

Анализ содержания полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) в рыбе методом ГХ-МС при подготовке образцов по методу QuEChERS с использованием набора реактивов Agilent Bond Elut для дисперсионной твердофазной экстракции и высокоэффективной ГХ-колонок DB-5ms Ultra Inert

Методическая информация

Контроль пищевых продуктов и нефтехимическая промышленность

Авторы

Дрис Смит (Doris Smith)
и Кен Линам (Ken Lynam)
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19809-1610
USA (США)

Резюме

В данном документе подробно описан быстрый и эффективный аналитический метод, позволяющий определять низкие и следовые количества полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) в рыбе. Он может служить альтернативой более сложным методикам, требующим больше времени. Упрощенный метод QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe, то есть быстрый, простой, бюджетный, эффективный, надежный и безопасный) с дисперсионной твердофазной экстракцией (дТФЭ) обеспечивает достаточную очистку матрицы, сохраняя при этом возможность обнаружения малых количеств определяемого вещества. На выходе из капиллярной колонки был установлен обдуваемый соединительный элемент, обеспечивающий обратную продувку для уменьшения остаточного взаимного загрязнения проб и сокращения продолжительности цикла анализа.

Колонка Agilent J&W DB-5ms Ultra Inert (UI) 20 м × 0,18 мм, 0,18 мкм обеспечила эффективное разделение 16 целевых ПАУ. Метод ГХ-МС, основанный на регистрации индивидуальных ионов (SIM), был откалиброван при значениях концентрации ПАУ 10, 25, 50, 100, 250, 500 и 1000 нг/мл, что позволило получить отличную линейность и воспроизводимость. Для определения степени извлечения использовались пробы с концентрацией 25, 250 и 500 нг/мл. Степень извлечения (выход) составила от 80% до 139% при относительном стандартном отклонении (СОС) менее 6%.



Agilent Technologies

Введение

Разливы нефти приводят к сильным загрязнениям сырой нефтью, в которой содержится множество химических соединений, к которым относятся и полициклические ароматические углеводороды (ПАУ). ПАУ представляют собой широкий класс веществ, свойства которых хорошо изучены, загрязнение этими углеводородами вызывает всемирную озабоченность из-за попадания их в продукты питания и экологических ущербов. ПАУ обладают известной токсичностью и в некоторых случаях считаются канцерогенными. Эти вещества устойчивы в окружающей среде и накапливаются в жировой ткани рыб на протяжении всей пищевой цепи [3]. К счастью для специалистов, на данный момент накоплен большой опыт влияния разливов нефти на морских обитателей и окружающую среду. Эти данные могут пригодиться для исследования последствий разливов, которые могут возникнуть в будущем.

Когда происходит большой разлив нефти, контролирующие органы стремятся минимизировать риск воздействия на человека, ограничить область разлива и устранить его источник, а также по возможности защитить окружающую среду. Национальное управление по исследованию океанов и атмосферы (NOAA) США совместно с Администрацией по контролю за продуктами питания и лекарствами (FDA) и другими федеральными и государственными органами приняли правила закрытия и повторного открытия рыболовного промысла в подверженных отрицательному влиянию областях. Как часть процесса повторного открытия промысла NOAA и FDA установили в качестве обязательного требования процедуры проверки включающие анализ на содержание ПАУ. Были определены уровни риска для восьми целевых ПАУ и их алкилированных гомологов у промысловых рыб, устриц, креветок и крабов. Заданные уровни варьируются от высокого в 233 млн д. антрацена/фенантрена для креветок и крабов до низкого в 0,03 млн д. бензо[а]пирена для промысловых рыб [5].

Анализ этих уровней может быть проведен с использованием метода капиллярной ГХ-МС. Разделение антрацена и фенантрена может быть достигнуто в рутинном анализе при использовании колонки Agilent J&W DB-5ms в соответствующих условиях. Использование в этом случае колонки Ultra Inert обеспечивает меньшее взаимодействие между колонкой и матрицей проб.

