

Analyse de HAP dans le saumon avec élimination améliorée de la matrice

Note d'application

Analyse alimentaire et agriculture, environnement

Auteurs

Derick Lucas and Limian Zhao
Agilent Technologies, Inc.

Extrait

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont composés de cycles benzéniques fusionnés résistants à la dégradation. Ils peuvent se retrouver dans les espèces aquatiques en raison de l'accumulation dans l'environnement et par les méthodes de cuisson utilisant de la fumée. L'analyse des HAP dans des matrices complexes, à forte teneur en lipides, constitue un défi à cause des interférences provenant de la matrice qui sont co-extraites et qui nuisent à la quantification, mais également à cause des effets-matrices et de l'encrassement du système analytique. Agilent Bond Elut QuEChERS 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. L'étude présentée ci-après démontre l'efficacité de cette méthodologie de préparation d'échantillons pour l'analyse des HAP dans le saumon. La méthode est d'une grande exactitude (84 à 115 %) et d'une grande précision (RSD = 0,5 à 4,4 %) pour les 15 composés HAP à toutes les concentrations, et permet ainsi l'analyse rapide, rigoureuse et efficace d'échantillons à haute teneur en lipides.

Introduction

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des contaminants omniprésents dans l'environnement et sont généralement d'origine pétrogénique ou pyrogénique. Ils sont composés d'hydrogène et de carbone disposés en deux ou plus de cycles benzéniques fusionnés, et peuvent avoir des groupes substitués sur un ou plusieurs cycles [1]. Les préoccupations associées aux HAP viennent de leur persistance dans l'environnement et des effets toxiques, mutagènes et cancérigènes connus de certains d'entre eux sur les mammifères [2]. La contamination des produits de la mer peut survenir à la suite de l'accumulation de constituants du pétrole dans les eaux ou provenir de méthodes de cuisson introduisant des HAP en tant que sous-produits de combustion présents dans la fumée. [3,4]. C'est pourquoi il est essentiel que les analystes aient à leur disposition des méthodes rigoureuses et efficaces pour détecter la contamination par des HAP aux concentrations qui posent problème.



Agilent Technologies

La détection de HAP à faible concentration peut s'effectuer par GC/MS associée à une méthode de préparation d'échantillons rigoureuse et efficace. Les protocoles de préparation courants comprennent l'extraction Soxhlet [5], l'extraction assistée par ultrasons [6] et l'extraction par un solvant pressurisé [7]. La préparation peut être couplée à des traitements de l'échantillon tels que l'extraction en phase solide [8] ou la chromatographie par perméation sur gel [9]. Afin de s'affranchir de ces techniques qui exigent beaucoup de temps et de travail, des protocoles de type QuEChERS (Quick, Easy, Effective, Rugged and Safe) [10,11] ont également été mis en œuvre avec succès [12,13,14]. La préparation d'échantillons est de plus en plus importante pour les échantillons alimentaires complexes, et notamment ceux à haute teneur en lipides car la matrice co-extraite a des effets néfastes sur l'analyse en introduisant des interférences, et en provoquant des effets-matrice et une pollution du système analytique.

Agilent Bond Elut QuEChERS EMR — Lipid est un nouvel adsorbant qui élimine sélectivement les principales classes de lipides des échantillons sans perte des composés d'intérêt. L'élimination de différentes espèces de lipides est particulièrement importante pour les techniques comme QuEChERS, qui co-extraient de grandes quantités de matrice avec les analytes cibles. Traditionnellement, des adsorbants à base de C18 et PSA sont utilisés pour la purification des échantillons à haute teneur en lipides lors la phase d'extraction en phase solide dispersive (dSPE). Souvent cependant, ces adsorbants ne permettent pas d'obtenir une purification des échantillons adéquate et peuvent présenter des interactions non-sélectives avec les analytes. Le présent travail constitue une investigation de la préparation d'échantillons et de l'analyse de 15 HAP dans le saumon à l'aide d'une suite d'étapes simples et efficaces, permettant d'obtenir un niveau de propreté adéquat grâce à EMR — Lipid ainsi qu'une exactitude et une reproductibilité excellentes en GC/MS.

Données expérimentales

L'analyse est effectuée sur des instruments Agilent 7890 GC et Agilent 5977 MSD équipés d'injecteurs multimodes (MMI), avec injecteur automatique d'échantillons liquides Agilent 7693, et une technologie de flux capillaire pour le backflush de la colonne. Le tableau 1 montre les paramètres de l'instrument et le tableau 2 montre les consommables et les autres pièces d'équipement utilisées pour ce travail.

