

AGNIESZKA HERNIK, KATARZYNA CZAJA, KATARZYNA GÓRALCZYK, PAWEŁ STRUCIŃSKI,
JAN K. LUDWICKI

OCENA PRZYDATNOŚCI TECHNIK SIS I MS/MS DO OZNACZANIA
PERSYSTENTNYCH ZWIĄZKÓW CHLOROORGANICZNYCH
I POLICHLOROWANYCH BIFENYLI W MATERIALE BIOLOGICZNYM
POCHODZĄCYM OD CZŁOWIEKA*

EVALUATION OF THE USEFULNESS OF SIS AND MS/MS MODE FOR
THE DETERMINATION OF PERSISTENT ORGANOCHLORINE COMPOUNDS
AND POLYCHLORINATED BIPHENYLS IN HUMAN SPECIMENS

Zakład Toksykologii Środowiskowej
Państwowy Zakład Higieny
00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24
Kierownik: prof. dr hab. J.K. Ludwicki

Sprawdzono przydatność technik SIS i MS/MS do oznaczania persystentnych związków chloroorganicznych i polichlorowanych bifenyli w próbkach obwodowej tkanki tłuszczowej, tkanki tłuszczowej pochodzącej z gruczołu piersiowego i mleka kobiecego. Opracowano warunki pracy spektrometru masowego dla wyżej wymienionych technik, do analizy następujących związków: HCH, HCB, DDT, DDD, chlordanu i PCB. Stwierdzono, że zastosowane techniki pozwalają na znaczne podwyższenie stosunku sygnału do szumu, co w efekcie umożliwia oznaczanie znacznie niższych stężeń tych związków.

Słowa kluczowe: Single Ion Storage (SIS), Tandemowa Spektrometria Mas (MS/MS), pestycydy chloroorganiczne, polichlorowane bifenyly (PCB), materiał biologiczny pochodzący od człowieka

Key words: Single Ion Storage (SIS), Tandem Mass Spectrometry (MS/MS), organochlorine pesticides (OCs), polychlorinated biphenyls (PCBs), human specimens

WSTĘP

Persystentne związki chloroorganiczne, w tym polichlorowane bifenyly (PCB), ze względu na dobrą rozpuszczalność w tłuszczach kumulują się w tkance tłuszczowej człowieka [3, 4, 9, 11, 19]. Związki te występują często w stężeniach niewiele wyższych od granicy wykrywalności metody analitycznej [4]. Analiza materiału biologicznego pochodzącego od czło-

* Praca wykonana w ramach grantu Komitetu Badań Naukowych nr 3 PO5D 091 22.

wieka nastęcza wiele trudności ze względu na zanieczyszczenia zawarte w ekstraktach z badanych próbek, które uniemożliwiają identyfikację badanego związku spośród pozostałych substancji. Techniki stosowane przy oczyszczaniu ekstraktów nie dają możliwości ich całkowitego wyeliminowania.

Związki chloroorganiczne najczęściej ilościowo oznaczane są techniką chromatografii gazowej z detektorem wychwyty elektronów (GC/ECD) [2, 21]. Do potwierdzania wyników analiz często stosowana jest spektrometria masowa [12, 16], ponieważ praca w systemie GC/ECD umożliwia jedynie identyfikację na podstawie porównywania czasów retencji [2, 8]. Ze względu na dużo mniejszą czułość spektrometru masowego pracującego w normalnym trybie EI (*Electron Impact*) w stosunku do detektora wychwyty elektronów [2, 8, 18], nie wszystkie związki dają wystarczająco mocny sygnał aby widoczne były w stężeniach występujących w materiale pochodzącym od człowieka. Zastosowanie technik zatrzymywania wybranych jonów (*SIS – Single Ion Storage*) i tandemowej spektrometrii mas (*MS/MS*) umożliwia potwierdzanie wyników z analizy GC/ECD ponieważ czułość układu jest wówczas znacznie większa [1, 8]. Techniki te pozwalają na redukcję sygnałów pochodzących zarówno z matrycy jak i tła aparatu. Możliwe jest to dzięki eliminacji interferujących jonów z pułapki przed dokonaniem pomiaru [5, 6, 13, 20]. Zastosowanie zarówno SIS jak i MS/MS umożliwia oznaczanie związków charakteryzujących się podobnymi czy wręcz identycznymi czasami retencji [14, 15].