Исторически пробоподготовка для метода NOAA была очень трудоемкой и включала две последовательные стадии препаративной хроматографии. В данном документе в качестве метода скрининга ПАУ предлагается использовать метод QuEChERS (быстрый, простой, бюджетный, эффективный, надежный и безопасный). Обычно пробоподготовка по методу NOAA занимает 12–14 часов на одну пробу. При использовании метода QuEChERS за одну восьмичасовую смену можно подготовить до 60 проб [6]. Экономия времени при пробоподготовке методом QuEChERS очень велика и позволяет повысить производительность лаборатории при скрининге ПАУ в морепродуктах.

Колонка DB-5ms широко используется для определения ПАУ Агентством по охране окружающей среды США (US-EPA) и обеспечивает подходящее разрешение для шестнадцати целевых ПАУ, исследуемых с использованием данного метода. Для данной методики была выбрана высокоэффективная колонка DB-5ms Ultra Inert, за ее преимущества при анализе следовых количеств в матрицах проб сложного состава при сохранении селективности [7]. Колонка с внутренним диаметром 0,18 мм или высокоэффективная колонка для газовой хроматографии также может обеспечить более быстрый анализ проб, чем обычно используемая для ГХ-МС колонка с внутренним диаметром 0,25 мм [8–9].

Используемая система ГХ-МС также была оснащена обратной продувкой. Эта функция помогает сократить цикл работы прибора путем обратной продувки более тяжелых компонентов через клапан очистки испарителя. Данная методика помогает избежать длительного кондиционирования между вводами проб. Обратная продувка имеет дополнительное преимущество – увеличение временных интервалов между периодами очистки источника, что дает возможность эффективно очищать систему от компонентов проб, оказывающих неблагоприятный эффект [10–11].

Экспериментальная часть

Для данной серии экспериментов использовался газовый хроматограф Agilent 7890 и система ГХ-МС Agilent 5975B, оборудованная многорежимным испарителем (MMI) и автоматической системой ввода пробы Agilent 7693. На выходе из капиллярной колонки был установлен обдуваемый соединительный элемент, обеспечивающий обратную продувку для уменьшения остаточного взаимного загрязнения проб и сокращения продолжительности цикла анализа. В таблице 1 приведены хроматографические условия выполнения анализов. В таблице 2 приведены расходные материалы, используемые в ходе проведения эксперимента.

Таблица 1. Хроматографические условия

ГХ-МСД	система ГХ Agilent 7890/ГХ-МС Agilent 5975B
Пробоотборник	автоматическая система ввода пробы Agilent 7693, шприц 5,0 мкл (каталожный номер 5181-1273)
Обдуваемый соединительный элемент	Purged Ultimate Union (каталожный номер G3186-60580)
Газ-носитель	гелий, постоянный поток 1,7 мл/мин
Рестриктор	деактивированная кварцевая трубка 0,7 м × 0,15 мм
Блок управления пневматикой 1	постоянное давление 3,8 psi
Многорежимный испаритель	0,5 мл, без разделения потока; 320 °С, продувочный поток 50 мл/мин в течение 0,8 мин газосберегающий режим 30 мл/мин в течение 2 мин
Колонка	Agilent J&W DB-5msUI 20 м × 0,18 мм, 0,18 мкм (каталожный номер 122-5522UI)
Термостат	50 °С (0,4 мин), 25 °С/мин до 195 °С (1,5 мин), 8 °С/мин до 265 °С, 20 °С/мин до 315 °С (1,25 мин)
Обратная продувка по окончании	7 мин при 315 °С, продувочное давление 70 psi, входное давление 2 psi во время обратной продувки
МСД	переходная линия 340 °С, источник 340 °С, квадруполь 150 °С

