

使用 DACC 复合色谱—荧光检测器

检测食用油中多环芳烃 (PAHs)

简介: 由于多环芳烃的致癌性, 使其在食品和环境中的存在已对人类的健康造成了威胁。多种 PAHs 在饮用水、食品添加剂、化妆品、车间和工厂的残留已经有了国际化的限量标准。PAHs 也存在于碳烤类和干燥类的食物中, 类似于有机物的不完全燃烧一样, 通过一种热解过程形成, 并存在于植物油中。食品中的 PAHs 也来源于 petrogenic 污染。欧盟的标准中对食品中的 PAHs 含量给予限定, 由于 BaP 能够反应 PAHs 污染程度, 故要求食用油中 BaP 的量不得超过 $2.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

PAHs 通常使用 HPLC 分离, 并且用紫外、荧光、电化学以及质谱 (通常使用大气压电离方式) 等检测手段检测。样品经过氧化还原后, PAHs 还可以用 LC-MS/MS 检测。以上这些方法检测食用油中的 PHAs 都需要多步样品制备的人工操作。一项检测十几种食用油中的 PHAs 的研究中先使用 DMSO 作为萃取剂, 接着用环己酮萃取三次, 最后用硅胶柱过滤。在另一项检测六种食用油中 PHAs 的研究中, 使用了固相萃取, 但是在固相萃取和随后的蒸发步骤之前, 仍然需要溶剂萃取的过程。这些手工的操作步骤浪费溶剂, 浪费资源, 并且浪费时间。

PAHs 通常使用 HPLC 分离, 并且用紫外、荧光、电化学以及质谱 (通常使用大气压电离方式) 等检测手段检测。在氧化反应后, PAHs 可以用 LC-MS/MS 检测。以上这些方法检测食用油中的 PHAs 都需要多步样品制备的人工操作。一项检测十几种食用油中的 PHAs 的研究中先使用 DMSO 作为萃取剂, 接着用环己酮萃取三次, 最后用硅胶柱过滤。在另一项检测六种食用油中 PHAs 的研究中, 使用了固相萃取, 但是在固相萃取和随后的蒸发步骤之前, 仍然需要溶剂萃取的过程。这些手工的操作步骤浪费溶剂, 浪费资源, 并且浪费时间。

近年来, DACC 广泛的应用于 PHA 的检测。DACC 的固定相能够用于固相萃取, 将 PAHs 保留在固定相中而基质组分则被洗脱到废液中。在分析物经过洗脱以后, 经过溶剂交换可以得到用于 HPLC 检测的样品。相对于传统的分析方法, 这种净化技术溶剂消耗少, 节省实验室人力, 并且节约了大量的时间。然而, 这种方法仍然包括很多手工操作步骤, 因此需要人工而且易于出错。

在 1996 年, Van Stijn 发展了一种制备和检测油类样品的自动方法。这种方法的设备由一个 DACC 固相萃取柱和一个 HPLC 液相柱串联组成。这个方法不需要大量的人工并且解决了上面提到的各种问题和挑战。然而, 采用这种方法进行日常分析室非常困难的并且需要较高的技术知识, 必须要知道如何优化系统配置。当然这种优化过程是非常费时的。上述的方案使用了用于系统控制的自动样品软件和用于数据收集的不同的软件, 代替了用于数据控制的整体色谱数据系统。这种方法给易于操作, 过程控制及记录, 验证, 报告以及自动诊断提供了改进的空间。

Maio 采用了 Van Stijn 的方案建立了一种用于自动在线检测食用油中 PAHs 的方法, 这种方法克服了以上方法凸显的问题。这个方案使用了装有双重梯度 HPLC 泵以及两个六通阀的 HPLC, 这有利于 HPLC 前端 DACC 柱的在线样品富集。在线的样品制备和分析的串联使用能够减少传统方法中化合物的人工前处理, 同时, 自动化能够降低偶然误差, 增强重现性。与传统方法的 8-10h 的分析时间相比较, 双梯度 HPLC 系统的每个样品的分析时间缩短到大约 80 分钟。此外, 该自动化系统能够 24 小时连续运转, 显著的增加了样品分析能力, 实现了这类化合物的日常分析。