Celem pracy było sprawdzenie przydatności technik SIS i tandemowej spektrometrii mas do oznaczania pozostałości pestycydów chloroorganicznych (OC) i polichlorowanych bifenyli (PCB) w próbkach biologicznych.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiły próbki obwodowej tkanki tłuszczowej, tkanki tłuszczowej pochodzącej z gruczołu piersiowego kobiet i mleka kobiecego. Do czasu analizy próbki przechowywano w temperaturze -18°C . Po rozmrożeniu wykonywano ekstrakcję n-heksanem, a otrzymany ekstrakt oczyszczano przy użyciu stężonego kwasu siarkowego. Oczyszczone ekstrakty analizowano ilościowo techniką GC/ECD i jakościowo GC/MS pod kątem następujących insektycydów chloroorganicznych: izomery DDT i ich metabolity, izomery heksachlorocykloheksanu (HCH), izomery chlordanu i heksachlorobenzen (HCB) oraz polichlorowanych bifenyli. Próbki mleka przed ekstrakcją poddano deproteinizacji acetonem [10].

W celu przeprowadzenia analizy polichlorowanych bifenyli zatężone ekstrakty heksanowe poddano działaniu odczynnika odchlorowodorowującego, a następnie utleniającego [10]. Przygotowany ekstrakt analizowano techniką GC/ECD a wyniki potwierdzano techniką GC/MS.

Opisane powyżej metody ilościowego oznaczania związków chloroorganicznych z wykorzystaniem GC/ECD zostały opracowane, zwalidowane i wdrożone w laboratorium Zakładu Toksykologii Środowiskowej Państwowego Zakładu Higieny [10].

Warunki chromatograficzne

W trybie EI jony powstają w wyniku krótkotrwałego bombardowania strumieniem elektronów i chwyte są w pułapkę za pomocą napięcia o określonej częstotliwości radiowej RF. Przemiatanie napięciem powoduje ich uwalnianie z pułapki w kolejności zwiększających się mas.

W pułapce jonowej można zachować jony tylko o wybranej masie ustawiając właściwe wartości napięcia stałego i napięcia przemiennego o określonej częstotliwości radiowej, w takim przypadku mówimy o trybie SIS.

GC/ECD	
Hewlett Packard 5890 seria II	
Kolumna	DB 1701, 60 m × 0,25 mm ID × 0,25 μm grubość filmu
Przepływ	0,6 ml min ⁻¹
Temperatura pieca	dla OC: 100 °C (1 min), 10 °C min ⁻¹ – 200 °C (7 min), 2 °C min ⁻¹ – 250 °C (15,5 min), 20 °C min ⁻¹ – 260 °C (13 min) dla PCB: 100 °C, 10 °C min ⁻¹ – 200 °C (5 min), 2 °C min ⁻¹ – 260 °C (30 min)
Temperatura dozownika	240 °C
Objętość nasyty	1 μl
Temperatura detektora	330 °C
Gaz nośny	azot
GC/MS	
Varian, Saturn 4D (pułapka jonowa)	
Kolumna	DB 5ms, 30 m × 0,25 mm ID × 0,25 μm grubość filmu
Przepływ	1,25 ml min ⁻¹
Temperatura pieca	60 °C (1 min), 10 °C min ⁻¹ – 260 °C (14 min)
Temperatura dozownika	260 °C
Objętość nasyty	2 μl
Temperatura detektora	170 °C
Gaz nośny	hel

Do analizy z zastosowaniem SIS wybrano związki nie widoczne w trybie EI (*Electron Impact*). Były to m.in.: HCH, HCB, p,p'-DDD, p,p'-DDT, PCB. Dla tych związków wybrano następujące zakresy jonów:

- dla β-HCH i HCB – jony wylapywane w pułapce jonowej: 108-111, 181-185, 216-221, 280-290 [m/z], jony wyrzucane z pułapki: 207, 257 [m/z];
- dla p,p'-DDT i p,p'-DDD – jony wylapywane w pułapce jonowej: 162-168, 198-210, 232-239 [m/z], jony wyrzucane z pułapki jonowej: 207 [m/z];
- dla PCB – jony wylapywane w pułapce jonowej: 107-111, 186-294, 324-330, 355-366, 390-395 [m/z], jony wyrzucane z pułapki: 283, 318 [m/z].

