

ОСНОВНІ ПУБЛІКАЦІЇ

ШУРЕК Я.^{1,3}, НАЗАФАРИН Л.², КОВАЛЬЧУК Т.³

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОТЕНЦИАЛА БЫСТРОЙ ВРЕМЯ-ПРОЛЕТНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ПРИ АНАЛИЗЕ ПЕСТИЦИДОВ И ПОЛИХЛОРИРОВАННЫХ БИФЕНИЛОВ МЕТОДАМИ ОДНОМЕРНОЙ И ДВУМЕРНОЙ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Використання швидкого мас-спектрометричного детектора час-прольотного типу (TOF MS) забезпечує чутливість у повному діапазоні мас, необхідну для ідентифікації слідових концентрацій пестицидів та ПХБ, а щільність даних – достатню для визначення вузьких хроматографічних піків та деконволюції піків з перекриттями. Параметри інструменту були оптимізовані для швидкого та надійного рутинного аналізу очищених екстрактів різних харчових продуктів (дитячі суміші, свинячий жир). Представлені дані по вирішенню одних і тих же задач у режимах одномірної газової хроматографії та повної ортогональної двомірної газової хроматографії (GC GC).

Ключові слова: газова хроматографія, двовимірна газова хроматографія, час-пролітна мас-спектрометрія, пестициди, поліхлоровані біфеніли, продукти харчування

Использование быстрого масс-спектрометрического детектора время-пролетного типа (TOF MS) обеспечивает чувствительность во всем диапазоне масс, необходимую для идентификации следовых количеств пестицидов и ПХБ, а плотность данных – достаточную для определения узких хроматографических пиков и деконволюции перекрывающихся пиков. Параметры инструмента были оптимизированы для быстрого и надежного рутинного анализа очищенных экстрактов различных пищевых продуктов (детское питание, свиной жир). Представлены данные по решению одних и тех же задач в режимах одномерной газовой хроматографии и полной ортогональной двумерной газовой хроматографии (GC GC).

Ключевые слова: газовая хроматография, двумерная газовая хроматография, время-пролетная масс-спектрометрия, пестициды, полихлорированные бифенилы, продукты питания

Detection by high-throughput TOF MS gives all of the sensitivity in full mass range needed to identify trace level of pesticides and PCBs while providing the data density needed to define narrow GC peaks and deconvolute overlapping peaks. The instrumental settings were

optimized to obtain fast and reliable analytical methods for routine control of purified extracts of different food-stuffs (baby food, pork fat). The results of PCBs and pesticides analyses by both common (GC) and orthogonal two-dimensional gas chromatography (GC GC) are presented.

Keywords: *gas chromatography, two-dimensional gas chromatography, overflight time mass spectrometry, pesticides, the polychlorinated biphenyl, food products*

1. Введение

В последние годы аналитические подходы, использующие газовую хроматографию в сочетании с время-пролетной масс-спектрометрией (GC-TOF MS) доказали свою эффективность в оценке качества и безопасности пищевых продуктов [1-4], а также в работе с экологическими матрицами [5]. В развитие этого направления, к концу 2007 года был предложен новый TOF MS-детектор, сконструированный специально для высокопроизводительного анализа. Высокая производительность — ключ к ускорению, оптимизации и, благодаря этому, — к улучшению окупаемости анализов. Вынужденное использование режима SIM (работа с ограниченным числом "характеристических" ионов) и низкий динамический диапазон, присущие традиционным масс-спектрометрам — квадрупольным и ионным ловушкам — оборачиваются для лаборатории дополнительными затратами. Обсуждаемая здесь технология (GC-TOF MS) является сочетание скоростного масс-спектрометра (до 500 Гц) со специфическими алгоритмами исследования данных. Целью ее является достижение скорости и разрешения, необходимых для реализации современной скоростной хроматографии (Time-Compressed Chromatography). Детектор HS TOF MS позволяет достичь необходимой плотности данных для точного учета самых узких пиков, получаемых при скоростном хроматографическом разделении. Получение полных масс-спектров при уровне чувствительности, достигаемом квадрупольными инструментами и ионными ловушками лишь в режиме SIM, позволяет применять алгоритмы истинной деконволюции и благодаря этому получать чистые масс-спектры коэлирующих соединений для надежной идентификации последних. В результате стало реальным проводить следовой анализ неизвестных соединений в сложных матрицах.

