

Confirmación de dioxinas y furanos a concentraciones bajas en matrices complejas, usando GC/MS de Alta Resolución

Dirk Krumwiede, Hans-Joachim Hübschmann, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany

Introducción

En los últimos 30 años, se ha observado un descenso en los niveles de dioxinas (expresados en equivalentes tóxicos, TEQ), así como en la carga corporal a la cual se ve sometida la población general^{1,2}. Más del 90% de la exposición en humanos a dioxinas y otras sustancias relacionadas se produce a través de la alimentación². El descenso que se ha venido observando en los niveles de dioxinas en alimentos, piensos y tejidos exige disponer de medios capaces de aportar mejores límites de cuantificación, condiciones de selectividad y medidas de control de calidad que permitan confirmar con garantías la presencia de estos compuestos a niveles de concentración cada vez más bajos.



Figura 1: Espectrómetro de Masas Thermo Scientific DFS High Resolution GC/MS acoplado a dos cromatografos de gases TRACE GC Ultra™ equipados con un solo inyector automático común TriPlus™

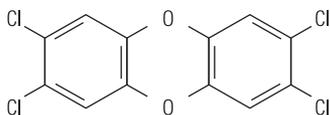


Figura 2: 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD)

En este sentido, HRGC/HRMS se presenta como la técnica analítica más adecuada para estos propósitos, en tanto que es capaz de cumplir con todos los criterios que son exigidos en este tipo de aplicaciones, y es actualmente exigida en los análisis de dioxinas y furanos que se realizan de acuerdo con las Directivas Europeas (Marco Legal Europeo) u otros estándares de análisis como el procedimiento 1613 Rev. B de la US EPA³⁻⁷. De igual modo, debido a su elevada especificidad, la HRGC/HRMS es una técnica analítica requerida en estas Directivas debido a su capacidad para confirmar positivamente la presencia del analito en la muestra.

Las nuevas Directivas reflejan la continua necesidad de una instrumentación analítica cada vez más sensible. Por

ejemplo, los nuevos métodos de confirmación requieren límites de cuantificación (LOQ) inferiores en un 80% respecto al nivel más bajo reportado por el método. Este requisito exige que la instrumentación analítica empleada alcance límites de detección aún más bajos. No obstante, con frecuencia, el mayor beneficio al trabajar con instrumentación con este grado de sensibilidad se obtiene al poder trabajar con cantidades de muestra cada vez más pequeñas.

Los instrumentos más modernos, como el DFS, permiten alcanzar estos niveles de detección tan bajos, incluso a nivel del attogrammo, como se mostró por primera vez en los resultados presentados en el 'Dioxin 2006' en Oslo, Noruega^{8,9}. Como consecuencia de ello, las muestras pueden ser analizadas más rápidamente, permitiendo así procesar un mayor número de ellas. La elevada sensibilidad del DFS HRGC/HRMS constituye la solución perfecta en muestras especialmente críticas.

Condiciones Experimentales

Las medidas fueron realizadas con un espectrómetro de masas de alta resolución DFS High Resolution GC/MS system acoplado a un cromatógrafo de gases TRACE GC Ultra™ equipado con un inyector split/splitless. Las muestras fueron introducidas en el cromatógrafo de gases con ayuda de un inyector automático TriPlus™ (ver Figura 1). El volumen de inyección fue de 2 µL para cada una de las muestras medidas. La separación cromatográfica de los analitos de interés se realizó con una columna cromatográfica capilar Thermo Scientific TRACE TR-5MS de 60 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno (ID) y 0.1 µm de espesor de fase. El programa de temperaturas empleado se detalla en la Tabla 1.

PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS

Temperatura del Inyector	260 °C
Tiempo de Splitless	1.5 min, (Purga del septum parada durante 1.2 min)
Flujo de purga	50 mL/min
Columna Cromatográfica	Thermo Scientific TRACE TR-5MS 60m x 0.25 mm x 0.1 µm
Flujo del gas Portador	0.8 mL/min
Programa de temperaturas del horno (disolvente: nonano)	120 °C (3 min) 19 °C/min - 210 (0 min) 3 °C/min - 275 °C (12 min) 20 °C/min - 300 °C (3 min)
Temperaturas de las líneas de transferencia	280 °C

Tabla1: Parámetros cromatográficos

Key Words

- DFS
- Dioxinas
- Furanos
- HRGC/HRMS

La muestra fue introducida en el cromatógrafo de gases utilizando la técnica denominada 'hot needle'. La aguja de la jeringa utilizada en el análisis, vacía, es precalentada durante un período de tiempo de 2 ó 3 segundos en el interior del inyector antes de introducir la muestra, eliminando así cualquier discriminación de aquellos congéneres que poseen un punto de ebullición más elevado.

