

# Analisi degli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) nel salmone con rimozione potenziata dei lipidi dalla matrice (EMR)

## Nota applicativa

Analisi alimentare e agricoltura, ambiente

### Autori

Derick Lucas e Limian Zhao  
Agilent Technologies, Inc.

### Abstract

Gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) sono formati da sistemi di anelli benzenici condensati, resistenti alla degradazione. Si possono ritrovare nelle specie acquatiche per accumulo nell'ambiente o a causa di metodi di cottura per affumicatura. L'analisi degli IPA nelle matrici alimentari complesse e ad alto contenuto lipidico spesso può presentare delle difficoltà, dato che la matrice coestratta impedisce l'accurata quantificazione nella forma di interferenze, effetti matrice e accumulo nel sistema analitico campione. Agilent Bond Elut QuEChERS Enhanced Matrix Removal—Lipid (EMR—Lipid) rappresenta l'ultima generazione di prodotti per la preparazione del campione ed è utilizzata nell'estrazione in fase solida dispersa (dSPE) per una rimozione dalla matrice estremamente selettiva, evitando ripercussioni sul recupero degli analiti. Questo lavoro dimostra l'efficacia di questo metodo di preparazione del campione nell'analisi degli IPA nel salmone. Questo metodo permette elevate accuratezza (da 84 a 115%) e precisione (RSD = da 0,5 a 4,4%) per tutti e 15 i composti IPA a tutti i livelli, fornendo un'analisi rapida, affidabile ed efficiente per i campioni a elevato contenuto lipidico.

### Introduzione

Gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) sono contaminanti diffusi nell'ambiente e possono avere origine petrogenica o pirogenica. Sono composti da idrogeno e carbonio disposti in due o più anelli benzenici condensati e possono avere gruppi sostituenti collegati a uno o più anelli [1]. Gli IPA destano preoccupazioni per la loro persistenza nell'ambiente e perché sono noti gli effetti tossici, mutageni e cancerogeni di alcuni di essi sui mammiferi [2]. La contaminazione del pesce può avvenire a causa dell'accumulo di costituenti del petrolio nelle sorgenti d'acqua e a causa dei processi di cottura mediante affumicatura, che rilasciano gli IPA come sottoprodotti della combustione [3,4]. Per questi motivi, è fondamentale che gli analisti dispongano di metodi affidabili ed efficienti per determinare quando gli IPA contaminanti raggiungono la soglia di allarme.



**Agilent Technologies**

La rivelazione di livelli bassi di IPA può essere eseguita con GC/MS in combinazione con un affidabile ed efficiente metodo di preparazione del campione. I comuni protocolli di preparazione includono l'estrazione Soxhlet [5], l'estrazione assistita da ultrasuoni [6] e l'estrazione in solvente pressurizzata [7]. La preparazione può essere accompagnata da procedure di purificazione, come la SPE [8] o la cromatografia a gel permeation [9]. Per ovviare a queste tecniche dispendiose, in termini di manodopera e di tempo, sono stati implementati i protocolli Quick, Easy, Effective, Rugged, and Safe (QuEChERS) [10,11] con un buon successo [12,13,14]. La preparazione del campione è sempre più importante per i campioni alimentari complessi, soprattutto per quelli con elevato contenuto lipidico, poiché la matrice coestratta ha effetti deleteri sull'analisi in forma di interferenze, effetti matrice e accumulo nel sistema analitico.

Agilent Bond Elut QuEChERS Enhanced Matrix Removal—Lipid (EMR—Lipid) è un nuovo adsorbente che rimuove in modo selettivo le principali classi di lipidi dagli estratti di campione senza interessare gli analiti di interesse. La rimozione di determinate specie di lipidi è particolarmente importante per tecniche come QuEChERS, che coestraggono grandi quantità di matrice con gli analiti target. Tradizionalmente, gli adsorbenti C18 e PSA erano utilizzati per purificare campioni ad alto contenuto lipidico durante l'estrazione in fase solida dispersa (dSPE). Tuttavia, questi adsorbenti spesso non permettono un'adeguata purificazione del campione e possono presentare interazioni non selettive con gli analiti. Questo lavoro studia la preparazione del campione e l'analisi di 15 IPA nel salmone tramite un protocollo semplice ed efficiente, che offre la purificazione adeguata con EMR-Lipid, nonché elevate accuratezza e riproducibilità con GC/MS.

