

# ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИОКСИНОВ В КОРМАХ И ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

## КОМПЛЕКСНОЕ РЕШЕНИЕ DIOXINS S<sup>3</sup>

М.В.Тремасова, Shimadzu Europa  
smo\_mt@shimadzu.ru

УДК 543.5, ВАК 02.00.02

Компания Shimadzu представляет новое комплексное решение Dioxins S<sup>3</sup> для определения диоксинов в кормах и пищевых продуктах. Комплекс включает оборудование для проведения автоматической пробоподготовки анализируемых образцов, а также газовый тандемный хромато-масс-спектрометр Shimadzu GCMS-TQ8050. Приведены результаты определения 17 токсичных соединений согласно строгим европейским регламентам, позволяющим вместо сложной и дорогостоящей газовой хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения в качестве подтверждающего метода анализа применять газовую тандемную хромато-масс-спектрометрию. Регламенты также обязательны к исполнению для всех производителей, экспортирующих свою продукцию на территорию стран ЕС.

Диоксины – это общее название семейства структурно и химически связанных полихлорированных дибензо-пара-диоксинов (ПХДД) и полихлорированных дибензофуранов (ПХДФ). Похожими свойствами обладают некоторые диоксиноподобные полихлорированные бифенилы (ПХБ) [1]. Группа ПХДД/ПХДФ и диоксиноподобных ПХБ насчитывает 419 соединений, относящихся к стойким органическим загрязнителям. Из-за высокой химической стабильности и хорошей растворимости в животных жирах они накапливаются в окружающей среде, растениях и живых организмах. Человек может быть подвержен действию диоксинов в результате употребления мясных, молочных и рыбных продуктов [1]. Диоксины – высокотоксичные соединения, они обладают нейротоксическим действием, могут вызывать поражение иммунной системы, гормональные нарушения, онкологические заболевания, проблемы в области репродуктивного здоровья и т.д. [1, 2]. Во многих странах на государственном уровне запрещено использовать сырье, а также готовые продукты и корма с их повышенным содержанием. В качестве примера приведем продовольственный скандал, разгоревшийся в Германии в 2011 году. Тогда поставки зараженного диоксином корма для животных и птиц

привели к закрытию около 5000 сельскохозяйственных ферм и огромным экономическим потерям [3].

В начале 2000-х годов в ЕС были утверждены первые официальные методы контроля содержания ПХДД/ПХДФ и ПХБ в пищевых продуктах и кормах. Для определения диоксинов на следовом уровне предписывалось использовать только газовую хромато-масс-спектрометрию высокого разрешения (ГХ-МСВР), поскольку она характеризуется высокой селективностью и чувствительностью. С 2014 года в качестве подтверждающего метода анализа утверждена газовая тандемная хромато-масс-спектрометрия ГХ-МС/МС [4], что значительно повысило доступность анализа и уменьшило затраты контрольных лабораторий. Таким образом, метод ГХ-МС/МС можно использовать для предоставления полной или дополнительной информации, позволяющей однозначно идентифицировать и количественно определять ПХДД/ПХДФ и диоксиноподобные ПХБ на предельно допустимом уровне.

### ОБОРУДОВАНИЕ

Диоксины в кормах и пищевых продуктах определяют в соответствии с регламентами ЕС 709/2014 и ЕС 644/2017 [5] процедур отбора проб и методов анализа. Регламенты

обязательны к исполнению не только на территории ЕС, но и в странах-экспортерах.

Пробоподготовка образцов включает гомогенизацию анализируемых пищевых продуктов, растворение, экстракцию, упаривание остатков растворителя, очистку проб и концентрирование искомым диоксинов.

Экстракцию образцов проводили растворителем под давлением с помощью высокопроизводительной системы BUCHI SpeedExtractor E-914/E-916, заменяющей времязатратные и трудоемкие процессы традиционного метода, включая экстракцию Сокслета. За 8-часовую смену SpeedExtractor E-914/E-916 может обработать до 96 образцов [6], при этом на 70% сокращается расход растворителей, что значительно снижает затраты на проведение анализа.