本应用手册描述了利用 Dionex UltiMate 3000 ×2 双重 HPLC 平台检测食用油中 PAHs 的方案和方法, 该方案根据上述的 Maio 而设计, 并且估计了该方法的效果, 例如线性, 检出限, 重现性, 再生, 以及自动进样的负载。

仪器

Ultimate 3000*2 双梯度系统包括:

DPG-3600A 泵 带有 SRD-3600

WPS-3000TSL 自动进样器

TCC-3200 柱温箱 (带有 2p-6p 阀)

RF2000 荧光检测器

Chromeleon 6.80 SP1 色谱工作站

设备配置有在线 DACC 净化装置的分析型 HPLC, 如图 1-3 所示, 在这些图示中, 上面的六通阀是 TCC-3200 中位于右侧的阀, 下面的六通阀是位于左侧的阀。

试剂与标准品

去离子水 经过 Milli-Q 处理

乙腈 (CH₃CN), HPLC 级 (Fisher Scientific)

异丙醇, HPLC 级 (Fisher Scientific)

活性炭, 化学纯 (上海化学试剂公司)

PAHs 混标, EPA 样品 (Method 610) 每种成分 20020 µg/ml, 包括: phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene, benzo[a]anthracene, chrysene, benzo[b]fluoranthene, benzo[k]fluoranthene, benzo[a]pyrene, dibenzo[a, h]anthracene, benzo[ghi]perylene and indeno[1, 2, 3-cd]pyrene (Restek) Benzo[b]chrysene, 50 µg/mL, 作为内标物 (I. S.) 样品

两种品牌的橄榄油 (分别来自于意大利和西班牙), 一个品牌的芝麻油 (来自中国)

条件

分析柱：两根 SUPELCOSIL LC-PAH 柱，4.6*250mm (Supelco Cat. #58229)

在线固相萃取柱：ChromSpher Pi，3.0*80mm (Varian P/N: CP28159)

流动相：A. 水

B. 乙腈（用于装载泵和分析泵）

C. 异丙醇（用于装载泵）

流速：1mL/min

进样体积：80μL (100 μ L 进样环)

柱温：30℃

自动进样器温度：40℃

检测器：荧光（见表 4）

表 1 说明使用装载泵进行在线固相萃取的梯度条件，表 2 说明使用分析泵进行分离的梯度条件，表 3 说明阀切换的时间程序。

由于 PAHs 的最大荧光响应发生在不同的发射波长上，所以需要根据各种 PAH 的保留时间，改变激发和发射波长。表 4 说明波长的变化程序。

Table 1. Gradient Program for On-Line SPE					
Time	Flow rate (mL/min)	Solvent A (% vol.)	Solvent B (% vol.)	Solvent C (% vol.)	Curve (%)
0.00	0.35	0	0	100	--
12	0.35	0	0	100	5
12.1	0.35	20	80	0	5
20.9	0.35	20	80	0	5
20.91	0.35	0	100	0	5
50.9	0.35	0	100	0	5
51.5	0.35	0	0	100	5
66.5	0.35	0	0	100	5

Table 2. Gradient Program for Separation				
Time	Flow rate (mL/min)	Solvent A (% vol.)	Solvent B (% vol.)	Curve (%)
0.00	0.4	20	80	--
14.6	0.4	20	80	5
16	1	20	80	5
30	1	0	100	6
58	1	0	100	5
58.1	1	20	80	5
65	1	20	80	5
65.5	0.4	20	80	5
70	0.4	20	80	5

Table 3. Valve Switching Programs for the Left and Right Valves		
Time (min)	Left Valve	Right Valve
0.00	6-1	1-2
12.1	No Movement	6-1
14.5	1-2	No Movement
17	6-1	No Movement
61.5	No Movement	1-2

Table 4. Wavelength Changes for RF2000 Fluorescence Detector		
Time (min)	Excitation Wavelength (nm)	Emission Wavelength (nm)
0.00	256	370
27.05	256	390
29.5	240	420
33.5	270	385
37.5	290	430
51.5	305	480
53.5	290	430

