

Adam Grochowalski

Praktyczne aspekty rozwiązywania problemów oznaczania ultraśladowych, szkodliwych związków organicznych na przykładzie dioksyn

Practical aspects of solving problems with determination of ultratraces of hazardous organic compounds on dioxins example.

Wstęp – uwagi praktyczne w analizie śladowej

Analiza ultraśladowa związków organicznych zaliczanych do tzw. Trwałych zanieczyszczeń organicznych – TZO wymaga zastosowania bardzo specyficznych metod w zakresie przygotowania próbki do analizy jak i samych metod analizy instrumentalnej. Zasadniczo, TZO należą do stabilnych termicznie związków chemicznych, dlatego do ich oznaczania można wykorzystać metody chromatografii gazowej. W próbkach pochodzenia środowiskowego, żywności oraz pasz oznaczanie substancji szkodliwych wymaga zastosowania metod pozwalających na uzyskanie bardzo niskiej granicy oznaczalności, zwykle na poziomie ng/kg próbki. Tak niskie stężenia substancji szkodliwych mogą być oznaczone metodą chromatografii gazowej dzięki zastosowaniu bardzo selektywnych detektorów – np. spektrometr mas lub detektor wychwytu elektronów. Zastosowanie jednak tych detektorów, oraz kapilarnych kolumn chromatograficznych do rozdzielania składników mieszanin wymaga usunięcia z ekstraktu składników matrycy oraz wszystkich innych związków chemicznych mogących zakłócić sygnał analityczny. W praktyce oznacza to bardzo selektywne wyizolowanie analitu z ekstraktu badanej próbki. Można tego dokonać stosując techniki chromatografii cieczonej kolumnowej, chromatografii planarnej, preparatywnej HPLC oraz chromatografii z fazą ruchomą w stanie nadkrytycznym.

Dalsze oczyszczanie prowadzi się w oparciu o metody chromatografii żelowej oraz chemisorpcji. Ze względu na dużą różnorodność matrycy oznaczanych próbek (oleje, mączki zwierzęce, tkanka, substancje mineralne) w przypadku oznaczania dioksyn nie ma jednoznacznie określonych przepisów przygotowania próbek do analiz w sposób znormalizowany. W literaturze naukowej można spotkać wiele różnych metod przygotowania próbek do analiz ultraśladowych, jednak w wielu przypadkach napotkać można rażące błędy. Jeżeli postępować zgodnie z takimi opiami procedur, wykonujący oznaczenie nawet nie będzie wiedział, że może całkowicie utracić analit, albo wprowadzić inne, nieobecne w próbce zanieczyszczenia (np. ftalany, silikony).

W większości dostępnych norm (np. oznaczanie pozostałości pestycydów, WWA) w próbkach środowiskowych przyjmuje się, że procedura zapewnia odzysk analitu na poziomie powyżej 90% wagowo, lub podobny – określony w normie. W praktyce nie ma możliwości sprawdzenia rzeczywistego odzysku analitu pomimo, że do walidacji metody stosuje się bogaty zestaw dostępnych w handlu próbek odniesienia. Dobrym tego przykładem jest oznaczanie dioksyn w próbkach popiołu mineralnego pozostałego po spaleniu odpadowych substancji organicznych (drewno, tekstylia, papier itd.). Postępując według odnośnych norm (np. EPA-1613 czy EN-1948) wymaga się, aby popiół poddać ekstrakcji toluenem przez minimum 16 godzin np. a aparacie Soxhleta. Przyjmuje się odzysk analitu w ekstrakcie (dioksyny) na poziomie 95% wagowo. Okazało się jednak, że po wstępnym przemyciu próbki popiołu za pomocą 1M HCl a następnie jej wysuszeniu i poddaniu ekstrakcji w takich samych

warunkach masa analitu wzrosła dwukrotnie! Okazało się bowiem, że duża masa dioksyn zaadsorbowana jest na powierzchni tlenków metali, z powierzchni których nie ma możliwości odzyskać ich w drodze ekstrakcji. Uprzednio należy chemicznie rozpuścić tlenki metali uwalniając zaadsorbowane dioksyny. Podobny problem może dotyczyć niektórych analitów związanych z kwasem humusowym w glebie.

W najnowszych rozwiązaniach technicznych stosowana jest przyspieszona ekstrakcja rozpuszczalnikowa w podwyższonej temperaturze i pod zwiększonym ciśnieniem (tzw. ASE – Accelerated Solvent Extraction). Wstępne badania przeprowadzone w moim Zespole wykazały, że tą drogą uzyskuje się większe wartości odzysku analitu niż przy zastosowaniu klasycznych metod ekstrakcji jaką jest np. zastosowanie aparatu Soxhleta.

Następnym dużym problemem analitycznym jest możliwość utraty analitu na drodze wieloetapowego oczyszczania próbki do analizy. Oczyszczanie przeprowadza się głównie w oparciu o metody selektywnej sorpcji na określonych adsorbentach. Niewielkie błędy w odmierzeniu właściwej objętości odbieranej frakcji zawierającej analit lub niekontrolowana zmiana własności sorpcyjnych adsorbentu może spowodować praktycznie całkowitą utratę analitu. Bez zastosowania odpowiednich wzorców do badania odzysku kontrola tego procesu jest praktycznie niemożliwa. To prawda, że można wykonać próbę odniesienia z wykorzystaniem certyfikowanych materiałów odniesienia i udowodnić powtarzalność i odtwarzalność metody analitycznej, ale przecież często zdarzają się błędy przypadkowe, których uniknąć się nie da. Wówczas otrzymamy wynik obarczony dużym błędem, o czym możemy nie wiedzieć.

W analizie ultraśladowej prowadzonej za pomocą techniki chromatografii gazowej i spektrometrii mas zaczyna wprowadzać się wzorce wewnętrzne znaczone izotopowo np. węglem ^{13}C . Są to związki chemiczne będące tymi samymi substancjami chemicznymi jak analit tylko w swojej budowie zamiast węgla o masie atomowej 12 zawierają izotop węgla o masie atomowej 13. Związki te nie różnią się praktycznie żadnymi własnościami chemicznymi tak, że w czasie oczyszczania analitu zachowują się identycznie. Wzorce wewnętrzne wprowadzane są do próbki przed jej oczyszczeniem, aby można było kontrolować straty powstałe na tym etapie analizy. Jeśli więc nastąpi utrata analitu tracimy w równym stosunku wzorzec wewnętrzny, gdyż ma takie same własności chemiczne. Znana jest masa wzorca wprowadzonego przed analizą i po oznaczeniu ekstraktu końcowego. Stąd znany jest stopień odzysku analitu, który będzie taki sam dla analitu jak dla substancji wzorcowej. Technika spektrometrii mas można oznaczać analit obok wzorca wewnętrznego bez wzajemnego zakłócania sygnału analitycznego, gdyż metoda spektrometrii mas oznacza się masę jonu fragmentacyjnego. Masa jonu analitu jest mniejsza niż masa jonu wzorca, gdyż ten ostatni zawiera cięższe atomy węgla. Dla przykładu dla 2,3,7,8-tetrachlorodibenzodiioksyny (TCDD) zawierającej w cząsteczce 12 atomów węgla masa jonu wzorca jest większa o 12 jednostek masowych (334) niż masa jonu analitu (322).

