

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ДВНЗ «УЖГОРОДСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ»

СКРИННИК МАКСИМ МИХАЙЛОВИЧ

УДК [543.54+543.51:547.993]504.064.3:574.064

ВИЗНАЧЕННЯ ХЛОРООРГАНІЧНИХ ПЕСТИЦИДІВ ТА ПОЛІХЛОРОВАНИХ
БІФЕНІЛІВ У ГІДРОБІОНТАХ МЕТОДОМ ХРОМАТО-МАС-СПЕКТРОМЕТРІЇ

02.00.02 – аналітична хімія

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата хімічних наук

Ужгород – 2017

Дисертацією є рукопис

Робота виконана на кафедрі аналітичної хімії та екотехнологій Східноєвропейського національного університету імені Лесі Українки

Науковий керівник: доктор хімічних наук, старший науковий співробітник
Мілюкін Михайло Васильович,
Інститут колоїдної хімії та хімії води
ім. А.В. Думанського НАН України,
провідний науковий співробітник відділу аналітичної та
радіохімії

Офіційні опоненти: доктор хімічних наук, професор
Антонович Валерій Павлович
Фізико-хімічний інститут ім. О.В. Богатського
НАН України, завідувач відділу аналітичної хімії
та фізико-хімії координаційних сполук

кандидат хімічних наук, доцент
Студеняк Ярослав Іванович
Державний вищий навчальний заклад «Ужгородський
національний університет», завідувач кафедри
аналітичної хімії

Захист відбудеться «03» березня 2017 р. о 12⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради К 61.051.03 при Державному вищому навчальному закладі «Ужгородський національний університет» за адресою: 88000, м. Ужгород, вул. Підгірна, 46, хімічний факультет, ауд. № 306.

З дисертацією можна ознайомитися у науковій бібліотеці ДВНЗ «Ужгородський національний університет» (88000, м. Ужгород, вул. Університетська, 14).

Автореферат розісланий «27» січня 2017 р.

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат хімічних наук, доцент



О.Ю. Сухарева

ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність. У зв'язку з проблемами аналітичної хімії водних систем (вода, донні відкладення, гідробіоти) з'являється необхідність розробки і застосування найбільш ефективних та інформативних методів виділення, концентрування, ідентифікації і визначення мікродомішок токсичних обмежено-летких органічних сполук (ОЛОС) в цих об'єктах на рівні ультрамікрокількостей. Дані про вміст мікро-, нано- і пікограмових кількостей токсичних органічних забруднюючих речовин в об'єктах водних систем є важливими для теоретичних та практичних досліджень, націлених на вивчення передбачення та прогнозування середовища існування для живих організмів, а також для вирішення технологічних проблем охорони водних систем.

Світовий розвиток і удосконалення природоохоронного законодавства потребують від аналітичної хімії вирішення складних прикладних задач, які включають діагностику антропогенного стану об'єктів навколишнього середовища та змін, які відбуваються в ньому. Вимоги до аналізів у багатьох провідних країнах світу було переглянуто в сторону посилення – значного зниження меж виявлення. Особливо це стосується суперекотоксикантів із загальної групи ОЛОС: стійких (персистентних) органічних забруднюючих речовин (СОЗ) в об'єктах водних систем, затверджених Стокгольмською конвенцією в 2001 р., у тому числі до переліку яких входять поліхлоровані біфеніли (ПХБ), хлорорганічні пестициди (ХОП), поліциклічні ароматичні вуглеводні (ПАВ) та інші. Це пов'язано з їхнім широким розповсюдженням та певною загальною токсичністю, а також здатністю проявляти канцерогенну, мутагенну, тератогенну, гепатотоксичну та інші дії, а також акумулюватись в жировій тканині живих організмів і при цьому викликати різноманітні захворювання.

Зростаючі вимоги сприяють розробці для цих цілей нових методологічних підходів або методологій, реалізованих з використанням хроматографічних і хромато-мас-спектрометричних методів аналізу, які характеризуються підвищеною чутливістю, селективністю, і можуть забезпечити точність та правильність отриманих результатів визначення супертоксичних речовин.

Систематичні дані відносно ідентифікації і рівнів вмісту ХОП і ПХБ, у тому числі копланарних, у гідробіонтах (м'язова тканина риби) басейну р. Дніпро та інших річок України досить обмежені. Актуальність виконаних в роботі досліджень полягає у розробці схеми аналізу для вирішення задач ідентифікації, визначення і практичного застосування для контролю і проведення моніторингу токсичних сполук (ХОП, ПХБ, копланарні ПХБ) у гідробіонтах методами прискореної рідинної екстракції (ПРЕ), препаративної хроматографії і хромато-мас-спектрометрії (газової хроматографії/мас-спектрометрії (ГХ/МС)).

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана у відповідності з планами науково-дослідницьких робіт кафедри аналітичної хімії та екотехнологій Східноєвропейського національного університету імені Лесі Українки "Хемосенсиори на основі амінопохідних родамінів" (2015–2016 рр.), № державної реєстрації 0115U002349,

а також по тематиці трьох Міжнародних проектів Інституту колоїдної хімії та хімії води ім. А.В. Думанського НАН України (ІКХВ) з Українським науково-технологічним центром (УНТЦ – Science and Technology Center in Ukraine, STCU) (Агенція з охорони навколишнього середовища, США): P277, 01.09.2006–31.10.2009 рр.; P277A, 01.11.2009–31.10.2010 рр.; P500, 01.09.2011–28.02.2014 рр.

Мета і задачі дослідження. Метою даної роботи є розробка методології пробопідготовки, ідентифікації і визначення мікродомішок ХОП, сумарного вмісту, ізомерно-специфічного складу ПХБ, копланарних ПХБ та застосування її для моніторингу цих сполук у гідробіонтах на рівні наноконцентрацій.

Основні задачі дослідження:

- розробка ефективних стадій методики пробопідготовки мікродомішок ХОП, ПХБ і копланарних ПХБ методами ПРЕ і препаративної вискоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) для їх виділення з гідробіонтів природних водних об'єктів басейну р. Дніпро (схема аналізу);
- оптимізація умов виділення і кількісного визначення ХОП, ПХБ і копланарних ПХБ методом ГХ/МС;
- застосування способу препаративної ВЕРХ для очистки концентратів ОЛОС з метою виділення суперекотоксикантів;
- встановлення закономірностей зміни рівнів вмісту ХОП і ПХБ в гідробіонтах за результатами моніторингу відносно CTL (Critical Tissue Level – критичний рівень концентрації для м'язової тканини риби) і BCF (Bioconcentration Factor – фактор біоконцентрування ХОП і ПХБ м'язовою тканиною риби) з метою оцінки їх біодоступності і токсичності;
- встановлення закономірностей зміни рівнів вмісту ПХБ у м'язовій тканині риби за результатами моніторингу відносно TEQ (Toxicity Equivalent – токсичний еквівалент відносно 3,4,7,8-тетрахлордибензо-*n*-діоксину) з метою оцінки їх токсичності.

Об'єкт дослідження – процес виділення, концентрування, ідентифікації, кількісного визначення мікродомішок токсичних ХОП і ПХБ в гідробіонтах природних водних систем і їх моніторинг.

Предмет дослідження – ХОП і ПХБ у м'язових тканинах риб.

Методи дослідження – основні результати роботи отримано з використанням сучасних фізико-хімічних методів дослідження: хроматографічних – газової хроматографії при електронно-захоплюючому детектуванні (ГХ/ЕЗД); ВЕРХ при діодно-матричному детектуванні в УФ/Вид-області спектру і ГХ/МС при електронній іонізації (EI) і мас-селективному детектуванні (МСД) в режимах SCAN (повний іонний струм, Total Ion Current (TIC) у повному діапазоні мас) і SIM (Selective Ion Monitoring) (TIC у визначеному діапазоні мас за вибраними характеристичними іонами).

Наукова новизна отриманих результатів. Наукова новизна полягає в розвитку методичних підходів наукового напрямку, пов'язаного з хімічним

контролем і моніторингом супертоксикиантів ХОП, ПХБ і копланарних ПХБ в гідробіонтах водних систем для вирішення практичних аналітичних задач:

- вперше розроблена методологія дослідження ХОП, ПХБ і копланарних ПХБ в гідробіонтах природних водних систем басейну р. Дніпро, у якій обґрунтовано необхідність раціонального поєднання процедур пробопідготовки, ідентифікації і заключного хроматографічного і (або) хромато-мас-спектрометричного визначення органічних токсикантів;
- оптимізовані умови виділення і концентрування вказаних сполук, режими хроматографічного розділення і мас-селективного детектування у складних сумішах;
- вирішена цільова задача ідентифікації і кількісного визначення ХОП і ПХБ (загального вмісту, ізомерно-специфічного складу та вмісту копланарних ізомерів) методом ГХ/МС в режимі SIM на рівні $(2,0-4,0) \cdot 10^{-10}$ г/дм³ у біологічних об'єктах водної системи басейну р. Дніпро;
- встановлено закономірності зміни рівнів вмісту ПХБ у гідробіонтах відносно ТЕQ за результатами моніторингу з метою оцінки їх токсичності на прикладі водної екосистеми басейну р. Дніпро;
- вирішена проблема біодоступності ХОП і ПХБ гідробіонтами за результатами моніторингу на прикладі водної екосистеми басейну р. Дніпро.

Практичне значення отриманих результатів. Для проведення аналітичних досліджень біологічних об'єктів водних систем розроблені методики пробопідготовки і визначення токсичних хлорорганічних сполук, реалізовані хроматографічними і хромато-мас-спектрометричними методами, на основі чого розроблено схему дослідження гідробіонтів, яка дозволяє ідентифікувати, кількісно визначати і проводити моніторинг ХОП, ПХБ і копланарних ПХБ та оцінювати їх біодоступність. Точність та правильність результатів, які можна отримати із застосуванням цих методик і схеми аналізу, підтверджено аналізом стандартних зразків тканин біоти (мідій) SRM 1977 NIST Mussel Tissue (Organic Contaminants and Trace Elements).

Особистий вклад здобувача в представлених до захисту матеріалах полягає у розробці методології дослідження гідробіонтів водних систем, постановці задач, організації і проведенні експериментальних досліджень, обробці та інтерпретації експериментальних даних, узагальненні отриманих результатів, підготовці статей, виступів і тез доповідей, звітів. Разом із д.х.н. М.В. Мілюкіним проводилось планування етапів робіт і обговорення результатів досліджень. У проведенні деяких експериментальних робіт (пробопідготовка) приймали участь к.х.н. Г.В. Терлецька і к.х.н. Т.О. Богословська. Всі співавтори приймали участь в обговоренні спільних публікацій.

Апробація роботи. Результати досліджень за темою дисертації представлено і обговорено на 14 Міжнародних і Українських конференціях: The Second International Conference “Interfaces against pollution” (Miskolc-Lillafured, Hungary, 2002); Міжнародний Форум “Аналитика и Аналитики” (Вороніж, Росія, 2003, 2008); Міжнародна конференція “Чистота довкілля в нашому місті” (Трускавець, 2004); International Conference “Analytical Chemistry and Chemical

Analysis” (Kyiv, 2005); Міжнародна конференція “Екстракция органических соединений” (Вороніж, Росія, 2005, 2010); Наукова конференція “Аналітичний контроль якості та безпеки продукції промислового виробництва і продовольчої сировини. Питання підготовки фахівців для випробувальних лабораторій” (Одеса, 2006); Міжнародна конференція “Хроматографічні методи аналізу органічних сполук” (Київ, 2007); Третя міжнародна конференція “Чистота довкілля в нашому місті” (Севастополь, 2007); IX Всеукраїнська конференція з аналітичної хімії (Донецьк, 2013); Київська конференція з аналітичної хімії. Сучасні тенденції 2014 (Київ, 2014); Всеукраїнська науково-практична конференція “Актуальні проблеми хімії і хімічної технології” (Київ, 2014); Третя міжнародна конференція “Хімічна і радіаційна безпека. Проблеми і рішення” (Київ, 2015).