Полученный экстракт упаривали, а затем очищали и концентрировали с помощью автоматической системы MIURA GO-xHT (рис.1). Потом пропускали через две очищающие и две концентрационные колонки, в итоге получали две отдельные фракции ПХДД/ПХДФ и диоксиноподобных ПХБ. Для элюирования искомым соединений использовали 100 мл гексана и 5 мл толуола. Благодаря применению одноразовых колонок и отсутствию контакта образцов с переключающими клапанами риск перекрестного загрязнения при серийном анализе сведен к нулю, а система не требует дополнительных промывок. Пробоподготовка с системой MIURA GO-xHT исключает использование токсичных хлорсодержащих растворителей (например, дихлорметан), что дополнительно снижает расходы на проведение анализа и повышает его безопасность. Процессы очистки и концентрирования занимают 90 мин. В зависимости от предполагаемых объемов анализов система MIURA GO-xHT может комплектоваться модулями на два, четыре или шесть образцов одновременной пробоподготовки. Таким образом, MIURA GO-xHT предлагает простой, быстрый и эффективный метод очистки, концентрирования и фракционирования анализируемых проб, что существенно повышает эффективность анализов и увеличивает производительность аналитических лабораторий.

Измерение содержания диоксинов проводили с помощью газового тандемного хромато-масс-спектрометра Shimadzu GCMS-TQ8050 (рис.2). Благодаря новому детектору и трем технологиям подавления шумов чувствительность прибора одна из самых высоких среди аналогов в своем классе. Это позволяет определять ультрамалые количества (на уровне фемтограмм) целевых



Рис.1. Система для очистки и концентрирования образцов MIURA GO-xHT



Рис.2. Новинка 2016 года – газовый тандемный хромато-масс-спектрометр Shimadzu GCMS-TQ8050

соединений с высокой точностью. Немаловажное преимущество состоит в способности GCMS-TQ8050 регистрировать одновременно большое число компонентов. Для работы нового детектора требуется подача значительно меньшего напряжения, поэтому срок его эксплуатации увеличился до пяти раз. Использование безмасляного насоса позволяет уменьшить периодичность обслуживания до одного раза в три года, благодаря чему GCMS-TQ8050 отличается высокой надежностью и долговечностью работы.