## Risultati sperimentali

L'analisi è stata eseguita su Agilent 7890 GC e Agilent 5977 MSD con iniettore multimode (MMI), con campionatore automatico per liquidi (ALS) Agilent 7693 e Capillary Flow Technology per backflush della colonna. La Tabella 1 mostra i parametri strumentali, mentre la Tabella 2 mostra i prodotti di consumo e altre apparecchiature utilizzate in questo lavoro.

**Tabella 1. Condizioni strumentali per il sistema Agilent GC/MS utilizzato per l'analisi degli IPA**

GC:	Agilent 7890B
Autocampionatore:	Campionatore automatico per liquidi Agilent 7693, siringa da 10,0 µL (G4513-80220)
Volume di iniezione:	0,5 µL
Gas di trasporto:	elio, flusso costante
Filtro gas:	filtro di purificazione gas GC/MS 1/8 pollice (codice CP17974)
Iniettore:	MMI, modalità di iniezione splitless a caldo, 320 °C
Flusso split:	50 mL/min a 0,75 min
Flusso:	2,0 mL/min
Programma forno:	70 °C per 1 min, poi 25 °C/min fino a 195 °C con 1,5 min a temperatura costante, poi 7 °C/min fino a 315 °C
Colonna:	GC Agilent J&W DB-5ms UI, 20 m × 0,18 mm, 0,18 µm (codice 121-5522UI)
Restrittore:	Tubo di silice disattivata, 0,65 m × 0,15 mm (codice 160-7625-5)
Backflush post-run:	5 min a 315 °C, 70 psi durante il backflush
Pressione aux:	2 psi durante l'analisi, 70 psi durante il backflush
MSD:	Agilent 5977 MSD
Modalità:	SIM
Temperatura transfer line:	340 °C
Temperatura sorgente:	325 °C
Temperatura quadrupolo:	150 °C
Solvent delay:	3,5 min

**Tabella 2. Altri prodotto di consumo e attrezzature.**

Vial:	vetro ambrato con chiusura a vite (codice 5190-7041)
Tappi vial:	Tappi PTFE a vite, 9 mm (codice 5182-0717)
Inseriti per vial:	vetro, 150 µL, base polimerica (codice 5183-2088)
Setto:	lunga durata, non adesivo, 11 mm 50/pk (codice 5183-4761)
Ferrule:	Vespel: grafite, 85:15, 0,4 mm id (codice 5181-3323), ferrule UltiMetal Plus Flexible Metal (codice G3188-27501)
Liner per iniettore:	single goosneck, splitless, Ultra Inert (codice 5190-7041)
Capillary Flow Technology (CFT):	UltiMetal Plus Ultimate Union (codice G3186-60580), raccordo capillare CFT (codice G2855-20530)
Bond Elut EMR—Lipid dSPE:	1 g in tubo da 15 mL (codice 5982-1010)
Bond Elut Final Polish per Enhanced Matrix Removal—Lipid:	2 g in tubo da 15 mL (codice 5982-0101)
Geno/Grinder, Metuchen, NJ, USA	
Centrifuga Centra CL3R, Thermo IEC, MA, USA	
Microcentrifuga Eppendorf, Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA	
Vortex e vortex multipli, VWR, Radnor, PA, USA	
Dosatore per bottiglia, VWR, So. Plainfield, NJ, USA	
Pipette Eppendorf	

## Preparazione del campione

Il salmone è stato omogeneizzato e pesato (5 g) in tubi per centrifuga da 50 mL e con aggiunta in base alle necessità di standard e standard interni marcati. È stato aggiunto dell'acetonitrile (ACN) (10 mL), quindi il campione è stato miscelato in un agitatore meccanico per due minuti. I tubi sono stati centrifugati a 5000 giri/min per cinque minuti. Il sopranatante (8 mL) è stato trasferito in un tubo per centrifuga da 15 mL contenente 1 g di adsorbente EMR—Lipid, immediatamente agitato in vortex fino a dispersione, poi per altri 60 secondi su vortex. La sospensione liquida è stata successivamente centrifugata a 5000 giri/min per tre minuti. L'intero sopranatante è stato fatto decantare in un secondo tubo di purificazione da 15 mL contenente 2,0 g di sale (1:4 NaCl:MgSO<sub>4</sub>) e immediatamente agitato in vortex fino a dispersione, seguito da una centrifuga a 5000 giri/min per tre minuti. Lo strato superiore di acetonitrile è stato trasferito in vial per campioni per l'analisi GC/MS (Figura 1).

