

Détermination des hydrocarbures aromatiques polycycliques HAPs dans les produits alimentaires avec la station de travail CHRONECT PAH



Note d'application 151

Introduction

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) sont un groupe de substances dont certaines sont considérées comme potentiellement cancérigènes [1]. Pour cette raison le contrôle et la réglementation de ces substances sont d'une importance capitale. L'Union Européenne a établi des limites strictes pour les molécules les plus courantes de cette famille. Elles sont appelées EU PAHs prioritaires et sont au nombre de 15, plus une autre également suspectée d'être cancérigène (15+1 EU PAHs) [2]. De ces 16 substances, 4 ont des limites seuil. En fonction de l'aliment et du groupe de consommateur, ses valeurs seuil sont comprises entre < 1 µg/kg et 50 µg/kg [3, 4].

Les HAPs contaminent généralement les aliments lors du procédé de fabrication. Lors de l'étape de friture, de fumage, ou de grillage. Les HAPs peuvent être le résultat d'une combustion incomplète ou d'une pyrolyse puis sont détectés dans les aliments. Les fumées d'échappement des moteurs diesels ou d'autres sources environnementales peuvent également être responsables de la contamination aux HAPs.

Méthode et configuration de l'appareil

Dans de nombreux aliments, l'analyse des HAPs ne représente pas un problème, mais pour certains elle peut être extrêmement difficile, particulièrement dans le cas où des composés similaires aux HAPs mais biogéniques sont présents, ou des quantités importantes d'émulsifiants.

L'analyse des HAPs est généralement réalisée à l'aide de la chromatographie liquide ou gazeuse, le couplage GC MS étant considéré comme la méthode de choix. Une attention particulière doit être portée à la préparation d'échantillon. Pour atteindre la sensibilité désirée, une grande quantité d'échantillon doit être utilisée pour extraire les HAPs. Les autres substances contenues dans l'échantillon ne doivent pas être extraites car elles pourraient interférer avec l'analyse et fausser le résultat ou dans le pire des cas endommager l'appareil.

La station de travail CHRONECT PAH est basée sur la méthode imPAHct (innovative multidimensional PAH cleanup technology), qui comprends une extraction manuelle et rapide de l'échantillon avec une purification chromatographique entièrement automatisée [5]. L'extrait obtenu est ensuite analysé par GC-MS(/MS) et le résultat final est disponible en 45 minutes après que l'échantillon soit placé sur le système.

La station de travail CHRONECT PAH est basée sur la technologie LC-GC d'Axel Semrau établie depuis plusieurs années. La LC est utilisée lors de la préparation d'échantillon. Le transfert de l'extrait en GC est réalisé à l'aide d'un « Large-Volume-On-Column-Transfer ». L'interface CHRONECT LC-GC est utilisée à cet effet.

La purification de l'échantillon est effectuée avec un procédé LC en deux étapes. Après injection de l'échantillon par le robot, celui-ci est séparé des composés plus polaires que les HAPs à l'aide d'une colonne HPLC en gel de silice pure. La fraction purifiée contient toujours de nombreuses substances interférentes qui doivent être éliminées à l'aide d'une seconde dimension LC. Pour cela, une chromatographie π donneur-accepteur est utilisée, elle permet d'enrichir l'échantillon en composés riches en électrons π . L'extrait résultant est ensuite transféré au GC via l'interface LC-GC puis séparé, détecté et quantifié à l'aide d'une analyse GC-MS(/MS) classique.

Pour la partie HPLC du système, des composants reconnus Agilent sont utilisés. Au cœur du système on trouve le logiciel de contrôle CHRONOS associé à l'interface LC-GC, il coordonne les sous-systèmes afin qu'ils performant la bonne action au bon moment.

Composants du système :

- Interface CHRONECT LC-GC
- Passeur d'échantillon robotisé CHRONECT Robotic Autosampler
- Logiciel CHRONOS
- HPLC Agilent 1260 Infinity II (Pompe et détecteur UV)
- GC MS Agilent 5977C

Préparation d'échantillon

Tous les échantillons doivent être préparés avant l'analyse. En fonction de la matrice de l'échantillon, cette préparation peut être ou moins complexe.

Avec la méthode imPAHct la préparation manuelle de l'échantillon peut être réduite au minimum. La figure 1 montre la procédure de préparation en fonction de la catégorie d'aliment de l'échantillon. Les huiles comestibles peuvent être injectées directement après dilution, les autres produits alimentaires sont préparés en 10 à 15 minutes.