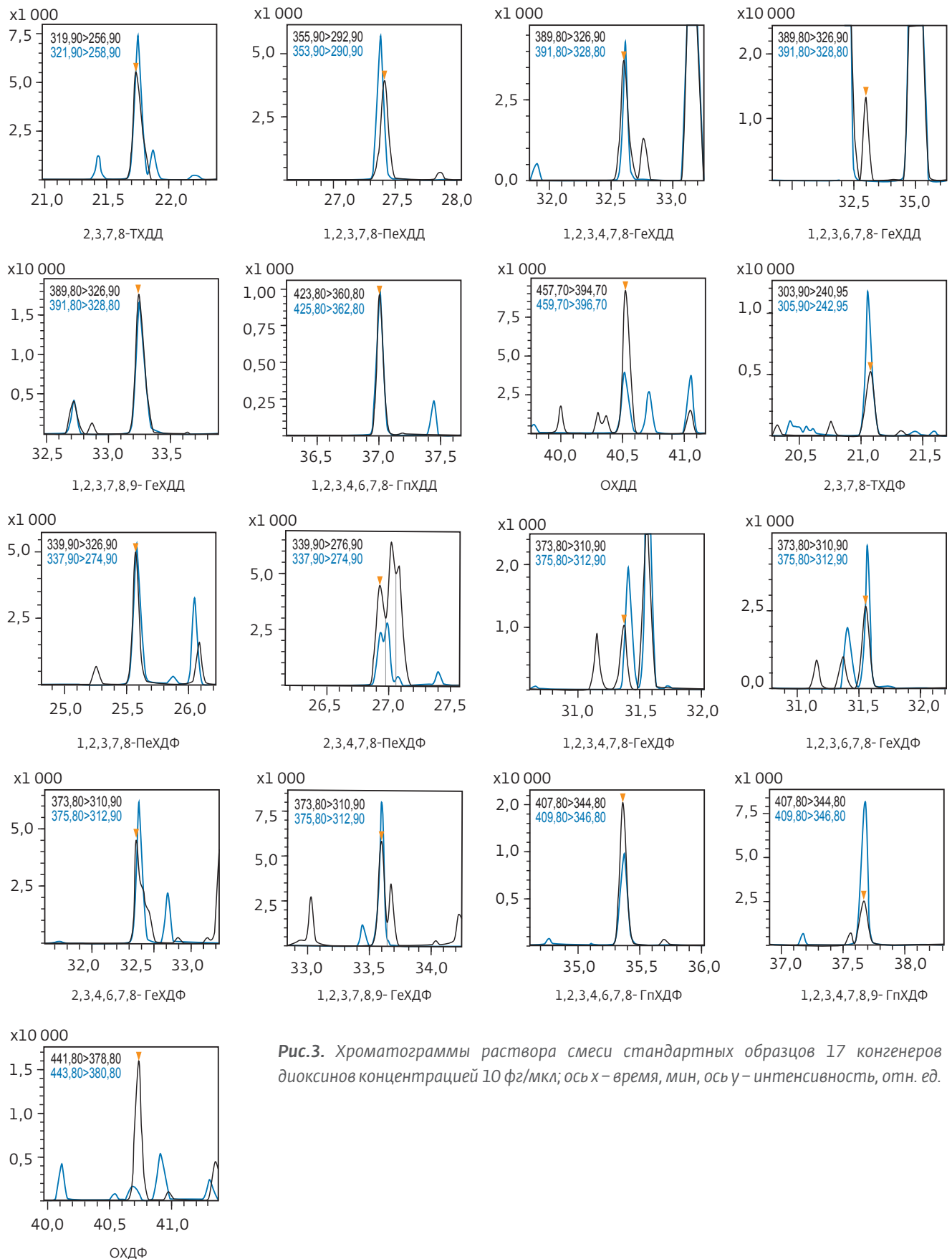


Рис.3. Хроматограммы раствора смеси стандартных образцов 17 конгенов диоксинов концентрацией 10 фг/мкл; ось x – время, мин, ось y – интенсивность, отн. ед.

На рис.3 представлены полученные на GCMS-TQ8050 хроматограммы раствора смеси стандартных образцов 17 конгенов диоксинов концентрацией 10 фг/мкл. Анализ проходил в режиме электронной ионизации (ЭИ), метод мониторинга множественных реакций (MRM). В качестве соударительного газа применяли аргон с давлением подачи 150 кПа. Для разделения компонентов использовали капиллярную колонку с фазой 5%-дифенил/95%-диметилполисилоксан длиной 60 м, внутренним диаметром 0,25 мм, толщиной пленки неподвижной фазы 0,25 мкм; объемом вводимой пробы – 1 мкл.

Соотношение сигнал/шум (S/N) для пиков всех соединений выше, чем 100:1 (например, для самого токсичного конгенера 2,3,7,8-ТХДД соотношение сигнал/шум пика m/z 319,9→256,9 составило 2070), что соответствует европей-

скому Регламенту 644/2017. Диоксины из-за своей высокой токсичности должны определяться на уровне фемтограмм ( $10^{-15}$  г), а предел количественного определения рассчитывается при соотношении S/N, равном 3:1.

### ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Количественное определение 17 высокотоксичных конгенов ПХДД/ПХДФ проводили в образцах филе рыбы. Анализ выполняли с помощью газового tandemного хромато-масс-спектрометра Shimadzu GCMS-TQ8050 в комплекте со специализированной базой данных Smart Environmental Database. Она позволяет быстро создать метод одновременного определения до нескольких сотен соединений и приступить к непосредственному анализу без трудоемкого подбора параметров.