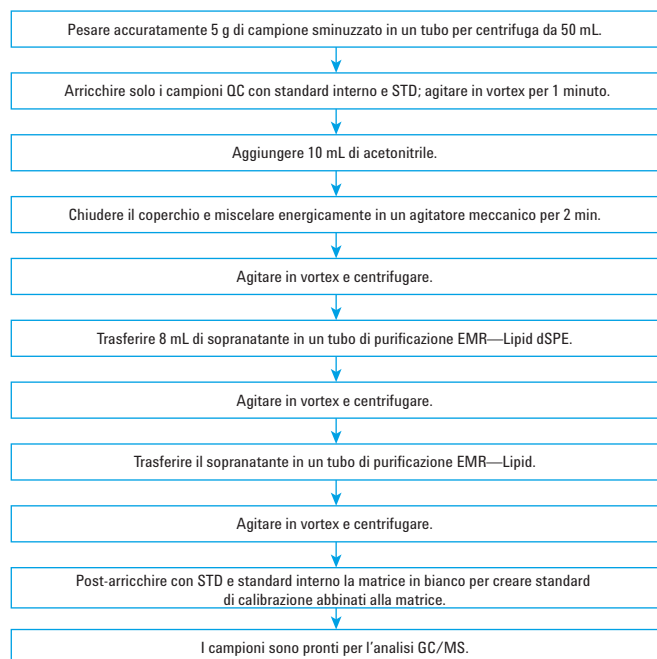


Figura 1. Protocollo di preparazione del campione per IPA nel salmone con Agilent Bond Elut Enhanced Matrix Removal—Lipid prima dell'analisi GC/MS.

## Reagenti e sostanze chimiche

Tutti i reagenti e i solventi erano di grado HPLC o superiore. L'acetonitrile è stato acquistato da Honeywell (Muskegon, MI, USA), mentre l'acqua è stata purificata con un sistema integrale EMD Millipore Milli-Q (Darmstadt, Germania). Gli standard IPA e gli standard interni sono stati acquistati come soluzioni da Ultra-Scientific (North Kingstown, RI, USA). Le soluzioni stock sono state preparate a 100 µg/mL in acetone e diluite in vial ambra come standard operativi.

## Curve di calibrazione e quantificazione

Le curve di calibrazione in matrice sono state generate su tutto l'intervallo di calibrazione, corrispondente a 1, 10, 25, 50, 100, 250, 500 e 1000 ng/g. I bianchi di salmone sono stati poi sottoposti all'intera procedura di preparazione del campione, con 950 µL di estratto di bianco, 25 µL di IPA standard e 25 µL di standard interni. Gli standard interni sono stati aggiunti al salmone e successivamente aggiunti agli standard di calibrazione in matrice a 100 ng/g. Tutte le curve di calibrazione hanno mostrato un'eccezionale linearità, con  $R^2 > 0,999$  per tutti i composti. I campioni di salmone sono stati arricchiti a livelli di 25, 100 e 500 ng/g prima dell'estrazione in sei cicli. Per quantificare gli analiti target è stato usato il software Agilent MassHunter. I valori di accuratezza sono stati determinati calcolando la risposta nei campioni arricchiti rispetto agli standard interni. I valori assoluti di recupero sono stati determinati misurando la risposta degli analiti aggiunti prima dell'estrazione alla curva di calibrazione senza correzione con standard interno.

## Risultati e discussione

Il 7890 GC e il 5977 GC/MSD hanno mostrato eccellenti prestazioni per i 15 IPA e cinque standard interni, fornendo risultati coerenti con alta sensibilità. La Figura 2 mostra la separazione raggiunta per i 15 IPA su colonna Agilent DB-5ms UI con arricchimento prima dell'estrazione del salmone a 25 ng/g. Il cromatogramma mostra la separazione alla linea di base di tutti e 15 i IPA, il che è essenziale per un'accurata integrazione degli isomeri IPA fenantrene, antracene, benzo(a)antracene, crisene, benzo(b)fluorantene e benzo(k)fluorantene. Alcune interferenze di minore entità nel cromatogramma vengono facilmente separate dai picchi di interesse.