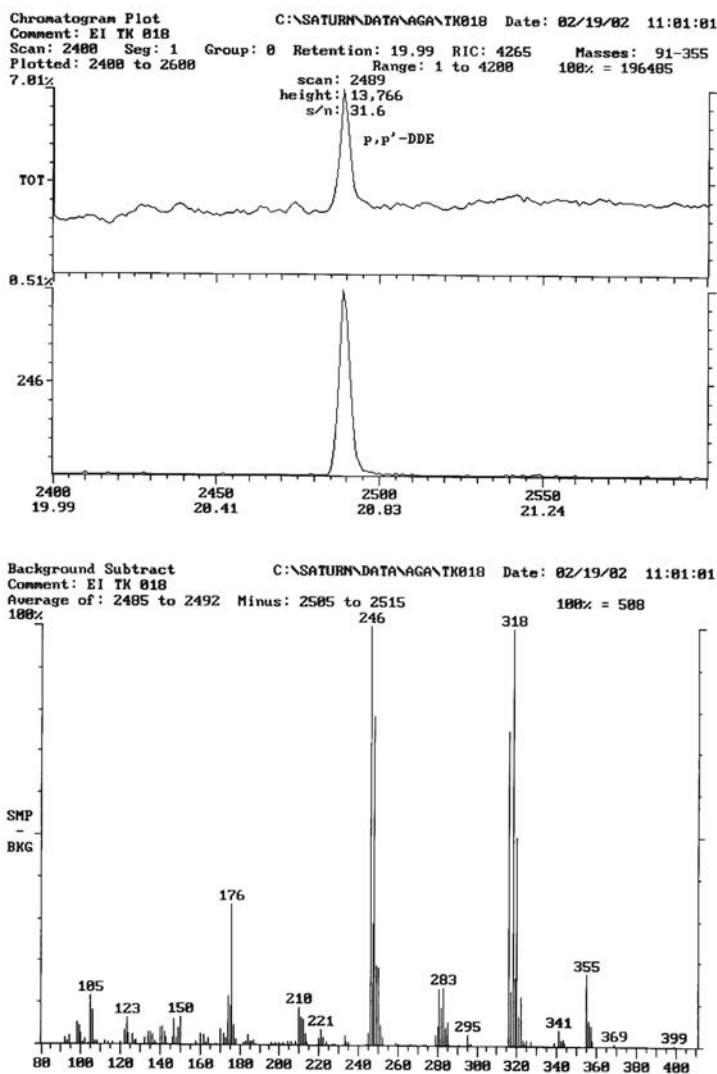
W trybie MS/MS poprzez odpowiednie ustawienia napięć w pułapce zatrzymywany jest tylko wybrany jon, pozostałe są usuwane. Zatrzymywany jon w miarę upływu czasu ulega fragmentacji wewnątrz pułapki. Powstają jony potomne, które można poddawać selektywnej ekspulsji i w ten sposób otrzymywać jony fragmentacyjne pochodzące od wybranego jonu macierzystego.

Tandemową spektrometrię mas (MS/MS) wykorzystano do sprawdzenia obecności w próbce związków nie widocznych w trybie EI i słabo identyfikowalnych czy też o zbyt niskim stosunku sygnału do szumu (S/N) w trybie SIS.

Opracowano optymalne warunki pracy w trybie MS/MS dla: HCH, HCB, DDT, DDD i chlordanu. Jako jony macierzyste wybrano odpowiednio: 181, 284, 235, 234, 373 [m/z].

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

W badanych próbkach biologicznych stwierdzono obecność wszystkich analizowanych pestycydów chloroorganicznych (z wyjątkiem izomerów chlordanu) i polichlorowanych bifenyli. *p,p'*-DDE będący najtrwalszym metabolitem *p,p'*-DDT, we wszystkich próbkach występował w stosunkowo wysokich stężeniach (rzędu mg/kg) wystarczających do potwierdzenia techniką EI (Ryc. 1).



Ryc. 1. Chromatogram i widmo masowe *p,p'*-DDE dla próbki obwodowej tkanki tłuszczowej uzyskane w trybie EI.

Fig. 1. The chromatogram and mass spectrum of *p,p'*-DDE obtained from the abdominal adipose tissue sample by EI mode.

Tabela I. Parametry metody MS/MS
MS/MS method parameters

Nazwa związku	Jon macierzysty (m/z)	Jony potomne (m/z)	CID ^a Ampl. (volt)	CID RF (m/z)	CID Typ	CID Czas msec
HCH	181	146, 109	71	80	NonResonant	20
HCB	284	249, 214	0,9	100	Resonant	30
DDD	235	199, 165	59	75	NonResonant	33
DDT	235	199, 165	59	75	NonResonant	33
Chlordan	373	337, 301, 266	0,3	48	Resonant	20

^a – CID rozpad pobudzany przez kolizję (*Collision Induced Dissociation*)

Tabela II. Porównanie stosunku sygnału do szumu (S/N) na przykładzie wybranych związków chloroorganicznych oznaczanych w próbkach tkanki tłuszczowej gruczołu piersiowego kobiet i tkanki tłuszczu obwodowego