Таблица 1. Параметры анализа градуировочных растворов, целевые соединения

Название соединений	m/z	m/z, ионы сравнения	Время удерживания, мин	Концентрация, нг/мл				
				1	2	3	4	5
2,3,7,8-ТХДД	319,90>256,90	321,90>258,90	21,681	0,05	0,10	0,20	0,50	1,00
1,2,3,7,8-ПеХДД	355,90>292,90	353,90>290,90	27,338					
1,2,3,4,7,8-ГеХДД	389,80>326,90	391,80>328,80	32,556					
1,2,3,6,7,8-ГеХДД	389,80>326,90	391,80>328,80	32,709					
1,2,3,7,8,9-ГеХДД	389,80>326,90	391,80>328,80	33,088					
1,2,3,4,6,7,8-ГпХДД	423,80>360,80	425,80>363,80	36,968					
ОХДД	457,70>394,70	459,70>396,70	40,468	0,10	0,20	0,40	1,00	2,00
2,3,7,8-ТХДФ	303,90>240,95	305,90>242,95	20,996	0,05	0,10	0,20	0,50	1,00
1,2,3,7,8-ПеХДФ	339,90>276,90	337,90>274,90	25,523					
2,3,4,7,8-ПеХДФ	339,90>276,90	337,90>274,90	26,867					
1,2,3,4,7,8-ГеХДФ	373,80>310,90	375,80>312,90	31,320					
1,2,3,6,7,8-ГеХДФ	373,80>310,90	375,80>312,90	31,506					
2,3,4,6,7,8-ГеХДФ	373,80>310,90	375,80>312,90	32,326					
1,2,3,7,8,9-ГеХДФ	373,80>310,90	375,80>312,90	33,557					
1,2,3,4,6,7,8-ГпХДФ	407,80>344,80	409,80>346,80	35,566					
1,2,3,4,7,8,9-ГпХДФ	407,80>344,80	409,80>346,80	37,614					
ОХДФ	441,80>378,80	443,80>380,80	40,680	0,10	0,20	0,40	1,00	2,00

Таблица 2. Параметры анализа градуировочных растворов, внутренние стандарты

Название соединений	m/z	m/z, ионы сравнения	Время удерживания, мин	Концентрация, нг/мл
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -1,2,3,4-ТХДД	331,90>268,00	333,90>270,00	21,158	2,50
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -2,3,7,8-ТХДД	331,90>268,00	333,90>270,00	21,663	
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -1,2,3,7,8-ПеХДД	367,90>303,90	365,90>301,90	27,306	
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -1,2,3,4,7,8-ГеХДД	401,80>337,90	399,90>335,90	32,552	
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -1,2,3,6,7,8-ГеХДД	401,80>337,90	399,90>335,90	32,696	
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -1,2,3,7,8,9-ГеХДД	401,80>337,90	399,90>335,90	33,079	
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -1,2,3,4,6,7,8-ГпХДД	435,80>371,80	437,80>373,80	36,966	5,00
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -ОХДД	469,80>405,80	471,80>407,80	40,461	
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -2,3,7,8-ТХДФ	315,95>251,95	317,95>253,95	20,989	2,50
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -1,2,3,7,8-ПеХДФ	351,90>287,90	349,90>285,90	25,509	
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -2,3,4,7,8-ПеХДФ	351,90>287,90	349,90>285,90	26,847	
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -1,2,3,4,7,8-ГеХДФ	385,80>321,90	387,80>323,90	31,311	
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -1,2,3,6,7,8-ГеХДФ	385,80>321,90	387,80>323,90	31,495	
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -2,3,4,6,7,8-ГеХДФ	385,80>321,90	387,80>323,90	32,327	
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -1,2,3,7,8,9-ГеХДФ	385,80>321,90	387,80>323,90	33,549	
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -1,2,3,4,6,7,8-ГпХДФ	419,80>355,90	421,80>357,90	35,555	
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -1,2,3,4,7,8,9-ГпХДФ	419,80>355,90	421,80>357,90	37,613	
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -ОХДФ	453,80>389,80	455,80>391,80	40,676	

Перед проведением анализа и экстракции к образцам добавили внутренние стандарты, изотопно-меченые по углероду <sup>13</sup>C<sub>12</sub> аналоги определяемых диоксинов.

Анализ проводили в режиме мониторинга множественных реакций (MRM). Оптимизированные параметры метода MRM (массы ионов-предшественников, ионов-продуктов, энергии соударения и др.) брали из базы данных Smart Environmental Database, которая уже содержит необходимую информацию для 527 устойчивых органических загрязнителей (включая 161 изо-

топно-меченое соединение), среди них 58 ПХДД / ПХДФ и 254 ПХБ. С помощью этой базы и встроенной функции Smart MRM метод анализа создается автоматически, поэтому проводить измерения могут даже неопытные пользователи.

