

Análisis de PAH en salmón con extracción mejorada en matriz

Nota de aplicación

Agricultura y análisis alimentario, medio ambiente

Autores

Derick Lucas y Limian Zhao
Agilent Technologies, Inc.

Resumen

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) están compuestos por sistemas de anillos de benceno fusionados que resisten a la degradación. Se introducen en las especies acuáticas por acumulación en el medio ambiente y con los métodos de cocinado que utilizan humo. El análisis de los PAH en matrices de alimentos grasos complejas presentan frecuentemente desafíos, ya que la matriz, que se extrae conjuntamente, impide una cuantificación precisa debido a interferencias, efectos de la matriz, y acumulación en la ruta de flujo analítica. El sistema Bond Elut QuEChERS con extracción mejorada en matriz de lípidos (EMR—Lipid) de Agilent es la nueva generación en productos de preparación de muestras y se utiliza en una práctica extracción en fase sólida dispersiva (dSPE) destinada a una eliminación de la matriz muy selectiva sin afectar la recuperación de los analitos. Este trabajo demuestra la eficacia de esta metodología de preparación de muestras para el análisis de los PAH en salmón. El método proporciona una exactitud (84 a 115%) y precisión (DER = 0,5 a 4,4%) excelentes para los quince compuestos PAH en todos los niveles, lo que proporciona un análisis rápido, robusto y eficaz de muestras grasas.

Introducción

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) son contaminantes omnipresentes en el medio ambiente, y pueden tener origen petrogénico o pirogénico. Están compuestos por hidrógeno y carbono dispuestos en dos o más anillos de benceno fusionados, y pueden tener grupos sustituyentes unidos a uno o más anillos [1]. Los riesgos de los PAH surgen de su persistencia en el medio ambiente y de los efectos tóxicos, mutagénicos y carcinogénicos conocidos que tienen algunos de ellos sobre los mamíferos [2]. La contaminación de los alimentos marinos se puede producir por acumulación de los componentes del petróleo en las fuentes de agua y debido a los procesos de cocinado que introducen los PAH como subproductos de la combustión en el humo [3,4]. Por este motivo, es importante que los analistas dispongan de métodos robustos y eficientes para detectar los PAH contaminantes en niveles de riesgo.



Agilent Technologies

La detección de los PAH a niveles bajos se puede llevar a cabo mediante GC/MS unido a un método de preparación de muestras robusto y eficaz. Los protocolos de preparación habituales incluyen la extracción Soxhlet [5], la extracción asistida por sonicación [6], y la extracción en disolvente presurizado [7]. La preparación puede combinarse con procedimientos de limpieza tales como extracción en fase sólida [8] o cromatografía de permeación en gel [9]. Para evitar estas técnicas laboriosas y lentas se han implantado protocolos basados en el principio “Quick, Easy, Effective, Rugged, and Safe” [rápido, sencillo, eficaz, sólido y seguro] (QuEChERS) [10,11] con buenos resultados [12,13,14]. La preparación de muestras es cada vez más importante en muestras alimentarias complejas, especialmente las que tienen un alto contenido en lípidos, ya que la matriz extraída conjuntamente tiene un efecto negativo sobre el análisis debido a interferencias, efectos de la matriz, y acumulación en la ruta de flujo analítica.

El sistema Bond Elut QuEChERS con extracción mejorada en matriz de lípidos (EMR—Lipid) de Agilent es un nuevo material absorbente que elimina selectivamente las principales clases de lípidos de los extractos de muestra sin la eliminación indeseada del analito de interés. La eliminación de especies lipídicas es especialmente importante en técnicas tales como QuEChERS, que extrae simultáneamente grandes cantidades de la matriz junto con los analitos diana. Tradicionalmente se han utilizado los absorbentes de tipo C18- y PSA para limpiar las muestras grasas en una etapa de extracción en fase sólida dispersiva (dSPE). Sin embargo, frecuentemente estos absorbentes no consiguen una limpieza adecuada de la muestra, y muestran interacciones no selectivas con los analitos. Este trabajo investiga la preparación de muestras y el análisis de quince PAH en salmón con EMR-Lipid usando un flujo de trabajo simple y eficaz, proporcionando una limpieza adecuada a la vez que una exactitud y reproducibilidad excelentes en GC/MS.

