

Analisi delle diossine negli alimenti e nei mangimi con il sistema GC-QQQ Intuvo 9000/7010



Autori

Rebecca Veeneman e
Anna Cali
Agilent Technologies, Inc.
Dott. Stefano Mazzotta
Direttore Tecnico,
Studio Effemme Chimica
Applicata

Abstract

Le diossine fanno parte della cosiddetta "sporca dozzina", un gruppo di sostanze chimiche conosciute come inquinanti organici persistenti (POP). Diossine e furani sono i nomi comuni associati a dibenzo-*p*-diossine policlorurate (PCDD) e dibenzofurani policlorurati (PCDF), tra i quali la più tossica è 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-diossina (TCDD). La caratterizzazione di questi composti si basa sulla struttura base chimica e sul numero di atomi di cloro su di essa sostituiti.

Introduzione

Le diossine e i furani sono inquinanti ambientali persistenti, ampiamente studiati e per i quali è stato dimostrato un bioaccumulo nell'ambiente.

Tradizionalmente, per confermare e quantificare i livelli di tracce di diossina, si ricorreva alla spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRMS), secondo il metodo EPA 1613B.¹ Tuttavia, a partire da giugno 2014, l'Unione europea (UE) ha istituito un regolamento (709/2014) che determina i livelli di PCDD, PCDF, PCB diossina-simili e PCB non diossina-simili (NDL) negli alimenti e nei mangimi, consentendo l'impiego dei sistemi di gascromatografia/spettrometria di massa tandem a triplo quadrupolo (GC/TQ MS) nei test di conferma per i controlli di conformità con i livelli massimi dell'Unione europea (European Union maximum levels, EUMLs).² A determinare questo cambiamento è stata la dimostrazione che gli spettrometri di massa a triplo quadrupolo potevano offrire prestazioni simili a quelle osservate con i sistemi HRMS, come dimostrato in precedenza su un sistema GC/TQ MS Agilent 7890B/7000C.³

Con l'introduzione del sistema GC Agilent Intuvo 9000 e la sua tecnologia a riscaldamento diretto, si aprono nuove possibilità per separazioni più rapide in quest'analisi critica.

Condizioni sperimentali

La valutazione delle prestazioni è stata dimostrata usando un sistema GC Agilent Intuvo 9000 configurato con un iniettore split/splitless, accoppiato a un sistema a triplo quadrupolo Agilent Serie 7010 che utilizza la sorgente ionica ad alta efficienza (HES). Sono stati sviluppati due metodi per far fronte a svariate esigenze. Il primo metodo ha un tempo di analisi di 52,5 minuti e utilizza un programma di temperatura applicabile anche a forni GC tradizionali. È stato sviluppato un metodo più rapido che si avvale del riscaldamento diretto della colonna disponibile sul sistema GC Agilent Intuvo 9000.

Le condizioni strumentali per entrambi i metodi sono riportate nella Tabella 1.

Preparazione del campione

I metodi più impiegati per la determinazione di PCDD/PCDF e DL-PCB nei prodotti alimentari e nei mangimi per animali combinano l'estrazione di grassi (Soxhlet) con fasi di purificazione usando differenti cromatografie su colonna (gel di silice trattato con acido solforico, florisil, allumina e carbone attivo).

La preparazione manuale del campione di diossina è una procedura tediosa e complessa; i sistemi multicolonna automatizzati sono stati creati per automatizzare l'estrazione di campioni e ridurre i tempi di analisi nel tentativo di limitare i costi secondo il metodo 1613.

Tabella 1. Parametri del sistema GC Agilent Intuvo 9000.

Parametro	Metodo da 52,5 minuti	Metodo da 31,12 minuti
Condizioni GC		
Liner porta di iniezione	codice 5181-3315 e 5190-2293	
Volume di iniezione	1 µL	1 e 0,5 µL
Splitless pulsato	60 psi per 0,6 minuti; 50 mL/min a 0,8 minuti	
Colonna	DB-5MS UI (60 m × 250 µm, 0,25 µm)	
Flusso nella colonna	1,6 mL/min	1,6 mL/min
Forno	130 °C (2 minuti) 20 °C/min fino a 220 °C (15 minuti) 5 °C/min fino a 235 °C (7 minuti) 5 °C/min fino a 330 °C (2 minuti)	130 °C (1 minuto) 100 °C/min fino a 200 °C (6 minuti) 7,5 °C/min fino a 235 °C (4 minuti) 20 °C/min fino a 310 °C (11 minuti)
Guard Chip	310 °C	310 °C
Bus	325 °C	325 °C
Condizioni MS		
Modalità operativa	Ionizzazione elettronica (EI), Monitoraggio di reazioni multiple (MRM)	
Temperatura transfer line	330 °C	330 °C
Temperatura sorgente	280 °C	280 °C
Temperatura del quadrupolo	150 °C	150 °C