Схема системы GC-TOF MS показана на рис. 1. Нить источника, находящегося внутри масс-спектрометра, генерирует непрерывный электронный луч. Продукты разделения с газового хроматографа подаются в источник через подогреваемую входную линию. В результате взаимодействия этих продуктов с электронным лучом происходит электронная ионизация (EI). Ионы выталкиваются из ортогонального ускорителя вовнутрь пролетной трубы импульсами с номинальной частотой 20 кГц. Каждый единичный импульс ионов производит масс-спектр, называемый переходным (transient), которые затем суммируются в пакеты, генерируя полные масс-спектры с частотой до 500 Гц. Чтобы направить ионы сквозь систему и обеспечить хорошую степень восстановления сигналов на детекторе служит ионная оптика. Функция отклоняющей оптики — отсечь нежелательные сигналы, такие как ионы фронта растворителей либо фоновые ионы, генерируемые газом-носителем и остаточными газами, и тем самым продлить жизнь детектору. Все ионы входят в пролетную трубу, имея одинаковую кинетическую энергию ($K.E. = 1/2 mv^2$). Их скорости поэтому строго и с обратным знаком пропорциональны отношению масса/заряд. Поскольку длина трубы фиксирована, фрагмент-ионы, имеющие разные скорости, проходят это расстояние за разное время (скорость = расстояние/время). Разре-

ние масс во время-пролетном масс-спектрометре осуществляется по времени достижения детектора, установленного в конце трубы пролета (время = константа $\times m^{1/2}$). Например, если ионы массой 100 е.м. достигают детектора приблизительно за 15 мкс, то массе 1000 е.м. для этого потребуется около 50 мкс.