Таблица 2 *Расходные материалы, используемые в ходе эксперимента*

Флаконы:	Флаконы из темного стекла с верхней резьбой (каталожный номер 5183-2072)
Крышки для флаконов:	Синие навинчивающиеся крышки (каталожный номер 5182-0717)
Вкладыши для флаконов:	100 мл, стекло с полимерным основанием (каталожный номер 5181-8872)
Шприц:	5 мкл (каталожный номер 5181-1273)
Септа:	Усовершенствованная зеленая (каталожный номер 5183-4759)
Лайнеры испарителя:	деактивированный, двойной конусности, спиральный лайнер (каталожный номер G5188-5398)
Обжимные втулки:	короткие, внутренний диаметр 0,4; 85/15 Vespel/графит (каталожный номер 5181-3323)
Фитинг управляемого давлением тройника:	Внутренняя гайка (каталожный номер G2855-20530)
Соединительные муфты обдуваемого элемента:	Соединительные муфты SiTite, внутренний диаметр 0,25 мм (каталожный номер 5188-5361)
20-кратный увеличитель:	20-кратное увеличительное стекло (каталожный номер 430-1020)

Реагенты и растворители

Все реагенты и растворители имели степень чистоты, пригодную для ВЭЖХ, или степень чистоты Ultra Resi. При анализе использовался ацетонитрил (ACN) от Honeywell (Muskegon, MI), а ацетон — от VWR International (West Chester, PA). Использованный 16-компонентный стандартный образец ПАУ был получен от Agilent (каталожный номер 8500-6035).

Растворы и стандарты

Исходный стандартный раствор ПАУ (502 мкг/мл, 16 полициклических ароматических углеводородов) был разбавлен в ацетоне с целью получения растворов для добавления к исследуемым пробам с концентрацией 0,5; 1; 5; 10 и 50 мкг/мл. Для подготовки калибровочных кривых использовалось разведение указанных стандартных растворов в холостом экстракте матрицы в соответствующей пропорции.

Пробоподготовка

Красный золотистый окунь, используемый для получения проб, был приобретен в местной бакалейной лавке. Рыба была разрублена на небольшие кубики и замораживалась при температуре $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение ночи. После этого пробы были тщательно измельчены до получения однородной массы. Для экстракции образцов был выбран метод QuEChERS с последующей очисткой дисперсионной твердофазной экстракцией [5]. На рис. 1 процедура пробоподготовки представлена в виде блок-схемы.

Пробы, содержащие 3,0 грамма рыбы, были взвешены и помещены в центрифужные пробирки. Контрольные пробы содержали необходимое количество стандартного раствора ПАУ для получения контрольных проб с концентрацией 25, 250 и 500 нг/мл. В каждую пробу были добавлены аликвоты 12,0 мл деионизированной воды, и 15 мл ацетонитрила. Для облегчения экстракции к каждой пробе было добавлено по два керамических гомогенизатора (каталожный номер 5982-9313).

Пробы встряхивались в течение 1 минуты. В каждую центрифужную пробирку было добавлено содержимое пакета экстрагирующей соли Agilent Bond Elut QuEChERS (каталожный номер 5982-6555), содержащей 6 г сульфата магния MgSO_4 и 1,5 г хлорида натрия. Закрытые пробирки встряхивали в лабораторной мельнице Geno Grinder с частотой 1500 об/мин в течение 1 минуты. Пробы центрифугировали в центрифуге при 4000 об/мин в течение 5 минут.

Аликвота 8 мл верхнего слоя была перенесена в дисперсионную пробирку для жирных проб Agilent Bond Elut QuEChERS для ТФЭ 15 мл (каталожный номер 5982-5158). Пробирку для дисперсионной твердофазной экстракции встряхивали в течение 1 минуты, а затем центрифугировали при 4000 об/мин в течение 5 минут до завершения экстракции пробы. Жидкость из пробирки дисперсионной твердофазной экстракции переносили во флакон для ГХ и анализировали с помощью ГХ-МС в режиме СИМ согласно хроматографическим условиям, приведенным в таблице 1.

Экстрагированные аликвоты воды и ацетонитрила были подготовлены тем же способом, что и образцы, и использовались в качестве контрольных экстрактов из реактивов.

