

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ УКРАИНЫ
ВОСТОЧНОЕВРОПЕЙСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ ЛЕСИ УКРАИНКИ

на правах рукописи

СКРИННИК МАКСИМ МИХАЙЛОВИЧ

УДК [543.54+543.51:547.993]504.064.3:574.064

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХЛОРООРГАНИЧЕСКИХ ПЕСТИЦИДОВ И
ПОЛИХЛОРИРОВАННЫХ БИФЕНИЛОВ В ГИДРОБИОНТАХ МЕТОДОМ
ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

02.00.02 – аналитическая химия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук
М.В. Милюкин

Луцк – 2016

СОДЕРЖАНИЕ	2
СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	8
РАЗДЕЛ 1. АНАЛИТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ ХЛОРОРГАНИЧЕСКИХ КСЕНОБИОТИКОВ ВОДНЫХ СИСТЕМ.	14
1.1. Вступление	14
1.2. Эколого-токсикологические основы проблемы	16
1.3. Источники поступления СОЗ в объекты окружающей среды и их накопление	19
1.4. Равновесные адсорбционно-десорбционные процессы стойких органических загрязняющих веществ из твердых природных образцов	22
1.5. Методы экстракции	24
1.5.1. Экстракция Сокслета	26
1.5.2. Ускоренная жидкостная экстракция	27
1.5.3. Сверхкритическая жидкостная экстракция	30
1.6. Исследование ПХБ и родственных соединений в объектах окружающей среды	33
1.7. Стойкие органические загрязняющие вещества в воде и донных отложениях	39
1.8. Стойкие органические загрязняющие вещества в гидробионтах	43
1.9. Физико-химические методы определения СОЗ	62
РАЗДЕЛ 2. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ИССЛЕДОВАНИЯ ХЛОРОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ В ЛИПИДНЫХ ТКАНЯХ ГИДРОБИОНТОВ РАЗЛИЧНЫХ ВОДНЫХ СИСТЕМ	64
2.1. Объекты исследования	64
2.2. Методы и методики исследования	64
2.2.1. Методика приготовления модельных образцов мышечной ткани рыб для установления открываемости аналита в пробах при проведении ускоренной жидкофазной экстракции органических соединений	64

2.2.2. Оборудование и метод проведения ускоренной жидкостной экстракции	70
2.2.3. Методика введения внутреннего стандарта в образцы ткани	71
2.2.4. Методика регистрации органических соединений методом лазерной рефрактометрии	72
2.2.5. Методика подготовки концентратов микропримесей ХОП и ПХБ из мышечной ткани рыб	72
2.2.6. Методика проведения ускоренной жидкофазной экстракции микропримесей ХОП и ПХБ из мышечной ткани рыб	73
2.2.7. Методика исследования микропримесей ХОП и ПХБ в пробах мышечной ткани рыб методом ГХ/МС в режиме SIM (система GC HP5890 SeriesII/MSD HP5972A фирмы Hewlett-Packard с квадрупольным анализатором масс)	73
2.2.8. Методика препаративного выделения ХОП, ПХБ и ПХДД из мышечной ткани рыб методом ВЭЖХ	74
2.2.9. Методика исследования балластных соединений в пробах мышечной ткани рыб методом ГХ/ПИД	77
2.2.10. Методика исследования балластных соединений в пробах мышечной ткани рыб методом ГХ/МС в режиме SCAN	77
2.2.11. Методика выделения копланарных ПХБ из общих концентратов ПХБ, полученных из мышечной ткани рыб, методом микропрепаративной ВЭЖХ	78
2.2.12. Методика исследования микропримесей копланарных ПХБ в пробах гидробионтов (мышечной ткани рыб) методом ГХ/МС в режиме SIM (система GC6890N/MSD5975 InertXL/Autoinjector 7683B фирмы Agilent Technologies с квадрупольным анализатором масс)	80
2.3. Схема определения хлорорганических пестицидов и полихлорированных бифенилов в тканях и органах гидробионтов различных водных систем	81

РАЗДЕЛ 3. УСТАНОВЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ ПРОБОПОДГОТОВКИ ХЛОРООРГАНИЧЕСКИХ ПЕСТИЦИДОВ И ПОЛИХЛОРИРОВАННЫХ БИФЕНИЛОВ ИЗ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ РЫБ	85
3.1. Метод ускоренной жидкостной экстракции	85
РАЗДЕЛ 4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХЛОРООРГАНИЧЕСКИХ ПЕСТИЦИДОВ И ПОЛИХЛОРИРОВАННЫХ БИФЕНИЛОВ В ГИДРОБИОНТАХ БАССЕЙНА Р. ДНЕПР МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ / МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ	101
4.1. Препаративное выделение хлорорганических пестицидов, полихлорированных бифенилов и диоксинов из экстрактов гидробиотов для определения методом газовой хроматографии/масс-спектрометрии (способы очистки исходных концентратов)	102
4.2. Определение хлорорганических пестицидов и полихлорированных бифенилов в гидробионтах бассейна р. Днепр методом газовой хроматографии / масс-спектрометрии в очищенных концентратах	113
РАЗДЕЛ 5. ПРЕПАРАТИВНОЕ ВЫДЕЛЕНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОПЛАНАРНЫХ ПОЛИХЛОРИРОВАННЫХ БИФЕНИЛОВ В ТКАНЯХ ГИДРОБИОНТОВ БАССЕЙНА Р. ДНЕПР МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ / МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ	123
5.1. Препаративное выделение копланарных бифенилов для определения методом газовой хроматографии / масс-спектрометрии	123
5.2. Определение копланарных полихлорированных бифенилов в мышечной ткани рыб бассейна р. Днепр методом газовой хроматографии / масс-спектрометрии	137
РАЗДЕЛ 6. БИОДОСТУПНОСТЬ ХЛОРООРГАНИЧЕСКИХ ПЕСТИЦИДОВ И ПОЛИХЛОРИРОВАННЫХ БИФЕНИЛОВ ДЛЯ ГИДРОБИОНТОВ БАССЕЙНА Р. ДНЕПР	144
ВЫВОДЫ	148
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	150

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АЭД	<input type="checkbox"/>	атомно-эмиссионный детектор
ВРГХ/ВРМС	<input type="checkbox"/>	газовая хроматография высокого разрешения / масс-спектрометрия высокого разрешения
ВЭЖХ	<input type="checkbox"/>	высокоэффективная жидкостная хроматография
ГеХБ	<input type="checkbox"/>	гексахлорбифенил
ГХ	<input type="checkbox"/>	газовая хроматография
ГХБ	<input type="checkbox"/>	гексахлорбензол
ГХБД	<input type="checkbox"/>	гексахлорбутадиен
ГХВР	<input type="checkbox"/>	газовая хроматография высокого разрешения
ГХ/МС	<input type="checkbox"/>	газовая хроматография / масс-спектрометрия
ГХ/ПИД	<input type="checkbox"/>	газовая хроматография / пламенно-ионизационное детектирование
ГХЦГ	<input type="checkbox"/>	гексахлорциклогексан
ГХ/ЭЗД	<input type="checkbox"/>	газовая хроматография / электронно-захватное детектирование
ДДД	<input type="checkbox"/>	дихлордифенилдихлорэтан
ДДТ	<input type="checkbox"/>	дихлордифенилтрихлорметилметан
ДДЭ	<input type="checkbox"/>	дихлордифенилдихлорэтилен
ЖЭД	<input type="checkbox"/>	жидкостная экстракция под давлением
ИК	<input type="checkbox"/>	инфракрасный
МСВР	<input type="checkbox"/>	масс-спектрометрия высокого разрешения
МСД	<input type="checkbox"/>	масс-селективное детектирование
МС/МС	<input type="checkbox"/>	тандемная масс-спектрометрия
ОЛОС	<input type="checkbox"/>	ограниченно-летучие органические соединения
ПАУ	<input type="checkbox"/>	полициклические ароматические углеводороды
ПБДЭ	<input type="checkbox"/>	полибромдифениловый эфир
ППС	<input type="checkbox"/>	пористые полимерные сорбенты
ПеХБ	<input type="checkbox"/>	пентахлорбифенил

ПХБ	<input type="checkbox"/>	полихлорированные бифенилы
ПХДД	<input type="checkbox"/>	полихлорированные дибензо- <i>n</i> -диоксины
ПХН	<input type="checkbox"/>	полихлорированные нафталины
ПХТ	<input type="checkbox"/>	полихлорированные терфенилы
ПХДФ	<input type="checkbox"/>	полихлорированные дибензофураны
ПХДЭ	<input type="checkbox"/>	полихлорированный дифениловый эфир
СЖЭ	<input type="checkbox"/>	сверхкритическая жидкостная экстракция
СОЗ	<input type="checkbox"/>	стойкие органические загрязняющие вещества
СФЭ	<input type="checkbox"/>	сверхкритическая флюидная экстракция
ТеХБ	<input type="checkbox"/>	тетрахлорбифенил
ТХБ	<input type="checkbox"/>	трихлорбензол
ТХДД	<input type="checkbox"/>	2,3,7,8-тетрахлордибензо- <i>n</i> -диоксин
ТХФ	<input type="checkbox"/>	трихлорфенол
УЖЭ	<input type="checkbox"/>	ускоренная жидкостная экстракция
УЗЭ	<input type="checkbox"/>	ультразвуковая экстракция
УФ/Вид	<input type="checkbox"/>	ультрафиолетовая / видимая области спектра
ФОС	<input type="checkbox"/>	фосфорорганические соединения
ХБ	<input type="checkbox"/>	хлорбензолы
ХМС	<input type="checkbox"/>	хромато-масс-спектрометрия
ХОП, ХОС	<input type="checkbox"/>	хлорорганические пестициды (соединения)
ХФ	<input type="checkbox"/>	хлорфенолы
ЭИ	<input type="checkbox"/>	электронная ионизация
ЭС	<input type="checkbox"/>	экстракция Сокслета
Aroclor	<input type="checkbox"/>	торговая марка препарата ПХБ
BCF	<input type="checkbox"/>	Bioconcentration Factor
CTL	<input type="checkbox"/>	Critical Tissue Level <input type="checkbox"/> критический уровень для мышечной ткани рыб
FT-IR	<input type="checkbox"/>	Fourier Transform Infrared Detector <input type="checkbox"/> инфракрасный детектор с преобразованием Фурье

I_M^+	<input type="checkbox"/> интенсивность молекулярного иона
IT	<input type="checkbox"/> Ion Trap <input type="checkbox"/> ионная ловушка
k	<input type="checkbox"/> коэффициент концентрирования
LOD	<input type="checkbox"/> Limit of Detection <input type="checkbox"/> нижний предел обнаружения
M^+	<input type="checkbox"/> молекулярный ион
MS	<input type="checkbox"/> Mass Spectrometry <input type="checkbox"/> масс-спектрометрия
MSD	<input type="checkbox"/> Mass Selective Detector <input type="checkbox"/> масс-селективный детектор
m/z	<input type="checkbox"/> отношение массы к заряду
NIST	<input type="checkbox"/> National Institute of Standards, Национальный институт стандартов (США)
SCAN	<input type="checkbox"/> режим сканирования в полном диапазоне масс
SIM	<input type="checkbox"/> Selective Ion Monitoring, режим сканирования по избранным ионам в указанном диапазоне масс
SRM	<input type="checkbox"/> Standard Reference Material, стандартный референтный материал
τ_R	<input type="checkbox"/> время удерживания
TEQ	<input type="checkbox"/> Toxicity Equivalent, токсический эквивалент относительно 3,4,7,8-тетрахлордibenзо- <i>p</i> -диоксина
TIC	<input type="checkbox"/> Total Ion Current, полный ионный ток
ToF	<input type="checkbox"/> Time of Flight <input type="checkbox"/> время-пролетный масс-спектрометр

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. В связи с проблемами аналитической химии водных систем (вода, донные отложения, гидробионты) возникает необходимость разработки и применения наиболее эффективных и информативных методов выделения, концентрирования, идентификации и определения микропримесей токсических ограниченно-летучих органических соединений (ОЛОС) в этих объектах на уровне ультрамикроколичеств. Данные о содержании микро-, нано- и пикограммовых количеств токсических органических загрязняющих веществ в объектах водных систем важны для теоретических и практических исследований, направленных на изучение предвидения и прогнозирования среды обитания для живых организмов, а также для решения технологических проблем охраны водных систем.

Мировое развитие и совершенствование природоохранного законодательства требуют от аналитической химии решения сложных прикладных задач, которые включают диагностику антропогенного состояния объектов окружающей среды и происходящих в ней изменений. Требования к анализам во многих ведущих странах мира пересмотрены в сторону ужесточения – существенного понижения пределов обнаружения. Особенно это касается суперэкотоксикантов из общей группы ОЛОС □ стойких (персистентных) органических загрязняющих веществ (СОЗ) в объектах водных систем, принятых Стокгольмской конвенцией в 2001 г., в том числе в перечень которых входят полихлорированные бифенилы (ПХБ), хлорорганические пестициды (ХОП), полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) и другие. Это связано с их широким распространением и определенной общей токсичностью, а также способностью обладать канцерогенным, мутагенным, тератогенным, гепатотоксическим и другими действиями, а также накапливаться в липидной ткани живых организмов и при этом вызывать различные тяжелые заболевания.

Возросшие требования способствуют разработке для этих целей новых

методологических подходов и (или) методологий, реализованных с использованием хроматографических и хромато-масс-спектрометрических методов анализа, отличающихся повышенной чувствительностью, селективностью, и обеспечивающих точность и правильность полученных результатов определения супертоксических веществ.

Систематические данные относительно идентификации и уровней содержания ХОП и ПХБ, включая копланарные, в гидробионтах (мышечная ткань рыбы) бассейна р. Днепр и других рек Украины весьма ограничены. Актуальность поставленных в работе исследований состоит в разработке схемы анализа для решения задач идентификации, определения и практического применения для контроля и проведения мониторинга токсических соединений (ХОП, ПХБ, копланарные ПХБ) в гидробионтах методами ускоренной жидкостной экстракции (УЖЭ), препаративной хроматографии и хромато-масс-спектрометрии (газовой хроматографии/масс-спектрометрии, ГХ/МС).

Связь работы с научными программами, планами, темами. Диссертационная работа выполнена в соответствии с планами научно-исследовательских работ кафедры аналитической химии и экотехнологий Восточноевропейского национального университета имени Леси Украинки «Хемосенсоры на основі амінопохідних родамінів» (2015–2016 гг.), № государственной регистрации 0115U002349, а также по тематике трех Международных проектов Института коллоидной химии и химии воды им. А.В. Думанского НАН Украины (ИКХХВ) с Украинским научно-технологическим центром (УНТЦ – Science and Technology Center in Ukraine, STCU) (Агентство охраны окружающей среды, США): P277, 01.09.2006–31.10.2009 гг.; P277A, 01.11.2009–31.10.2010 гг.; P500, 01.09.2011–28.02.2014 гг.

Цель и задачи исследования. Цель данной работы состояла в разработке методологии пробоподготовки, идентификации и определения микропримесей ХОП, суммарного содержания, изомерно-специфического состава ПХБ, копланарных ПХБ и ее применению для мониторинга этих соединений в гидробионтах на уровне наноконцентраций.

Основные задачи исследования:

- разработка эффективных стадий методики пробоподготовки микропримесей ХОП, ПХБ и копланарных ПХБ методами УЖЭ и препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) для их выделения из гидробионтов природных водных объектов бассейна р. Днепр (схема анализа);
- оптимизация условий выделения и количественного определения ХОП, ПХБ и копланарных ПХБ методом ГХ/МС;
- применение способа препаративной ВЭЖХ для очистки концентратов ОЛОС гидробионтов с целью выделения суперэкотоксикантов;
- установление закономерностей изменения уровней содержания ХОП и ПХБ в биоте по результатам мониторинга относительно CTL (Critical Tissue Level □ критический уровень концентрации для мышечной ткани рыбы) и BCF (Bioconcentration Factor □ фактор биоконцентрирования ХОП и ПХБ мышечной тканью рыбы) с целью оценки их биодоступности и токсичности;
- установление закономерностей изменения уровней содержания ХОП и ПХБ в мышечной ткани рыбы по результатам мониторинга относительно TEQ (Toxicity Equivalent □ токсический эквивалент относительно 3,4,7,8-тетрахлордибензо-*p*-диоксина) с целью оценки их токсичности;

Объект исследования – процесс выделения, концентрирования, идентификации, количественного определения микропримесей токсических ХОП и ПХБ в гидробионтах водных систем и их мониторинг.

Предмет исследования – ХОП и ПХБ в мышечных тканях рыб.

Методы исследования – основные результаты работы получены с использованием современных физико-химических методов исследования: хроматографических – газовой хроматографии при электронно-захватном детектировании (ГХ/ЭЗД), ВЭЖХ при диодно-матричном детектировании в УФ/Вид-области спектра и ГХ/МС при электронной ионизации (ЭИ) и масс-селективном детектировании (МСД) в режимах SCAN (полный ионный ток, Total Ion Current (TIC) в полном диапазоне масс) и SIM (Selective Ion

Monitoring) (ТІС в определенном диапазоне масс по избранным характеристическим ионам).

Научная новизна полученных результатов. Научная новизна состоит в развитии методических подходов научного направления, связанного с химическим контролем и мониторингом, супертоксикантов ХОП, ПХБ и копланарных ПХБ в гидробионтах водных систем для решения практических аналитических задач:

- впервые разработана методология исследования ХОП, ПХБ и копланарных ПХБ в гидробионтах природных водных систем бассейна р. Днепр, в которой обоснована необходимость рационального сочетания процедур пробоподготовки, идентификации и заключительного хроматографического и (или) хромато-масс-спектрометрического определения органических токсикантов;
- оптимизированы условия выделения и концентрирования указанных соединений, режимы хроматографического разделения и масс-селективного детектирования в сложных смесях;
- решена целевая задача идентификации и количественного определения ХОП и ПХБ (общего содержания, изомерно-специфического состава и содержания копланарных изомеров) методом ГХ/МС в режиме SIM на уровне $(2,0-4,0) \cdot 10^{-10}$ г/дм³ в биологических объектах водных систем бассейна р. Днепр;
- установлены закономерности изменения уровней содержания ХОП и ПХБ в гидробионтах относительно TEQ по результатам мониторинга с целью оценки их токсичности на примере водной экосистемы бассейна р. Днепр.
- решена проблема биодоступности ХОП и ПХБ гидробионтами по результатам мониторинга на примере водной экосистемы бассейна р. Днепр.