Experimento

El análisis se realizó en un cromatógrafo de gases Agilent 7890 GC y un MSD Agilent 5977 provisto de inyector multimodo (MMI) junto con un muestreador automático de líquidos Agilent 7693, y tecnología de flujo capilar para retroflujo de la columna. La Tabla 1 muestra los parámetros instrumentales, y la Tabla 2 muestra los consumibles y resto del equipo usado en este trabajo.

Tabla 1. Condiciones instrumentales del sistema GC/MS de Agilent utilizado en los análisis de PAH

GC:	Agilent 7890B
Muestreador automático:	Muestreador automático de líquidos Agilent 7693, jeringa de 10,0 µl (G4513-80220)
Volumen de inyección:	0,5 µl
Gas portador:	Helio, flujo continuo
Filtro de gas:	Filtro de purificación de gases para GC/MS, 1/8 pulgada (ref. CP17974)
Inyector:	MMI, modo de inyección splitless en caliente, 320 °C
Flujo de purga hacia la purga de split:	50 ml/min a 0,75 min
Velocidad de flujo:	2,0 ml/min
Programa del horno:	70 °C durante 1 min, después 25 °C/min hasta 195 °C, mantener durante 1,5 min, después 7 °C/min hasta 315 °C
Columna:	Agilent J&W DB-5ms UI, 20 m × 0,18 mm, 0,18 µm (ref. 121-5522UI)
Restrictor:	Tubos de sílice desactivados, 0,65 m × 0,15 mm (ref. 160-7625-5)
Retroflujo tras el procesamiento:	5 min a 315 °C, 70 psi durante el retroflujo
Presión auxiliar:	2 psi durante el análisis, 70 psi durante el retroflujo
MSD:	MSD Agilent 5977
Modo:	SIM
Temperatura de la línea de transferencia:	340 °C
Temperatura de fuente:	325 °C
Temperatura de cuadrupolo:	150 °C
Retardo del disolvente:	3,5 min

Tabla 2. Otros consumibles y equipos.

Viales:	De vidrio, de color ámbar, con tapón de rosca (ref. 5190-7041)
Tapones de vial:	Tapón de rosca de PTFE de 9 mm (ref. 5182-0717)
Insertos de vial:	De vidrio de 150 µl, con pies de polímero (ref. 5183-2088)
Séptum:	De larga duración, no adherente, 11 mm, 50/paq. (ref. 5183-4761)
Férrulas:	Vespel:grafito, 85:15, 0,4 mm de d.i. (ref. 5181-3323), férrulas metálicas flexibles UltiMetal Plus (ref. G3188-27501)
Liner de inyección:	Una sola punta, splitless, ultra inerte (ref. 5190-7041)
Tecnología de flujo capilar (CFT):	UltiMetal Plus Ultimate Union (ref. G3186-60580), conexión capilar CFT (ref. G2855-20530)
Bond Elut EMR—Lipid dSPE:	1 g en tubo de 15 ml (ref. 5982-1010)
Pulido final Bond Elut para extracción mejorada en matriz de lípidos:	2 g en tubo de 15 ml (ref. 5982-0101)
Geno/Grinder, Metuchen, NJ, EE.UU.	
Centrífuga Centra CL3R, Thermo IEC, MA, EE.UU.	
Microcentrífuga Eppendorf, Brinkmann Instruments, Westbury, NY, EE.UU.	
Vortizador y vortizadores multitubo, VWR, Radnor, PA, EE.UU.	
Dispensador vertical para viales, VWR, So. Plainfield, NJ, EE.UU.	
Pipetas Eppendorf	