Sono state raggiunte accuratezza e precisione elevate a livelli di arricchimento di 25, 100 e 500 ng/g utilizzando la procedura ottimizzata con EMR-Lipid. La Figura 3 mostra che l'accuratezza si è situata tra 84 e 115% per tutti gli analiti e a tutti i livelli con correzione di standard interno marcato, con RSD da 0,5 a 4,4% (Figura 4). I dati di accuratezza sono raggruppati nell'intervallo di recupero nella Figura 5 e mostrano che gran parte dei composti rientra tra il 90 e il 120%, con due composti leggermente al di sotto del 90% (Indeno(1,2,3-cd)pirene e benzo(g,h,i)perilene).

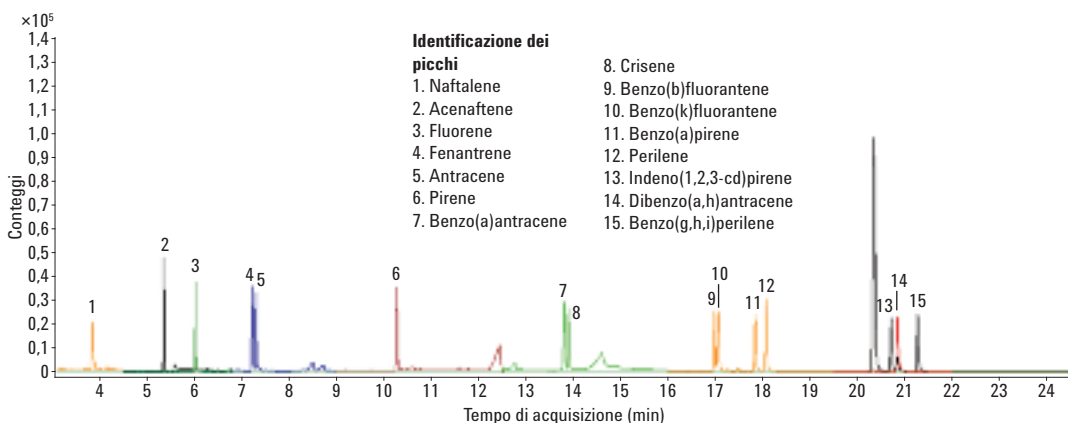


Figura 2. Cromatogramma GC/MS SIM di 15 IPA da salmone pre-arricchito 25 ng/g.

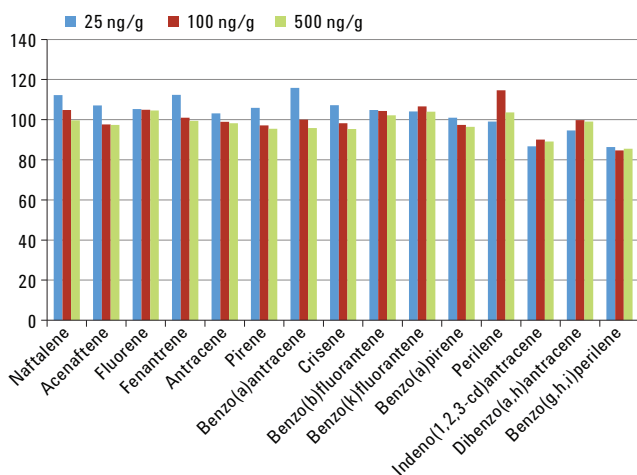


Figura 3. Risultati di accuratezza per 15 IPA nel salmone a livelli di 25 ng/g, 100 ng/g e 500 ng/g.