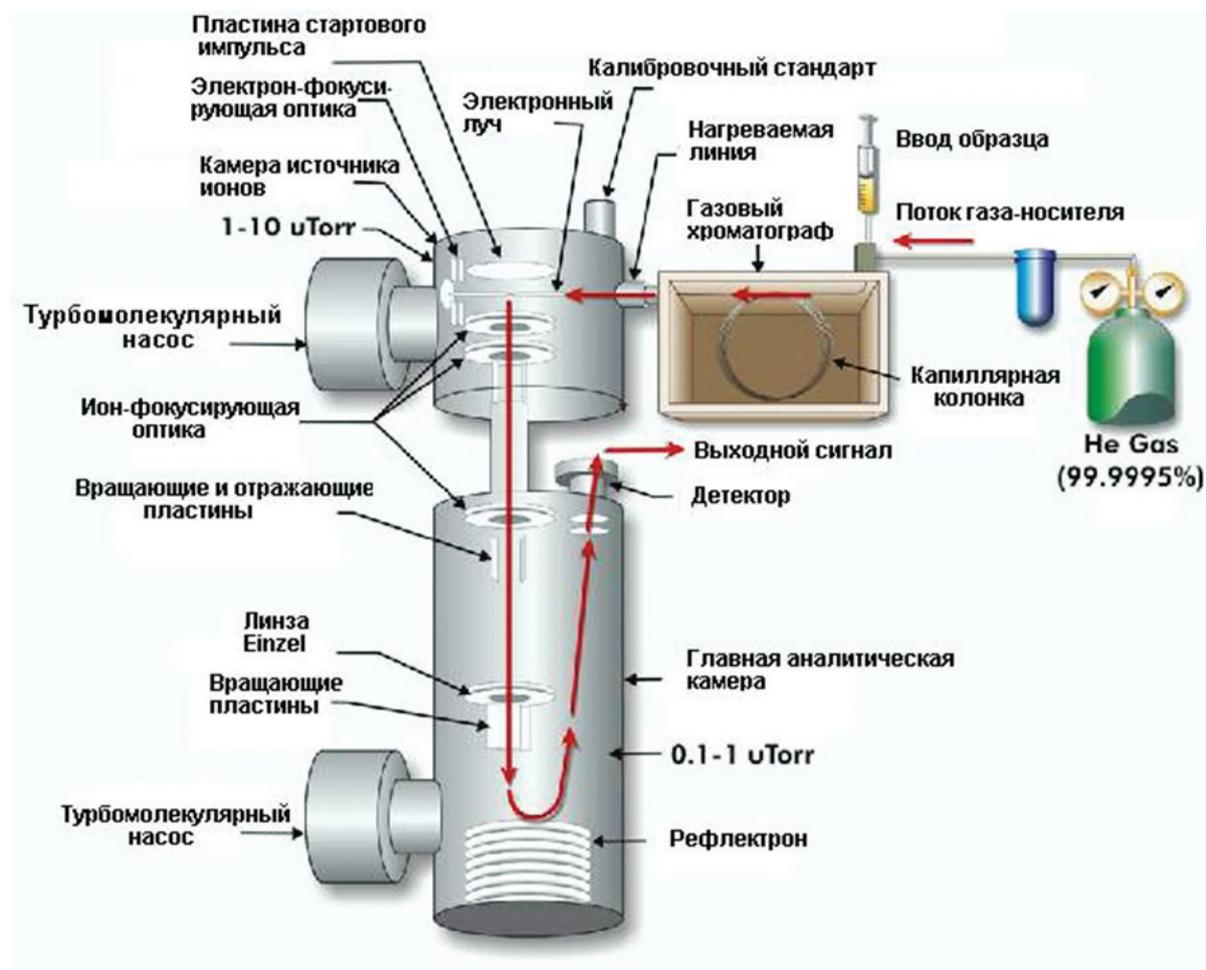


Рис. 1. Принципиальная схема GC-TOF MS

Данная статья является вводной к серии, состоящей еще из трех других, посвященных применению универсального время-пролетного детектора в решении различных аналитических задач. В именно данной работе мы поставили своей целью оценить эффективность системы GC-TOF MS при анализе пестицидов и полихлорированных бифенилов (ПХБ). Параметры инструмента были оптимизированы для быстрого и надежного рутинного анализа очищенных экстрактов различных пищевых продуктов (детское питание, свиной жир). Кроме данных по использованию одномерной газовой хроматографии, представлены также данные по решению тех же задач в режиме полной ортогональной двумерной газовой хроматографии (GC GC).

2. Экспериментальная часть

2.1. Материалы и реактивы

Перечисленные в таблице 2 целевые соединения пестицидов и ПХБ с чистотой от 95 до 99% были приобретены у Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Германия). Все использованные в пробоподготовке растворители (см. табл. 1) были аналитической чистоты (Scharlau, Barcelona, Испания). Рабочие растворы (диапазон концентраций

1,25-250 мкг/л) были приготовлены последовательными разбавлениями исходных растворов (10 мг/л) соответствующими растворителями. Для целей оптимизации и валидации использовали чистые матрицы (свиной жир, яблочное пюре для детского питания).

