

增强型脂质去除产品对三文鱼的 PAH 分析

应用简报

食品检测、农业与环境

作者

Derick Lucas 和 Limian Zhao
安捷伦科技（中国）有限公司

摘要

多环芳烃 (PAH) 由稠合苯环体系组成，因此难以降解。它们通过在环境中的积聚以及烟熏等烹饪方法进入水生生物体内。通常高脂肪含量复杂食品基质中的 PAH 分析极具挑战性，因为共萃取出的基质会以干扰物、基质效应和分析流路中的累积等形式影响定量分析的准确性。Agilent Bond Elut QuEChERS EMR-Lipid 增强型脂质去除产品为新一代样品前处理产品，可用于便捷的分散固相萃取 (dSPE) 中，实现高度选择性的基质去除且不影响分析物回收率。本文证明了这一样品前处理方法在进行三文鱼体内 PAH 分析中的有效性。此方法为各种浓度下的全部 15 种 PAH 化合物提供了出色的准确度（回收率为 84% - 115%）和精密度（RSD 为 0.5% - 4.4%），因此能够快速、稳定而有效地分析高脂肪含量样品。

前言

多环芳烃 (PAH) 是环境中普遍存在的污染物，可能来源于自然界的生物合成及燃烧过程。它们由排列在两个或多个稠合苯环上的氢和碳组成，在一个或多个苯环上连接有取代基团 [1]。由于 PAH 在环境中具有持久性，并且其中一些种类还对哺乳动物具有已知毒性、致畸性和致癌性，因此它们受到了越来越多的关注 [2]。对海产品的污染可能来源于石油成分在水源中的聚集以及烹饪过程中 PAH 作为烟气中燃烧的副产物而被引入 [3,4]。鉴于以上原因，分析人员必须采用可靠高效的方法对所关注相应浓度的 PAH 污染物进行检测。



Agilent Technologies

通过 GC/MS 与可靠高效的样品前处理技术相结合，可实现低浓度 PAH 的检测。常用的前处理方法包括索氏提取 [5]、超声辅助萃取 [6] 和加压溶剂萃取 [7]。前处理可以与固相萃取 [8] 或凝胶渗透色谱 [9] 等净化步骤配合使用。为弥补这些费时费力的技术不足，基于 QuEChERS 方法（一种分散固相萃取技术，因技术快速，简便，经济，高效，耐用和安全等特点而取名）样品前处理对于复杂的食品样品，尤其是脂质含量高的样品来说越来越重要，因为共萃取出的基质会以干扰物、基质效应和分析流路中的聚集等形式对分析造成不利影响。

Agilent Bond Elut QuEChERS EMR-Lipid 增强型脂质去除产品是一种新型的吸附剂材料，能够选择性去除样品萃取物中的主要脂质而不会去除目标分析物。脂质去除对于 QuEChERS 等技术而言尤其重要，因为这类技术会使大量基质随目标分析物一同萃取出来。过去，分散固相萃取 (dSPE) 步骤中采用 C18 和 PSA 型吸附剂对高脂肪含量样品进行净化。然而，这些吸附剂通常无法实现彻底的样品净化，还可能与分析物之间发生非选择性相互作用。本文研究了样品前处理以及使用简单、有效的工作流程对三文鱼样品中的 15 种 PAH 进行分析，从而利用 EMR-Lipid 实现彻底净化并在 GC/MS 中获得优异的准确度和重现性。

实验部分

分析采用 Agilent 7890 GC 与配备多模式进样口 (MMI) 的 Agilent 5977 MSD，以及 Agilent 7693 自动液体进样器和用于实现色谱柱反吹的微板流路控制技术。表 1 列出了仪器参数，表 2 则列出了本研究中所用的消耗品及其他仪器。