Публікації. Основний зміст дисертаційної роботи викладено в 21 публікації, з них – 6 статей, опублікованих у фахових наукових журналах, тези 15 доповідей на конференціях.

Структура і об’єм дисертаційної роботи. Дисертаційна робота складається із вступу, 6 розділів, висновків, списку цитованої літератури, що нараховує 171 посилання. Зміст роботи викладено на 170 сторінках друкованого тексту, містить 26 таблиць і 27 рисунків.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У вступі обговорений стан проблеми, обґрунтована актуальність теми, показаний зв’язок з науковими програмами, сформульовані мета і задачі дослідження, надана загальна характеристика роботи, показана наукова новизна і практичне значення роботи, наведені дані з апробації отриманих результатів дослідження і особистий внесок здобувача у їх вирішення.

У першому розділі представлений критичний огляд літератури відносно загальних аналітичних проблем визначення мікродомішок органічних токсичних сполук в об’єктах водних систем, наданий аналіз світового досвіду систем моніторингу та результати цього моніторингу. Розглянуті питання аналітичної хімії ксенобіотиків водних систем – СОЗ і споріднених токсикантів, виконаних з використанням високочутливих і селективних методів дослідження, котрі включають аналіз сучасних літературних даних відносно їх рівнів вмісту, розповсюдженості, шляхів переміщення (міграції), ступеню біоакмулювання та біодоступності.

У другому розділі «Розробка методик дослідження хлорорганічних пестицидів і поліхлорованих біфенілів у м’язовій тканині риб водних систем» представлені розроблені, апробовані і застосовані автором методики пробопідготовки і дослідження ХОП, ПХБ, копланарних ПХБ у гідробіонтах різних водних систем, реалізовані хроматографічними та хромато-мас-спектрометричними методами. Устаткування і метод проведення ПРЕ представлені на рис. 1. У колонку (2) поміщали зразок для екстракції. Мертвий об’єм заповнювали надлишковою кількістю безводного CuSO_4 . Колонку герметично закривали. Колонку (3) щільно наповнювали безводним CuSO_4 . Насос (1), колонки (2) і (3) і колбу (7) з’єднували трубками (6). Колонку (2) поміщали у

водяну або гліцеринову баню (4) при необхідній температурі, а колонку (3) – у посудину з холодною водою. Розчинник подавали за допомогою насоса. На основі розроблених і вдосконалених методик пробопідготовки концентратів та їх дослідження методами ГХ/МС у режимі SIM і ГХ/ЕЗД представлена схема визначення і моніторингу ХОП і ПХБ у гідробіонтах (рис. 2).

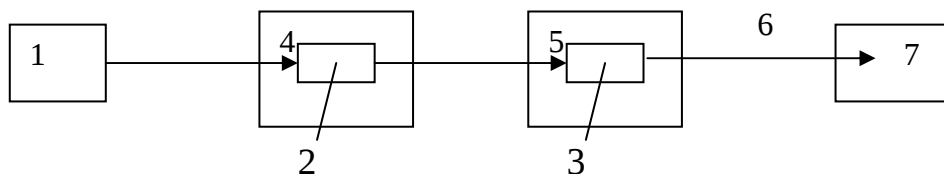


Рис. 1. Схематичне зображення системи для ПРЕ: 1 – насос (Waters 515); 2, 3 – колонки з неіржавіючої сталі розміром 21,2×70 і 6,0×40 мм; 4 – водяна або гліцеринова баня; 5 – посудина з холодною водою об'ємом 2 дм³; 6 – з'єднувальні трубки (внутрішній діаметр – 0,8 мм) з фітингами; 7 – колба з конічним дном для екстракту.

Встановлення оптимальних умов пробопідготовки хлорорганічних пестицидів і поліхлорованих біфенілів з м'язової тканини риб (розділ 3). У даному розділі представлені результати виділення ліпідної фракції з м'язової тканини риб, що містить ХОП і ПХБ, методом ПРЕ. При розробці цього методу на першому етапі проведено експеримент з тестовими зразками м'язової тканини риб екстракцією Сокслета, яка призводить до практично вичерпного вилучення органічних сполук з твердих зразків. Порівняння результатів, отриманих методом ПРЕ, проводили відносно класичного методу.

Маса екстрагованих органічних сполук. Результати визначення маси екстрагованих органічних сполук для 10 паралельних визначень тестового зразка № 3 метиленхлоридом в апараті Сокслета показали, що середнє значення маси становить $284,2 \pm 2,2$ мг; відносне стандартне відхилення становить 0,8 %. Результати визначення маси екстрагованих органічних сполук для п'яти тестових зразків тканини при екстракції хлористим метиленом, диетиловим ефіром і бензолом, отриманих двома способами: А (наважка вологої тканини перетерта з безводним CuSO_4 до сухої однорідної маси) і Б (наважка вологої тканини, яка висušена ліофільно), свідчать про незначне відхилення мас зразків від середнього значення, яке складає відповідно за способами А і Б – 1,1–3,6 і 1,5–7,1 %, для одних і тих же зразків, приготованих різними способами, – 0,9–5,7 %.

Концентрація ХОП і ПХБ. У всіх екстрактах, отриманих двома альтернативними способами, ідентифіковані ХОП і ПХБ та визначена їх концентрація методом ГХ/МС. З даного експерименту випливає, що обидва способи підготовки зразків при застосуванні класичного варіанту екстракції Сокслета органічних сполук дають практично збіжні результати. Відхилення концентрацій наведених сполук від середнього значення для всіх розчинників становить 0,1–11,8 %. Оскільки екстракція Сокслета призводить до практично повного вилучення органічних сполук з твердих зразків, то середні значення мас і концентрацій екстрагованих органічних сполук, в тому числі цільових ХОП і

ПХБ, приймали за 100 % від їх вмісту в тестових зразках тканини, і подальше порівняння ступеня вилучення за методом ПРЕ проводили відносно аналогічних величин, отриманих за методом Сокслета.

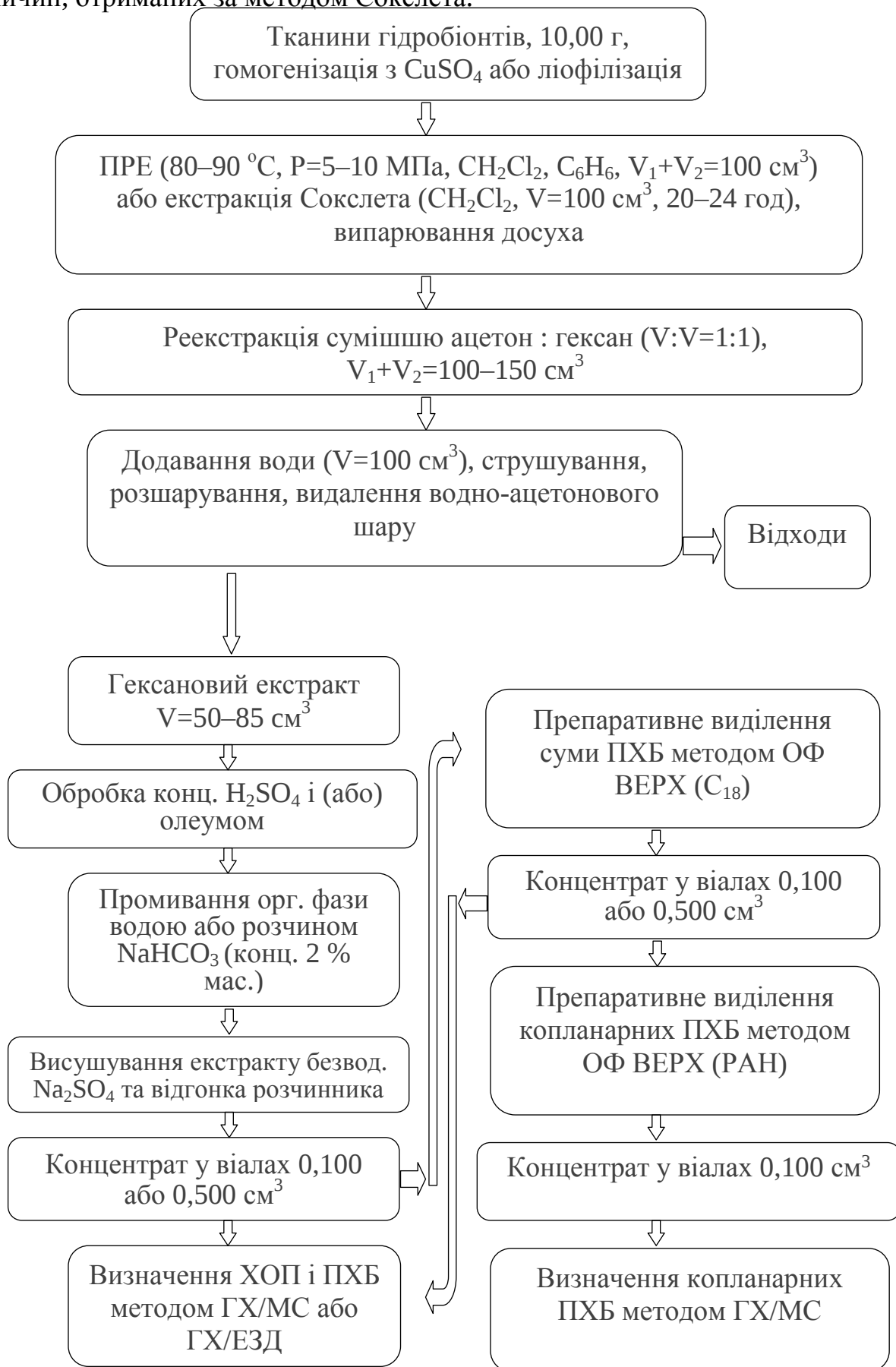


Рис. 2. Схема визначення ХОП, ПХБ і копланарних ПХБ методом ПРЕ і класичним методом екстракції Сокслета.

На рис. 3 представлена інтегральна крива диференційного лазерно-рефрактометричного детектора, яка характеризує вилучення органічних сполук із тканини методом ПРЕ. Провал перед піком обумовлений виходом бульбашок повітря з комірки екстракції. Як видно з даного рисунка, найбільш інтенсивно екстракція проходить на початку процесу (найбільша кількість органічних сполук міститься у перших 4 см³ екстракту). Потім вилучення проходить повільно і крива наближається до нульового значення, але не досягає його навіть після пропускання 25 см³ метиленхлориду.

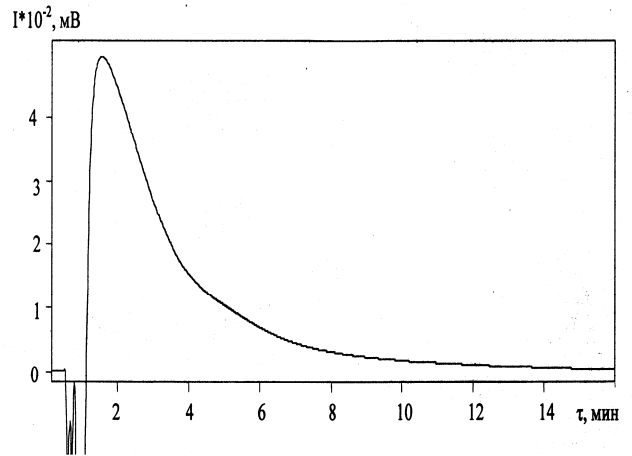


Рис. 3. Реєстрація екстрагованих органічних сполук із тканини на виході з системи ПРЕ при лазерно-рефрактометричному детектуванні.

Вплив температури. При проведенні ПРЕ, в залежності від наявного устаткування (рис. 1, 3), не завжди зручно використовувати високі температури екстракційної комірки. Щоб визначити оптимальну температуру, при якій досягається задовільне вилучення гідрофобних сполук із зразків тканини, тестові зразки екстрагували при температурах 20, 40, 60, 80, 100 і 120 °С. Інші параметри екстракції при цьому зберігали постійними для всіх зразків (розчинник – метиленхлорид при проходженні зі швидкістю 10 см³/хв впродовж 6 хв).

