice est chargée de composés à haut point d'ébullition (riche en lipides), elle va s'accumuler sur les parois du circuit et générer de nouveaux sites actifs. Avec le temps, ceci peut entraîner des variations de réponse des analytes, ce qui aura un impact considérable sur la fiabilité de la méthode et réduira le nombre d'injections par lot. Afin de résoudre ce problème, les laboratoires doivent effectuer plus de maintenance sur les instruments, comme changer l'insert ou raccourcir/changer la colonne, ce qui réduit la productivité du laboratoire.

Comme le montrent l'évaluation du traitement de la matrice et les mesures gravimétriques [14], les échantillons traités par EMR—Lipid ont donné un bruit de fond significativement moins élevé, montrant que beaucoup moins de matrice pénètre dans le système de GC/MS/MS. Le nombre de sites actifs s'accumulant dans le circuit GC/MS est moindre, préservant l'intégrité analytique de l'instrument. Ceci est démontré par la précision supérieure obtenue pour les analytes (RSD) sur plus de 100 injections d'échantillons d'avocat (Tableau 4). Les échantillons traités par EMR—Lipid ont permis d'obtenir des RSD <15 % pour 91 % des analytes, la plupart étant en dessous de 10 %. Deux composés, le captane (RSD 29,9 %) et le DDT (RSD 21,6 %) ont donné des valeurs de RSD plus élevées dans l'expérience avec 100 injections, mais ont donné des valeurs de RSD de 11,1 % et 6,4 % pour les 50 premières injections, respectivement.

Tableau 4. Comparaison de la reproductibilité des analytes (RSD) sur 50 et 100 injections en GC/MS/MS d'échantillons d'avocat traités avec Agilent Bond Elut EMR—Lipid, C18/PSA ou l'adsorbant à base de zirconium. Les échantillons sont dopés à une concentration de 50 ng/g. Les surfaces de pic des analytes sont utilisées pour calculer les résultats de RSD.

Pesticides	RSD des analytes pour 100 injections (n = 20)			RSD pour 50 injections (n = 10)		
	Traitement par EMR—Lipid	Traitement par C18/PSA	Traitement par adsorbant à base de zirconium	Traitement par EMR—Lipid	Traitement par C18/PSA	Traitement par adsorbant à base de zirconium
Dichlorvos	6,2	10,5	16,8	2,2	9,4	6,3
2-Phénylphénol	7,0	13,6	19,5	5,0	12,4	8,4
Éthalfuraline	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
Atrazine	6,8	12,2	19,1	3,2	12,2	5,2
Lindane	8,5	10,8	20,0	4,6	10,9	5,1
Chlorothalonil	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 méthyle	8,4	8,9	14,9	3,8	8,6	6,6
Dichlorfluamide	11,7	9,0	25,9	5,4	9,9	5,5
Aldrine	9,8	19,3	25,7	8,6	19,3	7,1
Tolyfluanide	10,5	6,6	17,8	4,2	6,9	6,6
Captane	29,9	51,9	47,1	11,1	24,9	21,7
Procymidone	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
Endrine	8,3	12,6	24,1	5,9	13,8	5,4
Sulfate d'endosulfan	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
Perméthrine	6,8	11,8	18,8	5,2	11,2	8,6
Parathion éthyle-d <sub>10</sub> (étalon interne)	11,8	7,2	13,0	4,7	6,8	7,0
TPP (étalon interne)	9,1	19,9	28,3	9,0	22,5	12,8

Par comparaison, C18/PSA a donné des valeurs de RSD <15 % pour 74 % des analytes, et l'adsorbant à base de zirconium beaucoup moins, avec seulement 9 %. L'extrait traité par l'adsorbant à base de zirconium était particulièrement problématique avec 100 % des analytes donnant un RSD au-dessus de 10 %, et 57 % d'entre eux donnant un RSD bien au-dessus de 20 % pour 100 injections. Ceci indique que la plus grande quantité de matrice demeurant dans l'extrait traité par C18/PSA et par l'adsorbant à base de zirconium affecte la performance de l'instrument de manière négative et entraîne une variabilité significative de la réponse des analytes. Ces résultats témoignent de l'élimination excellente de la matrice qu'offre EMR—Lipid, ce qui permet d'avoir moins d'activité dans le circuit de GC, une meilleure précision sur plusieurs injections, et de pouvoir analyser plus d'échantillons avant d'avoir à effectuer une maintenance de l'instrument.

## Conclusions

Une méthode rapide, fiable et robuste faisant appel à l'extraction QuEChERS AOAC suivie d'un traitement par Agilent Bond Elut EMR—Lipid a été développée et validée pour l'analyse de 23 pesticides présents dans l'avocat et analysables par GC-. Les effets-matrice ont été évalués et comparés aux méthodes de traitement traditionnelles à base de C18/SPA ou l'adsorbant à base de zirconium. Les résultats montrent que le traitement par EMR—Lipid permet d'obtenir une propreté chromatographique supérieure en GC/MS comme en GC/MS/MS par rapport à un traitement à base de C18/PSA et l'adsorbant à base de zirconium. La mise en œuvre d'un traitement par EMR—Lipid facilite l'utilisation d'un système de GC/MS pour l'analyse d'échantillons provenant de matrices riches en lipides. La comparaison des rendements montre que le traitement par EMR—Lipid a permis d'obtenir un rendement comparable à celui obtenu avec C18/PSA, et meilleur qu'avec l'adsorbant à base de zirconium. Le gros avantage de EMR—Lipid est qu'une plus grande quantité de matrice est éliminée, permettant ainsi d'obtenir une excellente reproductibilité pour 100 injections effectuées sur un système de GC/MS/MS. La réponse des analytes des échantillons traités par C18/PSA et surtout l'adsorbant à base de zirconium est en revanche extrêmement variable. Par conséquent, l'utilisation d'EMR—Lipid comme adsorbant d'extraction en phase solide dispersive dSPE dans un protocole QuEChERS, améliore la productivité globale du laboratoire, augmente la cadence d'analyse, diminue le travail de traitement et de vérification des données, réduit le nombre de ré-analyses de lots et réduit les besoins en maintenance de l'instrument. Les études à venir examineront les avantages de l'élimination améliorée de la matrice pour d'autres échantillons à haute teneur en lipides.

## Références

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*; Application note, 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*; Note d'application, Agilent Technologies, Inc. Numéro de publication 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 novembre 2013*; Commission européenne, Direction générale pour la santé et la protection des consommateurs, Bruxelles, Belgique.

## **Pour plus d'informations**

Ces données représentent des résultats types. Pour plus d'informations sur nos produits et services, consultez notre site Internet sur [www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem).

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

Agilent décline toute responsabilité en cas d'erreurs dans le présent document, ainsi qu'en cas de dommages fortuits ou consécutifs à la fourniture, aux performances ou à l'utilisation de ce matériel.

Les informations, descriptions et spécifications de cette publication peuvent être modifiées sans préavis.

© Agilent Technologies, Inc., 2015  
Imprimé aux USA  
4 août 2015  
5991-6097FR



**Agilent Technologies**