表 1. 用于 PAH 分析的安捷伦气质联用系统的仪器条件

气相色谱：	Agilent 7890B
自动进样器：	Agilent 7693 自动液体进样器，10.0 μ L 注射器 (G4513-80220)
进样量：	0.5 μ L
载气：	氦气，恒流
气体过滤器：	GC/MS 气体净化过滤器，1/8 英寸（部件号 CP17974）
进样口：	MMI，热不分流进样模式，320 $^{\circ}$ C
分流出口吹扫流速：	50 mL/min，自 0.75 min 处开始
流速：	2.0 mL/min
柱温箱升温程序：	70 $^{\circ}$ C 保持 1 min，以 25 $^{\circ}$ C/min 的速率升至 195 $^{\circ}$ C 并保持 1.5 min，然后以 7 $^{\circ}$ C/min 的速率升至 315 $^{\circ}$ C
色谱柱：	Agilent J&W DB-5ms UI，20 m \times 0.18 mm，0.18 μ m（部件号 121-5522UI）
限流器：	去活石英管线，0.65 m \times 0.15 mm（部件号 160-7625-5）
运行后反吹：	315 $^{\circ}$ C，保持 5 min，反吹压力 70 psi
辅助气压力：	运行过程 2 psi，反吹过程 70 psi
质谱：	Agilent 5977 MSD
模式：	SIM
传输线温度：	340 $^{\circ}$ C
离子源温度：	325 $^{\circ}$ C
四极杆温度：	150 $^{\circ}$ C
溶剂延迟：	3.5 min

表 2. 其他消耗品和仪器

样品瓶：	棕色，螺口，玻璃（部件号 5190-7041）
样品瓶盖：	PTFE，9 mm，螺口盖（部件号 5182-0717）
样品瓶内插管：	玻璃，150 μ L，带聚合物支脚（部件号 5183-2088）
隔垫：	长寿命，不粘连，11 mm，50/包（部件号 5183-4761）
密封垫圈：	Vespel:石墨 85:15，内径 0.4 mm（部件号 5181-3323），UltiMetal Plus 可塑金属密封垫圈（部件号 G3188-27501）
进样口衬管：	单锥，不分流，超高惰性（部件号 5190-7041）
微板流路控制技术 (CFT)：	UltiMetal Plus Ultimate 接头（部件号 G3186-60580），CFT 毛细管接头（部件号 G2855-20530）
EMR-Lipid 增强型脂质去除净化管	1 g 于 15 mL 管中（部件号 5982-1010）
EMR-Lipid polish 反萃管	2 g 于 15 mL 管中（部件号 5982-0101）
Geno/Grinder，美国新泽西州墨图根	
Centra CL3R 离心机，Thermo IEC，美国马萨诸塞州	
Eppendorf 微量离心管，Brinkmann Instruments，美国纽约州韦斯特伯里	
涡旋仪和多管涡旋仪，VWR，美国宾夕法尼亚州拉德诺	
瓶口分液器，VWR，美国新泽西州南普兰菲尔德	
Eppendorf 移液管	

样品前处理

将三文鱼样品混匀后称取 5 g 加入 50 mL 离心管中，根据需要向其中加入标准品和同位素标记的内标。加入 10 mL 乙腈 (ACN)，将样品置于机械振荡器中振摇混合 2 分钟。随后将离心管在 5000 rpm 下离心 5 分钟。移取 8 mL 上清液至含有 1 g EMR-Lipid 吸附剂的 15 mL 离心管中，立即涡旋混合使其分散，然后在涡旋台中继续混合 60 秒。随后将匀浆液在 5000 rpm 下离心 3 分钟。将所有上清液倒入第二根含有 2.0 g 盐 (1:4 NaCl:MgSO₄) 的 15 mL 反萃管中，立即涡旋混合使其分散，然后在 5000 rpm 下离心 3 分钟。移取上层 ACN 相至样品瓶中等待 GC/MS 分析 (图 1)。