Preparación de muestras

El salmón se homogeneizó y se pesó (5 g) en un tubo de centrifuga de 50 ml, y se añadió según lo necesario con patrones y patrones internos marcados isotópicamente. Se añadió acetonitrilo (ACN) (10 ml), y la muestra se mezcló en un agitador mecánico durante dos minutos. Los tubos se centrifugaron a 5.000 rpm durante cinco minutos. El sobrenadante (8 ml) se transfirió a un tubo de centrifuga de 15 ml que contenía 1 g de absorbente EMR—Lipid, se mezcló en un vórtex inmediatamente para su dispersión, y posteriormente durante 60 segundos más en un vortizador. La suspensión se centrifugó a continuación a 5.000 rpm durante tres minutos. Todo el sobrenadante se decantó a un segundo tubo de pulido de 15 ml que contenía 2,0 g de sales (NaCl:MgSO₄ 1:4), y se mezcló en un vórtex inmediatamente para su dispersión y, a continuación, se centrifugó a 5.000 rpm durante tres minutos. La capa sobrenadante de ACN se transfirió a viales de muestra para su análisis mediante GC/MS (Figura 1).

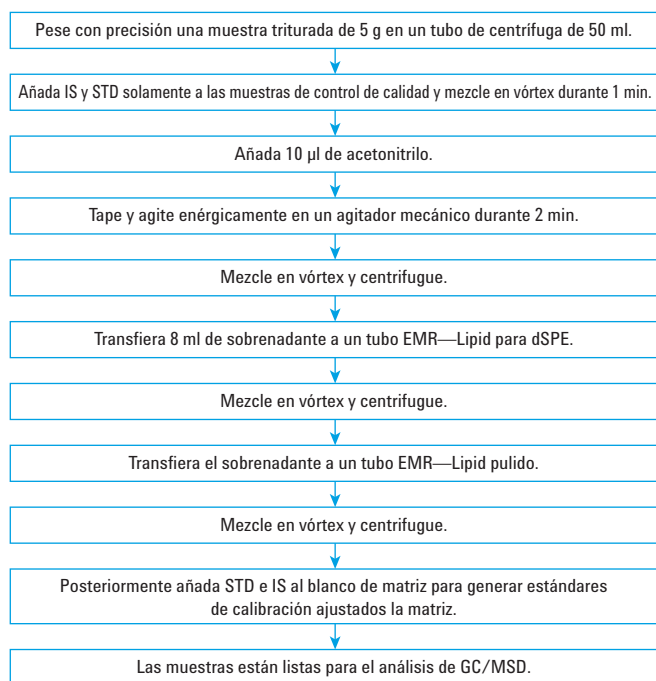


Figura 1. Flujo de trabajo de preparación de muestras para PAH en salmón usando el sistema Bond Elut con extracción mejorada en matriz de lípidos de Agilent antes de su análisis mediante GC/MS.

Reactivos y sustancias químicas

Todos los reactivos y disolventes fueron de calidad HPLC o superior. El ACN era de Honeywell (Muskegon, MI, EE.UU.), y el agua se purificó usando un sistema integrado Milli-Q de EMD Millipore (Darmstadt, Alemania). Los patrones de PAH y los patrones internos se adquirieron de Ultra-Scientific en forma de disolución (North Kingstown, RI, EE.UU.). Las disoluciones madre se prepararon a 100 µg/ml en acetona y se diluyeron en viales de color ámbar para constituir los patrones de trabajo.