标样和样品的制备

纯化橄榄油作为空白和基质

在 20g 橄榄油中加入 1g 活性炭，60℃ 加热搅拌 2h，经过 0.45 μm 的微膜过滤

(PTFE, Millex-LCR, Millipore), 将纯化好的油样品于 4°C 储存。

制备含有 I. S. (内标)的橄榄油作为基质

制备 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 的 I. S. 内标储备液: 于 2mL 小瓶中加入 995 μL 异丙醇, 5 μL 50 $\mu\text{g/mL}$ 的 I. S. 内标。

于约 10g 的已纯化的橄榄油空白基质中加入 40 μL 0.25 $\mu\text{g/mL}$ I. S. 储备液, 该橄榄油基质中 I. S. 的浓度约为 1 $\mu\text{g/kg}$ 。在这篇 AN 中, I. S. 的标准溶液加入到 10.0786g 已纯化的橄榄油中, 基质中 I. S. 的浓度为 0.992 $\mu\text{g/kg}$ 。

制备工作曲线 (橄榄油作为基质)

制备 1 $\mu\text{g/mL}$ 标准溶液储备液: 于 2mL 的小瓶中加入 995 μL 异丙醇, 5 μL , 200 $\mu\text{g/mL}$ 标准溶液, 以上储备液用于制备工作曲线的标准样品 (见表 5)。

食用油样品的制备

晋阳前, 将食用油过 0.451 μm 过滤膜 (PTFE, Millex-LCR, Millipore)

Table 5. Preparation of the Working Standards (Oil as Matrix)				
Vial # (1.5 mL)	Vial 1	Vial 2		
Volume of 1 $\mu\text{g/mL}$ PAH stock standard solution (μL)	50	100		
Volume of isopropanol (μL)	450	400		
Concentration of PAHs ($\mu\text{g/mL}$)	0.1	0.2		
Vial # (1.5 mL)	Vial 3	Vial 4	Vial 5	Vial 6
Volume of Diluted Standard (Vial 1 or Vial 2) or Stock Standard (μL)	10 μL , Vial 1	10 μL , Vial 2	10 μL , stock standard	20 μL , stock standard
Added weight of the cleaned olive oil used as matrix (containing I.S.) (g)	1.0355	1.0376	1.0389	1.0358
Final concentration of PAHs ($\mu\text{g/kg}$)	0.956	1.909	9.534	18.943
Final concentration of I.S. ($\mu\text{g/kg}$)	0.983	0.983	0.983	0.973

结果与讨论

在线 DACC-HPLC 方法简述

图 1 中，通过另一个梯度泵和两个柱切换阀就可以将在线 DACC 净化装置与液相色谱连接起来分析样品。图 1 所示，泵 A 吸取异丙醇，将样品运送至固相萃取柱，在线富集，同时泵 B 正在平衡分析柱。待被分析物完全富集在 DACC 柱上后，泵 A 吸取乙腈-水溶液将异丙醇和油从萃取柱上冲洗干净（图 2），随后将富集了被分析物的故乡萃取柱切换到分析流路（图 3），从而实现样品的在线富集和分析。