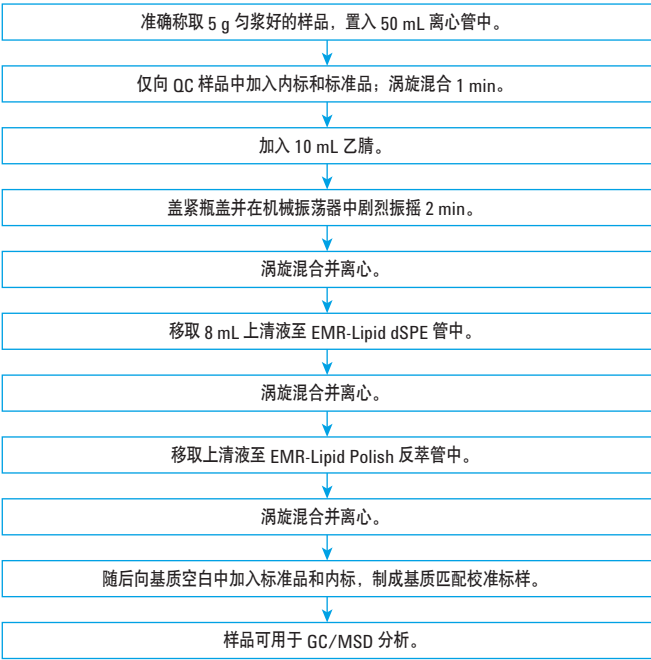


图 1. GC/MS 分析前使用 Agilent Bond Elut 增强型脂质去除产品 EMR-Lipid 对三文鱼中 PAH 进行样品前处理的工作流程

试剂与化学品

所有试剂和溶剂均为 HPLC 级或更高等级。ACN 购自 Honeywell (美国密歇根州马斯基根)，实验用水经过 EMD Millipore Milli-Q Integral 系统 (德国达姆斯塔特) 纯化处理。PAH 标准品和内标为溶液形式，购自 Ultra-Scientific (美国罗得岛州北金斯敦)。用乙腈配制 100 µg/mL 的储备液，并在棕色样品瓶中将其稀释为工作标准液。

校准曲线和定量分析

基质匹配校准曲线在校准范围内生成，浓度分别为 1、10、25、50、100、250、500 和 1000 ng/g。整个样品前处理过程中采用三文鱼空白制备出 950 µL 空白萃取液、25 µL 标准工作溶液和 25 µL 内标储备液。将内标以 100 ng/g 的浓度分别加标以及后加标至三文鱼样品与基质匹配校准标样中。所有校准曲线均表现出优异的线性，所有化合物的 R² 均大于 0.999。在六次重复萃取之前，将三文鱼样品预加标为浓度 25、100 和 500 ng/g 的溶液。Agilent MassHunter 软件用于对目标分析物进行定量分析。实验通过计算加标样品相对于内标的响应来测定准确度值，并通过测定预加标分析物相对于未经内标校正的校准曲线的响应来测定绝对回收率值。

结果与讨论

7890 GC 和 5977 GC/MSD 在 15 种 PAH 与 5 种内标分析中均表现出优异的性能，获得了一致的高灵敏度结果。图 2 显示以 25 ng/g 预加标于三文鱼样品中的 15 种 PAH 在 Agilent DB-5ms UI 色谱柱中的分离结果。该色谱图表明全部 15 种 PAH 达到了基线分离，这对于 PAH 异构体菲、蒽、苯并[a]蒽、蒽、苯并[b]蒽和苯并[k]蒽的准确积分至关重要。色谱图中一些较小的干扰能够轻松与目标色谱峰实现分离。

实验通过采用 EMR-Lipid 优化的步骤，在 25、100 和 500 ng/g 的加标浓度下获得了优异的准确度和精密度。图 3 显示采用同位素标记的内标校正使各种浓度下的所有分析物均达到了 84% - 115% 的准确度，且 RSD 为 0.5% - 4.4%（图 4）。图 5 中对准确度数据按回收率范围进行了分组，结果表明多数化合物的回收率均处于 90% - 120% 之间，只有两种化合物的回收率略小于 90%（茚并[1,2,3-cd]芘、苯并[g,h,i]芘）。

