



Wysokorozdzielcza spektrometria mas czasu przelotu w oznaczaniu dioksyn

Agnieszka Ulanowska, Grzegorz Strączyński*

W ostatnich latach naukowcy zwrócili szczególną uwagę na zwiększające się zanieczyszczenie środowiska naturalnego oraz jego negatywny wpływ na organizmy żywe. Zaobserwowano, że niektóre związki chemiczne, jak ksenobiotyki czy dioksyny, przedostające się do środowiska, powodują znaczne obniżenie płodności u ludzi i zwierząt. Szczególnie niebezpieczne są dioksyny (polichlorowane dibenzo-para-dioksyny oraz polichlorowane dibenzofurany) i polichlorowane bifenyle (PCB), które kumulując się w tkance tłuszczowej, zakłócają wydzielanie hormonów steroidowych, co w konsekwencji prowadzi do bezpłodności. Substancje te wykazują także negatywny wpływ na proces replikacji kodu genetycznego w rozmnażających się komórkach [1]. Bezpośrednim źródłem dioksyn są przestarzałe spalarnie odpadów, huty żelaza i metali kolorowych, przetwórnictwo surowców wtórnych, procesy spalania śmieci na wolnym powietrzu lub w piecach do ogrzewania domów, a także podczas składowania odpadów na wysypiskach. Niebezpieczne dioksyny oraz PCB przedostają się wówczas do atmosfery, wód gruntowych

i gleby, a ze środowiska trafiają do ludzi i zwierząt, kumulując się w tkance tłuszczowej. Substancje te słabo rozpuszczają się w wodzie, stąd szacuje się, że w wodzie pitnej jest ich od 0,005 do 0,1 pg-TEQ/L (ang. toxicequivalency, TEQ odnosi się do poziomu toksyczności dioksyn i PCB). Zawartość dioksyn w tkance ludzkiej zależy przede wszystkim od diety i sposobu życia. Wykazano, że średni okres wydalania połowy masy dioksyn z organizmu zwierząt stałocięplnych i ludzi wynosi od 7 do 10 lat. Przy czym należy wziąć pod uwagę, że stężenie dioksyn w tkance zwiększa się wraz z wiekiem, ponieważ codziennie z pożywieniem przyjmuje się nową dawkę tych substancji [1]. Oznaczanie dioksyn jest bardzo trudnym zadaniem, ponieważ występują one w przyrodzie w śladowych ilościach. Wyzwanie stanowi także ich ogromna różnorodność. Istnieje w sumie 75 tzw. kongenerów polichlorowanych dibenzo-*p*-dioksyn (ang. polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, PCDDs) i 135 polichlorowanych dibenzofuranów (ang. polychlorinated dibenzofurans, PCDFs) zaklasyfikowanych do grupy trwałych zanieczyszczeń organicznych (ang. persistent organic pollu-

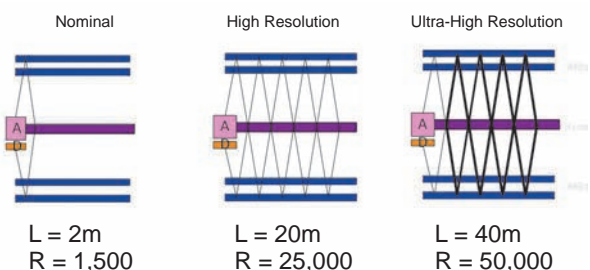
tants, POPs), z których 17 stwarza zagrożenie pod względem toksykologicznym. Polichlorowane bifenyle (ang. polychlorinated biphenyls, PCBs) stanowią grupę 209 różnych kongenerów, które można podzielić na dwie grupy, biorąc pod uwagę ich właściwości toksykologiczne: 12 kongenerów wykazuje właściwości toksykologiczne podobne do dioksyn, przez co często określa się je jako „polichlorowane bifenyle o działaniu podobnym do dioksyn” (ang. dioxin-like PCBs, DL-PCBs). Pozostałe polichlorowane bifenyle nie wykazują toksyczności podobnej do dioksyn, ale mają inne właściwości toksykologiczne i są określane jako „polichlorowane bifenyle o działaniu niepodobnym do dioksyn” (ang. non-dioxin-like PCBs, NDL-PCBs). Każdy kongener dioksyn lub polichlorowanych bifenyli o działaniu podobnym do dioksyn wykazuje nieco inny poziom toksyczności. Wprowadzenie koncepcji tzw. współczynników toksyczności (TEF) umożliwia sumaryczne wyrażenie toksyczności tych różnych kongenerów i ułatwia ocenę ryzyka oraz urzędową kontrolę. Dlatego też wyniki badań analitycznych odnoszące się do wszystkich