Времена удерживаний целевых соединений предсказывали по линейным индексам удерживания из базы данных. Достаточно провести анализ стандартной смеси n-алканов, и времена удерживания искоемых соединений рассчитаются автоматически программой

Газовый тандемный квадрупольный хромато-масс-спектрометр

# GCMS-TQ8050

**UFMS**  
ULTRA FAST ANALYSIS SPECTROMETRY



## Высококочувствительный анализ

В 10 раз более низкий предел обнаружения\* позволяет определять ультраследовые количества целевых соединений там, где долгое время применялись только системы ГХМС с высоким разрешением.

\*по сравнению с предыдущими моделями ГХ-МС/МС

### Области применения:

- Определение следовых количеств пестицидов, диоксинов и других стойких органических загрязнителей в продуктах питания, пищевом сырье и объектах окружающей среды
- Определение наркотических и запрещенных препаратов и их метаболитов в биологических материалах
- и другие

 **Smart MRM**

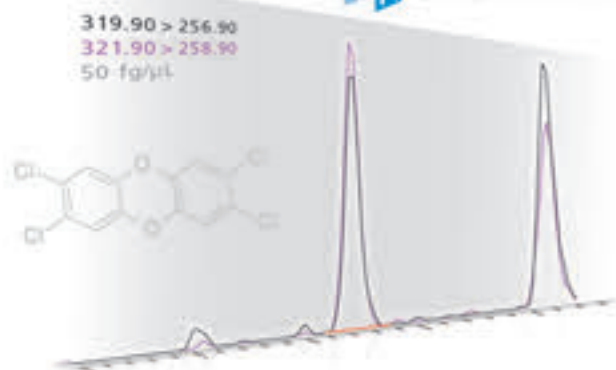


Таблица 3. Количественные результаты анализа образца экстракта рыбы

Название соединений	Время удерживания, мин	Площадь, отн. ед.	S/N*	Концентрация, нг/мл	TEF согласно ВОЗ	TEQ, нг/мл
2,3,7,8-ТХДД	21,649	220 313	20178	0,124	1	0,124
1,2,3,7,8-ПеХДД	27,304	506 237	2240	0,328	1	0,328
1,2,3,4,7,8-ГеХДД	32,543	75 033	9416	0,047	0,1	0,005
1,2,3,6,7,8-ГеХДД	32,694	179 157	22 849	0,121	0,1	0,012
1,2,3,7,8,9-ГеХДД	33,091	47 886	4 873	0,033	0,1	0,003
1,2,3,4,6,7,8-ГпХДД	36,961	60 746	21 564	0,044	0,01	0,000
ОХДД	40,437	51 075	5 576	0,056	0,0003	0,000
<b>Сумма ПХДД</b>	–	–	–	<b>0,752</b>	–	<b>0,472</b>
2,3,7,8-ТХДФ	20,980	7 381 249	2 137	3,538	0,1	0,354
1,2,3,7,8-ПеХДФ	25,498	938 115	119	0,492	0,03	0,015
2,3,4,7,8-ПеХДФ	26,841	2 577 208	2 899	1,337	0,3	0,401
1,2,3,4,7,8-ГеХДФ	31,299	26 614	191	0,017	0,1	0,002
1,2,3,6,7,8-ГеХДФ	31,492	93 633	122	0,054	0,1	0,005
2,3,4,6,7,8-ГеХДФ	32,323	90 911	3 104	0,052	0,1	0,005
1,2,3,7,8,9-ГеХДФ	33,567	8 681	2 142	0,006	0,1	0,001
1,2,3,4,6,7,8-ГпХДФ	35,544	56 601	11 731	0,034	0,01	0,000
1,2,3,4,7,8,9-ГпХДФ	37,627	2 893	1 559	0,002	0,01	0,000
ОХДФ	40,678	3 089	607	0,001	0,0003	0,000
<b>Сумма ПХДФ</b>	–	–	–	<b>5,533</b>	–	<b>0,783</b>
<b>Суммарный токсический эквивалент ПХДД/ПХДФ-ТЕQ</b>						<b>1,255</b>

\* При расчете соотношения S/N значение шума рассчитывали как среднеквадратичное отклонение сигнала базовой линии за определенный интервал времени.