Las condiciones de operación del espectrómetro de masas DFS incluyeron un registro de iones en modo de detección múltiple de iones (MID) a un poder de resolución de 10000 (10% del valle). Como sustancia de referencia se utilizó FC43, lo que permitió obtener las correspondientes masas de calibración y referencia ('lock' y 'cali'). Las masas de referencia fueron registradas 'scan-by-scan' con el fin de asegurar la más elevada precisión, estabilidad y robustez necesarias para el análisis rutinario de compuestos de interés mediante espectrometría de masas de alta resolución.

Las condiciones de análisis en modo MID incluyó la selección tanto de los congéneres nativos de dioxinas y furanos como de sus correspondientes estándares internos marcados isotópicamente con ¹³C, tal como se muestra en la Tabla 2. La bondad de la resolución es registrada constantemente de acuerdo con la masas de referencia seleccionadas (FC43) y documentada en los correspondientes archivos de datos para cada ventana de MID. En ocasiones es necesario realizar modificaciones o ajustes en el descriptor del MID en función de las aplicaciones que se realicen. Por ejemplo, el método 1613 de la US EPA no considera el registro de la traza del octa-furano marcado isotópicamente con ¹³C, en consecuencia, los iones que se muestran entre paréntesis en la Tabla 2 pueden ser eliminados si se desea seguir de forma concisa este procedimiento.

Para la definición de los límites de los tiempos de retención de las diferentes ventanas de registro múltiple de iones, correspondientes a cada grupo de congéneres, es adecuado utilizar un patrón de referencia (como por ejemplo una ceniza volante).

La selección de los iones de confirmación de dioxinas y furanos requiere una especial atención y puede variar en función de los diferentes métodos de análisis aplicados. En este caso, se empleó el ión de relación masa/carga (m/z) 371,823000 (52%) para el hexa-furano nativo en vez del típico 375.81723 (81%) debido a que esta traza está muy cerca de la traza de referencia 375,980170 del FC43 y contribuye constantemente con una señal de base que redundante en un aumento del ruido de fondo, y en consecuencia del límite de detección. La selección de este ión como alternativa permite disminuir el ruido de fondo y en consecuencia incrementa el valor de la relación señal/ruido del registro del ión nativo de nuestro analito.

Una situación similar puede observarse para el caso de las hepta-dioxinas, para el ión m/z 425,77317. En este caso, el ión interferente del FC43 que pudiera producir interferencias es el 425.976977. En este sentido, la utilización de FC43 como sustancia de referencia ofrece ventajas frente al uso del PFK. Para el caso concreto del análisis de dioxinas, el FC43 es capaz de aportar iones de referencia con una buena intensidad para todas las ventanas del registro múltiple de iones, incluso a menores flujos de gas de referencia en el interior de la fuente de iones; en consecuencia el FC43 contamina menos la fuente que el PFK.

La optimización de la energía de ionización es un parámetro instrumental crítico para la obtención de los mejores resultados. En el caso particular del espectrómetro de masas DFS utilizado durante la realización de las medidas de demostración, la sensibilidad óptima se obtuvo operando a una energía de ionización de 48 eV. No obstante, este parámetro ha de determinarse para cada instrumento en particular, variando los valores típicos observados experimentalmente entre 40 y 50 eV.