Tableau 1 : Conditions appliquées au système Agilent GC/MS utilisé pour l'analyse des HAP.

GC :	Agilent 7890B
Passeur automatique d'échantillons :	Passeur automatique d'échantillons liquides Agilent 7693, seringue de 10,0 µl (G4513-80220)
Volume d'injection :	0,5 µL
Gaz vecteur :	Hélium, débit constant
Filtre à gaz :	Filtre Gas Clean pour GC/MS, 1/8 pouce (réf. CP17974)
Injecteur :	MMI, mode d'injection à chaud sans division, 320 °C
Débit de purge vers la fuite :	50 mL/min à 0,75 min
Débit :	2,0 mL/min
Programme du four :	70 °C pendant 1 min, puis 25 °C/min jusqu'à 195 °C avec un palier de 1,5 min, puis 7 °C/min jusqu'à 315 °C
Colonne :	Agilent J&W DB-5ms UI, 20 m × 0,18 mm, 0,18 µm (réf. 121-5522UI)
Restriction :	Tube en silice désactivée, 0,65 m × 0,15 mm (réf. 160-7625-5)
Backflush après analyse :	5 min à 315 °C, 70 psi pendant le backflush
Pression aux. :	2 psi pendant l'analyse, 70 psi pendant le backflush
MSD :	MSD Agilent 5977
Mode :	SIM
Température de la ligne de transfert :	340 °C
Température de la source :	325 °C
Température du quad :	150 °C
Délai du solvant :	3,5 min

Tableau 2 : Autres consommables et équipements

Flacons :	En verre ambré, à visser (réf. 5190-7041)
Capsules pour flacons :	Capsule à visser avec septum PTFE/silicone, 9 mm (réf. 5182-0717)
Inserts de flacons :	Verre, 150 µL, avec pieds en polymère (réf. 5183-2088)
Septum :	Longue vie, non-collant, 11 mm, 50/pk (réf. 5183-4761)
Ferrules :	Vespel:graphite, 85:15, 0,4 mm id (réf. 5181-3323), ferrules en métal souple UltiMetal Plus (réf. G3188-27501)
Insert d'injection :	Simple rétreint, sans diviseur, Ultra Inert (réf. 5190-7041)
Technologie de flux capillaire (CFT)	Union Ultimate Ultimetal Plus (réf. G3186-60580), raccord capillaire CFT (réf. G2855-20530)
dSPE Bond Elut EMR — Lipid :	1 g dans un tube de 15 mL (réf. 5982-1010)
Bond Elut Final Polish pour la solution :	2 g dans un tube de 15 mL (réf. 5982-0101)

Broyeur Geno/Grinder, Metuchen, NJ, USA

Centrifugeuse Centra CL3R, Thermo IEC, MA, USA

Microcentrifugeuse Eppendorf, Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA

Agitateur vortex et agitateurs vortex multitubes, VWR, Radnor, PA, USA

Distributeur pour flacon, VWR, So. Plainfield, NJ, USA

Pipettes Eppendorf

Préparation d'échantillons

Le saumon homogénéisé et pesé (5 g) est introduit dans des tubes à centrifugeuse de 50 mL puis dopé selon les besoins avec des étalons et des étalons internes deutérés. Après ajout d'acétonitrile (ACN) (10 mL), l'échantillon est mélangé sur vortex pendant deux minutes. Les tubes sont centrifugés à 5 000 rpm pendant cinq minutes. Le surnageant (8 mL) est transféré dans un tube à centrifugeuse de 15 mL contenant 1 g d'adsorbant EMR — Lipid, agité au vortex immédiatement pour disperser la phase solide, puis pendant 60 secondes supplémentaires sur un plateau d'agitation. La suspension est ensuite centrifugée à 5 000 rpm pendant trois minutes. Tout le surnageant est transféré dans un tube de finition de 15 mL contenant 2,0 g de sels (1:4 NaCl:MgSO₄), agité immédiatement sur vortex pour disperser la phase solide, puis centrifugé à 5 000 rpm pendant trois minutes. La couche supérieure d'ACN est transférée dans des flacons d'échantillons pour l'analyse GC/MS (Figure 1).