dioksyn oraz kongenerów polichlorowanych bifenyli o działaniu podobnym do dioksyn stanowiących zagrożenie toksykologiczne są wyrażone w policzalnych jednostkach zwanych równoważnikami toksyczności [2].

Badanie zawartości dioksyn i dioksynopodobnych kongenerów PCB wymaga wyizolowania ich z badanej próbki i wyeliminowania zanieczyszczeń utrudniających oznaczenie, co stanowi dla analityka nie lada wyzwanie, ponieważ stężenie dioksyn waha się poziomem ng. Istotnym problemem są także straty dioksyn z badanej próbki podczas jej przygotowania do analizy. W celu kontroli tego procesu, do próbki wprowadza się wzorce odzysku, są to bardzo kosztowne wzorce znaczone izotopowo: ^{13}C -PCDDs, ^{13}C -PCDFs i ^{13}C -PCBs. W związku z tym, przygotowanie próbki do analizy jest długotrwałą i kosztowną procedurą analityczną. Oznaczanie dioksyn prowadzone jest w nielicznych laboratoriach, specjalizujących się głównie w tego typu oznaczeniach i wyposażonych w wysoko wyspecjalizowany sprzęt, najczęściej są to wysokorozdzielcze spektrometry mas sprzężone z chromatografią gazową.

Tabela 1. Obserwowane zdolności analityczne Pegasus GC-HRT względem kryteriów zawartych w dyrektywie EPA 1613b [3]

| Atrybut metody | Wymagania EPA | Pegasus GC-HRT |
|-----------------------------|---|--|
| Rozdzielczość MS | Nie niższa niż 10 000 w 10% dolinie dla m/z 304 | >10 000 dla m/z 303,9016 oraz 305,8987 |
| Względna abundancja izotopu | 85-115% | 103% |
| Stabilność „lock mass” | Wariancja nie wyższa niż 20% | < 5% |
| Czułość | Minimum 0,5 ppb | < 0,05 ppb |
| Energia jonizacji | 28 – 40 eV | 40 eV |



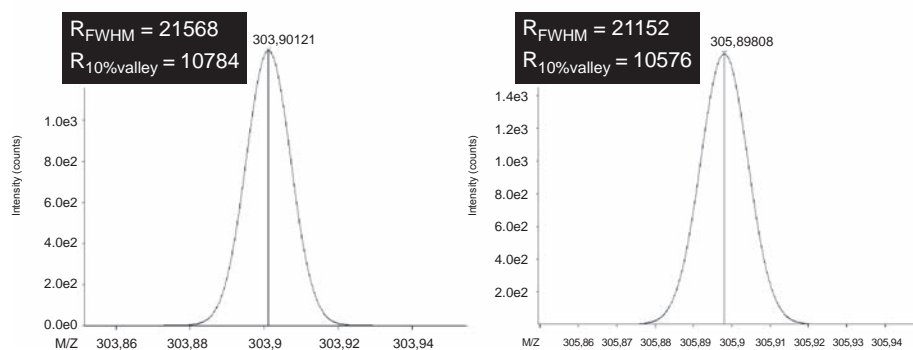
Rys. 1. Trzy tryby rozdzielczości Pegasus GC-HRT, w przypadku każdego z nich aparat rejestruje 200 widm mas w ciągu sekundy, L – długość toru przelotu jonów, R – rozdzielczość (FWHM) [3]

Do tej pory do analizy dioksyn powszechnie stosowano spektrometry mas z sektorem magnetycznym, w przypadku których najłatwiej było osiągnąć wysoką rozdzielczość. Jednakże sektory magnetyczne charakteryzują się małą szybkością akwizycji danych, co zmusza analityków do pracy w trybie monitorowania wybranych jonów (ang. selection monitoring, SIM), aby uzyskać pożądany wynik analizy. W 2011 roku firma LECO Corporation wprowadziła na rynek wysokorozdzielczy spektrometr mas czasu przelotu sprzężony z chromatografią gazową (GC-TOFMS) o nazwie Pegasus GC-HRT, który według przeprowadzonych testów, spełnia kryteria analityczne zawarte w dyrektywie EPA 1613b (Amerykań-