Problem tylko w tym, że jak na razie dostępna jest tylko niewielka liczba takich substancji wzorcowych (głównie polichlorowanych dibenzodiioksyn, dibenzofuranów i bifenyli) i są one bardzo drogie. Dostępne są również w niewielkim wyborze związki deuteryzowane i zawierające izotopy atomów chloru o masie ^{37}Cl . Brak jest w praktyce takich wzorców dla pestycydów i mykotoksyn.

Innym, poważnym problemem w analizie ultraśladowej jest występowanie tła laboratoryjnego, spowodowanego oznaczaniem w tych samych pomieszczeniach i przy użyciu tej samej aparatury i szkła laboratoryjnego próbek zawierających duże stężenie analitu i próbek o ultraśladowej jego zawartości. Znakomitym przykładem jest oznaczanie dioksyn w próbkach pochodzących np. z popiołów ze spalania odpadów (zawartość dioksyn do 500 μg -

TEQ/kg) i żywności o zawartości 100 pg-TEQ/kg. Mamy tu do czynienia z próbkami różniącymi się masą analitu o 6 rzędów wielkości.

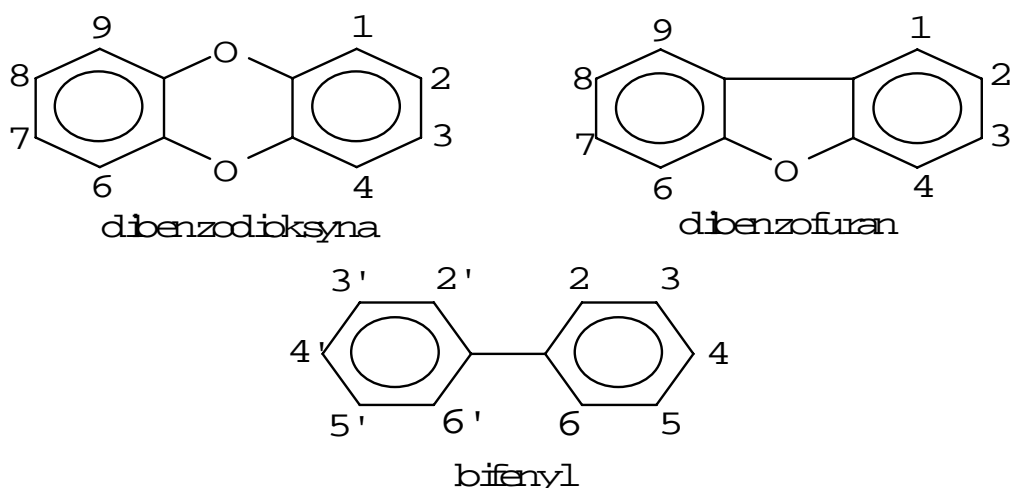
Z własnego doświadczenia wiem, że użycie do oznaczania dioksyn szkła laboratoryjnego do ekstrakcji i oczyszczania ekstraktu próbek popiołu ze spalarni czyni je bezużytecznym w oznaczaniu tych związków w próbkach żywności. W praktyce nie mam możliwości usunięcia tła z tak zanieczyszczonego szkła, które po wykonaniu oznaczenia powinno zostać zniszczone. Problem jest marginalny ekonomicznie w przypadku prostych naczyń szklanych jak zlewki, pipety czy kolby, Natomiast w przypadku drogich elementów jak chłodnice do wyparek, czy zestawy kolumn chromatograficznych do oczyszczania ekstraktów na adsorbentach jest możliwość obniżenia tła przez kilkudniowe wygrzewanie takiego szkła w temperaturze ok. 400 °C. Po ochłodzeniu szkło jest przemywane toluenem, dichlorometanem i acetonem. Niemniej jednak nawet potem należy wykonać ślepe próby, która nie może wykazać wyższej wartości masy analitu niż granica oznaczalności dla badanej próbki, czyli praktycznie nie wykazać obecności analitu. Z mojego doświadczenia wynika, że szkło analityczne po oznaczaniu próbek o zawartości dioksyn powyżej 10 µg-TEQ/kg wykazuje nawet po tak radykalnym oczyszczeniu tło analitu znacznie przekraczające granicę oznaczalności. Takiego szkła nie można użyć do żadnych analiz śladowych. To samo dotyczy aparatury analitycznej, szczególnie strzykawek chromatograficznych, dozowników w chromatografach gazowych a nawet w przypadkach dużych stężeń analitu kapilarnych kolumn chromatograficznych. Stąd dobra praktyka laboratoryjna w analizie śladowej zaleca zastosowanie prekolumn, które jako znacznie tańsze można częściej wymieniać, a już szczególnie wtedy gdy istnieje potrzeba oznaczania próbki o ultrasładowej zawartości analitu po próbce o dużej zawartości analitu. Stąd przy zastosowaniu automatycznych podajników próbek (tzw. autosamplerów) należy zweryfikować zawartość analitu w próbkach, które poprzedzały inne o dużej jego zawartości. W praktyce takie analizy należy powtórzyć przeprowadzając uprzednio oznaczenie ślepej próby.

Krótko o dioksynach i PCB

Dioksyny są wspólną, powszechnie używaną nazwą polichlorowanych dibenzo-para-dioksyn i polichlorowanych dibenzofuranów. W literaturze stosowane są akronimy PCDD i PCDF od angielskich nazw: *PolyChlorinated DibenzoParaDioxins* i *PolyChlorinated DibenzoFurans*. Budowę tych związków przedstawiono na rysunku 1.1. Ponieważ atomy chloru mogą zajmować dowolne pozycje w cząsteczkach istnieje 75 kongenerów PCDDs i aż 135 kongenerów PCDFs. W przyrodzie występują również polibromowane dibenzodioksyny i dibenzofurany. W sumie wszystkich możliwych kombinacji polihalogenodibenzodioksyn i dibenzofuranów jest ponad trzy tysiące. W przyrodzie występują głównie chlorowane dibenzodioksyny i dibenzofurany.