Curvas de calibración y cuantificación

Se generaron curvas de calibración acopladas con matriz para el intervalo de calibración, correspondiente a 1, 10, 25, 50, 100, 250, 500, y 1.000 ng/g. Los blancos de salmón se sometieron a la totalidad del procedimiento de preparación de la muestra y 950 µl del extracto de blanco, 25 µl de solución de patrón de PAH's y 25 µl de patrones internos se mezclaron para hacer que la matriz coincidiera con los patrones de calibración. Los patrones internos se mezclaron con el salmón, y posteriormente se añadieron a los patrones de calibración acopladas con matriz a 100 ng/g. Todas las curvas de calibración proporcionaron una linealidad excelente. Se obtuvo un valor de $R^2 > 0,999$ para todos los compuestos. Las muestras de salmón se marcaron previamente con 25, 100, y 500 ng/g antes de su extracción en seis réplicas. Se utilizó el software MassHunter de Agilent para cuantificar los analitos diana. Se determinaron los valores de exactitud calculando las respuestas de la muestra marcada con respecto a los patrones internos. Se determinaron los valores de recuperación absoluta comparando la respuesta del analito previamente enriquecido con la curva de calibración no corregida mediante patrón interno.

Resultados y comentarios

Los sistemas 7890 GC y 5977 GC/MSD ofrecieron un rendimiento excelente para los quince PAH y cinco patrones internos y proporcionaron resultados uniformes con elevada sensibilidad. La Figura 2 muestra la separación conseguida de los quince PAH en una columna DB-5ms UI de Agilent con un enriquecimiento previo de 25 ng/g en salmón. El cromatograma muestra una separación en línea de base para los quince PAH, algo esencial para una integración precisa de los isómeros de PAH fenantreno, antraceno, benzo[a]antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno, y benzo[k]fluoranteno. Algunas interferencias poco importantes se separaron fácilmente de los picos de interés en el cromatograma.

Con el procedimiento optimizado que utiliza EMR-Lipid se consiguieron una exactitud y precisión excelentes para niveles de marcado de 25, 100, y 500 ng/g. La Figura 3 muestra que la exactitud estuvo comprendida entre el 84 y el 115% para todos los analitos en todas las concentraciones usando la corrección de patrón interno marcado isotópicamente, proporcionando valores de DER de 0,5 a 4,4% (Figura 4). En la Figura 5 se han agrupado los datos de exactitud en intervalos de recuperación, que muestran que la mayoría de compuestos están comprendidos entre el 90 y el 120%, y dos compuestos están ligeramente por debajo de 90% (indo[1,2,3-cd]pireno y benzo[g,h,i]perileno).

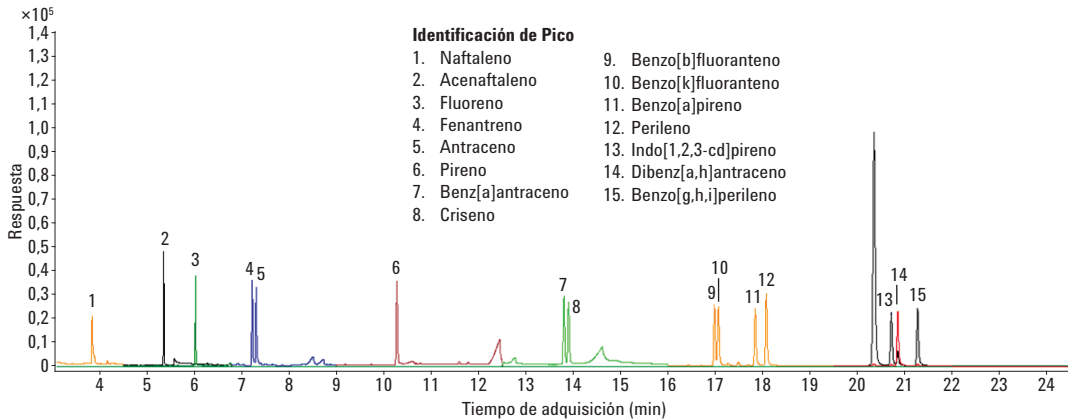


Figura 2. Cromatograma GC/MS con monitorización de ión único (SIM) de quince PAH procedentes de una muestra de salmón previamente marcada con 25 ng/g.