корректировки времен удерживания AART (Automatic Adjustment of Retention Times). Расчет для каждого соединения одновременно по 15 точкам повышает точность определения.

**Условия анализа:**

ГХ  
Колонка DB-5MS .... 60 м, внутренний диаметр 0,25 мм, толщина пленки неподвижной фазы 0,25 мкм

Стеклоянная вставка.....Custom SkyLiner, Splitless (Restek)  
Объем ввода пробы..... 2 мкл  
Режим ввода пробы..... без деления потока  
Температура инжектора ..... 280°C  
Температурная программа термостата .... 150°C (1 мин) → (20°C/мин) → 220°C → (2°C/мин) → 260°C (3 мин) → (5°C/мин) → 320°C (8,5 мин)  
Постоянная линейная  
скорость потока газа-носителя ..... 29,4 см/с

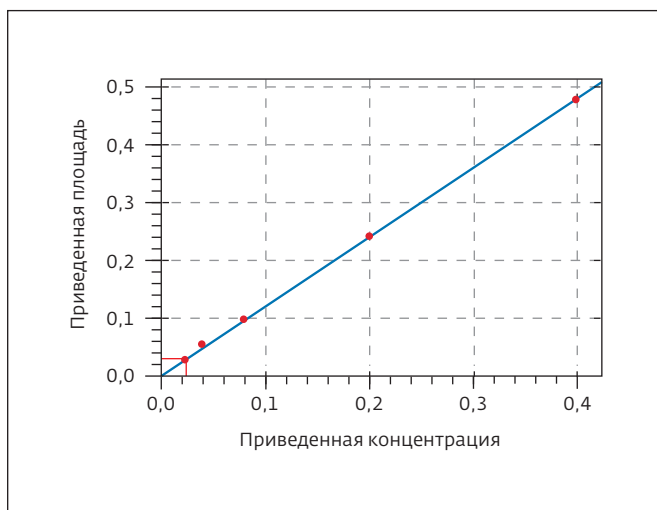


Рис.4. Градуировочный график 2, 3, 7, 8-ТХДД

МС

Режим ионизации .....ЭИ  
 Режим работы МСД ..... MRM  
 Энергия ионизации .....70 эВ  
 Ток эмиссии .....150 мкА  
 Соударительный газ ..... аргон  
 Энергия соударения ... значения из базы данных Smart Environmental Database  
 Время цикла.....1 с (для целевых соединений: 0,8 с, для внутренних стандартов: 0,2 с)  
 Давление соударительного газа ..... 150 кПа  
 Напряжение на детекторе .....2,1 кВ.

Для калибровки системы проводили анализ градуировочных растворов в области низких концентраций (табл.1, 2). На рис.4 градуировочный график наиболее токсичного конгенера 2,3,7,8-ТХДД. Аналогичные зависимости получены для всех стандартных образцов диоксинов с коэффициентом детерминации  $R^2 \geq 0,999$ , что указывает на хорошую линейность градуировки.

Хроматограммы четырех из семнадцати обнаруженных конгенов, полученные при анализе образца экстракта рыбы, изображены на рис.5. Результаты хромато-масс-спектрометрического анализа образца экстракта рыбы в табл.3.

На основе полученных концентраций диоксинов и соответствующих факторов эквивалентной токсичности (TEF)<sup>\*</sup>, установленных Всемирной организацией

\* Факторы эквивалентной токсичности (TEF) – установленные ВОЗ коэффициенты токсичности диоксинов относительно 2,3,7,8-тетрахлордibenзо-*p*-диоксина, токсичность которого условно принята равной единице [2].

