

Определение низких концентраций дибензодиоксинов и дибензофуранов в сложных матрицах методом GC-HRMS

Dirk Krumwiede, Hans-Joachim Huebschmann, Thermo Fisher Scientific, Бремен, Германия

Введение

В течение последних 30 лет, содержание полихлордибензодиоксинов и полихлордибензофуранов (ПХДД и ПХДФ, далее просто диоксины и фураны) в окружающей среде значительно снизилось и продолжает снижаться^{[1][2]}. В 90% случаев люди подвергаются воздействию диоксинов и диоксиноподобных соединений через пищу^[2]. Т.к. уровень содержания диоксинов в пище, кормах и тканях все время снижается, для их определения, требуются приборы с низкими пределами обнаружения, а также высокой селективностью и чувствительностью.



Рисунок 1: Thermo Scientific DFS - ГХ/МС высокого разрешения с двумя хроматографами TRACE 1310 and автосемплером TriPlus RSH

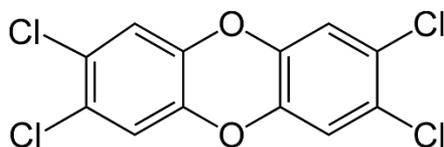


Рисунок 2: 2,3,7,8-Тетрахлордибензо-п-диоксин (ТХДД)

Т.к. метод GC-HRMS удовлетворяет всем описанным выше критериям, он является наиболее подходящим для данной цели, и используется для анализа диоксинов согласно как европейским директивам, так и US EPA (Method 1613 Rev.B) [3-7]. Только метод GC-HRMS должен использоваться для подтверждения присутствия данных соединений в образце согласно этим директивам.

Новые директивы также требуют все более чувствительных приборов. Например, новые методы подтверждения требуют, чтобы значения пределов количественного определения (LOQ) были на 80% ниже, чем наименьшее допустимое содержание.

Современный прибор, такой как DFS, позволяет достичь даже более низких пределов обнаружения (на уровне аттограммов^[8,9]), что было показано впервые на конференции "Dioxin 2006" (Осло, Норвегия), в результате, упрощается и ускоряется пробоподготовка и повышается производительность лаборатории.

Высокая чувствительность GC-HRMS-спектрометра DFS делает его прекрасным решением для анализа образцов со сверхнизкими концентрациями дибензодиоксинов и дибензофуранов.

Условия эксперимента

Все измерения были проведены методом GC-HRMS с помощью масс-спектрометра DFS, в качестве газового хроматографа использовался TRACE GC Ultra с инжектором с делением/без деления потока. Для ввода образцов был использован автосамплер TriPlus RSH (Рисунок 1). Объем инъекции составил 2 мкл для всех образцов. Для анализа была использована колонка Thermo TRACE™ TR-5MS GC (60 м, 0.25 мм, 0.1 мкм). Температурная программа описана в Таблице 1.

Ввод образца был проводился методом горячей иглы. Пустая игла нагревалась 2-3 секунды перед вводом образца, таким образом устранялась дискриминация легколетучих конгенов.

Масс-спектрометр DFS использовался в режиме детектирования нескольких ионов (multiple ion detection - MID) с разрешением 10,000 (на уровне 10% от высоты пика). В качестве стандарта использовался FC43 (опорный и калибровочный пики). Эти референтные пики были использованы в каждом сканировании для достижения высочайшей точности определения массы, стабильности и надежности, необходимых для рутинного анализа методом хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения. Для определения каждого из диоксинов и фуранов, а также для их ¹³C-меченных внутренних стандартов, в настройках режима MID были использованы один масс-пик для количественного определения и один масс-пик для подтверждения по соотношению масс (Таблица 2). Эффективное разрешение постоянно определялось для референтных масс и фиксировалось в файлах для каждого диапазона метода MID.

Для других приложений может потребоваться изменение настроек режима MID, использованных в этом исследовании. Например, стандарты для метода EPA 1613 обычно не содержат ¹³C-меченный внутренний стандарт окта-ПХДФ, поэтому пики в скобках (Таблица 2) могут быть удалены в случае EPA 1613.

