Методы и объекты химического анализа, 2006, т. 1, № 2, С. 152–158.

Препаративное выделение хлорорганических пестицидов, полихлорированных бифенилов и диоксинов из экстрактов биоты для определения методом газовой хроматографии/масс-спектрометрии

М. М. Скринник[1], М. В. Милюкин[2]

[1]ЗАО "Трудовой коллектив Киевского предприятия по производству бактерийных препаратов "Биофарма"; ул. Н. Амосова, 9, 03038 Киев, Украина; e-mail: max_skrynnyk@yahoo.com
[2]Институт коллоидной химии и химии воды им. А. В. Думанского, Национальная Академия Наук Украины; бульв. Вернадского, 42, 03680 Киев, Украина; e-mail: m_milyukin@mail.ru

Разработана экспрессная методика препаративного выделения хлорорганических пестицидов, полихлорированных бифенилов и полихлорированных дибензо-п-диоксинов из экстрактов биоты методом микропрепаративной ВЭЖХ в обращенно-фазном варианте для дальнейшего определения методом газовой хроматографии/масс-спектрометрии.

A rapid micropreparative HPLC method for isolation of organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls and polychlorinated dibenzo-p-dioxins from biota extracts in reverse-phase mode was developed for further determination by means of gas chromatography/mass-spectrometry.

Ключевые слова: *хлорорганические пестициды, полихлорированные бифенилы, диоксины, газовая хроматография/масс-спектрометрия*
Keywords: *organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls, dioxins, gas chromatography/mass-spectrometry*

Хлорорганические пестициды (ХОП), полихлорированные бифенилы (ПХБ) и полихлорированные дибензо-*п*-диоксины (ПХДД) являются загрязняющими веществами антропогенного происхождения. Их отличительные свойства – высокая токсичность и устойчивость к разложению под действием физико-химических и биологических природных факторов – обусловливают большой интерес к определению этих соединений в объектах окружающей среды и продуктах питания. В экстракты из биоты ПХДД попадают вместе с веществами жировой ткани, которые мешают определению данных соединений методом газовой хроматографии/масс-спектрометрии (ГХ/МС). Массы сухих остатков экстрактов, полученных из навесок биоты (10 г мышечной ткани рыб) составляют около 200 мг. В них необходимо определить соединения, содержание которых не превышает 100 нг на пробу. Перед определением целевых соединений, их необходимо отделить от балластных. ПХДД – самые токсичные известные соединения из всех соединений, когда-либо синтезированных человеком. Они являются побочными продуктами окислительных процессов хлорирования органических соединений. В реальных объектах ПХДД обычно встречаются вместе с ПХБ, причем концентрации последних, как правило, на несколько порядков выше. Это делает невозможным определение ПХДД методом ГХ/МС без препаративного отделения их от ПХБ. В настоящее время методики определения устойчивых органических загрязняющих веществ трудоемкие и требуют больших затрат времени и растворителей. Самым распространенным методом подготовки проб для определения ХОП, ПХБ и ПХДД является очистка этих соединений от мешающих определению методом хроматографии низкого давления с последовательным использованием кислого, нейтрального и щелочного силикагеля, а также в некоторых случаях оксида алюминия и активированного угля [1, 2, 3]. Данный метод выделения требует затрат времени для подготовки и проверки сорбентов, упаковки хроматографических колонок, а также требует расходования большого количества органических растворителей. Существуют методы выделения ПХБ и ПХДД методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в полупрепаративном масштабе [4]. Эти методы позволяют получать высококачественное разделение целевых и балластных соединений, но являются дорогостоящими. В работе [5] описан метод выделения диоксино-

© М. М. Скринник, М. В. Милюкин

подобных веществ из человеческой плазмы методом аффинной хроматографии на сорбенте с привитыми моноклональными антителами. Другой подход к определению веществ с диоксиновой биологической активностью – иммуноферментный анализ [6]. Это относительно простой метод мониторинга, который уступает ГХ/МС по чувствительности и информативности.

Цель работы – разработка методики выделения ХОП, ПХБ и ПХДД из экстрактов биоты, при которой достигается: 1) минимальное присутствие в пробе нецелевых соединений, мешающих определению, 2) разделение фракций, содержащих ПХБ и ПХДД, 3) небольшие затраты времени на выделение целевых соединений, 4) небольшой расход органических растворителей на подготовку пробы. Критерием адекватности степени очистки данных веществ является возможность их идентификации и определения концентраций в реальных пробах методом ГХ/МС. ХОП и ПХБ выделяют в одну фракцию, так как они не мешают определению друг друга данным методом.