Таблица 1

Пробоподготовка и рабочие параметры системы GC-TOF MS

Параметры	Группы аналитов		
	Пестициды (детское питание)	ПХБ (свиной жир)	ПХБ и пестициды (свиной жир)
<i>Подготовка проб</i>	Экстракция продукта этилацетатом с последующей очисткой HPGPC. ⁶	Экстракция жировой ткани по Сокслету смесью гексан:дихлорметан (1:1, по объему), затем очистка HPGPC ⁷	Экстракция жировой ткани по Сокслету смесью гексан:дихлорметан (1:1, по объему), затем очистка HPGPC
<i>Газовый хроматограф</i>	<p>GC</p> <p>Инъекция: splitless 1 мкл, 250°C</p> <p>Колонка: forte VPX-5 (40м x 0,18 мм x 0.18 мкм)</p> <p>Температурная программа: 70°C (1 мин) 45°C/мин до 300°C (3 мин)</p> <p>Скорость тока: 1 мл/мин</p>	<p>GC</p> <p>Инъекция: pulse splitless 1 мкл, 250°C, 1,5 мин при 50 p.s.i.</p> <p>Колонка: forte VPX-5 (30м x 0.25 мм x 0.25 мкм)</p> <p>Температурная программа: 80°C (1,5 мин) 45°C/мин до 340°C (6 мин)</p> <p>Скорость тока: 1 мл/мин</p>	<p>GC x GC</p> <p>Инъекция: splitless 1 мкл, 250°C</p> <p>Колонки: 1е измерение - forte VPX-5 (20м x 0.18 мм x 0.18 мкм), 2е измерение - forte VPX-50 (2 м x 0.1 мм x 0.1 мкм)</p> <p>Температурная программа: 50°C, 2 мин, 20°C/мин до 180°C, 4°C/мин до 300°C;</p> <p>температ.модулятора, ± к основн.программе: 50°C;</p> <p>темпер. вторичн.термост., ± к первичн.: 10°C; цикл модуляции: 3 сек; время горячего импульса: 0,6 сек; скорость тока: 1 мл/мин</p>
<i>TOF масс-спектрометр</i>	<p>Напряжение на детекторе: 1750 В</p> <p>Время анализа: 10 мин</p> <p>Скорость: 10 Гц</p>	<p>Напряжение на детекторе: 1875 В</p> <p>Время анализа: 14 мин</p> <p>Скорость: 10 Гц</p>	<p>Напряжение на детекторе: 1750 В</p> <p>Время анализа: 37,5 мин</p> <p>Скорость: 200 Гц</p>

2.2. Анализы образцов

Для каждой аналитической группы были применены различные процедуры пробоподготовки^{6,7}. Их короткое описание можно найти в табл. 1. Система GC-NT TOF MS состояла из газового хроматографа HP 6890 (Agilent Technologies, Palo Alto, Калифорния, США) с инжектором split-splitless (или программируемое входное устройство Agilent PTV) и время-пролетного масс-спектрометра LECO TruTOF™ NT (LECO, St Joseph, Мичиган, США) в качестве детектора. Тип ионизации – электронный удар (EI). Установки и рабочие параметры системы GC-TOF MS указаны в таблице 1.

3. Результаты

3.1. Быстрый анализ и деконволюция спектров – пестициды

Чтобы продемонстрировать потенциал системы TruTOF HT и программы ChromaTOF в детекции/идентификации, были проанализированы добавленные контаминанты и остатки. Оптимизированные режимы описаны в предыдущем разделе. Все данные, полученные в ходе анализа образцов, обрабатывали автоматическими функциями деконволюции и поиска пиков. Программа ChromaTOF автоматически определяет пики по каждой из регистрируемых простых масс (m/z 35-650 в нашей работе) при заданном отношении сигнал/шум (≥ 25 в нашем случае). После этого алгоритм деконволюции математически разделял масс-спектры хроматографически коэлюирующих соединений. Восстановленные спектры автоматически идентифицировались путем сравнения с библиотекой NIST. В качестве примера рисунок 2 показывает восстановленную хроматограмму по общему ионному току (DTIC) для искусственно приготовленного стандарта (25 мкг/л). Из-за высокой скорости разделения (быстрая температурная программа – 45°C/мин) отмечено несколько коэлюций (см. рис.2А). Успешная спектральная деконволюция с последующей идентификацией перекрывающихся хроматографических пиков были возможными при скорости регистрации масс-спектров 15 Гц, предлагаемой время-пролетным масс-спектрометром (см. рис. 2В-С). Хотя определенные коэлюции отмечены внутри всех групп анализов и матриц, количественная оценка целевых соединений возможна благодаря избыточности информации, содержащейся в пиках, восстановленных по их уникальным массам.