Nº DE LA VENTANA MID (TIEMPO DE LA VENTANA)	IONES DE REFERENCIA (FC43) m/z		IONES A REGISTRAR m/z (n - native; is - ¹³ C int. std.)	TIEMPO DE CICLO EN MID (INTENSITY, DWELL TIME MS)
	L = LOCK MASS	C = CALI MASS		
1 – Tetra-PCDD/F (09.00 – 19.93 min)	313.98336 (L)	363.98017 (C)	303.90088 (n), 305.89813 (n), 315.94133 (is) 317.93838 (is), 319.89651 (n), 321.89371 (n) 331.93680 (is), 333.93381 (is)	0.75 s (L/C: 30, 4 ms; n: 1, 137 ms; is: 7, 19 ms)
2 – Penta-PCDD/F (19.93 – 23.52 min)	313.98336 (L)	363.98017 (C)	339.85889 (n), 341.85620 (n), 351.89941 (is) 353.85702(n), 353.89646 (is), 355.85400 (n) 365.89728 (is), 367.89433(is)	0.80 s (L/C: 30, 4 ms; n: 1, 147 ms; is: 7, 21 ms)
3 – Hexa-PCDD/F (23.52 – 26.98 min)	375.97974 (L)	413.97698 (C)	371.82300 (n), 373.82007 (n), 385.86044 (is) 387.85749 (is), 389.81494 (n), 391.81215 (n) 401.85535 (is), 403.85240 (is)	0.80 s (L/C: 30, 4 ms; n: 1, 147 ms; is: 7, 21 ms)
4 – Hepta-PCDD/F (26.98 – 32.06 min)	413.97698 (L)	463.97378 (C)	407.78101 (n), 409.77826(n), 419.82147 (is) 421.81852 (is), 423.77588 (n), 425.77317 (n) 435.81638 (is), 437.81343 (is)	0.90 s (L/C: 35, 4 ms; n: 1, 169 ms; is: 7, 24 ms)
5 – Octa-PCDD/F (32.06 – 36.00 min)	425.97681 (L)	463.97378 (C)	441.74219 (n), 443.73929(n), (453.78250 (is) 455.77955 (is), 457.73706 (n), 459.73420 (n) 469.77741 (is), 471.77446 (is)	0.95 s (L/C: 40, 4 ms; n: 1, 183 ms; is: 7, 22 ms)

Tabla 2: Condiciones del MS MID para el análisis de PCDD y PCDF: MID en modo lock (amplitud del primer 'lock': 0.3 u, retardo eléctrico: 10 ms)

Una vez optimizada la tensión de aceleración, los mejores resultados se obtienen en modo autotuning, o sea, realizando un reglaje automático de la fuente de iones y utilizando el ión con relación masa carga (m/z) 414 de la sustancia de referencia FC43 a un poder de resolución de 10000, tal como se indica en la Tabla 3.

PARÁMETROS DE REGLAJE

Modo de ionización	El positivo
Energía de Ionización	48 eV
Temperatura de la fuente	270 °C
Resolution	10 000 (10 % valley)

Tabla 3: Parámetros de reglaje

Análisis de Muestras

Con el fin de probar la sensibilidad, estabilidad y robustez del instrumento se llevaron a cabo dos tipos de experimentos diferentes. El primero de ellos consistió en una secuencia de 72 análisis repetidos en los cuales se analizaron los iones correspondientes a las TCDDs con la ayuda de un patrón de 2,3,7,8-TCDD de concentración 17 fg/μL (obtenida mediante la dilución de un estándar de 2,3,7,8-TCDD de concentración 100 fg/μL suministrado por Wellington Laboratorios Inc., Guelph, OT, Canadá).

El segundo experimento, consistió en el análisis de una serie de muestras reales, sobre las cuales se analizaron la totalidad de dioxinas y furanos en una muestra compuesta de sangre que contenía bajas concentraciones de dioxinas y furanos (por ejemplo, concentraciones de 2,3,7,8 TCDD de 20 fg/μL) y que fueron repetidamente analizadas en diferentes secuencias.

Con el fin de evaluar la resolución cromatográfica del sistema se empleó un método que incluía el análisis de un estándar, concretamente el estándar de calibración CS1 del método US EPA 1613 (dilución = 50 fg/μL tetras; 250 fg/μL pentas a hexas; 500 fg/μL octas, Cambridge Isotope Laboratories Inc., Andover, MA, USA).