Процедура экстракции Agilent Bond Elut QuEChERS для ПАУ в рыбе

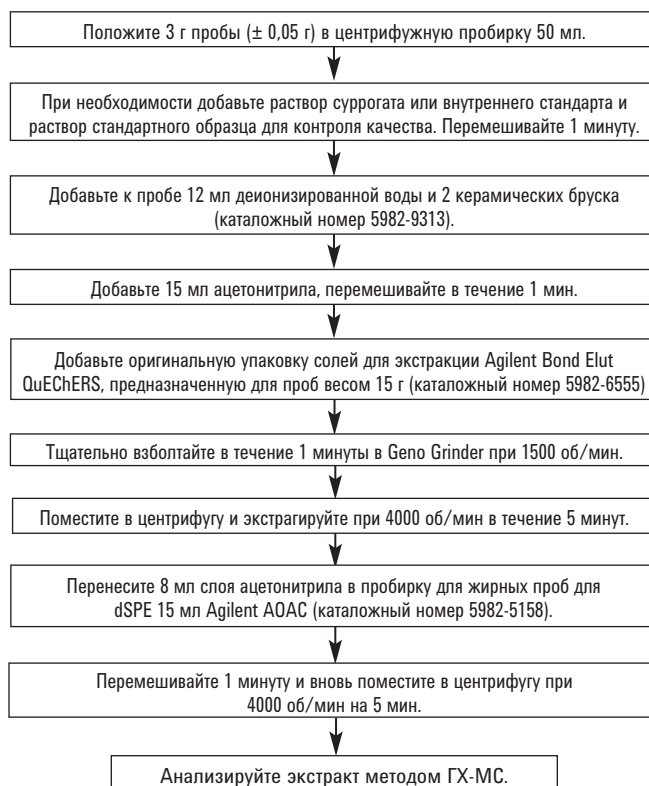


Рис. 1. Блок-схема модифицированной процедуры экстракции Agilent Bond Elut QuEChERS для пробы рыбы.

Обсуждение результатов

Шестнадцать определяемых ПАУ были разделены с помощью аналитической колонки Agilent J&W DB-5msUI 20 м × 0,18 мм, 0,18 мкм менее чем за 20 минут. На рис. 2 представлено разделение стандартного раствора ПАУ 500 нг/мл.

Количественный анализ ГХ-МС целевых ПАУ выполнялся с помощью метода селективного ионного мониторинга (СИМ), который обеспечивает высокую чувствительность до 10 млрд д. для всех аналитов.

В рамках данного исследования высокопроизводительная колонка DB-5msUI продемонстрировала отличную линейность и высокую степень извлечения во всем диапазоне калибровки. Линейность колонки, определяемая значениями R^2 кривой стандартного образца ПАУ, лежала в диапазоне 0,9988–0,9999. Значения для каждого определяемого ПАУ приведены в таблице 3. Как видно из рис. 3, хорошие показатели соотношения «сигнал — шум» были получены даже для калибровочного стандарта с низким содержанием ПАУ. Предел количественного определения для бензо[а]пирена, 10 млрд д., лежит значительно ниже допустимого NOAA и FDA уровня концентрации в 30 млрд д.

Таблица 3. Значения R^2 полученные в данном исследовании для стандартов количественной калибровки ПАУ от 10 нг/мл до 1000 нг/мл

Определяемое вещество	R^2
Нафталин	0,9997
Аценафтилен	0,9999
Аценафталин	0,9999
Флуорен	0,9999
Фенантрен	0,9999
Антрацен	0,9999
Флуорантен	0,9999
Пирен	0,9998
Бензо[а]антрацен	0,9993
Хризен	0,9994
Бензо[б]флуорантен	0,9990
Бензо[к]флуорантен	0,9988
Бензо[а]пирен	0,9992
Индено[1,2,3-с,д]пирен	0,9992
Дибензо[а,h]антрацен	0,9991
Бензо[g,h,i]перилен	0,9995