Résultats

Le développement d'un circuit de vanne spécial a permis d'établir une purification d'échantillon par LC en deux étapes. La figure 2 montre un exemple de configuration obtenue avec ce système. Avec seulement quatre vannes HPLC, l'ensemble des permutations peuvent être effectuées. Le tableau 1 résume l'ensemble des actions associées.

Afin de démontrer les performances du système, une courbe de calibration a été créée pour le benzo[a]pyrène dans la gamme 0.04 – 4 µg/kg, comme montré en figure 3. Par la suite, du beurre de cacao traité au charbon actif a été dopé avec 0.05 µg/kg de HAPs. Les 16 HAPs ont pu clairement être détectés avec un rendement de 85%. De plus toutes les exigences de la directive 836/2011 de l'UE ont été respectées.

La figure 4 montre une section de chromatogramme d'un ion extrait pour le beurre de cacao. Avec cette méthode, même les aliments les plus difficiles comme les épices peuvent être analysés. Le poivre et l'huile d'amarante contiennent environ 10% d'hydrocarbures oléfiniques qui sont des interférences connues avec les HAPs en chromatographie.

La figure 5 montre des sections de chromatogramme pour deux échantillons dans lesquels des interférences sont attendues, mais où seulement les analytes désirés sont visibles.

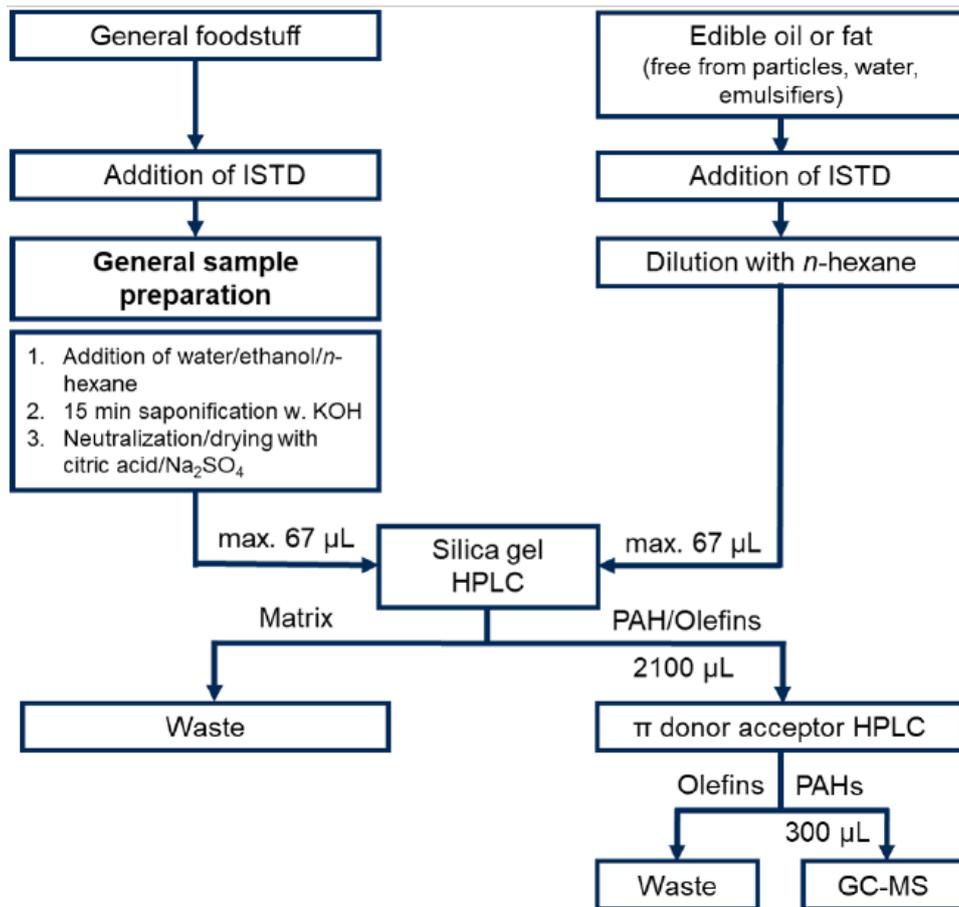


Figure 1 : digramme de la préparation d'échantillon manuelle.