Практическое значение полученных результатов. Для проведения аналитических исследований биологических объектов водных систем разработаны методики пробоподготовки и определения токсических хлорорганических соединений, реализованные хроматографическими и

хромато-масс-спектрометрическими методами, на основе чего разработана схема анализа гидробионтов, позволяющая идентифицировать, количественно определять и проводить мониторинг ХОП, ПХБ и копланарных ПХБ и оценивать их биодоступность. Точность и правильность результатов, получаемых с применением этих методик и схемы анализа, подтверждена анализом стандартных образцов тканей биоты (мидий) SRM 1977 NIST Mussel Tissue (Organic Contaminants and Trace Elements).

Личный вклад соискателя в представленных к защите материалах состоит в разработке методологии исследования гидробионтов водных систем, постановке задач, организации и проведении экспериментальных исследований, обработке и интерпретации экспериментальных данных, обобщении полученных результатов, подготовке статей, выступлений и тезисов докладов, отчетов. Совместно с д.х.н. М.В. Милюкиным проводилось планирование этапов работ и обсуждение полученных результатов исследований. В проведении некоторых экспериментальных исследований (пробоподготовка) принимали участие к.х.н. А.В. Терлецкая и к.х.н. Т.А. Богословская. Все соавторы принимали участие в обсуждении общих публикаций.

Апробация работы. Результаты исследований по теме диссертации представлены и обсуждены на 14 Международных и Украинских конференциях: The Second International Conference “Interfaces against pollution” (Miskolc-Lillafured, Hungary, 2002); Международный Форум “Аналитика и Аналитики” (Воронеж, Россия, 2003, 2008); Міжнародна конференція “Чистота довкілля в нашому місті” (Трускавець, 2004); International Conference “Analytical Chemistry and Chemical Analysis” (Kyiv, 2005); Международная конференция “Экстракция органических соединений” (Воронеж, Россия, 2005, 2010); Наукова конференція “Аналітичний контроль якості та безпеки продукції промислового виробництва і продовольчої сировини” (Одеса, 2006); Міжнародна конференція “Хроматографічні методи аналізу органічних сполук” (Київ, 2007); Третя міжнародна конференція “Чистота довкілля в нашому місті”

(Севастополь, 2007); ІХ 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. Основне содержание диссертационной работы изложено в 21 публікації, из них – 6 статей, опублікованих в научных журналах, тезиси 15 докладов на конференциях.

Структура и объем диссертационной работы. Диссертация состоит из введения, 6 разделов, выводов, списка цитированной литературы, который насчитывает 171 ссылку. Работа изложена на 170 страницах машинописного текста, включает 26 таблиц и 27 рисунков.

РАЗДЕЛ 1

АНАЛИТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ ХЛОРОРГАНИЧЕСКИХ КСЕНОБИОТИКОВ
ВОДНЫХ СИСТЕМ. ПРОБЛЕМЫ И ЗАДАЧИ. ПРОБОПОДГОТОВКА.
ХРОМАТОГРАФИЯ. ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ

1.1. Вступление

В современном обществе человека окружает большое количество благ, созданных для улучшения повседневной жизни. Их основой послужили достижения успехов в области создания новых химических соединений с характерными специфическими свойствами, которые должны соответствовать определенным физико-химическим требованиям. Некоторые из этих соединений спасли жизни миллионам людей, например, дихлордифенилтрихлорэтан или дихлордифенилтрихлорметилметан (ДДТ). Это соединение использовалось для уничтожения насекомых на протяжении II Мировой войны, что существенно снизило заболеваемость населения на малярию и тиф. Впервые синтезировал ДДТ австрийский химик Отмар Цайдлер в 1873 г. В 1939 г. швейцарский химик Пауль Мюллер открыл инсектицидные свойства ДДТ, за что в 1948 г. награжден Нобелевской премией по медицине за открытие сильного контактного действия этого инсектицида, который имел большое значение в превентивной медицинской практике (официальная формулировка – “За открытие высокой эффективности ДДТ как контактного яда”). Другие химические соединения, такие как ПХБ, имеющие уникальные химические свойства, нашли широкое применение в промышленности, особенно с 1930 до середины 1970 гг. Они инертны и являются хорошими электрическими изоляторами, поэтому использовались в больших количествах при производстве трансформаторов и конденсаторов. В мире всего произведено до $2 \cdot 10^6$ т ПХБ. К сожалению, к тому времени очень немного сведений было известно об отрицательных эффектах галогенорганических соединений, таких как ДДТ и ПХБ в случае их попадания в окружающую среду. На сегодня они

отнесены к СОЗ и найдены во всех живых организмах, в том числе и у человека. Понятно, что ДДТ и ПХБ – это лишь два примера из тысяч, когда химикаты, когда-то созданные для удовлетворения определенных потребностей человека, в последствии создали значительные проблемы загрязнения окружающей среды. Едва ли кому-то не приходилось слышать о глобальном загрязнении, которое является следствием постоянного производства многочисленных известных и неизвестных соединений, попадающих в окружающую среду [1].

Известно, что СОЗ являются суперэкоотоксикантами, к которым относятся следующие классы органических соединений: полихлорированные дибензо-*n*-диоксины (ПХДД), дибензофураны (ПХДФ), ПХБ; меньшей токсичностью обладают часто встречающиеся в объектах окружающей среды хлорорганические соединения, например, ХОП, хлорбензолы (ХБ), хлорфенолы (ХФ), ПАУ и др. Эти соединения, попадая в организм животных и человека, прежде всего накапливаются в жировых тканях. Обладая высокой токсичностью ПХДД, ПХДФ, ПХБ, ХОП, ХБ, ХФ и ПАУ, оказывают разрушительное воздействие на гормональную систему, что в конечном итоге приводит к значительно повышенному канцерогенезу, иммунодефициту, расстройствам нервной системы, тератогенному, эмбриотоксическому эффекту и нарушению функций деторождения. И как следствие этого – онкологические заболевания крови, желчного пузыря, печени и др. Данные хлорорганические соединения могут приводить к тяжелым генетическим заболеваниям (мутагенный эффект) [1–8].

Таким образом, вследствие высокой токсичности для млекопитающих, включая и человека, устойчивости и широкого распространения в природной среде, в настоящее время СОЗ представляют глобальную экологическую угрозу. Особо опасными представителями СОЗ являются 12 изомеров диоксинов и фуранов с числом атомов хлора 4–6, из которых 4 расположены в положениях 2,3,7,8 и 13 копланарных изомеров ПХБ с числом атомов хлора 4–7, из которых 4 замещены в положениях 4,4' и/или 3,3',5,5'.

При аналитическом определении ксенобиотиков в объектах водных систем возникают трудности, которые связаны с низкими уровнями содержания, их сложным изомерным составом и присутствием в выбросах существующих технологий функционально замещенных соединений, которые содержат вместо атомов галогенов группы NO_2 , NH_2 , Alk и другие [2]. Это требует дополнительных усилий на стадии проведения пробоподготовки. Сложности, которые возникают в связи с изомерным составом ксенобиотиков, обусловлены также изменениями физических и химических свойств в рядах их региоизомеров. Если физические свойства ксенобиотиков определяются, в основном, их общей химической природой, в том числе количеством атомов галогена в молекуле, то химические свойства также существенно зависят от положения атомов галогена. Соответственно, региоизомеры существенно отличаются по биологической активности, скорости и направлению метаболизма в природе. При этом возможны биоактивация и биodeградация этих соединений в окружающей среде. Таким образом, ксенобиотики – это сложная, постоянно изменяющаяся в пространстве и во времени система загрязняющих веществ природной среды [3].

Традиционными способами извлечения остаточных количеств СОЗ из твердых образцов окружающей среды, в том числе и водных систем, таких как грунты, донные отложения и гидробионты, являются различные варианты жидкостной экстракции образцов, после которых выполняется анализ полученных концентратов с целью определения целевых соединений хроматографическими и хромато-масс-спектрометрическими методами анализа при различных способах детектирования.

1.2. Эколого-токсикологические основы проблемы

СОЗ, поступающие в водную систему, включаются в разные типы донных отложений, которые могут стать основным источником загрязнения воды и гидробионтов на длительное время. Одним из основных вопросов является

биодоступность этих соединений. Важно, как долго загрязняющее вещество, связанное с донными отложениями, продолжает оставаться биодоступным, поскольку это будет иметь решающее значение на попадание его в живые организмы на разных трофических уровнях. Биодоступность загрязняющего вещества может быть определена, как его доля, доступная для биоаккумуляции от общего количества в окружающей воде и частицах донных отложений. Для многих бентосных бесхребетных донные отложения являются основным источником питания, и поэтому они могут быть токсичными для этих организмов после переваривания и усвоения пищи. Донные отложения также могут играть основную роль в загрязнении пищевых цепей. Общим эффектом является установленный факт, что при транспортировании СОЗ через несколько трофических уровней в цепи питания на последнем их концентрация увеличивается. Поскольку взаимодействие СОЗ с донными отложениями связано с конечной концентрацией в гидробионтах, израсходовано много усилий для выявления закономерностей их миграции и предвидения хода этих процессов. Сделано несколько попыток определения степени загрязнения донных отложений для бентосных организмов. Довольно простой процедурой является определение общего количества ксенобиотиков вытяжной экстракцией донных отложений и использование полученной величины как критерия его качества. Такой способ является недостаточно надежным для оценки загрязнения, поскольку во внимание не принимается биодоступность. Поэтому разработаны другие методы оценки, которые базируются на прямом определении токсичности (тесты с добавлением донных отложений) и теоретических моделях “равновесного распределения” [1].

В связи с острой угрозой, которую представляют СОЗ для окружающей среды, ООН утвердила ряд важных решений для стратегических действий во всем мире. На конференции ООН (Рио-де-Жанейро, 1992 г.) принята программа действий “Повестка дня на 21 век”, в которой сформулирована проблема повышения безопасности использования токсических химических веществ [9]. Данная программа включает следующие предложения для всемирного

сообщества:

- использовать менее токсические химические вещества, чтобы уменьшить опасность;
- выработать всеобщее соглашение о торговле токсическими и опасными продуктами;
- получить важные данные об опасности для здоровья человека и окружающей среды большого числа производимых в значительных объемах токсических химических веществ.

В 1995 г. Советом правления программы ООН по защите окружающей среды (United Nations Environment Programme, UNEP) принято Решение 18/32 по СОЗ, в котором приведен перечень особо опасных химических веществ. В список вошли 12 наименований (ПХБ, диоксины, фураны, альдрин, дильдрин, ДДТ, эндрин, хлордан, гексахлорбензол, мирекс, токсафен и гептахлор) [10]. Согласно данному решению необходимо соединить имеющуюся информацию Межправительственного форума по безопасности химических веществ (Intergovernmental Forum on Chemical Safety, IFCS), Европейской экономической комиссии ООН (United Nations Economic Commission for Europe, UNEEC) и других соответствующих источников по химии и токсикологии веществ; выявить источники загрязнения СОЗ, их транспортные пути и накопление в глобальном масштабе; оценить выгоды и риск, которые относятся к производству и применению; выработать механизм избежания и ликвидации эмиссий, выбросов и потерь и применить имеющиеся заменители, учитывая их стоимость и эффективность.

В 2001 г. в Стокгольме (Швеция) ООН была проведена конференция [11], где центральное внимание было уделено проблеме СОЗ. Заключительный акт этого форума, так называемую “Стокгольмскую конвенцию”, подписали 110 стран, и она вступила в действие в 2004 г. В 2005 г. комитетом по рассмотрению СОЗ в Женеве принято решение о включении еще пяти веществ в существующий перечень: бромированные замедлители горения □ пентабромдифениловый эфир, гексабромдифенил, перфтороктановый

сульфонат и пестициды □ хлордекон и линдан [12]. Украина подписала Стокгольмскую конвенцию по СОЗ 23 мая 2001 г., ратифицировала 18 апреля 2007 г., представила официальные документы в Секретариат конвенции 25 сентября 2007 г. С 24 декабря 2007 г. Стокгольмская конвенция по СОЗ вступила в силу в Украине. Стокгольмская конвенция содержит план целенаправленных действий по уменьшению поступления СОЗ в природную среду. Каждое государство, подписавшее конвенцию, должно контролировать производство и применение СОЗ, а также проводить мониторинг источников их образования и поступления в окружающую среду.

В 2002 г. эту конвенцию подписала Россия, где до сих пор отсутствует система мониторинга СОЗ и вряд ли в ближайшее время она будет введена в действие [3–6, 13].

Вследствие высокого промышленного развития для Украины проблема СОЗ является весьма актуальной. Первые работы относительно уровней содержания персистентных соединений ХОП и ПХБ в объектах водных систем Украины появились еще в 50–70 гг. прошлого столетия. Обобщение этих данных, оценка их влияния на экологическое состояние пресных вод и аккумулярование гидробионтами с привлечением мировой литературы приведены в монографиях [14, 15]. Публикации последних лет относительно развития аналитической химии СОЗ и их мониторинга в объектах водных систем (вода, донные отложения, гидробионты) Украины обобщены в статьях [16–22], главах в книгах [23–26] и монографиях [27–28]. Результаты более частных исследований приведены в работах [29–35].

1.3. Источники поступления СОЗ в объекты окружающей среды и их накопление

ХОП, ПХБ, ПХДФ, ПХДД и другие хлорорганические соединения могут попадать в окружающую среду в результате различных техногенных процессов.

Так, ПХБ, полихлорнафталины (ПХН) и гексахлорбутадиен (ГХБД)

являются продуктами химических производств, которые используются в электротехнической промышленности. Мощные трансформаторы и конденсаторы, содержащие технические смеси [13] совол (ПХБ), совтол (ПХБ и ТХБ (1,2,4-трихлорбензол)) и гексол (ПХБ и ГХБД), производились в 60-90-х годах 20 века и функционируют до сих пор. Отработанные электрохимические устройства не собраны в общие хранилища, вследствие чего возможны поступления ПХБ, ТХБ, ПХН и ГХБ в природную среду.

ПХДД и ПХДФ образуются в хлорных технологиях в щелочных условиях при высоких температурах и давлениях. В Украине имеется ряд крупных химических производств, с которыми может быть связана проблема СОЗ. Так на заводе “Краситель” (г. Рубежное) производились синтетические красители с использованием ТХБ, ввозимого из России (г. Чапаевск). Очень высокая загрязненность связана с 2,4,5-трихлорфенолом (ТХФ), который использовался в виде дуста 2,4,5-трихлорфенолята меди для предпосевного протравливания семян. Также он поступал на украинский завод “Химпром” (г. Первомайский) для приготовления комбинированных протравливателей фентиурамовой группы. Часть ТХФ перерабатывалась на заводе “Краситель” в гексахлорфен, применявшийся для изготовления антибактериальных материалов. В процессе приготовления этого продукта предиксин превращался в 2,3,7,8-тетрахлордibenзо-*n*-диоксин (2,3,7,8-ТХДД), концентрация которого достигала от 0,9 до 102 ppm [13].

Значительная эмиссия диоксинов в окружающую среду происходит в результате сжигания хлорсодержащих химических веществ и пластикового мусора [36]. Особую экологическую опасность для водных систем Украины представляет подтопление мусорных свалок и заброшенных складов с отходами хлорорганических соединений. Также СОЗ попадают на территорию Украины вследствие трансграничного загрязнения со стороны соседних западных стран, например Чехословакии, которая уже к 1986 г. произвела 20 тыс. т. делоров, хайделоров, делотермсов и других технических смесей, содержащих ПХБ [37]. Наиболее важным в проблеме СОЗ в стране является накопление непригодных

и запрещенных к использованию пестицидов и других СОЗ, вследствие которого происходит их постоянная эмиссия в окружающую среду [12].

Отличительными особенностями СОЗ являются высокая химическая и биологическая устойчивость в окружающей среде, высокая степень растворимости в жире, вследствие которых они накапливаются в липидных тканях гидробионтов. Показано, что ПХБ вызывают родовые изменения и скелетные деформации у хищников, которые находятся на высших трофических уровнях водных экосистем [28]. В последнее время идентифицированы методами двумерной газовой хроматографии новые СОЗ, а именно: три класса соединений в различных матрицах (токсафен – техническая смесь, содержащая в основном хлорборнаны и хлоркамфены; техническая смесь полихлорированных *n*-алканов со степенью хлорирования 60 мас. %; полихлорированные терфенилы (ПХТ) – смесь технических продуктов Aroclor 5442 и Aroclor 5460 в соотношении 1:1 [38–41]), технический токсафен – сложная смесь хлорированных борнанов, борненов, камфенов, дигидрокамфенов [42], хлорорганических соединений – ПХБ, полихлорированных дифениловых эфиров (ПХДЭ), ПХН, полихлорированных дибензотиофенов, ПХДД, ПХДФ, ПХТ, полихлорированных алканов, токсафенов, ХОП, полибромированных бифенилов, полибромированных дифениловых эфиров (ПБДЭ) [43], чье поведение сходно со свойствами ХОП, ПХБ ПХДД, ПХДФ. На основании проведенных исследований составлен список сравнительно новых и новоявленных СОЗ относительно их токсического потенциала в объектах окружающей среды [44]. Идентификацию и определение сложной смеси хлорорганических и ароматических соединений в биологических матрицах методом двумерной хроматографии при электронно-захватном детектировании выполнено для смеси ПХБ (29 конгенов), хлорированных ароматических соединений (пестициды, их метаболиты, промышленные загрязняющие вещества (19 соединений)) и эфиров фталевой кислоты (6 соединений) [45], а также ПХБ, ДДТ (его изомеры и метаболиты), гексахлорбензола и изомеров гексахлорциклогексана (ГХЦГ) [46] и ПХБ

методом газовой хроматографии с микроволновым индуктивно-связанным плазменным атомно-эмиссионным спектрометрическим детектированием [47]. Следует признать, что идентифицированные соединения представляют неполный перечень СОЗ, находящихся в круговороте между объектами окружающей среды. Вследствие персистентности СОЗ будут продолжать циркулировать в природе еще в течение многих десятилетий и актуальность проблемы для объектов водных систем будет приобретать все большее значение.

1.4. Равновесные адсорбционно-десорбционные процессы стойких органических загрязняющих веществ из твердых природных образцов

Сорбция-десорбция ксенобиотиков из матриц окружающей среды имеет большое значение, поскольку высвобождающиеся соединения аккумулируются гидробионтами, и в конечном итоге, попадают к человеку.