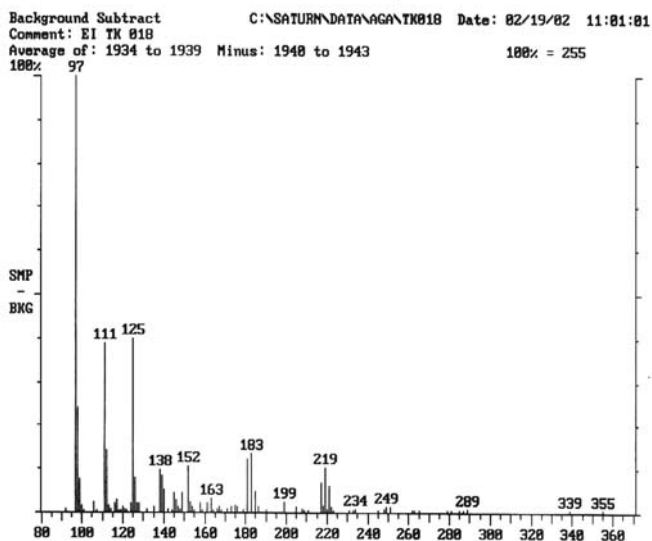
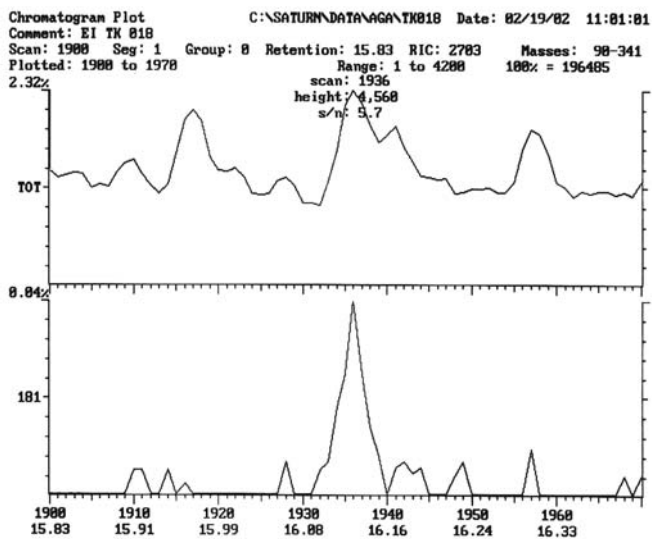
Signal to noise (S/N) comparison for selected compounds determined in samples originating from women's adipose breast tissue and men's abdominal adipose tissue

Nazwa związku	Stężenie w tkance (mg/kg) ECD	Ilość w nastrzyku (pg/μl)	Stosunek sygnału do szumu (S/N)		
			EI	SIS	MS/MS
Próbka tkanki tłuszczowej gruczołu piersiowego kobiet					
HCB	0,219	0,32	-	2,7	35
β-HCH	0,0217	0,32	5,7 ^a	9,8	60
p,p'-DDT	0,0404	0,59	- ^a	3,1	28
ΣPCBs	0,1994	3,06	-	-	-
PCB118	- ^b	-	-	2,2	- ^b
PCB138	- ^b	-	3,5	7,1	- ^b
PCB153	- ^b	-	1,4	9,6	- ^b
PCB170	- ^b	-	-	-	- ^b
PCB180	- ^b	-	-	-	- ^b
Próbka tłuszczu obwodowego					
HCB	0,0600	5,2	1,1	4	40
β-HCH	0,0447	3,9	5,7 ^a	10	83
p,p'-DDT	0,0448	3,9	0,7	4,3	40
ΣPCBs	0,8112	3,5	-	-	-
PCB118	- ^b	-	5,6	7,8	- ^b
PCB138	- ^b	-	-	9,6	- ^b
PCB153	- ^b	-	5,3	53,5	- ^b
PCB170	- ^b	-	3,8	7,9	- ^b
PCB180	- ^b	-	-	-	- ^b

^a – piki badanej substancji interferujące z zanieczyszczeniami

^b – nie oznaczane ilościowo jako pojedyncze kongenery, nie analizowane w trybie MS/MS

2 a

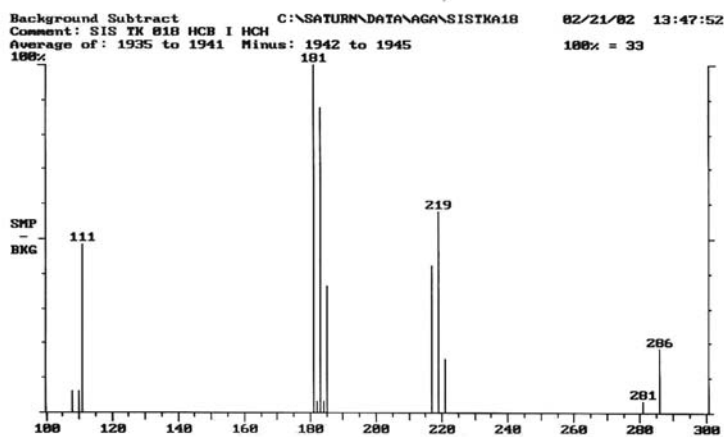
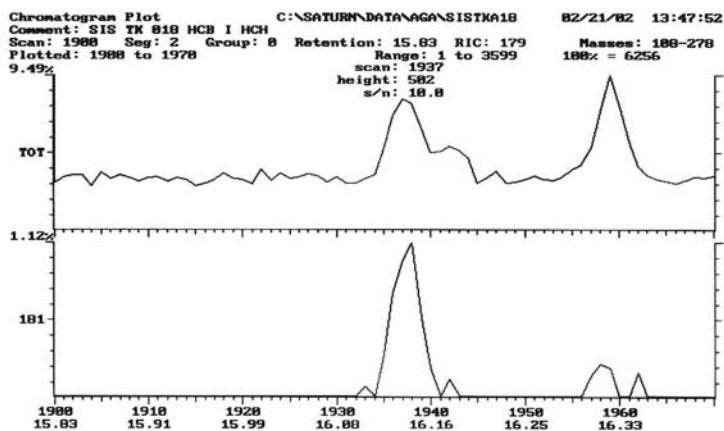