Разделение 16 ПАУ с помощью колонки Agilent J&W DB-5msUI

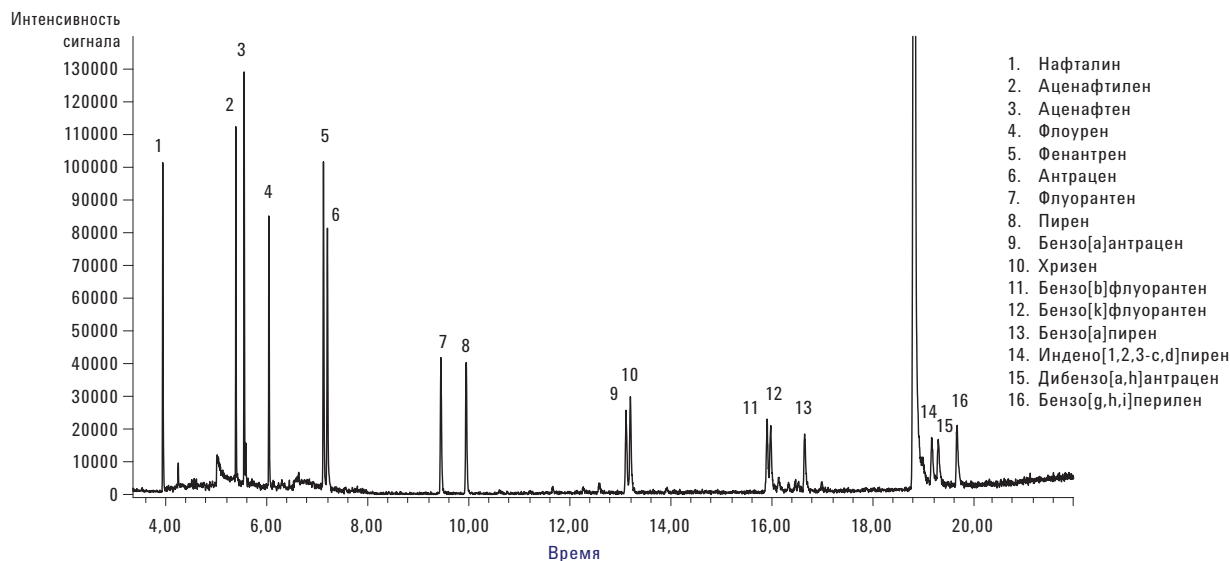


Рис. 2. Хроматограмма ГХ-МС для стандарта ПАУ 500 нг/мл, приготовленного в матрице проб, с анализом с помощью капиллярной ГХ-колонки Agilent J&W DB-5msUI 20 м × 0,18 мм, 0,18 мкм (каталожный номер Agilent 122-5522UI). Условия хроматографического анализа указаны в Таблице 1.

**Хорошее соотношение «сигнал — шум»
при определении следовых количеств**

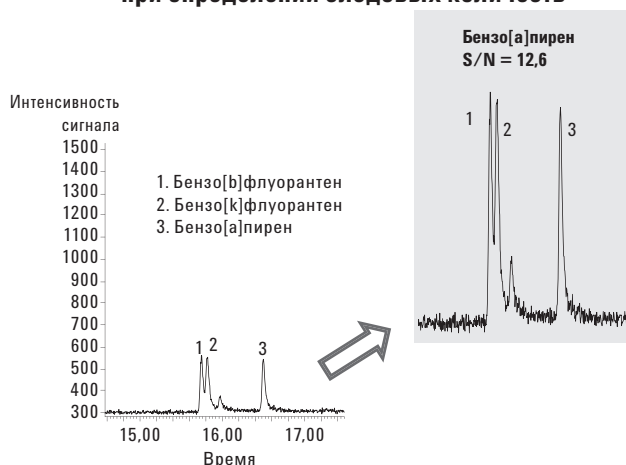


Рис. 3. Увеличенное изображение хроматограммы калибровочного стандарта ПАУ 10 нг/мл для бензо[а]пиренового пика, подготовленного в матрице проб, с анализом в капиллярной колонке Agilent J&W DB-5msUI (каталожный номер 122-5522UI). Условия хроматографического анализа указаны в Таблице 1.