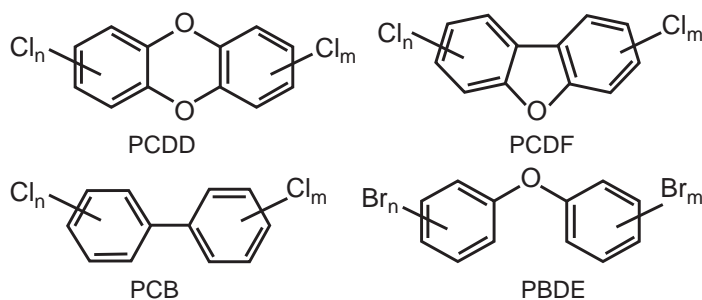
skiej Agencji Ochrony Środowiska) dotyczącej oznaczania dioksyn. Dzięki zastosowaniu technologii Folded Flight Path i wyposażeniu Pegasus GC-HRT w wieloodbiciowy analizator czasu przelotu (ang. multi-reflecting TOF), uzyskano wydłużenie toru przelotu jonów do 40 m i polepszenie rozdzielczości względem li-

niowego analizatora TOF. Aparat może pracować w trzech trybach rozdzielczości: nominalnej, gdzie $R = 1\ 000$, wysokiej $R = 25\ 000$ oraz maksymalnej $R = 50\ 000$, zachowując w przypadku każdej z nich dużą szybkość rejestrowania danych równą 200 widm/s. Na rys. 1 zobrazowano schemat przelotu jonów w wieloodbiciowym analizatorze czasu przelotu w zależności od zastosowanej rozdzielczości. Według wymagań EPA, system wykorzystywany do analizy dioksyn musi charakteryzować się jednocześnie wysoką rozdzielczością, dużą czułością (poniżej 0,5 ppb), odpowiednią wartością względną abundancji izotopu, stabilnością wskazań detektora podczas wykonywania analiz oraz odpowiednią energią jonizacji. Pegasus GC-HRT pomyślnie przeszedł badania mające na celu sprawdzenie jego parametrów technicznych pod kątem oznaczania dioksyn i PCB[3]. W tabeli 1 zebrano wytyczne zawarte w dyrektywie EPA 1613b dotyczące aparatury oraz parametry uzyskane za pomocą Pegasus GC-HRT. Okazało się, że w przypadku warunku rozdzielczości

$R_{10\%} = 10\ 000$ dla jonu $m/z = 304$, a dokładnie $m/z\ 303,9016$ oraz $305,8987$, Pegasus GC-HRT pozwala na uzyskanie znacznie lepszych wyników, niż wymagane przez EPA (patrz rys. 2). Według dyrektywy EPA, dla dioksyn zawierających 8 atomów chloru w cząsteczce, czyli OCDD i OCDF, względny stosunek jonów (M+2) i (M+4) powinien zawierać się od 0,76 do 1,02 (wartość średnia 0,89). Zmierzone za pomocą Pegasus GC-HRT średnie wartości stosunków dla OCDD i OCDF wynoszą odpowiednio 0,916 i 0,910. Aparat ten wykazuje także dużą stabilność sygnałów pochodzących od substancji stosowanej do kalibracji systemu (poniżej 5%) [3]. W przyrodzie istnieje ogromna ilość substancji zaliczanych do grupy trwałych zanieczyszczeń organicznych (POPs), m.in. PCDDs, PCDFs, PCBs oraz polibromowane etery difenylowe (PBDEs). Na rys. 3 przedstawiono wzory strukturalne substancji należących do grupy POPs. Oznaczenie większości tych substancji obok siebie w jednej próbce jest bardzo trudne, ponieważ rozważane związki chemiczne mogą występować w bardzo szero-



Rys. 2. Widmo mas TCDF ($m/z = 303,9016$ oraz $305,8987$) wykonane w trybie wysokiej rozdzielczości obrazujące izotopy M i M+2 z obliczonymi rozdzielczościami dla obu jonów: 10784 i 10576 (w 10% dolinie) [3]



Rys. 3. Struktury substancji zaliczanych do trwałych zanieczyszczeń organicznych (POPs) [4]

kim zakresie stężeń, przez co obecność jednych może maskować inne. Ponadto, halogenowe pochodne związków organicznych należące do tej samej klasy chemicznej dają bardzo podobne widma mas, powodując niekiedy ogromne trudności w ich jednoznacznej identyfikacji. W próbkach, oprócz POPs, mogą występować również ich produkty rozpadu oraz inne halogenopochodne [4].