Ступінь вилучення неполярних сполук (R) розраховували як відношення маси сухого залишку, отриманого в умовах ПРЕ, до аналогічного середнього значення при екстракції Сокслета за формулою:

$$R (\%) = (m_{\text{ПРЕ}} / m_{\text{Сокслет}}) \cdot 100.$$

R для усіх тестових зразків тканини при 20–40 °С низький – 61–79 %, з підвищенням температури екстракції зростає і при 100–120 °С наближається до виходу на «плато» та досягає 80–87 %. Показано, що для ПРЕ зразків тканини цілком достатньою може бути температура 80–90 °С, яка забезпечує 78–85 % вилучення. Підвищення температури до 120 °С призводить тільки до незначного зростання ступеня вилучення (2–3 %).

Ступінь вилучення від температури і об'єму розчинника. Для визначення об'єму розчинника, достатнього для отримання основної маси органічних сполук зі зразка тканини, проводили екстракцію тестового зразка № 5 при зазначених температурах. Метиленхлорид збирали у 6 колб по 10 см³ (фракції I–VI). Масу екстрагованих органічних сполук визначали окремо у кожній фракції. Ступінь вилучення гідрофобних сполук R_T при різних температурах у кожній фракції істотно залежить від температури екстракції і мало залежить від об'єму розчинника, витраченого на екстракцію. Наприклад, в умовах ПРЕ при 100 °С у

перших 20 см³ екстракту міститься близько 86 % вилучених органічних сполук, а в наступних 40 см³ – менше 1 %; при температурі 20 °С відповідні значення складають 63 і 6 %. Можна припустити, що органічні сполуки у зразках тканини пов'язані з матрицею певним зв'язком, на руйнування якого необхідно затратити певну енергію. При цьому слабо асоційовані речовини (близько 65 %) вилучаються вже при температурі 20 °С, у той час як інші – міцно асоційовані не вилучаються навіть при 120 °С.

Ступінь відкривання внутрішнього стандарту. Для з'ясування поведінки цільових сполук при проведенні ПРЕ у зразок № 5, який екстрагували при 60 °С, вводили внутрішній стандарт – 2,3,3',4,4',5-гексахлорбіфеніл. Отримані дані свідчать, що ступінь відкривання внутрішнього стандарту (близько 100 %) досягається вже при 60 °С. Оскільки ХОП і ПХБ зв'язані з матрицею, їх вилучення при цій температурі відбувається неповністю. Тому внутрішній стандарт може використовуватись тільки для оцінки втрат цільових сполук в ході пробопідготовки, але не для оцінки їх ступеню відкривання у зразках. ХОП і ПХБ у зразках тканини асоційовані з жировою фракцією, і їх ступінь вилучення близький до вилучення інших гідрофобних сполук, а тому маса речовин, що екстрагуються в умовах ПРЕ, може служити критерієм оцінки їх вилучення.

Вплив швидкості подачі розчинника. У п'яти тестових зразках, при їх екстракції метиленхлоридом при 80 °С і швидкості подачі органічного розчинника 2 та 10 см³/хв, ступені вилучення гідрофобних органічних сполук становлять: 81,8; 77,9; 80,3; 78,8; 85,1 та 82,2; 78,2; 83,4; 79,4; 85,3 % відповідно. Таким чином, у вказаному діапазоні значень швидкість подачі розчинника практично не впливає на ступінь вилучення органічних сполук.

Вибір оптимального розчинника. Для вибору розчинника, здатного найбільш повно та вибірково вилучати цільові компоненти, проводили ПРЕ тестових зразків різними екстрагентами в оптимальних умовах: температура – 80 °С, швидкість потоку екстрагента – 10 см³/хв, об'єм екстракту – 50 см³. Для всіх зразків та екстрагентів за вказаних умов ступінь вилучення (R_T , %) неполярних сполук становив: метиленхлорид (78,2–85,3), диетиловий ефір (70,8–83,3), бензол (80,5–85,6), хлороформ (79,1–86,0), етилацетат (72,1–82,4), чотирехлористий вуглець (75,6–84,1), дихлоретан (78,1–86,2), толуол (76,2–85,0), гексан (42,5–63,2), гептан (42,3–61,7). Найслабше цільові компоненти вилучають насичені *n*-вуглеводні, однак і вилучення іншими розчинниками є теж неповним.

Вибір оптимальних сумішей розчинників. Ступінь вилучення (R_T , %) неполярних сполук в умовах ПРЕ сумішами гідрофобних та гідрофільних розчинників досліджували при їх співвідношенні 9:1, так як більш високі концентрації останніх (метанолу, ацетону або ацетонітрилу) призводили до інтенсивного вилучення води зі зразків і до виходу з ладу запобіжної колонки (з безводним CuSO₄). Значення R_T за вказаних вище умов, для відповідних сумішей становили (%): метиленхлорид : метанол (77,3–84,4), метиленхлорид : ацетон (78,2–85,1), метиленхлорид : ацетонітрил (76,3–86,3), бензол : метанол (76,6–86,3), бензол : ацетон (80,3–83,3), бензол : ацетонітрил (79,2–84,9), диетиловий ефір : метанол (79,5–85,1), диетиловий ефір : ацетон (75,9–84,3), диетиловий ефір :

ацетонітрил (78,8–84,8). Таким чином, при використанні релевантного розчинника або суміші розчинників досягається 75–86 % вилучення цільових компонентів, проте жоден з них не забезпечує більш як 90 % вилучення неполярних сполук із тканин гідробіонтів.

Послідовна екстракція розчинниками та їх сумішами. Тестові зразки тканини екстрагували при 80 °С, швидкості подачі розчинника 10 см³/хв із триразовою заміною розчинника на наступний або на суміш розчинників – диетиловий ефір (I), метиленхлорид (II), бензол : метанол (9 : 1) (III), хлороформ (IV), причому збирали 40 см³ першого екстракту і по 10 см³ наступних (фракції I–IV). Після проведення ПРЕ залишки зразків екстрагували в апараті Сокслета хлороформом впродовж 24 год (V фракція). Ступені вилучення (R_T) гідрофобних органічних сполук в ході послідовної ПРЕ різними розчинниками та остаточної вичерпної екстракції Сокслета тестових зразків м'язової тканини риб становили: 72,0–82,0; 5,0–15,0; 3,0–6,0; 0,5–0,8 та 3,2–13,2 % у фракціях (I–V) відповідно.

Реалізація і проведені експериментальні дослідження методу ПРЕ та впливу різних факторів на ступінь вилучення гідрофобних органічних сполук з гідробіонтів органічними розчинниками і їх сумішами засвідчили, що: в оптимальних умовах проведення процесу досягається достатньо високий ступінь відкривання цільових сполук (85–90 %); розроблена методика ПРЕ вказаних сполук із зразків м'язової тканини риб характеризується експресністю (10 хв), при цьому вода та водорозчинні речовини в екстракт не потрапляють; на екстракцію одного зразка витрачається 70–80 см³ розчинників, а сам процес не вимагає застосування високовартісного обладнання.

Визначення хлорорганічних пестицидів і поліхлорованих біфенілів у гідробіонтах басейну р. Дніпро методом газової хроматографії/мас-спектрометрії (розділ 4). Ідентифікацію і визначення ХОП і ПХБ у зразках тканини риб з басейну р. Дніпро, відловлених у вересні-жовтні 2003 р., проводили при детектуванні в режимі SIM (EI 70 eV) за характеристичними іонами з m/z для ХОП: 4,4'-ДДЕ – 176, 246, 248; 2,4'-ДДД, 4,4'-ДДД і 4,4'-ДДТ – 165, 235, 237; для ПХБ: три- – 256, 258, 260, тетра- – 290, 292, 294, пента- – 324, 326, 328, гекса- – 358, 360, 362, гепта- – 392, 394, 396 та октахлорізомерів – 426, 428, 430. ХОП і ПХБ ідентифікували за часом їх утримування та за характеристичними іонами з використанням електронної бібліотеки мас-спектрів Wiley 275, крім цього ПХБ ідентифікували за відповідністю співвідношень інтенсивностей іонів M^{+} , $[M+2]^{+}$, $[M+4]^{+}$ отриманих мас-спектрів до теоретично розрахованих. Для ідентифікації використовували і співвідношення між зазначеними іонами, отриманими на інших приладових комплексах. Концентрації цільових сполук визначали за співвідношеннями інтенсивностей їх характеристичних іонів на хроматограмах калібрувальних розчинів до відповідних значень на хроматограмах випробовуваних розчинів. Концентрації ХОП і ПХБ розраховували за середніми значеннями, отриманими за трьома вибраними характеристичними іонами. У всіх досліджених пробах м'язової тканини риб ідентифіковані ХОП і ПХБ, визначені їх концентрації та ізомерно-специфічний склад ПХБ.

На рис. 4 зображені реконструйовані хроматограми (екстракти з ТІС, режим

SIM) зразків тканини риби за характеристичними іонами для ХОП. Реконструйовані хроматограми (екстракти з ТІС, режим SIM) зразків м'язової тканини риби за характеристичними для ПХБ іонами M^+ , $[M+2]^+$, $[M+4]^+$ представлені на рис. 5. Мас-спектри ПХБ хроматограм зразків гідробіонтів і результати бібліотечного пошуку за бібліотекою Wiley 275 наведені на рис. 6.

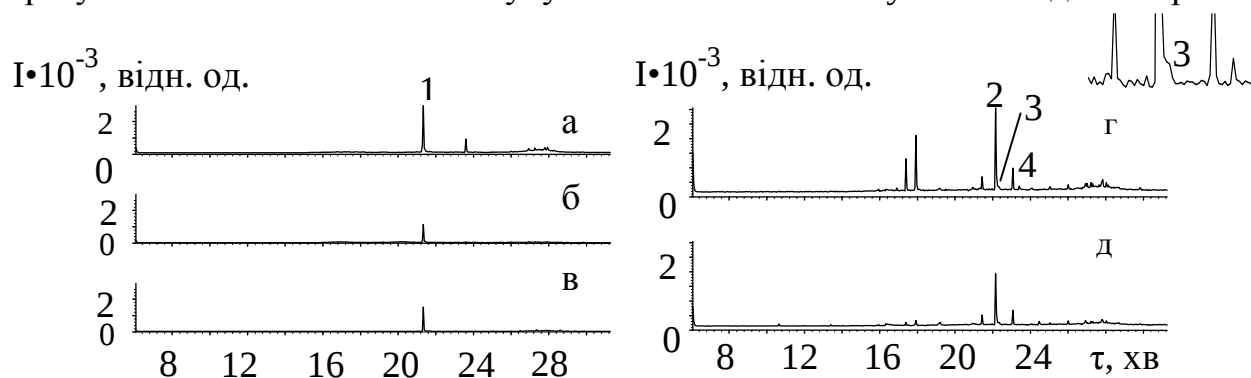


Рис. 4. Реконструйовані хроматограми зразка м'язової тканини риби за характеристичними іонами з m/z : 246 (а), 248 (б) і 318 (в) для 4,4'-ДДЕ (пік 1) і 235 (г) і 237 (д) – для 2,4'-ДДД (пік 2), 4,4'-ДДД (пік 3) і 4,4'-ДДТ (пік 4).