Процесс экстракции с помощью метода QuEChERS, с последующей дисперсионной твердофазной экстракцией, показал свою эффективность в сохранении ПАУ в пробе рыбы с добавкой стандартного образца и очистке матрицы проб для последующего анализа ГХ-МС. На рис. 4 показано разделение экстрагированных ПАУ в пробе рыбы с добавкой стандартного образца, полученное с помощью колонки DB-5ms UI.

Степень извлечения определялась при следующих концентрациях ПАУ: 25, 250 и 500 нг/мл. Значение степени извлечения для каждого определяемого ПАУ приведены в таблице 4. С использованием колонки DB-5ms UI были получены хорошие диапазоны степеней извлечения (от 80% до 139%) и значений ОСО для всех используемых ПАУ.

ГХ-МС (СИМ) хроматограмма холостого экстракта образца красного золотистого окуня в сравнении с меченой пробой после экстракции методом Agilent Bond Elut QuEChERS и последующей дисперсионной твердофазной экстракцией

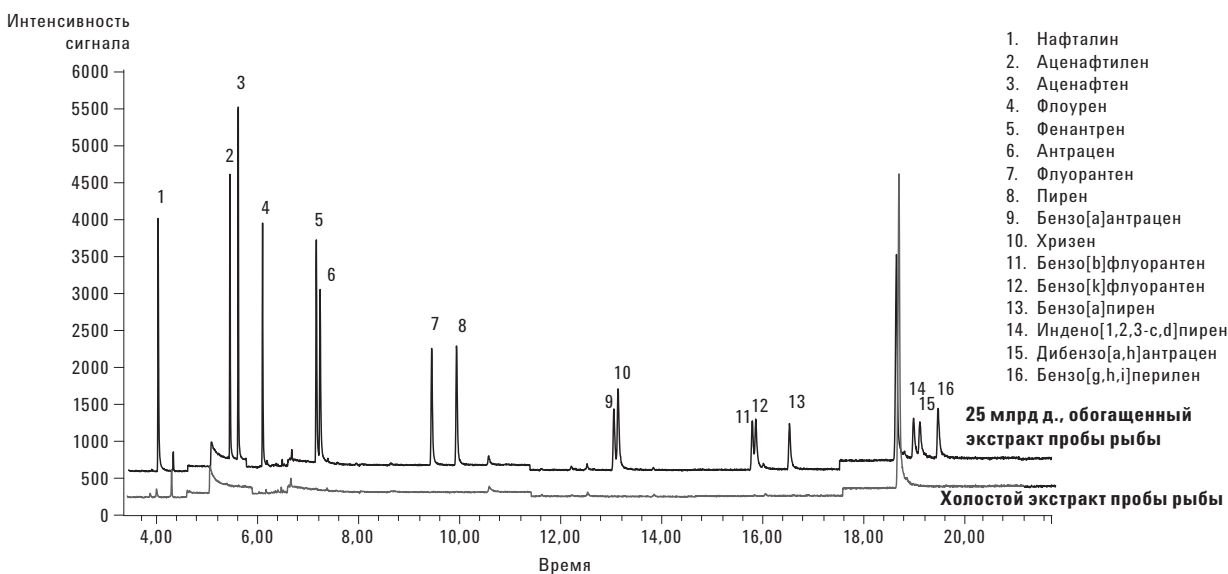


Рис. 4. ГХ-МС (СИМ) хроматограмма холостого экстракта пробы рыбы и экстракты проб рыбы с добавкой 25 нг/мл стандартного образца, анализ с помощью капиллярной колонки Agilent J&W DB-5msUI (серийный номер 122-5522UI). Условия хроматографического анализа указаны в Таблице 1.