Resultados

En la figura 3 se muestran los diferentes fragmentogramas correspondientes al análisis de un estándar de calibración EPA 1613 CS1 a concentraciones de 50 fg/μL para las TCDD y los TCDF, obtenidos de acuerdo a los parámetros cromatográficos descritos en la Tabla 1.

Estos parámetros cromatográficos fueron aplicados por extensión a toda la serie de análisis y experimentos realizados, incluyendo las muestras compuestas de sangre.

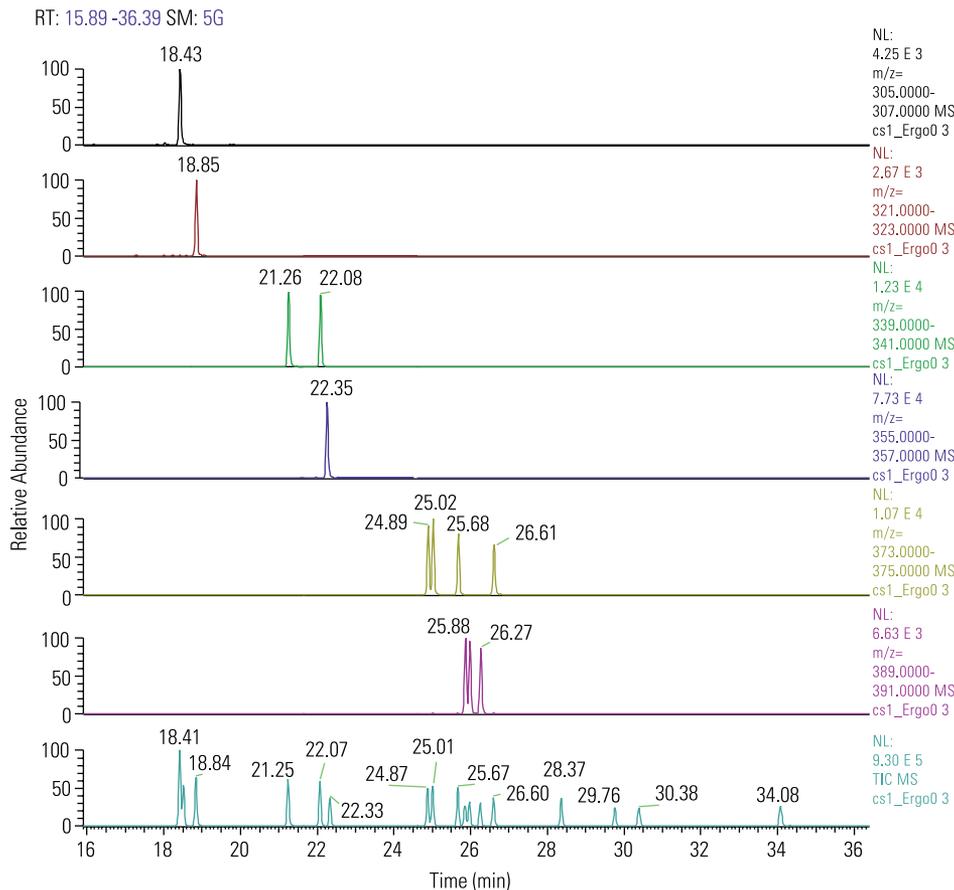


Figura 3: EPA CS1 Standard (dilución 1:10, 50 fg TCDD), parámetros cromatográficos en Tabla 1.

Tal como se muestra en la Figura 5, la sensibilidad instrumental es demostrada mediante la inyección de un estándar de TCDD a una concentración de 20 fg/μL.

Para demostrar el buen comportamiento del sistema en el análisis de dioxinas a bajas concentraciones en matrices complejas, se llevaron a cabo series repetidas de inyecciones de una muestra real compleja, concretamente de un extracto de una muestra compuesta de sangre. En la Figura 6, se muestra un cromatograma obtenido típico, en el que se observan trazas de 2,3,7,8-TCDD, cuantitativamente resueltas a concentraciones de 20 fg/μL.

La variación de la relación isotópica entre dos masas del cluster molecular de todos los analitos de interés (dioxinas y furanos) ha sido evaluada en series repetidas de análisis de un estándar con una concentración de 17 fg/μL y un extracto de una muestra compuesta de sangre (Figura 7 y 8). Los datos obtenidos tanto para la traza de la 2,3,7,8-TCDD en el estándar como en el extracto de sangre mostraron excelentes resultados presentando variaciones inferiores al intervalo comprendido entre ±15% y cumpliendo con los requisitos exigidos en el método 1613 de la US EPA.