После установившегося равновесия в зависимости от природных условий следует фаза быстрой десорбции (от нескольких часов до нескольких суток). Затем происходит медленная десорбция органических токсикантов, во время которой может извлекаться более половины общего количества токсикантов. Это характерно для всех равновесных адсорбционно-десорбционных процессов, которые связаны с наличием свободных сорбционных мест (пор), а также ограничением молекулярной диффузии (транспорта массы) к местам сорбции. Научно обоснованно 5 стадий, которые проходят соединения для достижения своего места связывания внутри частицы, откуда обмен молекулами проходит значительно медленнее [1]:

- транспорт в объеме жидкости;
- инертная диффузия на поверхности водной пленки;
- мезопоровая диффузия, которая замедляется адсорбцией у покрытия органических веществ;

- микропоровая диффузия, замедленная сложной формой пор;
- твердофазная диффузия в органический материал со специфическим взаимодействием между соединением и органическим материалом.

Из этих пяти стадий только три последние считаются причиной медленной сорбции, но трудно сказать, которая из них является лимитирующей. Диффузия в органический материал и мезопоровая диффузия, замедленная порами, происходят одновременно в одной и той же частице.

Разные участки частиц грунта/донного отложения содержат разные типы, количества и распределения поверхностей и органических включений. Вебером и Гьюангом [48] предложена модель трех поверхностей (“Three-domain”), которая включает многие реакции, происходящие на поверхности твердых фаз. В этой модели сорбционные процессы протекают с низкой скоростью вследствие медленной диффузии внутри поверхности. Авторы полагали, что двух–трех дней должно быть достаточно для достижения третьей поверхности. Позже эта теория была упрощена, и медленную адсорбцию связывали с покрытием органического материала двух поверхностей – “резиновой” и “стеклянной”. Диффузия в “стеклянную” часть проходит на несколько порядков медленнее, чем в “резиновую”, и процесс миграции в нее длится несколько лет.

Итак, молекулы загрязняющего вещества могут быть связаны с матрицей в разной степени. Это обусловлено наличием разных участков локализации в частице матрицы и строением этих молекул. Авторы работ [49, 50] использовали метод селективной сверхкритической жидкостной экстракции (СЖЭ) для последовательного извлечения ПХБ, связанных с матрицей в разной мере. В течение экстракционного процесса были применены резкие подъемы температуры и давления. При этих условиях молекулы ПХБ последовательно десорбировались из матрицы. Места связывания ПХБ условно классифицированы как слабые, средние, сильные и очень сильные составляющие. Такой анализ пяти образцов с разными концентрациями ПХБ показал, что физико-химическая природа матрицы влияет на силу связывания

больше, чем химическая структура индивидуальных ПХБ. Характеристики матрицы (размер частиц образца, содержание воды, органических веществ и концентрация ПХБ) не являются основой для предвидения характера десорбции, поскольку он зависит от многих других характеристик образца.

В работе [51] проведено извлечение ПХБ из природных образцов методом СЖЭ. После растворения в воде экстрагированных ПХБ в течение 18 суток исследовали процесс их адсорбции в ту же матрицу. С целью определения соотношений ПХБ, связанных с четырьмя разными активными центрами (от слабых до очень сильных), использовали селективные условия экстракции. Установлено, что 18 суток оказалось недостаточно для миграции ПХБ к активным центрам адсорбции, при этом ПХБ сначала связывались с более слабыми участками. В донных отложениях с наиболее низкими концентрациями, все ПХБ адсорбировались из воды, что свидетельствует о том, что слабых участков связывания оказалось достаточно для извлечения их из воды. Поскольку сильно загрязненные донные отложения имеют ограниченное количество активных центров связывания, специфические взаимодействия раствор–матрица включены в адсорбцию даже для самых слабых активных центров связывания.

Авторы [52] обработали полученные экспериментальные данные, используя сложную многопараметрическую модель экстракции, которая включает три типа полимерного органического материала, входящего в состав частицы матрицы. Причем, каждый тип имеет разную энергию связывания с молекулами ПХБ. Скорость стадии диффузии ПХБ из органического материала считалась лимитирующей в общей скорости протекания всего процесса. Таким образом, авторы показали возможность использования селективной СЖЭ для описания поведения ПХБ в естественных условиях.

1.5. Методы экстракции

ХОП и ПХБ являются веществами антропогенного происхождения. Такие

их свойства как высокая токсичность и устойчивость к разложению под действием физико-химических и биологических природных факторов обуславливают необходимость определения этих соединений в объектах окружающей среды и продуктах питания. ХОП и ПХБ представляют угрозу для водных экосистем, в которых они способны накапливаться в донных отложениях и тканях гидробионтов. В организм человека ХОП и ПХБ попадают, в основном, с питьевой водой и продуктами питания.

ХОП, ПХБ и другие суперэкоотоксиканты, такие как ПХДФ и ПХДД, находятся в биоте (мышечная ткань рыб, печень, икра) в связанном (ассоциированном) состоянии с материалом матрицы, в основном, в липидных (жировых) тканях.

Для их определения необходимо извлечь неполярные вещества из образца соответствующими растворителями. Современные методы экстракции хлорорганических и других соединений из твердых образцов представлены в обзорах: сверхкритическая флюидная экстракция (СФЭ) и жидкостная экстракция под давлением (ЖЭД) [53–55], экстракция в аппарате Сокслета (ЭС), фокусированная микроволновая ЭС [56], УЖЭ [57] и статьях [58–60]. Перечисленные методы экстракции органических соединений имеют много недостатков: большие затраты времени (ЭС) [56–58, 60–62], недостаточная полнота извлечения (ультразвуковая экстракция (УЗЭ)) [61, 63], использование дорогостоящего оборудования ((СФЭ) [1, 53–55, 64] и (УЖЭ) [1, 53–55, 57–61, 65]). Преимущества УЖЭ, выполненной в различных вариантах, состоят в экспрессности проведения процесса при достижении высоких степеней извлечения органических соединений из твердых матриц, достаточных для проведения анализа [1, 53–55, 57–61, 65].

За последние 25 лет проведен систематический мониторинг токсических органических соединений в природных и питьевых водах бассейна р. Днепр при применении метода твердофазной экстракции для подготовки концентратов ХОП и ПХБ [21–24, 28, 66, 67]. Для более полной оценки угрозы для человека и водных экосистем, которую представляют ХОП и ПХБ,

выполнено их определение, включая копланарные ПХБ, в мышечной ткани рыб (метод УЖЭ) и получены надежные результаты о содержании этих соединений. На основании полученных результатов проведена оценка токсичности данных ксенобиотиков в мышечной ткани гидробионтов [68–70].

1.5.1. Экстракция Сокслета

ЭС — это классический метод экстракции органических соединений из твердой фазы. Несмотря на свой значительный возраст (более 100 лет), эта техника почти не изменилась, за исключением некоторых модификаций [56, 61, 62], и до сих пор широко используется во многих лабораториях. Метод требует использования большого количества дорогих органических растворителей высокой степени очистки, которые, как правило, токсичны. Экстракция занимает много времени вследствие медленной диффузии органических компонентов в образце и десорбции из материала матрицы в растворитель. В результате такой процедуры получается грязный экстракт, который в дальнейшем необходимо очищать от балластных компонентов [71]. Пробоподготовка с применением ЭС может занимать две трети времени анализа [1].

Классический метод проотбора грунтов состоит из следующих стадий: отбор средней пробы образца, находящегося в воздушно-сухом состоянии, методом квартования; получение фракции твердых частиц диаметром $< 0,5$ мм, используя процедуры растирания и просеивания через сито. Целевые хлорорганические соединения извлекают из полученных образцов методом ЭС, учитывая при этом тип грунтов и их поглощающую способность. Поэтому для каждого образца подбирают оптимальные условия экстракции (растворители, температура, время) для нескольких параллельных проб. В работе [2] предложено экстрагировать ксенобиотики из грунтов после выдерживания сухого образца в дистиллированной воде растворителями или их смесями: ацетон, гексан–ацетон (4:1), ацетон–гексан (1:1) в присутствии дезактиватора

□ 1 % раствора хлористого аммония. Альтернативным способом является экстракция в ультразвуковой бане ацетонитрилом с предшествующей дезактивацией образцов хлоридом аммония и последующей переэкстракцией гексаном, что позволяет анализировать экстракты методом ГХ/ЭЗД без дальнейшей очистки [2]. Для удаления балластных органических веществ из гексановых экстрактов, которые извлекаются вместе с СОЗ и оказывают мешающее влияние, применяют концентрированную серную кислоту [2] или олеум [28] до получения бесцветного слоя. Этот способ очистки подходит для определения СОЗ, которые не разрушаются при сернокислотном способе очистки. Помимо органических балластных веществ определению целевых соединений мешают элементарная сера и серосодержащие соединения, способы удаления которых хорошо разработаны [75, 76]. Применение газовой хроматографии высокого разрешения (ГХВР) при МСД позволяет упростить очистку экстрактов.

Для выделения микропримесей органических соединений из водных образцов используют жидкостную экстракцию различными растворителями, которая имеет ряд общих принципов с ЭС. С целью сравнения приведена методика анализа водных образцов. Экстракцию хлорорганических соединений из таких образцов, как правило, проводят гексаном или хлористым метиленом [3]. Органический экстракт сушат безводным сульфатом натрия. Наиболее эффективным является метод твердофазной экстракции [72] с применением колонок с пористыми полимерными сорбентами (ППС) и обращенно-фазными сорбентами [28, 73, 74]. Для экспрессного анализа (небольшие объемы воды и элюатов) фактор обогащения или степень концентрирования (enrichment factor) может достигать 1000. Это позволяет исключить также стадию удаления растворителей, предшествующую газохроматографическому анализу. В случае наличия большого количества балластных веществ в конечных экстрактах применяют аналогичный способ сернокислотной очистки.

1.5.2. Ускоренная жидкостная экстракция

Перспективным методом извлечения органических соединений из твердых образцов является УЖЭ. Преимущество этого метода состоит в экспрессности. Так, количественная экстракция в статическом варианте может быть проведена за несколько минут. Установка для УЖЭ состоит из ячейки экстракции, изготовленной из нержавеющей стали, в которой поддерживаются выбранные условия (температура и давление), автоматически управляемые и контролируемые электроникой. В данном случае органический растворитель удерживается в жидкой фазе даже при высоких температурах (50–200 °С) вследствие создания повышенного давления в системе [1]. После проведения УЖЭ стадия очистки экстрактов является обязательной.

Классическая процедура УЖЭ состоит из следующих этапов: загрузка образца в ячейку; введение органического растворителя; установление оптимальных условий процесса (давление и температура); проведение статической экстракции в течение определенного времени; сбор растворителя в приемник и повторная промывка образца свежей порцией растворителя; сбор остатка растворителя из образца в приемник с использованием газа (азота).

Остановимся подробнее на каждой стадии. Растворитель, наполняя ячейку экстракции, накачивается в течение определенного времени, пока 1 см^3 его не поступит в пробирку для сброса. Далее клапан закрывается, и происходит накачка газа для создания рабочего давления. После этого следует нагревание растворителя. На этой стадии происходит экстракция, продолжительность которой зависит от конечной температуры и составляет 5–10 мин. При возникновении давления, которое на 10–15 % превышает выбранное, излишек растворителя сбрасывается через специальный клапан. С целью избежания потерь в ячейку поступает порция свежего растворителя. После установления выбранных температуры и давления начинается статический период экстракции, в течение которого вещества извлекаются из образца в растворитель. Время этого периода зависит от физико-химической природы матрицы и выбранных условий экстракции. После завершения

статической стадии клапан открывается, и растворитель выливается в приемник. Приемник для сбора растворителя можно не охлаждать, поскольку существенных отличий в концентрациях исследуемых веществ при горячем и холодном сборе не выявлено. После этого под давлением газа прибавляется свежий растворитель для промывки образца и соединений трубок.

Рассматривая физико-химические процессы, экстракцию ПХБ методом УЖЭ из полимерных матриц можно разделить на три стадии: диффузия растворителя из коры к поверхности частицы матрицы; дальнейший перенос с поверхности частицы в экстрагирующую жидкость; конечное удаление растворителя из ячейки экстракции [1]. Процессы первых двух стадий происходят вследствие молекулярной диффузии веществ, третьей – зависят от растворимости извлекаемых веществ в органическом экстракте. Каждая из этих стадий может быть лимитирующей, поэтому для интенсификации процесса необходимо ускорять все три стадии повышением температуры. Также для сложных образцов окружающей среды следует учитывать еще одну стадию – десорбцию из мест связывания молекул ПХБ с матрицей. Она может быть одновременно направлена в разные стороны и лимитировать скорость всего процесса экстракции [1].

Эффективность метода зависит от температуры, давления, растворителя, времени экстракции и размера частиц матрицы. Повышение температуры увеличивает растворимость экстрагируемых веществ, способствует разрыву сорбционных связей молекул вещества (силы ван-дер-Ваальса, водородные связи и диполь-дипольный эффект) между активными центрами поверхности матрицы и молекулой растворителя. Также повышение температуры снижает поверхностное натяжение растворителя, что улучшает смачиваемость. Повышенное давление позволяет удерживать растворитель в жидком состоянии при высоких температурах экстракции, а также улучшает экстракцию соединений из пор. Отмечено [77], что химическая природа растворителя может иметь большее значение, чем температура экстракции. Растворитель, который является наиболее эффективным для экстракции определенного

образца, подбирают экспериментально. Например, для экстракции ПАУ оптимально подобранными являются следующие растворители или смеси растворителей: толуол, дихлорметан : ацетон (1 : 1), гексан : ацетон (1 : 1). Эти же растворители применяют для экстракции ПХБ и ХОП. Показано, что толуол является лучшим растворителем для ПХБ, чем смесь гексан : ацетон (1 : 1) [78]. В работах [78, 79] установлено влияние размера частиц матрицы образца на полноту извлечения ПХБ. Чем меньше частицы, тем выше скорость и эффективность экстракции. Известно, СЖЭ по некоторым параметрам превосходит УЖЭ в незначительной мере. При использовании метода СЖЭ получают значительно более чистые экстракты по сравнению с УЖЭ. Следует признать, что УЖЭ является более эффективной и экспрессной, чем методы экстракции, которые применялись до ее возникновения [1, 28, 70].

1.5.3. Сверхкритическая жидкостная экстракция

Известно, что эффективность экстракции определяется способностью переноса массы экстрагирующей средой. Жидкости в сверхкритическом состоянии характеризуются более высокими коэффициентами диффузии и более низкими коэффициентами вязкости по сравнению с жидкостями в обычном состоянии, поэтому они обладают повышенной способностью к массопереносу экстрагируемых соединений из сложных матриц. Поскольку жидкости в сверхкритическом состоянии характеризуются практически нулевым поверхностным натяжением, они смачивают частицы матрицы в значительной степени. СЖЭ наряду с ЭС успешно используется для определения ПХБ, ХБ и ХФ, ХОП, ПАУ в различных объектах природной среды. СЖЭ по сравнению с ЭС имеет ряд основных преимуществ, которые заключаются в экономии расхода органических растворителей, сокращении времени пробоподготовки и отсутствии необходимости очистки образца. Основным неудобством СЖЭ является контроль за большим числом физико-химических параметров процесса в постоянном рабочем состоянии.

Эффективность экстракции в значительной мере зависит от тщательного соблюдения параметров процесса. Поскольку растворяющая способность жидкости в сверхкритическом состоянии симбатно возрастает с плотностью при заданной температуре, при экстракции неполярных и малополярных веществ необходимо проводить процесс при низких давлениях, сильнополярных и тяжелых веществ □ при высоких давлениях. Количественной характеристикой растворителя в сверхкритическом состоянии является параметр растворимости Гилдебрандта [1].

Наиболее общепринятой экстракционной средой в СЖЭ является диоксид углерода CO_2 (применяется при выполнении более 90 % анализов), поскольку многие другие растворители создают ряд неудобств, хотя эффективность экстракции при их использовании может быть увеличена. Так, N_2O является взрывоопасным при контакте с органическими веществами, фреон экологически небезопасен. Преимущества CO_2 заключаются в низкой реакционной способности, негорючести и экологической безопасности. Кроме того, CO_2 обладает низкими критическими параметрами (32 °С, 7,4 МПа), просто получается в чистом виде сравнительно дешевым способом и легко отделяется от конечного экстракта. Вследствие низкой полярности CO_2 возникают проблемы с растворимостью при экстракции сильнополярных соединений. В таких случаях с целью устранения этого неудобства к CO_2 добавляют различные модификаторы (метанол, метилхлорид, толуол и др.), при этом большее влияние на эффективность экстракции имеет тип модификатора по сравнению с его концентрацией. Применение воды приводит к набуханию матрицы и повышению эффективности процесса. Часто применяют воду в смеси с метанолом, в таком случае метанол способствует растворению экстрагируемых соединений, а вода – набуханию матрицы. В некоторых случаях вода может отрицательно влиять на процесс экстракции.

В зависимости от химической природы analyта и матрицы используют разные растворители, давления, температуры и другие параметры [80]. В целом, в зависимости от лимитирующих стадий процесса, образцы можно разделить на

два типа: первый □ экстракция определяется стадией растворение/элюирование, второй □ стадией десорбция/кинетика. Примером процесса первого типа является экстракция большого количества жира из мяса, второго типа – экстракция следовых количеств СОЗ из донных отложений. Для эффективного извлечения аналитов из образцов первого типа необходимо создать благоприятные условия для повышения их растворимости. Для извлечения жира, содержащего целевые соединения, оптимальными условиями являются повышенное давление, относительно низкая температура и мелкий размер частиц матрицы [78□80]. Динамический вариант экстракции является более эффективным, чем статический. Поскольку определяемые соединения образцов второго типа намного сильнее связаны с матрицей, для их эффективного извлечения следует применять высокие температуры (100–300 °С), при которых активнее происходит разрыв связей образец□матрица. В данном случае, размер частиц матрицы не имеет существенного влияния на эффективность экстракции. Статический вариант экстракции аналитов из образцов этого типа по своей эффективности не уступает динамическому [80].

В дальнейшем выделение экстрагированных веществ проводят двумя способами – твердофазным или методом сбора экстрагирующей жидкости. В первом случае применяют твердые материалы – стекло, нержавеющую сталь и хроматографические сорбенты. Извлечение поверхностью стекла или стали происходит в результате криогенного охлаждения, а поверхностью и объемом хроматографических сорбентов – криогенного охлаждения и сорбции. При выборе сорбционных ловушек необходимо учитывать химическую природу сорбента, промывающего растворителя и температуру процесса. При жидкостном извлечении должен быть правильно выбран растворитель, поскольку его физико-химические свойства могут оказывать сильное влияние на эффективность извлечения, и оптимальная температура процесса. Для летучих соединений температура должна быть достаточно низкой. Необходимо правильно установить расстояние между ограничителем и дном приемника растворителя.