Методы и материалы исследований

Фракционирование экстрактов биоты выполняли в две стадии, которые включают: 1) минерализацию пробы концентрированной серной кислотой и/или олеумом, и/или раствором перманганата калия; 2) препаративное выделение целевых соединений методом обращенно-фазной ВЭЖХ.

В качестве объекта исследования выбрана биота бассейна Днепра (сентябрь–октябрь 2003 г.).

Для удаления органических соединений, мешающих определению ХОП, ПХБ и ПХДД, экстракты биоты реэкстрагировали гексаном и обрабатывали концентрированной серной кислотой и/или олеумом или 5% раствором перманганата калия.

Экстракты из биоты, полученные по классическому методу в аппарате Сокслета или с использованием ускоренной жидкофазной экстракции (УЖЭ) [7], упаривали на роторном испарителе досуха и немедленно растворяли не менее, чем в 10 $см^3$ гексана (Riedel-de-Haën N 34412). После полного растворения органических соединений в колбу добавляли около 20 $см^3$ концентрированной серной кислоты марки х.ч (массовая концентрация – не менее 50%). Колбу энергично встряхивали. После расслоения фракций кислоты и растворителя, смесь переносили в делительную воронку объемом 100 $см^3$ с тефлоновым краном. Кислоту отделяли и утилизировали, а растворитель переносили обратно в колбу. Процедуру повторяли, пока не получали прозрачный бесцветный слой серной кислоты. В тех случаях, когда расслоение органического и неорганического слоев происходит медленно, поступали по одному из приведенных ниже способов, либо использовали оба способа:

А. К гексановому слою добавляли около 1 $см^3$ олеума марки х.ч. Колбу ставили на электрический встряхиватель и оставляли там не менее, чем на 1 ч. После этого, олеум отделяли, используя делительную воронку. Процедуру повторяли, пока не получали прозрачный бесцветный слой олеума.

Б. К гексановому слою добавляли около 10 $см^3$ 5% раствора перманганата калия марки х.ч. и энергично встряхивали. Раствор $KMnO_4$ отделяли, используя делительную воронку. Процедуру повторяли, пока раствор перманганата калия не переставал менять окраску.

В делительную воронку с гексановым слоем доливали около 20 $см^3$ воды (удельное сопротивление – 18 $МОм \cdot см^{-1}$, общий органический углерод – менее 10 $мкг/дм^3$), встряхивали и отделяли воду. Процедуру повторяли не менее 3 раз. В случае, если для минерализации не использовали перманганат калия, лакмусовым индикатором проверяли pH среды, которой отмывали экстракт, и отмывку продолжали до pH 5–6. Колбу, в которой проводили минерализацию, также отмывали, смывы соединяли с экстрактом.

Холостые пробы подвергали очистке параллельно с пробами ХОП, ПХБ и ПХДД, повторяя все процедуры некоторое число раз.

Очищенные пробы упаривали досуха на роторном испарителе и герметично закрывали. Хранили при комнатной температуре в месте, защищенном от прямых солнечных лучей.

Полученные таким образом пробы растворяли в метиленхлориде и количественно переносили в микровиалы объемом 100 мкл (Agilent Technologies, N 5180-0844) при помощи микрошприца объемом 100 мкл (Agilent Technologies, N 5183-4539). При необходимости растворитель удаляли в токе азота марки ос.ч.

Для идентификации балластных соединений, мешающих определению целевых, пробы, минерализованные H_2SO_4 и/или олеумом и/или $KMnO_4$, концентрировали до 100 мкл и концентраты анализировали методом ГХ/МС в режиме SCAN в следующих условиях: газовый хроматограф – Hewlett-Packard 5890 Series II, детектор – масс-спектрометр 5972 MSD (режим сканирования масс в диапазоне 34–700 а.е.м., 1 скан/с), колонка – Supelco SE-30, длина – 30 м, внутренний диаметр – 0,25 мм, степень покрытия – 0,25 мкм; газ-носитель – He, объемная скорость потока – 1 $см^3$/мин при темпера-

турной коррекции расхода газа-носителя; температурный режим – изократический период при 60°С – 1 мин, градиент температуры 60 → 300°С, 6°С/мин, изократический период при 300°С – 20 мин.