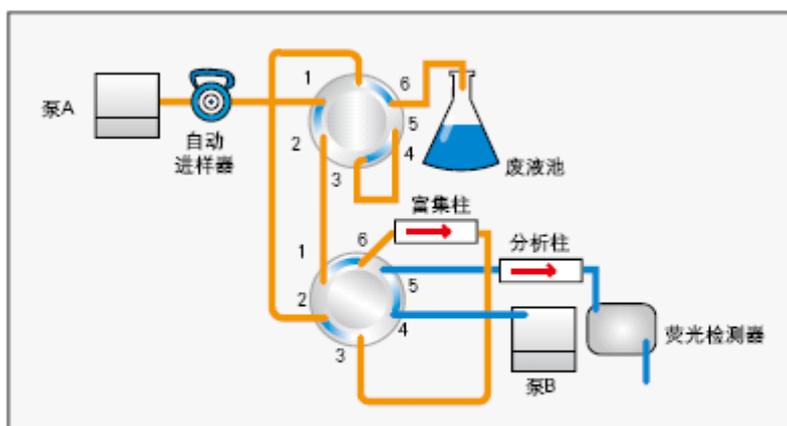


图1 泵A吸取异丙醇将样品运送至固相萃取柱，在线富集，同时泵B平衡分析柱。

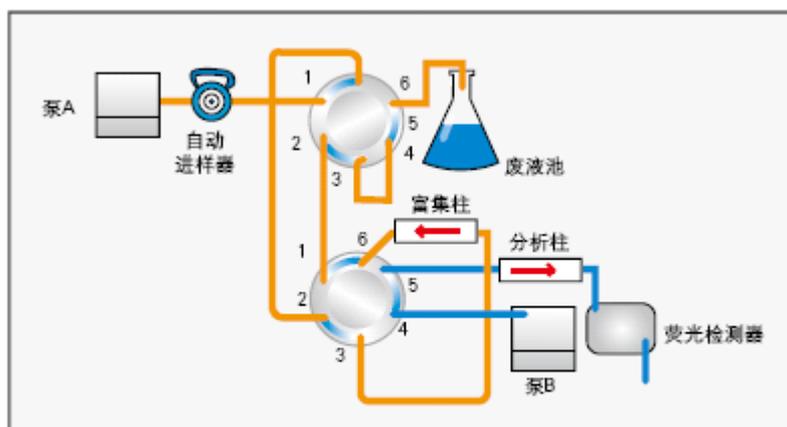


图2 泵A吸取乙腈水溶液将异丙醇和油从萃取柱上冲干净，同时仍使用泵B平衡分析柱。

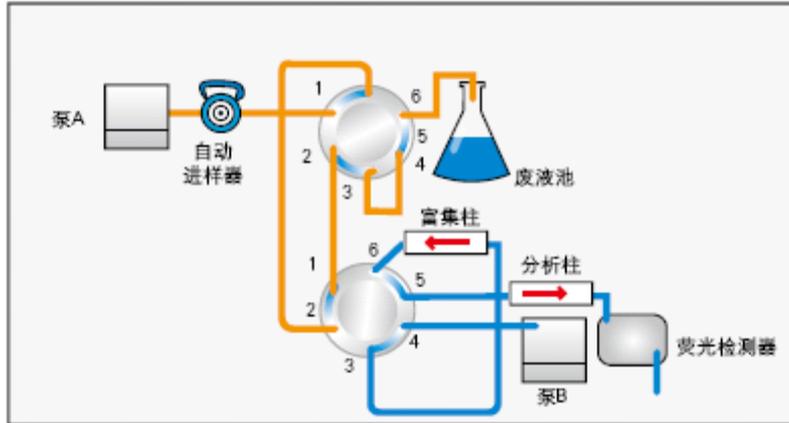


图3 将富集了被分析物的固相萃取柱切换到分析流路，从而实现样品的在线富集和分析。

重现性，检出限和线性

方法重现性通过重复进加标的橄榄油样品（表 5 中#6 号瓶）获得（见图 4）。表 6 列举了保留时间和峰面积重现性的数据。标准校正曲线通过 4 个不同浓度的标样（每个标样进 5 针）获得。该标准曲线及样品的计算均使用内标法。表 7 列举了通过 Chromeleon 软件计算的结果，包括 PAH 的方法检出限等数据。