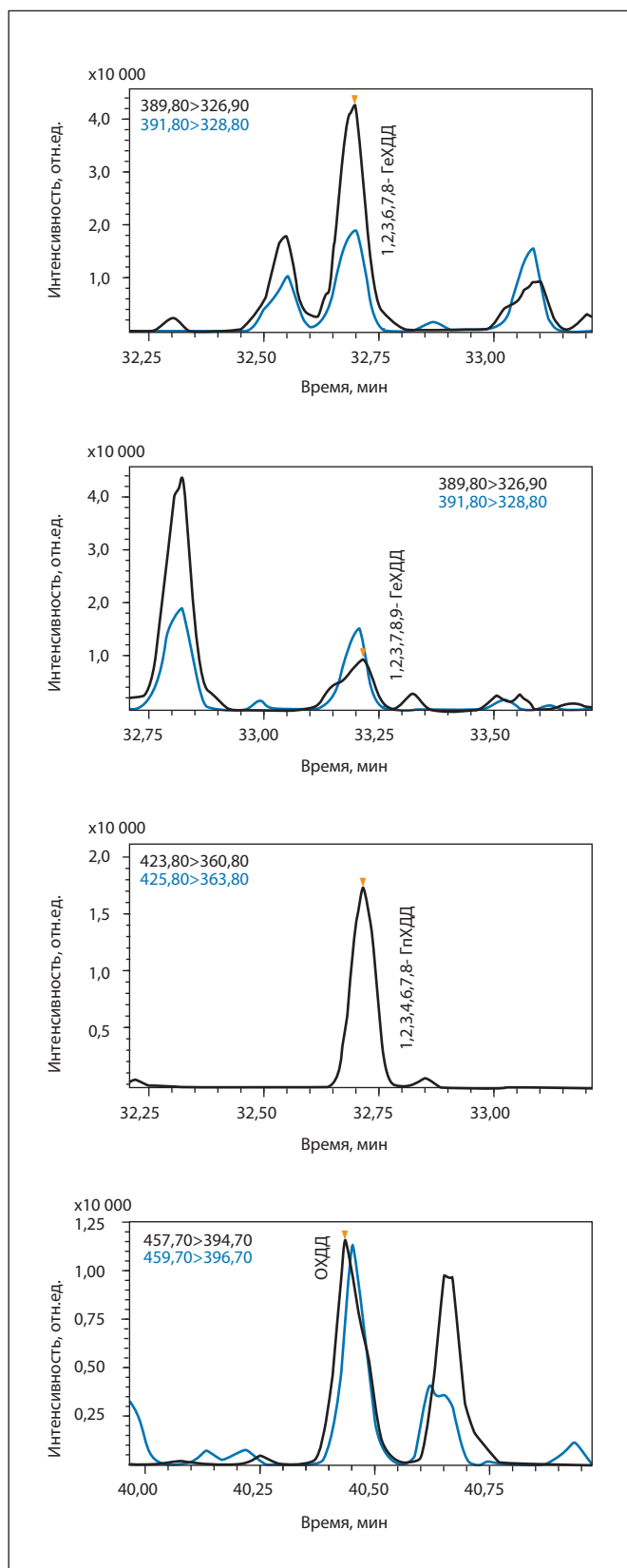


Рис.5. Хроматограммы четырех из семнадцати обнаруженных диоксинов, полученные при анализе образца экстракта рыбы



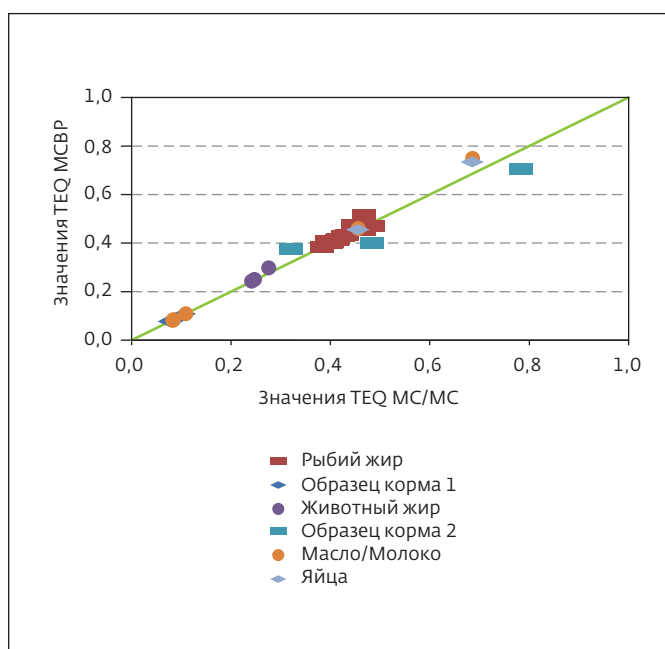


Рис.6. Корреляция результатов, полученных с помощью газового тандемного хромато-масс-спектрометра Shimadzu TQ8050 и газового хромато-масс-спектрометра высокого разрешения