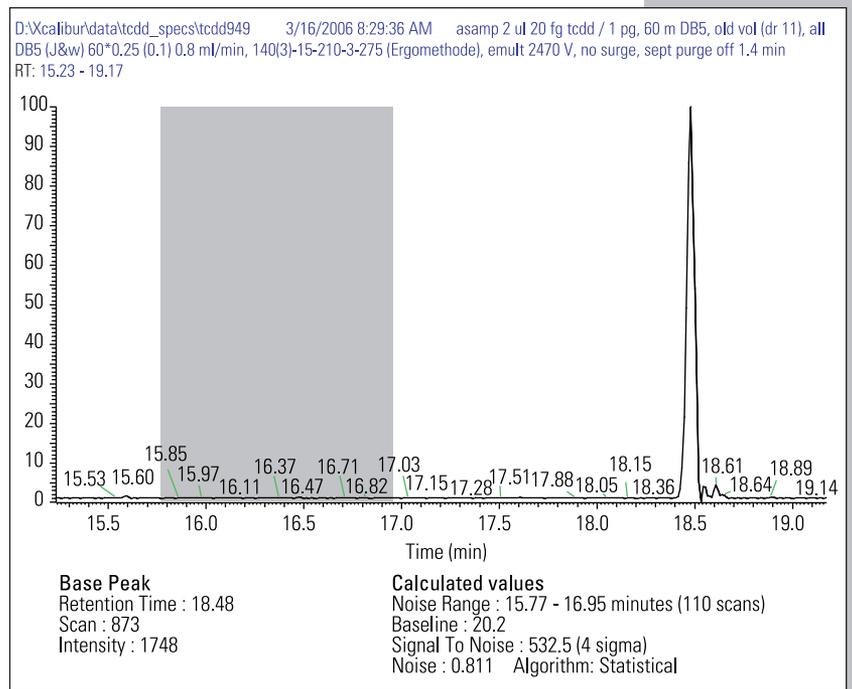


Figura 5: El análisis (2 μL) de un estándar de TCDD a una concentración de 20 fg/μL empleando una columna cromatográfica de 60 m de longitud y de acuerdo con los parámetros cromatográficos que se describen en la Tabla 1, permite obtener valores de relación S/N > 500:1.