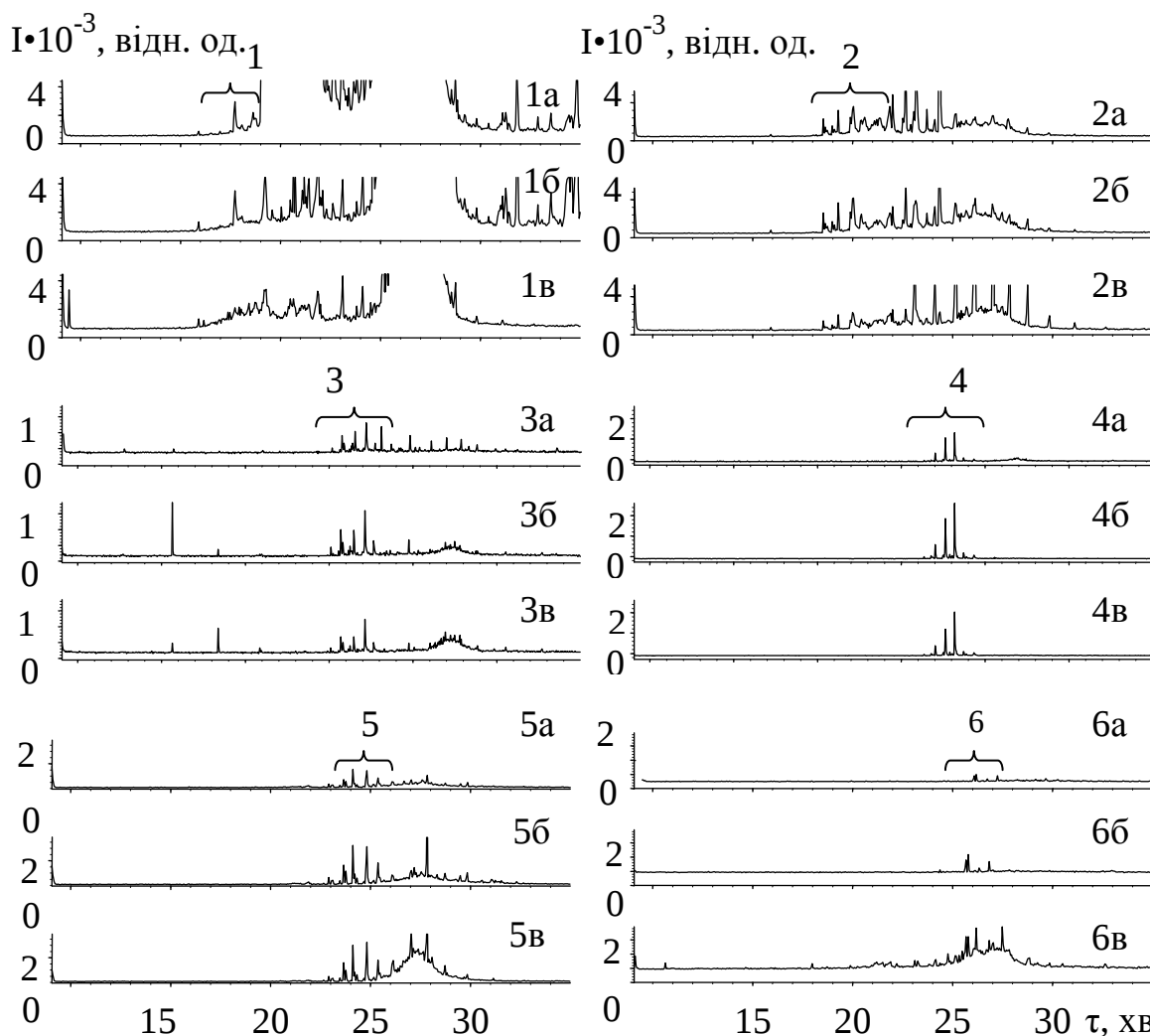


Рис. 5. Реконструйовані хроматограми зразків тканини за характеристичними іонами M^+ , $[M+2]^+$, $[M+4]^+$ для ізомерів ПХБ з m/z : три- – 256 (1а), 258 (1б), 260

(1в); тетра- – 290 (2а), 292 (2б), 294 (2в); пента- – 324 (3а), 326 (3б), 328 (3в); гекса- – 358 (4а), 360 (4б), 362 (4в); гепта- – 392 (5а), 394 (5б), 396 (5в); октахлор- – 426 (6а), 428 (6б), 430 (6в); 1–6 – часові вікна, в котрих ідентифіковані відповідно три- – октахлорбіфеніли в калібрувальних сумішах.

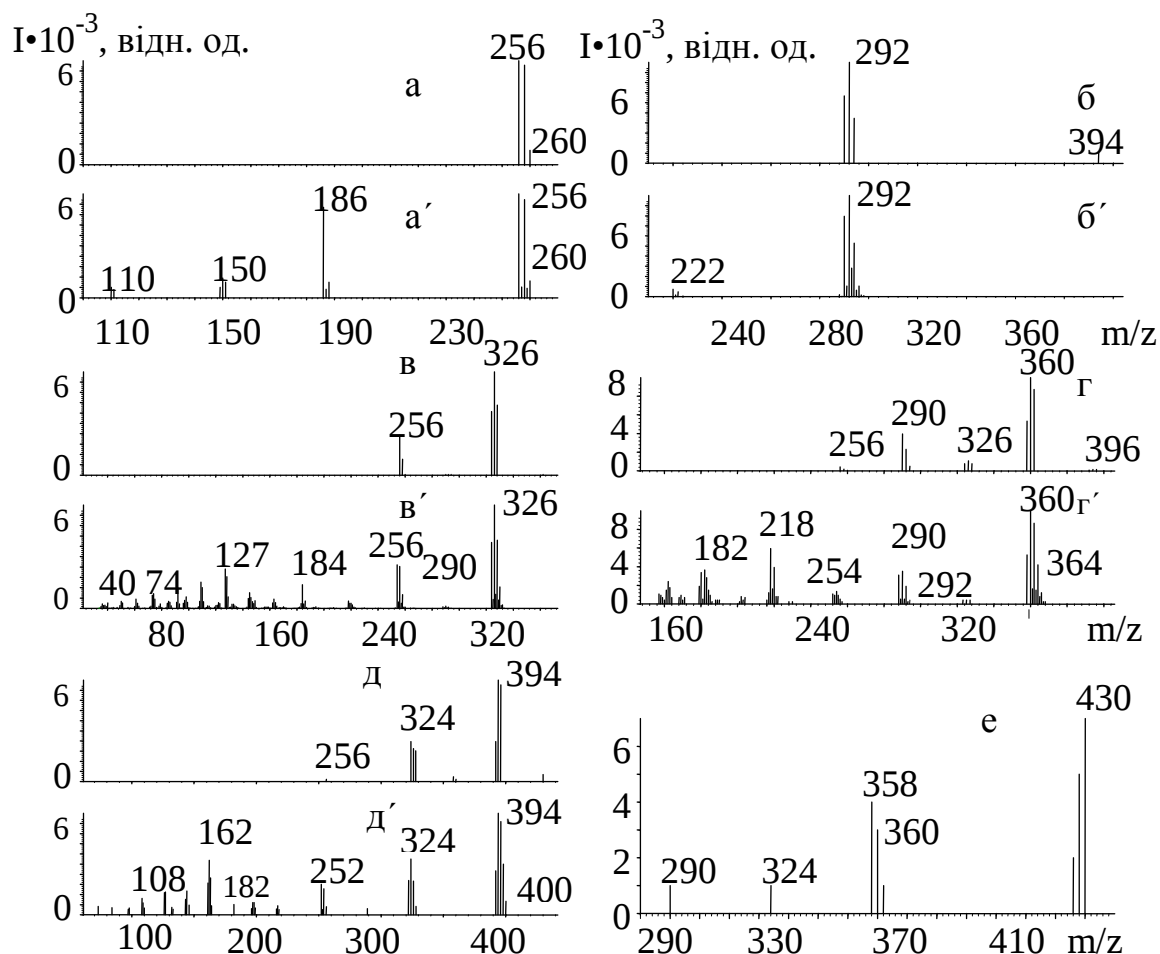


Рис. 6. Мас-спектри ізомерів ПХБ із хроматограм зразків гідробіонтів (режим SIM): а – три-, б – тетра-, в – пента-, г – гекса-, д – гепта-, е – октахлорбіфеніли і мас-спектри (а', б', в', г' і д') цих же сполук із бібліотеки Wiley 275. Ступінь відповідності: три- – 74, тетра- – 93, пента- – 93, гекса- – 91 і гепта- – 95 %. Для октахлорбіфенілів відповідні спектри у бібліотеці Wiley 275 не знайдені.

ХОП і ПХБ ідентифіковані у зразках м'язової тканини риб за часом їх утримування на мас-хроматограмах (реконструйованих хроматограмах) за характеристичними іонами, а також за мас-спектрами в режимі SIM. Для всіх сполук, крім октахлорбіфенілів, отримані результати пошуку збігаються з високою імовірністю (74–95 %). Співвідношення іонів M^+ , $[M+2]^+$, $[M+4]^+$ мас-спектрів ПХБ з хроматограм реальних зразків відповідають теоретично розрахованим для всіх ізомерів, включаючи октахлорбіфеніли.

Концентрації ХОП, ПХБ та ізомерно-специфічний склад ПХБ у зразках гідробіонтів басейну р. Дніпро представлені у табл. 1. Найбільш токсичними для ссавців є тетра-, пента- і гексахлорбіфеніли. Із наведених даних щодо ізомерно-специфічного складу ПХБ видно, що у найбільших концентраціях у всіх зразках гідробіонтів містяться ПХБ з числом атомів хлору $Cl_n=5-6$. Для 11 і 15 зразків

побудовані діаграми концентрацій ПХБ з $Cl_n=4-7$ (рис. 7). Тетра- і гептахлорбіфеніли знаходяться у нижчих концентраціях, ніж пента- і гексахлорбіфеніли. Рівні вмісту тетра- і гептахлорізомерів знаходяться в інтервалах 4,0–13,5 і 3,4–16,1 %, що в середньому відповідно становить 7,4 і 7,8 % від загальної суми ПХБ. Низькі концентрації три- і октахлорбіфенілів у порівнянні з іншими ПХБ ідентифіковані тільки у зразках з високими концентраціями ПХБ. Концентрації цих сполук не визначали.

Таблиця 1. – Концентрації ХОП, ПХБ і ізомерно-специфічний склад ПХБ у зразках м'язової тканини риб.

№ зразка	Концентрація ХОП і ПХБ				Концентрація ізомерів ПХБ			
	4,4'-ДДЕ	ДДД ^{3*}	4,4'-ДДТ	ПХБ	Тетра-	Пента-	Гекса-	Гепта-
	мкг/кг маси вологої речовини							
1	528	736	135	2300	135	948	1 012	205
2	145	171	121	1520	121	618	657	124
3	64	59	38	961	38	465	405	53
4	134	421	412	6482	412	2 601	2 998	471
5	50	71	46	355	46	160	149	0
6	65	87	52	434	52	184	198	0
7	203	245	202	4 812	202	1 683	2 152	775
8	296	289	166	3 752	166	1 387	1 813	386
9 ^{1*}	200	240	234	2 336	234	1 011	987	104
10	445	461	186	1 373	186	797	343	47
11 ^{1*, 2*}	1 595	2 410	914	13 486	914	5 389	6 072	1 111
12	93	68	69	1 443	69	601	647	126
14	196	213	111	1 304	111	538	564	91
15 ^{1*}	1 260	1 489	348	6 109	348	2 409	2 898	454
16	238	73	38	960	38	465	404	53

Ідентифіковані: ^{1*} – трихлорбіфеніли; ^{2*} – октахлорбіфеніли; ^{3*} – сума 2,4'- + 4,4'-ДДД

$C_{ПХБ}$, мкг/кг маси вологої речовини $C_{ПХБ}$, мкг/кг маси вологої речовини

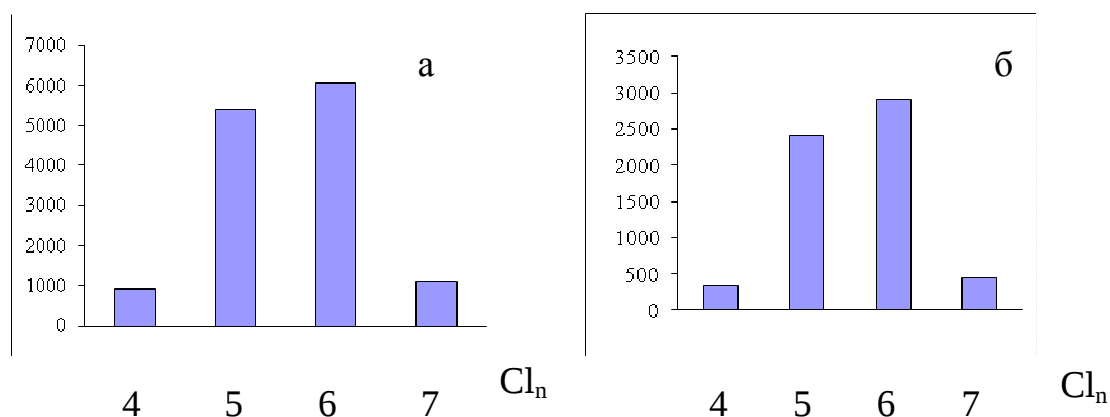


Рис. 7. Ізомерно-специфічний склад ПХБ з $Cl_n=4-7$ для зразків 11 (а) і 15 (б).