Для выделения ПХДД из концентратов проб биоты использовали жидкостный хроматограф Waters 515 с УФ-детектором Waters^{TM} 486 при λ=250 нм и хроматографическую колонку LiChrosorb RP-18 размером 250×4,6 мм с зернением сорбента 5 мкм. Объем вводимой пробы – 150 мкл. В качестве подвижной фазы использовали метанол (Merck N 106007 или Fluka N 65548) при скорости потока 2 см^3/мин.

Для определения времени удерживания ПХБ использовали модельную смесь Aroclor 1254 (Supelco N 48707) с общей концентрацией ПХБ 20 мг/дм^3, для ХОП – смесь пестицидов (Supelco N 4-8858) с той же концентрацией, для ПХДД – раствор 2,3,7,8-тетрахлор-дибензо-*п*-диоксина (2,3,7,8-ТХДД) (Supelco N 4-8599) в концентрации 1 мг/дм^3.

Сухие остатки проб биоты растворяли в 50 мкл метиленхлорида и вводили в инжектор жидкостного хроматографа, используя при этом кран-дозатор с петлей объемом 200 мкл. После этого промывали микровиалу еще 2 раза 50 мкл метиленхлорида и каждую порцию смыва вводили в петлю. Затем поворачивали ручку крана-дозатора и начинали отсчет времени (объема элюента). Собирали фракцию растворителя с 3 по 9 (фракция, содержащая ХОП и ПХБ) и с 10 по 20 см^3 (ПХДД). Потом через колонку пропускали 3 см^3 метиленхлорида для удаления из нее неполярных балластных веществ и 5 см^3 метанола для уравновешивания хроматографической системы. Фракции отбрасывали.

Фракции, содержащие целевые соединения, собирали в колбы с коническим дном объемом 30 см^3. Пробы упаривали досуха на роторном испарителе.

Чтобы оценить степень очистки реальных проб ХОП, ПХБ и ПХДД от мешающих их определению балластных веществ жировой ткани биоты, которая достигается после стадии хроматографического выделения целевых соединений, реальные пробы после очистки концентрированной серной кислотой, а также концентраты фракций целевых соединений хроматографировали на газовом хроматографе Varian 3400 с пламенно-ионизационным детектором (ПИД) в следующих условиях: колонка – Rtx-5 (длина – 30 м, внутренний диаметр – 0,32 мм, степень покрытия – 1 мкм); скорость газа-носителя (He) – 5 см^3/мин, объем вводимой пробы – 1 мкл (без деления потока); температурный режим – 60°С – 1 мин, линейный градиент температуры до 300°С со скоростью 10°С/мин, удерживание конечной температуры – 10 мин.

Результаты исследований и их обсуждение

Для выбора оптимальных условий очистки проб от остаточных балластных соединений материала матрицы, выполнена их идентификация методом ГХ/МС. Хроматограмма по полному ионному току (TIC) балластных органических соединений образца биоты, очищенного минерализацией концентрированной серной кислотой, представлена на рис. 1 а.

Балластные соединения мешают определению целевых по причине того, что при их фрагментации образуются ионы с m/z, которые используются для определения ХОП и ПХБ, либо они не дают таких ионов, но их присутствие в источнике ионов создает лишнее парциальное давление паров, что подавляет общую чувствительность масс-спектрометра. В образце балластных соединений биоты, очищенном минерализацией концентрированной серной кислотой, методом ГХ/МС идентифицированы основные классы органических соединений, которые не удаляются, либо удаляются не полностью из проб при данном способе очистки. Идентифицированы *н*-карбоновые кислоты, *н*-алканы, изоалканы, стероиды и продукты их деградации, а также хлорированные производные углеводородов.

На рис. 1 б представлена реконструированная хроматограмма (экстракт из TIC, режим SCAN) образца биоты Киевского водохранилища по характеристическому для жирних кислот иону с m/z 73.

На рис. 1 в представлена реконструированная хроматограмма (экстракт из TIC, режим SCAN) образца биоты Киевского водохранилища по характеристическому для алканов иону с m/z 85. На хроматограмме видно несколько гомологических рядов углеводородов, самый интенсивный из которых принадлежит *н*-алканам, остальные – изоалканам.

