

使用 Agilent J&W Select PAH 和较长气相色谱柱分析巧克力和花生中的 PAH

应用简报

食品检测与农业

作者

Pat Sasso
安捷伦科技公司

摘要

使用 GC/MS 的 SIM 模式分离 ppb 级的多环芳烃 (PAH) 同分异构体，从而可对 Agilent Bond Elut SPE 净化得到的可可和花生提取物以及来自基质的共萃取物甘油三酯进行分析。PAH 含有一大类已知会引发癌症的化学品。食品中的 PAH 可能来源于外环境的输入，也可能产生于食品加工过程。已经证实，许多 PAH 同时也是突变剂。使用较短的 15 m Agilent Select J&W PAH 气相色谱柱，整个运行时间不到一小时，并在适当的高温范围内对色谱柱后运行烘烤。针对 GC/FID 和 GC/MS 分析，对经验证的用于 HPLC-荧光检测的样品前处理方法进行了调整。通过全扫描模式采集萃取物数据以对高温下后流出的潜在干扰物进行筛查。将加标的巧克力样品与天然巧克力样品进行比较，以确认 SIM 模式下是否存在可报告的痕量 PAH。15 m 长的 Select PAH 色谱柱可以较好地分离复杂的难分离色谱峰对，同时使进样之间的烘烤时间最短，从而使色谱柱更耐用、寿命更长。研究还论述了利用微板流路控制技术 (CFT) 的反吹功能缩短运行时间的可行性。



Agilent Technologies

前言

最近，有关 PAH 食物暴露的报道引起了大众对食品要求的广泛关注。这些食品大部分富含膳食脂肪和甘油三酯。众所周知，在明火上烧烤食物会产生 PAH，而用于可可豆和花生等其他豆类的烘焙工艺，也为 PAH 进入食物提供了另一种渠道。从这些基质中分离出痕量 PAH 非常困难，并且相当耗时 [2, 3]。本应用简报提供了一种适当的方法用于萃取和分析样品中的 PAH。为了延长气相色谱柱的寿命，建议进样口使用带玻璃毛的安捷伦超高惰性衬管捕集共萃取的非挥发性物质。气相色谱分析的总运行时间大约为 60 分钟。所有 PAH 全部洗脱的时间为 30 分钟，另外共萃取物可可脂甘油三酯的额外柱烘烤需要 30 分钟。J&W Select PAH 气相色谱柱结合优化的升温程序 [1] 实现了同分异构体组分的分离，同时总分析时间最短。

材料与方法

Agilent 7890A 气相色谱与 Agilent 5975C 系列 GC/MSD 联用，并配备惰性 350 无涂层 EI 源和三轴检测器。使用带 FID 检测器的类似配置评估长色谱柱以初步确定合适的烘烤时间。

气相色谱条件

色谱柱： Agilent J&W Select PAH, 15 m × 0.15 mm, 0.10 μ m (部件号 CP7461)
样品前处理： 使用 Agilent Bond Elut SI 进行固相萃取, 1 g/6 mL (部件号 12256008)
样品： 1 g 切碎的牛奶巧克力棒或油烤花生
载气： MSD UHP 氮气, FID 氢气, 均为 1.2 mL/min 恒流
柱温箱升温程序： 从 70 °C (保持 0.4 min) 以 70 °C/min 升至 180 °C, 然后以 7 °C/min 升至 230 °C (保持 7 min), 再以 50 °C/min 升至 280 °C (保持 7 min), 最后以 30 °C/min 升至 350 °C (保持 24 min)
进样： 不分流, 0.5 min 时开启 100 mL/min 分流流量, 2 min 时开启载气节省模式
进样口温度： 300 °C
MSD 传输线
辅助温度： 350 °C
检测器： FID 350 °C
进样器： Agilent 7693A 自动液体进样器
1 μ L 进样量