Таблица 4. Извлечение и воспроизводимость ПАУ для образца красного золотистого окуня с добавкой стандартного образца при использовании колонки Agilent J&W DB-5msUI (каталожный номер 122-5522UI)

Определяемое вещество	25 нг/мл обогащенная контрольная проба		250 нг/мл обогащенная контрольная проба		500 нг/мл обогащенная контрольная проба	
	Извлечение, %	ОСО (n = 6)	Извлечение, %	ОСО (n = 6)	Извлечение, %	ОСО (n = 6)
Нафталин	80,35	3,29	96,77	4,23	98,64	1,88
Аценафтилен	95,28	2,30	103,36	2,80	101,02	2,27
Аценафталин	92,28	2,51	101,18	2,87	100,69	2,34
Флуорен	95,98	2,99	105,94	2,82	105,00	1,28
Фенантрен	100,51	3,46	104,93	2,71	103,25	1,70
Антрацен	107,38	3,51	105,95	3,45	105,38	1,74
Флуорантен	113,27	3,87	105,76	3,33	103,64	1,81
Пирен	113,55	3,51	103,99	3,24	102,29	1,94
Бензо[а]антрацен	129,79	3,41	101,45	3,91	100,61	3,24
Хризен	116,75	4,01	98,55	4,17	95,95	5,61
Бензо[б]флуорантен	131,20	3,70	98,77	4,08	98,08	3,24
Бензо[к]флуорантен	139,45	2,52	99,13	3,98	95,31	4,54
Бензо[а]пирен	125,30	3,68	95,33	3,89	96,82	1,80
Индено[1,2,3-с,д]пирен	119,51	3,47	94,57	3,23	93,71	2,55
Дибензо[а,һ]антрацен	126,35	3,54	98,55	3,50	98,85	2,24
Бензо[g,һ,і]перилен	114,91	4,93	97,30	3,37	95,63	1,83

Выводы

В данном документе успешно продемонстрирован быстрый и эффективный аналитический метод контроля низких и следовых количеств ПАУ в пробах рыбы, удовлетворяющий текущим требованиям безопасности пищевой промышленности. Этот метод демонстрирует применение упрощенного подхода для рутинного контроля качества рыбы и представляет собой альтернативу более времязатратным и сложным методикам.

Метод Agilent Bond Elut QuEChERS, с последующей дисперсионной твердофазной экстракцией для жирных проб, показал свою эффективность в очистке матрицы образца, позволяя избежать взаимного влияния проб и сохраняя при этом возможность обнаружения малых количеств аналитов. Простой метод экстракции QuEChERS позволяет осуществлять быструю пробоподготовку, обеспечивая высокую производительность. Любые следы остаточного взаимного загрязнения удаляются посредством обратной продувки, что устраняет необходимость в цикле термообработки и значительно сокращает продолжительность анализа.

Высокоэффективная колонка Agilent J&W DB-5ms UI показала свою эффективность при анализе 16 ПАУ в матрице рыбы с последующей очисткой матрицы образца методом QuEChERS и дисперсионной твердофазной экстракцией. Колонка DB-5ms UI позволяет получить удовлетворительное разрешение для четырех известных критических пар: фенантрен/антрацен, бенз[а]антрацен/хризен, бензо[б]/[к]флуорантен и индено [1,2,3-с,д]пирен/дибензо[а,һ]антрацен. Производительность колонки DB-5ms UI позволила получить отличную линейность результатов по всему диапазону исследуемых концентраций. Значения R^2 для соединений ПАУ находились в диапазоне 0,9988–0,9999. Извлечение и воспроизводимость были более 80%, а значение ОСО было ниже 6,0. Достигнутый с помощью данного метода предел количественного определения 10 млрд д. для бензо[а]пирена значительно ниже актуальных уровней риска.

Благодарность

Авторы хотели бы поблагодарить Джоан Стивенс (Joan Stevens) за помощь и пожелания при разработке процедуры экстракции Agilent Bond Elut QuEChERS.