На рис. 1 г представлена реконструированная хроматограмма (экстракт из TIC, режим SCAN) образца биоты Киевского водохранилища по характеристическому для холестеринов иону с m/z 355.

На рис. 2 представлены масс-спектры пика пальмитиновой кислоты из образца биоты (скан 1150–1152) (а) и полученный в результате поиска по библиотеке масс-спектров Wiley 275 (а'). В пробе идентифицированы *н*-карбоновые кислоты (C_8–C_{20}). Пальмитиновая кислота мешает определению трихлорбифенилов, так как при ее фрагментации образуется интенсивный ион $M^{+\cdot}$ с m/z 256 и время выхода ее пика близкое к времени выхода трихлорбифенилов. Жирные кислоты также мешают определению тетрахлор-, пентахлор-, гексахлор- и гептахлорбифенилов, а также ДДЕ, ДДД и ДДТ методом ГХ/МС.

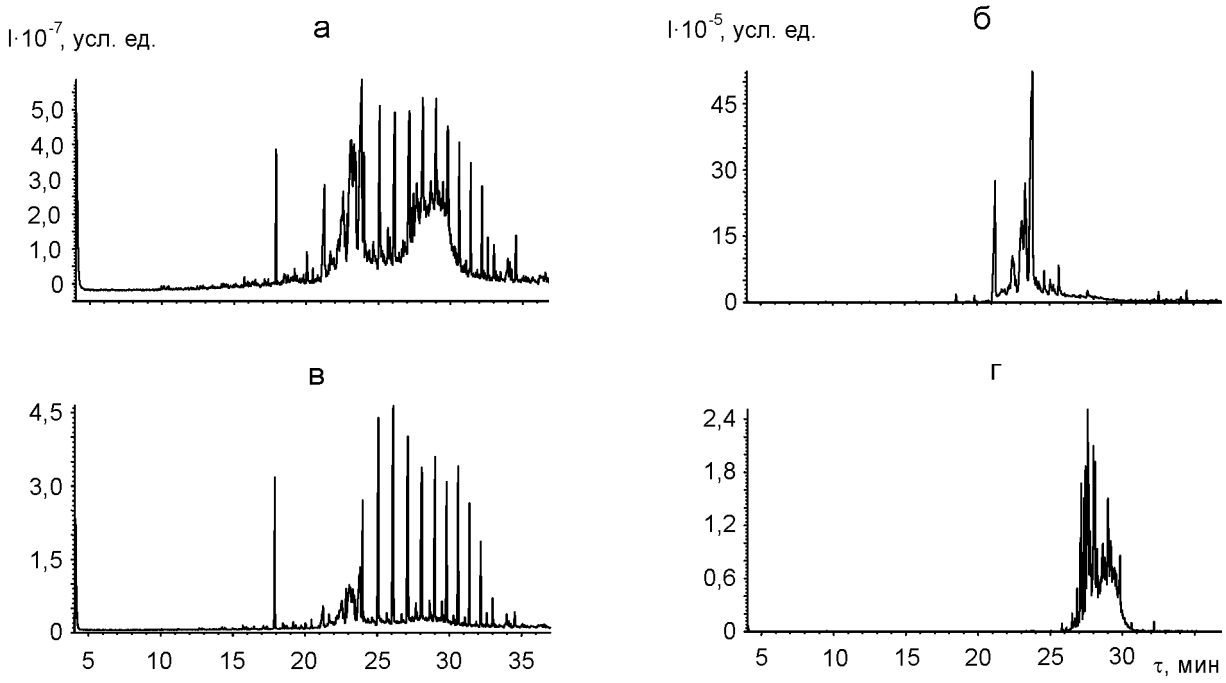

Рис. 1. Хроматограмма TIC (режим SCAN) (а) и реконструированные хроматограммы (экстракты из TIC) по ионам с m/z 73 (б), 85 (в) и 355 (г), которые являются характеристическими соответственно для карбоновых кислот, алканов и холестеринов.

На рис. 2 представлены масс-спектры *н*-алкана (скан 1878–1881) (б) из образца биоты и полученный в результате поиска по библиотеке масс-спектров Wiley 275 (б'). Углеводороды глубоко фрагментируются и создают сильный ионный ток, который мешает определению многих устойчивых загрязняющих веществ. Как и ПХДД, углеводороды не разрушаются ни концентрированной серной кислотой, ни олеумом, ни раствором перманганата калия. Эти соединения являются распространенными загрязняющими веществами в объектах окружающей среды.