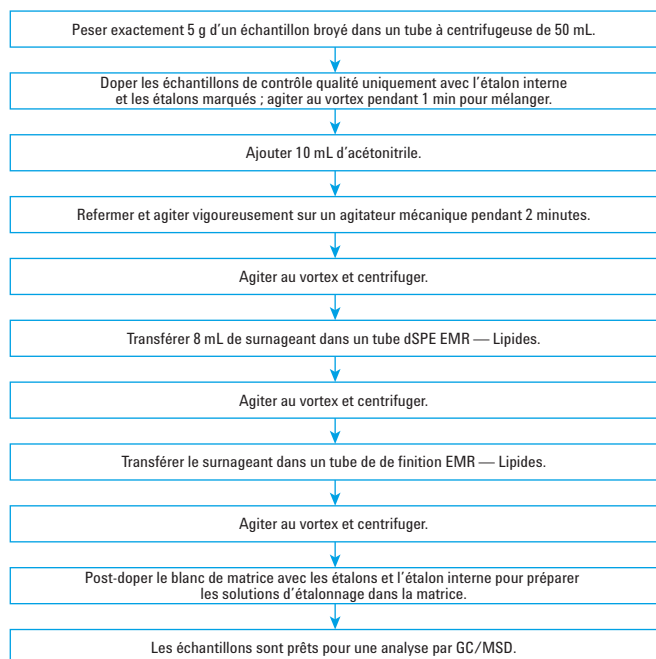


Figure 1 : Déroulement de la préparation d'échantillons pour l'analyse de HAP dans le saumon par Agilent Bond Elut EMR — Lipid avant l'analyse par GC/MS.

Réactifs et composés chimiques

Tous les réactifs et les solvants sont de grade HPLC ou supérieur. L'ACN provient de Honeywell (Muskegon, MI, USA) et l'eau est purifiée à l'aide d'un système intégral EMD Millipore Milli-Q (Darmstadt, Allemagne). Les étalons de HAP et les étalons internes sont achetés auprès d'Ultra-Scientific sous forme de solutions (North Kingstown, RI, USA). Des solutions mères de 100 µg/mL sont préparées dans de l'acétone, puis diluées dans des flacons ambrés pour obtenir les solutions de travail.

Courbes d'étalonnage et quantification

Des courbes d'étalonnage dans la matrice sont obtenues pour une plage d'étalonnage correspondant à 1, 10, 25, 50, 100, 250, 500 et 1 000 ng/g. Des blancs de préparation d'échantillon sont préparés en suivant le protocole d'extraction complet, à partir de saumon exempt des composés d'intérêt. Ensuite, 950 µL de blanc, 25 µL de solution de travail d'étalons et 25 µL de solution mère d'étalons internes sont mélangés pour constituer les standards de calibration dans la matrice. Les étalons internes sont ajoutés aux échantillons de saumon à tester *avant* la préparation d'échantillon et aux solutions de calibration *après* la préparation, à hauteur de 100ng/g. Toutes les courbes d'étalonnage présentent une linéarité exceptionnelle, avec $R^2 > 0,999$ pour tous les composés. Les échantillons de saumon à tester sont dopés à des concentrations de 25, 100 et 500 ng/g avant l'extraction en six répliqués. Le logiciel Agilent MassHunter est utilisé pour quantifier les analytes cibles. Les valeurs d'exactitude sont mesurées en calculant la réponse des échantillons dopés par rapport aux étalons internes. Les valeurs de rendement absolu sont obtenues en mesurant la réponse des analytes pré-dopés par rapport à la courbe d'étalonnage sans correction par rapport étalons internes.

Résultats et discussion

Les instruments 7890 GC et 5977 GC/MSD montrent une excellente performance pour les 15 HAP et cinq étalons internes, en donnant des résultats homogènes et une très bonne sensibilité. La figure 2 montre la séparation obtenue pour les 15 HAP sur une colonne Agilent DB-5ms UI avec un pré-dopage de 25 ng/g dans un échantillon de saumon. Le chromatogramme montre une séparation avec un retour à la ligne de base pour les 15 HAP, ce qui est essentiel pour l'intégration exacte des paires d'isomères de HAP telles que phénanthrène/anthracène, benz[a]anthracène/chrysène, benzo[b]fluoranthène/benzo[k]fluoranthène. Les interférences mineures dans le chromatogramme sont facilement séparées des pics étudiés.

Une exactitude et une précision excellentes sont obtenues à des concentrations de dopage de 25, 100 et 500 ng/g en utilisant la procédure optimisée avec EMR-Lipide. La figure 3 montre que l'exactitude se situe entre 84 et 115 % pour tous les analytes à toutes les concentrations en utilisant la correction avec les étalons internes deutérés, ce qui donne une RSD de 0,5 à 4,4 % (Figure 4). Les données d'exactitude sont groupées par plage dans la figure 5 et montrent que la plupart des composés donnent des valeurs entre 90 et 120 %, avec deux composés légèrement en dessous de 90 % (indo[1,2,3-cd]pyrène et benzo[g,h,i]pérylène).

