

Dioxinanalyse in Lebens- und Futtermitteln mit dem Intuvo 9000/7010 GC- Triple Quadrupol-System



Autoren

Rebecca Veeneman und
Anna Cali
Agilent Technologies, Inc.

Dr. Stefano Mazzotta
Direttore Tecnico,
Studio Effemme Chimica
Applicata

Zusammenfassung

Dioxine gehören zum sog. „dreckigen Dutzend“, einer Gruppe von Chemikalien, die als persistent organische Schadstoffe (POP, Persistent Organic Pollutants) bezeichnet werden. Dioxine und Furane sind die am häufigsten verwendeten Bezeichnungen, die mit polychlorierten Dibenzo-*p*-Dioxinen (PCDD) und polychlorierten Dibenzofuranen (PCDF) in Verbindung gebracht wurden, wobei 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD) am giftigsten ist. Charakteristisch für Dioxine und Furane sind das chemische Grundgerüst und die Anzahl der Chlorsubstituenten daran.

Einleitung

Dioxine und Furane sind persistente Umweltschadstoffe, die eingehend untersucht wurden und sich nachweislich in der Umwelt anreichern (Bioakkumulation).

In der Vergangenheit war zur Bestätigung und Quantifizierung von Dioxin im Spurenbereich hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS) erforderlich, z. B. in der EPA-Methode 1613B.¹ Seit Juni 2014 gilt in der Europäischen Union (EU) jedoch eine Richtlinie (709/2014), die den Gehalt an PCDD, PCDF, dioxinähnlichen PCB (DL-PCB) und nicht-dioxinähnlichen PCB (NDL-PCB) in Lebens- und Futtermitteln reguliert und den Einsatz von Gaschromatographie/Tandem-Quadrupol-Massenspektrometrie (GC/TQ-MS-)Systemen für Bestätigungstests auf Compliance mit der EUML ermöglicht.² Diese Änderung war auf die Erkenntnis zurückzuführen, dass Triple-Quadrupol-MS eine ähnliche Leistung erbringen können wie HRMS-Systeme, was zuvor mit einem Agilent 7890B/7000C GC/TQ MS-System demonstriert wurde.³

Mit der Einführung des Intuvo 9000 GC-Systems und seiner Technologie der Direkt-Heizung ergeben sich neue Möglichkeiten, für diese kritische Analyse eine schnellere Trennung herbeizuführen.

Experimentelles

Die Leistung wurde anhand eines Agilent Intuvo 9000 GC-Systems evaluiert, das über einen Split/Splitless-Einlass verfügte und mit einem Agilent Triple-Quadrupol-System der Serie 7010 unter Verwendung der Ionisationsquelle mit hoher Effizienz (High Efficiency Source, HES) gekoppelt war. Es wurden zwei Methoden entwickelt, um unterschiedlichen Anforderungen gerecht zu werden. Die erste Methode benötigt eine Laufzeit von 52,5 Minuten und arbeitet mit einem Temperaturprogramm, das auch für herkömmliche GC-Öfen geeignet ist. Darüber hinaus wurde eine schnellere Methode entwickelt, die die im Intuvo 9000 GC-System verfügbare direkte Säulenheizung nutzt. Die Gerätebedingungen beider Methoden sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Probenvorbereitung

Die am häufigsten eingesetzten Methoden für die Bestimmung von PCDD/PCDF und DL-PCB in Lebens- und Futtermitteln bestehen aus einer Kombination aus Fettextraktion (Soxhlet) und Aufreinigungsschritten unter Verwendung verschiedener Säulenchromatographien (Silicagel beschichtet mit Schwefelsäure, Florisil, Aluminiumoxid und Aktivkohle).

Die manuelle Vorbereitung von Dioxinproben ist aufwändig und komplex. Deshalb wurden zur Automatisierung der Extraktion von Dioxinproben automatisierte Mehrsäulensysteme entwickelt, um auf diese Weise die Analysendauer zu verkürzen und zu versuchen, die Kosten der Methode 1613 zu senken.

Tabelle 1. Parameter für das Intuvo 9000 GC-System.