На рис. 2 представлены масс-спектры стерина из образца биоты (скан 1562–1559) (в) и полученный в результате поиска по библиотеке масс-спектров Wiley 275 (в'). С 25 по 30 мин хроматограммы в виде группы неразделенных пиков выходят соединения, масс-спектры которых имеют неглубокую удельную фрагментацию, плохо идентифицируются по библиотеке Wiley 275, но в большинстве случаев в результате библиотечного поиска программа получает спектры разных стероидных соединений. По общему виду спектров можно однозначно утверждать, что они принадлежат соединениям с высокой формальной непредельностью, например, стероидам [8]. Так как эти соединения могут частично разлагаться в процессе хроматографирования, их пики накладываются друг на друга и на пики углеводородов, достоверная их идентификация затруднена. Учитывая происхождение проб, можно с уверенностью утверждать, эти балластные вещества являются стероидами и продуктами их деградации в результате окисления и высоких температур процесса хроматографирования.

На рис. 2 представлены масс-спектры гексахлорбутена из образца биоты (скан 487–490) (г) и полученный в результате поиска по библиотеке масс-спектров Wiley 275 (г'). Хлорированные производные углеводородов не разрушаются при обработке проб окислителями.

В состав остаточных балластных веществ матрицы входят соединения с меньшей полярностью, чем ХОП, ПХБ и ПХДД. Целевые соединения хорошо растворимы в метаноле, а карбоновые кислоты имеют ограниченную растворимость; углеводороды и стероиды – практически нерастворимы. Массы сухих проб, полученных описанным выше методом, обычно составляют не более 5–10 мг. Поэтому, наиболее подходящим способом препаративного выделения ПХДД, на наш взгляд, является обращенно-фазная ВЭЖХ в аналитическом масштабе. Этот метод позволяет разделять малые количества органических соединений с высокой эффективностью и минимальными затратами вре-