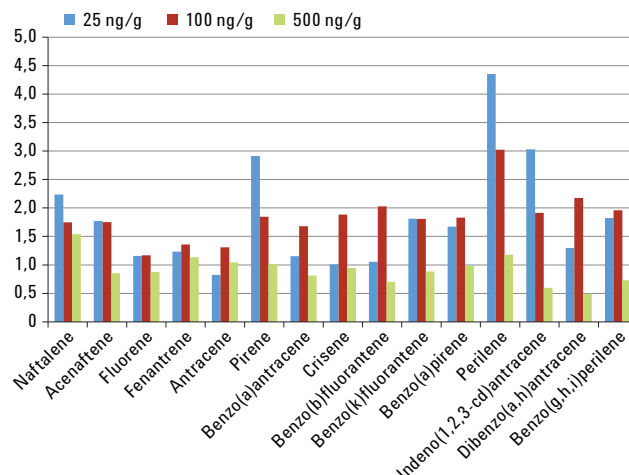


Figura 4. Risultati di precisione per 15 IPA nel salmone a livelli di 25 ng/g, 100 ng/g e 500 ng/g.

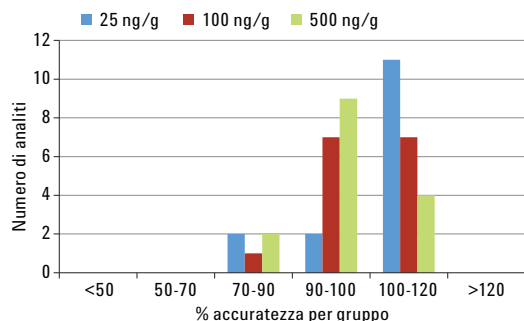


Figura 5. Risultati di precisione raggruppati per IPA nel salmone a livelli di 25 ng/g, 100 ng/g e 500 ng/g.

Il recupero assoluto si è collocato tra il 62 e il 98% senza utilizzo di standard interni (Tabella 3). Due composti, indo(1,2,3-cd)pirene e benzo(g,h,i)perilene, hanno mostrato un recupero lievemente inferiore al 70%. I recuperi assoluti di IPA diminuiscono con l'aumento del peso molecolare a causa della minore solubilità in acetonitrile. Tuttavia, gran parte dei recuperi è elevata e facilmente corretta con gli standard interni. Anche i recuperi assoluti degli standard interni sono elevati, come mostrato nella Tabella 4. Nonostante la limitazione della solubilità dell'acetonitrile, questo metodo consente un recupero da buono a ottimo e risultati altamente riproducibili nei campioni di salmone con alto contenuto lipidico.

Tabella 3. Elenco di IPA utilizzati in questo studio e loro accuratezza, recupero assoluto e deviazioni standard relative (RSD) in salmone (n = 6).

Composto	Arricchimento 25 ng/g			Arricchimento 100 ng/g			Arricchimento 500 ng/g		
	Acc.	Rec.	%RSD	Acc.	Rec.	%RSD	Acc.	Rec.	%RSD
Naftalene	112,2	86,7	2,2	104,8	89,7	1,7	99,7	85,8	1,5
Acenaftene	107,1	90,1	1,8	97,6	89,9	1,8	97,3	90,6	0,9
Fluorene	105,3	94,6	1,2	105,0	94,2	1,2	104,6	96,2	0,9
Fenantrene	112,3	95,3	1,2	101,0	94,1	1,4	99,4	94,5	1,1
Antracene	103,1	91,6	0,8	98,9	90,7	1,3	98,3	92,6	1,0
Pirene	105,8	97,6	2,9	97,1	88,9	1,8	95,4	89,7	1,0
Benzo(a)antracene	115,8	91,2	1,2	100,1	84,7	1,7	95,8	85,7	0,8
Crisene	107,2	83,6	1,0	98,2	83,2	1,9	95,4	85,4	0,9
Benzo(b)fluorantene	104,8	78,3	1,1	104,3	76,1	2,0	102,2	79,2	0,7
Benzo(k)fluorantene	104,1	78,8	1,8	106,6	77,5	1,8	104,0	80,3	0,9
Benzo(a)pirene	101,0	74,2	1,7	97,4	71,8	1,8	96,4	74,8	1,0
Perilene	99,1	74,4	4,4	114,7	76,4	3,0	103,6	80,3	1,2
Indeno(1,2,3-cd)pirene	86,7	66,1	3,0	90,0	66,2	1,9	89,1	69,1	0,6
Dibenzo(a,h)antracene	94,7	73,9	1,3	99,7	72,2	2,2	99,0	76,2	0,5
Benzo(g,h,i)perilene	86,4	64,7	1,8	84,7	62,3	2,0	85,6	66,3	0,7
<b>Media</b>	<b>103,0</b>	<b>82,7</b>	<b>1,8</b>	<b>100,0</b>	<b>81,2</b>	<b>1,8</b>	<b>97,7</b>	<b>83,1</b>	<b>0,9</b>