Ze względu na duże podobieństwo w toksycznym działaniu na organizmy żywe do dioksyn zaliczono również niektóre kongenery polichlorowanych bifenyli (PCBs).

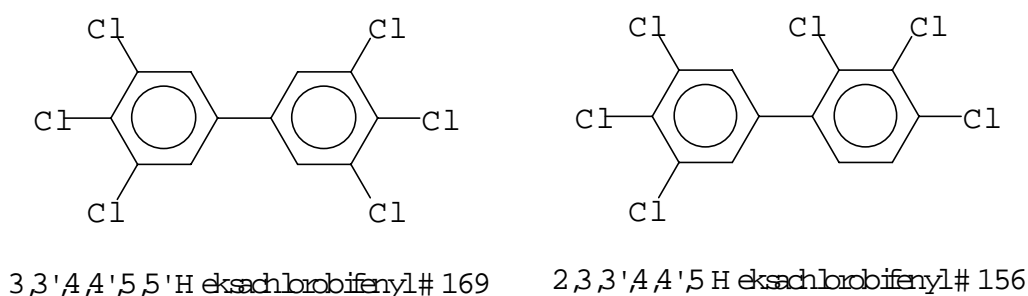
Na rysunku 1 przedstawiono budowę cząsteczki dibenzodioksyny i dibenzofuranu oraz bifenyli.



Rys. 1: Budowa cząsteczek dibenzodioxyny, dibenzofuranu i bifenylu.
Zaznaczono pozycje zajmowane przez atomy wodoru, które mogą być zastąpione atomami chloru

Wśród PCDDs i PCDFs tylko niektóre wykazują bardzo silne właściwości toksyczne w odniesieniu do ludzi i zwierząt. Kongenery, w których atomy chloru w cząsteczce PCDD lub PCDF zajmują położenie 2,3,7 i 8 (jest ich w sumie 17) są bardzo toksyczne. Kongener 2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxyna (w skrócie 2,3,7,8-TCDD) jest najbardziej toksycznym związkiem w tej grupie. Wśród 210 kongenerów PCDDs i PCDFs najbardziej poznanym jest 2,3,7,8-TCDD.

Pod nazwą dioksyny rozumie się również trzy kongenery non-orto-PCBs: 3,3',4,4'-PCB#77, 3,3',4,4',5-PCB#126 oraz 3,3',4,4',5,5'-PCB#169, posiadające atomy chloru w cząsteczce bifenylu w pozycjach meta i para (3,4,5 oraz 3',4',5') - tzw. położenie non-orto, charakteryzujące się brakiem atomu chloru w bezpośrednim sąsiedztwie wiązania międzypierścieniowego. Kongenery non-orto i mono-orto polichlorowanych bifenyli mają budowę płaską (koplanarną).



Rys. 2: Budowa non-orto-PCB#169 i mono-orto-PCB#156

W 1998 roku międzynarodowa organizacja WHO zaliczyła dwanaście spośród non-orto-PCBs i mono-orto-PCBs do tzw. dioksynopodobnych PCBs, które powinny być analizowane wspólnie z dioksynami w celu określenia poziomu toksyczności (tzw. poziom TEQ) badanej próbki.

W latach 70 zainteresowanie dioksynami było skupione głównie na poszukiwaniu źródeł ich emisji do środowiska. Rozpoczęto intensywne badania nad oddziaływaniem tych związków na organizmy żywe i poszukiwano źródeł emisji. Wśród podstawowych źródeł dioksyn zidentyfikowano i opisano trzy: przemysł chemiczny, wszelkie procesy spalania oraz substancje odpadowe nieprzetworzone i przetworzone.

Do pierwszej kategorii zaliczono wytwarzanie i przetwórstwo związków chemicznych zawierających chlor, przemysł papierniczy, pozostałości z procesów suchej destylacji itp. Wśród procesów spalania wymieniano spalarnie odpadów komunalnych, przemysłowych i szpitalnych, szlamów ściekowych, wzbogacanie rud metali, termiczną obróbkę surowców wtórnych w recyklingu a także spalanie paliw w instalacjach energetycznych i w silnikach samochodowych. Do odpadów przetworzonych, obciążonych dioksynami zaliczono osady ściekowe, komposty i zanieczyszczoną ziemię z terenów pobliskich wysypiskom i zakładom chemicznym. Wody powierzchniowe, gruntowe i wody głębinowe zawierają dioksyny wskutek przedostawania się do nich pyłów powstałych w procesach spalania odpadów w przestarzałych technologicznie instalacjach oraz wskutek chemizacji rolnictwa, wycieku substancji chemicznych zawierających dioksyny z wysypisk odpadów przemysłowych (szczególnie odpady z przemysłu chloroorganicznego). Poważnym źródłem dioksyn w wodach rzecznych są lub były zakłady celulozowo-papiernicze, w których do produkcji papieru stosowano chlorofenole. Wykazano znaczną w porównaniu z tłem zawartość polichlorowanych dibenzofuranów w osadach dennych rzek, do których odprowadzano ścieki przemysłowe z produkcji celulozy i papieru. W krajach Wspólnoty Europejskiej wycofano chlorofenole z produkcji i wszelkiego stosowania. Podczas wytwarzania chlorofenoli dioksyny powstają jako zanieczyszczenie, jako niepożądany produkt uboczny.

W latach 70 - 80 w wyniku prowadzonych badań naukowych zaobserwowano wyraźne obniżenie się poziomu dioksyn w analizowanych próbkach gleby i osadów. Aktualnie więc stan środowiska w krajach o wysokiej kulturze ekologicznej, pod względem zawartości masowej dioksyn przestaje być niepokojący, gdyż rozpoznano główne źródła dioksyn i zmniejszono ich emisję po gruntownym i kosztownym zmodernizowaniu spalarni odpadów, wycofaniu wszelkich preparatów chloro organicznych z rolnictwa i gospodarki budowlanej (poza PCW), zaprzestania bielenia papieru chlorem, wycofania paliw etylizowanych i "uszczelnienia" technologii wzbogacania rud i przetwórstwa metali kolorowych (szczególnie miedzi!). Stąd też wyraźnie obserwuje się obniżanie poziomu dioksyn w środowisku zarówno w glebie, roślinach, wodach powierzchniowych, mułach ale też w tkance człowieka i zwierząt. Szeroko przeprowadzone w latach 90 badania (głównie w Niemczech, Japonii i USA) wskazują na obniżanie się poziomu dioksyn u ludzi w tkance tłuszczowej, jak i w wątrobie i płazmie.