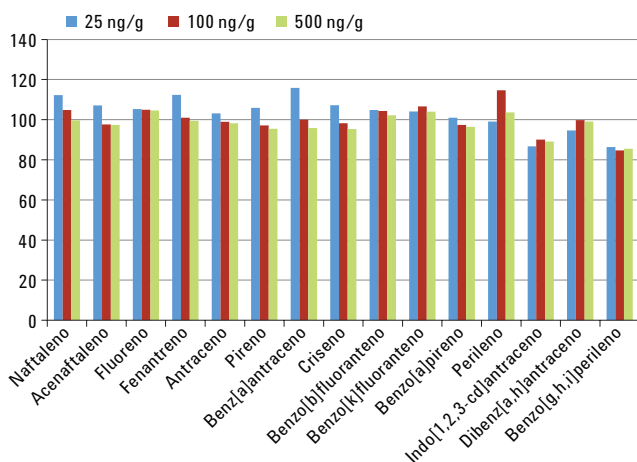


Figura 3. Resultados de exactitud para quince PAH en salmón a niveles de 25 ng/g, 100 ng/g, y 500 ng/g.

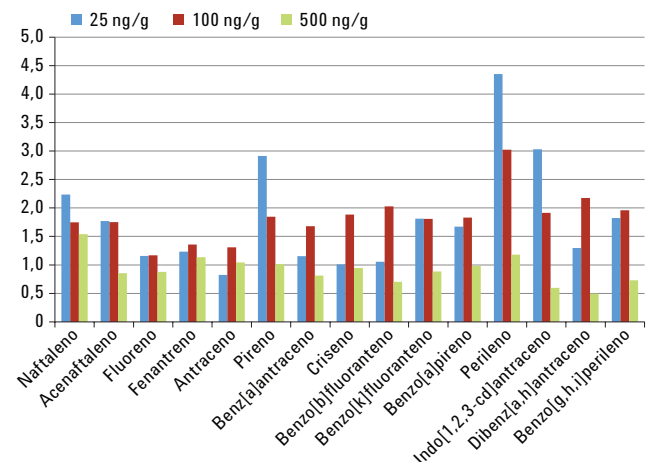


Figura 4. Resultados de precisión para quince PAH en salmón a niveles de 25 ng/g, 100 ng/g, y 500 ng/g.

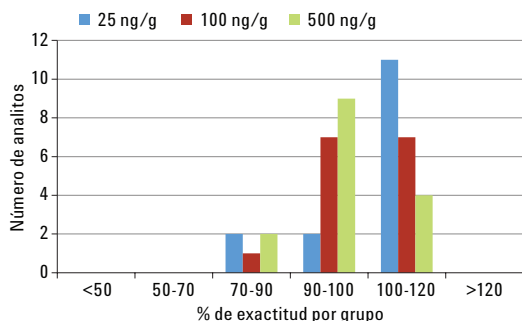


Figura 5. Resultados agrupados por exactitud para quince PAH en salmón a niveles de 25 ng/g, 100 ng/g, y 500 ng/g.

La recuperación absoluta estuvo comprendida entre el 62 y el 98% sin el uso de patrones internos (Tabla 3). Dos compuestos, indol[1,2,3-cd]pireno y benzo[g,h,i]perileno, proporcionaron recuperaciones ligeramente inferiores al 70%. La recuperación absoluta de los PAH disminuye al aumentar el peso molecular debido a la menor solubilidad en ACN. Sin embargo, la mayoría de recuperaciones son altas, y se corrigen fácilmente con los patrones internos. Las recuperaciones absolutas de los patrones internos también son elevadas, como se muestra en la Tabla 4. A pesar de la limitación de la solubilidad en ACN, este método proporciona recuperaciones excelentes y resultados muy reproducibles en la muestra de salmón graso.

Tabla 3. Listado de los PAH usados en este estudio y su exactitud, recuperaciones absolutas y desviaciones estándar relativas (DER) en salmón (n = 6).