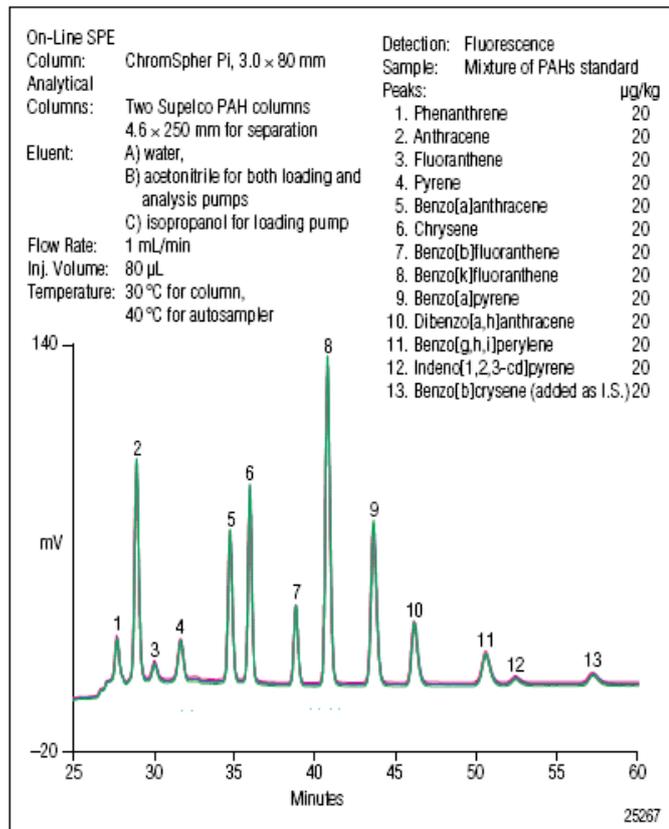


Figure 4. Overlay of chromatograms of seven serial injections of olive oil sample 1 spiked with a PAH standard mixture (20 µg/kg).

Table 6. Reproducibility of Retention Times and Peak Areas^a		
PAH	RT RSD	Area RSD
Phenanthrene	0.064	6.733
Anthracene	0.055	4.350
Fluoranthene	0.072	4.491
Pyrene	0.044	4.965
Benzo[a]anthracene	0.031	4.628
Chrysene	0.026	4.469
Benzo[b]fluoranthene	0.027	4.325
Benzo[k]fluoranthene	0.027	4.173
Benzo[a]pyrene	0.031	4.399
Dibenzo[a,h]anthracene	0.041	4.383
Benzo[g,h,i]perylene	0.042	5.038
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	0.048	4.484

^aSeven injections of olive oil sample 1 spiked with 20 µg/kg mixed PAH standards.

残留情况

通过连续进样 500 µg/kg 的内标和已纯化的橄榄油空白样品来检测残留情况。图 5 所示，在进样前与进样后使用乙腈对进样针外壁进行清洗可以消除残留问题。使用 WPS3000TSL 自动进样器进行该项应用，不会产生交叉污染。

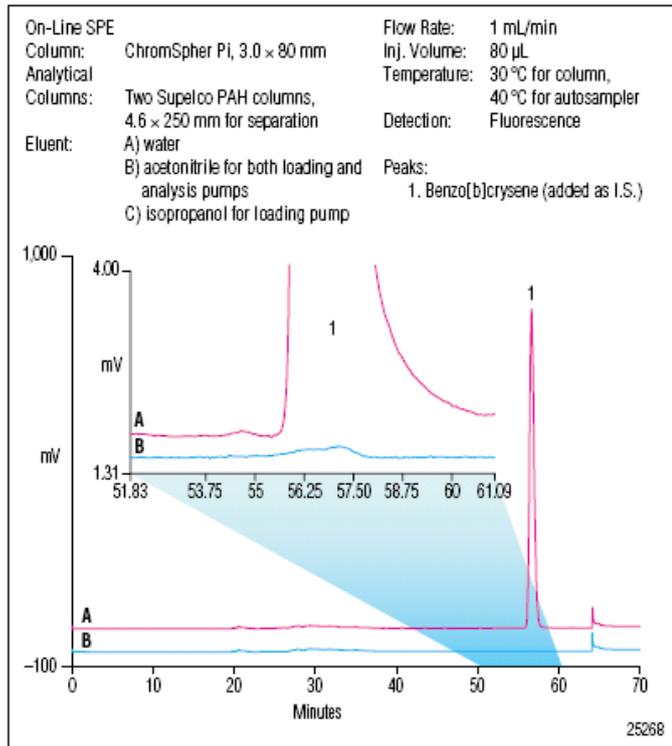


Figure 5. Carryover test on the WPS-3000 autosampler.
A) Purified olive oil spiked with 500 µg/kg of benzo[b]crysene (I.S.).
B) Purified olive oil prepared as blank, analyzed immediately after A).