Parameter	Methode mit 52,5 Minuten	Methode mit 31,12 Minuten
GC-Bedingungen		
Einspritzblock-Liner	Bestell-Nr. 5181-3315 und 5190-2293	
Injektionsvolumen	1 µl	1 und 0,5 µl
Gepulst splitlos	60 psi über 0,6 Minuten; 50 ml/min nach 0,8 Minuten	
Säule	Agilent J&W DB-5MS UI-Säule (60 m × 250 µm, 0,25 µm)	
Säulenflussrate	1,6 ml/min	1,6 ml/min
Ofen	130 °C (2 Minuten) 20 °C/min bis 220 °C (15 Minuten) 5 °C/min bis 235 °C (7 Minuten) 5 °C/min bis 330 °C (2 Minuten)	130 °C (1 Minute) 100 °C/min bis 200 °C (6 Minuten) 7,5 °C/min bis 235 °C (4 Minuten) 20 °C/min bis 310 °C (11 Minuten)
Guard Chip	310 °C	310 °C
Bus	325 °C	325 °C
MS-Bedingungen		
Betriebsmodus	Elektronenstoß-Ionisation (EI), Multiple Reaction Monitoring (MRM)	
Transferleitungstemperatur	330 °C	330 °C
Temperatur der Quelle	280 °C	280 °C
Quadrupoltemperatur	150 °C	150 °C

Ergebnisse und Diskussion

Ein Standard, der native PCDD, native PCDF, Spritzenstandards und ¹³C-markierte interne Standards (Tabelle 2) enthielt, wurde sowohl mit der Methode mit 52,5 Minuten als auch der Methode mit 31,12 Minuten evaluiert. Die Chromatogramme für die Trennungen unter diesen beiden Sätzen von Bedingungen sind in den Abbildungen 1 und 2 dargestellt.

Die Kalibrierungskurven beider Trennmethode wurden einer Regressionsanalyse unterzogen. Für die ursprüngliche, längere Methode wurde eine Kalibrierungskurve mit sechs Punkten analysiert, deren Konzentrationswerte in Tabelle 3 aufgeführt sind. Die Korrelation der Bestimmung wurde zur Bewertung der Linearität herangezogen; die zugehörigen Werte sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 2. Analytierte Verbindungen.

Verbindung	Typ	Verbindung	Typ
2378-TCDD	Nativ	2378-TCDD-LCS*	ISTD
2378-TCDF	Nativ	2378-TCDF-LCS*	ISTD
12378-PCDD	Nativ	12378-PCDD-LCS*	ISTD
12378-PCDF	Nativ	12378-PCDF-LCS*	ISTD
23478-PCDF	Nativ	23478-PCDF-LCS*	ISTD
123478-HxCDD	Nativ	123478-HxCDD-LCS*	ISTD
123478-HxCDF	Nativ	123478-HxCDF-LCS*	ISTD
123678-HxCDD	Nativ	123678-HxCDD-LCS*	ISTD
123678-HxCDF	Nativ	123678-HxCDF-LCS*	ISTD
123789-HxCDD	Nativ	123789-HxCDD-ISS	Spritzenstandard
123789-HxCDF	Nativ	123789-HxCDF-LCS*	ISTD
234678-HxCDF	Nativ	234678-HxCDF-LCS*	ISTD
1234678-HpCDD	Nativ	1234678-HpCDD-LCS*	ISTD
1234678-HpCDF	Nativ	1234678-HpCDF-LCS*	ISTD
1234789-HpCDF	Nativ	1234789-HpCDF-LCS*	ISTD
OCDD	Nativ	OCDD-LCS*	ISTD
OCDF	Nativ	OCDF-LCS*	ISTD
1234-TCDD-ISS	Spritzenstandard		

LCS = Labeled Compound Standard (Standard einer markierten Verbindung)
ISS = interner Spritzenstandard

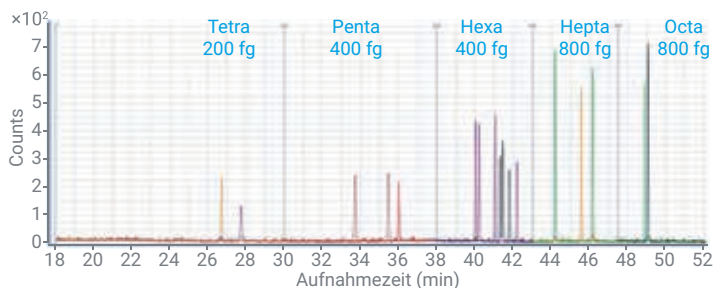


Abbildung 1. Methode mit 52,5 Minuten, 1 µl Injektionsvolumen, Standard der Stufe 2.