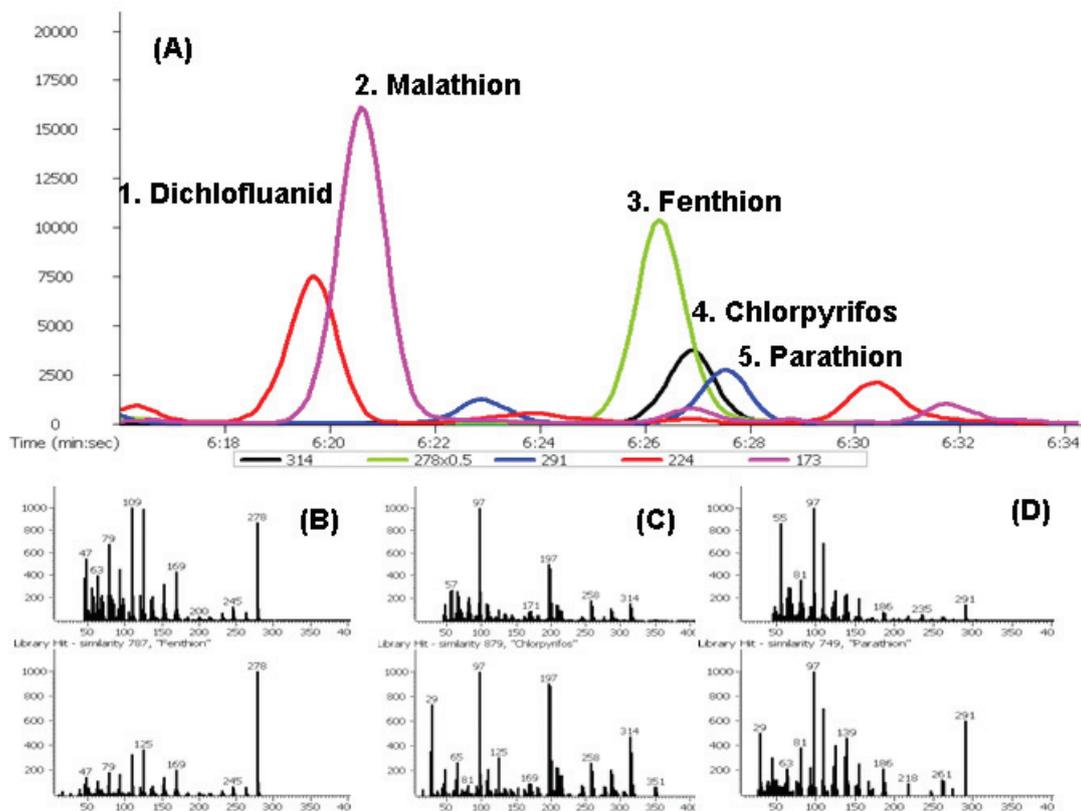


Рис. 2. GC-TOF MS анализ образцов с добавленными пестицидами в количестве 25 мкг/л (детское питание на основе яблочного пюре). (А) Восстановленная ТИС-хроматограмма. Показаны измеренные масс-спектры (верхняя линия) фентиона (В), хлорпирифоса (С) и паратиона (D) в сравнении с соответствующими им библиотечными спектрами NIST (нижняя линия).

3.2. Рабочие характеристики методов анализа пестицидов и ПХБ

Рабочие характеристики аналитических методов (повторяемость, пределы количественной оценки и линейность) оценивали на искусственно загрязненных образцах в трех повторениях. Поскольку упор делался на завершающих этапах аналитического процесса, вопросы, касающиеся пробоподготовки, не обсуждались. Результаты сведены в таблицу 2.

Пределы количественной оценки (LOQ) определяли как нижний порог калибровок (LCL).

Таблица 2

Рабочие характеристики методов определения целевых аналитов в различных пищевых матрицах на системе GC– TOF MS *

Соединение	Линейность (R^2)	LOQ (нг/г)	RSD (n=5, %)
<i>Пестициды в продуктах детского питания</i>			
НСВ	0.9991	2.5	2
DDT	0.9994	5.0	5
DDE	0.9981	5.0	7
DDD	0.9980	5.0	9
НСН	0.9995	2.5	4
эндрин	0.9993	5.0	4
хлорпиррофос	0.9975	5.0	6
гептахлор	0.9972	5.0	8
<i>ПХБ в свином жире</i>			
ПХБ 28	0.9983	2.5	5
ПХБ 52	0.9963	5.0	9
ПХБ 101	0.9955	5.0	6
ПХБ 118	0.9959	5.0	10
ПХБ 138	0.9960	5.0	5
ПХБ 153	0.9942	10.0	12

*Пределы количественной оценки (LOQs) определяли на очищенных экстрактах мат-риц. Повторяемость (RSD) измеряли на концентрациях 25 мкг/л.