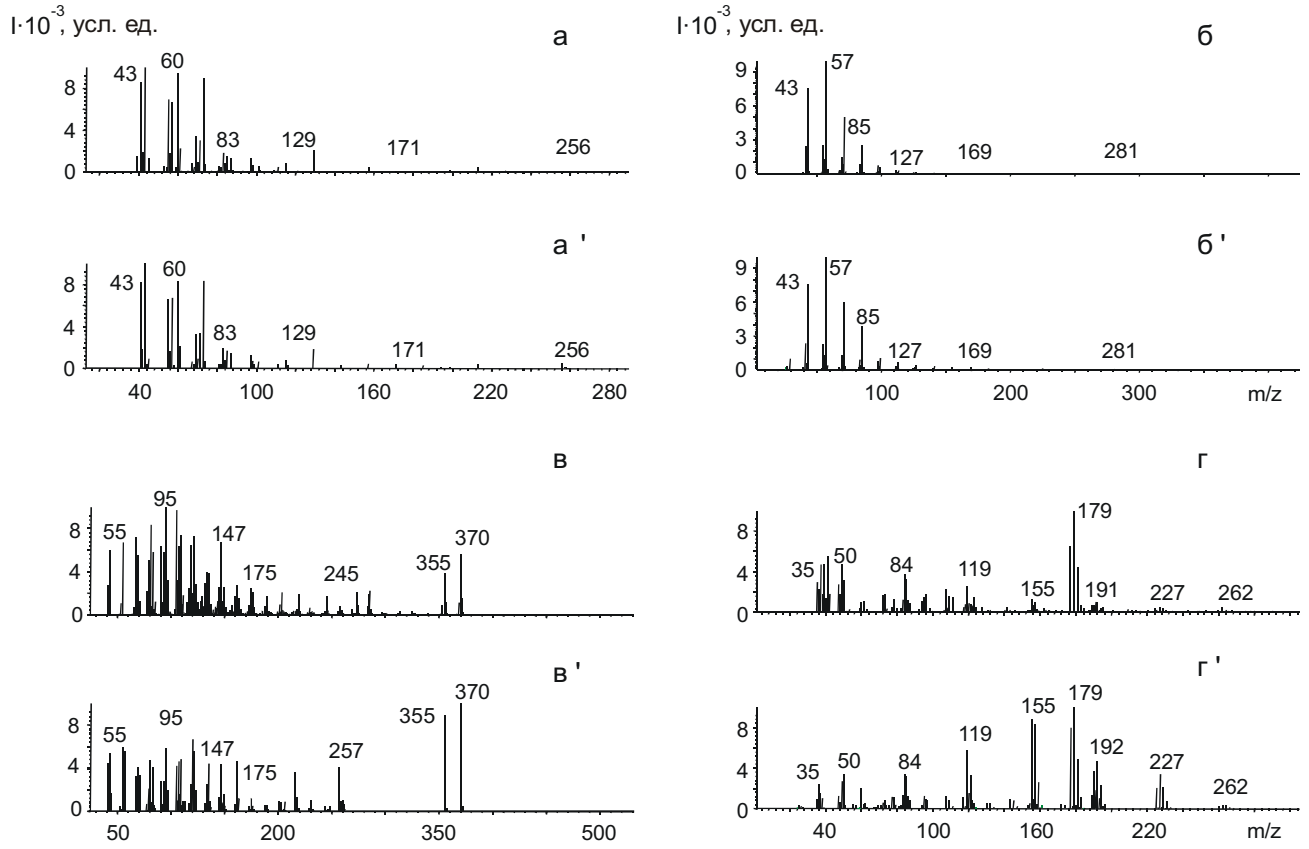

Рис. 2. Масс-спектры балластных веществ проб биоты и полученные в результате библиотечного поиска по библиотеке Wiley 275 (отмечены штрихом): а – пальмитиновой кислоты, б – *н*-гептакозана, в – холестерина, г – гексахлорбутена; степени соответствия – 98, 96, 99 и 38%.

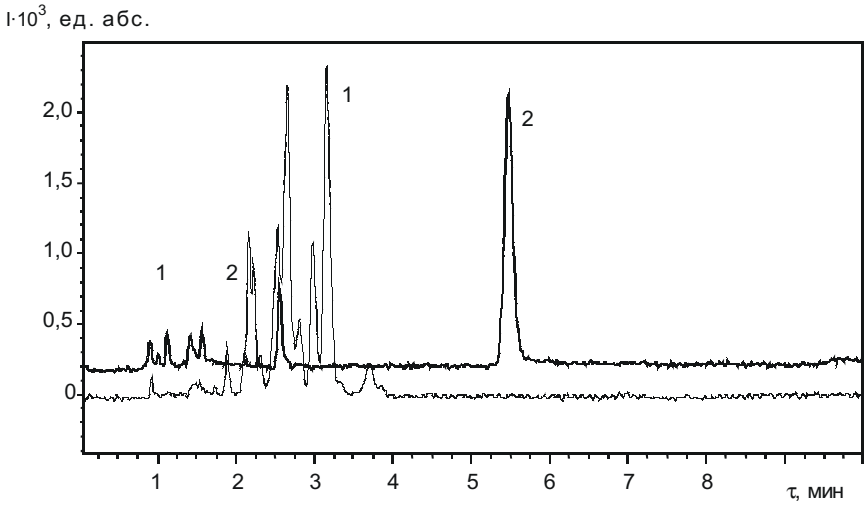

Рис. 3. Хроматограммы модельной смеси Aroclor 1254 и раствора 2,3,7,8-ПХДД на обращенно-фазной колонке (C_{18}) в условиях препаративного выделения ПХДД. 1 – смесь Aroclor 1254, 2 – 2,3,7,8-ТХДД.

мени и растворителей. Принципы и методы микропрепаративной ВЭЖХ для разных классов органических соединений описаны в монографии [9]. В качестве подвижной фазы удобно использовать метанол – недорогой растворитель, подходящий по полярности, который легко упаривается и пропускает УФ-свет. Наложенные друг на друга хроматограммы смеси Aroclor 1254, и 2,3,7,8-ТХДД, полу-