PCDDs i PCDFs występują w śladowej ilości powszechnie w przyrodzie na poziomie 0,1 - 1 ng-TEQ w 1 kilogramie gleby i 0,1 pg-TEQ w litrze wody. W terenach zurbanizowanych lub przemysłowych poziom ten jest o rząd lub nawet dwa rzędy wyższy. W żywności i paszach dioksyny zawarte są wyłącznie w tłuszczu. W tłuszczu zwierzęcym (wołowy, koński) dioksyny występują na poziomie 1 – 5 ng-TEQ/kg lub więcej, podczas gdy w tłuszczu wieprzowym i drobiowym poziom ten nie przekracza 1 ng-TEQ/kg. W tłuszczu rybnym zawartość dioksyn jest zależna od miejsca połowu. W Bałtyku i innych akwenach o małej wymianie wody morskiej tłuszcz rybny zawiera dioksyny na poziomie 1 – 40 ng-TEQ/kg. W rybach atlantyckich wartość ta wynosi 0,05 – 2 ng-TEQ/kg.

Tabela 1: Średni poziom zawartości PCDDs/Fs w glebie z terenów zurbanizowanych (przykład badania gleby w Krakowie z terenu przemysłowego).

PCDD	suma kongenerów w 1 ng/kg gleby	PCDF	suma kongenerów w 1 ng/kg gleby
T ₄ CDD	70	T ₄ CDF	230
P ₅ CDD	80	P ₅ CDF	190
H ₆ CDD	150	H ₆ CDF	160
H ₇ CDD	820	H ₇ CDF	150
OCDD	10 000	OCDF	200
2,2 – 16,4 ng-TEQ/kg			

Tabela 2: Średni poziom zawartości PCDDs/Fs w glebie z terenów zurbanizowanych (przykład badania gleby z Tatrzańskiego Parku Narodowego).

PCDD	suma kongenerów w 1 ng/kg gleby	PCDF	suma kongenerów w 1 ng/kg gleby
T ₄ CDD	1	T ₄ CDF	2
P ₅ CDD	3	P ₅ CDF	5
H ₆ CDD	7	H ₆ CDF	11
H ₇ CDD	9	H ₇ CDF	8
OCDD	140	OCDF	40
0,1 – 0,4 ng-TEQ/kg			

TEQ jest wartością określającą poziom toksyczności analizowanej próbki w odniesieniu do sumy masy 17 najbardziej toksycznych kongenerów PCDD/F posiadających w cząsteczce atomy chloru położone w pozycjach 2,3,7 i 8 oraz dla niektórych, koplanarnych bifenyli (PCB#77, PCB#126, PCB#169).

W celu określenia potencjalnej toksyczności badanych próbek pod względem zawartości dioksyn w rutynowo prowadzonych analizach chemicznych standardem wymagane jest oznaczenie siedemnastu najbardziej toksycznych kongenerów PCDDs/PCDFs. Spośród 210 kongenerów PCDDs i PCDFs oznacza się tylko te, które posiadają atomy chloru w pozycjach oznaczonych jako 2,3,7 i 8. To samo dotyczy 209 kongenerów polichlorowanych bifenyli, spośród których dwanaście wykazuje właściwości toksyczne podobne do dioksyn. Ze względu na podobieństwo w toksycznym działaniu na organizmy żywe oraz wysoki – w odniesieniu do dioksyn – współczynnik toksyczności, non-orto-PCBs i mono-orto-PCBs zwane są często dioksynopodobnymi. W odniesieniu do rozporządzenia WHO z 1998 r. oznaczać należy wszystkie dwanaście dioksynopodobnych kongenerów PCBs. Niekiedy jednak wymagane jest oznaczenie tylko trzech koplanarnych PCBs: PCB#77, PCB#126 i PCB169.

Określenie poziomu toksyczności próbki, wyrażonego jako TEQ (z ang. *Toxic Equivalency*) dokonuje się za pomocą tzw. współczynnika równoważnego toksyczności TEF. TEQ oblicza się ze wzoru (1.1) na podstawie wyników chemicznych analiz zawartości masowej wszystkich siedemnastu kongenerów PCDDs/PCDFs oraz jeżeli to potrzebne – dodatkowo dwunastu kongenerów PCBs. Wartość liczbowa TEQ jest sumaryczną wartością parametrów cząstkowych otrzymanych z pomnożenia wyniku analitycznego stężenia pojedynczego kongeneru PCDD, PCDF i PCB przez odpowiedni współczynnik cząstkowy TEF.

$$TEQ = \sum_{i=1}^{i=17} (m_i \times TEF_i) + \sum_{j=1}^{j=12} (m_j \times TEF_j) \quad (1.1)$$

gdzie: m_i - masa pojedynczego kongeneru,
 TEF_i - współczynnik równoważny toksyczności dla i-tego kongeneru PCDD/F, w odniesieniu do kongeneru 2,3,7,8-TCDD,
 TEF_j - współczynnik równoważny toksyczności dla j-tego kongeneru PCBs, w odniesieniu do kongeneru 2,3,7,8-TCDD.

Wartości liczbowe TEF zestawiono w tabeli 1.4. Określają one względną toksyczność każdego kongeneru PCDDs/PCDFs/PCBs w odniesieniu do najbardziej toksycznego 2,3,7,8-TCDD, dla którego – zgodnie z zaleceniami WHO z 1998 – przyjęto współczynnik równy 1. Odpowiednio dla najmniej toksycznych PCDDs/PCDFs: OCDD i OCDF przyjęto współczynniki TEF – 0,0001. Tabela zawiera również współczynniki toksyczności TEF dla dwunastu dioksynopodobnych kongenerów polichlorowanych bifenyli (PCBs).