Pegasus GC-HRT wykorzystano do ukierunkowanej analizy PCBs w osadzie rzeczny. Przed badaniem, próbkę osadu poddano ekstrakcji mieszaniną rozpuszczalników: dichlorometan/heksan (1:4 v/v), oczyszczono na żelu krzemionkowym i odmyto za pomocą wspomnianej mieszaniny rozpuszczalników [4]. Ekstrakt odparowano do objętości 1 ml i poddano analizie za pomocą systemu GC-HRT przy zastosowaniu wysokiej i ultra-wysokiej rozdzielczości aparatu (odpowiednio $R=25\ 000$ i $R=50\ 000$). W ekstrakcie z osadu wykryto trzy kontenery PCBs: CB 47, CB 162 i CB 209. Na rys. 4 zaprezentowano uzyskane widma mas tych kongenerów z opisanymi wartościami obliczonej masy jonu molekularnego, zmierzonej masy jonu molekularnego, eksperymentalnie

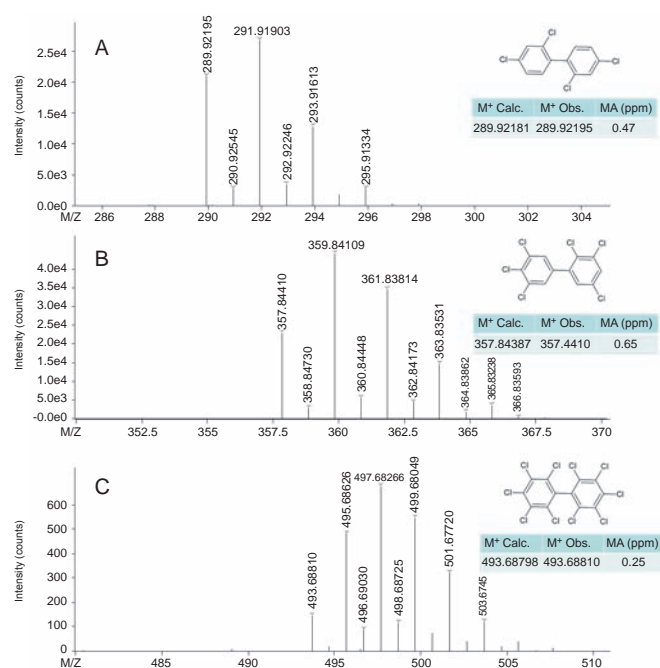
masy jonu molekularnego oraz dokładności pomiaru mas dla CB 47, CB 162 i CB 209. Wykonane widma mas PCBs wykazują bardzo dobre dopasowanie z widmami zamieszczonymi w bibliotece NIST, ich podobieństwo wyniosło odpowiednio: 953, 826 oraz 865. Doskonałej jakości widma mas rejestrowane za pomocą GC-HRT wykazują bardzo dużą korelację pomiędzy oczekiwanymi i obserwowanymi wartościami stosunków względnej abundancji klastrowych jonów molekularnych PCBs.

Analogiczne badania z zastosowaniem maksymalnej rozdzielczości Pegasus GC-HRT ($R = 50\ 000$) wykonano dla ekstraktu z tkanek ryb w celu oznaczenia substancji należących do POPs [4]. W badanych próbkach zidentyfikowano 70 substancji należących do grupy polichlorowanych bifenyli oraz 7 innych substancji chloroorganicznych, które zalicza się do POPs. Średni błąd pomiaru mas wyniósł 1,01 ppm. Wyłącznie dzięki zastosowaniu aparatu o wysokiej rozdzielczości możliwe było rozdzielanie i zidentyfikowanie fragmentów jonu o nominalnej masie 324, która odpowiada jonowi $[M-Cl_2+2]^{+*}$ dla CB 180 i jonowi $[M-Br_2]^{+*}$ dla BDE 47