Ryc. 2. Porównanie czułości trybów EI (a), SIS (b) i MS/MS (c) β -HCH dla próbki obwodowej tkanki tłuszczowej.

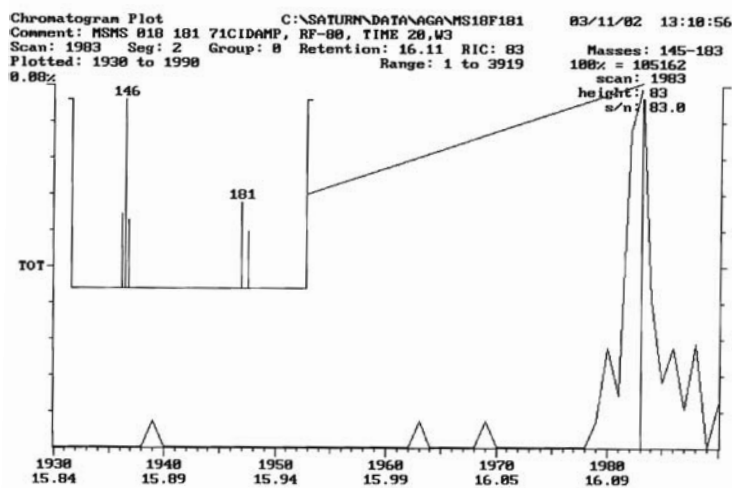
Fig. 2. Sensitivity comparison of full scan EI (a), SIS (b) and MS/MS (c) for β -HCH in the sample of abdominal adipose tissue.

Wyboru jonu macierzystego dokonuje się na podstawie widma masowego uzyskiwanego w trybie EI. Jest to stosunkowo prosta procedura z uwagi na to, że prawie zawsze istnieje tylko jedna możliwość. Wybrane jony macierzyste dla HCB (284 m/z), DDD (235 m/z), chlordanu (373 m/z) są identyczne z prezentowanymi w innych publikacjach [16, 17, 18]. W przypadku HCH kilka jonów może być wykorzystanych jako macierzyste, dla celów tej