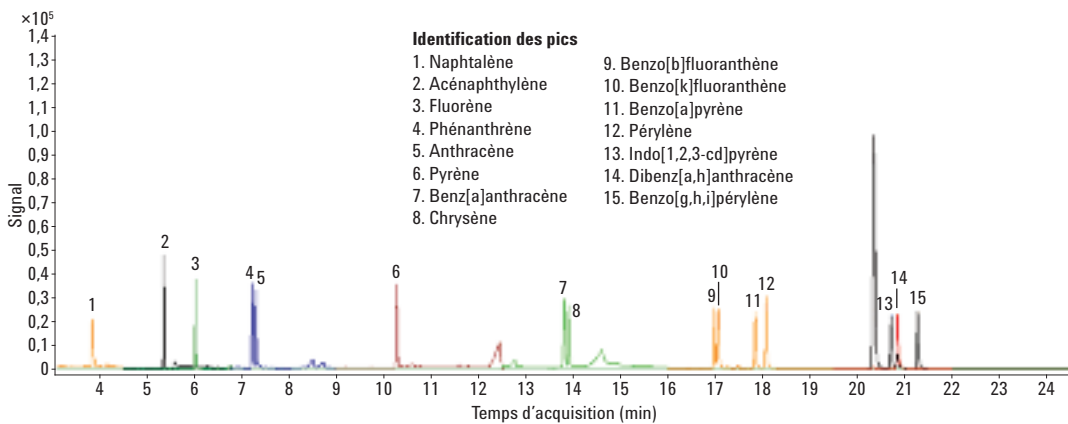


Figure 2 : Chromatogramme de GC/MS SIM de 15 HAP après pré-dopage de 25 ng/g dans du saumon.

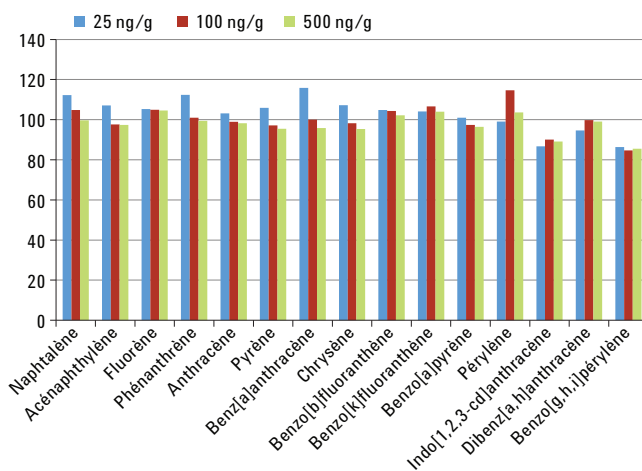


Figure 3 : Résultats d'exactitude pour 15 HAP dans du saumon à des concentrations de 25 ng/g, 100 ng/g et 500 ng/g.

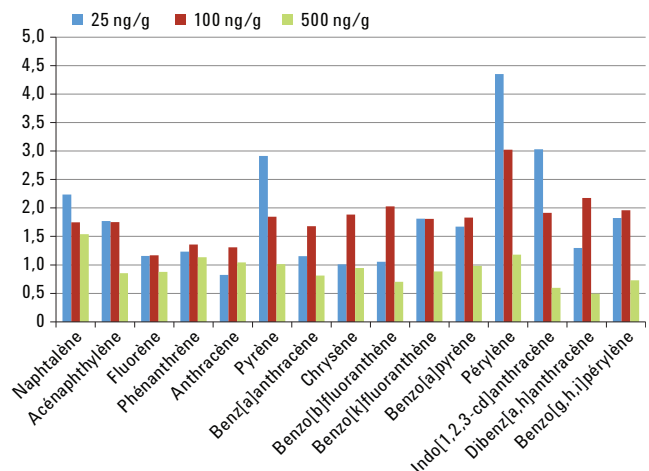


Figure 4 : Résultats de précision pour 15 HAP dans du saumon à des concentrations de 25 ng/g, 100 ng/g et 500 ng/g.