Препаративне виділення і визначення копланарних поліхлорованих біфенілів у тканинах гідробіонтів басейну р. Дніпро методом хромато-мас-спектрометрії (розділ 5). Копланарні ПХБ (рис. 8) містяться у гідробіонтах у малих кількостях порівняно з іншими ізомерами ПХБ, тому вони не можуть бути надійно ідентифіковані та визначені методом ГХ/МС без препаративного виділення. Виділення копланарних ПХБ на прикладі модельних сумішей Aroclor і зразків м'язової тканини риб проводили методом мікропрепаративної обернено-фазної ВЕРХ на колонці C_{18} у дві стадії: 1) групове відокремлення фракції, що містить усі ПХБ, від баластних речовин жирової тканини; 2) селективне виділення фракцій копланарних ПХБ, що не містять ПХБ, які заважають визначенню.

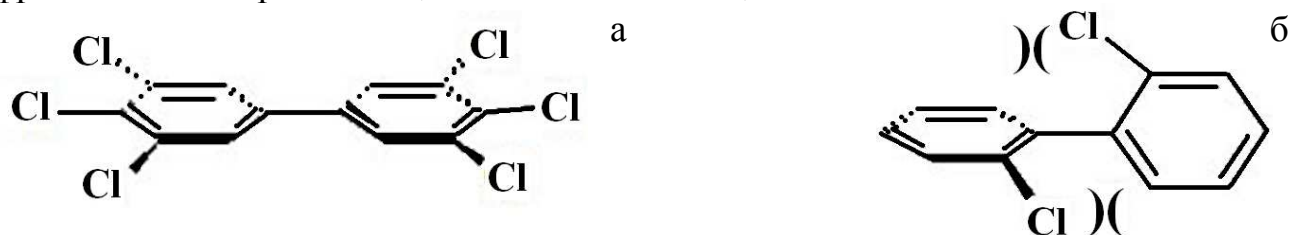


Рис. 8. Структурні формули копланарного (а) і некопланарного ПХБ (б).

Препаративне виділення копланарних біфенілів. Проведено вибір хроматографічної системи та умов виділення копланарних ПХБ із суміші ПХБ, при яких досягається: 1) адекватний ступінь очищення цільових сполук; 2) висока швидкість виділення; 3) мала витрата розчинників; 4) простота виконання.

Хроматограми копланарних ПХБ, накладені на хроматограми суміші Aroclor 1221, 1242, 1254, представлені на рис. 9. На хроматограмах суміші цих сполук (єлювання ПХБ відбувається у вигляді одного піку або групи нерозділених піків) проводили спільну базову лінію для усіх піків. У точці початку виходу першого компоненту на хроматограмі суміші 12 копланарних ПХБ хроматограму ділили на дві частини. Розраховували співвідношення сумарної площі піків лівої частини хроматограми до правої, отримуючи коефіцієнт α , за допомогою якого оцінювали ступінь перекривання виходу цільових і нецільових сполук на різних колонках. Чим більший цей коефіцієнт, тим краще відокремлення копланарних ПХБ від некопланарних. Для колонки з прищепленою функціональною групою отримані наступні значення α : CN – 0; C_8 – 0,757; C_{18} – 2,195; Phenyl – 0,421; PАН – 2,395.

На колонках з групами CN (рис. 9, а) і C_8 (рис. 9, б) розділення відбувається незадовільно через недостатнє утримування. На колонці C_{18} (рис. 9, в) внаслідок довшого вуглеводневого ланцюга досягається задовільне утримування ПХБ. На колонці з групою Phenyl (рис. 9, г) $\alpha=0,421$. Дана нерухома фаза внаслідок π - π -взаємодії бензольних кілець краще взаємодіє з ПХБ, але механізм цієї взаємодії не дозволяє повністю відокремити копланарні ПХБ від некопланарних. На колонці з групою PАН (рис. 9, д) отримано найвище значення $\alpha=2,395$. Окрім π - π -взаємодій, на відміну від колонки з групою Phenyl, виникають стеричні труднощі для ПХБ з непласкою геометрією молекули (рис. 8), внаслідок меншої площі контакту сорбату з плоскими молекулами прищепленої функціональної групи.

Для розробки методики препаративного виділення копланарних ПХБ обрані

колонки РАН ($\alpha=2,395$) і C_{18} ($\alpha=2,195$), на яких у найменшій мірі перекривалися області елюювання копланарних ПХБ з сумішшю Aroclor. Для встановлення характеристики утримування сполук, незалежної від розмірів колонки і швидкості елюента, для колонок C_{18} і РАН визначили коефіцієнти ємності для кожного з 12 копланарних ПХБ (табл. 2). При хроматографуванні їх модельних розчинів визначали часи утримування аналітів і мертвого об'єму системи. Коефіцієнти ємності розраховували за формулою: $k' = (t_R - t_0)/t_0$, де: t_0 , t_R – часи утримування неутримуваної та утримуваної сполук.

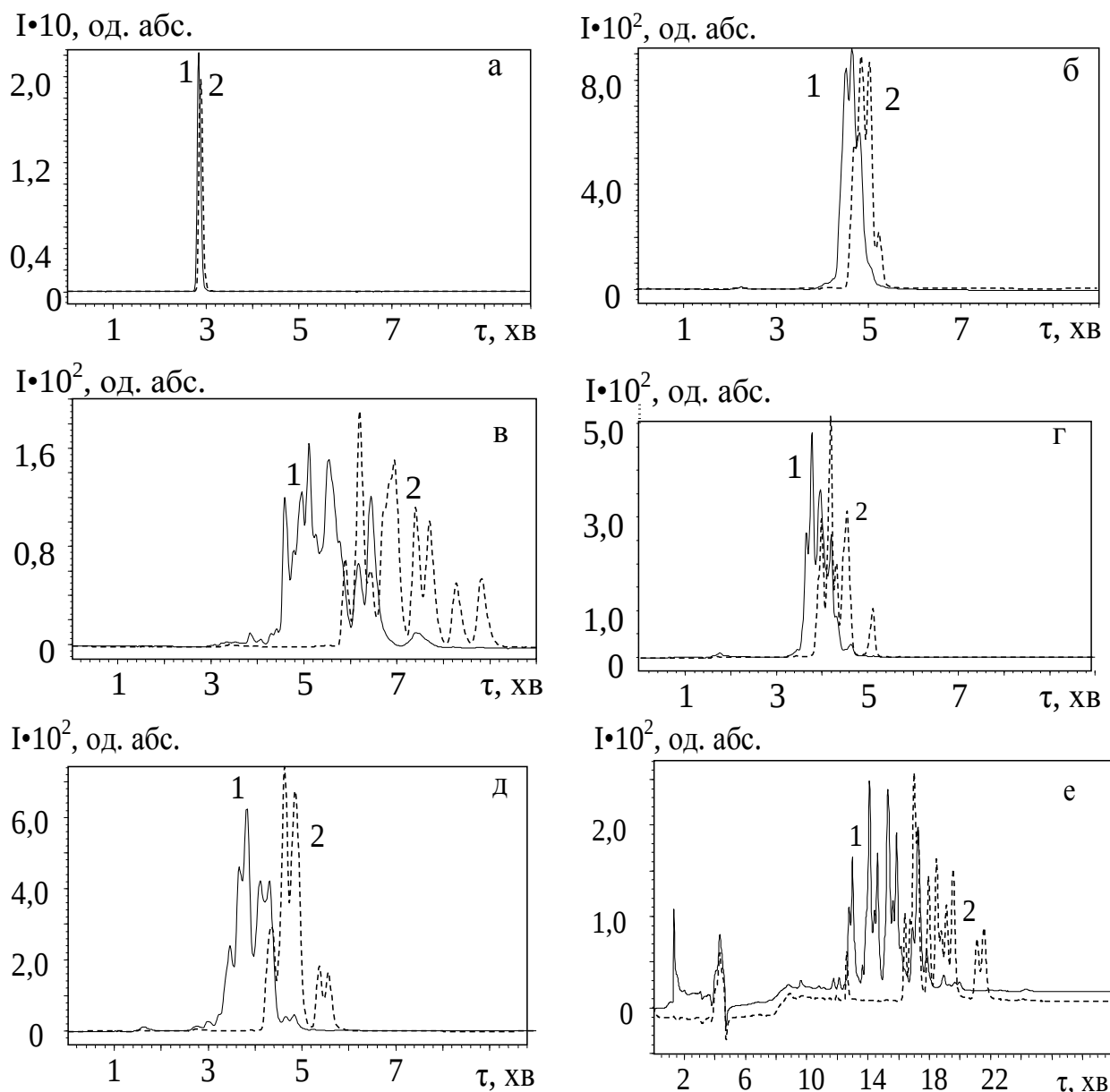


Рис. 9. Хроматограми суміші Aroclor 1221, 1242, 1254 (1), накладені на хроматограми суміші 12 копланарних ПХБ (2), на різних хроматографічних колонках в ізократичних умовах (а–д) і в режимі лінійного градієнту (е). Колонки: а – CN, б – C_8 , в – C_{18} , г – Phenyl, д, е – РАН.

Із експериментального матеріалу визначення k' випливає: 1) дані сполуки по-різному утримуються на РАН і C_{18} (черговість елюювання відповідає

порядковому номеру, наведеному у дужках і суттєво відрізняється); 2) загальна закономірність приблизно однакова – спочатку елююються ПХБ з меншим ступенем хлорування, потім – з більшим. Нерухома фаза РАН утворена, в основному, молекулами, що містять чотири бензольних кільця, орієнтованих в одній площині. Певний внесок в утримування сполук вносить стеричне розпізнавання (π - π -взаємодія). При помірній полярності рухомої фази, між молекулами ПХБ і прищепленою нерухомою фазою встановлюється міграційна рівновага. При цьому, незалежно від полярності молекули, копланарні ПХБ більш глибоко проникають в прищеплений шар і сильніше з ним взаємодіють, ніж ті молекули ПХБ, у яких бензольні кільця орієнтовані в різних площинах. Цим можна пояснити великі часи утримування копланарних ПХБ на колонці РАН порівняно з ізомерами з тією ж кількістю атомів хлору, що входять до складу сумішей Aroclor.

Таблиця 2. – Коефіцієнти ємності копланарних ПХБ на колонках РАН і C_{18} в ізократичних умовах хроматографування. Рухома фаза – метанол.

ПХБ	Коефіцієнт ємності, k'			
	РАН		C_{18}	
3,4,4',5-тетрахлор	2,32	(6)	2,29	(3)
3,3',4,4'-тетрахлор	2,13	(3)	2,09	(1)
2',3,4,4',5-пентахлор	2,16	(4)	2,57	(6)
2,3,4,4',5-пентахлор	2,26	(5)	2,49	(5)
2,3',4,4',5-пентахлор	2,00	(2)	2,35	(4)
2,3,3',4,4'-пентахлор	1,97	(1)	2,19	(2)
3,3',4,4',5-пентахлор	2,52	(10)	2,62	(7)
2,3',4,4',5,5'-гексахлор	2,36	(8, 9)	2,98	(10)
2,3,3',4,4',5'-гексахлор	2,35	(7)	2,80	(8)
3,3',4,4',5,5'-гексахлор	3,01	(12)	3,31	(11)
2,3,3',4,4',5-гексахлор	2,36	(8, 9)	2,82	(9)
2,3,3',4,4',5,5'-гептахлор	2,72	(11)	3,51	(12)

Для успішного виділення копланарних ПХБ, полярність рухомої фази повинна бути досить помірною для прояву ефекту вибіркового утримування плоских молекул, але не надто слабкою, оскільки розділення може бути недостатнім через надмірну елюотропну силу рухомої фази. На обернено-фазних колонках добре відокремлюються моно-, ди- і трихлорізомери ПХБ, які не заважають визначенню копланарних ПХБ методом ГХ/МС.