здравоохранения (ВОЗ), рассчитывали токсические эквиваленты (TEQ) для каждого обнаруженного конгенера (как произведение концентрации диоксина на его TEF), а затем Суммарный токсический эквивалент\* (см. табл.3). Все расчеты проведены с помощью специализированного программного обеспечения, входящего в решение Dioxins S<sup>3</sup>. Программное обеспечение автоматически загружает полученные данные, рассчитывает содержание диоксинов и диоксиноподобных ПХБ и создает суммарный отчет анализа, соответствующий всем требованиям европейских стандартов.

При пересчете полученного суммарного токсического эквивалента ПХДД/ПХДФ в экстракте на массу навески получили, что в исследуемом образце филе рыбы содержится 0,954 пг/г TEQ ПХДД/ПХДФ. Это не превышает допустимые пределы содержания, установленные европейскими нормативами – 3,5 пг/г (Регламент ЕС 1259/2011) [8].

Для сравнения результатов, полученных методами тандемной хромато-масс-спектрометрии и масс-спектрометрии высокого разрешения проводили определение содержания диоксинов в различных пищевых матрицах (рис.6). Угловой коэффициент прямой на гра-

фике равен единице, что говорит об очень хорошей корреляции: данные ГХ-МС/МС практически совпадают со значениями, полученными с помощью ГХ-МСБП.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Комплексное решение определения диоксинов Dioxins S<sup>3</sup>, включающее газовый тандемный хромато-масс-спектрометр GCMS-TQ8050, обеспечивает быстрый, высокопроизводительный, точный, надежный и высокочувствительный анализ в соответствии с последними европейскими нормативами и является альтернативой сложному и дорогостоящему методу хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Официальный сайт всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) [Электронный ресурс] URL: <http://www.who.int/ru> – (10.06.2017).
2. Van den Berg M., Birnbaum L.S., Denison M., De Vito M., Farland W., Feeley F., Fiedler H., Hakansson H., Hanberg A., Haws L., Rose M., Safe S., Schrenk D., Tohyama C., Tritscher A., Tuomisto J., Tysklind M., Walker N., Peterson R.E. The 2005 World Health Organization reevaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds // Toxicological Sciences 2006. 93(2). P. 223–241.
3. Inside the Dioxin Scandal // Spiegel Online. 2011, 10 January [Electronic resource] URL: <http://www.spiegel.de/international/germany/inside-the-dioxin-scandal-the-criminal-machinations-of-the-feed-industry-a-738610.html> – (10.06.2017)
4. COMMISSION REGULATION (EU) No 589/2014 of 2 June 2014 laying down methods of sampling and analysis for the control of levels of dioxins, dioxin-like PCBs and non-dioxin-like PCBs in certain foodstuffs and repealing Regulation (EU) No 252/2012.
5. COMMISSION REGULATION (EU) 2017/644 of 5 April 2017 laying down methods of sampling and analysis for the control of levels of dioxins, dioxin-like PCBs and non-dioxin-like PCBs in certain foodstuffs and repealing Regulation (EU) No 589/2014.
6. Официальный сайт компании Buchi [Электронный ресурс] URL: <http://www.buchi.com> – (10.06.2017).
7. Safe S. Hazard and Risk Assessment of Chemical Mixtures Using the Toxic Equivalency Factor Approach // Environmental Health Perspectives. 1998. 106. P. 1051–1058.
8. COMMISSION REGULATION (EU) No 1259/2011 of 2 December 2011 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for dioxins, dioxin-like PCBs and non dioxin-like PCBs in foodstuffs.

\* Суммарный токсический эквивалент – токсичность пробы по диотоксинам, равная сумме произведений концентрации каждого конгенера на соответствующий TEF [7].