3.3. Улучшенное разделение системой GC GC

Законодательство относительно стойких хлорорганических пестицидов (ХОП) и поли-хлорированных бифенилов становится все более строгим, поскольку обширные исследования показали их сильную токсичность по отношению к животным и человеку. Потребность в методах, способных хроматографически разделить индивидуальные компоненты из семейства ПХБ, а также другие хлорорганические соединения в сложных матрицах, определила интерес к полной двумерной газовой хроматографии (GC X GC), в том числе – в сочетании с время-пролетным масс-спектрометром (TOF-MS) в качестве детектора. Технология GC X GC резко повысила разрешающую мощь хроматографии, а наличие в ней термомодулятора, благодаря эффекту "криофокусирования", существенно улучшило пределы детекции. Детектор TOF-MS способен работать на скоростях (до 500 полных масс-спектров в секунду), необходимых для определения сверхузких пиков со вторичной колонки. Высокая чувствительность этого детектора во всем диапазоне масс является цен-

ным преимуществом для анализа нецелевых ПХБ и/или других загрязнений/остатков. Входящая в состав системы программа ChromaTOF может строить высокоструктурированные двумерные хроматограммы с выделением регионов нахождения специфических семейств соединений. По завершению анализа всех образцов функция автоматического поиска пиков и деконволюции она может отслеживать потенциальные коэлюции. В процессе поиска пиков программа ChromaTOF автоматически фиксирует пики по всем зарегистрированным единичным массам с величиной сигнала выше заданного порога ($c/\text{ш} \geq 50$ в нашем случае). После этого алгоритм деконволюции математически разделяет масс-спектры коэлюирующих соединений. Восстановленные спектры сравниваются с библиотекой NIST и соединения идентифицируются автоматически. Детектор TOF-MS использовали в данной работе для демонстрации потенциала ортогональной двумерной газовой хроматографии. На рис. 3 показана контурная диаграмма анализа смеси растворенных стандартов системой GC × GC–TOF MS. Были применены две колонки различной селективности, чем достигнута повышенная разрешающая способность. В данном исследовании разделение соединений в первом измерении (летучесть) обеспечивалось колонкой ВРХ-5, а во втором (полярность) – колонкой ВРХ-50. В этой системе пики продуктов деградации колонки (шлейф) расположились в верхней части диаграммы, ниже их – более полярные окси-соединения, хлорированные ароматические соединения. Менее полярные ХОП и углеводороды расположены ближе к основанию. Чем больше полярных групп содержит структура, тем выше расположено соединение на диаграмме. Хороший пример показан на рис. 4В, где часть соединений осталась бы неразделенной при одномерной хроматографии. В данном случае это пара ПХБ 28 – НСН, полностью разделенная на вторичной колонке.

В данном исследовании система GC × GC-TOF MS была использована для качественного и количественного анализа ПХБ и ХОП в виде стандартов, разбавленных в растворителях и добавленных к реальным образцам. Целью исследования было показать пригодность для подобных задач и потенциал разрешения системы полной двумерной газовой хроматографии (GC × GC). Задачей системы TOF MS было отслеживать возможные коэлюции и идентифицировать аналиты. Результаты, приведенные в табл. 3, свидетельствуют о значительно возросшей чувствительности в сравнении с одномерной хроматографией, особенно в отношении пестицидов (в 2-5 раз).