Risultati e discussione

Uno standard contenente PCDD e PCDF nativi, standard di siringa e standard interni marcati con ^{13}C (Tabella 2) è stato valutato con i due metodi da 52,5 minuti e da 31,12 minuti. Nelle Figure 1 e 2 sono riportati i cromatogrammi delle separazioni nelle due condizioni.

Le curve di calibrazione sono state analizzate mediante analisi di regressione rispetto ad entrambi i metodi di separazione. Per il metodo originale più lungo, si è proceduto all'analisi di una curva di calibrazione a sei punti, i cui dettagli sulle concentrazioni sono riportati in Tabella 3. La linearità è stata valutata mediante il coefficiente di determinazione; i risultati sono mostrati nella Tabella 4.

Tabella 2. Composti testati.

Composto	Tipo	Composto	Tipo
2378-TCDD	Nativo	2378-TCDD-LCS*	ISTD
2378-TCDF	Nativo	2378-TCDF-LCS*	ISTD
12378-PCDD	Nativo	12378-PCDD-LCS*	ISTD
12378-PCDF	Nativo	12378-PCDF-LCS*	ISTD
23478-PCDF	Nativo	23478-PCDF-LCS*	ISTD
123478-HxCDD	Nativo	123478-HxCDD-LCS*	ISTD
123478-HxCDF	Nativo	123478-HxCDF-LCS*	ISTD
123678-HxCDD	Nativo	123678-HxCDD-LCS*	ISTD
123678-HxCDF	Nativo	123678-HxCDF-LCS*	ISTD
123789-HxCDD	Nativo	123789-HxCDD-ISS	Standard di siringa
123789-HxCDF	Nativo	123789-HxCDF-LCS*	ISTD
234678-HxCDF	Nativo	234678-HxCDF-LCS*	ISTD
1234678-HpCDD	Nativo	1234678-HpCDD-LCS*	ISTD
1234678-HpCDF	Nativo	1234678-HpCDF-LCS*	ISTD
1234789-HpCDF	Nativo	1234789-HpCDF-LCS*	ISTD
OCDD	Nativo	OCDD-LCS*	ISTD
OCDF	Nativo	OCDF-LCS*	ISTD
1234-TCDD-ISS	Standard di siringa		

LCS = Composto standard marcato
ISS = Standard interno di siringa

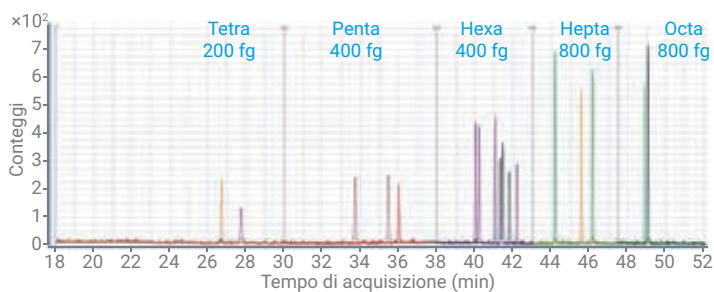


Figura 1. Metodo da 52,5 minuti, volume di iniezione da 1 μL , standard di livello 2.

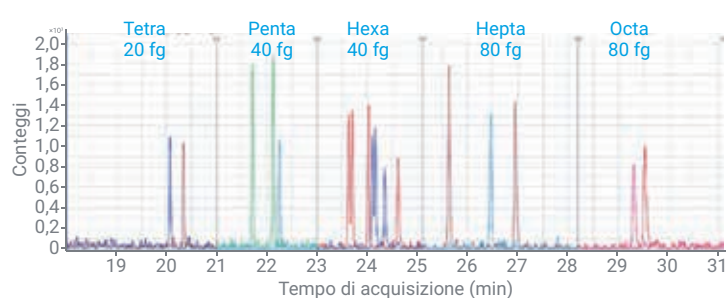


Figura 2. Metodo da 31,12 minuti, volume di iniezione da 1 μL .