Выбор определяемых (целевых) масс-пиков для диоксинов и фуранов требует особого внимания и может варьироваться в зависимости от используемого метода. В данном случае вместо стандартного масс-пика m/z 375.81723 (81%) для подтверждения по соотношению масс для гекса-ПХДФ был использован m/z 371.82300 (52%). Причина: референтный масс-пик FC43 m/z 375.980170 находится слишком близок к масс-пику определяемого ПХДФ, что может вызвать наложение. Выбор этого альтернативного иона снижает фоновый шум и повышает соотношение сигнал/шум для определяемого ПХДФ. Сходная ситуация наблюдается в случае гепта-ПХДД (m/z 425.77317). В данном случае масс-пик FC43 (m/z 425.976977) находится слишком близко, что также может вызвать наложения.

| | |
|----------------------------|---|
| Температура инжектора | 260 °C |
| Время без деления потока | 1.5 мин, (продувка сетки длилась 1.2 мин) |
| Скорость потока | 50 мл/мин |
| Колонка | Thermo Scientific TRACE TR-5MS 60 м x 0.25 мм x 0.1 мкм |
| Скорость газа-носителя | 0.8 мл/мин |
| Температурная программа | 120 °C (3 мин) |
| (растворитель нонан) | 19 °C/ мин - 210 (0 мин) 3 °C/мин - 275 °C (12 мин) 20 °C/ мин - 300 °C (3 мин) |
| Температура линии переноса | 280 °C |

Таблица 1: Параметры ГХ.

| № диапазона MID. (диапазон) | Референтный масс-пик, (FC43) m/z O = опорный пик; K = калибр. пик | Целевой масс-пик m/z (A - аналит; BC - ¹³ C внутр. стандарт) | Время MID (интенсивность, время измерения мс) |
|--|--|---|---|
| 1 - Тетра- ПХДД/Ф (9.00 - 19.93 мин) | 313.98336 (O), 363.98017 (K) | 303.90088 (A), 305.89813 (A), 315.94133 (BC), 317.93838 (BC), 319.89651 (A), 321.89371 (A), 331.93680 (BC), 333.93381 (BC) | 0.75 с (O/K: 30, 4 мс; A: 1, 137мс; BC: 7, 19мс) |
| 2 - Пента- ПХДД/Ф (19.93 - 23.52 мин) | 313.98336 (O), 363.98017 (K) | 339.85889 (A), 341.85620 (A), 351.89941 (BC), 353.85702 (A !), 353.89646 (BC !), 355.85400 (A), 365.89728 (BC), 367.89433 (BC) | 0.80 с (O/K: 30, 4 мс; A: 1, 147мс; BC: 7, 21мс) |
| 3 - Гекса- ПХДД/Ф (23.52 - 26.98 мин) | 375.97974 (O), 413.97698 (K) | 371.82300 (A), 373.82007 (A), 385.86044 (BC), 387.85749 (BC), 389.81494 (A), 391.81215 (A), 401.85535 (BC), 403.85240 (BC) | 0.80 с (O/K: 30, 4 мс; A: 1, 147мс; BC: 7, 21мс) |
| 4 - Гепта-ПХДД/Ф (26.98 - 32.06 мин) | 413.97698 (O), 463.97378 (K) | 407.78101 (A), 409.77826 (A), 419.82147 (BC), 421.81852 (BC), 423.77588 (A), 425.77317 (A), 435.81638 (BC), 437.81343 (BC) | 0.90 с (O/K: 35, 4 мс; A: 1, 169мс; BC: 7, 24мс) |
| 5 - Окта-ПХДД/Ф (32.06 - 36.00 мин) | 425.97681 (O), 463.97378 (K) | 441.74219 (A), 443.73929(A), (453.78250 (BC)), (455.77955 (BC)), 457.73706 (A), 459.73420 (A), 469.77741 (BC), 471.77446 (BC) | 0.95 с (O/K: 40, 4 мс; A: 1, 183мс; BC: 7, 22мс) |

Таблица 2: Настройки HRMS (режим MID) для анализа ПХДД and ПХДФ: MID в режиме захвата (ширина захвата: 0.3 u, задержка сканирования: 10 мс).

Несмотря на данные эффекты, FC43 имеет практические преимущества перед другим стандартом - ПФК. В случае анализа диоксинов, FC43 дает референтные масс-пики высокой интенсивности для всех диапазонов MID, даже в случае уменьшенного потока референтного газа через источник ионов. Также ввиду более низкой температуры кипения, FC43 загрязняет ионный источник намного слабее ПФК.

Оптимизация энергии электронов очень важна для получения хороших результатов. Наилучшая чувствительность была достигнута при значении 48 эВ. Этот параметр нужно определять для каждого масс-спектрометра DFS только один раз; обычно значения лежат в диапазоне от 40 до 50 эВ. В процессе оптимизации анализа наилучшие результаты были достигнуты при автоматической настройке ионного источника на референтном масс-пике FC43 (m/z 414) с разрешением 10,000 как показано в Таблице 3.

| | |
|-----------------------|---------------------------------------|
| Режим ионизации | EI (положительный) |
| Энергия электронов | 48 эВ |
| Температура источника | 270 °C |
| Разрешение | 10 000 (на уровне 10% от высоты пика) |

Таблица 3: Параметры HRMS.