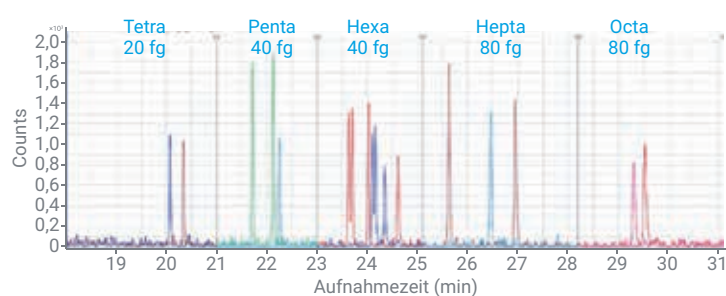


Abbildung 2. Methode mit 31,12 Minuten, 1 µl Injektionsvolumen.

Tabelle 3. Kalibrierungskurve für die Methode mit 52,5 Minuten; 1 µl Injektionsvolumen.

fg/µl	Tetra	Penta	Hexa	Hepta	Octa
S1	50	100	100	200	200
S2	200	400	400	800	800
S3	1000	2000	2000	4000	4000
S4	4000	8000	8000	16 000	16 000
S5	20 000	40 000	40 000	80 000	80 000
S6	80 000	160 000	160 000	320 000	320 000

Tabelle 4. Ergebnisse der verbindungsspezifischen Bestimmtheitsmaße für die Methode mit 52,5 Minuten.

Analyt	R ²	Analyt	R ²
2378-TCDD	0,99997	23478-PCDF	0,99991
12378-PCDD	0,99983	123478-HxCDF	0,99999
123478-HxCDD	0,99978	123678-HxCDF	0,99994
123678-HxCDD	0,99998	234678-HxCDF	0,99999
123789-HxCDD	0,99928	123789-HxCDF	0,99999
1234678-HpCDD	0,99998	1234678-HpCDF	0,99996
OCDD	0,99999	1234789-HpCDF	0,99999
2378-TCDF	0,99991	OCDF	0,99993
12378-PCDF	0,99987		

Eine detailliertere statistische Auswertung der Daten ist in Tabelle 5 enthalten.

In dieser Tabelle sind die für jede Zielsubstanz verwendeten Übergänge sowie die gerätespezifischen Grenzwerte und die Signal-Rausch-Verhältnisse aufgeführt. Die instrumentelle Quantifizierungsgrenze (iLOQ) wurde aus 10 Wiederholungsinjektionen am niedrigsten Kalibrierungspunkt berechnet.

Methode 2: Schnelleres Temperaturprogramm

Unter Verwendung des in Tabelle 1 dargestellten beschleunigten Temperaturprogramms wurde eine zweite Kalibrierungskurve erstellt, für die eine 1- μ l-Injektion der vorbereiteten Standards (siehe Tabelle 6) eingesetzt wurde.

Ähnlich wie bei der Evaluierung der längeren Methode wurden die Kalibrierungsstandards der Reihe nach injiziert und dann mit Hilfe eines Datensystems verarbeitet, in dem für jede Verbindung eine Korrelation der Bestimmung generiert wurde. Für die verschiedenen Verbindungen wurden die in Tabelle 5 angegebenen Übergänge konsistent angewendet. Die Korrelationswerte sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 5. RT, MRM-Übergänge, LOQ und Nachweisgrenze.