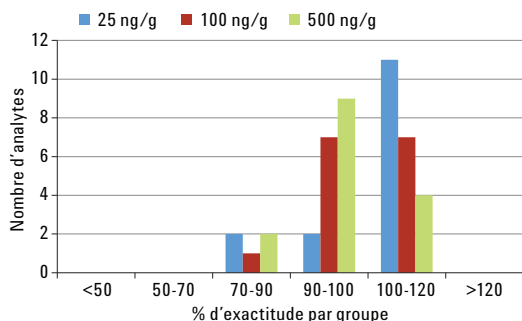


Figure 5 : Résultats d'exactitude groupés pour les HAP dans du saumon à des concentrations de 25 ng/g, 100 ng/g et 500 ng/g.

Le rendement absolu est de 62 à 98 % sans utilisation d'étalons internes (Tableau 3). Deux composés, l'indo[1,2,3-cd]pyrène et le benzo[g,h,i]pérylène, donnent des rendements légèrement inférieurs à 70 %. Les rendements absolus pour les HAP diminuent avec l'augmentation de la masse moléculaire en raison de la baisse de solubilité dans l'ACN. Cependant, la plupart des rendements sont élevés et facilement corrigés à l'aide des étalons internes. Les rendements absolus des étalons internes sont également élevés, comme le montre le tableau 4. Malgré la limitation de solubilité dans l'ACN, cette méthode donne d'excellents rendements et des résultats extrêmement reproductibles pour les échantillons de saumon à haute teneur en lipides.

Tableau 3 : Liste des HAP utilisés dans cette étude avec l'exactitude, le rendement absolu et la déviation standard relative (RSD) dans du saumon (n = 6).

Composé	Dopage de 25 ng/g			Dopage de 100 ng/g			Dopage de 500 ng/g		
	Exact.	Rdt.	% RSD	Exact.	Rdt.	% RSD	Exact.	Rdt.	% RSD
Naphtalène	112,2	86,7	2,2	104,8	89,7	1,7	99,7	85,8	1,5
Acénaphthylène	107,1	90,1	1,8	97,6	89,9	1,8	97,3	90,6	0,9
Fluorène	105,3	94,6	1,2	105,0	94,2	1,2	104,6	96,2	0,9
Phénanthrène	112,3	95,3	1,2	101,0	94,1	1,4	99,4	94,5	1,1
Anthracène	103,1	91,6	0,8	98,9	90,7	1,3	98,3	92,6	1,0
Pyrène	105,8	97,6	2,9	97,1	88,9	1,8	95,4	89,7	1,0
Benz[a]anthracène	115,8	91,2	1,2	100,1	84,7	1,7	95,8	85,7	0,8
Chrysène	107,2	83,6	1,0	98,2	83,2	1,9	95,4	85,4	0,9
Benzo[b]fluoranthène	104,8	78,3	1,1	104,3	76,1	2,0	102,2	79,2	0,7
Benzo[k]fluoranthène	104,1	78,8	1,8	106,6	77,5	1,8	104,0	80,3	0,9
Benzo[a]pyrène	101,0	74,2	1,7	97,4	71,8	1,8	96,4	74,8	1,0
Pérylène	99,1	74,4	4,4	114,7	76,4	3,0	103,6	80,3	1,2
Indo[1,2,3-cd]pyrène	86,7	66,1	3,0	90,0	66,2	1,9	89,1	69,1	0,6
Dibenz[a,h]anthracène	94,7	73,9	1,3	99,7	72,2	2,2	99,0	76,2	0,5
Benzo[g,h,i]pérylène	86,4	64,7	1,8	84,7	62,3	2,0	85,6	66,3	0,7
Moyenne	103,0	82,7	1,8	100,0	81,2	1,8	97,7	83,1	0,9

dSPE EMR — Lipid

Le saumon est choisi comme échantillon représentatif en raison de sa haute teneur en lipides par rapport aux autres produits de la mer. La procédure optimisée s'écarte d'un protocole QuEChERS type en plusieurs points, ce qui rationalise le déroulement des opérations et tire parti de l'étape de purification par dSPE EMR — Lipid. Tout d'abord, le saumon est extrait directement avec de l'ACN sans addition d'eau ou de sels d'extraction QuEChERS. Après centrifugation, le surnageant comporte de l'ACN et une petite quantité d'eau provenant de l'échantillon. Le surnageant est transféré dans le tube d'EMR — Lipid pour l'élimination de la matrice par dSPE. Enfin, le surnageant de dSPE est transféré dans un tube de finition contenant 2,0 g de NaCl/MgSO₄ (1:4) pour obtenir la séparation des phases. La couche supérieure d'ACN est alors transférée dans des flacons pour analyse.

