

Análisis de dioxinas en alimentos y piensos mediante el sistema GC-QQQ 9000/7010 Intuvo



Autores

Rebecca Veeneman y Anna Cali
Agilent Technologies, Inc.

Dr. Stefano Mazzotta
Direttore Tecnico,
Studio Effemme Chimica
Applicata

Resumen

Las dioxinas pertenecen a la denominada “docena sucia”, un grupo de productos químicos conocidos como contaminantes orgánicos persistentes (COP).

Dioxinas y furanos son los nombres más usados que se han asociado con las dibenzo-*p*-dioxinas policloradas (PCDD) y dibenzofuranos policlorados (PCDF), siendo la más tóxica la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD). Las dioxinas y los furanos se caracterizan por su cadena química principal y por el número de átomos de cloro que aparecen como sustituyentes en dicha cadena.

Introducción

Las dioxinas y los furanos son contaminantes medioambientales persistentes ampliamente estudiados, habiéndose demostrado su bioacumulación en el medio ambiente.

Históricamente, se necesitaba la espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) para confirmar y cuantificar los niveles de trazas de dioxinas, como en el método EPA 1613B.¹ Sin embargo, a partir de junio de 2014, la Unión Europea (UE) ha instituido el reglamento 709/2014, que rige los niveles de PCDD, PCDF, PCB similares a las dioxinas y PCB no similares a las dioxinas (NDL) en alimentos y piensos y que permite el uso de sistemas de cromatografía de gases combinada con espectrometría de masas de cuadrupolo en tándem (GC/TQ MS) en los análisis confirmatorios para la conformidad con EURL.² Este cambio se ha debido a la observación de que los espectrómetros de masas de triple cuadrupolo podían proporcionar un rendimiento similar al observado con los sistemas HRMS, lo que se había demostrado anteriormente en un sistema GC/TQ MS Agilent 7890B/7000C.³

Con la introducción del sistema GC 9000 Intuvo y su tecnología de calentamiento directo, se pueden explorar nuevas posibilidades para una separación más rápida para este análisis tan importante.

Experimento

La evaluación del rendimiento se demostró utilizando un sistema GC Agilent 9000 Intuvo configurado con un inyector split/splitless y acoplado a un sistema de triple cuadrupolo Agilent serie 7010 utilizando la fuente iónica de alta eficiencia (HES). Se desarrollaron dos métodos para satisfacer diversas necesidades. El primer método tiene un tiempo de análisis de 52,5 minutos y usa un programa de temperatura que también puede aplicarse a los hornos de GC tradicionales. Se desarrolló un método más rápido que aprovechaba el calentamiento directo de columna disponible en el sistema GC 9000 Intuvo. Las condiciones de los instrumentos para ambos métodos se muestran en la Tabla 1.

Preparación de muestras

Los métodos más usados para la determinación de PCDD/PCDF y DL-PCB en alimentos y piensos animales combinan la extracción de grasa (Soxhlet) con los pasos de limpieza usando diferentes cromatografías de columna (gel de sílice recubierto con ácido sulfúrico, florisil, alúmina y carbón activo).

La preparación manual de muestras de dioxinas es tediosa y exhaustiva; se han fabricado sistemas multicolumna automatizados para automatizar la extracción de muestras de dioxinas con el fin de reducir el tiempo de análisis y tratar de reducir los costes siguiendo el método 1613.

Tabla 1. Parámetros del sistema GC 9000 Intuvo

Parámetro	Método de 52,5 minutos	Método de 31,12 minutos
Condiciones del sistema GC		
Liner del puerto de inyección	ref. 5181-3315 y 5190-2293	
Volumen de inyección	1 µl	1 y 0,5 µl
Splitless pulsada	60 psi durante 0,6 minutos: 50 ml/min a los 0,8 minutos	
Columna	DB-5MS UI (60 m × 250 µm, 0,25 µm)	
Flujo de la columna	1,6 ml/min	1,6 ml/min
Horno	130 °C (2 minutos) 20 °C/min hasta 220 °C (15 minutos) 5 °C/min hasta 235 °C (7 minutos) 5 °C/min hasta 330 °C (2 minutos)	130 °C (1 minuto) 100 °C/min hasta 200 °C (6 minutos) 7,5 °C/min hasta 235 °C (4 minutos) 20 °C/min hasta 310 °C (11 minutos)
Guard Chip	310 °C	310 °C
Bus	325 °C	325 °C
Condiciones del sistema MS		
Modo de funcionamiento	Ionización por impacto electrónico (EI), monitorización de reacciones múltiples (MRM)	
Temperatura de la línea de transferencia	330 °C	330 °C
Temperatura de la fuente	280 °C	280 °C
Temperatura del cuadrupolo	150 °C	150 °C

Resultados y comentarios

Se evaluó un patrón que contenía PCDD nativos, PCDF nativos, patrones de jeringa y patrones internos marcados con ^{13}C (Tabla 2) con los métodos de 52,5 y 31,12 minutos. En las Figuras 1 y 2 se muestran cromatogramas que muestran las separaciones bajo ambos conjuntos de condiciones.