使用已纯化的橄榄油作为空白基质的影响

图 6 列举了原橄榄油和纯化的橄榄油的叠加谱图，由此我们可以看出，通过纯化，很多成分可以从原始橄榄油中除去，但是仍然还是会有杂质存在于空白基质中，影响一些 PAHs 的检测，Chromleon 软件可以通过扣除空白基线的方法，解决这一问题。

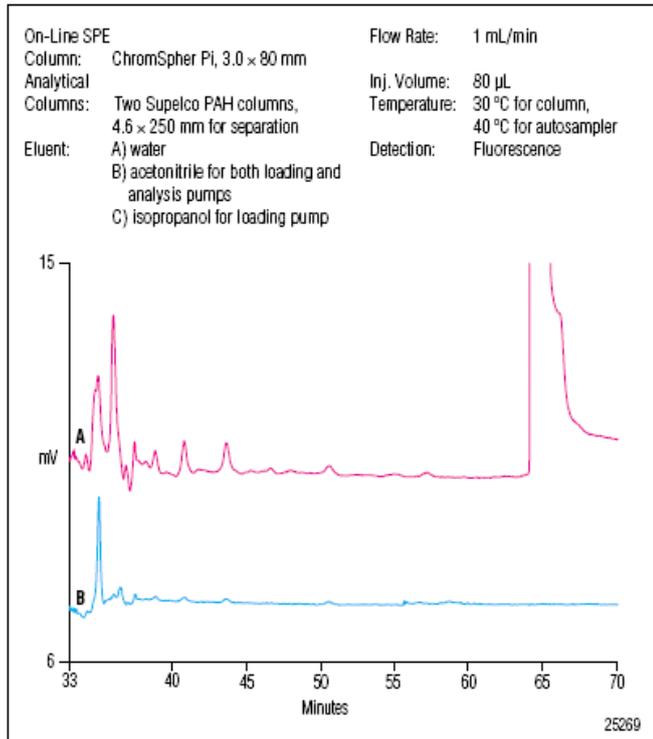


Figure 6. Overlay of chromatograms of A) untreated olive oil, and B) purified olive oil used as a blank.

样品分析

两种橄榄油样品和一种芝麻油样品经过分析，结果见表8，谱图见图7. PAHs的加标回收率都在70%–131%之间，一些PAHs污染物可以再食用油中发现。其中5中PAHs存在于所有这三个样品中，分别是：phenanthrene, anthracene, benzo[a]anthracene, chrysene and enzo[a]pyrene。其中phenanthrene的含量最高。