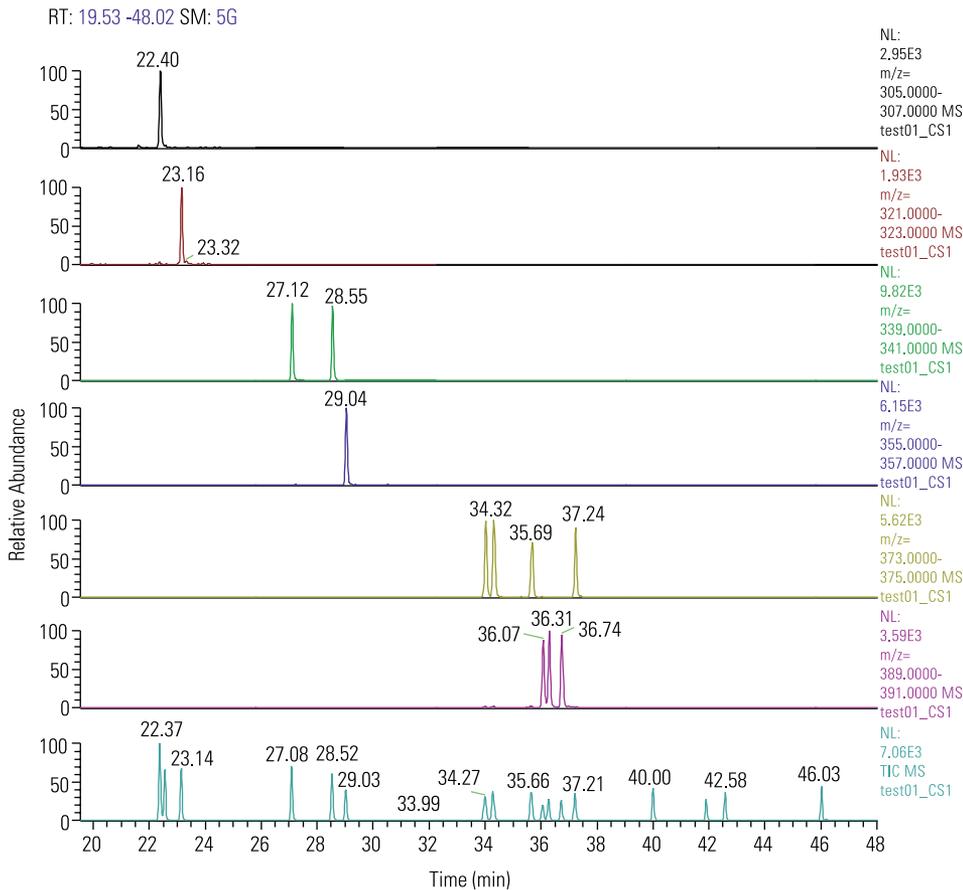


Figura 4: Separación cromatográfica mejorada de un estándar EPA 1613 CS1 diluido (dilución 1:10, 50 fg TCDD) a expensas de un programa de temperaturas con un mayor tiempo de análisis: 120(2)-10-220(10)-3-235(7)-4.6-310(1).

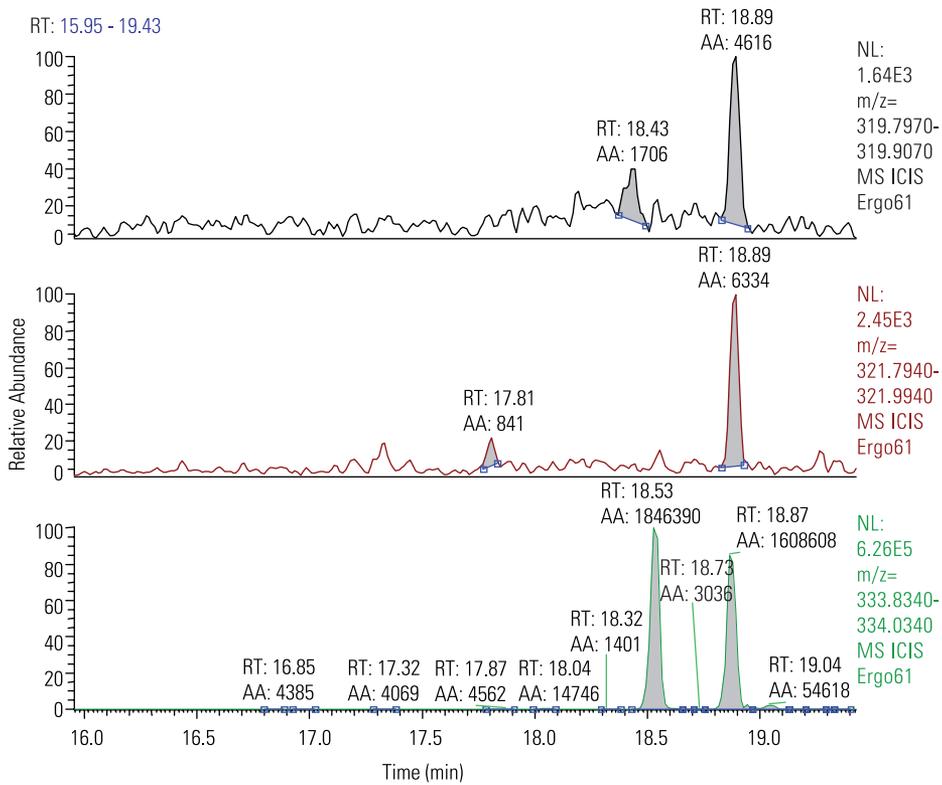


Figura 6: Análisis de un extracto (2 μ L) de una muestra de sangre (20 fg/ μ L TCDD) usando los parámetros cromatográficos descritos en la Tabla 1 – 3 con ión nativo de la TCDD (fragmentograma superior), ión nativo para cuantificación TCDD (fragmentograma intermedio), ión correspondiente al estándar interno de cuantificación 13C-TCDD (fragmentograma inferior).