Se realizó el análisis de regresión de las curvas de calibración frente a ambos métodos de separación. Para el método original, más largo, se analizó una curva de calibración de seis puntos; los datos de concentración se proporcionan en la Tabla 3. La correlación de la determinación se usó como evaluación de la linealidad, y los valores resultantes se muestran en la Tabla 4.

Tabla 2. Compuestos analizados.

Compuesto	Tipo	Compuesto	Tipo
2378-TCDD	Nativo	2378-TCDD-LCS*	Patrón interno
2378-TCDF	Nativo	2378-TCDF-LCS*	Patrón interno
12378-PCDD	Nativo	12378-PCDD-LCS*	Patrón interno
12378-PCDF	Nativo	12378-PCDF-LCS*	Patrón interno
23478-PCDF	Nativo	23478-PCDF-LCS*	Patrón interno
123478-HxCDD	Nativo	123478-HxCDD-LCS*	Patrón interno
123478-HxCDF	Nativo	123478-HxCDF-LCS*	Patrón interno
123678-HxCDD	Nativo	123678-HxCDD-LCS*	Patrón interno
123678-HxCDF	Nativo	123678-HxCDF-LCS*	Patrón interno
123789-HxCDD	Nativo	123789-HxCDD-ISS	Patrón de jeringa
123789-HxCDF	Nativo	123789-HxCDF-LCS*	Patrón interno
234678-HxCDF	Nativo	234678-HxCDF-LCS*	Patrón interno
1234678-HpCDD	Nativo	1234678-HpCDD-LCS*	Patrón interno
1234678-HpCDF	Nativo	1234678-HpCDF-LCS*	Patrón interno
1234789-HpCDF	Nativo	1234789-HpCDF-LCS*	Patrón interno
OCDD	Nativo	OCDD-LCS*	Patrón interno
OCDF	Nativo	OCDF-LCS*	Patrón interno
1234-TCDD-ISS	Patrón de jeringa		

LCS = Patrón de compuesto marcado

ISS = Patrón interno de jeringa

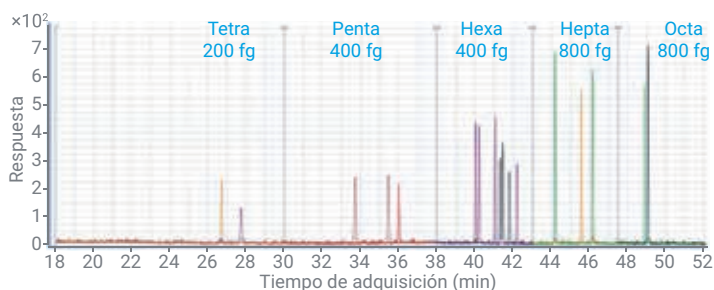


Figura 1. Método de 52,5 minutos, volumen de inyección de 1 μl , patrón de nivel 2

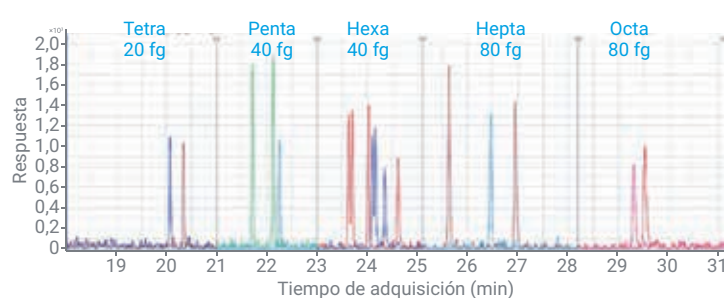


Figura 2. Método de 31,12 minutos, volumen de inyección de 1 μl .