Литература

1. Environmental Protection Agency (EPA) of the United States of America, Compendium Method TO-13A, EPA, Cincinnati, OH, USA, 1999. [Агентство США по защите окружающей среды (EPA), Фармакопейный метод TO-13A, EPA, Цинциннати, Огайо, США, 1999].
2. European Union, Commission Recommendation 2005/108/EC, Off. J. Eur. Comm. L34 (2005) 433. [Европейский Союз, Рекомендации комиссии 2005/108/EC, Оф. Ж. Евр. Комм. L34 (2005) 433].
3. Haruhiko Nakata, Yasufumi Sakai, Takashi Miyawaki, and Akira Takemura "Bioaccumulation and Toxic Potencies of Polychlorinated Biphenyls and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Tidal Flat and Coastal Ecosystems of the Ariake Sea, Japan," Environmental Science and Technology, 2003,37, 3513-3521. [Хаурико Наката, Ясуфуми Сакаи, Такаши Миявяки и Акира Такемура «Накопление в живых организмах и токсический потенциал соединений полихлорированного бифенила и полициклических ароматических углеводородов в экосистемах приливно-отливной и прибрежной зон залива Ариаке, Япония», Экология и технология, 2003,37, 3513-3521].
4. Zhendi Wand and Scott A. Stout, "Oil Spill Environmental Forensics: Finger Printing and Source Identification," Academic Press, Burlington, MA 01803, USA, 2007. [Женди Ванд и Скотт А. Стаут, «Экспертно-технический анализ разливов нефти: характерные признаки и определение источника», Academic Press, Берлингтон, Массачусетс 01803, США, 2007].
5. NOAA Cleared Document Dated 5/29/2010 "Protocol for Interpretation and Use of Sensory Testing and Analytical Chemistry Results from Re-Opening Oil-Impacted Areas Closed to Seafood Harvesting." [Документ NOAA от 29.05.2010 «Протокол по интерпретации и использованию сенсорного анализа и результатам аналитической химии для повторного открытия подвергшихся разливу нефти зон, закрытых для рыбного промысла.»]
6. AOAC Method 2007.01 [Метдика AOAC Method 2007.01]
7. Kenneth Lynam and Doris Smith, "Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Analysis Using an Agilent J&W DB-5ms Ultra Inert Capillary GC Column," Agilent Technologies publication 5989-9181EN [Кеннет Линам и Дорис Смит, «Анализ полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) с использованием капиллярной ГХ-колонки Agilent J&W DB-5ms Ultra Inert», публикация Agilent Technologies 5989-9181EN].
8. Kenneth Lynam and Mike Szelewski, "Analysis of Semivolatiles using High Efficiency Capillary GC Columns," Agilent Technologies publication 5989-7500EN [Кеннет Линам и Майк Шелевски, «Анализ полуплетучих веществ с использованием высокоэффективных капиллярных ГХ-колонок», публикация Agilent Technologies 5989-7500EN].
9. Для загрузки программного обеспечения Agilent Method Translation перейдите по ссылке:
<http://www.chem.agilent.com/cag/servsup/usersoft/files/GCTS.htm>
10. Chin Kai Meng, "Improving Productivity and Extending Column Life with Backflush," Agilent Technologies publication 5989-6018EN [Чин Кай Менг, «Повышение производительности и повышение срока службы колонки с обратной продувкой», публикация Agilent Technologies 5989-6018EN].
11. Harry Prest, "User Quick Guide to Pressure Controlled Tee (PCT) Operation – Post Run Backflushing," Agilent Technologies publication 5990-5484EN [Гарри Прест, «Краткое руководство пользователя по работе с T-образным коннектором с контролируемым давлением — обратная продувка по окончании работы», публикация Agilent Technologies 5990-5484EN].

Дополнительные сведения

Дополнительную информацию о продуктах и услугах нашей компании см. на веб-сайте www.agilent.com/chem.

www.agilent.com/chem

Компания Agilent не несет ответственности за возможные ошибки в настоящем документе, а также за убытки, связанные или являющиеся следствием получения настоящего документа, ознакомления с ним и его использования.

Информация, описания и технические характеристики в настоящем документе могут быть изменены без предупреждения.

© Agilent Technologies, Inc., 2012.
Напечатано в США
6 января 2012 г.
Номер публикации 5990-6668RU



Agilent Technologies