质谱条件

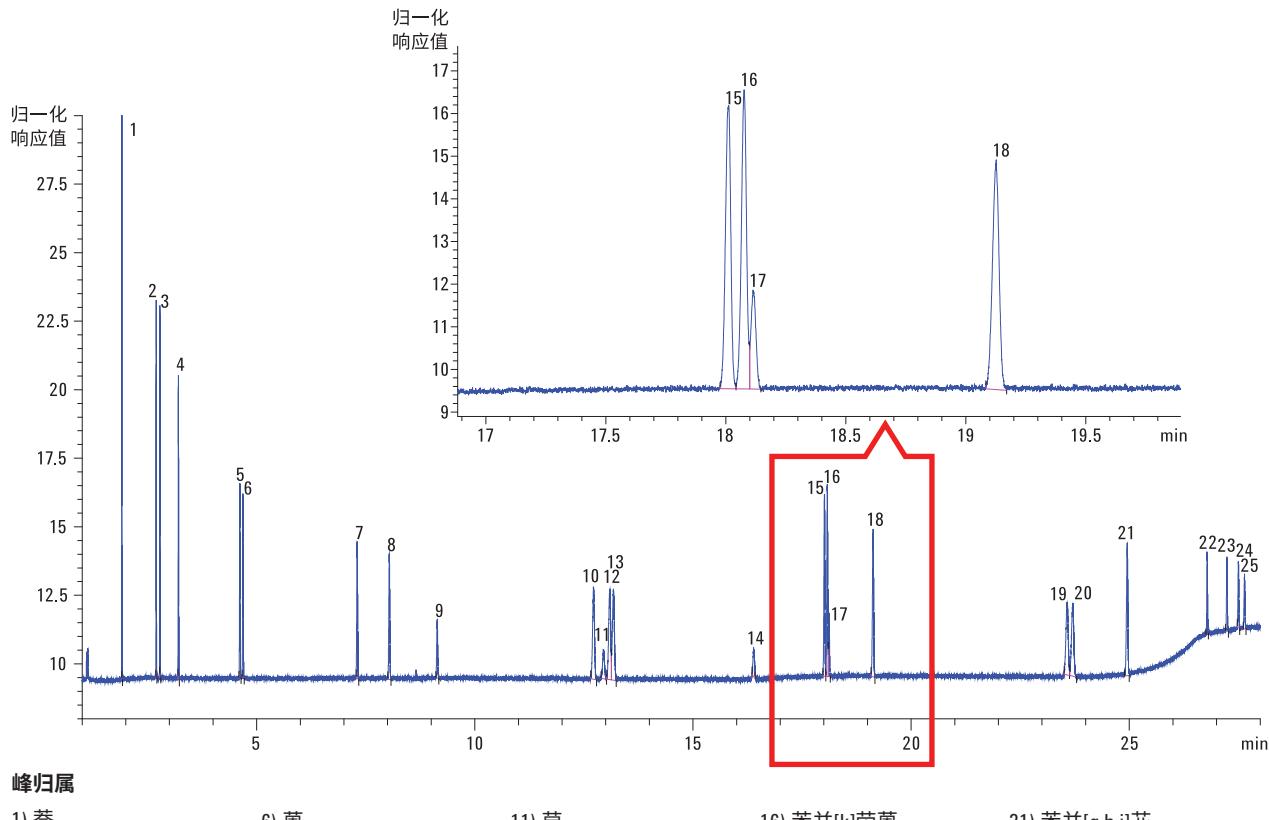
溶剂延迟：	1.4 min		
质谱温度：	300 °C (离子源), 150 °C (四极杆)		
SIM 模式：			
组别	起始时间	离子	驻留时间 (ms)
1	1.40	128, 152, 153, 165	50
2	4.70	178	200
3	7.40	202, 216	100
4	12.50	226, 228, 242	50
5	18.30	252	200
6	23.00	276, 278	100
7	27.00	302	200

流路设备

密封垫圈： 长, 0.3 mm (部件号 5062-3507)
样品瓶： 棕色螺口盖 (部件号 5182-0716)
瓶盖： 蓝色螺口盖 (部件号 5282-0723)
样品瓶内插管： 250 μ L 带聚合物支脚的玻璃内插管 (部件号 5181-1270)
进样针： 5 μ L (部件号 5181-1273)
隔垫： 红色流失性与温度优化 BTO 隔垫 (部件号 5183-4757)
进样口衬管： 通用超高惰性衬管, 带玻璃毛 (部件号 5190-2295)