(patrz rys. 5). Według Alaei i wsp., rozdzielanie tego typu izobarów wymaga zastosowania aparatu o rozdzielczości nie niższej niż 25 000 ($m/\Delta m$) [5]. Prezentowany eksperyment wyraźnie wskazuje na fakt, że stosowanie Pegasus GC-HRT pozwala na jednoznaczne identyfikowanie substancji należących do grupy POPs obecnych w próbce na różnym poziomie stężeń, jak również w obecności różnego rodzaju zanieczyszczeń.

Celem kolejnego badania było wykonanie nieukierunkowanej analizy substancji zawartych w popiele lotnym za pomocą Pegasus GC-HRT przy wykorzystaniu wysokiej rozdzielczości aparatu ($R=25\ 000$) [6]. W bardzo złożonej próbce popiołu wykryto 76 dioksyn, wśród których były PCDDs i PCDFs, a także substancje heterocykliczne zawierające atom tlenu w cząsteczce. Pomiaru masy jonów

dokonano z dużą dokładnością ($\leq 1,2$ ppm). Podczas identyfikacji zastosowano porównanie widm z biblioteką NIST, gdzie współczynnik dopasowania wynosił zawsze powyżej 800. W próbce wykryto także chlorowane wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne oraz wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (ang. polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs), które występowały w próbce na znacznie wyższym poziomie stężeń, niż dioksyny. Oprócz dioksyn w lotnym popiele zidentyfikowano jeszcze 4 substancje należące do grupy PAHs oraz 5 chlorowanych PAHs. W przypadku tych ostatnich bardzo łatwo dokonano identyfikacji, ponieważ błąd pomiaru mas wyniósł od 0,35 – 0,13 ppm, zaś dopasowanie z biblioteką mas od 821 do 918. Na rys. 6 zamieszczono chromatogram wybranych jonów (ang. extracted ion chromatogram,

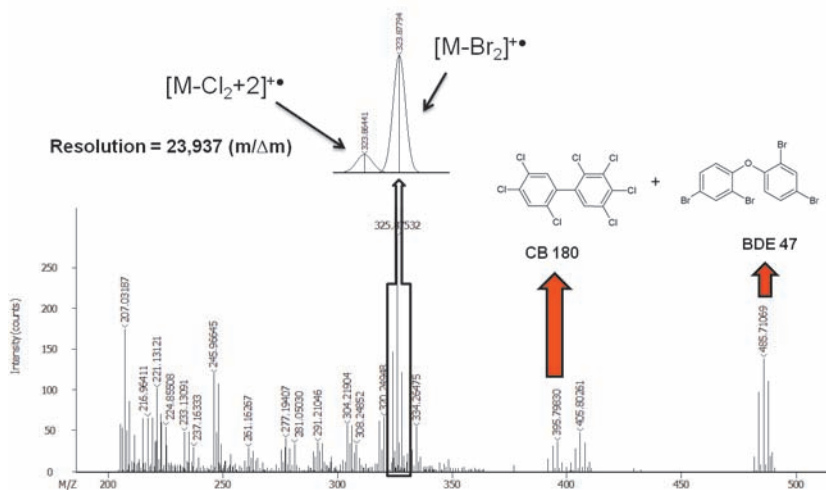


Rys. 4. Widma mas kongenerów: CB 47, CB 162 i CB 209 z zaznaczonymi wartościami obliczonej masy jonu molekularnego, zmierzonej masy jonu molekularnego oraz dokładności pomiaru mas [4]