Compuesto	Marcado con 25 ng/g			Marcado con 100 ng/g			Marcado con 500 ng/g		
	Exac.	Rec.	DER (%)	Exac.	Rec.	DER (%)	Exac.	Rec.	DER (%)
Naftaleno	112,2	86,7	2,2	104,8	89,7	1,7	99,7	85,8	1,5
Acenaftaleno	107,1	90,1	1,8	97,6	89,9	1,8	97,3	90,6	0,9
Fluoreno	105,3	94,6	1,2	105,0	94,2	1,2	104,6	96,2	0,9
Fenantreno	112,3	95,3	1,2	101,0	94,1	1,4	99,4	94,5	1,1
Antraceno	103,1	91,6	0,8	98,9	90,7	1,3	98,3	92,6	1,0
Pireno	105,8	97,6	2,9	97,1	88,9	1,8	95,4	89,7	1,0
Benz[a]antraceno	115,8	91,2	1,2	100,1	84,7	1,7	95,8	85,7	0,8
Criseno	107,2	83,6	1,0	98,2	83,2	1,9	95,4	85,4	0,9
Benzo[b]fluoranteno	104,8	78,3	1,1	104,3	76,1	2,0	102,2	79,2	0,7
Benzo[k]fluoranteno	104,1	78,8	1,8	106,6	77,5	1,8	104,0	80,3	0,9
Benzo[a]pireno	101,0	74,2	1,7	97,4	71,8	1,8	96,4	74,8	1,0
Perileno	99,1	74,4	4,4	114,7	76,4	3,0	103,6	80,3	1,2
Indo[1,2,3-cd]pireno	86,7	66,1	3,0	90,0	66,2	1,9	89,1	69,1	0,6
Dibenz[a,h]antraceno	94,7	73,9	1,3	99,7	72,2	2,2	99,0	76,2	0,5
Benzo[g,h,i]perileno	86,4	64,7	1,8	84,7	62,3	2,0	85,6	66,3	0,7
Media	103,0	82,7	1,8	100,0	81,2	1,8	97,7	83,1	0,9

dSPE con EMR-Lipid

Se seleccionó el salmón como muestra representativa debido a su elevado contenido en grasa, en comparación con otros alimentos marinos. El procedimiento optimizado se diferencia de un protocolo QuEChERS típico de varias formas que agilizan el flujo de trabajo y aprovechan la etapa de limpieza con EMR—Lipid. En primer lugar, el salmón se extrae directamente con ACN sin agua adicional ni las sales de extracción QuEChERS. Después del centrifugado, el sobrenadante está compuesto por ACN y una pequeña cantidad de agua procedente de la muestra. El sobrenadante se transfiere a un tubo EMR—Lipid para eliminación de la matriz mediante dSPE. Finalmente, el sobrenadante dSPE se transfiere a un tubo de pulido que contiene 2,0 g de NaCl/MgSO₄ (1:4) para inducir la separación de fases. La capa superior de acetonitrilo se transfiere a continuación a viales para su análisis.

Tabla 4. Recuperación absoluta y precisión (DER, %) para patrones internos en salmón (n = 6).

Compuesto	Marcado con 100 ng/g	
	Rec.	DER (%)
Naftaleno-d8	87,8	1,0
Acenaftaleno-d10	93,3	0,8
Fenantreno-d10	94,9	0,8
Criseno-d12	87,1	1,0
Perileno-d12	86,4	3,1
Media	89,9	1,3

Como suele ser habitual en los protocolos de extracción mejorada en matriz, esta solución aprovecha la limpieza mejorada con una muestra de mayor tamaño, lo que a su vez mejora la sensibilidad global del método. En los protocolos convencionales de EMR—Lipid se añade agua para activar el material absorbente antes de la dSPE. Para este protocolo optimizado, se observó que el agua adicional disminuía la solubilidad de los PAH y afectaba negativamente a algunas recuperaciones absolutas. En consecuencia, el sobrenadante de la extracción se transfirió directamente al tubo EMR-Lipid sin añadir agua, proporcionando una limpieza adecuada para el análisis GC/MS SIM. La mezcla realizada inmediatamente después de añadir el sobrenadante al EMR-Lipid y a los tubos de pulido EMR-Lipid pone al sólido en suspensión, garantizando de esta forma la máxima interacción con el absorbente, y evita la formación de grumos. Para una eliminación óptima de la matriz, se puede añadir más agua a la dSPE, y la recuperación se puede corregir eficazmente con los patrones internos para proporcionar una exactitud y precisión excelentes.