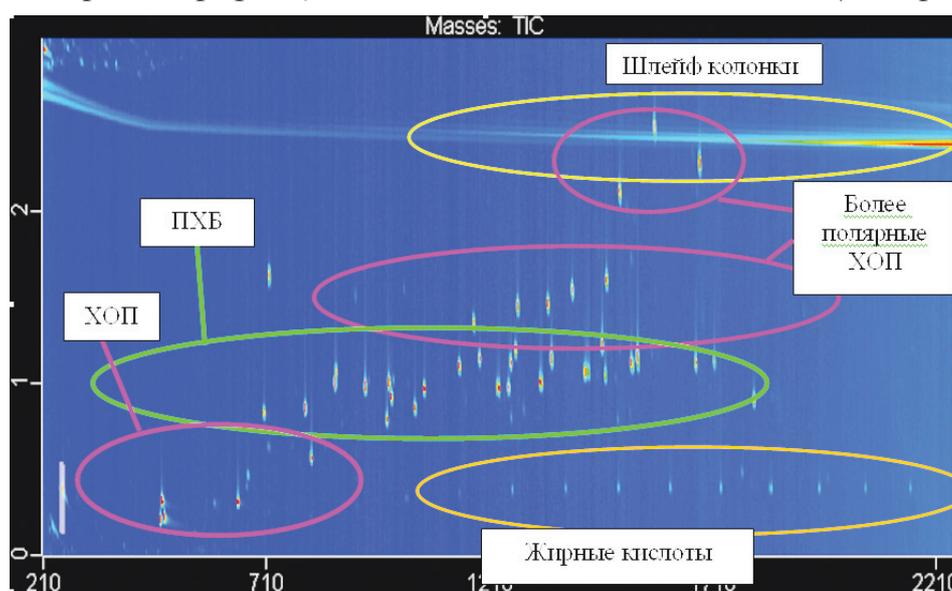


Рис. 3. Контурная диаграмма разделения системой GC × GC-TOF MS смеси разбавленных стандартов ХОП и ПХБ при концентрации 100 нг/мл

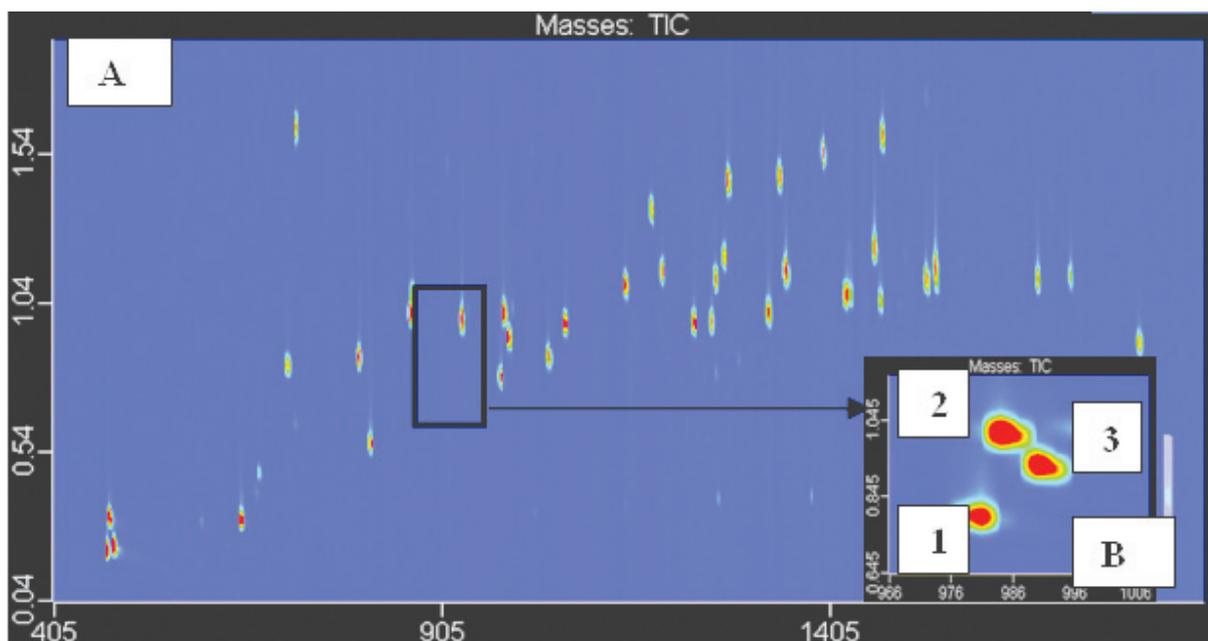


Рис. 4. (А) Контурная диаграмма, разделения системой GC×GC-TOF MS смеси разбавленных стандартов ХОП и ПХБ при концентрации 100 нг/мл. Увеличенная часть региона ПХБ демонстрирует разделение целевых аналитов (ПХБ) друг от друга и от ХОП. (В) Пример разделения: показаны ПХБ 28 (1), -НСН (2) и гептахлор (3).