Измерение образцов

Чтобы показать чувствительность, стабильность и надежность измерений проводились два типа экспериментов. В первом были выполнены 72 последовательных инъекции 17 фг/мкл стандарта 2,3,7,8-ТХДД (получен разбавлением стандарта 100 фг/мкл ТХДД, Wellington Laboratories Inc., Guelph, ON, Canada). Во втором было проведено измерение реальных образцов крови, содержащих полный набор диоксинов и фуранов в низкой концентрации (20 фг/мкл для 2,3,7,8-ТХДД). Было проведено несколько серий повторных измерений.

Проверка хроматографического разделения осуществлялась на стандарте CS1 для метода EPA 1613 (разбавление 1:10 = 50 фг/мкл ТХДД/Ф; 250 фг/мкл пента-ПХДД/Ф и гепта-ПХДД/Ф; 500 фг/мкл окта-ПХДД/Ф, Cambridge Isotope Laboratories Inc., Andover, MA, USA).

Результаты

Результаты разделения образца стандарта EPA 1613 CS1 (50 фг/мкл ТХДД/Ф) с использованием параметров ГХ, описанных в Таблице 1 показаны на Рисунке 3. Эти параметры также использовались для образцов крови.

Чувствительность прибора продемонстрирована путем анализа стандарта ТХДД (20 фг/мкл), результаты показаны на Рисунке 5.

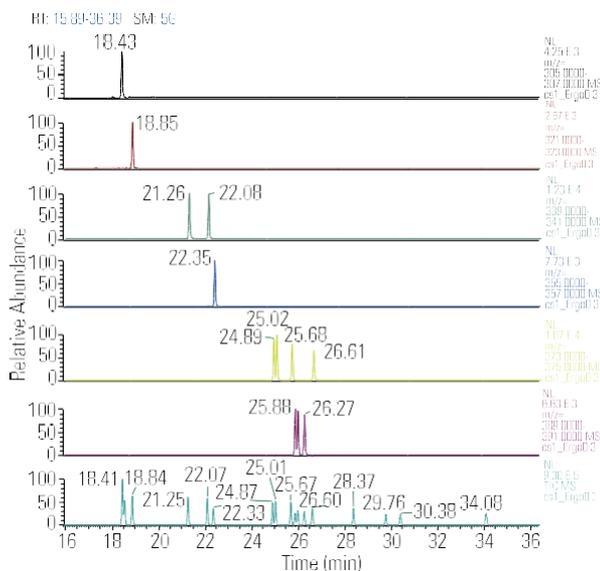


Рисунок 3: ГХ-разделение стандарта EPA 1613 CS1 (разбавление 1:10, 50 фг/мкл TCDD), условия ГХ указаны в Таблице 1.

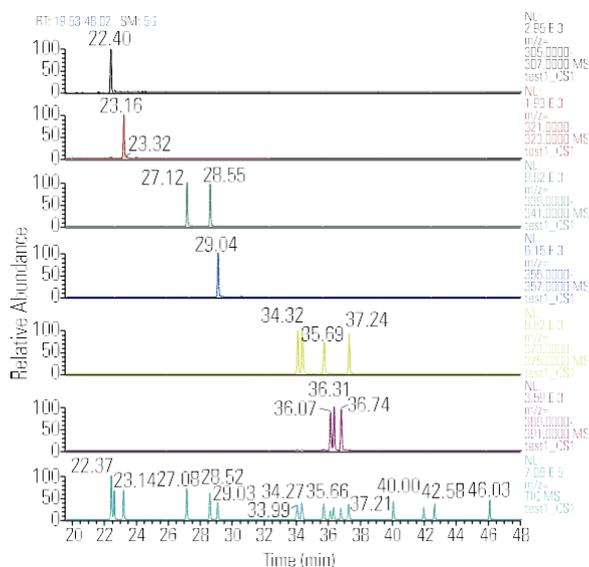


Рисунок 4: EPA CS1 стандарт (разбавление 1:10), улучшение ГХ-разделения путем увеличения времени анализа, температурный режим печи ГХ: 120 (2)-10-220(10)-3-235(7)-4.6-310(1).