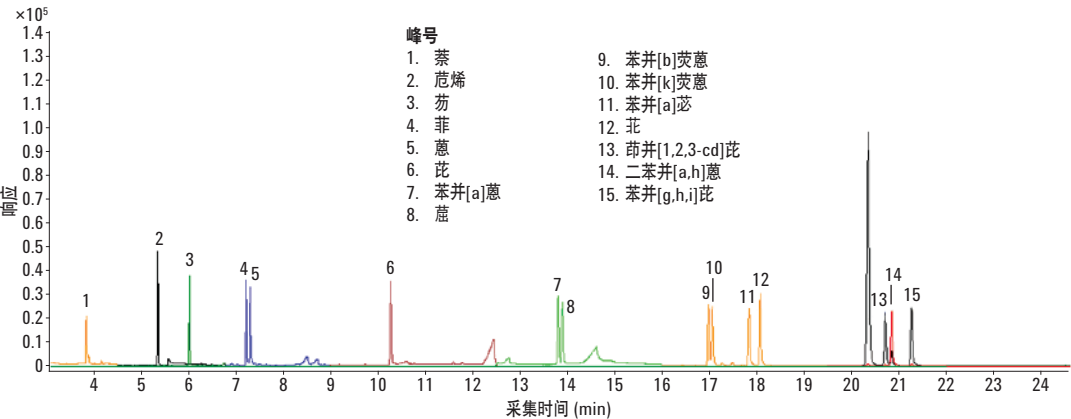


图 2. 25 ng/g 预加标于三文鱼中的 15 种 PAH 的 GC/MS SIM 色谱图

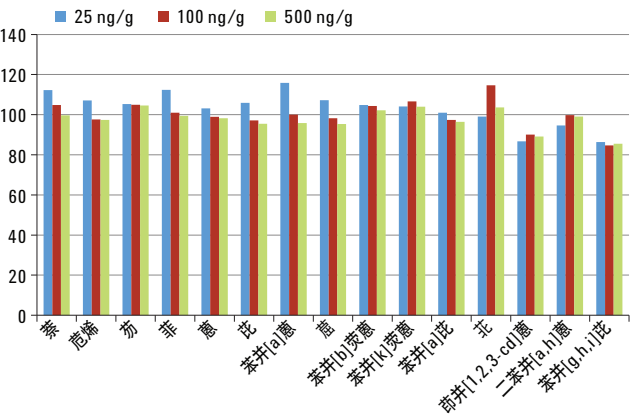


图 3. 在 25 ng/g、100 ng/g 和 500 ng/g 浓度下得到的三文鱼样品中 15 种 PAH 的准确度结果

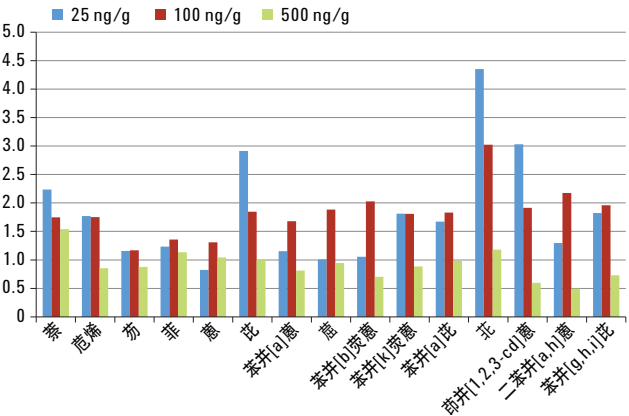


图 4. 在 25 ng/g、100 ng/g 和 500 ng/g 浓度下得到的三文鱼样品中 15 种 PAH 的精密度结果

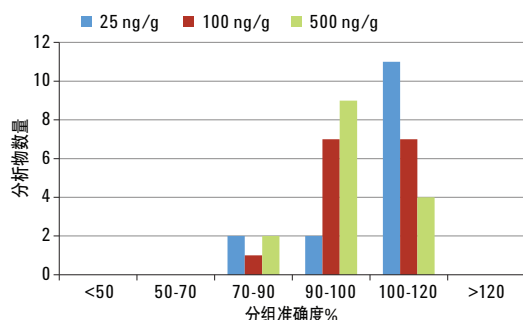


图 5. 在 25 ng/g、100 ng/g 和 500 ng/g 浓度下得到的三文鱼样品中 PAH 的分组准确度结果

在不使用内标的情况下得到的绝对回收率为 62% - 98% (表 3)。其中茚并[1,2,3-cd]芘和苯并[g,h,i]芘两种化合物的回收率略小于 70%。PAH 绝对回收率随分子量的增加而降低, 因为化合物在 ACN 中的溶解度会随分子量的增加而减小。然而, 多数化合物的回收率均比较高且易于使用内标进行校正。内标绝对回收率也很高, 如表 4 所示。尽管受限于化合物在 ACN 中的溶解度, 但这一方法仍能够使高脂肪含量的三文鱼样品获得良好乃至出色的回收率和高重现性结果。

EMR-Lipid dSPE

选择三文鱼作为代表性样品是由于其中的脂肪含量相对于其他海产品较高。优化程序简化了工作流程并利用了 EMR-Lipid dSPE 净化步骤, 因此与典型 QuEChERS 方法在几个方面均有所不同。首先, 优化程序直接采用 ACN 对三文鱼样品进行萃取, 而不使用额外的水或 QuEChERS 萃取盐。离心后, 上清液中包含 ACN 和来自样品的少量水分。移取上清液至 EMR-Lipid 管中以去除 dSPE 基质。最后, 移取 dSPE 上清液至含有 2.0 g NaCl/MgSO₄ (1:4) 的 Polish 反萃管中, 以诱导产生相分离。接下来移取上层 ACN 相至样品瓶中等待分析。

表 4. 三文鱼样品中内标的绝对回收率和精密度 (%RSD), n = 6

化合物	加标浓度 100 ng/g	