При выборе способа извлечения следует учитывать химическую природу исследуемых соединений. Для извлечения ХБ и ПХБ применяют методы твердофазной [28], углеводов – жидкостной экстракции.

В случае наличия свободного объема в ячейке экстракции, образец смешивают с вспомогательной матрицей, при этом достигается улучшение промывания матрицы растворителем, что позитивно сказывается на эффективности экстракции. В качестве материала вспомогательной матрицы применяют порошок меди или сульфат натрия [70], для удаления нежелательных примесей из экстракта в ячейку вводят оксид алюминия [2, 3].

При исследовании объектов окружающей среды важным техническим решением является объединение СЖЭ с хроматографическими методами анализа в единую систему, которая способна работать автоматически. Основным направлением в разработке методик анализа объектов окружающей среды является экспрессность анализа и повышение его селективности к целевым соединениям. Использование метода СЖЭ позволяет устанавливать оптимальные условия проведения экстракции (температура, давление в ячейке экстракции, правильный выбор модификаторов растворителя, применение вспомогательных сорбентов), при которых в конечный раствор попадает минимум балластных веществ, мешающих хроматографическому анализу. Так, авторы [81] при экстракции ПХБ из трансформаторного масла для удаления мешающих полярных соединений применяли оксид алюминия. В другом случае, эти же авторы использовали аналогичную процедуру в несколько стадий при разных температурах для определения отличающихся по летучести ПАУ с целью минимизации потерь при переэкстракции.

1.6. Исследование ПХБ и родственных соединений в объектах окружающей среды

Наиболее эффективным средством для решения сложных аналитических задач в объектах окружающей среды является использование селективных

методов детектирования. Различают два способа МСД органических соединений: режим SCAN □ по всем ионам в выбранном (определенном) диапазоне масс по полному ионному току; режим SIM □ по избранным (селективным) ионам (режим селективного мониторинга ионов) в определенном диапазоне масс по полному ионному току. Чувствительность детектирования соединений в таких режимах очень сильно различается. Так, чувствительность при определении ПХБ, экстрагированных из трансформаторного масла, в режиме SIM по избранным ионам в 15 раз выше, чем в режиме SCAN по всем ионам в таком же диапазоне масс. Такая чувствительность МСД сравнима с чувствительностью ЭЗД. В целом, по своей селективности масс-спектрометр в режиме SIM значительно превосходит ЭЗД. Идентификацию и определение изомерно-специфического состава ПХБ в режиме SIM обычно проводят по следующим характеристическим ионам с m/z : трихлор- – 256, 258, 260; тетрахлор- – 290, 292, 294; пентахлор- – 324, 326, 328; гексахлор- – 358, 360, 362; гептахлор- – 392, 394, 396; октахлор- – 426, 428, 430 [24, 28]. Полное разделение изомеров ПХБ осуществляют методом двухмерной хроматографии [2, 38□45] на основе летучести, полярности и геометрической формы молекул [38□43, 82]. Установлено, что улучшение селективности способствует повышению чувствительности методики определения.

Для повышения чувствительности определяемых соединений и получения надежных результатов необходимо проводить очистку образца от балластных веществ. При определении пестицидов и ПХБ в природных объектах методом ЕРА 3640А для очистки экстракта применяют гель-проникающую хроматографию [83]. Предложено два варианта очистки с использованием колонок с объемом сорбента 25 и 7,5 см³. Первый вариант позволяет очищать образцы объемом 5 см³. Второй, который является менее чувствительным по сравнению с первым, требует меньшего расхода органических растворителей и применяется для определения ПХБ методом ВЭЖХ с люминесцентным детектированием.

Важной проблемой является выбор стандартных изомеров ПХБ для

анализа, который зависит от числа атомов хлора в изомерах ПХБ, выделенных из реальных объектов исследования. При расчете общего содержания ПХБ учитывают вклад изомеров в пробы. По общей концентрации ПХБ проводят оценку их дисперсно-фазового распределения в естественных средах, а также персистентности, водной и липидной растворимости, биодоступности и токсичности [2, 28]. Вычисление общего содержания ПХБ проводят сравнением площадей пиков стандартной смеси с площадями соответствующих пиков на хроматограмме образца. В работах [37, 81, 84] указаны недостатки этого метода. В случае неудовлетворительного хроматографического разделения изомеров и мешающих определению соединений результат оказывается завышенным. Примером таких соединений являются фталаты. Отклик ЭЗД на них на порядок ниже, чем на ПХБ, но часто их концентрация в определяемых концентратах превосходит концентрацию целевых соединений. Хотя селективность МСД значительно выше по сравнению с ЭЗД [28], оно не разрешает проблему селективного детектирования изомеров с одинаковым числом атомов хлора в молекуле. К тому же, изомеры ПХБ отличаются по интенсивности отклика ЭЗД и МСД. Чувствительность ЭЗД к изомерам с большим числом атомов хлора возрастает, а масс-спектрометра в режиме ЭИ, наоборот, уменьшается. В режиме положительной химической ионизации также наблюдается разный отклик детектора на разные изомеры ПХБ. Применение атомно-эмиссионного детектора (АЭД), аналитический сигнал которого прямо пропорционален количеству атомов хлора в молекуле изомера, позволяет устранить указанные проблемы. Этот детектор не является селективным к изомерам хлорорганических соединений и обладает более низкой чувствительностью. Вклад в результат анализа мешающих соединений устраняют тщательной очисткой и вычитанием фона [28, 81, 83].

Известно, что некоторые изомеры ПХБ имеют повышенную токсичность и в связи с этим большой аналитический интерес при оценке загрязнения природных объектов представляет не только суммарная концентрация ПХБ, но и содержание наиболее опасных изомеров. Наибольшую токсичность в опытах

in vivo и *in vitro* на млекопитающих и людях проявили 12 изомеров ПХБ, фенильные группы которых размещены в одной плоскости (табл. 1.1) [85]. Самыми токсическими соединениями являются 2,3,7,8-ТХДД и 1,2,3,7,8-пентахлордibenзо-*n*-диоксин (1,2,3,7,8-ПХДД). Поскольку механизм токсичного действия копланарных ПХБ аналогичен механизму действия диоксинов, их токсичность выражают количественно в ТЕQ относительно 2,3,7,8-ТХДД или 1,2,3,7,8-ПХДД.

Таблица 1.1. Индекс токсичности для человека и млекопитающих

№ п/п	IUPAC Num	ПХБ	TEQ
1	81	3,4,4',5-тетрахлор	0,0001
2	77	3,3',4,4'-тетрахлор	0,0001
3	126	3,3',4,4',5-пентахлор	0,1
4	169	3,3',4,4',5,5'-гексахлор	0,01
5	105	2,3,3',4,4'-пентахлор	0,0001
6	114	2,3,4,4',5-пентахлор	0,005
7	118	2,3',4,4',5-пентахлор	0,0001
8	123	2',3,4,4',5-пентахлор	0,0001
9	156	2,3,3',4,4',5-гексахлор	0,0005
10	157	2,3,3',4,4',5'-гексахлор	0,0005
11	167	2,3',4,4',5,5'-гексахлор	0,00001
12	189	2,3,3',4,4',5,5'-гептахлор	0,0001

В связи с содержанием диоксинов, фуранов, диоксиноподобных изомеров ПХБ на следовом уровне, их идентификация и количественное определение являются сложными аналитическими задачами. Рассмотрим практические работы, выполненные в этой области, которые привели к существенному развитию аналитической химии соединений указанных классов.

Методами ГХ/МС (Finnigan 4500) для предварительного анализа и газовой хроматографии/масс-спектрометрии высокого разрешения (ГХ/МСВР) для окончательного доказательства авторы [86] еще в начале 80-х годов прошлого столетия в г. Онтарио провели комплексную проверку и мониторинг питьевой воды с целью определения диоксиноподобных соединений. Из 399

отобранных проб указанные токсиканты были обнаружены в 37, в том числе в 4 образцах обработанной воды.

Авторы работы [87] при исследовании сточных вод и донных отложений, в качестве внутренних стандартов использовали диоксиновые соединения, меченные изотопом ^{13}C . В 198 образцах из 200 были выявлены диоксины и фураны в количествах 0,1–304 ppb (мкг/кг). В работе [88] в качестве внутренних стандартов и суррогатов предложено использовать фтор- и иодзамещенные аналоги этих соединений, образующие при ЭИ другие фрагменты по сравнению с исходными соединениями.

В связи с высокой токсичностью копланарных ПХБ, возникла проблема определения их содержания в смеси изомеров. Методика определения копланарных изомеров ПХБ довольно сложна вследствие их низкого содержания по сравнению с другими ПХБ и требует применения специальных методов для их выделения. В работе [89] представлено два метода ВЭЖХ для выделения изомеров с атомами хлора в *орто*-положении, основанные на различном взаимодействии сорбент-сорбат. Первый предусматривает элюирование смесей через колонку с углем, второй – силикагелем, модифицированным ПАУ. Изомеры с большим числом атомов хлора в молекуле и атомами хлора в не-*орто*-положении, образуют более сильные электронные донорно-акцепторные взаимодействия с неподвижной фазой, чем копланарные ПХБ, и потому удерживаются дольше. Элюат анализируют методом ГХ/ЭЗД. Второй метод является более экспрессным по сравнению с первым: разделение происходит в течение 15 мин и требует меньшее количество органических растворителей. Элюат пригоден к анализу методами ГХ/ЭЗД и ГХ/МС [89].

Разработаны методы анализа диоксинов и фуранов, основанные на их способности связываться с рецептором протеина печени Ah и конкурентном связывании введенных молекул, меченных тритием. Концентрацию соединений определяли по радиоактивной метке культуры [90].

Существенный прорыв в анализе диоксинов и фуранов оказало развитие

технологий создания установок для их предварительного концентрирования, позволяющих проведение процесса экстракции из больших объемов воды (до 200 дм³) [91].

Установлены каталитические действия меди, железа и оксидов металлов в процессе образования преддиоксинов в присутствии воды, кислорода и соляной кислоты при высоких температурах до 430 °С [92].

Авторы [93] показали, что для определения диоксинов и фуранов применение различных вариантов метода тандемной масс-спектрометрии МС/МС дает возможность уменьшать мешающее влияние посторонних примесей по сравнению с методом МСВР. Данный метод становится альтернативным при определении суперэкотоксикантов.

Получены хорошие результаты при применении для очистки этилацетатного экстракта образца ПХБ из трансформаторного масла от полярных балластных соединений картриджа с оксидом алюминия. Выполнение работы оказалось возможным при использовании хромато-масс-спектрометра низкого разрешения HP5972A/MSD (MSD □ Mass Selective Detector, масс-селективный детектор) [94].

Показано значительно лучшее разделение пиков изомеров ПХБ при использовании для ввода образца on-column инжектора в колонки с внутренним диаметром 0,32–0,25 мм. При вводе пробы инжектор внезапно нагревается, что устраняет слияние соседних пиков и деградацию определяемых соединений. Практическое оснащение реализовано на приборах Agilent Technologies [95, 96].

При проведении идентификации соединений в образцах окружающей среды часто недостаточно применения одного метода масс-спектрометрии. Для идентификации и определения соединений в низких концентрациях большую роль играет наличие высокого фона и близких по химическому составу изомеров. В таких случаях возможны ошибки в точном установлении химического строения неизвестных соединений. Разработаны методологии общей обработки информации идентифицирующих детекторов (МСД, ИК-, АЭД) и данных газохроматографического разделения компонентов проб

неизвестного состава. Схема установления структуры неизвестного соединения заключается в том, что полученные при библиотечном поиске масс-спектров соединения-кандидаты, соответствующие заданному набору характеристик, поддаются последовательному анализу с помощью процедур-фильтров. Последние опираются на информацию, полученную с помощью других идентифицирующих детекторов и параметры хроматографического удерживания. В результате формируется согласованный перечень соединений, который не противоречит полученной информации о неизвестном соединении. Разработанный подход позволяет в какой-то мере получить вероятностную количественную оценку надежности проведенной идентификации [97].

Для определения ароматических и циклических углеводородов (дибензофуранов) в грунтах предложен метод EPA 8410A, основанный на использовании капиллярной ГХ с ИК-детектором с преобразованием Фурье (FT-IR), как альтернативный методу МСД в силу его недостаточной информативности. Хроматографы Agilent Technologies оснащены IRD-детектором, который позволяет получать ИК-спектры в газовой фазе и проводить поиск неизвестных соединений по базам данных ИК-спектров [98].

1.7. Стойкие органические загрязняющие вещества в воде и донных отложениях

Известно, что из объектов водных систем донные отложения в наибольшей степени накапливают СОЗ и затем становятся источником поступления их в воду.

Уровни загрязнения поверхностных донных отложений, взятых в районе дельты р. Дунай в местах впадения в Черное море, оценены по некоторым ХОП [99]. Концентрация ГХЦГ достигает самой высокой обозначенной глобальной черты \square более 40 нг/г массы сухого вещества. Отношение между концентрациями α - и γ -изомеров оказалось низким, что свидетельствует о применении линдана. Концентрации суммы ДДТ и его метаболитов ДДЭ

(дихлордифенилдихлорэтилен) и ДДД (дихлордифенилдихлорэтан) (0,06–0,72 нг/г массы сухого вещества) и ПХБ (0,06–72 нг/г массы сухого вещества) имели средние значения по сравнению с мировыми уровнями. Отношение ДДЭ/ДДТ было низким, что указывает на свежие поступления ДДТ в этом регионе.

В работе [100] приведены уровни содержания ПХБ, суммы ДДТ и его метаболитов и гексахлорбензола (ГХБ) в донных отложениях Средиземного моря. Данные за период 1971–2005 гг. были обобщены и оценены относительно их основного перемещения и нагрузки на окружающую среду. Обнаружено уменьшение концентрации суммы ДДТ и его метаболитов вследствие более эффективного регулирования применения этих пестицидов.

Определены уровни содержания 16 ПАУ, 12 индивидуальных ПХБ и 18 ХОП в воде и донных отложениях р. Tonghui в Beijing (Китай) [101]. Общие уровни содержания ПАУ, ПХБ и ХОП составляли соответственно: в воде – 192,5–2651, 31,58–344,9 и 134,9–3788 нг/дм³, верхнем слое донных отложений – 127–928, 0,78–8,47 и 1,79–13,98 нг/г массы сухого вещества. Концентрации определяемых соединений значительно выше в донных отложениях, чем в воде. Из ПАУ в воде доминируют двух- и трехкольцевые, в донных отложениях – трех- и четырехкольцевые соединения. ГХЦГ (α -, δ -изомеры), гептахлор, эндосульфат II, ДДТ являются преобладающими соединениями в воде. Гептахлор, дильдрин и ДДЭ составляют 95 % общей концентрации ХОП в донных отложениях. Среди ГХЦГ α -изомер преобладал в воде и донных отложениях. В воде доминировали ПХБ 18, 31 и 52, среднее значение их суммы составляло 67 % общего уровня содержания ПХБ. В донных отложениях 71 % суммарной концентрации приходилось на ПХБ 28, 31 и 153. Представленные уровни загрязнения сравнены с данными других авторов.

В работе [35] выполнена оценка загрязнения донных отложений р. Днестр и его притока р. Буг в 2001 г. (Молдова) ХОП, фосфорорганическими соединениями (ФОС) и ПХБ. Общее содержание ДДТ и его метаболитов находилось в интервале 8,2–34,7 нг/г массы сухого вещества с самой высокой средней концентрацией в притоке реки. Другие пестициды определены в

следующих концентрациях: гептахлорэпоксид – < 0,2–3,0, хлордан – < 0,1–6,1, эндрин – < 0,2–2,5, фосалон – < 0,2–1,1, метилпаратион – < 0,2–16,8 нг/г массы сухого вещества. Общая концентрация ПХБ находилась в интервале 68–763 нг/г массы сухого вещества. Преимущественное содержание составляли индивидуальные изомеры ПХБ: 28, 37 (трихлор-), 44, 49, 52, 74, 77 и 81 (тетрахлор-) и 170 (гептахлор-). Суммарная концентрация ДДЭ (19,7 нг/г массы сухого вещества) в притоке, гептахлорэпоксида (3,0 нг/г массы сухого вещества) в низовьи реки во всех точках превышала установленный для речных донных отложений допустимый уровень нагрузки (Probable Effect Level, PEL), что указывает на неблагоприятный эффект для бентосных организмов придонного слоя.

Проведено определение 16 приоритетных ПАУ в водных образцах из р. Jinsha (Panzhihua), Юго-Восточная часть Китая [102]. Концентрации растворимых ПАУ находились в интервале 21,89–382,8 мкг/дм³. Показано, что их концентрации уменьшаются вдоль направления потока и уровни загрязнения значительно выше, чем определенные уровни в Китае и других странах. Бензо(*k*)флюорантен и индено(1,2,3-*cd*)пирен идентифицированы во всех водных образцах и их средняя суммарная концентрация составляла 98,3 % общего содержания растворимых ПАУ. Установлена симбатная корреляция между суммарной концентрацией ПАУ и концентрацией этих соединений. Обобщение результатов показало, что увеличение углеводородного загрязнения связано с развитием угольной промышленности в этом регионе за последние 20 лет.

В работе [103] представлены обобщенные результаты по определению концентраций 18 ХОП, используемых в Китае, в воде, речных донных отложениях, почве и растениях, которые соответственно составляют 187–893 нг/дм³, 8,53–210, 2,66–13,45 и 651–2823 нг/г массы сухого вещества. Во всех пробах преобладал β -ГХЦГ, поскольку этот изомер является более резистентным к биодegradации. Средние концентрации этого изомера составляют соответственно 44, 53, 50 и 46 % суммы ГХЦГ в воде, почве,

донных отложениях и растениях. ДДЭ в этих же объектах составляет 48, 43, 53 и 55 % суммы ДДТ как более стабильный метаболит. Уровни содержания ГХЦГ и ДДТ и его метаболитов в р. Wuchuan превышали нормы, предусмотренные ЕС Environmental Quality Standards, хотя были ниже значений, предусмотренных руководством норм Китая.