Tabela 3: Wartości współczynnika równoważnego toksyczności TEF dla PCDDs, PCDFs i koplarnych oraz mono-orto PCBs (wg WHO 1998)

Kongener PCDDs	TEF	Kongener PCDFs	TEF
2,3,7,8-TCDD	1	2,3,7,8-TCDF	0,1
1,2,3,7,8-P ₅ CDD	1	2,3,4,7,8- P ₅ CDF	0,5
1,2,3,4,7,8-H ₆ CDD	0,1	1,2,3,7,8- P ₅ CDF	0,05
1,2,3,6,7,8- H ₆ CDD	0,1	1,2,3,4,7,8- H ₆ CDF	0,1
1,2,3,7,8,9- H ₆ CDD	0,1	1,2,3,6,7,8- H ₆ CDF	0,1
1,2,3,4,6,7,8- H ₇ CDD	0,01	1,2,3,7,8,9- H ₆ CDF	0,1
OCDD	0,0001	2,3,4,6,7,8- H ₆ CDF	0,1
		1,2,3,4,6,7,8- H ₇ CDF	0,01
		1,2,3,4,7,8,9- H ₇ CDF	0,01
		OCDF	0,0001
Koplanarne kongenery non-orto PCBs			
3,3',4,4' - T ₄ CB (PCB# 77)			0,0001
3,4,4',5- T ₄ CB (PCB# 81)			0,00001
3,3',4,4',5 - P ₅ CB (PCB#126)			0,1
3,3',4,4',5,5' - H ₆ CB (PCB#169)			0,01
Kongenery mono-orto PCBs			
2,3,4,3',4' - P ₅ CB (PCB#105)			0,0001
2,3,4,5,4' - P ₅ CB (PCB#114)			0,0005
2,4,5,3',4' - P ₅ CB (PCB#118)			0,0001
3,4,5,2',4' - P ₅ CB (PCB#123)			0,0001
2,3,4,5,3'4' - H ₆ CB (PCB#156)			0,0005
2,3,4,3'4',5' - H ₆ CB (PCB#157)			0,0005
2,4,5,3',4',5' - H ₆ CB (PCB#167)			0,00001
2,3,4,5,3'4',5' - H ₇ CB (PCB#189)			0,0001

TEQ jest wartością określającą poziom toksyczności analizowanej próbki w odniesieniu do sumy mas wymienionych kongenerów.

Ze względu na niską wartość współczynników TEF dla mono-orto PCBs oraz non-orto PCB#81 - kongenery te w większości przypadków nie są oznaczane. Stąd w obliczaniu TEQ wprowadza się przeważnie tylko stężenia trzech koplarnych PCBs : PCB#77, PCB#126 i PCB#169. Trzy koplarnie kongenery PCBs są również włączane do procedur oznaczania dioksyn w ramach organizowanych międzynarodowych porównań międzylaboratoryjnych jako standard analityczny. Oznaczanie PCBs z grupy mono-orto PCBs i diorto-PCBs nie jest standardem w oznaczaniu dioksyn.

Do roku 1999 nie ustalono jednoznacznie, czy tzw. mono-orto, WHO-PCBs oraz koplarny PCB#81 (tabela 1.4) należy włączyć do procedur oznaczania dioksyn i obliczania poziomu toksyczności TEQ.

Problemy analityczne oznaczania dioksyn

Oznaczanie stężenia dioksyn w próbkach wody, ścieków komunalnych lub przemysłowych, popiołach, glebie, roślinach, tkance i innych preparatach prowadzi się w oparciu o wysoki stopień wzbogacenia substancji oznaczanej, z jednoczesnym usunięciem dużej liczby związków organicznych utrudniających identyfikację oraz oznaczenie analitu.

Przy pobieraniu, przechowywaniu i transporcie próbek do laboratorium należy zwrócić szczególną uwagę na jej zabezpieczenie przed utratą śladowych ilości substancji badanej, gdyż PCDDs/PCDFs występują w próbkach pobranych ze środowiska na poziomie pikogramowym.

Chlorowane dibenzodioksyny i dibenzofurany należą do związków fotolabilnych. Przy przechowywaniu próbek oraz podczas czynności związanych z oczyszczaniem próbek do analiz instrumentalnych należy je zabezpieczyć przed dostępem światła. Najlepiej poprzez owinięcie naczyń szklanych folia aluminiową.

Najbardziej pracochłonną i w związku z tym najkosztowniejszą czynnością analityczną jest przygotowanie próbek do analiz instrumentalnych. Przygotowanie próbek polega na wyizolowaniu analitu z matrycy. Zwykle dokonuje się tego różnymi technikami ekstrakcji. Otrzymany ekstrakt jest jednak silnie zanieczyszczony i nie może być w takiej postaci analizowany. Oczyszczenie ekstraktu polega na rozdzieleniu i usunięciu związków przeszkadzających w oznaczaniu PCDDs/PCDFs występujących niejednokrotnie na poziomie stężeń 10^6 razy wyższym niż analit. Z próbki należy więc usunąć praktycznie setki tysięcy związków organicznych. Operacje te mogą spowodować spore straty analitu. W celu obliczenia poziomu odzysku dioksyn wprowadza się do próbki wzorce wewnętrzne, wzorce odzysku oraz tzw. wzorzec strzykawkowy, które są analogami kongenerów PCDDs i PCDFs znaczoneymi stabilnymi izotopami węgla ^{13}C . Są to substancje jednoskładnikowe lub mieszaniny o ściśle określonym składzie i stężeniu przygotowane w odpowiednich rozpuszczalnikach. Dla próbek wodnych wzorce przygotowuje się w acetonie lub metanolu a do oznaczania próbek stałych, olejów i tkanki w rozpuszczalnikach hydrofobowych. Gotowe do użycia roztwory wzorcowe ^{13}C -PCDDs i ^{13}C -PCDFs dostępne są w handlu.

Podczas czynności związanych z przygotowaniem próbek do analiz wprowadza się niekiedy dodatkowo substancje wzorcowe dioksyn znaczone izotopem chloru ^{37}Cl .

Stosowane techniki separacji PCDDs/PCDFs muszą zapewnić wysoką selektywność rozdziału. W literaturze opisano wiele różnych procedur. Opisane metody różnią się w zależności od samej natury próbki, składu matrycy oraz stężenia PCDDs i PCDFs [4-13].

Poniżej przedstawiono opracowane w Politechnice Krakowskiej procedury analityczne przygotowania próbek do analiz i oznaczania dioksyn w wodach, glebach, osadach, olejach i tkance biologicznej. Procedury te zostały wielokrotnie sprawdzone w praktyce m.in. w

międzynarodowych porównaniach międzylaboratoryjnych organizowanych przez Uniwersytet w Umeå w Szwecji oraz Uniwersytet w Kyoto w Japonii. Jakkolwiek procedury te oparte są w dużej części na metodyce szeroko opisanej w literaturze naukowej, zostały one znacznie zmodyfikowane do analiz techniką spektrometrii masowej przy zastosowaniu spektrometrów masowych typu kwadrupolowego oraz z podwójną fragmentacją cząsteczki (spektrometria MS/MS) przy zastosowaniu pułapki jonowej. Są to urządzenia znacznie tańsze od spektrometrów wysokorozdzielczych, dla których opracowano opisane w literaturze metody [4,5,13].