	回收率	%RSD
蔡-d8	87.8	1.0
萘烯-d10	93.3	0.8
菲-d10	94.9	0.8
蒽-d12	87.1	1.0
芘-d12	86.4	3.1
平均值	89.9	1.3

表 3. 本研究使用的 PAH 列表, 以及它们在三文鱼样品中的准确度、绝对回收率和相对标准偏差 (RSD), n = 6

化合物	加标浓度 25 ng/g			加标浓度 100 ng/g			加标浓度 500 ng/g		
	化合物	回收率	%RSD	准确度	回收率	%RSD	准确度	回收率	%RSD
蔡	112.2	86.7	2.2	104.8	89.7	1.7	99.7	85.8	1.5
萘烯	107.1	90.1	1.8	97.6	89.9	1.8	97.3	90.6	0.9
芴	105.3	94.6	1.2	105.0	94.2	1.2	104.6	96.2	0.9
菲	112.3	95.3	1.2	101.0	94.1	1.4	99.4	94.5	1.1
蒽	103.1	91.6	0.8	98.9	90.7	1.3	98.3	92.6	1.0
芘	105.8	97.6	2.9	97.1	88.9	1.8	95.4	89.7	1.0
苯并[a]蒽	115.8	91.2	1.2	100.1	84.7	1.7	95.8	85.7	0.8
蒽	107.2	83.6	1.0	98.2	83.2	1.9	95.4	85.4	0.9
苯并[b]荧蒽	104.8	78.3	1.1	104.3	76.1	2.0	102.2	79.2	0.7
苯并[k]荧蒽	104.1	78.8	1.8	106.6	77.5	1.8	104.0	80.3	0.9
苯并[a]芘	101.0	74.2	1.7	97.4	71.8	1.8	96.4	74.8	1.0
芘	99.1	74.4	4.4	114.7	76.4	3.0	103.6	80.3	1.2
茚并[1,2,3-cd]芘	86.7	66.1	3.0	90.0	66.2	1.9	89.1	69.1	0.6
二苯并[a,h]蒽	94.7	73.9	1.3	99.7	72.2	2.2	99.0	76.2	0.5
苯并[g,h,i]芘	86.4	64.7	1.8	84.7	62.3	2.0	85.6	66.3	0.7
平均值	103.0	82.7	1.8	100.0	81.2	1.8	97.7	83.1	0.9