В работе [104] проведено определение ПАУ, нефтепродуктов, ПХБ, ХОП и диоксиноподобных соединений в морских донных отложениях, отобранных в 16 прибрежных станциях в 2003 г. в районе дельты р. Pearl (Китай). Концентрации ПАУ, ПХБ, нефтепродуктов, ДДТ и его метаболитов в образцах донных отложений соответственно составляют: 94–4300, 6–290 нг/г, 14–150 мкг/г и 1,4–600 нг/г массы сухого вещества. Токсический эквивалент относительно 2,3,7,8-ТХДД образцов донных отложений находился в интервале 0,3–440 пг ТХДД-EQ/г. Предварительный анализ выполнен с целью оценки вероятности риска СОЗ для морской экосистемы района Xiashan. Результаты исследований показали, что СОЗ в этом регионе представляют угрозу для морских гидробионтов.

Разработана, апробирована и применена методика пробоподготовки, идентификации и определения 16 приоритетных ПАУ методом ГХ/МС в морских донных отложениях из района Одесского залива [105, 106]. Суммарное содержание ПАУ находилось в интервале 615–2477 мкг/кг массы сухого вещества. Среди идентифицированных ПАУ в наиболее высоких концентрациях определены, мкг/кг: бенз(а)пирен – 11–239; флуорантен – 90–407; пирен – 66–322; хризен – 59–228, что свидетельствует об антропогенной нагрузке на акваторию Черного моря в этом регионе. С применением этой же методики выполнено исследование ПАУ в донных отложениях эстуариев р. Дунай [107]. Суммарное содержание находилось в интервале 329,6–1093,3 мкг/кг массы сухого вещества. Оценена эквивалентная токсичность относительно бенз(а)пирена, которая для данного интервала концентраций составляла 34,9–195,1 мкг/кг.

1.8. Стойкие органические загрязняющие вещества в гидробионтах

Рассмотрим несколько примеров накопления СОЗ разными биологическими объектами водных систем.

Биодоступность. Определены уровни содержания СОЗ (ДДТ и его метаболиты, 24 индивидуальных соединения ПАУ, ПХБ, нефтепродукты) в двухстворчатых рапанах восточного побережья Китая (2001 г., реки Pearl и дельта Yangtze) [108], которые составляли соответственно 14–640, 456–3495, 1–13 нг/г и 621–2863 мкг/г массы сухого вещества. Сравнение уровней содержания этих СОЗ показало, что более загрязненными регионами Китая являются Shanghai и Qingdao.

Проанализировано 62 образца рыбы (10 видов), отловленной в озере Онтарио в 1980 г., с целью определения ТХДД [109]. Диоксин определен в 7 видах, уровни его содержания находились в интервале 2–39 нг/кг, причем в 5 образцах они превысили 20 нг/кг. Зафиксированы также высокие концентрации ПХБ (> 1 мг/кг). Высокие уровни загрязнения рыбы диоксинами и ПХБ непосредственно связаны с повышенным содержанием жира в тканях (> 3 %).

В 1982–1984 г.г. на примере биологических тканей полярного медведя изучено загрязнение канадских арктических и субарктических морских экосистем хлорорганическими соединениями, в которых методом ГХВР/МС идентифицированы ГХЦГ, ДДТ и его метаболиты, дильдрин, ХБ, ПХБ, хлорданы, нонахлор-III. Концентрации ПХБ и хлорданов в жировой ткани находились в интервале 3,24–8,25 и 1,81–7,09 мг/кг и составляли более 80 % общей концентрации токсикантов. Около 93 % суммы ПХБ в жире приходилось на 6 изомеров (ПХБ 99, 153, 138, 180, 170, 194). Наблюдалось географическое распределение хлорорганических соединений, их уровни содержания увеличивались от северных областей к южным. По сравнению с 1969 г. в тех же самых областях концентрация хлорданов увеличилась в 4 раза, других хлорорганических соединений – в 2 раза, ДДТ и его метаболитов не изменилась и находились в интервале 0,12–1,19 мг/кг [110]. Поскольку полярный медведь

(*Ursus Maritimus*) является верхним звеном трофической цепи фитопланктон–зоопланктон–рыба–тюлень, данная работа убедительно показывает пример биологически сконцентрированных суперэкоотоксикантов в арктической морской экосистеме.

В работе [111] определены концентрации ГХЦГ, ДДТ, ХБ, ПХБ, хлорданов, токсафенов в тканях и жире арктической трески, полярных медведей и кольчатых тюленей из восточно-центрального побережья Канады. На примере ПХБ прослежено биоконцентрирование по пищевой цепи: три- и тетрахлоризомеры преобладали в тканях рыбы, пента- и гексахлоризомеры – тюленей, гекса- и гептахлорбифенилы – медведей. Суммарные уровни содержания токсикантов соответственно составляли 0,0037, 0,68 и 4,5 мг/кг массы влажного вещества в мышцах трески, печени тюленей и жире медведей. Прослежено уменьшение количества изомеров ПХБ по трофической цепи, что свидетельствует о более низких скоростях метаболизма более хлорированных изомеров и *орто*-замещенных изомеров (2,6,2',6'-углероды). Отмечено, что морские млекопитающие преимущественно неспособны метаболизировать 2,5- (ПХБ 52 и 101), 2,3,6-замещенные изомеры (ПХБ 149) и высокохлорированные изомеры (ПХБ 170, 201 и 196/203). Показано также, что изомерно-специфический состав в образцах полярных медведей отличается от того, который наблюдают в любых других наземных и морских млекопитающих. Это свидетельствует о разных механизмах метаболизма ПХБ. Наблюдалось снижение концентраций СОЗ в 1980-х годах по сравнению с 1970-ми годами.

Изучено накопление 2,3,4,7,8-пентахлордибензофурана (ПeХДФ) молодой радужной форелью (*Onchorhynchus mykiss*) [112]. Рыбу кормили в течение 31 дня пищей, зараженной данным соединением, меченным изотопом ¹⁴C в концентрациях 9,0 и 0,82 нг/г. Затем отслеживали выведение из организма ПeХДФ на протяжении 180 дней. Степень усвояемости ПeХДФ составила соответственно 44 и 41 %. Определение ПeХДФ в экстрактах толуола из тканей рыбы выполняли методом радиоактивности (подсчет жидкостной сцинтилляции) и методом ГХ/ЭЗД. Предел обнаружения для метода

жидкостной сцинтилляции составил 0,05 нг/г, для ГХ/ЭЗД – 0,5 нг/г.

В аналогичном исследовании [113] молодую радужную форель кормили пищей, зараженной 2,3,7,8-тетрахлордибензофураном ($[^3\text{H}]\text{ГХДФ}$), меченым тритием, в концентрациях от 0,36 до 42,8 нг/г. Изучали аккумуляцию, распределение в тканях, биотрансформацию и индукцию печеночного монооксигеназного энзима. Эффективность ассимиляции составила 49–62 % за период 30 дней и не зависела от концентрации в диете. Полученные данные могут использоваться для построения модели биоаккумуляции данных соединений. В организме рыб устанавливается равновесие между поступлением в организм токсических веществ с пищей и их выведением. Для хищных рыб и тех, которые питаются бентосными организмами придонного слоя, это равновесие может быть критичным для выживания.

Копланарные ПХБ. ПХДД, ПХДФ и не-орто-ПХБ исследовали в жире рыбы, выпускаемом в качестве пищевой добавки в Испании. Использовали методику препаративного выделения модифицированным силикагелем и активированным углем в сочетании с экстракцией *on-column* для отделения целевых соединений от жира. Затем экстракты были доочищены на колонках с Florisil и проанализированы методом ГХВР/МСВР. Определены следующие концентрации: 10,50 и 9,95 нг/кг соответственно ПХДД и ПХДФ. Факторы эквивалентной токсичности для ПХДД/ПХДФ в жировой основе составили 2,11 нг/кг. Концентрация ПХБ 77, 126 и 169 составила 18,26 нг/кг, а эквивалентная токсичность – 0,31 нг/кг [114].

Из соединений данного класса к самым токсичным относят копланарные ПХБ. Потребление рыбы в пищу – один из основных источников попадания диоксиноподобных веществ в организм человека. В водных экосистемах вклад копланарных ПХБ в общую токсичность в диоксиновом эквиваленте превосходит вклад ПХДД и ПХДФ вместе взятых [115–118]. Хотя индексы эквивалентной токсичности копланарных ПХБ на порядки ниже, чем ПХДД и ПХДФ [85], их концентрации в тканях гидробионтов и донных отложениях существенно выше и достигают уровня значений нескольких мкг/кг массы

сухого вещества, а в организмах высшей трофической цепи – даже нескольких мг/кг массы сухого вещества. Их вклад в общую диоксиновую токсичность в тканях гидробионтов может составлять до 80 %. Остальные 20 % приходятся на долю ПХДД и ПХДФ. Токсичность 12 копланарных ПХБ на порядки превосходит токсичность всех остальных изомеров. Среди копланарных ПХБ наибольший вклад в величину токсичности (до 99 %) обычно вносят изомеры 3',3',4,4'-тетра-, 3,3',4,4',5-пента- и 3,3',4,4',5,5'-гексахлорбифенилы [85, 116, 117]. Первый из них, обладая относительно низкой токсичностью, встречается в окружающей среде в высоких концентрациях, второй – самый токсичный, как правило, вносит больше половины суммарной токсичности ПХБ [116, 117]. На более высоких уровнях пищевой цепи соотношение может быть другим из-за разной скорости метаболизма изомеров в разных живых организмах [115].

Проведено исследование воздействия ПХБ, ПХДФ, ПХДД на две отдаленные приморские группы населения. Эти группы характеризуются высоким употреблением рыбных продуктов. Первая группа – 109 женщин эскимосского происхождения из Северного Квебека (целевые соединения определяли в молоке); вторая группа – 185 мужчин-рыболовов европейского происхождения из северного побережья залива Святого Лаврентия (целевые соединения определяли в крови) [115]. Показано, что концентрации некоторых изомеров ПХБ, в том числе не-орто-замещенных в молоке эскимосских женщин в 3×10 раз выше, чем в молоке обычных канадских женщин европейского происхождения. Концентрации ПХДД и ПХДФ отличаются незначительно. Уровни токсичности в диоксиновом эквиваленте для ди-орто-замещенных, моно-орто-замещенных, не-орто-замещенных ПХБ и суммы ПХДД/ПХДФ составили 17,3; 58,7; 32,2; 19,1 нг/кг в молоке эскимосских женщин и 2,1; 17,4; 9,8; 13,3 нг/кг в молоке обычных канадских женщин европейского происхождения. Копланарные ПХБ были определены только в 10 образцах крови мужчин-рыболовов. В этих образцах были зафиксированы самые высокие суммарные концентрации изомеров ПХБ. Уровень токсичности копланарных ПХБ в диоксиновом эквиваленте составил 900 нг/кг, что в 30 раз

выше, чем в контрольных образцах.

С помощью ранее разработанной методики были определены 12 не-орто-замещенных и моно-орто-замещенных копланарных ПХБ в 30 образцах рыбы (полосатого окуня) из дельты р. Гудзон и пролива Лонг-Айленд-Саунд, а также в 8 образцах мидий из пролива Лонг-Айленд-Саунд [116]. Все точки отбора проб находились в штате Нью-Йорк. В образцах рыбы концентрации не-орто-замещенных ПХБ составили 0,2–37,1 нг/г. Самые высокие концентрации были зафиксированы в образце рыбы из г. Трой (3,3',4,4'-тетрахлорбифенила □ 37,1 нг/г и 3,3',4,4',5-пентахлорбифенила □ 7,5 нг/г). Концентрации моно-орто-замещенных ПХБ составили 0,4–790 нг/г, причем самые высокие концентрации обнаружены для 2,3',4,4',5-пентахлор- и 2,3,3',4,4'-пентахлорбифенилов. Показано, что наибольший вклад в общую диоксиновую токсичность вносят изомеры 3,3',4,4'-, 3,3',4,4',5-, 2,3,3',4,4'-ПХБ. Следует отметить, что вклад копланарных ПХБ в диоксиновую токсичность намного выше, чем вклад ПХДД и ПХДФ. Так, в образце рыбы из г. Трой уровни общей диоксиновой токсичности ПХБ и 2,3,7,8-ГХДД составили соответственно 3000 и 20 нг/кг.

Проанализированы образцы жировой ткани 36 видов животных, включая рыб, морских (кит, дельфин, морская свинья) и наземных (собака, кот, человек) млекопитающих с целью определения высокотоксичных копланарных ПХБ □ 3,3',4,4'-тетрахлор-; 3,3',4,4',5-пентахлор-; 3,3',4,4',5,5'-гексахлор- [117]. Целевые соединения были детектированы во всех образцах. Концентрации составили от нескольких пг/г до нг/г. В большинстве образцов концентрация ПХБ уменьшалась в ряду: 3,3',4,4'-тетрахлор- > 3,3',4,4',5-пентахлор- > 3,3',4,4',5,5'-гексахлор-. Самые высокие концентрации – 40 нг/г для 3,3',4,4'-тетрахлор-, по 4 нг/г для 3,3',4,4',5-пентахлор- и 3,3',4,4',5,5'-гексахлор- – были зафиксированы в образце жира кита из побережья Тихого океана около Японии [117]. В целом, концентрации исследуемых копланарных ПХБ оказались на 3–5 порядков ниже, чем общая концентрация ПХБ. Также обнаружена корреляция между общей концентрацией ПХБ и концентрацией каждого из копланарных ПХБ во всех образцах млекопитающих. Это подтверждает, что главным

источником копланарных ПХБ являются коммерческие смеси (например, арохлоры, канехлоры). Следует отметить, что в образцах рыб соотношение исследуемых ПХБ такое же как в коммерческих препаратах: 3,3',4,4'-тетрахлор- \square около 95 %; 3,3',4,4',5-пентахлор- \square 5 %; 3,3',4,4',5,5'-гексахлор- \square меньше 1 %. В образцах наземных млекопитающих доля 3,3',4,4'-тетрахлоризомера несколько ниже. Это свидетельствует, что высшие млекопитающие могут метаболизировать 3,3',4,4'-тетрахлор- и в некоторой степени 3,3',4,4',5-пентахлоризомеры. Способность к метаболизму данных соединений у наземных млекопитающих выше, чем у морских. В человеческих тканях концентрация копланарных ПХБ оказалась выше, чем концентрация 2,3,7,8-ТХДД и 2,3,4,7,8-ПеДБФ и других токсических изомеров данного класса. Определена токсичность трех исследуемых соединений в диоксиновом эквиваленте и показано, что 3,3',4,4',5-пентахлорбифенил представляет большую угрозу для животных, чем диоксины и фураны.

В работе [118] проведено определение концентраций ПХДД, ПХДФ и копланарных ПХБ в образцах прибрежной и коммерческой рыбы из Японии методом ГХ/МС в режиме SIM. При этом уровень определения целевых соединений составил 0,01–0,1 нг/кг массы влажного вещества. Копланарные ПХБ, 2,3,7,8-ТХДД и 2,3,7,8-ТХДФ были обнаружены во всех исследуемых образцах рыбы. В образцах прибрежной и коммерческой рыбы суммарные концентрации копланарных ПХБ составили соответственно 290–1500 и 0,4–170 нг/кг массы влажного вещества; токсические эквиваленты суммы ПХДД и ПХДФ \square 0,63–1,41 (среднее значение: $0,87 \pm 0,28$) и 0,01–0,86 ($0,33 \pm 0,25$) нг/кг массы влажного вещества; средние значения токсического эквивалента суммы копланарных ПХБ \square $9,4 \pm 7,3$ и 0,22 нг/кг массы влажного вещества. Из работы следует, что в образцах прибрежной рыбы токсический эквивалент суммы копланарных ПХБ намного выше, чем суммы ПХДД и ПХДФ.

Разработана методика определения трех не-орто-замещенных копланарных ПХБ (3,3',4,4'-тетрахлор-; 3,3',4,4',5-пентахлор-; 3,3',4,4',5,5'-гексахлор-), которая состоит из следующих стадий: 1 – экстракция раствором

щелочи в спирте; 2 – отделение целевых соединений гексаном; 3 – твердофазная экстракция (в качестве сорбента применяли активированный уголь; элюирование проводили в 2 этапа: первую фракцию элюировали 20 % -ным раствором дихлорметана в гексане; вторую фракцию элюировали 50 % -ным раствором бензола в этилацетате; целевые соединения оказались во второй фракции); 4 – очистка экстракта дымящей серной кислотой; 5 – анализ экстракта методом ГХ/ЭЗД и подтверждение результатов методом ГХ/МС [119]. Данная методика позволяет определять целевые соединения на уровне нг/кг в биологических образцах, причем влияние других токсических соединений сводится к нулю. По этой методике был проанализирован образец жира беспёрой морской свиньи и определены концентрации ПХБ □ 3,3',4,4'-тетрахлор-; 3,3',4,4',5-пентахлор-; 3,3',4,4',5,5'-гексахлор- соответственно на уровне 13,5; 0,89; 0,64 нг/г. Приведенные результаты в работе впервые свидетельствуют об обнаружении этих трех изомеров ПХБ в организме высшего млекопитающего, являющегося представителем дикой природы.

Разработана методика определения 4 *орто*-незамещенных и 8 моно-*орто*-замещенных копланарных ПХБ в образцах рыбы [120]. Методика состоит из таких стадий: экстракция гексаном; очистка гексанового экстракта концентрированной серной кислотой; выделение целевых соединений с помощью колонки с сорбентом (активированным углем); анализ концентрата методом ГХ/ЭЗД и подтверждение полученных результатов методом ГХ/МС. Данная методика позволяет определять копланарные ПХБ на уровне нг/кг. Методика была апробирована на образцах рыбы из р. Гудзон и Нью-Йоркской бухты. В этих образцах суммарная концентрация *орто*-незамещенных и моно-*орто*-замещенных копланарных ПХБ составила 0,16–1,7 мкг/г.

Исследователи провели определение трех не-*орто*-замещенных копланарных ПХБ (номер 77, 126, 169) и 39 других конгенов ПХБ в донных отложениях и гидробионтах оз. Эри в Пенсильвании летом 1991 г. [121]. С целью оценки распределения ПХБ между трофическими уровнями пищевой цепи исследовали бентосную (рыбы, обитающие на дне) и пелагическую (рыбы,

обитающие на поверхности) составляющие. Показано, что изомер 126 содержится в сравнительно больших концентрациях в бентосных рыбах и рыбах-хищниках из поверхностного слоя, в тоже время нет существенных различий в концентрациях изомера 77 между бентосными и поверхностными рыбами. Изомер 169 детектирован в очень низких концентрациях в образцах некоторых видов. Изучали также распределение копланарных ПХБ между яйцами, печенью, мышечной тканью рыбы, но не смогли установить четкую тенденцию для всех видов. Установлено, что бионакопление характерно для всех изомеров ПХБ, но лучше всего происходит бионакопление соединений с высоким коэффициентом распределения октанол-вода, т.е. более гидрофобных изомеров.