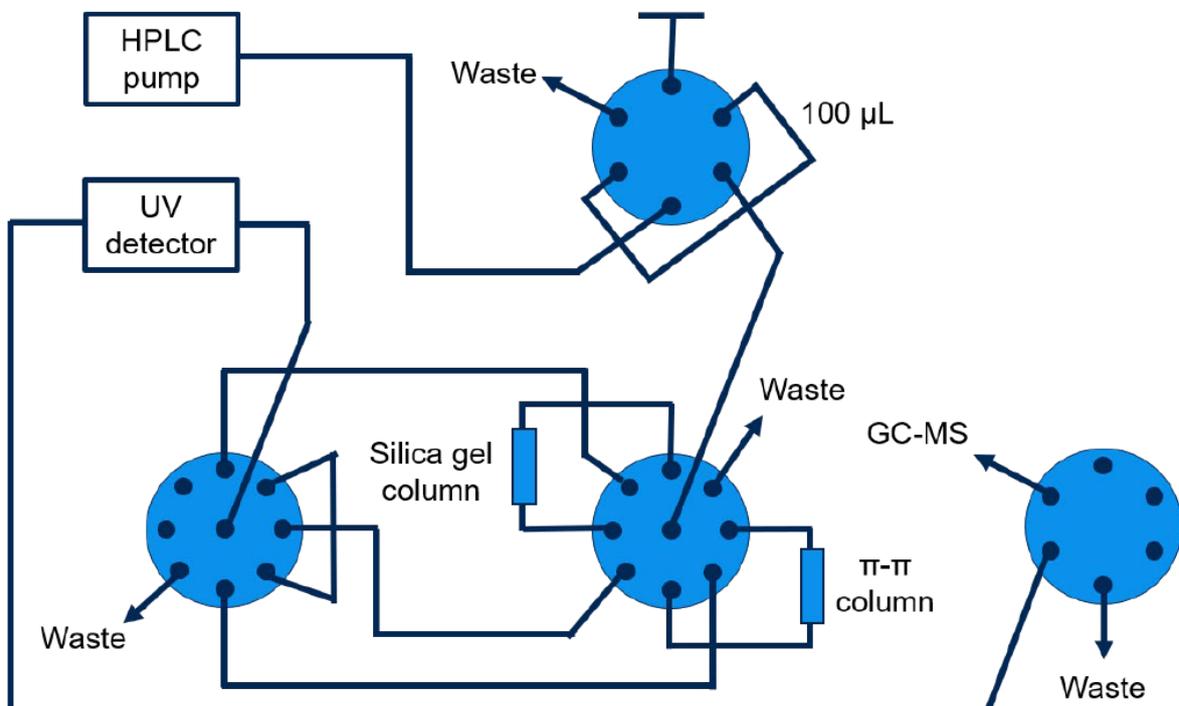


Figure 2 : système de vannes HPLC [5].

Tableau 1 : procédé de permutation des vannes pour une analyse HAP [5].

Time [min]	Action
0.00	Injection on the silica gel column
0.00 – 2.00	Separation of PAHs & olefins from the rest of the matrix
2.00 – 5.00	Transfer of the PAH-containing fraction from the silica gel to the π - π column
5.00 – 10.00	Separation of PAHs from olefins
from 10.00	Start of the backflush of the π - π column
13.10 – 14.10	Elution of the PAHs fraction from the π - π column into GC-MS
until 20.00	Backflush of the π - π column for matrix removal
20.00 – 29.00	Backflush of the silica gel column for matrix removal
29.00 – 34.00	Re-equilibration of the silica gel column in forward direction
34.00 – 40.00	Re-equilibration of the π - π column in forward direction