Conclusiones

Este trabajo muestra un método rápido y sencillo que cuantifica eficazmente concentraciones de PAH altas y bajas en muestras de salmón graso. El flujo de trabajo es tan sencillo como el de QuEChERS, pero utiliza el nuevo absorbente EMR—Lipid para dSPE para minimizar la grasa extraída simultáneamente, maximizar la recuperación, y proporcionar un elevado nivel de precisión.

Aunque el contenido de grasa en matrices como el salmón puede variar ampliamente, y, el sistema Bond Elut con extracción mejorada en matriz de lípidos es un absorbente universal para extracción de grasa que no interactúa con los analitos de interés. La eliminación de grasa se maximiza usando agua adicional con EMR—Lipid durante la etapa de extracción dSPE. Sin embargo, en este caso, una mayor cantidad de agua disminuye la solubilidad de los PAH, lo que no es deseable durante la preparación de la muestra de PAH. En el futuro se continuará trabajando para optimizar el EMR—Lipid para tipos de muestra y aplicaciones que supongan un desafío con el fin de ampliar su valor en los sistemas cromatográficos y de detección actuales y de nueva generación.

Tabla 5. Analitos diana, tiempo de retención, ión diana, y patrones internos designados para el método GC/MS con SIM.

Compuesto	GC/MS (SIM)			Patrón interno
	TR	Ión diana	Permanencia (ms)	
Naftaleno	3,89	128,0	20	Naftaleno-d8
Acenaftaleno	5,37	152,0	20	Acenaftaleno-d10
Fluoreno	6,05	166,0	20	Acenaftaleno-d10
Fenantreno	7,25	178,0	20	Fenantreno-d10
Antraceno	7,34	178,0	20	Fenantreno-d10
Pireno	10,31	202,0	20	Fenantreno-d10
Benz[a]antraceno	13,83	228,0	20	Criseno-d12
Criseno	13,93	228,0	20	Criseno-d12
Benzo[b]fluoranteno	16,99	252,0	20	Perileno-d12
Benzo[k]fluoranteno	17,08	252,0	20	Perileno-d12
Benzo[a]pireno	17,85	252,0	20	Perileno-d12
Perileno	18,09	252,0	20	Perileno-d12
Indo[1,2,3-cd]pireno	20,72	276,0	20	Perileno-d12
Dibenz[a,h]antraceno	20,87	278,0	20	Perileno-d12
Benzo[g,h,i]perileno	21,29	276,0	20	Perileno-d12
Patrones internos				
Naftaleno-d8	3,87	136,0	20	—
Acenaftaleno-d10	5,52	162,0	20	—
Fenantreno-d10	7,22	188,0	20	—
Criseno-d12	13,86	240,0	20	—
Perileno-d12	18,03	264,0	20	—

Referencias

1. Anon. *Compendium Method T0-13A*. Agencia de Protección Ambiental (EPA) de los Estados Unidos de América, Cincinnati, OH, EE.UU., **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*; Nota de aplicación, Agilent Technologies, Inc. Número de publicación 5990-6668EN, **2012**.
14. Sapozhnikova, Y.; Lehotay, S. J. *Analytica Chimica Acta* **2013**, *758*, 80–92.

Más información

Estos datos representan resultados típicos. Si desea obtener más información sobre nuestros productos y servicios, visite nuestra página web www.agilent.com/chem.

www.agilent.com/chem

Agilent no se hace responsable de ningún error incluido en este documento ni de ningún daño incidental o consecuencial relacionado con la distribución, la aplicación o el uso de este material.

La información, las descripciones y las especificaciones de esta publicación están sujetas a modificación sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2015
Impreso en EE. UU.
30 de julio de 2015
5991-6088ES



Agilent Technologies