## EMR-Lipid dSPE

Il salmone è stato scelto come campione rappresentativo per il suo alto contenuto lipidico rispetto ad altri pesci. La procedura ottimizzata devia da un tipico protocollo QuEChERS per diverse modalità che semplificano il protocollo di lavoro e sfruttano la fase di purificazione EMR—Lipid con formato dSPE. Dapprima, il salmone è estratto direttamente con acetonitrile senza aggiunta di acqua o con sali per estrazione QuEChERS. Dopo la centrifuga, il sopranatante consiste di acetonitrile e una piccola quantità d'acqua proveniente dal campione. Il sopranatante viene trasferito nel tubo EMR—Lipid per la rimozione della matrice in dSPE. Infine, il sopranatante dSPE è trasferito in un tubo di purificazione contenente 2,0 g di NaCl/MgSO<sub>4</sub> (1:4) per indurre la separazione delle fasi. Lo strato superiore di acetonitrile è poi trasferito in vial per l'analisi.

Tabella 4. Recupero assoluto e precisione (%RSD) per standard interni nel salmone (n = 6).

Composto	Arricchimento 100 ng/g	
	Rec.	%RSD
Naftalene-d8	87,8	1,0
Acenaftene-d10	93,3	0,8
Fenantrene-d10	94,9	0,8
Crisene-d12	87,1	1,0
Perilene-d12	86,4	3,1
<b>Media</b>	<b>89,9</b>	<b>1,3</b>

Essendo tipico dei protocolli per la rimozione dei lipidi dalla matrice, questo approccio sfrutta la purificazione avanzata utilizzando un campione di dimensioni maggiori, che a sua volta migliora la sensibilità globale del metodo. Per i protocolli tradizionali EMR—Lipid, viene aggiunta dell'acqua per attivare il materiale adsorbente prima della fase dSPE. Per questo protocollo ottimizzato, è stato riscontrato che l'acqua aggiunta faceva diminuire la solubilità degli IPA, con effetto negativo su alcuni recuperi assoluti. Perciò, il sopranatante ottenuto per estrazione è stato trasferito direttamente nel tubo EMR-Lipid senza aggiunta di acqua, fornendo una purificazione adeguata per l'analisi SIM GC/MS. La miscelazione immediata dopo l'aggiunta del sopranatante nei tubi EMR-Lipid e EMR-Lipid di purificazione sospende i solidi per assicurare la massima interazione con il adsorbente ed evitare la formazione di grumi. Per una rimozione ottimale della matrice, è possibile aggiungere dell'acqua nella fase dSPE, mentre i recuperi possono essere corretti efficacemente con standard interni, in modo da avere accuratezza e precisione elevate.

## Conclusioni

Questo lavoro dimostra un metodo rapido e semplice che quantifica efficientemente livelli di concentrazione da bassi ad alti di IPA in campioni di salmone con alto contenuto di lipidi. Il protocollo di lavoro è semplice come il metodo QuEChERS, ma implementato con il nuovo adsorbente EMR—Lipid dSPE per ridurre al minimo gli interferenti lipidici, massimizzare il recupero e offrire un maggiore livello di precisione.

Anche se il contenuto lipidico nelle matrici quali il salmone può variare sensibilmente, Agilent Bond Elut Enhanced Matrix Removal—Lipid è un adsorbente universale per la rimozione dei grassi, che non interagisce con gli analiti di interesse. La rimozione dei grassi è massimizzata con l'aggiunta di acqua con EMR—Lipid durante la fase dSPE. Tuttavia, in questo caso, una maggiore quantità d'acqua fa diminuire la solubilità degli IPA, condizione non auspicabile durante la preparazione del campione per analisi di IPA. Il lavoro futuro continuerà a ottimizzare EMR—Lipid per tipologia di campione e le applicazioni più complesse, così da ampliarne il valore con i sistemi cromatografici e di rivelazione attuali e di prossima generazione.