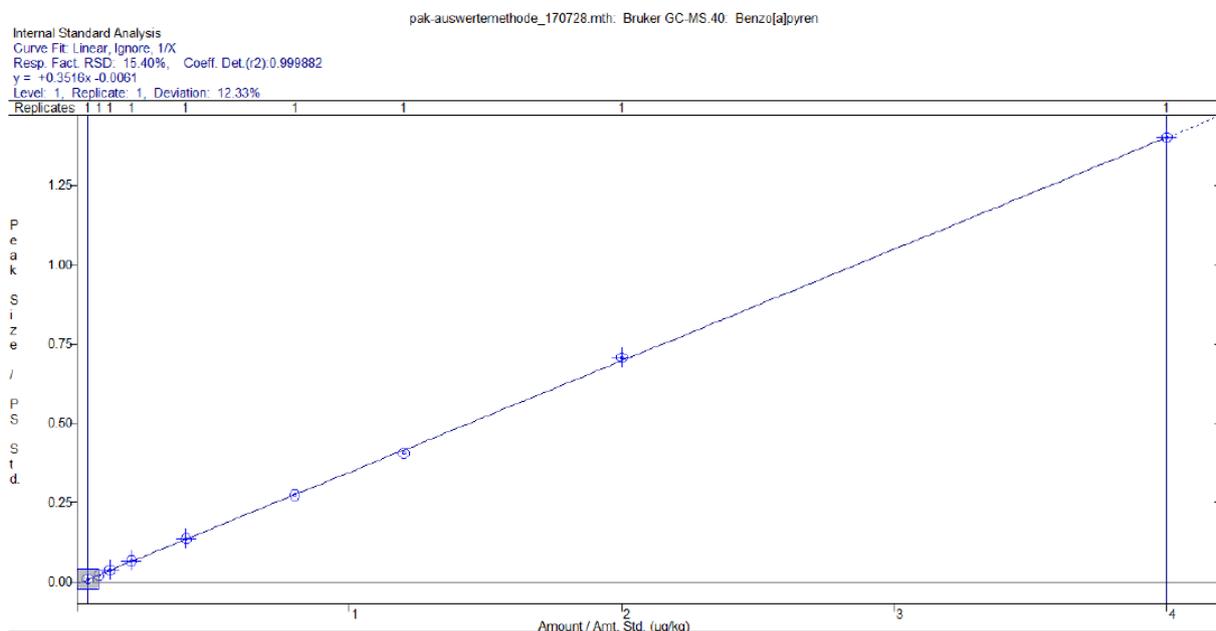


Figure 3 : courbe de calibration pour le benzo[a]pyrène pour la gamme 0.04 – 4 μ /kg.

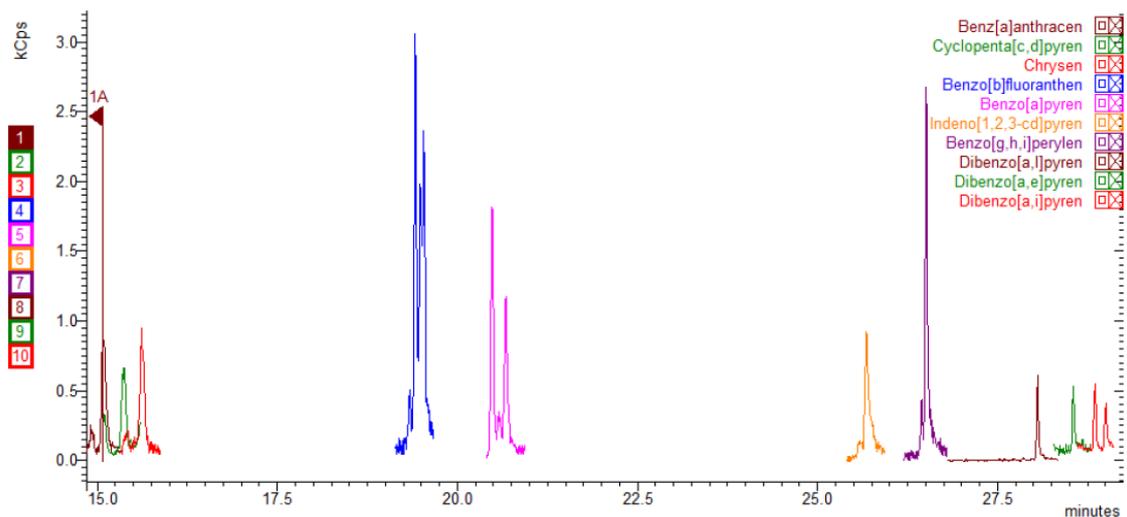


Figure 4 : chromatogramme d'ion extrait pour le beurre de cacao dopé à 0.05 μ /kg. Tous les HAPs sont séparés des interférences et clairement identifiables.