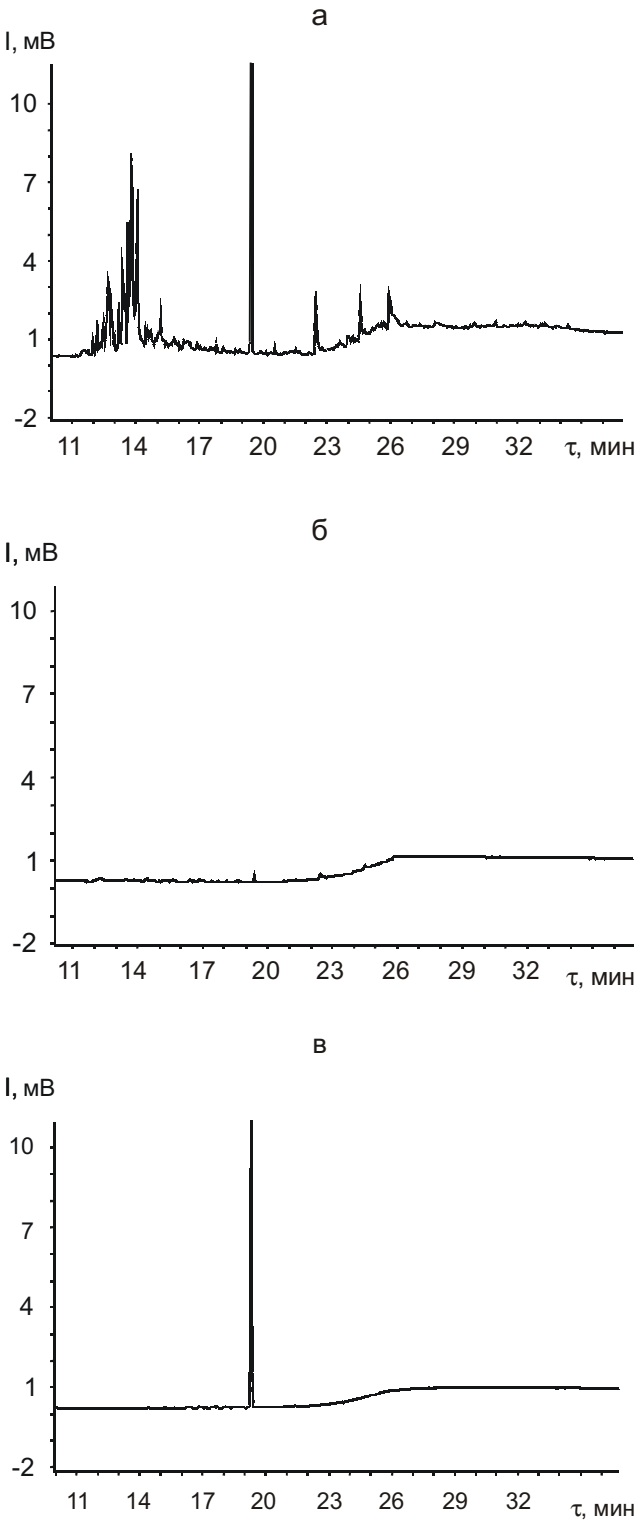

Рис. 4. Хроматограммы балластных соединений пробы биоты после очистки концентрированной серной кислотой (а), фракции, содержащей ХОП и ПХБ (б) и фракции, содержащей ПХДД, при детектировании ПИД (в).

ченные на обращенно-фазной колонке (C_{18}) в условиях препаративного выделения ПХДД из реальных смесей, представлены на рис. 3. Из хроматограммы определены объемы элюента, в которых будут находится ПХБ и ПХДД, выделенные из реальных объектов исследования. В этих же условиях хроматографировали смесь ХОП. Во фракции, содержащей ПХБ, найдены гексахлорциклогексан, ДДЕ, ДДД и ДДТ методом ГХ/МС.

В качестве маркера для препаративного выделения ПХДД выбран самый токсичный изомер – 2,3,7,8-ПХДД. Из представленной хроматограммы видно, что ПХБ попадают в 3–9 см^3 элюента, а 2,3,7,8-ТХДД – отделен от них и элюируется в 11–12 см^3. Так как объем удерживания ПХБ с увеличением степени хлорирования в данных условиях хроматографирования увеличивается, то, по аналогии, можно предположить, что ожидаемый объем удерживания ПХДД с количеством атомов хлора 5–7 (самые токсичные изомеры) составит более 10 см^3.

Методика препаративного выделения ПХДД апробирована на реальных пробах биоты бассейна Днепра. Степень очистки проб от балластных веществ оценивали по хроматогаммам ГХ/ПИД, полученным из одних и тех же проб до и после препаративного выделения целевых соединений. Ввиду низких концентраций ПХДД в реальных пробах и неспецифичности отклика ПИД к данным соединениям, все пики на хроматограммах приписывали пикам балластных соединений матрицы. Хроматограммы проб биоты представлены на рис. 4.