Tabella 5. Analiti target, tempo di ritenzione, ione target e standard interni per il metodo GC/MS SIM.

Composto	GC/MS (SIM)			
	TR	Ione target	Dwell time (ms)	Standard interno
Naftalene	3,89	128,0	20	Naftalene-d8
Acenaftene	5,37	152,0	20	Acenaftene-d10
Fluorene	6,05	166,0	20	Acenaftene-d10
Fenantrene	7,25	178,0	20	Fenantrene-d10
Antracene	7,34	178,0	20	Fenantrene-d10
Pirene	10,31	202,0	20	Fenantrene-d10
Benzo(a)antracene	13,83	228,0	20	Cisene-d12
Cisene	13,93	228,0	20	Cisene-d12
Benzo(b)fluorantene	16,99	252,0	20	Perilene-d12
Benzo(k)fluorantene	17,08	252,0	20	Perilene-d12
Benzo(a)pirene	17,85	252,0	20	Perilene-d12
Perilene	18,09	252,0	20	Perilene-d12
Indeno(1,2,3-cd)pirene	20,72	276,0	20	Perilene-d12
Dibenzo(a,h)antracene	20,87	278,0	20	Perilene-d12
Benzo(g,h,i)perilene	21,29	276,0	20	Perilene-d12
<b>Standard interni</b>				
Naftalene-d8	3,87	136,0	20	—
Acenaftene-d10	5,52	162,0	20	—
Fenantrene-d10	7,22	188,0	20	—
Cisene-d12	13,86	240,0	20	—
Perilene-d12	18,03	264,0	20	—

## Bibliografia

1. Anon. *Compendium Method T0-13A*. Environmental Protection Agency (EPA) of the United States of America, Cincinnati, OH, USA, **1999**.
2. Guo, Y.; Wu, K.; Xu, X. *J. Environ. Health* **2011**, *73*, 22-25.
3. Beyer, J.; Jonsson, G.; Porte, C.; Krahn, M. M.; Ariese, F. *Environ. Tox. and Pharma.* **2010**, *30*, 224-244.
4. Essumang, D. K.; Dodoo, D. K.; Adjei, J. K. *J. Food Composition and Analysis* **2012**, *27*, 128-138.
5. Takigami, H.; Suzuki, G.; Hirai, Y.; Sakai, S. *Chemosphere* **2009**, *76*, 270–277.
6. Ali, N.; Dirtu, A. C.; Eede, N. V. D.; Goosey, E.; Harrad, S.; Neels, H.; 't Mannetje, A.; Coakley, J.; Douwes, J.; Covaci, A. *Chemosphere* **2012**, *88*, 1276–1282.
7. Stapleton, H. M.; Keller, J. M.; Schantz, M. M.; Kucklick, J. R.; Leigh, S. D.; Wise, S. A. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *387*, 2365–2379.
8. Sverko, E.; Tomy, G. T.; Marvin, C. H.; Zaruk, D.; Reiner, E.; Helm, P. A.; Hill, B.; Mccarry, B. E. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42*, 361–366.
9. Saito, K.; Sjödin, A.; Sandau, C. D.; Davis, M. D.; Nakazawa, H.; Matsuki, Y.; Patterson, Jr., D. G. *Chemosphere* **2004**, *57*, 373–381.
10. Anastassiades, M.; Lehotay, S. J.; Štajnbaher, D.; Schenck, F. S. *J. AOAC Int.* **2003**, *86*, 412-431.
11. Lehotay, S. J.; Mastovská, K.; Lightfield, A. R. *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 615-629.
12. Forsberg, N. D.; Wilson, G. R.; Anderson, K. A. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 8108-8116.
13. Smith, D.; Lynam, K. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Analysis in Fish by GC/MS Using Agilent Bond Elut QuEChERS Sample Preparation and a High Efficiency DB-5ms Ultra Inert GC Column*; Application Note, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5990-6668EN, **2012**.
14. Sapozhnikova, Y.; Lehotay, S. J. *Analytica Chimica Acta* **2013**, *758*, 80–92.

## 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  
30 luglio 2015  
5991-6088ITE



**Agilent Technologies**