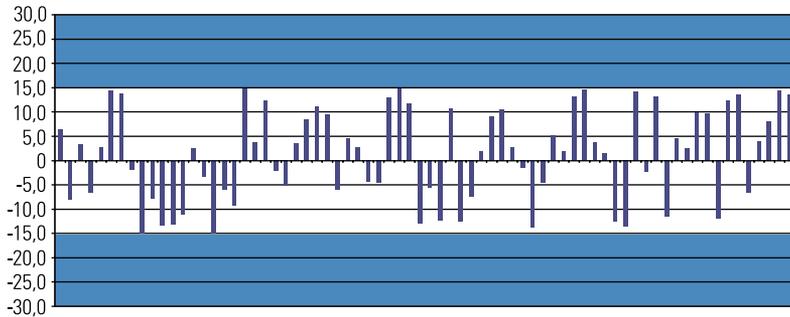


Figura 7: Porcentaje (%) de variación de la relación isotópica sobre el valor teórico de confirmación para los iones m/z 320/322 en inyecciones repetidas de un patrón de TCDD con una concentración de 17 fg/ μ L.

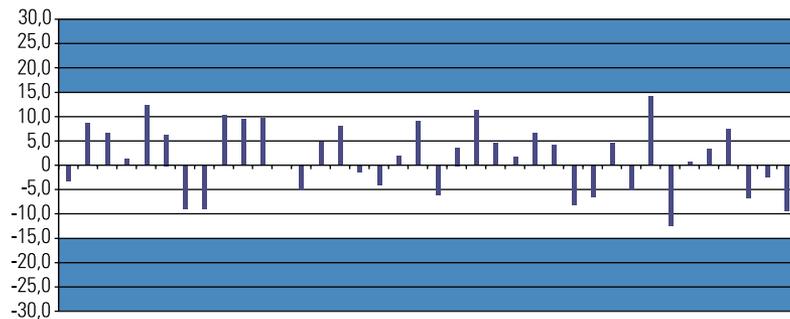


Figura 8: Porcentaje (%) de variación de la relación isotópica sobre el valor teórico de confirmación a partir los iones m/z 320/322 en inyecciones repetidas de un extracto de sangre.

Conclusiones

El sistema DFS High Resolution GC/MS permite analizar dioxinas y furanos en muestras ambientales, biológicas y alimentos en el intervalo de concentraciones de unos pocos femtogramos. De igual forma, el sistema permite analizar con éxito muestras complejas con un importante efecto matriz. La fiabilidad, sensibilidad y robustez del DFS han sido demostradas a lo largo del análisis de series repetidas de inyecciones de extractos complejos de muestras de sangre. En modo HRGC/HRMS, el DFS aporta resultados confirmatorios que pueden despejar cualquier interrogante legal.

Referencias

- ^[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, 4.2.2006.
- ^[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.

Legal Notices

©2007 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific Inc. and its subsidiaries. This information is presented as an example of the capabilities of Thermo Fisher Scientific Inc. products. It is not intended to encourage use of these products in any manners that might infringe the intellectual property rights of others. Specifications, terms and pricing are subject to change. Not all products are available in all countries. Please consult your local sales representative for details.

In addition to these offices, Thermo Fisher Scientific maintains a network of representative organizations throughout the world.

Australia
+61 2 8844 9500

Austria
+43 1 333 50340

Belgium
+32 2 482 30 30

Canada
+1 800 532 4752

China
+86 10 5850 3588

Denmark
+45 70 23 62 60

France
+33 1 60 92 48 00

Germany
+49 6103 408 1014

India
+91 22 6742 9434

Italy
+39 02 950 591

Japan
+81 45 453 9100

Latin America
+1 608 276 5659

Netherlands
+31 76 587 98 88

South Africa
+27 11 570 1840

Spain
+34 91 657 4930

**Sweden/Norway/
Finland**
+46 8 556 468 00

Switzerland
+41 61 48784 00

UK
+44 1442 233555

USA
+1 800 532 4752

www.thermo.com

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

AN30112_S 09/07C