Тому для оцінки ступеню виділення копланарних ПХБ вибрали суміш Aroclor 1254, що складається переважно з тетра-, пента-, гекса- і гептахлорізомерів ПХБ, які заважають визначенню копланарних ізомерів. На хроматограмах суміші Aroclor 1254, отриманих на колонках C_{18} (рис. 10, а) і РАН (рис. 10, б) позначили 12 точок, що відповідають початку виходу кожного із 12 копланарних ПХБ (на колонці РАН деякі точки співпадають). Таким чином, при перемиканні потоку елюенту в пробовідбірник в означений на хроматограмах момент часу досягається повне потрапляння даної сполуки у цільову фракцію.

Щоб оцінити ступінь очищення копланарних ПХБ від суміші Aroclor 1254, для всіх піків на хроматограмі проводили спільну базову лінію і інтегрували як один пік, площу якого приймали за 100 %. У точці, в якій слід почати збирати фракцію певного копланарного ПХБ (або групи ПХБ), хроматограму ділили на дві частини. Площа половини хроматограми, що знаходиться зліва служить

кількісною мірою частини суміші Aroclor 1254, від якої вдалося очистити зразок, та, що знаходиться праворуч – еквівалентна тій кількості ПХБ, яка потрапить у зразок разом з копланарними ПХБ. Припустивши, що всі ізомери ПХБ однаково поглинають світло при $\lambda=250$ нм, отримуємо ступінь очищення цільових сполук нормалізацією площ двох частин хроматограми. При препаративному виділенні фракції копланарних ПХБ можна відокремити групу сполук, що складається з різного числа ізомерів. Чим менше число ізомерів виділяють, тим менше до неї потрапляє некопланарних ізомерів, що заважають визначенню копланарних ПХБ. Ступені очищення копланарних ПХБ при виділенні на колонках C_{18} і РАН представлені у табл. 3.

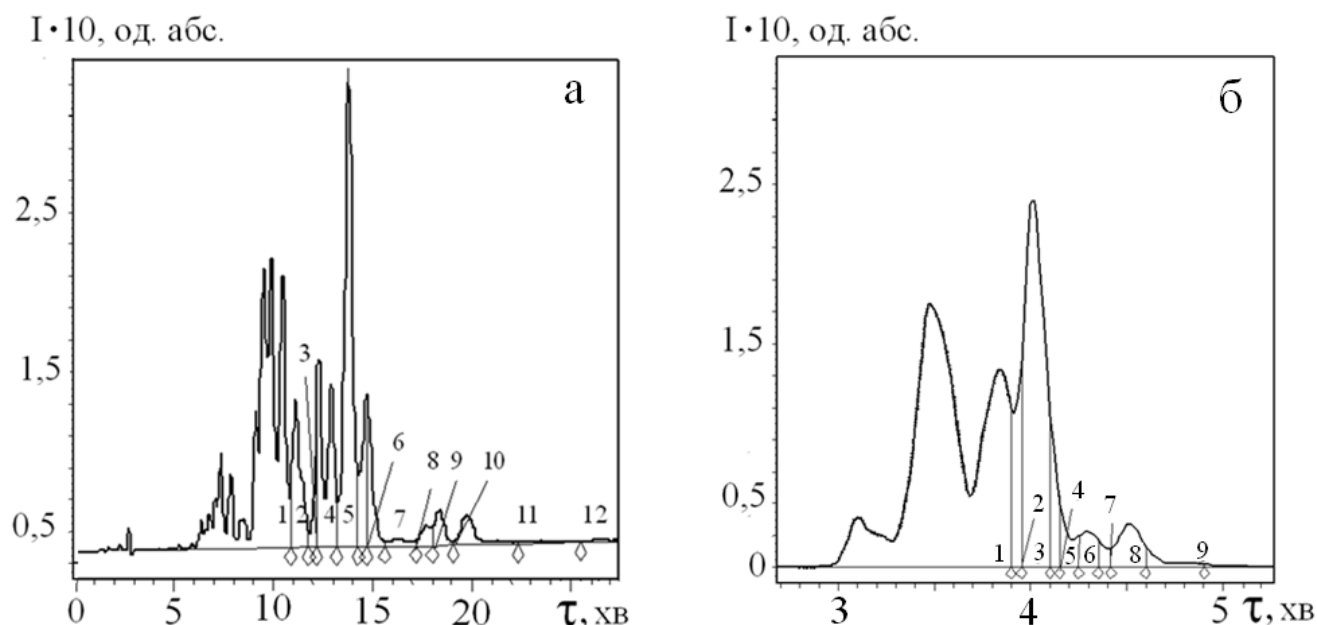


Рис. 10. На хроматограмах суміші Aroclor 1254 відмічені місця початку виходу кожного із 12 копланарних ПХБ на колонках з прищепленими групами C_{18} (а) (позначено цифрами 1–12) і РАН (б) (позначено цифрами 1–9).

Різниця між цільовими і баластними сполуками полягає в геометричній будові молекули, і саме це покладено в основу їх розділення: нерухома фаза розпізнає плоскі молекули і взаємодіє з ними сильніше, ніж з іншими. Внаслідок цього копланарні тетрахлорізомери утримуються довше, ніж некопланарні тетрахлор-, пентахлор- і деякі гексахлор- і гептахлорбіфеніли. Такого розділення достатньо для їхнього надійного визначення методом ГХ/МС. Найбільш токсичними для людини і ссавців є 3,3',4,4',5-пентахлор- і 3,3',4,4',5,5'-гексахлорбіфеніл (TEQ – 0,1 і 0,01 відповідно), для птахів – 3,4,4',5-тетрахлор-, 3,3',4,4'-тетрахлор- і 3,3',4,4',5-пентахлорбіфеніл (TEQ – 0,1, 0,05 і 0,1 відповідно). На колонці РАН можна виділити 10 з 12 копланарних ПХБ (включаючи всі не *орто*-заміщені ізомери) зі ступенем очищення від суміші Aroclor 1254 – 88 %.

Такий ступінь очищення дозволяє надійно ідентифікувати методом ГХ/МС усі 10 сполук у зразках м'язової тканини риб з р. Дніпро. Якщо ізомерно-специфічний склад реальних зразків такий, що у суміші присутні ізомери, що заважають визначенню, фракцію копланарних ПХБ можна розбити на дві частини

і кожен аналізувати методом ГХ/МС окремо.

З огляду на характер зразків (слідові кількості ПХБ, висока стійкість цільових сполук до фізико-хімічних впливів, поглинання світла в УФ-діапазоні, близькість фізико-хімічних властивостей цільових і баластних сполук), як інструмент для підготовки зразків обрана ВЕРХ в аналітичному масштабі. Це дало можливість розробити методику виділення мікрокількостей копланарних ПХБ з цілим рядом переваг, якими володіють сучасні високоефективні методи розділення перед виділенням на колонках низького тиску.

Таблиця 3. – Ступені очищення копланарних ПХБ від суміші Aroclor 1254 при препаративному виділенні на колонках РАН і C₁₈ і кількість ізомерів, відкривання яких у фракції складає 100 % ¹

Ізомер ПХБ	РАН		C ₁₈	
	Ступінь очищення, %	Кількість ізомерів ¹	Ступінь очищення, %	Кількість ізомерів ¹
3,4,4',5-тетрахлор	94,8	7	50,4	10
3,3',4,4'-тетрахлор	88,0	10	41,4	12
2',3,4,4',5-пентахлор	90,9	9	87,5	7
2,3,4,4',5-пентахлор	92,9	8	83,2	8
2,3',4,4',5-пентахлор	63,6	11	62,0	9
2,3,3',4,4'-пентахлор	58,9	12	48,8	11
3,3',4,4',5-пентахлор	98,9	3	92,8	6
2,3',4,4',5,5'-гексахлор	95,4	6	96,6	3
2,3,3',4,4',5'-гексахлор	95,4	6	93,4	5
3,3',4,4',5,5'-гексахлор	100,0	1	99,2	2
2,3,3',4,4',5-гексахлор	95,4	6	94,5	4
2,3,3',4,4',5,5'-гептахлор	99,9	2	99,6	1

Примітка. ¹ У фракцію копланарних ПХБ, разом із вибраним ізомером, можна збирати всі інші копланарні ізомери, ступінь очищення котрих рівний або вищий за ступінь очищення вибраного ізомеру. Наприклад, якщо на колонці РАН виділяти 3,3',4,4',5-пентахлорбіфеніл, у фракцію можна зібрати ще 2,3,3',4,4',5,5'-гептахлор- і 3,3',4,4',5,5'-гексахлорбіфеніл, причому ступінь очищення фракції буде дорівнювати 98,9 %.

Розроблено методику швидкого (1 хроматограма займає 6 хв) виділення копланарних ПХБ із суміші ПХБ на обернено-фазній колонці з прищепленими ПАВ. Одночасно з виділенням фракції копланарних ПХБ, відбувається очищення зразка від залишків баластних речовин, що присутні після мінералізації та попередньої хроматографічної очистки на колонці C₁₈. Підібрано оптимальну рухому фазу для виділення – метанол (або метанол з додаванням невеликої кількості води або неполярного органічного модифікатора, наприклад, метиленхлориду), який пропускає УФ-світло, підходить за полярністю, об'єм фракції копланарних ПХБ становить 1 см³/цикл і легко випарюється. Метод не вимагає великих витрат органічних розчинників (на 1 цикл використовується 5 см³ метанолу), простий у виконанні – можна детектувати елювання сполук у режимі он-лайн і легко оптимізувати умови виділення, встановити відсоток

попадання кожної цільової сполуки за сигналом УФ-детектора (не потрібно аналізувати кожену фракцію методом ГХ/МС). Використання сучасного обладнання дозволяє повністю автоматизувати цей етап підготовки зразків. Даний метод має високу продуктивність – можливість підготувати до визначення методом ГХ/МС зразок копланарних ПХБ за 20–25 хв. У всіх досліджених зразках м'язової тканини риб методом ГХ/МС ідентифіковані копланарні ПХБ, визначені їх концентрації і розраховані вклади кожного з них у загальну токсичність для людини в еквіваленті токсичності 2,3,7,8-тетрахлордibenзо-*n*-діоксину (2,3,7,8-ТХДД) (рис. 11, табл. 4).