Analyt	RT	Übergang	Konz. RSD	MDL (fg/ μ l)	LOQ	LOD	Rauschen	S/N
2378-TCDF	26,64	303,9 → 240,9	2,6	3,8184	13,5334	4,06	1,92	18,54
2378-TCDD	27,835	319,9 → 256,9	3,9	5,7684	20,445	6,1335	1,61	14,62
12378-PCDF	33,638	339,8 → 277,0	4,9	14,8674	52,6945	15,8083	2,02	17,6
23478-PCDF	35,359	339,8 → 277,0	6,4	20,1087	71,271	21,3813	1,99	21,43
12378-PCDD	35,921	355,9 → 292,9	6,5	20,0992	71,2375	21,3713	1,48	19,69
123478-HxCDF	39,96	373,8 → 310,9	6,4	19,4782	69,0366	20,711	1,55	24,45
123678-HxCDF	40,141	373,8 → 310,9	4,6	14,2778	50,6047	15,1814	1,55	25,08
234678-HxCDF	41,148	373,8 → 310,9	3,4	10,0481	35,6132	10,684	1,96	22,2
123478-HxCDD	41,237	389,8 → 326,9	4,2	12,5373	44,4357	13,3307	1,51	23,82
123678-HxCDD	41,533	389,8 → 326,9	8,1	24,7315	87,6558	26,2967	1,45	25,78
123789-HxCDD	41,737	389,8 → 326,9	7,3	21,5291	76,3055	22,8916	1,55	26,1
123789-HxCDF	42,135	373,8 → 310,9	4,9	14,8626	52,6774	15,8032	1,39	30,68
1234678-HpCDF	44,133	407,8 → 344,8	4	23,4349	83,06	24,918	1,76	46,85
1234678-HpCDD	45,674	423,8 → 360,8	3,5	20,7641	73,594	22,0782	1,9	34,19
1234789-HpCDF	46,105	407,8 → 344,8	8,7	52,986	187,7979	56,3394	1,52	52,61
OCDD	48,83	457,7 → 394,8	2,8	16,7276	59,2874	17,7862	1,33	44,22
OCDF	48,995	441,7 → 378,8	2,5	14,9213	52,8855	15,8656	1,35	49,63

Tabelle 6. Kalibrierungskurve für die Methode mit 31,12 Minuten; 1 μ l Injektionsvolumen.

fg/ μ l	Tetra	Penta	Hexa	Hepta	Octa
SC1	20	40	40	80	80
SC2	80	40	160	320	320
SC3	400	200	800	1600	1600
SC4	1600	800	3200	6400	6400
SC5	8000	4000	16 000	32 000	32 000
SC6	32 000	16 000	64 000	128 000	128 000

Tabelle 7. Korrelationen der Bestimmung für die beschleunigte Methode.

Analyt	R ²
2378-TCDD	0,99995
12378-PCDD	0,99984
123478-HxCDD	0,99975
123678-HxCDD	0,9999
123789-HxCDD	0,99931
1234678-HpCDD	0,99998
OCDD	0,99999
2378-TCDF	0,99992
12378-PCDF	0,99985
23478-PCDF	0,99991
123478-HxCDF	0,99999
123678-HxCDF	0,99993
234678-HxCDF	0,99979
123789-HxCDF	0,99998
1234678-HpCDF	0,99997
1234789-HpCDF	0,99999
OCDF	0,99993

Die Fortschritte in der Massenspektrometrie, insbesondere in Bezug auf die High Efficiency Source des 7010 TQ, ermöglichen niedrigere Nachweisgrenzen und die Anwendung kleinerer Probenvolumen. Um den Einfluss der High Efficiency Source auf die beschleunigte Trennmethode zu evaluieren, wurde ein kleineres Injektionsvolumen hinzugefügt, sodass sowohl für 1- μ l als auch für 0,5- μ l-Probenaufgaben Daten am niedrigsten Kalibrierpunkt vorlagen. Tabelle 8 zeigt den Vergleich der Injektionsvolumina für die sieben Replikate des in Tabelle 6 aufgeführten SC1-Standards mithilfe der prozentualen relativen Standardabweichung.

Schlussfolgerungen

Die Aufsichtsbehörden haben die Fähigkeit von Tandem-Quadrupol-Systemen für eine effektive Identifikation und Quantifizierung von Dioxin- und Furanverbindungen erkannt. Dies wird durch die Verordnungen Nr. 589/2014 und Nr. 709/2014 der EU-Kommission deutlich, die GC/TQ als Option für die Bestätigungsanalyse bei bestimmten Lebensmitteln zulassen. Im Vergleich zu hochauflösenden MS-Systemen (HRAM) stellt GC/TQ eine kostengünstigere Alternative für die Analyse potenziell kontaminierter Proben dar. Fortschritte bei den MS-Quellen, insbesondere die in diesem Beitrag evaluierte Option mit einer High Efficiency Source, ermöglichen eine bessere Detektion unter Verwendung kleinerer Injektionsvolumina, ohne dabei Vertrauen in die Daten oder Präzision einzubüßen. Eine weitere Beschleunigung erfahren die Trennungen dank der Fortschritte in der Gaschromatographie mit der Möglichkeit der Direkt-Heizung, was den Weg für ein schnelles Screening und einen höheren Durchsatz eröffnet. Ein Beispiel hierfür ist das Intuvo 9000 System.