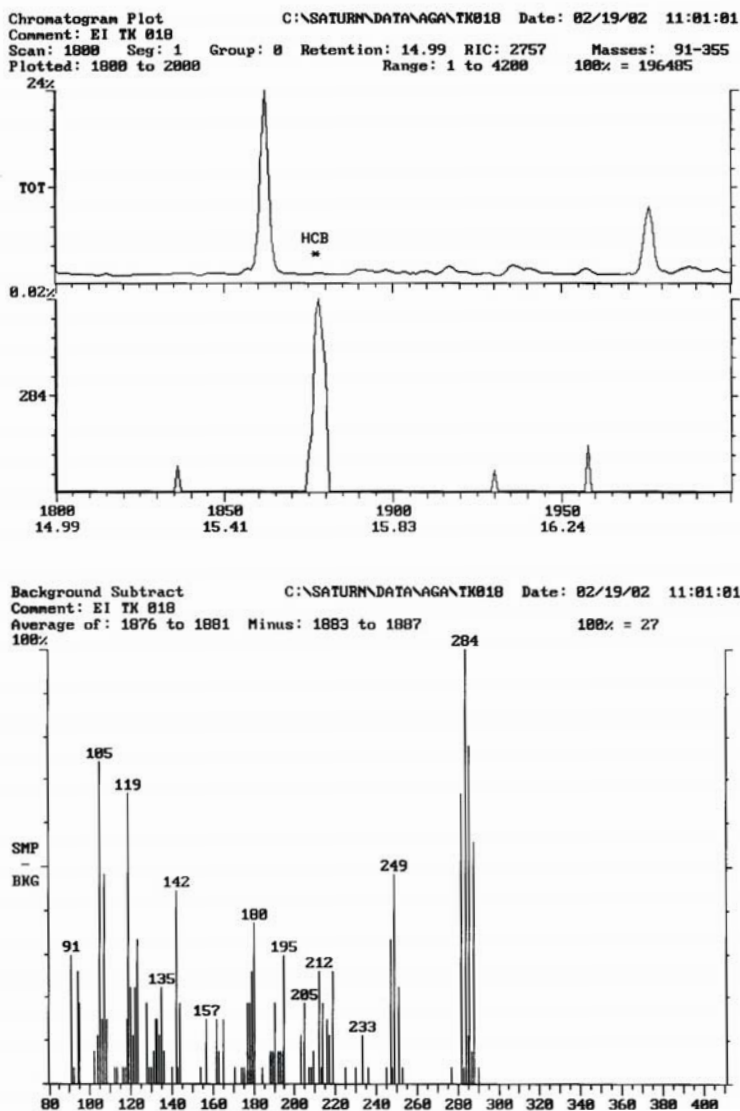
2 b



2 c



3a



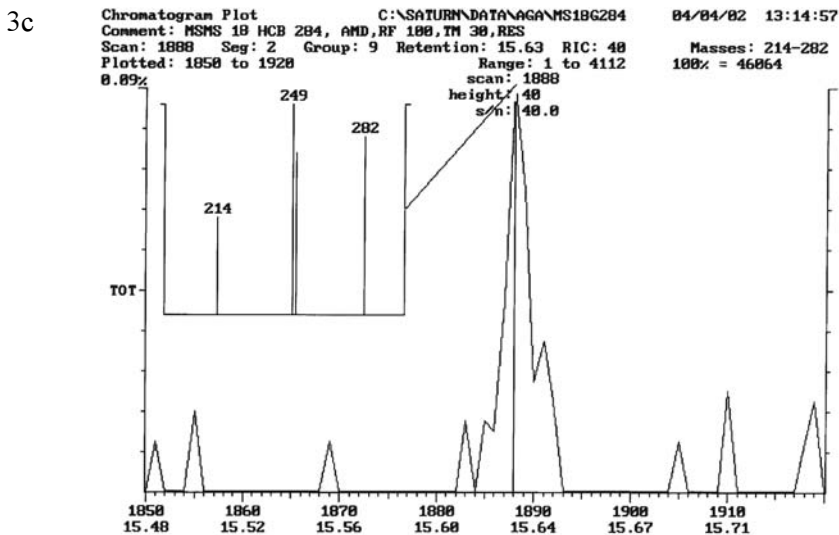
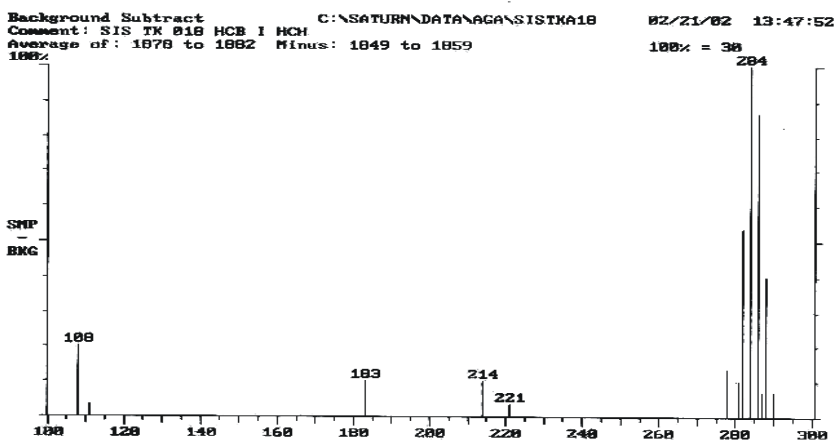
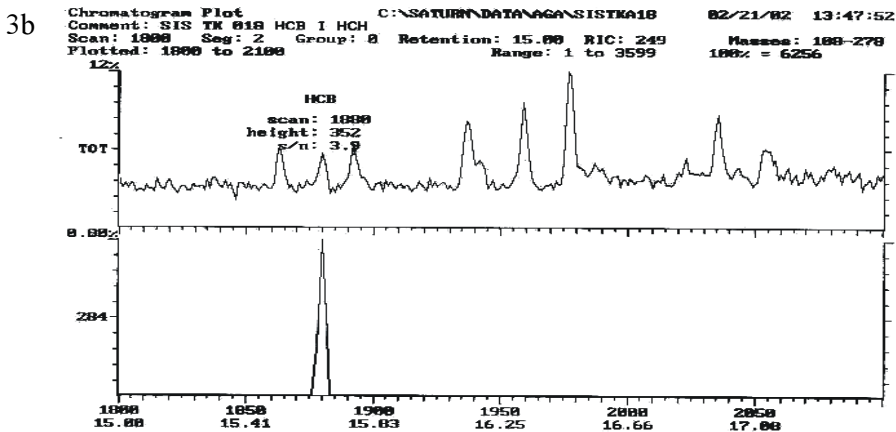
Ryc. 3. Porównanie czułości trybów EI (a), SIS (b) i MS/MS (c) HCB dla próbki obwodowej tkanki tłuszczowej.