标样

通过混合两种参比混合标样，即欧洲食品安全局 (EFSA) 规定的 15+1 种目标物 (部件号 5190-0487) 和另外 9 种美国食品和药品监督管理局 (USFDA) 规定目标物 (部件号 8500-6035)，得到 25 种组分混标。三亚苯购自 Sigma-Aldrich 公司 (部件号 442830, 5 mg)。图 1 显示混标中所有组分的分离效果良好，包括难分离的同分异构体苯并 [b,k] 和 [j] 荧蒽 (15 至 17) 的色谱峰。



峰归属

1) 萍	6) 萍	11) 萍	16) 苯并[k]荧蒽	21) 苯并[g,h,i]芘
2) 萍烯	7) 荧蒽	12) 环戊烯[cd]芘	17) 苯并[j]荧蒽	22) 二苯并[a,l]芘
3) 萍	8) 芘	13) 三亚苯	18) 苯并[a]芘	23) 二苯并[a,e]芘
4) 芐	9) 苯并[c]芴	14) 5-甲基䓛	19) 二苯并[a,h]蒽	24) 二苯并[a,i]芘
5) 菲	10) 苯并[a]蒽	15) 苯并[b]荧蒽	20) 芘并[1,2,3-cd]芘	25) 二苯并[a,h]芘

图1. 在 Agilent J&W Select PAH 气相色谱柱上使用优化的升温程序获得的 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (每种组分 10 ng) 的 25 种组分 PAH 评估混标的 FID 谱图

样品前处理 [2.3]

1. 将 1 g 巧克力在 10 mL MeOH 中形成匀浆，并用带 PTFE 涂层的钢制刮铲将其粉碎成细小固体，以脱脂/提取可可脂和 PAH
2. 将可可固体悬浮液静置 (1 小时)，除去上层甲醇溶液并在实验室 N_2 下蒸发至干燥固体
3. 用 2 mL 新鲜甲醇洗涤所得固体
4. 在 10 mL 去离子水中重悬浮油类残留物
5. 用两份 5 mL 正戊烷液液萃取去离子水中的油类残留物，然后合并正戊烷溶液，在实验室 N_2 下干燥
6. 将所得的正戊烷残留物重新溶解在 2 mL 正戊烷中
7. SPE — 依次用 5 mL MeOH、5 mL THF、5 mL 正戊烷活化 1 g/6 mL Bond Elut SI SPE 管。加入 2 mL 戊烷萃取液，再用 3 mL 纯正戊烷冲洗管，共得到 5 mL 流出液
8. 用 10 mL (5 mL \times 2) 10% MeOH:90% THF (无抑制剂) 洗脱 PAH
9. 蒸发至近干，复溶至最终体积为 1 mL 的 MeOH 溶液，然后进样

结果与讨论

众多实验室已测定多种样品中的 PAH。成人膳食中 PAH 暴露的主要来源是脂肪、面包和干面包食品，其次来源于甲壳类生物和软体动物。美国 FDA 已经开发出一种筛查贝类动物中 PAH 的方法，该方法采用 QuEChERS 萃取结合 HPLC-荧光检测分析 [5]。在一开始就得到了出色的数据。使用 LC/MS 结合 APPI 和掺杂剂甲苯又进一步提高了该方法的选择性 [6]。法国国家农业研究院 (INRA) 实验室也开发出一种通过 SPE 萃取，再结合 HPLC 和荧光检测的方法 [2]。GC/MS 方法的引入使进行此类分析的实验人员进一步提升了信心，并且随着该分析方法不断改善，还能开发出更好的样品净化方法。印度出口大量可可豆，印度科学与工业研究委员会 (CSIR) 的实