Tableau 4 : Recouvrement absolu et précision (% RSD) pour les étalons internes dans du saumon (n = 6).

Composé	Dopage de 100 ng/g	
	Rec.	% RSD
Naphtalène-d8	87,8	1,0
Acénaphthylène-d10	93,3	0,8
Phénanthrène-d10	94,9	0,8
Chrysène-d12	87,1	1,0
Pérylène-d12	86,4	3,1
Moyenne	89,9	1,3

Comme on retrouve typiquement avec les protocoles d'élimination améliorée de la matrice, cette approche tire profit d'une meilleure purification permettant ainsi d'utiliser un échantillon de plus grande taille, ce qui augmente la sensibilité globale de la méthode. Dans les protocoles conventionnels d'EMR — Lipid, de l'eau est ajoutée au tube de dSPE afin d'activer l'adsorbant. Pour le présent protocole optimisé, il s'avère que l'addition d'eau diminue la solubilité des HAP et affecte négativement certains rendements absolus. Par conséquent, le surnageant d'extraction est transféré directement vers un tube EMR-Lipides sans ajouter d'eau, ce qui permet une purification adéquate pour l'analyse par GC/MS SIM. Le mélange immédiat après ajout du surnageant aux tubes de dSPE et de finition met les solides en suspension pour assurer une interaction maximale avec l'adsorbant et éviter la formation d'agrégats. Pour une élimination optimale de la matrice, on peut ajouter de l'eau à la dSPE, et les rendements peuvent être efficacement corrigés avec les étalons internes afin d'avoir une exactitude et une précision excellentes.

Conclusions

Ce travail présente une méthode rapide et facile permettant de mesurer efficacement des concentrations faibles ou élevées de HAP dans des échantillons de saumon à haute teneur en lipides. Le protocole est aussi facile qu'avec QuEChERS mais met en œuvre le nouvel adsorbant dSPE EMR — Lipid pour minimiser l'extraction des lipides, optimiser le rendement et offrir un haut degré de précision.

Bien que la teneur en lipides dans des matrices telles que le saumon varie de manière importante, Agilent Bond Elut EMR — Lipid est un adsorbant polyvalent pour l'élimination des lipides, qui n'interagit pas avec les analytes étudiés. L'élimination des lipides est optimisée en ajoutant de l'eau au tube EMR — Lipid à l'étape de dSPE. Cependant, dans le cas présent, l'eau ajoutée diminue la solubilité des HAP et par conséquent n'est pas souhaitable dans ce cas. Les études à venir continueront à optimiser EMR — Lipid pour les types d'échantillons et les applications difficiles afin d'élargir son utilité sur les systèmes de chromatographie et de détection actuels et de futures générations.

Tableau 5 : Analytes cibles, temps de rétention, ion ciblé et désignations des étalons internes pour la méthode GC/MS SIM.

Composé	GC/MS (SIM)			Étalon interne
	TR	Ion ciblé	Dwell (ms)	
Naphtalène	3,89	128,0	20	Naphtalène-d8
Acénaphthylène	5,37	152,0	20	Acénaphthylène-d10
Fluorène	6,05	166,0	20	Acénaphthylène-d10
Phénanthrène	7,25	178,0	20	Phénanthrène-d10
Anthracène	7,34	178,0	20	Phénanthrène-d10
Pyrène	10,31	202,0	20	Phénanthrène-d10
Benz[a]anthracène	13,83	228,0	20	Chrysène-d12
Chrysène	13,93	228,0	20	Chrysène-d12
Benzo[b]fluoranthène	16,99	252,0	20	Pérylène-d12
Benzo[k]fluoranthène	17,08	252,0	20	Pérylène-d12
Benzo[a]pyrène	17,85	252,0	20	Pérylène-d12
Pérylène	18,09	252,0	20	Pérylène-d12
Indo[1,2,3-cd]pyrène	20,72	276,0	20	Pérylène-d12
Dibenz[a,h]anthracène	20,87	278,0	20	Pérylène-d12
Benzo[g,h,i]pérylène	21,29	276,0	20	Pérylène-d12
Étalons internes				
Naphtalène-d8	3,87	136,0	20	—
Acénaphthylène-d10	5,52	162,0	20	—
Phénanthrène-d10	7,22	188,0	20	—
Chrysène-d12	13,86	240,0	20	—
Pérylène-d12	18,03	264,0	20	—

Références

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.

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.

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, le 30 juillet 2015
5991-6088FR



Agilent Technologies