Fig. 3. Sensitivity comparison of full scan EI (a), SIS (b) and MS/MS (c) for HCB in the sample of abdominal adipose tissue.

pracy wybrany został jon 181 m/z (Tab. I) choć wielu autorów wykorzystuje również jony 219 m/z [16] i 217 m/z [17].

Ryciny 2 i 3 przedstawiają chromatogramy i widma masowe, kolejno w trybie EI (a), SIS (b) i MS/MS (c) dla β -HCH i HCB badanych w próbce tkanki tłuszczu obwodowego.

Stwierdzono, że zastosowane w badaniach techniki pozwalają na znaczne podwyższenie



stosunku sygnału do szumu (S/N), średnio do dziesięciu razy dla techniki SIS i do kilkudziesięciu razy dla techniki MS/MS w porównaniu do trybu EI (Tab. II). Umożliwiają one również eliminację z tła jonów pochodzących z układu (np.: z kolumny, septy) oraz z zanieczyszczeń obecnych w ekstraktach próbek biologicznych (Ryc. 2). Jak wynika z tabeli II pik HCB w trybie EI nie jest widoczny (Ryc. 3a), co mogłoby sugerować, że związek ten w próbce nie występuje. Wykorzystanie trybu SIS powoduje, że pik HCB jest widoczny, stosunek sygnału do szumu wynosi 3,9 (Ryc. 3b), natomiast w trybie MS/MS stosunek sygnału do szumu jest jeszcze korzystniejszy i wynosi 40 (Ryc. 3c).

Zastosowanie wyżej wymienionych technik pozwala na precyzyjne potwierdzanie tożsamości związków analizowanych z wykorzystaniem GC/ECD. Jednocześnie techniki te umożliwiają identyfikację związków obecnych w wysokich stężeniach ale o tych samych czasach retencji co zanieczyszczenia pochodzące z matrycy, nawet jeśli występują w wysokich stężeniach. Widma uzyskiwane w trybie SIS są w znacznej mierze pozbawione jonów tła, co obniża znacząco linię podstawową i poprawia jakość otrzymywanych widm. Dodatkowo istnieje możliwość porównywania ich z widmami biblioteki.

Tandemowa spektrometria mas dzięki możliwości izolacji pojedynczych jonów macierzystych i wyrzucaniu z pułapki jonowej wszystkich pozostałych umożliwia eliminację jonów pochodzących z zanieczyszczeń obecnych w ekstraktach z próbek materiału biologicznego. Zatrzymane w pułapce jony poddane dysocjacji kolizyjnej z obojętną cząsteczką gazu dają w rezultacie unikalne widmo utworzone z jonów potomnych co umożliwia precyzyjną identyfikację badanych związków [7, 8, 18].

WNIOSKI

1. Zastosowanie technik SIS i MS/MS umożliwia eliminację zanieczyszczeń pochodzących z matrycy i tła chromatografu (septy, kolumny) dzięki czemu ułatwia identyfikację związków nie widocznych w trybie EI.

2. Technika SIS pozwala na podwyższenie stosunku sygnału do szumu średnio do dziesięciu razy w stosunku do trybu EI.

3. Technika MS/MS daje możliwość podwyższenia stosunku sygnału do szumu średnio do kilkudziesięciu razy w stosunku do trybu EI.

4. Wykorzystanie techniki MS/MS pozwala na uzyskanie unikalnego widma jonów potomnych, dzięki czemu umożliwia precyzyjną identyfikację badanych związków.

A. Hernik, K. Czaja, K. Góralczyk, P. Struciński, J.K. Ludwicki

EVALUATION OF THE USEFULNESS OF SIS AND MS/MS MODE TO DETERMINATION OF PERSISTENT ORGANOCHLORINE COMPOUNDS AND POLYCHLORINATED BIPHENYLS IN HUMAN SPECIMENS

Summary

This study aimed of examining of the applicability of the SIS (*Selected Ion Storage*) and the MS/MS (*Tandem Mass Spectrometry*) methods for analyzing organochlorine pesticide (OCs) residues and PCBs in human specimens.

The samples of human abdominal adipose tissue, women's breast adipose tissue, and human milk were used as study material. The samples were analyzed using the gas chromatography method with EC and MS detectors.

MS/MS and SIS mode allow to eliminate system-based (e.g., column, septum) ions and the biological samples extract impurities' ions from the background to achieve the analytical system sensitive enough for trace analysis of organochlorine compounds in human specimens.