Zastosowania spektrometrów wysokorozdzielczych do metod analizy dioksyn w próbkach środowiskowych jest bardzo kosztowne. Koszt inwestycyjny wynosi w tym przypadku około 1 mln. dolarów USA, podczas gdy systemy GC-MS/MS mające w większości przypadków próbek wystarczający poziom wykrywalności dla dioksyn przy równie wysokiej selektywności oznaczenia jak systemy wysokorozdzielcze, kosztują ok. 100 tys. dolarów USA.

Analizę instrumentalną prowadzi się techniką kapilarnej chromatografii gazowej w sprzężeniu ze spektrometrią mas.

Przedstawione procedury są schematem czynności analitycznych i nie zawierają dokładnych danych o masie badanej próbki, którą należy przygotować do analizy. Nie podano również masy sorbentów, ani objętości rozpuszczalników stosowanych do ekstrakcji czy elucji, gdyż procedury muszą być każdorazowo dostosowane do charakteru badanej próbki. Dla przykładu podano jedynie szczegółową procedurę oznaczania PCDDs i PCDFs w próbkach popiołów po spalaniu odpadów szpitalnych.

Należy mocno podkreślić, że po zmianie sorbentu (np. tlenku glinowego, węgla aktywnego lub żelu krzemionkowego) na inną partię nawet od tego samego producenta, należy skorygować objętości odbieranych frakcji rozpuszczalników w oparciu analizę czystych substancji wzorcowych, wprowadzonych zamiast badanej próbki. Sprawdzenia takiego należy dokonywać również co kilka dni.

Przykładowa procedura przygotowania próbki żywności do oznaczania dioksyn

Oznaczanie PCDDs i PCDFs w żywności i materiale biologicznym napotyka spore trudności spowodowane:

- a) ich bardzo niską zawartością w badanych próbkach,
- b) niezwykle bogatą matrycą tych próbek, zawierającą znaczne w stosunku do dioksyn stężenie innych chlorowanych związków aromatycznych, takich jak etery difenylowe, fenoksyfenole, a w szczególności polichlorowane bifenyle. Substancje te występują w próbkach biologicznych w stężeniach niekiedy 1000-krotnie wyższych niż PCDDs i PCDFs [8,9,23,34,47,50].

Oznaczanie wymaga przede wszystkim wysokiej specyficzności metody przygotowania próbek do analizy.

Z tego też względu do oznaczeń dioksyn w materiale biologicznym i żywności nie nadają się systemy GC-MS o niskiej rozdzielczości, a więc typowe w innych zastosowaniach spektrometrii kwadrupolowe lub pułapki jonowe. Do analiz należy stosować spektrometry magnetyczne o wysokiej rozdzielczości. W przedstawionych w niniejszej pracy badaniach z zastosowaniem systemów z podwójną fragmentacją GC-MS/MS uzyskano dobre rezultaty w oznaczaniu PCDDs i PCDFs w mleku, mięsie, tkance zwierzęcej i ludzkiej. Poziom wykrywalności stosowanej metody obliczono na 0,5 pg dla 2,3,7,8-TCDD oraz dla 1,2,3,7,8-P₅CDD w odniesieniu do 1 g tłuszczu. Dla OCDD i OCDF poziom ten wynosi odpowiednio 2 do 5pg/g tłuszczu. Możliwości stosowanego systemu GC-MS/MS są więc porównywalne z

o wiele bardziej kosztownymi systemami chromatografów gazowych sprzężonych ze spektrometrami magnetycznymi o wysokiej rozdzielczości.

Próbki biologiczne o masie od 5 do 50g (w zależności od zawartości tłuszczu) ujednorodniono przez roztarcie w homogenizatorze. Do próbki wprowadzono roztwór wzorców wewnętrznych w acetonie oraz bezwodny Na_2SO_4 tak, aby uzyskać sypki preparat. Próbkę przenoszono do kolumny szklanej ze spiekem o średnicy wewnętrznej 20÷25mm. Naczynie homogenizatora wmywano trzykrotnie niewielką objętością dichlorometanu, wprowadzając roztwory każdorazowo do kolumny z próbką. Kolumnę wmywano następnie porcją 100 ml dichlorometanu. Rozpuszczalnik ten odparowano w wyparce obrotowej w kolbie o znanej masie. Kolbę z zawartością ważono i obliczano masę wyekstrahowanego tłuszczu. Zawartość tłuszczu w próbce musi być znana, gdyż wynik analizy należy obliczyć w odniesieniu do masy 1g tłuszczu zawartego w badanej próbce.

Próbkę rozpuszczano ponownie w niewielkiej objętości dichlorometanu, biorąc 5 ml rozpuszczalnika na każdy gram tłuszczu. Roztwór wprowadzano na kolumnę węglową makro zawierającą 2g węgla aktywnego. Złoże sorbentu wmywano kolejno porcjami 100 ml dichlorometanu, 20 ml toluenu o temperaturze pokojowej oraz 10 ml toluenu o temperaturze bliskiej temperatury wrzenia. Następnie kolumnę umieszczano w urządzeniu do ogrzewania pod chłodnicą zwrotną i wmywano złoże węglowe przez 1 godzinę dichlorometanem, skraplającym się w chłodnicy. Konstrukcja kolumny umożliwia spływanie kropli na powierzchnię złoża węglowego. Wmywanie prowadzono w tym samym kierunku przepływu rozpuszczalnika jak podczas wprowadzania próbki. Następnie kolumnę odwracano i wmywano skraplającym się toluenem. Wmywanie PCDDs i PCDFs prowadzono przez 24 godziny. Dla próbek o małej masie (poniżej 5g) zaleca się prowadzić wmywanie toluenem przez 48 godzin, a to ze względu na bardzo silną sorpcję $\text{H}_6\text{CDDs/Fs}$, $\text{H}_7\text{CDDs/Fs}$ i OCDD/F na węglu aktywnym. Do ekstraktu wprowadzano 100 μl nonanu i ekstrakt zatężano do ok. 100 μl . Pozostałość rozpuszczano w niewielkiej objętości heksanu i przenoszono ilościowo do kolumny zawierającej 1g zasadowego Al_2O_3 . Po wprowadzeniu roztworu próbki na kolumnę z Al_2O_3 wmywano ją heksanem, a następnie 2% (v/v) roztworem dichlorometanu w heksanie, odbierając frakcję I zawierającą mono-orto PCBs. Kolejno, kolumnę wmywano 50% (v/v) roztworem dichlorometanu w heksanie, odbierając frakcję II zawierającą dioksyny i non-orto PCBs. Zakres objętościowy zbieranej frakcji musi być każdorazowo ustalony dla nowo przygotowanej kolumny na podstawie analizy próby zerowej, zawierającej wzorce wewnętrzne $^{13}\text{C-PCDDs/Fs}$ i $^{13}\text{C-PCBs}$.