Tabla 3. Curva de calibración para el método de 52,5 minutos; Volumen de inyección de 1 μl .

fg/ μl	Tetra	Penta	Hexa	Hepta	Octa
L1	50	100	100	200	200
L2	200	400	400	800	800
L3	1000	2000	2000	4000	4000
L4	4000	8000	8000	16000	16000
L5	20000	40000	40000	80000	80000
L6	80000	160000	160000	320000	320000

Tabla 4. Resultados del coeficiente de determinación específico del compuesto para el método de 52,5 minutos.

Analito	R ²	Analito	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		

En la Tabla 5 se presenta una evaluación estadística más detallada de los datos. En esta tabla se proporcionan las transiciones usadas para cada compuesto diana, junto con los límites específicos del instrumento y los valores de señal a ruido. Se calculó el límite de cuantificación instrumental utilizando 10 inyecciones de réplica en el punto de calibración más bajo.

Método 2: Programa de temperatura más rápido

Utilizando el programa de temperatura acelerado mostrado en la Tabla 1, se generó una segunda curva de calibración utilizando una inyección de 1 µl de los patrones preparados mostrados en la Tabla 6.

De forma similar a la evaluación del método más prolongado, los patrones de calibración se analizaron secuencialmente y posteriormente se procesaron con un sistema de datos donde se generaron correlaciones de la determinación para cada compuesto. Las transiciones aplicadas a cada compuesto se mantuvieron coherentes con las proporcionadas en la Tabla 5. La Tabla 7 muestra los valores de correlación.

Tabla 5. TR, transiciones MRM, límite de cuantificación y límite de detección.

Nombre	TR	Transición	Conc. DER	MDL (fg/µl)	LOQ	LOD	Ruido	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

Tabla 6. Curva de calibración para el método de 32,12 minutos; Volumen de inyección de 1 µl.

fg/µl	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	16000	32000	32000
SC6	32000	16000	64000	128000	128000

Tabla 7. Correlaciones de la determinación para el método acelerado.

Analito	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

Los avances en la espectrometría de masas, y específicamente en el HES disponible en el TQ 7010, prometen menores límites de detección, y, en consecuencia, menores volúmenes de muestra. Con el fin de evaluar la influencia de HES en el método de separación acelerado, se añadió un volumen de inyección más pequeño, proporcionándose datos para las inyecciones de muestra de 1 y de 0,5 µl en el punto de calibración más bajo. La Tabla 8 muestra la comparación de volumen de inyección, utilizando % DER para siete réplicas del patrón SC1 mostrado en la Tabla 6.

Conclusión

Las agencias reguladoras están reconociendo la capacidad de los sistemas de cuadrupolo en tándem para identificar y cuantificar eficazmente compuestos de dioxinas y furanos preocupantes, como se muestra en los Reglamentos n.º 589/2014 y n.º 709/2014 de la Comisión de la Unión Europea, que añaden la GC/TQ como opción para el análisis confirmatorio de determinados alimentos. En comparación con los sistemas MS de alta resolución (HRAM), la GC/TQ es un sistema más asequible para analizar muestras potencialmente contaminadas. Los avances en las fuentes de MS, en concreto la opción HES evaluada en este trabajo, permiten mejorar los límites de detección, con volúmenes de inyección más pequeños, sin que se reduzcan ni la confianza ni la precisión de los datos. Del mismo modo, los avances en la cromatografía de gases, tal como el sistema 9000 Intuvo, aceleran las separaciones con capacidad de calentamiento directo, lo que abre toda una vía para un cribado rápido y una mayor productividad.

En este trabajo, se desarrollaron dos métodos de separación para demostrar el rendimiento usando separaciones más rápidas y volúmenes de muestra más pequeños. Estos resultados son posibles debido a la asociación entre la innovadora tecnología incrustada en el sistema GC 9000 Intuvo y el robusto rendimiento del espectrómetro de masas 7010 TQ.

Tabla 8. Estadísticas de comparación utilizando dos volúmenes de inyección (1 y 0,5 µl) en la separación acelerada de dioxinas y furanos diana.

Nombre	Transición	1 µl	0,5 µl
		DER	DER
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

Referencias

1. Método US EPA 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. Reglamento (UE) n.º 709/2014 de la Comisión de 20 de junio de 2014 por el que se modifica el Reglamento (CE) n.º 152/2009 en lo que respecta a la determinación de los contenidos de dioxinas y de bifenilos policlorados, *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. Nota de aplicación de Agilent Technologies, número de publicación 5991-6590EN, **2016**.

www.agilent.com/chem

DE.6419560185

Esta información está sujeta a cambios sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2020
Impreso en EE. UU., 13 de noviembre de 2020
5991-9399ES