Проведено определение 44 индивидуальных изомеров ПХБ в растворе и суспендированных частицах Балтийского моря. Исследование проходило в три этапа: ноябрь 1988, ноябрь 1989 и весна 1991 г.г. Предел определения используемой методики составил $0,05 \text{ пг/дм}^3$. Сначала значительные объемы воды (от 65 до 1143 дм^3) пропускали сквозь фильтр GF/C. Затем отфильтрованную фазу пропускали через колонку с сорбентом XAD-2. После элюирования разные классы органических соединений разделяли методом ВЭЖХ. Выделенную фракцию целевых соединений анализировали методом ГХ/ЭЗД. Целевые соединения с фильтров экстрагировали гексаном в аппарате Сокслета в течение 3 ч. [122]. Концентрации индивидуальных изомеров ПХБ в воде оказались на уровне десятых или нескольких пг/дм^3 , а их сумма составила от 2 до 237 пг/дм^3 . Эти концентрации оказались значительно ниже зафиксированных ранее. Самые высокие концентрации были определены в Бельтском море и Финском заливе, а самые низкие концентрации – в период продуцирования планктона (весной 1991 г.). Концентрации индивидуальных изомеров ПХБ в суспендированных частицах составили $0,1\text{--}0,5 \text{ пг/дм}^3$, а их сумма $\square 4\text{--}6 \text{ пг/дм}^3$. Аномально высокие концентрации зафиксированы в Бельтском море весной 1991 г. (суммарная концентрация ПХБ – 2859 пг/дм^3) в период массового цветения воды. Не-орто-замещенные ПХБ были найдены в

очень низких концентрациях (на уровне предела определения). В больших концентрациях были найдены моно- и ди-*орто*-замещенные ПХБ. В диоксиновом эквиваленте суммарная токсичность ПХБ составила 0,01–12 фг/дм³, а наибольший вклад внесли изомеры с номерами 77, 118, 105, 156.

ПХДД, ПХДФ и копланарные ПХБ были определены в 12 образцах донных отложений и 8 образцах рыбы в р. Эр-Жен, которая является одной из наиболее загрязненных в Тайване [123]. Все образцы были отобраны недалеко от места сжигания отходов. Уровень диоксиновой токсичности в донных отложениях для суммы ПХДД/ПХДФ составил от 14 до 14200 пг/г, а для копланарных ПХБ – от 9 до 1030 пг/г. Самая высокая концентрация ПХДД, ПХДФ и копланарных ПХБ зафиксирована в образце, взятом на середине реки напротив места сжигания отходов. В этом образце 90 % общей диоксиновой токсичности приходится на сумму ПХДД и ПХДФ. Показано, что главным источником загрязнения р. Эр-Жен является сжигание отходов на открытом воздухе. Уровень диоксиновой токсичности в рыбах для суммы ПХДД и ПХДФ составлял от 37 до 2084, а для копланарных ПХБ – от 12 до 120 пг/г. Несмотря на то, что концентрация 3,3',4,4'-тетрахлорбифенила (ТеХБ) выше, чем 3,3',4,4',5-пентахлорбифенила (ПеХБ), последний вносит самый большой вклад среди ПХБ в общую диоксиновую токсичность. В отличие от образцов донных отложений в образцах рыбы концентрации ПХБ (в том числе копланарных) слабо коррелируют с концентрациями ПХДД и ПХДФ.

Установлены концентрации ПХДД, ПХДФ, копланарных ПХБ, ПБДЭ в образцах рыбы из залива Сан-Франциско (2000 г.) и побережья Калифорнии (2001 г.) [124]. Эти образцы состояли только из съедобных частей рыбы. Всего было проанализировано 65 образцов на наличие ПХДД, ПХДФ, копланарных ПХБ и 43 образца с целью определения ПБДЭ. Для рыб всех видов средняя суммарная концентрация ПБДЭ под номерами 47, 99, 100, 153, 154 составила 302 нг/г жира; средняя диоксиновая токсичность ПХДД и ПХДФ \square 33,1 пг/г жира; средняя диоксиновая токсичность суммы копланарных ПХБ (77, 126, 169) \square 109 пг/г жира. Самые высокие концентрации ПХДД, ПХДФ,

копланарных ПХБ и ПБДЭ зафиксированы в плотнозаселенных местах (залив Сан-Франциско, залив Сан-Диего, территория около Лос-Анджелеса).

Работа [125] выполнена с целью определения содержания ПХДД, ПХДФ, копланарных ПХБ, гексахлорированных нафталинов, ПХДЭ и некоторых алкилхлорароматических соединений в образцах щуки, окуня, леща в р. Кумийоки (Финляндия). Известно, что некоторые хлорорганические соединения образуются в процессе производства целлюлозы, например, алкилполихлорфенантрены, алкилполихлорнафталины, алкилполихлордибензила. Поэтому для изучения распространения этих соединений в гидробионтах образцы рыбы были отобраны недалеко от сточных трубопроводов целлюлозных заводов. Среди ПХДД и ПХДФ был найден только 2,3,7,8-ТХДФ на уровне 2–12 пг/г массы сухого вещества, причем самые высокие концентрации были зафиксированы в щуках. Среди копланарных ПХБ обнаружены 3,3',4,4'-ТеХБ (8–73 пг/г) и 3,3',4,4',5-ПеХБ (2–5 пг/г). При этом не замечено разницы в концентрациях между видами рыб. Гексахлорированные нафталины определены во всех образцах рыб на уровне 4–73 пг/г. Алкилхлорароматические соединения, источником которых являются сбросы целлюлозной промышленности, слабо биоаккумулируются рыбами, и поэтому не были обнаружены в большинстве образцов. ПХДЭ были найдены во всех образцах рыб на уровне нескольких десятков нг/г массы жировой ткани.

Установлено распределение ПХДД, ПХДФ и копланарных ПХБ между тканями в организмах женщин до, во время и после рождения ребенка. Для этого было отобрано по 6 образцов тканей (кровь перед родами; жировая ткань, пуповинная кровь и плацента во время кесаревого сечения; кровь и молоко после родов) 5 женщин из штата Нью-Йорк. Средняя суммарная концентрация ПХДД, ПХДФ и копланарных ПХБ составила соответственно 352 пг/г в жировой ткани, 526 пг/г в крови перед родами, 182 пг/г в плаценте, 165 пг/г в пуповинной крови, 352 пг/г в крови после родов и 220 пг/г в молоке. Средний уровень диоксиновой токсичности составил 11,6 пг/г жировой ткани, 12,1 пг/г крови перед родами, 10,5 пг/г плаценты, 5,8 пг/г пуповинной крови, 10,0 пг/г

крови после родов и 10,2 пг/г молока. Следует отметить, что большая часть диоксиновой токсичности приходится на ПХДД, среди которых преобладал октахлордибензодиоксин [126].

Определены 47 *орто*-замещенных и 7 не-*орто*-замещенных ПХБ в образцах донных отложений, воды, беспхребетных животных и рыбы из бухты Кэмбридж на севере Канады с целью изучения транспорта этих загрязняющих веществ от воды и донных отложений к низшим, а затем высшим организмам по трофической цепи. Поскольку бухта Кэмбридж загрязнена смесью ПХБ под коммерческим названием Aroclor 1254, то распределение изомеров в донных отложениях является подобным распределению в смеси Aroclor 1254. В целом, суммарные концентрации ПХБ в донных отложениях и воде составили соответственно 0,14–45 мкг/кг, 0,045–1,8 нг/дм³. Суммарные концентрации ПХБ в образцах двустворчатых моллюсков, морских ежей и амфиподов составили соответственно 0,89–3,2, 1–210, 32–36 мкг/кг. Повышенная концентрация ПХБ в образцах морских ежей объясняется тем, что они питаются органическим материалом донных отложений. Показано, что в образцах морских ежей пропорциональные концентрации низкохлорированных (три- и тетра-) и высокохлорированных (окта- и нона-) ПХБ намного выше, чем в донных отложениях [127]. Отмечено, что суммарные концентрации ПХБ в образцах рыбы (7,3–230 мкг/кг, четырёхрогие бычки; 1,4–38 мкг/кг, гренландская треска; 4,4–39 мкг/кг, арктическая форель) примерно такие же, как в других местах Арктики. В образцах бычков преобладает (68–92 %) небольшое число изомеров с атомами хлора в *para*-позициях на обоих кольцах (номер 153, 138, 118, 180, 128, 105, 170). Показано, что пропорциональная часть копланарных ПХБ (номер 77, 126) с повышением трофического уровня организмов скорее понижается, чем повышается (например, при переходе от морских ежей до бычков). Изомер 169 вообще не был идентифицирован ни в одном образце бычков.

Биоаккумуляция. Ряд хлорорганических соединений (ПХБ, ДДТ и его метаболиты, хлорданы, изомеры ГХЦГ, ХБ) были определены в образцах жира

трех видов тюленей (гренландский, кольчатый и морской заяц), а также в образцах рыб и беспозвоночных животных из Белого моря в течение 1998–2001 г.г. Самые высокие суммарные концентрации ПХБ и ДДТ, соответственно 4150 и 3950 нг/г, были обнаружены в образцах морских зайцев (самцов). Средняя суммарная концентрация ПХБ и ДДТ в образцах гренландских тюленей (самок) составила соответственно 1070 ± 504 и 619 ± 328 нг/г. Примерно такие же концентрации ПХБ и ДДТ как в образцах гренландских тюленей были зафиксированы в образцах самок и самцов кольчатых тюленей, соответственно 955 ± 385 и 999 ± 304 нг/г. Самые низкие суммарные концентрации хлорданов обнаружены в образцах самок кольчатых тюленей $\square 63 \pm 28$ нг/г, а самые высокие в образцах морских зайцев $\square 465$ нг/г. Изомеры ГХЦГ и ХБ также были найдены во всех проанализированных образцах тюленей, но в меньших концентрациях. Следует отметить, что во всех образцах тюленей из всех ПХБ в наибольших концентрациях были найдены гексахлорбифенилы. Показано, что суммарные концентрации ПХБ, ДДТ и хлорданов в образцах кольчатых тюленей Белого моря примерно равны концентрациям в образцах Баренцевого моря, но ниже, чем в образцах Карского моря. На примере образцов гренландских тюленей было проанализировано изменение концентрации хлорорганических соединений в гидробионтах Белого моря во времени и обнаружено значительное снижение суммарных концентраций ПХБ (на 60 %) и ДДТ (на 33 %) за 6 лет с 1992 по 1998 г.г. [128]. Среди всех хлорорганических соединений в образцах пяти видов рыб Белого моря (навага, европейский керчак, треска, сельдь, корюшка) в наибольших концентрациях найдены ПХБ и ДДТ. Самая высокая суммарная концентрация ПХБ обнаружена в образцах наваги 41 ± 28 нг/г. Также были проанализированы образцы беспозвоночных животных (равноногие и веслоногие ракообразные, крабы-пауки, морские улитки) с целью определения факторов бионакопления этих соединений по пищевой цепи. Показано, что концентрации ДДТ, ПХБ и хлорданов строго коррелируют с трофическим уровнем организмов [128].

Исследователи рассмотрели ряд экспериментальных работ по изучению

бионакопления ПХБ в зоопланктоне разных областей Северного Ледовитого океана и Великих Американских озер [129]. В этих работах были определены концентрации ПХБ в воде и зоопланктоне. Оказалось, что факторы биоаккумуляции, которые выражаются как соотношение концентрации загрязняющего вещества в организме к концентрации последнего в воде, могут различаться в несколько раз в разных работах. Наблюдается тенденция, показывающая, что факторы биоаккумуляции, приведенные в недавних работах, намного выше по сравнению с работами 80-ых годов. Вероятно, это связано с неправильным определением (завышением концентрации) ПХБ в воде в ранних работах. Показано, что реальные факторы биоаккумуляции ПХБ выше в 10 раз, чем те, которые рассчитаны теоретически с помощью коэффициентов распределения в системе октанол-вода. Это объясняется бионакоплением ПХБ в зоопланктоне [129].

В статье [130] изучено бионакопление водорослями 40 изомеров ПХБ при условиях подавления роста растений и разрешения роста растений. Как известно, бионакопление ПХБ можно предсказать теоретически по коэффициенту распределения в системе октанол-вода. Показано, что в целом процесс бионакопления ПХБ соответствует теоретической модели, но является достаточно медленным. Из-за этого в условиях роста растений состояние равновесия для ПХБ никогда не будет достигнуто. Поэтому, чтобы предсказать бионакопление ПХБ по пищевой цепи необходимо также учитывать кинетику процесса.

В обзоре литературных данных по изучению бионакопления хлорорганических соединений в организмах арктической морской среды [131] установлены факторы, влияющие на разнообразие их концентраций среди организмов. Главным химическим фактором, влияющим на бионакопление соединений, является его гидрофобность, которая выражается как $\log k_{o/w}$. Это значение коррелирует с размером молекулы и числом атомов хлора. С повышением $\log k_{o/w}$ соединения аккумулируются более эффективно. Геометрическое расположение атомов хлора в молекуле влияет на способность

ХОС к биотрансформации. Так, изомеры ПХБ без атомов хлора в соседних *пара-*, *мета-* или *орто-*, *мета-*позициях более легко биотрансформируются, чем изомеры, имеющие атомы хлора в этих позициях.

Среди биологических факторов для хлорорганических соединений выделяют следующие:

- содержание жира (способность организма их аккумулировать линейно коррелирует с содержанием жира в организме);
- сезонные колебания (в течение года изменяется содержание жира в организме, соответственно изменяется их биодоступность);
- размножение (во время периода лактации самок морских млекопитающих уменьшается их концентрация в организме, поскольку они вместе с молоком передаются малышам);
- размер тела, возраст, пол, жизненный цикл (обычно концентрация этих соединений ниже в молодых организмах, чем во взрослых, а также ниже в организмах самок, чем самцов);
- биотрансформация (например, α -ГХЦГ накапливается в организмах кольчатых тюленей, поскольку они не способны к метаболизму этого соединения, в то же время этот изомер не накапливается в морских птицах из-за их способности к биотрансформации);
- позиция в пищевой цепи (чем выше трофический уровень организма, тем выше концентрация соединений в его тканях).

В 6 точках отбора в Амстердаме из пресной воды были взяты образцы донных отложений и рыбы (угря) с целью определения концентраций ПХБ, ХОП, ПХДФ и ПХДД и расчета фактора их биоаккумуляции, т.е. соотношения концентрации соединения в мышечной ткани угря к его концентрации в донных отложениях [132]. Суммарная концентрация ПХБ составила соответственно 193–1756 и 5610–14620 мкг/кг в образцах донных отложений и рыбы. Показано, что факторы биоаккумуляции выше для ПХБ с большим числом атомов хлора. Например, для ПХБ 153 фактор биоаккумуляции достигает 60. Это связано с более эффективным

бионакоплением высокохлорированных ПХБ и более быстрой скоростью выведения низкохлорированных ПХБ вследствие селективного метаболизма. Также высокие факторы биоаккумуляции характерны для ГХБ и ДДТ достигают 70, причем наиболее эффективно аккумулируются 4,4'-ДДТ и 4,4'-ДДЭ. В то же время низкие факторы биоаккумуляции зафиксированы для ГХЦГ, альдрин, дильдрин, эндрин, гептахлор. Суммарные концентрации ПХДФ и ПХДД из одной точки отбора составили соответственно в образцах донных отложений и рыбы, мкг/кг: 57,1, 49,5 и 0,718, 0,318. Это свидетельствует о низких факторах биоаккумуляции ПХДФ и ПХДД. При этом наиболее эффективно накапливаются тетра-, пента-, гекса-изомеры, а гепта-, окта-изомеры практически не накапливаются.

В статье [133] представлены результаты мониторинга СОЗ в образцах рыбы (эулахон), которая является традиционной пищей для индейцев из провинции Британская Колумбия в Канаде, и жира, приготовленного из этой рыбы. Всего в образцах были определены 51 изомер ПХБ и 17 индивидуальных ХОП, в том числе пентахлорбензол, изомеры ГХЦГ, ГХБ, гептахлор, гептахлорэпоксид, изомеры хлордана, ДДЭ, ДДТ, фотомирекс, мирекс. Целевые соединения выделяли методом жидкостной экстракции смесью метилхлорид/гексан. Затем полученные экстракты очищали от липидных соединений на колонке SX-3 Biobeads, соединенной с высокоэффективной хроматографической системой. Далее фракцию, в которой содержались целевые соединения, пропускали через колонку с флорисилом с целью очистки и разделения целевых соединений на отдельные фракции. В результате этой процедуры получены 3 фракции: первая – изомеры ПХБ, ГХБ, гептахлор, мирекс и фотомирекс; вторая – изомеры ГХЦГ, изомеры хлордана, ДДТ; третья – гептахлорэпоксид и дильдрин. Затем эти фракции анализировали методом ГХ/МС. Показано, что степень извлечения выбранных ПХБ и ХОП по этой методике пробоподготовки составляет выше 95 % для всех соединений. Следует отметить, что из 17 ХОП в реальных образцах было обнаружено 14 (не обнаружены пентахлорбензол, гептахлор и мирекс), а высокие концентрации

зафиксированы для ДДТ и хлордана. В целом, средние общие концентрации ХОП и ПХБ соответственно составляли 110 и 30 нг/г жира; эти показатели намного ниже величин ПДК, установленных законодательными органами Канады, тем не менее, свидетельствуют о биоаккумуляции этих соединений. Среди ПХБ преобладают пента- и гексахлоризомеры. На их долю приходится соответственно 33 и 32 % общего содержания ПХБ.