Таблица 3

Пределы количественной оценки (LOQ) для отдельных соединений и повторяемость измерений загрязненных образцов свиного жира при анализе системой GC×GC-TOF MS

Соединение	Линейность (R ² , при 5-200 нг/г)	LOQs (нг/г)	Повторяемость (RSD,%,n=5)
<i>Пестициды</i>			
НСВ	0,9980	0,5	7
DDT	0,9991	0,5	9
DDE	0,9967	0,5	8
DDD	0,9984	1,5	5
НСН	0,9990	2	9
эндрин	0,9956	2,5	6
диэльдрин	0,9968	2,5	11
хлорпирофос	0,9979	4	17
гептахлор	0,9989	3	13
<i>ПХБ</i>			
ПХБ 28	0,9982	2,5	11
ПХБ 52	0,9965	3	17
ПХБ 101	0,9945	5	11
ПХБ 118	0,9967	3	9
ПХБ 138	0,9941	2	13
ПХБ 153	0,9970	4,5	14

4. Заключение

Данное исследование коротко описывает использование быстрого разделения для анализа микрозагрязнений в образцах пищевой продукции. Скоростная температурная программа существенно уменьшает общее время анализа в сравнении с традиционными методами. Использование масс-спектрометрического детектора время-пролетного типа (TOF MS) обеспечивает чувствительность, необходимую для идентификации следовых количеств загрязнителей и плотность данных – достаточную для определения узких хроматографических пиков и деконволюции перекрывающихся пиков.

Технология GC × GC, при условии надлежащего подбора колонок (в наших исследованиях ВРХ-5 и ВРХ-50) существенно улучшала разделение целевых аналитов и снижала пределы количественной оценки, в сравнении с обычной, "одномерной" хроматографией. Благодаря лучшему разделению, распознать целевые аналиты можно было даже без привлечения масс-спектрометрической информации, лишь по временам удержания на первичной и вторичной колонках. Но в реальных ситуациях, где нужна надежность и однозначность, нормативы предписывают идентификацию на основе масс-спектров. Следует еще раз подчеркнуть, что только время-пролетный масс-спектрометр может без потерь регистрировать очень узкие пики (доли секунды) со вторичной колонки. Анализ данных облегчается возможностью программы ChromaTOF селективно "фильтровать" необходимые типы соединений, т.е. имитировать специфическую чувствительность.

Авторы хотели бы представить далее другие интересные примеры применения систем GC-TOF MS и GC × GC-TOF MS. Следующая статья будет посвящена экологическим анализам галоген-органических загрязнителей.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Lehotay S.J., Hajslova J.*: TrAC 21, 686 (2002).
2. *Hajslova J., Zrostlikova J.*: J. Chromatogr. A 1000, 181 (2003).
3. *Schurek J., Portoles T., Hajslova J., Riddellova K., Hernandez F.*: Anal. Chim. Acta 611, 163 (2008).
4. *Agustin M.R.R., Park H., Hong S., Ryu J., Lee K.*: J. of Chromatogr. A 1085, 278 (2005).
5. *Ticha J., Hajslova J., Jech M., Honzicek J., Lacina O., Kohoutkova J., Kocourek V., Lansky M., Kloutvorova J., Falta V.*: Food Control 19, 247 (2008).
6. *Hajslova J., Zrostlikova J.*: J. Chromatogr. A 1000, 181 (2003).
7. *Suchan P., Pulkrabova J., Hajslova J., Kocourek V.*: Anal. Chim. Acta 520, 193 (2004).

Благодарности

Авторы хотели бы поблагодарить LECO Instrumente Plzen и SGE Analytical Sciences за любезную помощь и поддержку.

¹ Институт химической технологий, Прага, Факультет пищевых и биохимических технологий, отделение пищевой химии и анализа,

ул. Техническая, 3, 166 28, Прага-6, Чешская Республика

² SGE Europe, пр. Квебека, 12, г. Куртабеф, Франция

³ LECO Instrumente Plzen Ltd, ул. Пласка, 66, 323 00, г. Пльзень, Чешская Республика

Поступило в редакцию 20.10.2009