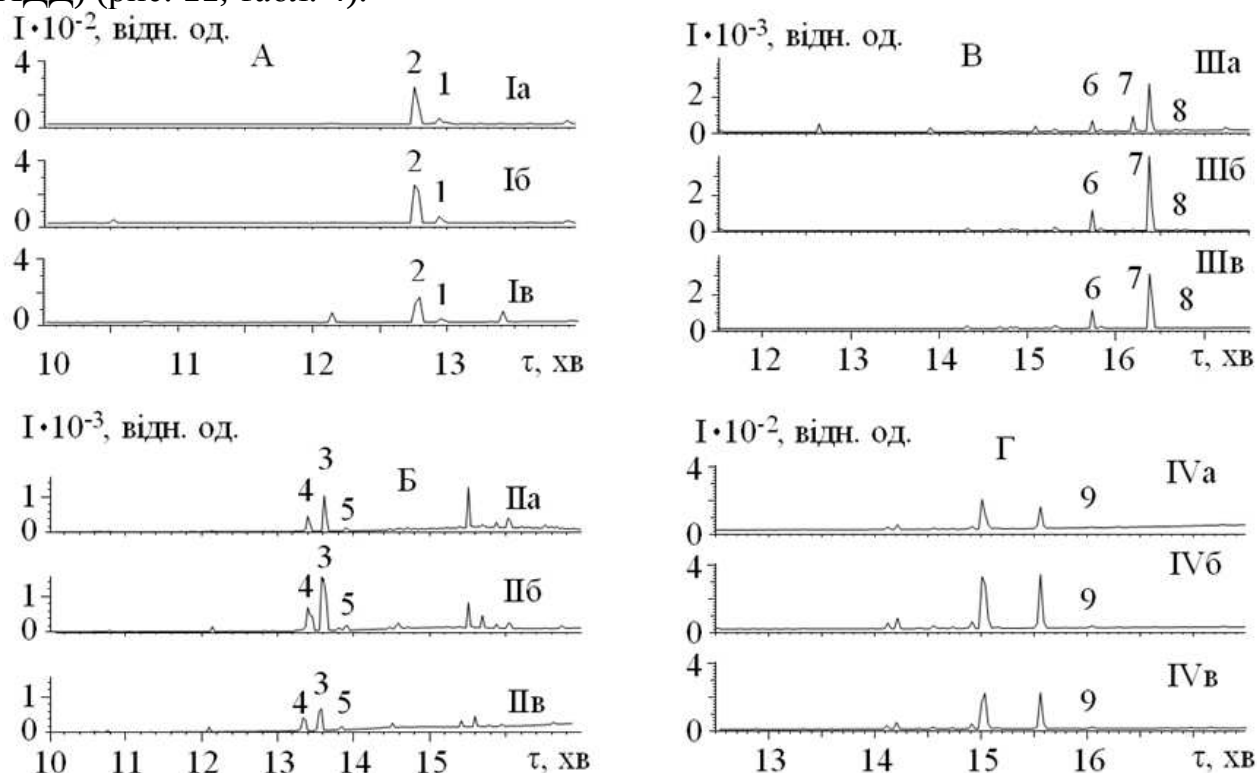


Рис. 11. Реконструйовані хроматограми зразка 11 м'язової тканини риби після препаративного виділення копланарних ПХБ (А, Б, В, Г) за іонами M^+ , $[M+2]^+$, $[M+4]^+$ з m/z 290 (Ia), 292 (Iб), 294 (Iв) тетра-; 324 (IIa), 326 (IIб), 328 (IIв) пента-; 358 (IIIa), 360 (IIIб), 362 (IIIв) гекса-; 392 (IVa), 394 (IVб), 396 (IVв) гепта-; I–IV – часові вікна, в котрих ідентифіковані відповідно тетра- – гексахлорбіфеніли у стандартних сумішах ПХБ; 1–9 – позначення копланарних ПХБ (табл. 5).

Таблиця 4. Загальні концентрації ПХБ ($C_{\text{ПХБ заг}}$) та копланарних ПХБ ($C_{\text{ПХБ копл}}$) у зразках тканини риб і їх токсичність для людини у еквіваленті 2,3,7,8-ТХДД

Зразок	Концентрація		TEQ
	С _{ПХБ заг}	С _{ПХБ копл}	
	мкг/кг		нг/кг
	маси вологої речовини		
1	2300	55	0,04

Для всіх зразків отримані дані щодо концентрації та внеску в загальну токсичність в діоксиновому еквіваленті індивідуальних копланарних ПХБ ($C_{\text{ПХБ копл}}$). В найбільшій концентрації міститься 3,3',4,4'-тетрахлорбіфеніл. Незважаючи на невисоку концентрацію, найбільший внесок у загальну токсичність вносить 3,3',4,4',5-пентахлорбіфеніл через високий фактор

4	5482	78	0,10
7	4812	83	0,09
8	3752	74	0,07
9	2336	53	0,05
11	13486	220	0,24
15	6109	103	0,11

еквівалентної токсичності (0,1). Ізомерні сполуки – 3,3',4,4',5,5'-гекса- і 2,3,3',4,4',5,5'-гептахлорбіфеніли містяться у низьких концентраціях і не виявлені у деяких зразках, внесок у токсичність першої з них відчутний навіть у

малій концентрації через високий коефіцієнт (0,01), а другої – мізерно малий.

Біодоступність хлорорганічних пестицидів і поліхлорованих біфенілів для гідробіонтів басейну р. Дніпро (розділ 6). Для оцінки біодоступності ХОП і ПХБ використовували зразки м'язової тканини риб, відловлених у басейні р. Дніпро у 2003, 2011 і 2012 рр. Отримані рівні вмісту ХОП і ПХБ у природній воді і біоматеріалі були використані для оцінки біодоступності цих сполук. Табл. 6 представляє перевищення CTL (Critical Tissue Level) і BCF (Bioconcentration factor, $\text{дм}^3/\text{кг}$) 4,4'-ДДЕ, 4,4'-ДДД, 4,4'-ДДТ і ПХБ в м'язових тканинах риб, що були розраховані з даних концентрацій 4,4'-ДДЕ, 4,4'-ДДД, 4,4'-ДДТ та загальної концентрації ПХБ у воді. BCF дорівнює концентрації речовини у м'язових тканинах риби в мг/кг маси вологої речовини поділений на концентрацію речовини у воді (мг/дм^3), в якій організм перебував. Одержані наступні значення BCFs для м'язів ($\text{дм}^3/\text{кг}$): 4,4'-ДДЕ – $5,0 \cdot 10^4$ – $4,5 \cdot 10^6$, 4,4'-ДДД – $1,0 \cdot 10^4$ – $2,6 \cdot 10^6$, 4,4'-ДДТ – $1,0 \cdot 10^4$ – $2,4 \cdot 10^5$ і ПХБ – $1,0 \cdot 10^4$ – $7,0 \cdot 10^5$. Допустимими вважаються наступні рівні BCFs для тканин прісноводних риб: для 4,4'-ДДЕ, 4,4'-ДДД, 4,4'-ДДТ – 54000, суми ПХБ – 31000.

Таблиця 5. Перевищення критичного рівня і фактор біоконцентрування для м'язових тканин риби для 4,4'-ДДТ та його метаболітів і суми ПХБ згідно з результатами дослідження восени 2011 (¹) та навесні 2012 рр. (²), р. Дніпро.

Сполука	Зразки риби									Інтервал значень
	1-1 ²	1-2 ²	2-1 ²	2-2 ²	3-1 ²	4-1 ²	5-1 ²	5-2 ²	3-1 ¹	
C _{4,4'-ДДТ і метаболіти, ПХБ сума} / CTL										
4,4'-ДДЕ	0,7	0,6	2,0	3,3	1,7	5,6	43,0	48,0	3,3	0,6–48,0
4,4'-ДДД	6,5	20,0	5,6	12,0	11,0	8,2	111,0	72,0	0,2	0,2–111
4,4'-ДДТ	1,3	5,7	2,4	4,1	5,4	6,3	22,0	16,0	0,7	0,7–22,0
Сума ПХБ	4,0	10,0	8,4	8,8	7,7	8,1	26,0	14,0	0,4	0,4–26,0
BCF _{4,4'-ДДТ і метаболіти, ПХБ сума} •10 ⁻⁵ , дм ³ /кг										
4,4'-ДДЕ	0,7	0,5	1,9	3,1	1,6	5,2	40	45	3,1	0,5–45,0
4,4'-ДДД	1,5	4,5	1,3	2,8	2,5	1,9	26	17	0,1	0,1–26,0
4,4'-ДДТ	0,1	0,6	0,3	0,5	0,6	0,7	2,4	1,7	0,1	0,1–2,4
Сума ПХБ	1,1	2,7	2,3	2,4	2,1	2,2	7,0	3,7	0,1	0,1–7,0

Перевищення CTLs і BCFs для м'язових тканин риби для 4,4'-ДДТ та його метаболітів і суми ПХБ згідно з результатами дослідження восени 2003 р. в річках Дніпро та Десна відповідно складають 1,0–44,6 і 0,8–8,5, і $(0,1–35,9) \cdot 10^5$ і $(0,2–33,0) \cdot 10^5$ дм³/кг та восени 2011 і навесні 2012 рр. у р. Дніпро – 0,2–111,0 і $(0,1–45,0) \cdot 10^5$ дм³/кг. Більш низькі значення CTLs і BCFs для м'язових тканин риб отримані для притоків р. Дніпро, відповідно 1,1–27,6 і $(0,1–24,1) \cdot 10^5$ дм³/кг.

ВИСНОВКИ

У роботі вирішено науково-методологічну проблему дослідження групи ОЛОС, що включає хімічний аналіз і моніторинг ХОП і ПХБ у гідробіонтах. Використано раціональні методи пробопідготовки і сучасні хроматографічні і хромато-мас-спектрометричні методи аналізу – ГХ/ЕЗД, ВЕРХ з УФ/Вид-детектуванням, ГХ/МС із мас-селективним детектуванням у режимах SCAN і SIM, що дозволяє оцінити токсикологічний стан гідробіонтів басейну р. Дніпро.

1. Вперше розроблено методологію дослідження ХОП і ПХБ (ізомерно-специфічний склад та копланарні ПХБ) у гідробіонтах басейну р. Дніпро, яка направлена на виділення, концентрування, ідентифікацію і визначення цих сполук на рівні наноконцентрацій методами ГХ/ЕЗД, ГХ/МС, що дозволило надійно проводити хімічний моніторинг цих токсичних сполук.

2. Обгрунтовано необхідність реалізації раціонального поєднання процедур пробопідготовки для виділення методом прискореної рідинної екстракції (ПРЕ), очистки, концентрування отриманих екстрактів та режимів хроматографічного розділення складних сумішей, мас-селективного детектування, способів ідентифікації і завершального хроматографічного і хромато-мас-спектрометричного (метод ГХ/МС при ЕІ по повному іонному струму в режимах SCAN і SIM) визначення мікрокількостей ХОП і ПХБ в гідробіонтах. При цьому досягнуто підвищення чутливості і селективності аналітичного сигналу визначуваних органічних сполук на 2 порядки.

3. На основі комплексу розроблених методик створено, апробовано і застосовано схему визначення і моніторингу ХОП і ПХБ у гідробіонтах методами ГХ/ЕЗД, мікропрепаративної ВЕРХ, ГХ/МС. Встановлено рівні вмісту цих токсикантів і простежено закономірності їх зміни в гідробіонтах.

4. Вирішено цільове завдання ідентифікації та кількісного визначення ХОП і ПХБ (загального вмісту, ізомерно-специфічного складу і вмісту копланарних ізомерів) у гідробіонтах методом ГХ/МС у режимі SIM на рівні 10 мкг/кг маси вологої речовини.

5. Встановлено закономірності зміни рівнів вмісту ХОП і ПХБ у гідробіонтах басейну р. Дніпро відносно TEQ за результатами моніторингу з метою оцінки їх токсичності. Оцінено токсичність гідробіонтів.

6. Оцінено біодоступність ХОП (4,4'-ДДТ та його метаболітів) і суми ПХБ для гідробіонтів басейну р. Дніпро відносно перевищення критичного рівня (CTL,

Critical Tissue Level) і фактору біоконцентрування (BCF, Bioconcentration Factor) за результатами дослідження у 2003 р. та 2011–2012 рр.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Скринник М.М.** Препаративное выделение хлорорганических пестицидов, полихлорированных бифенилов и диоксинов из экстрактов биоты для определения методом газовой хроматографии/масс-спектрометрии / М.М. Скринник, М.В. Милюкин // Методы и объекты химического анализа. – 2006, Т. 1, № 2. – С. 152–158.

2. **Скринник М.М.** Определение хлорорганических пестицидов и полихлорированных бифенилов в биоте бассейна Днестра методом газовой хроматографии/масс-спектрометрии / М.М. Скринник, М.В. Милюкин // Укр. хим. журн. – 2007. – Т. 73, № 10. – С. 105–109.

3. **Скринник М.М.** Препаративное выделение копланарных полихлорированных бифенилов для определения методом газовой хроматографии/масс-спектрометрии / М.М. Скринник, М.В. Милюкин // Укр. хим. журн. – 2007. – Т. 73, № 12. – С. 97–104.

4. **Скринник М.М.** Определение копланарных полихлорированных бифенилов в биоте бассейна Днестра методом газовой хроматографии/масс-спектрометрии / М.М. Скринник, М.В. Милюкин // Укр. хим. журн. – 2010. – Т. 76, № 7. – С. 65–69.

5. **Скринник М.М.** Ускоренная жидкофазная экстракция липидной фракции из биоты / М.М. Скринник, М.В. Милюкин // Методы и объекты химического анализа. – 2013. – Т. 9, № 1. – С. 28–38.