验人员发表论文描述了在出口源头通过 SPE 回收硅胶中的 PAH，取得了出色的结果 [3]。然而，上述几种样品提取法均未考虑到完全去除干扰 GC/MS 分析结果的干扰物甘油三酯，如图 2 和图 3 所示。有研究表明使用自动 GPC 净化步骤除去干扰物是可行的 [4]。还可以利用微板流路控制技术 (CFT) 反吹进一步缩短运行时间，甚至可能在烘烤过程中减少质谱仪离子源的污染。欧洲食品安全局 (EFSA) 规定，进入市场的大部分食品，其 PAH 的含量必须小于 $30 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。主要是指四种 PAH，即 BaP (苯并[a]芘)、BaA (苯并[a]蒽)、CHR (䓛) 和 BpFl (苯并[b]荧蒽) 的总和。图 4 表明，所分析的巧克力样品中存在的痕量 PAH 同分异构体苯并[b]荧蒽、苯并[k]荧蒽、苯并[j]荧蒽和苯并[a]芘未达到检测限。

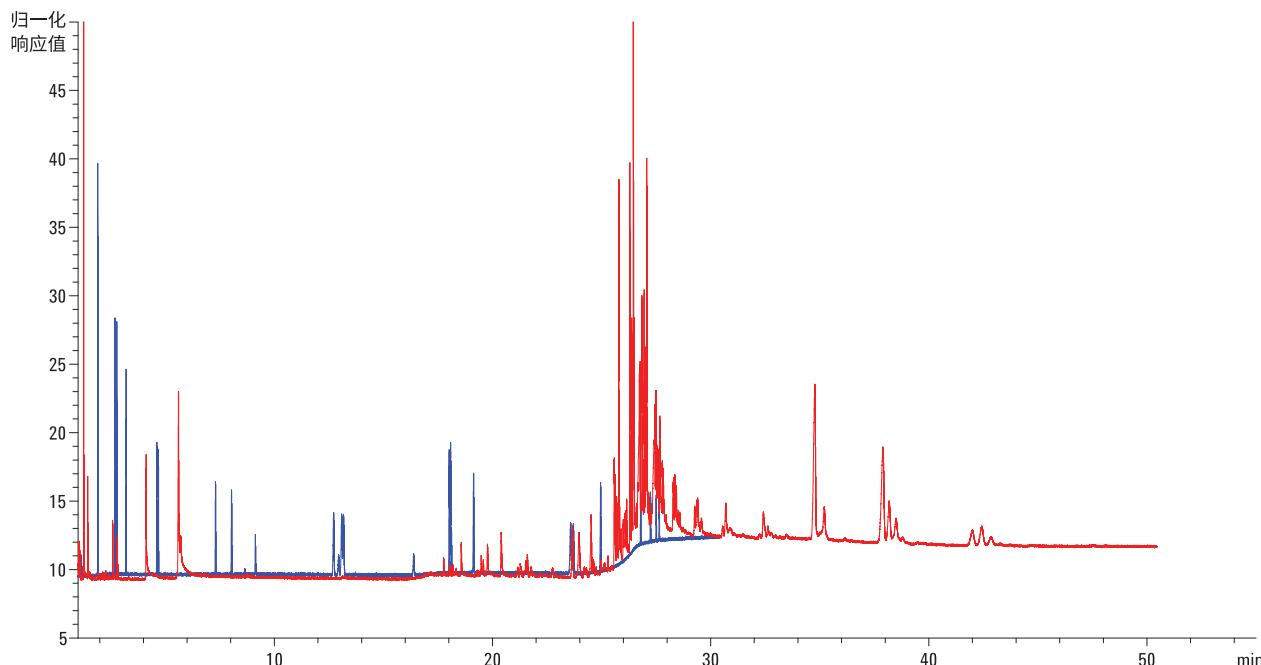


图 2. 牛奶巧克力基质提取物（红色曲线）与 PAH 标样（蓝色曲线）的叠加色谱图表明来自基质的干扰和柱后运行烘烤色谱柱的必要性。所用色谱柱为 Agilent J&W Select PAH $15 \text{ m} \times 0.15 \text{ mm}$ ，膜厚 $0.10 \mu\text{m}$