Разработана универсальная методика одновременного определения ПХБ, в том числе копланарных, и ПАУ в морских донных отложениях и биоаккумуляруемых образцах (рыбий жир, ткани мидий и др.) [134]. Выделение целевых соединений из образцов проводили методом модифицированной экстракции Сокслета, при этом в качестве растворителя использовали смесь ацетон/гексан (80/20). Очистку и фракционирование полученного экстракта проводили на колонке, заполненной оксидом алюминия и кремнезёмом. Сорбированные соединения элюировали в 2 этапа: первую фракцию, содержащую ПХБ, элюировали пентаном; вторую фракцию, содержащую ПАУ, элюировали смесью метиленхлорид/пентан. Особое внимание в статье уделено анализу копланарных ПХБ. Не-орто-замещенные ПХБ и некоторые моно-орто-замещенные ПХБ проявляют такое же воздействие на ферменты, как 2,3,7,8-ТХДД. Поскольку они находятся в окружающей среде в очень низких концентрациях, перед анализом необходимо отделить их от остальных ПХБ. Для этого исследователи использовали метод ВЭЖХ. Анализ полученных фракций ПХБ проводили методом ГХ/ЭЗД; анализ фракции ПАУ – методами ГХ с пламенно-ионизационном детектировании (ГХ/ПИД) или ГХ/МС. Разработанная методика позволяет количественно определить в объектах окружающей среды обычные ПХБ на уровне 0,5 нг/г, копланарные ПХБ \square 1 пг/г, ПАУ \square 50 нг/г. По данной методике были проанализированы образцы печени трески и ткани скумбрии из Северного моря. Общее содержание ПХБ составило соответственно 13,6–383 и 0,2–3,8, содержание не-орто-замещенных ПХБ (номер 77, 126, 169) \square 140–1250 и 2–51 пг/г массы сухого вещества.

Исследователями разработана методика определения 16 ХОП в рыбной продукции [135]. Как известно, методики определения микроколичеств хлорорганических соединений в пищевых продуктах обычно состоят из 3 стадий: экстракция целевых соединений, очистка экстракта, анализ с помощью хроматографических методов. В данной работе проведена оптимизация указанных стадий. Выделение целевых соединений из образца, в который было введено известное количество ХОП, провели поочередно 2 методами: 1 – ЭС смесью ацетон/гексан (10/90) в течение 4 ч; 2 – УЗЭ смесью ацетон/гексан (10/90) в течение 30 мин (повтор 3 раза). Поскольку степени извлечения ХОП этими методами оказались примерно равны, исследователи рационально предложили использовать УЗЭ, потому что она занимает меньше времени. Очистку экстракта проводили пропусканием через колонку с флорисилом. Для элюирования и фракционирования экстракта использовали ряд растворителей в различных соотношениях и в итоге пришли к выводу, что элюирование необходимо проводить в 2 этапа: 1 – смесью диэтиловый эфир/гексан (6/94); 2 – смесью диэтиловый эфир/гексан (50/50). Итак, были получены 2 фракции целевых соединений, которые анализировали методом ГХ/ЭЗД; для подтверждения полученных результатов использовали метод ГХ/МС. Разработанную методику апробировали на реальных образцах рыб 10 видов из рыбного магазина в Бангкоке, в которых содержание жира составило от 2 до 9 %. В образцах рыбы 9 видов были обнаружены α -, γ -, δ -ГХЦГ, альдрин, эндосульфат I, 4,4'-ДДЭ, дильдрин. Самая высокая концентрация зафиксирована для δ -ГХЦГ (35 нг/г массы сухого вещества в образце полосатого змеоголова).

Поскольку ХОП являются устойчивыми соединениями в окружающей среде и накапливаются в пищевой цепи, важной задачей является их определение в продуктах питания. Задачей работы [136] является разработка оптимальной методики определения 13 ХОП в тканях рыбы. Для этого использовано 4 разных процедуры выделения ХОП из тканей рыбы: 1 – тройная экстракция гексаном при мягком кипячении и встряхивании; 2 – тройная

экстракция смесью гексан : метиленхлорид (1:1) в аналогичных условиях; 3 – тройная экстракция смесью гексан : метиленхлорид (1:3) в таких же условиях; 4 – ЭС в течение 8 ч смесью гексан : метиленхлорид (1:3). Из полученных экстрактов удаляли воду сульфатом натрия, а растворитель выпаривали досуха. Затем сухой остаток растворяли гексаном и пропускали через колонку с сорбентом Florisil. Элюировали ХОП раствором бензола в гексане. Затем элюат выпаривали, растворяли в изооктане и анализировали методом ГХ/ЭЗД. Все процедуры были выполнены на образце кильки, в который перед этим ввели определенную концентрацию 13 ХОП. Исследования показали, что процедура экстракции гексаном, являющаяся стандартной при определении ХОП в ЕС, проводится в течение 15 мин, но имеет низкую эффективность. Процедуры 2 и 3 также занимают мало времени, но их эффективность гораздо выше. Низкая степень извлечения для изученных пестицидов была получена только для γ -ГХЦГ. Хотя процедура 4 является достаточно длительной, но даёт лучшие результаты при извлечении ХОП из тканей рыбы. Данная процедура была апробирована на образцах бычков из Черного моря. Самые высокие концентрации были зафиксированы для 4,4'-ДДЭ (8,1 нг/г), 4,4'-ДДД (3,6 нг/г) и 4,4'-ДДТ (1,2 нг/г).

Проведен мониторинг 6 ХОП (ДДТ, ДДЭ, линдан, эндосульфат, гептахлор, хлордан) в образцах воды, донных отложений и рыбы из оз. Паришан, Иран [137]. Образцы для анализа отбирали из четырех разных мест в течение четырех времен года. Выделение целевых соединений из образцов воды проводили методом трехкратной жидкостной экстракции смесью гексан : дихлорметан (1:1). Из донных отложений и рыбы ХОП выделяли методом ЭС в течение 4 ч. Целевые соединения элюировали гексаном. Конечные экстракты анализировали методом ГХ/ЭЗД. Полученные данные показали, что ДДТ и его метаболит ДДЭ являются наиболее распространенными пестицидами в природных объектах оз. Паришан. В тканях рыбы их концентрации составили соответственно 4,11 и 4,86 нг/г. Концентрации хлордана, гептахлора, линдана,

эндосульфана оказались незначительными и составили соответственно 0,02, 0,04, 0,14; 0,82 нг/г.

Разработана методика определения ПАУ в образцах биоты (рыбы, мидии, водоросли) методом ГХ/МС [138]. Показано преимущество использования для экстракции этих соединений бинарных смесей органических растворителей. Методика апробирована на стандартных образцах состава гомогенизата мидий IAEA-142 и водорослей IAEA-142. Точность и правильность полученных результатов свидетельствуют о пригодности данной методики для определения 16 ПАУ в реальных биологических образцах.

В статье [139] приведено сравнение накопления пестицидов растительной тканью по разработанной эффективной методике определения 88 пестицидов в ягодах малины, клубники, черники и винограда. В работе были оптимизированы стадии экстракции, очистки экстракта и хроматографического анализа. С целью выбора лучшего растворителя для экстракции пестицидов из природной матрицы было проведено сравнение этилацетата, ацетона и ацетонитрила. Ацетонитрил являлся лучшим растворителем для экстракции, поскольку степень извлечения пестицидов при его использовании составила 63–137 %. Ацетон и этилацетат также извлекают пестициды достаточно эффективно, но при этом полученные экстракты являются более грязными и содержат больше пигментов и липидов. Очистку экстрактов проводили методом твердофазной экстракции на разных сорбентах: графитизированном углероде (Envi-Carb), химически связанных кремнеземах (C_{18} , NH_2 -LC). Исследование показало, что лучшим вариантом является использование колонки Envi-Carb в сочетании с колонкой NH_2 -LC. В качестве элюента была выбрана смесь ацетонитрил:толуол (3:1). Анализ полученных концентратов проводили методом ГХ/МС в режиме SIM. Степень извлечения при концентрации пестицидов 0,05–0,5 мг/кг по разработанной методике составляет 63–137 %. Относительные стандартные отклонения составили 1–19 %, а уровни идентификации и определения \square соответственно 0,006–0,05 мг/кг и 0,02–0,15 мг/кг. Безусловно, уровни накопления пестицидов значительно ниже по

сравнению с липидной тканью.

Из изложенного материала следует, определение ПХБ, в том числе и копланарных, в объектах окружающей среды и биологических объектах представляет большой практический и, соответственно, аналитический интерес, чем ПХДД и ПХДФ, и важность проблемы идентификации и определения соединений этих классов тождественна.

1.9. Физико-химические методы определения СОЗ

Химико-аналитические аспекты проблемы СОЗ рассмотрены широко в зарубежной и отечественной литературе.

US EPA разработало методики определения соединений рассматриваемых классов, реализованных различными инструментальными методами анализа, а именно: ГХ/ЭЗД – ХОП [140]; ХОП, хлордан, токсафен, ПХБ (Aroclors 1016, 1221, 1232, 1242, 1248, 1254, 1260) в городских и промышленных сточных водах [141]; ГХ/ЭЗД или кондуктометрическим по электропроводности – ПХБ (по Aroclors или индивидуальным изомерам) в экстрактах из твердых, тканевых и водных матриц (экстракция Сокслета и другие подходящие способы экстракции, капиллярные колонки) [142] или твердофазная экстракция на C₁₈-дисках диаметром 47, 50 или 90 мм) [143]; ГХ/ПИД – ПАУ (насадочные колонки [144]); газовой хроматографии/масс-спектрометрии низкого и высокого разрешения (ВРГХ/НРМС, ВРГХ/ВРМС) – ПХДД, ПХДФ [145, 146] (при отборе проб из стационарных источников по способу [147]); ВРГХ/ВРМС определения ПХДД и ПХДФ с применением внутренних соединений-стандартов, содержащих меченые изотопы ¹³C и ³⁷Cl [148]; ВЭЖХ – ПАУ (подземные и сточные воды, УФ- и флуоресцентный детекторы) [149]; электрохимическим тестовым методом (L2000[®] PCBs/Chloride Analyzer) для скрининга ПХБ в почве (песок, гравий, плодородная почва, донные отложения, глина) [150]; колориметрическим тестовым методом (хлорид-ион) в трансформаторном масле [151].

Предложен метод (ВРГХ/ВРМС) изомерно-специфического определения 209 ПХБ в экологических матрицах – воде, почве, донных отложениях, биологической твердой фазе, тканях и других (включая 12 токсических соединений согласно списка ВОЗ, 21 токсическое соединение – Национальной океанической и атмосферной администрации (NOAA)) соответственно на уровне рр_q для водных образцов и рр_t для твердых матриц [152].

В связи с постоянно возрастающей во всем мире актуальностью проблемы изучения поведения известных и новых СОЗ, поступивших и поступающих в объекты окружающей среды, в частности в водные системы, возникла необходимость разработки новых методик идентификации и определения этих соединений при применении новых способов пробоподготовки и наиболее эффективных и информативных физико-химических методов исследования, таких как двумерная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием [38–45]. Альтернативой использования метода ВРГХ/ВРМС [86, 87, 146] является применение систем МС/МС [56]. В последнее время для диоксинов и родственных соединений используются методы ВРГХ с масс-спектрометрическим детектированием (ионная ловушка, ion trap IT) (HRGC/IT/MS/MS) и время-пролетной масс-спектрометрией (HRGC/ToF/MS). Чувствительность (LOD) систем IT/MS/MS ниже (100–300 фг), чем инструмента ВРМС (3 фг), для ToF/MS – 1–4 пг [44]. Для твердых образцов основными методами экстракции являются ЭС, УЖЭ под давлением, микроволновая экстракция и СФЭ [1, 25, 26, 28, 47–70], которые подробно представлены ранее в данном обзоре литературы.

РАЗДЕЛ 2

РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ИССЛЕДОВАНИЯ ХЛОРООРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ В ЛИПИДНЫХ ТКАНЯХ ГИДРОБИОНТОВ РАЗЛИЧНЫХ ВОДНЫХ СИСТЕМ

2.1. Объекты исследования

Первое исследование. В качестве объекта исследования выбраны образцы мышечной ткани рыб, в которые вошли особи одного возраста (одной группы), отловленные в одно и то же время в одном и том же месте. Из них выбрано 5 тестовых образцов, которые использовали для установления оптимальных условий УЖЭ липидной фракции из тканей. Данные о тестовых пробах представлены в табл. 2.1, 2.2.

Второе исследование. Характеристики образцов рыб, отловленных в р. Днепр в районе г. Киева в 2011 г. (осень) и 2012 г. (весна), представлены соответственно в табл. 2.3, 2.4 и на рис. 2.1.

2.2. Методы и методики исследования

2.2.1. Методика приготовления модельных образцов мышечной ткани рыб для установления открываемости аналита в пробах при проведении ускоренной жидкофазной экстракции органических соединений

Отрезали часть рыбы от грудного плавника до анального, отделяли мышечную ткань от костей, кожи и внутренних органов. Ножом с кожи соскабливали всю ткань, которая от нее отделяется. Ткань рыб объединяли в равных пропорциях от каждой особи и полностью переносили в электрическую мясорубку и гомогенизировали в течение 5 мин.

Полученную массу (гомогенизат) хранили в плотно закрывающемся стеклянном сосуде при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Таблица 2.1. Образцы рыб, используемые для определения ХОП и ПХБ

№ пробы	Место отлова	Вид	Количество экземпляров в рыб в образце, шт.	Возраст, лет	Время отлова
1	с. Сорокошичи, р. Днепр	Щука	3	4	Октябрь 2003 г.
2	г. Херсон, р. Днепр	Судак	3	5	Август 2003 г.
3	г. Корсунь-Шевченковский, р. Рось	Судак	2	3	Август 2003 г.
4*	г. Светловодск, Кременчугское водохранилище	Судак	3	5	Сентябрь 2003 г.
5	с. Журавно, р. Днестр	Щука	3	3	Октябрь 2003 г.
6	г. Остер, р. Десна	Щука	2	3	Август 2003 г.
7	г. Черкассы, лиман Иркилев	Судак	3	5	Сентябрь 2003 г.
8	г. Кировоград, р. Ингул	Щука	3	3	Сентябрь 2003 г.
9	с. Пирятин, р. Удай	Судак	2	3	Сентябрь 2003 г.
10*	с. Черныш, р. Десна	Щука	3	4	Август 2003 г.
11*	г. Яготин, р. Супий	Щука	3	4	Сентябрь 2003 г.
12*	Киевское водохранилище	Щука	1	9	Октябрь 2003 г.
13*	Каневское водохранилище	Судак	3	5	Сентябрь 2003 г.
14	г. Лубны, р. Сула	Щука	2	4	Сентябрь 2003 г.
15	р. Тетерев	Щука	3	4	Сентябрь 2003 г.

* Тестовые образцы отдельно вынесены в табл. 2

Перед приготовлением навесок гомогенизат размораживали в течение 12 ч при комнатной температуре. Сосуд с гомогенизатом открывали только после

размораживания.

Способ А.

Гомогенизат взвешивали в фарфоровой ступке по 10,00 г, добавляли около 10 г CuSO_4 , выдержанного в течение 3 ч при 400 °С, и растирали до получения однородного, сухого и сыпучего порошка. Полученную смесь количественно переносили во флакон объемом 100 см³ и плотно закрывали пробкой. Параллельно готовили холостой опыт – взвешивали около 10 г CuSO_4 , использовавшегося для приготовления модельных образцов, и подвергали всей процедуре подготовки проб, аналогично образцам из мышечной ткани рыб.

Образцы хранили при комнатной температуре в месте, защищенном от прямых солнечных лучей.

Таблица 2.2. Образцы рыб, используемые для приготовления тестовых образцов

№ пробы	Место отлова	Вид	Количество экземпляров рыб в образце, шт.	Возраст, лет	Время отлова
1	г. Светловодск, Кременчугское водохранилище	Судак	3	5	Сентябрь 2003 г.
2	г. Черныш, р. Десна	Щука	3	4	Август 2003 г.
3	г. Яготин, р. Супий	Щука	3	4	Сентябрь 2003 г.
4	Киевское водохранилище	Щука	1	9	Октябрь 2003 г.
5	Каневское водохранилище	Судак	3	5	Сентябрь 2003 г.

Способ Б.

По 10,00 г гомогенизата взвешивали в чашке Петри, замораживали до -60 °С и лиофилизировали при следующих условиях: давление – 0,5 атм, начальная

температура – $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, линейный градиент температуры до $+60\text{ }^{\circ}\text{C}$ со скоростью $2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{ч}$. Общее время лиофилизации – 48 ч.

Лиофилизированные образцы хранили во флаконах объемом 100 см^3 , плотно закрытых пробкой при комнатной температуре в месте, защищенном от прямых солнечных лучей.

Таблица 2.3. Характеристики образцов рыб, которые были использованы для определения ХОП и ПХБ (осень 2011 г.).

№	Образец	Вид	Пол	Биоматериал (мышечная ткань, икра, печень)	m, г масса влажного вещества	m, г масса сухого вещества	К, в.в/с.в	Липиды, %
1	1	Esox lucius, щука	самка	белая ткань + икра + печень	11,7531	3,0226	3,89	6,82
2	2	Esox lucius, щука	самка	белая ткань + икра + печень	11,0466	2,9033	3,80	5,42
3	3□ 1	Abramis brama, лещ	самка	белая ткань	9,1398	1,6342	5,59	0,83
4	3□ 2	Abramis brama, лещ	самка	красная ткань + печень	7,3109	1,5550	4,70	8,13
5	3□ 3	Abramis brama, лещ	самка	икра	10,0888	3,0896	3,27	1,94
6	4	Rutilus rutilus, плотва	самка	белая ткань + икра	7,6478	2,0301	3,77	6,04

Для установления общей массы экстрагируемых органических соединений и концентраций ХОП и ПХБ в каждой из тестовых проб, пробы мышечной ткани, полученные по способу А и Б, экстрагировали в аппарате Сокслета по 3 раза каждую разными растворителями.

Пробу помещали в мешок из белой ситцевой ткани, размером (6x10) см. Мешки предварительно экстрагировали в аппарате Сокслета в тех же условиях, в которых проводили экстракцию проб.

Для экстракции органических соединений из мышечной ткани рыб, при массе навески ткани 10,00 г, использовали аппарат Сокслета с объемом экстракционной ячейки 30 см³. Объем растворителя, взятый для экстракции, составлял не менее 60 см³.

Таблица 2.4. □ Характеристики образцов рыб, которые были использованы для определения ХОП и ПХБ (весна 2012 г.).