Из представленных на рис. 4 хроматограмм видно, что после препаративного выделения целевых соединений, достигается существенная очистка пробы от большей части балластных. Из проб практически полностью удаляются все идентифицированные соединения (*н*-карбоновые кислоты, алканы, хлорированные алканы, стероидные соединения и оставшиеся после обработки концентрированной H_2SO_4 продукты их деградации). Чтобы количественно оценить потерю балластных веществ, хроматограммы интегрировали и выражали степень очистки пробы как соотношение площадей всех пиков на хроматограмме до препаративного выделения целевых соединений к площадям всех пиков на хроматограммах после их выделения. Расчеты проводили по хроматограммам экстрактов, полученным из 3 разных образцов рыб. Получили степени (во столько раз очистилась проба) очистки 12, 144 и 176. Низкая степень очистки (12) пробы, представленной на рис. 4 в, обусловлена присутствием в одной из проб неидентифицированного соединения, которое частично попадает в данную фракцию. Присутствие

таких пиков нетипично для проб биоты. Степень очистки этой пробы от идентифицированных балластных соединений, которые присутствуют в большинстве проб мышечной ткани биоты, рассчитано отдельно, при этом пик неидентифицированного соединения не учитывали. Полученная степень очистки составила 160.

Обработка экстрактов из биоты окислителем перед хроматографическим выделением целевых соединений дает возможность уменьшить количество балластных на 2–3 порядка. Это позволило выполнять дальнейшее фракционирование пробы методом ВЭЖХ в аналитическом масштабе.

Выводы

Таким образом, разработана методика быстрого выделения ПХДД из проб биоты, в результате использования которой достигается отделение фракции ХОП и ПХБ от фракции ПХДД. При этом пробы освобождаются от балластных соединений, мешающих определению целевых, и готовы для определения методом ГХ/МС.

На подготовку одной пробы биоты по данной методике на стадию препаративного выделения расходуется 25 см^3 метанола и 3 см^3 метиленхлорида. Процедура хроматографического выделения целевых соединений занимает 10 мин, подготовка колонки к фракционированию следующей пробы – 4 мин. Детектирование модельных смесей ПХБ и ПХДД при помощи УФ-детектора позволяет быстро подбирать оптимальные условия разделения без необходимости анализировать фракции методом ГХ или ГХ/МС.

Литература

1. *Method* 1668, Revision A: Chlorinated biphenyls congeners in water, soil, sediment, and tissue by HRGC/HRMS – EPA No. EPA – 821–R–00–002, 1999.
2. *Method* 1613, Revision B: Tetra- trough octa- chlorinated dioxins and furans by isotope dilution HRGC/HRMS. – EPA No. 68–C3–0337, 1994.
3. *Method* 8290, Revision 1, Polychlorinated dibenzodioxins (PCDDs) and polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) by high-resolution gas chromatography/high-resolution mass spectrometry (HRGC/HRMS), 1998.
4. *Houtman C., Jover E., Adahchour M., Lamoree M., Legler J., Brouwer A.* Identification of dioxin-like and estrogenic compounds in sediment using CALUX® assay-directed fractionation combined with two-dimensional comprehensive GC×GC–ToF MS // Organohalogen Compounds. – 2004. – **66**. – P. 704–710.
5. *Huwe J.K., Shelver W.L., Patterson D.G., Turner W.E.* On the isolation of polychlorinated *p*-dioxins and furans from serum samples using immunoaffinity chromatography high-resolution gas chromatography-mass spectrometry // J. Chromatogr. B. – 2001. – **757**, № 2. – P. 285–293.
6. *Shan G., Leeman W.R., Gee S.G., Sanborn J.R., Jones A.D., Chang D.P.Y., Hammock B.D.* Highly sensitive dioxin immunoassay and its application to soil and biota samples // Anal. Chim. Acta. – 2001. – **444**. – P. 169–178.
7. *Скринник М.М., Милюкин М.В.* // Укр. хим. журн. – 2007. – **73**, № 6. – (в печати).
8. *Зенкевич И.Г., Иоффе Б.В.* Интерпретация масс-спектров органических соединений. – Л.: Химия, 1986. – 176 с.
9. *Бидлингмейер Б.* Препаративная жидкостная хроматография. – М.: Мир, 1990. – 360 с.