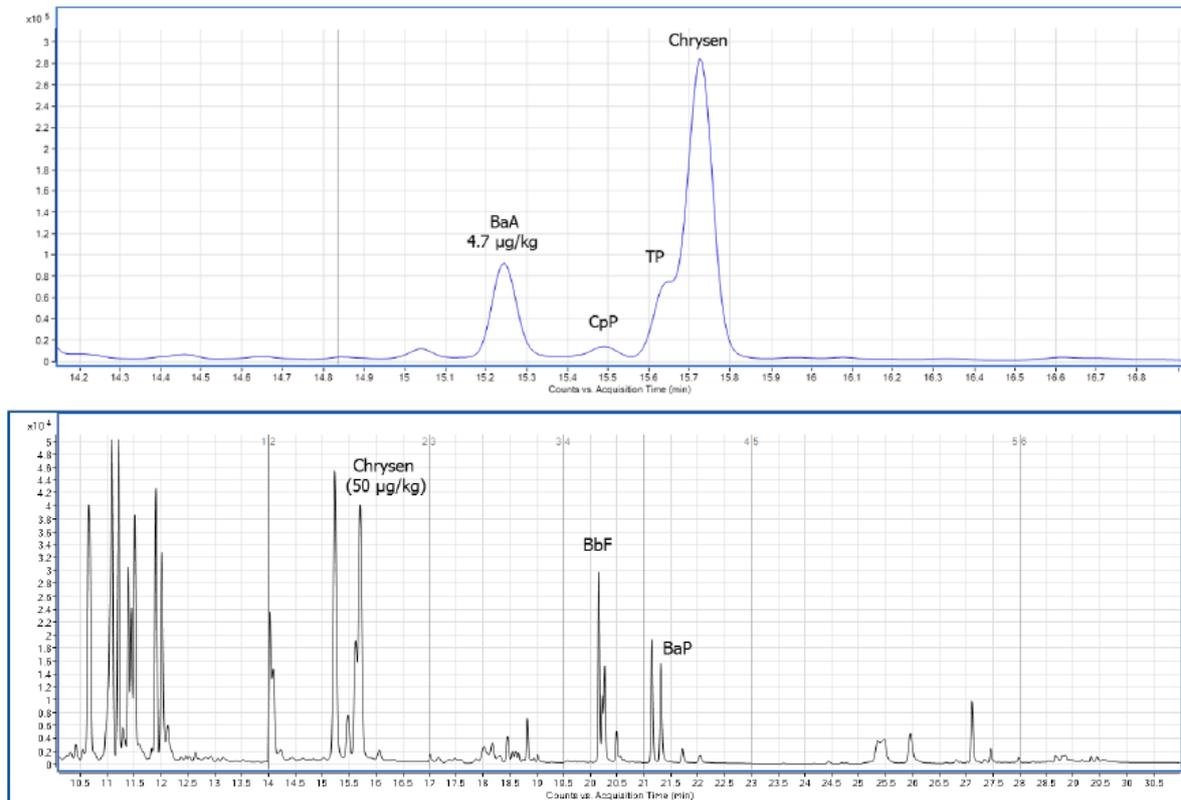


Figure 5 : Chromatogramme d'un échantillon de poivre (en haut) et d'huile d'amarante (en bas). De fortes interférences de matrice peuvent apparaître dans la région des benz[a]anthracène (BaA), cyclopenta[c,d]pyrène (CpP), triphénylène (TP), chrysène ainsi que des benzo[b]fluoranthène (BbF) et benzo[a]pyrène (BaP).

Résumé

La station de travail CHRONECT PAH est capable respecter les exigences strictes de la réglementation de l'UE concernant les 16 HAPs listés. En fonction du système GC-MS choisi, les limites de détection sont jusqu'à 100 fois inférieures aux limites européennes pour les HAPs dans les aliments pour nourrisson. Ceci est possible grâce à la méthode imPAHct ; une extraction manuelle rapide combinée à une chromatographie multidimensionnelle et efficace pour la purification d'échantillon.

Références

- [1] Scientific Committee on Food, Opinion of the Scientific Committee on Food on the Risks to Human Health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food. 4 December 2002. European Commission (EC), Brussels, 2002.
- [2] European Food Safety Authority (EFSA). EFSA J. 2008, 724, 1–114.
- [3] The European Commission. Off. J. Eur. Unions 2011, 215, 4–8.
- [4] The European Commission. Off. J. Eur. Unions 2011, 215, 9–16.
- [5] Nestola, M.; Friedrich, R.; Bluhme, P.; Schmidt, T. C. *Anal. Chem.* 2015, 87(12), 6195–6203.