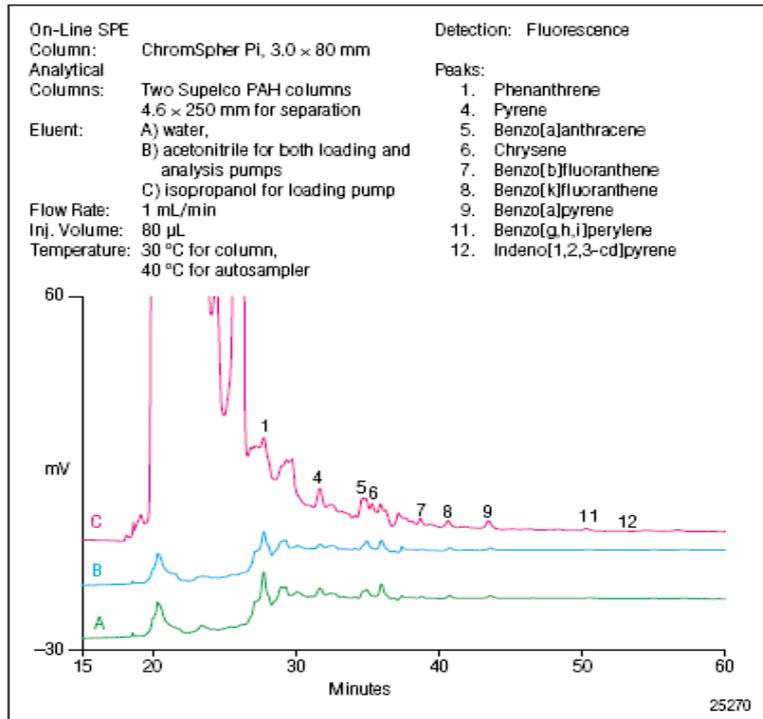


Figure 7. Overlay of chromatograms of A) olive oil 1, B) olive oil 2, and C) sesame oil samples.

SPE固相萃取柱的耐用性

在线萃取食用油中PAHs的SPE固相萃取柱的耐用性通过比较一根新柱和一根萃取过600次食用油样品的固相萃取柱的性能来得出。图8显示了两根固相萃取柱的分析结果，使用两根萃取柱得出的结果非常相近。

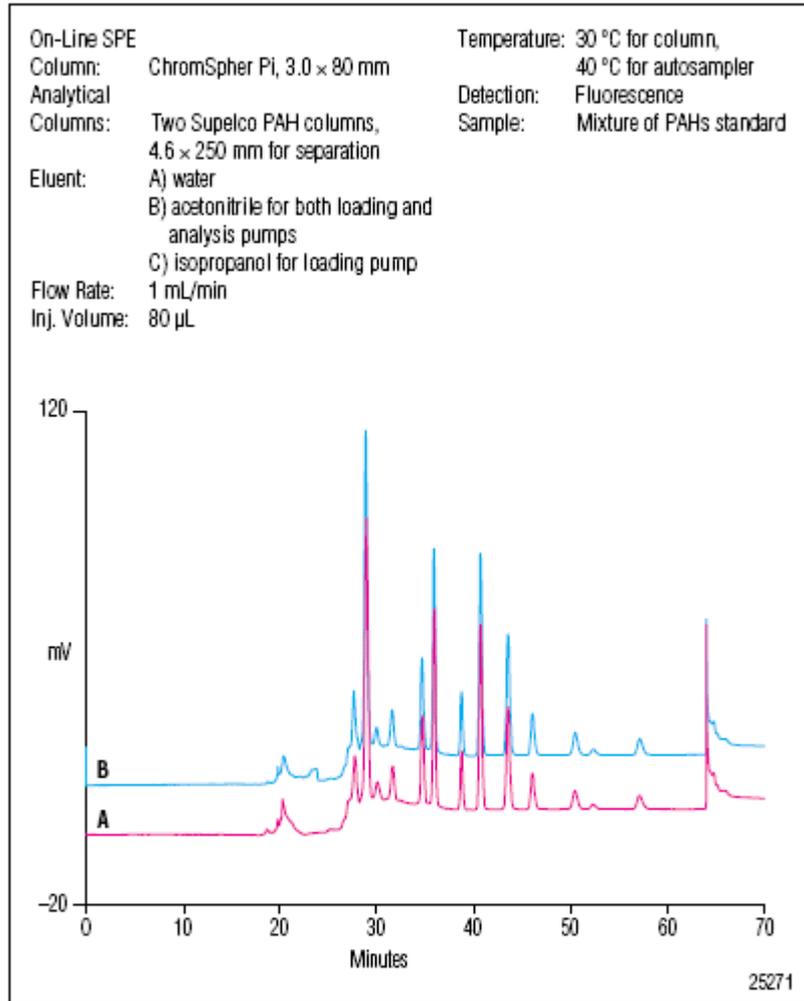


Figure 8. Separation of PAHs in olive oil using different SPE columns. A) SPE column with 600 prior injections; B) new SPE column.

注意:

溶剂、试剂、玻璃器皿以及其他样品处理的部件的污染都有可能引起方法异常，所有器皿需要清洗干净。应尽量使用高纯度的试剂和溶剂以减少干扰。