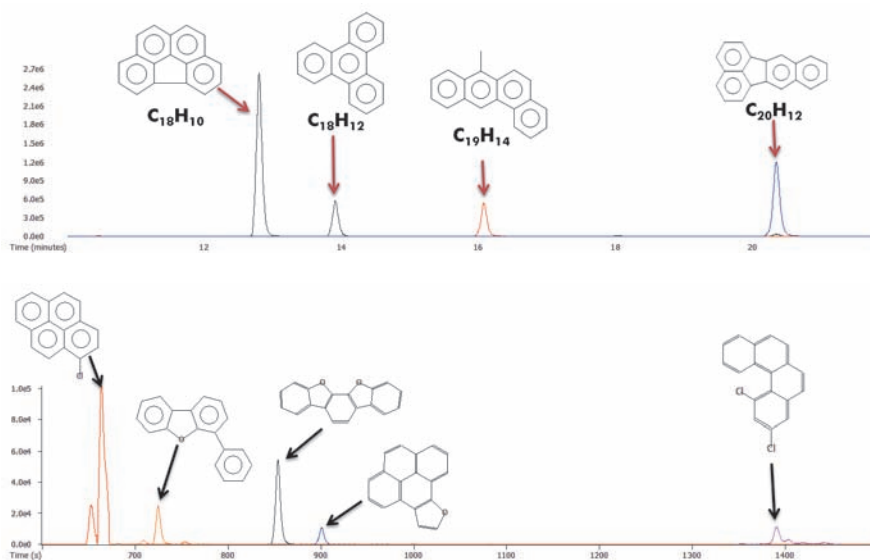
XIC) PAHs oraz chlorowanych i heterocyklicznych substancji wykrytych w próbce lotnego popiołu.

Stosowanie wysokorozdzielczej spektrometrii mas czasu przelotu do analizy próbek środowiskowych jak również biologicznych, pozwala na czułe i selektywne oznaczanie dioksyn w różnego rodzaju matrycach zgodnie z wymaganiami EPA. Pegasus GC-HRT umożliwia kompletną analizę jakościową i ilościową substancji występujących na śladowym poziomie stężeń w próbkach o bogatej matrycy. System ten może zastąpić spektrometry mas wyposażone w sektor magnetyczny, które ze względu na wysoką rozdzielczość są stosowane w laboratoriach analitycznych głównie do oznaczania dioksyn.

Wychodząc naprzeciw stale rosnącym wymaganiom analitycznym, firma LECO Corporation prowadzi prace nad systemem kompletnej dwuwymiarowej chromatografii gazowej sprzężonej z wysokorozdzielczą spektrometrią mas czasu przelotu (GCxGC-HRT). Takie połączenie pozwoli na znaczne zwiększenie pojemności pikowej układu, a co za tym idzie polepszenie rozdzielania i obniżenie granic wykrywalności analitów. Umożliwi też w pewnym stopniu wyeliminowanie czasochłonnego procesu wstępnego oczyszczenia próbki. Nowoczesny system GCxGC-HRT będzie łączyć ze sobą wysoką rozdzielczość, dużą szybkość rejestrowania danych, doskonale rozdzielanie analitów oraz niskie granice ich wykrywalności. Czy można chcieć więcej...?



Rys. 5. Widmo mas BDE 47 i CB 180 obecnych w próbce tkanki rybnej [4]



Rys. 6. Chromatogram wybranych jonów PAHs (od góry) oraz chlorowanych i heterocyklicznych substancji (na dole) wykrytych w próbce lotnego popiołu [6]

Literatura

[1] A. Grochowalski, Badania nad oznaczaniem dioksyn w środowisku, Normalizacja 4 (2002) 3-9
 [2] Rozporządzenie Komisji (UE), NR 1259/2011 z dnia 2 grudnia 2011 r.
 [3] LECO Corporation, Meeting the Challenges of EPA 1613b Using Gas Chromatography with High Resolution Time-of-Flight Mass Spectrometry, LECO Application Note Form No. 203-821-421 3/12 (2012)

[4] LECO Corporation, Analysis of Persistent Organic Pollutants in Complex Matrices by Gas Chromatography - High Resolution Time-of-Flight Mass Spectrometry, LECO Application Note Form No. 203-821-409 1/12 (2012)
 [5] M. Alaei, S. Backus, C. Cannon, Potential interference of PBDEs in the determination of PCBs and other organochlorine contaminants using electron capture detection,

Journal of Separation Science 24 (2001) 465-469
 [6] LECO Corporation, High Performance Mass Spectrometry of Persistent Organic Pollutants: What Else Is In My Dioxin Sample?, LECO Application Note Form No. 203-821-420 3/12 (2012)

* Agnieszka Ulanowska, Grzegorz Strączyński, LECO Polska Sp. z o.o., Tychy, e-mail: leco@leco.com.pl