Do oczyszczonego ekstraktu PCBs (I frakcja) oraz PCDDs/PCDFs (II frakcja) wprowadzono po 20 μl tetradekanu i zagęszczano obie frakcje do objętości około 20 μl do analizy GC-MS/MS.

Wstępne oznaczanie techniką GC-MS/MS pozwalało sprawdzić, czy stężenie związków przeszkadzających obniżyło się na tyle, aby dokonać poprawnej identyfikacji i przeprowadzić analizę ilościową na zawartość PCDDs i PCDFs.

Jeżeli oczyszczenie próbki było niewystarczające, należało zastosować dodatkowe oczyszczenie na kolumnie kwaśno-alkalicznej i ponownie na kolumnie z 1g zasadowego Al_2O_3 .

Próbki jajek (analizie poddawano żółtko jajka, które zawiera ok. 30% tłuszczu) przygotowywano przez roztarcie w homogenizatorze z bezwodnym siarczanem sodowym, a następnie ekstrahowano dichlorometanem w aparacie Soxhleta przez 16 godzin. W tym przypadku na 10g żółtka należało użyć 50 – 80g bezwodnego Na_2SO_4 . Alternatywą do stosowania dużej masy Na_2SO_4 było ugotowanie jajka, oddzielenie i rozdrobnienie żółtka, wysuszenie go w suszarce w temperaturze nie wyższej niż 50°C. Pozwoliło to znacznie zmniejszyć sumaryczną masę próbki i objętość rozpuszczalnika stosowanego do ekstrakcji.

Wykazano, że gdy sumaryczne stężenie PCBs w badanych próbkach przekraczało 10 mg/kg masy próbki (np. tkanka ryb z zanieczyszczonych zbiorników wodnych) próbkę należało uprzednio oczyścić przy zastosowaniu kolumny zawierającej 5g zasadowego Al_2O_3 . Pozwoliło to na sprawne rozdzielenie PCBs od PCDDs/Fs. W przeciwnym przypadku frakcja zawierająca dioksyny była w znacznym stopniu zanieczyszczona PCBs, co utrudniało identyfikację P_5CDD/F i H_6CDD/F .

Po wprowadzeniu roztworu próbki na kolumnę z Al_2O_3 wmywano ją heksanem, a następnie 2% (v/v) roztworem dichlorometanu w heksanie, odbierając frakcję I zawierającą mono-orto PCBs. Następnie kolumnę wmywano 50% (v/v) roztworem dichlorometanu w heksanie, odbierając frakcję II zawierającą dioksyny i non-orto PCBs.

Do oczyszczonego ekstraktu PCBs (I frakcja) oraz PCDDs/PCDFs (II frakcja) wprowadzono po 20 μl tetradekanu i zagęszczano obie frakcje - do objętości około 20 μl - do analizy GC-MS/MS.

Obliczanie wyniku oznaczenia dioksyn w badanej próbce

Obliczanie stężeń PCDDs, PCDFs, koplarnych i mono-orto PCBs w badanych próbkach prowadzono w oparciu o pomiar sygnałów analitycznych (wysokości lub pól powierzchni integrowanych pików), których czas retencji odpowiadał substancjom wzorcowym, w tym również ^{13}C -PCDDs/Fs/PCBs. Wybór pomiaru pola powierzchni pików lub jego wysokości był zależny od jakości uzyskanego sygnału analitycznego. W oznaczaniu dioksyn i PCBs techniką GC-HRMS lub GC-MS/MS zaleca się wykonywanie obliczeń z wykorzystaniem pomiaru wysokości pików. W przeprowadzonych międzynarodowych porównaniach międzylaboratoryjnych w latach 1997-1999 [53] wykazano, że pomiar pól powierzchni integrowanych pików obarczony jest większym błędem przypadkowym niż pomiar ich wysokości. W niniejszej pracy obliczenie stężenia dioksyn i PCBs autor prowadził w oparciu o pomiar wysokości pików substancji oznaczanej.

Masy oznaczanego kongeneru m_i w próbce badanej określano na podstawie następującego algorytmu:

Objętość końcową ekstraktu próbki badanej, nastrzykiwanego na kolumnę chromatograficzną obliczano w oparciu o wprowadzony wzorec strzykawkowy, którym był roztwór ^{37}Cl -2,3,7,8-TCDD. Ściśle odmierzoną objętość tego roztworu wprowadzano do oczyszczonego ekstraktu próbki przed jego odparowaniem do 20 μl . Dokładną objętość ekstraktu końcowego V_{EK} obliczano ze wzoru (2.2):

$$V_{EK} = \frac{H_{37-WZ} \times V_{EK}^{IN} \times V_{37-WZ}}{H_{37-EK} \times V_{37-WZ}^{IN}} \quad (2.2.)$$

gdzie:

V_{EK} - objętość końcowa ekstraktu próbki badanej (μl),

V_{EK}^{IN} - objętość nastrzyku na kolumnę końcowego ekstraktu próbki badanej (μl),

V_{37-WZ}^{IN} - objętość nastrzyku na kolumnę roztworu wzorca strzykawkowego, ^{37}Cl -2,3,7,8-TCDD (μl),

V_{37-WZ} - objętość roztworu wzorca strzykawkowego ^{37}Cl -2,3,7,8-TCDD wprowadzonego do ekstraktu próbki badanej przed odparowaniem do objętości końcowej (μl),

H_{37-WZ} - wysokość pików ^{37}Cl -2,3,7,8-TCDD w roztworze wzorca strzykawkowego,

H_{37-EK} - wysokość pików ^{37}Cl -2,3,7,8-TCDD w końcowym ekstrakcie próbki badanej.