Tabella 3. Curva di calibrazione per il metodo da 52,5 minuti, volume di iniezione da 1 μL .

fg/ μL	Tetra	Penta	Hexa	Hepta	Octa
L1	50	100	100	200	200
L2	200	400	400	800	800
L3	1000	2.000	2.000	4000	4000
L4	4000	8000	8000	16000	16000
L5	20000	40000	40000	80000	80000
L6	80000	160000	160000	320.000	32000

Tabella 4. Risultati dei coefficienti di determinazione specifici per ciascun composto per il metodo da 52,5 minuti.

Analita	R ²	Analita	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		

Una valutazione statistica più dettagliata è fornita nella Tabella 5, in cui sono mostrate le transizioni utilizzate per ciascun composto target, insieme ai limiti specifici dello strumento e ai rapporti segnale-rumore. Il limite di quantificazione strumentale (iLOQ) è stato calcolato usando 10 iniezioni replicate al punto di calibrazione più basso.

Metodo 2: Programma di temperatura più rapido

Usando il programma di temperatura accelerato mostrato nella Tabella 1, è stata generata una seconda curva di calibrazione effettuando iniezioni da 1 µL di standard preparati, come mostrato nella Tabella 6.

Analogamente al metodo di valutazione più lungo, gli standard di calibrazione sono stati analizzati in sequenza e quindi elaborati utilizzando un sistema gestione dati in cui i coefficienti di determinazione sono stati generati per ciascun composto. Le transizioni applicate a ciascun composto sono state mantenute consistenti con quelle fornite nella Tabella 5. Nella Tabella 7 sono mostrati i valori di correlazione.

Tabella 5. RT, transizioni MRM, LOQ e LOD.

Nome	RT	Transizione	Conc. RSD	MDL (fg/µL)	LOQ	LOD	Rumore	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

Tabella 6. Curva di calibrazione per il metodo da 31,12 minuti, volume di iniezione da 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	1.600	1.600
SC4	1600	800	3200	6400	6400
SC5	8000	4000	16000	32000	32000
SC6	32000	16000	64000	128000	128000

Tabella 7. Coefficienti di determinazione per il metodo accelerato.

Analita	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

I progressi nella spettrometria di massa, in particolare la sorgente ad alta efficienza nei sistemi TQ 7010, fanno ben sperare in analisi future con limiti di rilevazione più bassi e, di conseguenza, con volumi di campione minori. Per valutare gli effetti della sorgente ad alta efficienza sul metodo di separazione accelerato, è stato aggiunto un volume di iniezione più piccolo, che ha fornito dati per iniezioni di campione sia da 1 µL che da 0,5 µL al punto di calibrazione più basso. Nella Tabella 8, viene mostrato il confronto tra i volumi di iniezione, usando %RSD per sette replicati dello standard SC1 riportato nella Tabella 6.

Conclusione

Gli enti regolatori riconoscono come i sistemi a quadrupolo tandem siano in grado di identificare e quantificare in modo efficiente diossine e furani, come mostrato dalle normative della Commissione europea n. 589/2014 e 709/2014, in cui si aggiungono i sistemi GC/TQ come opzioni per analisi di conferma in determinati prodotti alimentari. Rispetto ai sistemi MS ad alta risoluzione (HRAM), GC/TQ è un sistema più accessibile per l'analisi di campioni potenzialmente contaminati. Gli sviluppi nell'ambito delle sorgenti MS, in particolare grazie alla sorgente ad alta efficienza esaminata nel presente studio, rendono possibili rilevazioni migliorate con volumi di iniezione più piccoli, senza influire sull'affidabilità o sulla precisione dei dati. Allo stesso modo, le innovazioni in gascromatografia, come il sistema GC Agilent Intuvo 9000, accelerano le separazioni grazie alla funzione di riscaldamento diretto, con nuove possibilità di screening rapidi e maggiore produttività.

Nel presente lavoro, sono stati sviluppati due metodi di separazione per verificare le prestazioni quando si utilizzano separazioni più rapide e volumi di campione più piccoli. Tali risultati sono possibili grazie alla tecnologia innovativa apportata dal sistema GC Agilent Intuvo 9000 in combinazione con le solide prestazioni dello spettrometro di massa TQ 7010.

Tabella 8. Statistiche a confronto usando due volumi di iniezione diversi (1 e 0,5 µL) sulla separazione accelerata di diossine e furani target.

Nome	Transizione	1 µL	0,5 µL
		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

Bibliografia

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, publication number 5991-6590EN, **2016**.

www.agilent.com/chem

DE.6419560185

Le informazioni fornite possono variare senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2020
Stampato negli Stati Uniti Stati Uniti, 13 novembre 2020
5991-9399ITE