PIŚMIENNICTWO

1. *Arrebola F.J., Martinez Vidal J.R., Fernandez-Gutierrez A.*: Analysis of endosulfan and its metabolites in human serum using gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. Sci.* 2001, 39, 177-182.
2. *Bruner F.*: Gas Chromatographic Environmental Analysis. VCH Publishers Inc., New York, 1993.
3. *Czaja K., Hernik A., Góralczyk K., Struciński P., Ludwicki J.K.*: Application of selected ion storage and tandem mass spectrometry in analyzing persistent organochlorine compounds. *Organohalogen Compounds* 2001, 55, 147-150.
4. *Dewailly E., Ayotte P., Bruneau S., Laliberte Muir D.C.G., Norstrom R.J.*: Inuit exposure to organochlorines through the aquatic food chain in arctic Quebec. *Environ Health Perspect.* 1993, 101, 618-620.
5. *Garrido Frenich A., Martinez Vidal J.L., Moreno Frias M., Olea-Serrano F., Olea N.*: Quantitative determination of endocrine-disrupting polychlorinated biphenyls and organochlorinated pesticides in human serum using gas chromatography with electron-capture detection and tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 2000, 35, 967-975.
6. *Hoffmann E., Charette J., Stroobant V.*: Spektrometria Mas. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne. Warszawa, 1994.
7. *Hoffmann E.*: Tandem mass spectrometry: a primer. *J. Mass Spectrom.* 1996, 31, 129-137.
8. *Lehotay S.T.*: Analysis of pesticide residues in mixed fruit and vegetable extracts by direct sample introduction/gas chromatography/tandem mass spectrometry. *J. AOAC Int.* 2000, 83, 680-697.
9. *Ludwicki J.K., Czaja K., Struciński P.*: Próba oceny ryzyka zdrowotnego w warunkach środowiskowego narażenia na chlorowane węglowodory aromatyczne. *Roczn. PZH* 1996, 47, 33-39.
10. *Ludwicki J.K., Góralczyk K., Czaja K., Struciński P.*: Oznaczanie pozostałości insektycydów chloroorganicznych i polichlorowanych bifenyli w środkach spożywczych metodą chromatografii gazowej. *Wyd. Metod. PZH, Warszawa*, 1996.
11. *Ludwicki J.K., Góralczyk K.*: Concentrations of persistent organochlorine compounds in human fat tissue in Poland. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1994, 52, 400-403.
12. *Manirakiza P., Covaci A., Schepens P.*: Organochlorinated pesticide determination in human serum by solid phase disk extraction and GC-ECD. *Chromatographia* 2002, 55, 353-360.
13. *March R.E., Strife R.J., Creaser C.S.*: Practical Aspects of Ion Trap Mass Spectrometry Vol. III, Chemical, Environmental, and Biomedical Applications. CRC Pres, Inc., Boca Raton. 1995, p. 27.
14. *Martinez Vidal J.L., Moreno Frias M., Garrido Frenich A., Olea-Serrano F., Olea N.*: Trace determination of alpha- and beta-endosulfan and three metabolites in human serum by gas chromatography electron capture detection and gas chromatography tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2000, 14, 939-946.
15. *Martinez Vidal J.L., Moreno Frias M., Garrido Frenich A., Olea-Serrano F., Olea N.*: Determination of endocrine-disrupting pesticides and polychlorinated biphenyls in human serum by GC-ECD and GC-MS-MS and evaluation of contributions to the uncertainty of the results. *Anal. Bioanal. Chem.* 2002, 372, 766-775.
16. *Moreno Frias M., Garrido Frenich A., Martinez Vidal J.L., Mateu Sanchez M., Olea F., Olea N.*: Analyses of lindane, vinclozolin, aldrin, p,p'-DDE, o,p'-DDT and p,p'-DDT in human serum using gas chromatography with electron capture detection and tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 2001, 760, 1-15.

17. *Rosenblum L., Hieber T., Morgan J.*: Determination of pesticides in composite dietary samples by gas chromatography/mass spectrometry in the selected ion monitoring mode using a temperature programmable large volume injector with preseparation column. *J. AOAC Int.* 2001, 84, 891-900.
18. *Scheridan R.S., Meola J.R.*: Analysis of pesticide residues in fruits, vegetables, and milk by gas chromatography/tandem mass spectrometry. *J. AOAC Int.* 1999, 82, 982-990.
19. *Struciński P., Ludwicki J.K., Góralczyk K., Olszewski W., Czaja K., Buckley B., Jethon J., Barańska J., Hernik A.*: Storage of persistent organochlorine pesticides in adipose breast tissue of Polish women in 1997-2001. *Organohalogen Compounds* 2002, 58, 261-264.
20. *Vekey K.*: Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. *J. Chromatogr. A* 2001, 921, 227-236.
21. *Zehring M., Herrmann A.*: Analysis of polychlorinated biphenyls, pyrethroid insecticides and fragrances in human milk using a laminar cup liner in the GC injector. *Eur. Food Res. Technol.* 2001, 212, 247-251.

Otrzymano: 2005.02.12