Poziom odzysku analitu obliczano w odniesieniu do sygnałów otrzymanych od wzorca wewnętrznego. Obliczenia prowadzono w oparciu o pomiar wysokości pików substancji znaczących izotopami ^{13}C , wprowadzonych do próbek przed rozpoczęciem procedur

analitycznych w odniesieniu do wartości otrzymanych dla substancji wzorcowych ^{13}C -PCDDs, ^{13}C -PCDFs i ^{13}C -PCBs. Substancje te stosowano również do kalibrowania urządzeń chromatograficznych oraz oceny sprawności kolumn, a także sprawdzenia liniowości odpowiedzi detektora. Obliczenie poziomu odzysku R_{Vi} prowadzono w oparciu o wzór (2.3).

$$R_{Vi} = \frac{H_{13-i} \times C_{13-WZi} \times V_{EK} \times V_{13-WZ}^{IN}}{H_{13-WZi} \times m_i^{13} \times V_{EK}^{IN}} \times 100\% \quad (2.3)$$

gdzie:

- R_{Vi} - poziom odzysku analitu (%),
- H_{13-i} - wysokość pików poszczególnych kongenerów wzorca wewnętrznego ^{13}C -PCDD/PCDF/PCB w próbce,
- H_{13-WZi} - wysokość pików poszczególnych kongenerów wzorca wewnętrznego ^{13}C -PCDD/PCDF/PCB w roztworze wzorcowym mieszaniny kalibracyjnej,
- C_{13-WZi} - stężenie poszczególnych kongenerów wzorca wewnętrznego ^{13}C -PCDD/PCDF/PCB, w roztworze wzorcowym mieszaniny kalibracyjnej (pg/ μl),
- V_{EK} - objętość końcowa ekstraktu próbki badanej (μl) obliczona wg wzoru (2.2),
- V_{EK}^{IN} - objętość nastrzyku na kolumnę końcowego ekstraktu próbki badanej (μl),
- V_{13-WZ}^{IN} - objętość nastrzyku na kolumnę roztworu mieszaniny kalibracyjnej wzorca wewnętrznego ^{13}C -PCDD/PCDF/PCB (μl),
- m_i^{13} - masa poszczególnych kongenerów wzorca wewnętrznego ^{13}C -PCDD/PCDF/PCB wprowadzonego do badanej próbki (pg).

Masy m_i poszczególnych kongenerów obliczano ze wzoru (2.4), korzystając z pomiaru wysokości pików.

$$m_i = \frac{H_{ANi} \times C_{AN-WZi} \times V_{EK} \times V_{AN-WZ}^{IN}}{H_{AN-WZi} \times m_{PR} \times R_{Vi} \times V_{EK}^{IN}} \times 100\% \quad (2.4)$$

gdzie:

- m_i - masa i-tego kongeneru w pg/g (lub odpowiednio w ng/kg) próbki,
- m_{PR} - masa próbki (g),
- H_{ANi} - wysokość pików oznaczanego kongeneru w końcowym ekstrakcie próbki,
- H_{AN-WZi} - wysokość pików odpowiedniego kongeneru w mieszaninie wzorcowej naturalnych PCDD/PCDF/PCB,
- C_{AN-WZi} - stężenie oznaczanego kongeneru w mieszaninie wzorcowej naturalnych PCDD/PCDF/PCB (pg/ μl),
- V_{EK} - objętość końcowa ekstraktu próbki badanej (μl), obliczona wg wzoru (2.2),
- V_{EK}^{IN} - objętość nastrzyku na kolumnę końcowego ekstraktu próbki badanej (μl),
- V_{AN-WZ}^{IN} - objętość nastrzyku na kolumnę roztworu mieszaniny wzorca naturalnych PCDD/PCDF/PCB (μl),
- R_{Vi} - poziom odzysku i-tego kongeneru (%), obliczony wg wzoru (2.3).

W ten sposób obliczano masę każdego spośród 17 kongenerów PCDDs/PCDFs i 12 kongenerów PCBs w badanej próbce.

Poziom wykrywalności metody LOD_i obliczano dla przypadku, gdy stosunek sygnału do szumu $S/N = 3$. W przypadku, gdy w badanej próbce wystąpił sygnał poniżej tej wartości lub nie stwierdzano obecności pików oznaczanego kongeneru, poziom wykrywalności obliczano w oparciu o wzór (2.5).

$$L_{ODi} = \frac{H_N \times C_{AN-WZi} \times V_{EK}}{H_{AN-WZi} \times m_{PR} \times R_{Vi}} \times 300 \quad (2.5)$$

Gdzie:

L_{ODi} - poziom wykrywalności i-tego kongeneru PCDD, PCDF lub PCB (pg/g),

H_N - średnia wartość sygnałowa szumu, mierzona jako stosunek pik - dolina międzyszczytowa w obszarze czasu retencji analitu,

C_{AN-WZi} - stężenie i-tego kongeneru w roztworze wzorcowym mieszaniny kalibracyjnej (pg/μl),

V_{EK} - objętość końcowa ekstraktu próbki badanej (μl),

H_{AN-WZi} - wysokość pików analitu w roztworze wzorcowym mieszaniny kalibracyjnej,

m_{PR} - masa próbki (g),

R_{Vi} - poziom odzysku analitu (%), obliczony wg wzoru (2.3).

Dla próbek stałych wynik analizy odnosi się do 1 g lub 1 kg suchej masy próbki. Dla próbek ciekłych wynik analiz odnoszono do 1 kg lub 1L próbki badanej.

Tabela 4: Wyniki analiz próbek żywności na zawartość dioksyn przeprowadzonych przez autora w latach 1999-2002

Produkt	Oznaczone stężenie w ng-TEQ/kg tłuszczu
Mleko	0,1 – 4,0
Mleko w proszku	0,3 – 5,0
Masło	0,1 – 6,5
Ser żółty	0,2 – 7,7
Jogurty niskotłuszczowe	Poniżej 0,01
Jogurty powyżej 2% tł.	0,1 – 2,2
Wieprzowina	0,05 – 3,2
Wieprzowina grillowana na otwartym ogniu (węgiel drzewny)	20 - 25
Drób	0,1 – 4,2
Wołowina	1,4 – 11,5
Ryby słodkowodne polskie	1,2 – 9,4
Ryby morskie (bałtyckie) – w tłuszczu	2,0 – 50,0
Olej rybny (z ryb bałtyckich)	10 - 80
Olej rybny (import ze Skandynawii)	12,6 - 50
Jaja (żółtko)	0,1 – 7,4
Olej roślinny świeży	0,005 – 0,12
Olej roślinny zużyty (po smażeniu frytek)	0,15 – 1,1
Mączka rybna (import ze Skandynawii)	6,5 - 20
Mączka kostna polska	0,25 – 4,25
Wyroby czekoladowe	0,05 – 0,75
Mięso kurczaków belgijskich karmionych zanieczyszczoną paszą (luty-marzec 1999)	700