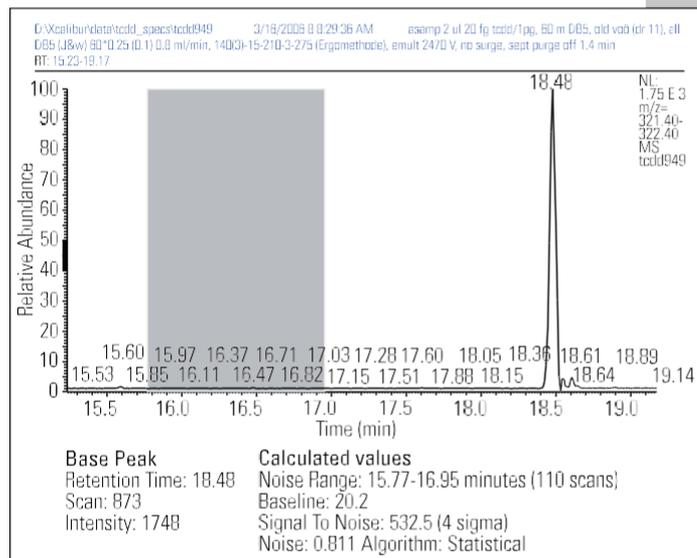


Рисунок 5: Стандарт ТХДД (20 фг/мкл) дает S/N > 500:1 при использовании 60 м колонки, условия ГХ даны в Таблице 1.

Для демонстрации эффективности анализа низких концентраций диоксинов в сложных матрицах была выполнена серия повторных инъекций реальных образцов экстрактов крови. Типичная хроматограмма, полученная в результате анализа следовых количеств 2,3,7,8-ТХДД (20 фг/мкл), показана на Рисунке 6.

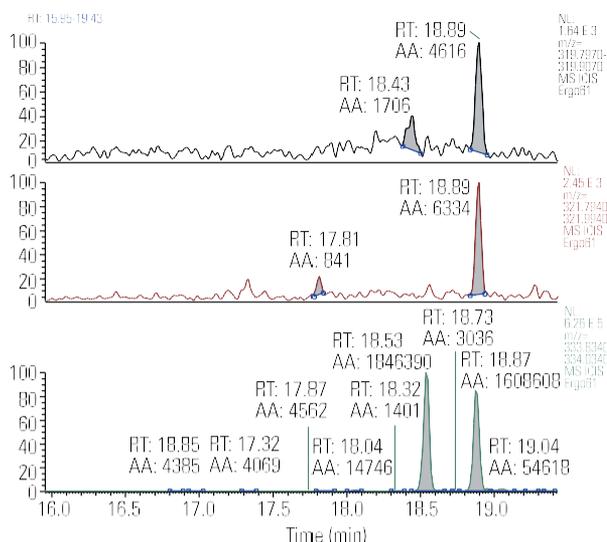


Рисунок 6: Хроматограммы экстрактов крови (20 фг/мкл ТХДД), (условия анализа в Таблицах 1-3) по масс-пику для подтверждения ТХДД (вверху), масс-пику для кол. определения ТХДД (средний) и пику для кол. определения стандарта ¹³С-ТХДД (внизу).

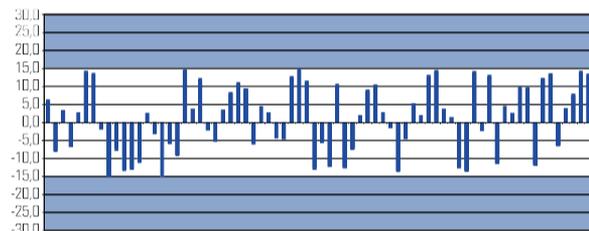


Рисунок 7: Подтверждение по соотношению масс m/z 320/322 в % для нескольких повторных анализов стандарта ТХДД (17 фг/мкл).

Было проведено подтверждение по соотношению масс (отношение площадей по масс-пику для подтверждения) для всех ПХДД и ПХДФ при нескольких последовательных анализах (17 фг/мкл) стандартов и образцов крови (Рисунки 7 и 8). Результаты как для стандарта 2,3,7,8-ТХДД, так и для образцов крови, укладываются в диапазон $\pm 15\%$, что полностью соответствует требованиям EPA 1613.

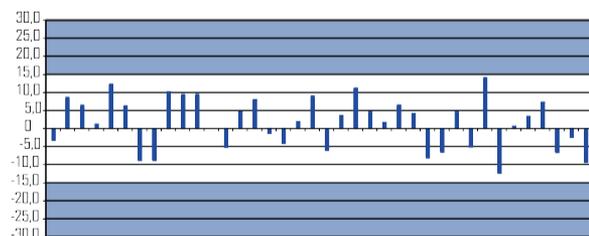


Рисунок 8. Подтверждение по соотношению масс m/z 320/322 в % для нескольких повторных анализов экстракта крови.