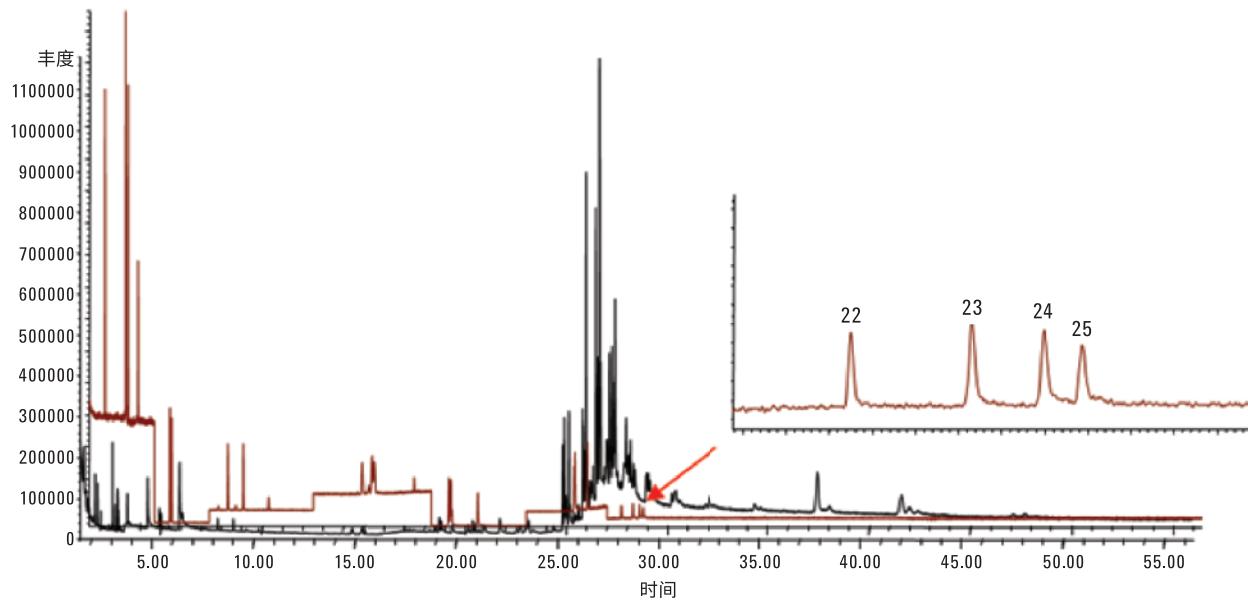


图 3. 牛奶巧克力基质提取物（黑色曲线）与 PAH 标样（红色曲线）的叠加色谱图，表明 10 ppb 下获得了出色响应，且最后流出的组分不受干扰。所用色谱柱为 Agilent J&W Select PAH 15 m × 0.15 mm，膜厚 0.10 μm