In dieser Applikation wurden zwei Trennmethoden entwickelt, um die Leistung mithilfe schnellerer Trennungen und kleinerer Probenvolumen zu veranschaulichen. Möglich macht dies die Symbiose aus innovativer Technologie, die im Intuvo 9000 GC verbaut ist, und der robusten Leistung des 7010 TQ Massenspektrometers.

Tabelle 8. Statistische Daten zum Vergleich zwei unterschiedlicher Injektionsvolumen (1 und 0,5 μ l) für die beschleunigte Trennung der untersuchten Dioxine und Furane.

Analyt	Übergang	1 μ l	0,5 μ l
		RSD	RSD
2378-TCDF-LCS-REC	315,8 → 252,0	2,3	3,2
2378-TCDD	319,9 → 256,9	4,0	3,9
2378-TCDD-LCS-REC	331,8 → 268,0	3,2	3,7
2378-TCDF	303,9 → 240,9	5,3	6,1
23478-PCDF	339,8 → 277,0	5,9	6,8
12378-PCDF-LCS-REC	351,9 → 287,9	2,0	2,1
23478-PCDF-LCS-REC	351,9 → 287,9	1,3	2,1
12378-PCDD	355,9 → 292,9	8,0	7,2
12378-PCDD-LCS-REC	367,8 → 304,0	3,6	3,4
12378-PCDF	339,8 → 277,0	5,2	5,4
123478-HxCDF-LCS-REC	385,8 → 322,0	2,0	3,1
123478-HxCDD	389,8 → 326,9	4,1	7,1
123678-HxCDF-LCS-REC	385,8 → 322,0	1,6	4,5
123478-HxCDF	373,8 → 310,9	6,8	7,0
123678-HxCDF	373,8 → 310,9	7,6	8,5
1234678-HpCDD	423,8 → 360,8	6,8	7,0
234678-HxCDF-LCS-REC	385,8 → 322,0	0,6	3,7
234678-HxCDF	373,8 → 310,9	7,5	7,5
1234678-HpCDF	407,8 → 344,8	8,5	8,7
123789-HxCDF-LCS-REC	385,8 → 322,0	3,6	2,4
OCDD	457,7 → 394,8	7,7	7,7
123789-HxCDF	373,8 → 310,9	5,4	5,4
123478-HxCDD-LCS-REC	401,8 → 338,0	3,8	2,3
OCDF	441,7 → 378,8	8,7	8,5
123678-HxCDD-LCS-REC	401,8 → 338,0	3,6	4,6
123678-HxCDD	389,8 → 326,9	4,5	5,2
123789-HxCDD	389,8 → 326,9	7,8	7,7
1234678-HpCDF-LCS-REC	419,8 → 356,0	1,9	1,0
1234678-HpCDD-LCS-REC	435,8 → 372,0	2,5	4,4
1234789-HpCDF-LCS-REC	419,8 → 356,0	2,6	3,0
1234789-HpCDF	407,8 → 344,8	6,0	5,6
OCDD-LCS-REC	469,7 → 405,8	1,8	3,5
OCDF-LCS-REC	453,7 → 389,8	2,7	4,0

Literatur

1. US EPA Method 1613 "Tetra- through Octa-Chlorinated Dioxins and Furans by Isotope Dilution HRGC/HRMS", U.S. EPA Office of Water Engineering and Analysis Division (4303) 401 M Street S.W. Washington, D.C. 20460. **1994.**
2. Commission Regulation (EU) No 709/2014 of 20 June 2014 amending Regulation (EC) No 152/2009 as regards the determination of the levels of dioxins and polychlorinated biphenyls, *Offic. J. Eur. Commun.* **2014**, L188, 1–18.
3. Riener, J. Validation of a Confirmatory GC/MS/MS Method for Dioxins and Dioxin-like PCBs to Meet the Requirements of EU Regulation 709/2014. Agilent Technologies Application Note, Publikationsnummer 5991-6590EN, **2016.**

www.agilent.com/chem

DE.6419560185

Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc. 2020
Gedruckt in den USA, 13. November 2020
5991-9399DEE