作为典型的增强型基质去除方案，此方法通过使用较大的样品体积利用增强型净化功能，提高方法的整体灵敏度。在常规 EMR-Lipid 方法中，进行 dSPE 之前需要额外加入水以活化吸附剂材料。而在这一优化方案中发现，这些额外的水会降低 PAH 的溶解度并对某些化合物的绝对回收率产生负面影响。因此，方案将萃取得到的上清液直接移取至 EMR-Lipid 管中而不再额外加入水，使样品得到彻底净化以便进行 GC/MS SIM 分析。向 EMR-Lipid 和 EMR-Lipid 反萃管中加入上清液后立即混合可使固体悬浮，确保其与吸附剂的相互作用最大化并避免结块。为实现最佳的基质去除效果，可以向 dSPE 中额外加入水，并可采用内标对回收率进行有效校正，以获得优异的准确度和精密密度。

结论

本文展示了一种能够对高脂肪含量三文鱼样品中的低至高浓度 PAH 进行有效定量分析的快速而简便的方法。方法中的工作流程与 QuEChERS 同样简单，但采用新型 EMR-Lipid dSPE 吸附剂以最大程度减少脂肪共萃取物、提高回收率并获得较高精密密度。

尽管三文鱼等基质中的脂肪含量差异极大，但 Agilent Bond Elut 增强型脂质去除产品 EMR-Lipid 是万能的脂肪去除吸附剂，不会与目标分析物之间发生相互作用。在 dSPE 步骤中将 EMR-Lipid 与额外加入的水配合使用，能够最大程度去除脂肪。然而，在这种情况下，更多的水会降低 PAH 的溶解度，这是 PAH 样品前处理中不希望出现的情况。未来的研究将针对具有挑战性的样品类型和应用不断优化 EMR-Lipid，提升其对于当前及新一代色谱和检测系统的价值。

表 5. GC/MS SIM 方法中的目标分析物、保留时间、目标离子和内标类型

化合物	GC/MS (SIM)			
	保留时间	目标离子	驻留时间 (ms)	内标
萘	3.89	128.0	20	萘-d8
苊烯	5.37	152.0	20	苊烯-d10
芴	6.05	166.0	20	苊烯-d10
菲	7.25	178.0	20	菲-d10
蒽	7.34	178.0	20	菲-d10
芘	10.31	202.0	20	菲-d10
苯并[a]蒽	13.83	228.0	20	蒽-d12
蒽	13.93	228.0	20	蒽-d12
苯并[b]荧蒽	16.99	252.0	20	芘-d12
苯并[k]荧蒽	17.08	252.0	20	芘-d12
苯并[a]芘	17.85	252.0	20	芘-d12
芘	18.09	252.0	20	芘-d12
茚并[1,2,3-cd]芘	20.72	276.0	20	芘-d12
二苯并[a,h]蒽	20.87	278.0	20	芘-d12
苯并[g,h,i]芘	21.29	276.0	20	芘-d12
内标				
萘-d8	3.87	136.0	20	—
苊烯-d10	5.52	162.0	20	—
菲-d10	7.22	188.0	20	—
蒽-d12	13.86	240.0	20	—
芘-d12	18.03	264.0	20	—

参考文献

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.; Krahm, 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. 使用 Agilent Bond Elut QuEChERS 样品前处理方法和高效 DB-5ms 超高惰性气相色谱柱通过 GC/MS 分析鱼体内的多环芳烃 (PAH); 应用简报, 安捷伦科技公司, 出版号 5990-6668CHA, **2012**
14. Sapozhnikova, Y.; Lehotay, S. J. *Analytica Chimica Acta* **2013**, *758*, 80-92.

更多信息

这些数据代表典型结果。有关我们的产品与服务的信息，请访问我们的网站 www.agilent.com。

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。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更,恕不另行通知。

© 安捷伦科技(中国)有限公司, 2015
2015年7月30日, 中国出版
5991-6088CHCN



Agilent Technologies