Выводы

С помощью GC-HRMS-спектрометра DFS возможно определение диоксинов и фуранов на уровне фемтограммов в образцах пищи и кормов, а также природных и биологических образцах. Сложные матрицы не являются препятствием для проведения анализа.

Надежность, чувствительность и долговременная стабильность результатов, получаемых на масс-спектрометре DFS продемонстрированы путем серии повторных анализов образца со сложной матрицей: экстракта крови. Результаты, получаемые с помощью GC-HRMS-спектрометра DFS являются надежными и достоверными и могут использоваться в качестве доказательства в случае арбитражных споров.

Литература

- [1] Lorber, M., A pharmacokinetic model for estimating exposure of Americans to dioxin-like compounds in the past, present, and future, *Sci. Tot. Environ.* 288 (2002), 81-95.
- [2] United States Environmental Protection Agency (USEPA), Exposure and Human Health Reassessment of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin and Related Compounds, Washington, D.C.:National Center for Environmental Assessment, U.S. Environmental Protection Agency (2000) EPA/600/P-00/001Be.
- [3] Council Directive 2006/13/EG, February 3, 2006 concerning the "Zur Änderung der Anhänge I und II der Richtlinie 2002/32/EG des Europ. Parlamentes und des Rates über unerwünschte Stoffe in Futtermitteln in Bezug auf Dioxine und dioxinähnliche PCB, Off. J. Europ. Communities L32/44, Feb 4, 2006.
- [4] Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, Off. J. Europ. Communities L221/8, 17.8.2002.
- [5] Council Directive 2002/69/EC, July 26, 2002 laying down the sampling methods and the methods of analysis for the official control of dioxins and the determination of dioxin-like PCBs in foodstuffs, Off. J. Europ. Communities L209/5, 6.8.2002.
- [6] Council Directive 2002/70/EG, July 26, 2002 establishing requirements for the determination of levels of dioxins and dioxin-like PCBs in feedingstuffs, Off. J. Europ. Communities L209/15, 6.8.2002.
- [7] Method 1613 Rev.B, Tetra- through Octa-Chlorinated Dioxins and Furans by Isotope Dilution HRGC/HRMS, U.S. Environmental Protection Agency Office of Water Engineering and Analysis Division, Washington, Oct 1994.
- [8] Patterson, D.G. Jr., Welch, S.M., Focant J.-F., Turner, W.E., The Use Of Various Gas Chromatography And Mass Spectrometry Techniques For Human Biomonitoring Studies, Lecture at the 26th Int. Symp. Halogenated Persistent Organic Pollutants, Oslo, Norway, 21.-25. Aug., 2006.
- [9] Turner, W.E., Welch, S.M., DiPietro, E.S., Whitfield, W.E., Cash, T.P., McClure, P.C., Needham, L.L., Patterson, D.G Jr., Instrumental approaches for improving the detection limit for selected PCDD congeners in samples from the general U.S. Population as background levels continue to decline, Poster at the 26th Int. Symp. Halogenated Persistent Organic Pollutants, Oslo, Norway, 21.-25. Aug., 2006.

Помимо данных
офисов Вы можете
обратиться к
дистрибьютору,
работающему в
Вашем регионе

Африка
+43 1 333 5034 127
Австралия
+61 2 8844 9500
Австрия
+43 1 333 50340
Бельгия
+32 2 482 30 30
Канада
+1 800 530 8447
Китай
+86 10 8419 3588
Дания
+45 70 23 62 60
Европа, другие
страны
+43 1 333 5034 127
Франция
+33 1 60 92 48 00
Германия
+49 6103 408 1014
Индия
+91 22 6742 9434
Италия
+39 02 950 591
Япония
+81 45 453 9100
Латинская Америка
+1 608 276 5659
Средний Восток
+43 1 333 5034 127
Нидерланды
+31 76 579 55 55
Южная Африка
+27 11 570 1840
Испания
+34 914 845 965
Швеция/Норвегия
/Финляндия
+46 8 556 468 00
Швейцария
+41 61 48784 00
Великобритания
+44 1442 233555
США
+1 800 532 4752

www.thermo.com

МС-аналитика
ХРОМАТОГРАФИЯ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ

thermo
scientific
Authorized Distributor

Контакты:
Тел./Факс.: +7(495)995-88-90
Почта: moscow@textronica.com

Thermo Fisher Scientific
(Bremen) GmbH is certified
DIN EN ISO 9001:2000

AN30112_E_03/08

Thermo
SCIENTIFIC