6. Милюкин М. Концентрирование хлорорганических пестицидов и полихлорированных бифенилов на носителе гуминовых и фульвокислотах из водных растворов пористыми полимерными сорбентами / М. Милюкин, **М. Скринник**, М. Горбань // Науковий вісник Східноєвропейського університету імені Лесі Українки. Серія: Хімічні науки. – 2014. – № 20 (297). – С. 14–25.

[1–6] Особистий внесок автора полягає в участі загальній постановці задач, проведенні хроматографічних і хромато-мас-спектрометричних досліджень, трактуванні, узагальненні отриманих результатів та написанні статей.

7. Milyukin M.V. Identification and determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in waters and sediments of Dnieper river basin by GC/ECD and GC/MS / M.V. Milyukin, **M.M. Skrynnyk** // 2nd Intern. Conf. “Interfaces against pollution”. Miskolc, May 27–30, 2002: abstracts. – Miskolc, 2002. – P. 90.

8. **Скринник М.М.** Ускоренное определение персистентных хлорорганических пестицидов, полихлорированных бифенилов в биоте бассейна р. Днепр методом хромато-масс-спектрометрии / М.М. Скринник, М.В. Милюкин // Междунар. форум “Аналитика и Аналитики”: В 2-х т. Воронеж, 2–6 июня 2003 г.: каталог рефератов и статей. – Воронеж, 2003. – Т. 2. – С. 347.

9. **Скринник М.М.** Выделение полихлорированных бифенилов и хлорорганических пестицидов из мышечной ткани рыб для хромато-масс-спектрометрического (ГХ-МС) анализа / М.М. Скринник, М.В. Милюкин // Друга міжнар. конф. “Чистота довкілля в нашому місті”. Трускавець, 25–28 травня 2004 р.: збірник праць. – Київ, 2004. – С. 46–48.

10. **Skrynnyk M.M.** Evaluation of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides content in fish tissue of Dnieper river basin by GC/MS / M.M. Skrynnyk, M.V. Milyukin // Intern. Conf. “Analytical Chemistry and Chemical Analysis” devoted to 100 anniversary of A. Babko. Kyiv, September 12–18, 2005: book of abstracts. – Kyiv, 2005. – P. 235.

11. **Скринник М.М.** Препаративное выделение и определение копланарных полихлорированных бифенилов из мышечной ткани рыбы методом хромато-масс-спектрометрии / М.М. Скринник, М.В. Милюкин // III Междунар. конф. “Экстракция органических соединений”. Воронеж, 17–21 октября 2005 г.: каталог докладов. – Воронеж, 2005. – С. 314.

12. **Скринник М.М.** Идентификация и определение хлорорганических пестицидов и полихлорированных бифенилов в мышечных тканях рыб методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии / М.М. Скринник, М.В. Милюкин // Наук. конф. “Аналітичний контроль якості та безпеки продукції промислового виробництва і продовольчої сировини”. Одеса, 22–26 травня 2006 р.: тези доп. – Одеса, 2006. – С. 71.

13. **Скринник М.М.** Определение дибензо-*n*-диоксинов и копланарных полихлорированных бифенилов в биоте методом газовой хроматографии/масс-спектрометрии / М.М. Скринник, М.В. Милюкин // Міжнар. конф. “Хроматографічні методи аналізу органічних сполук”, присвячена 100-річчю з дня народ. чл.-кор. АН України М.А. Ізмайлова. Київ, 4–7 вересня 2007 р.: тези доп. – Київ, 2007. – С. 38.

14. Милюкин М.В. Определение хлорорганических пестицидов, полихлорированных бифенилов и полиароматических углеводородов в речных и морских донных отложениях и биоте методами газовой хроматографии/масс-спектрометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии / М.В. Милюкин, А.В. Терлецкая, Т.В. Воробьева, **М.М. Скринник** // Третя міжнар. конф. “Чистота довкілля в нашому місті”. Севастополь, 2–5 жовтня 2007 р.: тези доп. – Київ, 2007. – С. 4–5.

15. Милюкин М.В. Мониторинг хлорорганических пестицидов, полихлорированных бифенилов и полиароматических углеводородов в донных отложениях и биоте эстуариев рек Украины / М.В. Милюкин, А.В. Терлецкая, Т.В. Воробьева, **М.М. Скринник** // II Междунар. форум “Аналитика и аналитики”. Воронеж, 22–26 сентября 2008 г.: рефераты докладов. – Воронеж, 2008. – Т. 2. – С. 381.

16. Милюкин М.В. Мониторинг хлорорганических пестицидов, полихлорированных бифенилов и полиароматических углеводородов в донных отложениях и биоте водных систем / М.В. Милюкин, А.В. Терлецкая, Т.В. Воробьева, **М.М. Скринник**, Т.А. Богословская // IV Междунар. конференция

“Экстракция органических соединений”. Воронеж, 20–24 сентября 2010 г.: каталог докладов. – Воронеж, 2010. – С. 331.

17. **Скринник М.М.** Экстракционно-хромато-масс-спектрометрическое определение копланарных полихлорированных бифенилов в биоте бассейна Днепра / М.М. Скринник, М.В. Милюкин // IV Междунар. конф. “Экстракция органических соединений”. Воронеж, 20–24 сентября 2010 г.: каталог докладов. – Воронеж, 2010. – С. 335.

18. **Скринник М.М.** Определение хлорорганических пестицидов и полихлорированных бифенилов в биоте методом хромато-масс-спектрометрии / М.М. Скринник // Наук. конф. з аналітичної хімії. Донецьк, 15–20 вересня 2013 р.: тези доп. – Донецьк, 2013. – С. 110–111.

19. **Скринник М.М.** Определение хлорорганических пестицидов и полихлорированных бифенилов в биоте методом газовой хроматографии/масс-спектрометрии / М.М. Скринник // Київська конф. з аналітичної хімії. Сучасні тенденції 2014. Київ, 9–12 червня 2014 р.: тези доп. – Київ, 2014. – С. 177.

20. **Скринник М.** Определение хлорорганических пестицидов и полихлорированных бифенилов в биоте методом газовой хроматографии / масс-спектрометрии и оценка их биодоступности / М. Скринник // Всеукр. наук.-практ. конф. “Актуальні проблеми хімії і хімічної технології”. Київ, 20–21 листопада 2014 р.: тези доп. – Київ, 2014. – С. 120–121.

21. Милюкин М.В. Химический мониторинг органических экотоксикантов в водных системах и их биодоступность / М.В. Милюкин, **М.М. Скринник** // Третя міжнар. конф. “Хімічна і радіаційна безпека. Проблеми і рішення”. Київ, 19–22 травня 2015 р.: збірник праць. – Київ, 2015. – С. 16.

АНОТАЦІЇ

Скринник М.М. Визначення хлорорганічних пестицидів та поліхлорованих біфенілів у гідробіонтах методом хромато-мас-спектрометрії. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата хімічних наук за спеціальністю 02.00.02 – аналітична хімія. – ДВНЗ «Ужгородський національний університет» МОН України, Ужгород, 2017.

Розроблена, апробована і застосована методика прискореної рідинної екстракції гідрофобних органічних сполук зі зразків м'язової тканини риб, при котрій досягається висока ступінь відкривання цільових сполук. При цьому в екстракт не потрапляє вода і розчинні в ній речовини. На екстракцію сполук з одного зразка витрачається невелика кількість органічних розчинників. Дана методика не потребує використання дорогого обладнання і дозволяє швидко і практично повністю екстрагувати цільові сполуки із зразків гідробіонтів. З використанням даної методики отримані експериментальні дані про рівні вмісту ХОП і ПХБ, включаючи копланарні, у зразках риби з різних рік України.

Розроблена експресна методика препаративного виділення ХОП і ПХБ з екстрактів гідробіонтів методом мікропрепаративної ВЕРХ в обернено-фазному варіанті для подальшого визначення методом ГХ/МС.

У м'язових тканинах риб басейну р. Дніпро визначені концентрації ХОП, ПХБ, копланарних ПХБ і розрахований вклад копланарних ПХБ у величину токсичності в еквіваленті 2,3,7,8-тетрахлордибензо-*n*-діоксину. Проведено оцінку біодоступності ХОП (4,4'-ДДТ та його метаболітів) і суми ПХБ для гідробіонтів відносно перевищення критичного рівня (CTL) і фактору біоконцентрування (BCF) за результатами дослідження у 2003 та 2011–2012 рр.

Ключові слова: ХОП, копланарні ПХБ, гідробіонти, ГХ/МС, препаративна ВЕРХ.

Скринник М.М. Определение хлорорганических пестицидов и полихлорированных бифенилов в гидробионтах методом хромато-масс-спектрометрии. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – аналитическая химия. – ГВУЗ «Ужгородский национальный университет» МОН Украины, Ужгород, 2017.

Проведено исследование влияния различных факторов, таких как температура, объем растворителя, скорость подачи растворителя в методе ускоренной жидкофазной экстракции (УЖЭ) на степень извлечения гидрофобных органических соединений из гидробионтов различными растворителями и их смесями. На основе оптимизации условий проведения процесса разработана, апробирована и применена экспресная методика УЖЭ гидрофобных органических соединений из образцов мышечной ткани рыб, при которой достигается высокая открываемость целевых соединений из проб. При этом в экстракт не попадает вода и водорастворимые вещества. На экстракцию соединений из одной пробы расходуется небольшое количество органических растворителей. Данная методика не требует использования дорогого оборудования, применима для проведения мониторинга ХОП и ПХБ в образцах гидробионтов. Разработана экспресная методика препаративного выделения ХОП и ПХБ из экстрактов гидробионтов методом микропрепаративной ВЭЖХ в обращенно-фазном варианте для дальнейшего определения методом ГХ/МС.

В мышечных тканях рыб бассейна р. Днепр определены концентрации ХОП, ПХБ, включая копланарные, и рассчитан вклад последних в величину токсичности в диоксиновом эквиваленте. Проведена оценка биодоступности ХОП (4,4'-ДДТ и его метаболиты) и суммы ПХБ для гидробионтов согласно значений превышения критического уровня (CTL) и фактора биоконцентрирования (BCF) по результатам исследования в 2003 и в 2011–2012 гг.

Ключевые слова: ХОП, копланарные ПХБ, гидробионты, ГХ/МС, препаративная ВЭЖХ.

Skrynnyk M.M. Determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in aquatic organisms by chromat-mass-spectrometry method. – Manuscript.

Thesis for obtaining the scientific degree of Candidate of Sciences in chemistry in speciality 02.00.02 – Analytical chemistry. – SHEE «Uzhgorod National University» MES Ukraine, Uzhgorod, 2017.

Investigation of different factors such as temperature, solvent volume, and solvent flow rate on hydrophobic organic compounds recovery of from biota samples by different solvents and their mixtures during Accelerated Solvent Extraction (ASE) is described. On the base of process optimization, a rapid procedure of hydrophobic organic compounds extraction from fish muscles tissue was developed, approbated and used. The procedure provides high recovery of organochlorine pesticides (OCPs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) from fish muscles tissue. Extract contamination by water and water-soluble compounds is avoided. Extraction of hydrophobic organic compounds requires a small volume of organic solvents per sample. The procedure does not require expensive equipment, and can be used for OCPs and PCBs monitoring in aquatic organisms samples and for other practical tasks. A rapid micropreparative HPLC method for OCPs and PCBs isolation from aquatic organisms extracts in reverse-phase mode was developed for further determination by GC/MS.

OCPs, PCBs and coplanar PCBs concentrations in fish muscle tissue samples from Dnieper river basin were determined and coplanar PCBs contribution in toxicity value was converted into 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin equivalent. OCPs and PCBs bioavailability evaluation for aquatic organisms was done according to Critical Tissue Level values and Bioconcentration Factor as sum of 4,4'-DDTs and sum of PCBs basing on investigations results carried out in 2003 and 2011–2012.

Keywords: OCPs, coplanar PCBs, aquatic organisms, GC/MS, preparative HPLC.