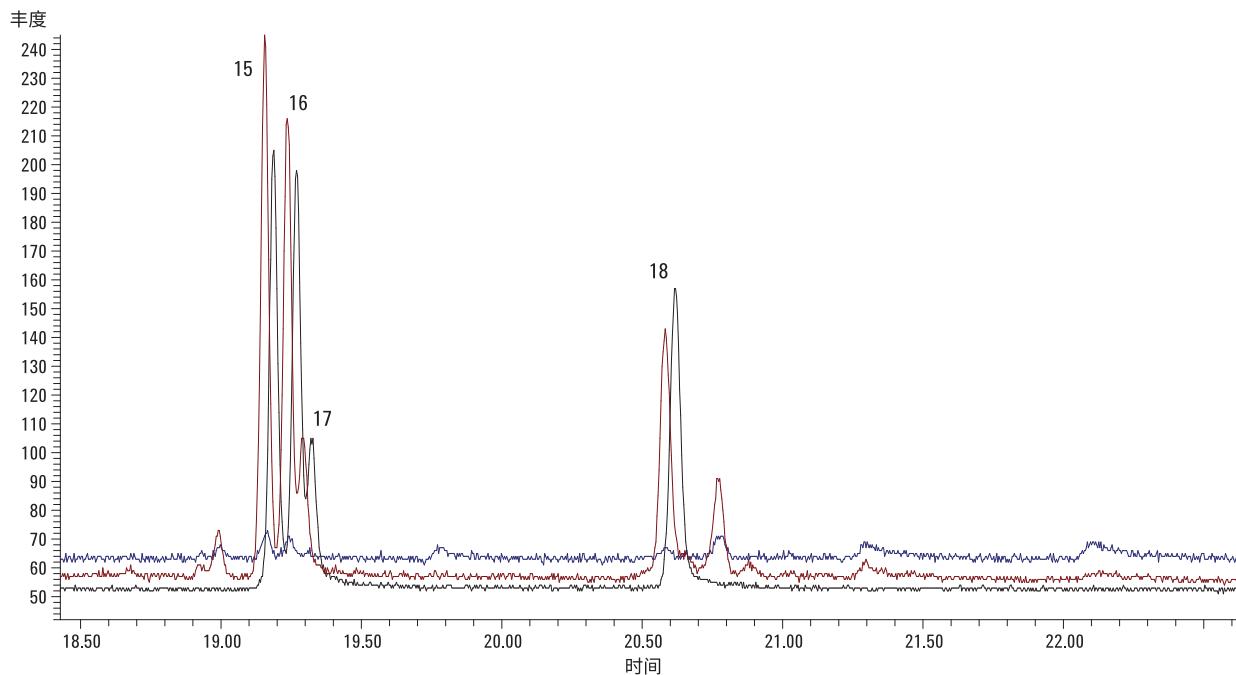


图 4. 使用 Agilent J&W Select PAH 气相色谱柱分析所得的 10 ppb 标样（黑色曲线）、10 ppb 加标巧克力样品（红色曲线）和天然巧克力样品（蓝色曲线）的叠加色谱图，表明 PAH 异构体苯并[b]荧蒽、苯并[k]荧蒽、苯并[j]荧蒽和苯并[a]芘的浓度未达到临界值

结论

Agilent J&W Select PAH 气相色谱柱结合优化的升温程序可带来令人满意的 PAH 同分异构体分离效果，满足法规要求。由于色谱柱仅长 15 米，因而实际样品提取物（包括富含甘油三酯的牛奶巧克力和油烤花生）两次运行之间的烘烤时间较为合理。一种可选方案是安装微板流路控制技术反冲系统，并在大约 30 分钟开始烘烤时进行短时反冲。这样可使烘烤时间缩短大约 20 分钟。较长色谱柱需要长时间的烘烤，可能由于高温时间太长而发生降解，导致同分异构体对的临界分离度受到影响。运行了典型的样品组（10 个样品）后，对质谱仪调谐进行验证，结果表明该仪器能够正常运行。最后，放空仪器并目视检查离子源。离子源已变脏，需要进行内部清洁。如果采用 CFT 进行反冲，则不需要频繁的离子源维护。

参考文献

1. J. Oostdijk, "Fast separation of regulated PAHs on Agilent J&W Select PAH column" (使用 Agilent J&W Select PAH 色谱柱快速分离管制的 PAH)，应用简报，安捷伦科技公司，出版号 SI-02259 (2010)
2. R. Kumari P. Chaturvedi, N. G. Ansari, R. C. Murthy, D. K. Patel., *J. Food Sci.* 77, T34 (2012)
3. J. Koffi Houessou, C. Benac, C. Delteil, V. Camel., *J. Agric. Food Chem.* 53, 871 (2005)
4. M. Halvorson, C. Hedman, T. Gibson., LC-GC, (1 February, 2010)
5. <http://www.chem.agilent.com/library/applications/5990-5441CHCN.pdf>
6. JASMS 15, Issue 12, Dec 2004, pp1853-1862, "Comparison of ESI, APCI, and APPI for the analysis of dinitropyrene and aminonitropyrene LC-MS/MS"

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2013
2013 年 5 月 7 日，中国出版
5991-2299CHCN



Agilent Technologies