№	Об- ра- зец	Вид	Стать	Биома- териал	т, г масса влаж- ного вещест- ва	т, масса сухого вещест- ва	К, в.в/с.в	Ли- пи- ди, %
1	1□ 1	Exos lucius, щука	самка	ткани	26,32	5,53	4,76	4,34
2	1□ 2			ткани	22,14	4,74	4,67	5,50
3	1□ 3			икра	16,86	5,51	3,06	9,31
4	2□ 1	Abramis brama, лещ	самец	ткани	37,74	7,75	4,87	7,10
5	2□ 2			ткани	43,87	8,88	4,94	7,90
6	3□ 1	Perca fluviatilis, окунь	самка	ткани	35,33	7,55	4,68	5,33
7	4□ 1	Blicca bjoerkna, устира	самец	ткани	25,47	5,61	4,54	6,72
8	5□ 1	Rutilus rutilus, плотва	самка	ткани	29,98	7,57	3,96	17,56
9	5□ 2			ткани	26,94	5,87	4,59	17,69
10	5□ 3			икра	18,55	6,31	2,94	18,87
11	5□			икра	26,75	10,37	2,58	16,72

	4							
12	5□ 5			печень	70,33	16,47	4,27	12,68

Для экстракции органических соединений из мышечной ткани рыб использовали следующие растворители: хлористый метилен, диэтиловый эфир и бензол. Для проведения экстракции с целью определения массы экстрагируемых органических соединений использовали растворители отечественного производства класса х.ч. или производства Merck, Fluka и Riedel-de-Haën класса “для ВЭЖХ”. Для проведения экстракции с целью определения концентраций ХОП и ПХБ методом ГХ/МС использовали растворители, специально предназначенные для анализа диоксинов, фуранов и ПХБ производства Riedel-de-Haën.

Температуру водяной бани устанавливали на 10–15 °С выше температуры кипения используемого растворителя. Экстракцию органических соединений проводили в течение 18–24 ч.

После завершения экстракции аппарат Сокслета извлекали из водяной бани, охлаждали, снимали обратный холодильник и ставили в вытяжной шкаф. Экстракт помещали в колбу с коническим дном. Аппарат Сокслета трижды промывали растворителем, использовавшимся для экстракции, порциями по 5 см³. Смывы соединяли с экстрактом. Экстракт упаривали досуха на роторном испарителе и реэкстрагировали гексаном. Реэкстракт хранили в плотно закрытой колбе при комнатной температуре в защищенном от прямых солнечных лучей месте.

Устанавливали среднюю массу общей суммы экстрагируемых органических соединений, используя следующую методику: конические колбы объемом около 100 см³ подписывали карандашом по внутренней поверхности горлышка. Подбирали стеклянные пробки, герметично закрывающие колбы, и также подписывали по рифленой поверхности. Воздушно-сухие колбы с пробками (выдержанные в нормальных условиях не менее 60 мин) взвешивали

на аналитических весах (Sartorius BL 210 S) с точностью до 0,0005 г. Массы колб записывали в журнал.

Растворы экстрактов органических соединений из мышечной ткани рыб помещали в колбы и упаривали на роторном испарителе досуха. Внешнюю поверхность колб тщательно протирали чистым сухим полотенцем из хлопчатобумажной ткани. Колбы оставляли открытыми при комнатной температуре в течение не менее 1 ч. После этого колбы с экстрагированными органическими соединениями взвешивали аналогично пустым. Массы колб записывали в журнал.

Оценивали погрешность определения массы экстрагируемых органических соединений. Для этого проводили 10 экстракций тестовой пробы № 3 метиленхлоридом в аппарате Сокслета. Определяли относительное стандартное отклонение масс 10 экстрактов.

2.2.2. Оборудование и метод проведения ускоренной жидкостной экстракции

Для УЖЭ органических соединений из ткани использовали систему, состоящую из насоса (Waters 515) (1), колонок из нержавеющей стали размером 21,2×70 (2) и 6,0×40 мм (3), водяной или глицериновой бани (4), сосуда с холодной водой объемом 2 дм³ (5), соединительных трубок (внутренний диаметр – 0,8 мм) с фитингами (6) и колбы с коническим дном для сбора экстракта (7) (рис. 2.1) [68, 70].

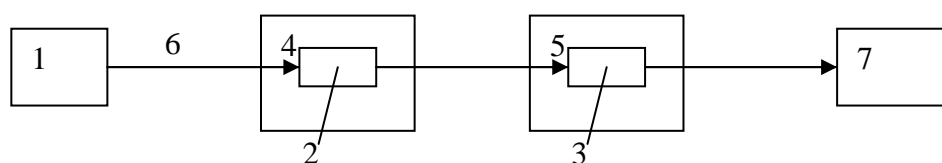


Рис. 2.1. Схематическое изображение системы для УЖЭ.

В колонку (2) помещали образец, приготовленный для экстракции, и плотно его упаковывали. Мертвый объем наполняли избыточным количеством безводного CuSO_4 . Колонку герметично закрывали.

Колонку (3) плотно наполняли безводным CuSO_4 .

Насос (1), колонки (2), (3) и колбу (7) соединяли трубками (6). Колонку (2) помещали в водяную или глицериновую баню (4) при необходимой температуре, а колонку (3) – в сосуд с холодной водой. Растворитель подавали при помощи насоса.

В тех случаях, когда не использовали колонку 3, масса экстрагируемых органических соединений в некоторых случаях превышала массу, полученную при экстракции в аппарате Сокслета. Сухие остатки не полностью растворялись в гексане, но частично растворялись в воде. Водорастворимую часть экстрагируемых органических соединений анализировали методом гель-фильтрационной ВЭЖХ в следующих условиях: жидкостный хроматограф – Hewlett-Packard HP 1050 с диодно-матричным детектором HP DAD 1050 в режиме сканирования спектра в диапазоне 220–400 нм; колонка – Waters Ultrahydrogel™ 250 размером 7,8×300 мм; подвижная фаза – (фосфатный буферный раствор, pH 6,5 + 33 г/дм³ $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) : ацетонитрил (9 : 1); скорость – 0,7 см³/мин, объем вводимой пробы – 50 мкл. Калибровка молекулярных масс выполнена по следующим стандартным образцам: цитохром С (Fluka 17917, м.м. = 13 кДа, τ = 12,1 мин), аprotинин (Fluka 17916, м.м. = 6,5 кДа, τ = 14,2 мин), окситоцин (Sigma O 3251, м.м. = 1 кДа, τ = 26,8 мин).

2.2.3. Методика введения внутреннего стандарта в образцы ткани

Для определения устойчивых органических загрязняющих веществ в образцах тканей биоты в качестве внутренних стандартов обычно используют растворы индивидуальных целевых соединений, содержание которых в реальных пробах низкое по сравнению с вводимым.

В качестве внутреннего стандарта для определения ПХБ и ХОП в образцах ткани выбрали 2,3,3',4,4',5-гексахлорбифенил (ULTRA Scientific RPC-055S). В образец вводили 100 мкл раствора внутреннего стандарта в ацетоне с концентрацией 2 мг/дм³ [70].

Микрошприцем Hamilton (MICROLITER™ N 710) объемом 100 мкл отбирали 200 мкл исходного раствора (2 раза по 100 мкл) и помещали в мерную колбу (V=10 см³), растворяли в 5 см³ ацетона (Riedel-de Haën N 34410) и доводили до метки ацетоном.

Из полученного раствора, шприцем вместимостью 1 см³ (Hamilton GASTIGHT^R N 1001), отбирали 1,00 см³, помещали в виалу объемом 2 см³ (Agilent Technologies N 5182-0544) и закрывали тефлоновой крышечкой (Agilent Technologies N 5182-0564).

По 100 мкл оставшегося раствора микрошприцем Hamilton (MICROLITER™ N 710) объемом 100 мкл вводили в навески ткани перед добавлением CuSO₄.

Растворы хранили в плотно закрытой стеклянной посуде при -20 °С не более 3 мес.

2.2.4. Методика регистрации органических соединений методом лазерной рефрактометрии.

Экстрагируемые органические соединения регистрировали лазерным дифференциальным рефрактометрическим детектором Waters 410 при $\lambda=930$ нм на выходе из системы для УЖЭ при температуре экстракционной ячейки 20 °С. В качестве растворителя использовали метиленхлорид при скорости подачи 2 см³/мин [70].

2.2.5. Методика подготовки концентратов микропримесей ХОП и ПХБ из мышечной ткани рыб

В навески мышечной ткани рыб (10 г) вводили внутренний стандарт – 2,3,3',4,4',5-гексахлорбифенил (Ultra Scientific RPC-055S) в объеме 100 мкл раствора в ацетоне с концентрацией 2 мг/дм³ и экстрагировали методом УЖЭ. Экстракты очищали от балластных соединений минерализацией концентрированной серной кислотой и/или олеумом и/или 5 %-ным раствором KMnO₄. При необходимости проводили дополнительную очистку методом обращенно-фазной ВЭЖХ в аналитическом масштабе. Полученные пробы концентрировали до 0,1 см³ и анализировали на газовом хроматографе с масс-селективным детектором. В качестве калибровочных растворов использовали смесь ХОП (Supelco N 4-8858) в концентрациях 1,0 и 0,1 мг/дм³ и смесь ПХБ, состоящую из 3,4,4',5-тетра- (RPC-096S), 2,3,3',4,4'-пента- (RPC-098S), 2,3,3',4,4',5'-гекса- (RPC-164S) и 2,3,3',4,4',5,5'-гептахлорбифенила (RPC-137S) (номера по каталогу Ultra Scientific) в концентрациях 1,0 и 0,02 мг/дм³ каждого соединения в смеси. Для идентификации ПХБ использовали смесь Aroclor 1221, 1242, 1254 (Supelco N 48862) с общей концентрацией ПХБ 6 мг/дм³ [70].

2.2.6. Методика проведения ускоренной жидкофазной экстракции микропримесей ХОП и ПХБ из мышечной ткани рыб

Для УЖЭ органических соединений из указанных образцов использовали систему, состоящую из насоса (Waters 515) (1), колонок из нержавеющей стали размером 21,2x70 (2) и 6,0 x 40 мм (3), водяной или глицериновой бани (4), сосуда с холодной водой объемом 2 дм³ (5), соединительных трубок (внутренний диаметр – 0,8 мм) с фитингами (6) и колбы с коническим дном для сбора экстракта (7) (рис. 2.1) [68, 70].

В колонку 2 помещали образец, приготовленный для экстракции, и плотно его упаковывали. Мертвый объем наполняли избыточным количеством безводного CuSO₄. Колонку герметично закрывали. Колонку 3 плотно наполняли безводным CuSO₄. Насос 1, колонки 2 и 3 и колбу 7 соединяли трубками 6. Колонку 2 помещали в водяную или глицериновую баню 4 при

необходимой температуре, а колонку 3 – в сосуд с холодной водой. Растворитель подавали при помощи насоса. Пробы тестовых образцов биоты экстрагировали при 80 °С и скорости подачи растворителя 10 см³/мин с трехкратной сменой растворителя на последующий растворитель или смесь растворителей – диэтиловый эфир, метилхлорид, бензол : метанол в соотношении 9 : 1.

2.2.7. Методика исследования микропримесей ХОП и ПХБ в пробах мышечной ткани рыб методом ГХ/МС в режиме SIM (система GC HP5890 SeriesII/MSD HP5972A фирмы Hewlett-Packard с квадрупольным анализатором масс)

Для идентификации и определения ХОП и ПХБ в пробах мышечной ткани рыб использовали газовый хроматограф Hewlett-Packard 5890 Series II с масс-селективным детектором 5972 MSD. Колонка – Supelco SE-30, внутренний диаметр – 0,25 мм, длина – 30 м, степень покрытия – 0,25 мкм; газ-носитель – He, скорость потока \square 1 см³/мин при температурной коррекции расхода газ-носителя; температурный режим – изократический период при 60 °С – 1 мин, градиент температуры 60 \rightarrow 300 °С со скоростью 6 °С/мин и 20 мин – изократический период при 300 °С; объем вводимой пробы – 1 мкл без деления потока, через 1 мин – деление потока 1:50; параметры детектора – режим SIM при детектировании ионов с m/z 181, 183, 219, 235, 237, 246, 248, 318 (ХОП) и 256, 258, 260, 290, 292, 294, 324, 326, 328, 358, 360, 362, 392, 394, 396, 426, 428, 430 (ПХБ) при ЭИ (70 эВ). ХОП и ПХБ идентифицировали по временам удерживания и по характеристическим ионам с использованием электронной библиотеки масс-спектров Wiley 275, а ПХБ – также по соотношению интенсивностей ионов M⁺, [M+2]⁺, [M+4]⁺ полученных масс-спектров теоретически рассчитанным соотношениям. Концентрации целевых соединений определяли по соотношениям интенсивностей характеристических ионов этих соединений на хроматограммах калибровочных растворов к их

интенсивностям на хроматограммах испытуемых растворов. Рассчитывали концентрации ХОП и ПХБ как средние значения, полученные по нескольким ионам [68].

2.2.8. Методика препаративного выделения ХОП, ПХБ и ПХДД из мышечной ткани рыб методом ВЭЖХ

Фракционирование экстрактов мышечной ткани 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 [153].

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 ЭС или с использованием УЖЭ, упаривали на роторном испарителе досуха и немедленно растворяли не менее, чем в 10 см³ гексана (Riedel-de-Haën N 34412). После полного растворения органических соединений в колбу доливали пипеткой около 20 см³ 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 см³ с тефлоновым краном. Кислоту отделяли и утилизировали, а растворитель переносили обратно в колбу. Процедуру повторяли, пока не получали прозрачный бесцветный слой серной кислоты. В случаях медленного расслоения органического и неорганического слоев поступали по одному из приведенных ниже способов, либо использовали оба способа:

А. К гексановому слою пипеткой добавляли около 1 см³ 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 пипеткой 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 – $18 \text{ МОм}\cdot\text{см}^{-1}$, общий органический углерод – менее $10 \text{ мкг}/\text{дм}^3$), встряхивали и отделяли воду. Процедуру повторяли не менее 3 раз. В случае, если для минерализации не использовали перманганат калия, лакмусовым индикатором проверяли рН среды, которой отмывали экстракт, и отмывку продолжали до рН 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 аналогичное 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 микровials 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 о.с.ч.

Для выделения ПХДД из концентратов проб мышечной ткани рыб использовали жидкостный хроматограф Waters 515 с УФ-детектором WatersTM 486 при $\lambda=250 \text{ нм}$ и хроматографическую колонку LiChrosorb RP-18 размером $250 \times 4,6 \text{ мм}$ с размером зерен сорбента 5 мкм. Объем вводимой пробы – 150 мкл. В качестве подвижной фазы использовали метанол (Merck N 106007 или Fluka N 65548) при скорости потока $1 \text{ см}^3/\text{мин}$.

Для определения времени удерживания ПХБ использовали модельную смесь Aroclor 1254 (Supelco N 48707) с общей концентрацией ПХБ 20 мг/дм³. Для определения времени удерживания ПХДД использовали раствор 2,3,7,8-тетрахлордibenзо-*n*-диоксина (Supelco N 4-8599) в концентрации 1 мг/дм³.

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 фракции растворителя по 20 см³, содержащие ХОП и ПХБ (с 3 по 9) и ПХДД (с 10 до конца процесса). Потом через колонку пропускали 3 см³ метиленхлорида для удаления из нее неполярных балластных веществ и 5 см³ метанола для уравнивания хроматографической системы. Фракции отбрасывали.

Фракции, содержащие целевые соединения, собирали в колбы с коническим дном объемом 30 см³. Пробы упаривали досуха на роторном испарителе.

2.2.9. Методика исследования балластных соединений в пробах мышечной ткани рыб методом ГХ/ПИД

Чтобы оценить степень очистки реальных проб ХОП, ПХБ и ПХДД от мешающих их определению балластных веществ жировой ткани рыб, 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 см³/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 [153].

2.2.10. Методика исследования балластных соединений в пробах мышечной ткани рыб методом ГХ/МС в режиме SCAN

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 см³/мин при температурной 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 [153].

2.2.11. Методика выделения копланарных ПХБ из общих концентратов ПХБ, полученных из мышечной ткани рыб, методом микропрепаративной ВЭЖХ

Для подбора оптимальных условий выделения копланарных ПХБ использовали два жидкостных хроматографа: Waters 515 с УФ детектором WatersTM 486 или Hewlett-Packard 1050 с градиентным насосом, диодно-матричным детектором и автоматическим дозатором проб. Объем вводимой пробы – 50 мкл. Детектирование осуществляли при $\lambda=250$ нм. В качестве маркеров использовали метанольные растворы смеси ПХБ, составленной из Aroclor 1221, 1242, 1254 (Supelco N 48862, 2001 г) (смесь I), с концентрацией каждого компонента 20 мг/дм³ (мешающие анализу соединения), и

метанольные растворы 12 индивидуальных копланарных ПХБ: 3,4,4',5-тетрахлорбифенил (RPC-096S), 3',3',4,4'-тетрахлорбифенил (RPC-036S), 2',3,4,4',5-пентахлорбифенил (RPC-156S), 2,3',4,4',5,5'-гексахлорбифенил (RPC-100S), 2,3',4,4',5-пентахлорбифенил (RPC-106S), 2,3,3',4,4'-пентахлорбифенил (RPC-098S), 2,3,4,4',5-пентахлорбифенил (RPC-108S), 3,3',4,4',5-пентахлорбифенил (RPC-102S), 2,3,3',4,4',5'-гексахлорбифенил (RPC-164S), 3,3',4,4',5,5'-гексахлорбифенил (RPC-090S), 2,3,3',4,4',5-гексахлорбифенил (RPC-055S), 2,3,3',4,4',5,5'-гептахлорбифенил (RPC-137S) (номера по каталогу Ultra Scientific, 2001 г.) по отдельности, так и в смеси целевых соединений (смесь II) соответственно в концентрации около 10 и 1 мг/дм³ каждого индивидуального соединения в смеси [154].

Хроматографирование смесей проводили методом обращенно-фазной ВЭЖХ в изократическом режиме при использовании пяти колонок с привитыми функциональными группами – CN, Phenyl, C₈, C₁₈ и PАН в следующих условиях: подвижная фаза – метанол (0,5–1 см³/мин), температура колонки – 30 °С, детектирование при λ=250 нм. Полученные хроматограммы смеси Aroclor 1221, 1242, 1254 накладывали на хроматограммы смеси копланарных ПХБ при помощи программы для сбора и обработки хроматографических данных Millennium³² Chromatography Manager производства фирмы Waters. Ординаты хроматограмм приводили к единому для всех хроматограмм значению.

Хроматографирование модельных растворов 3,3',4,4'-тетрахлор-, 2,3,3',4,4'-пентахлор- и 2,3',4,4',5-пентахлорбифенилов проводили на колонках с привитыми фазами PАН и C₁₈ в тех же условиях, но в качестве подвижной фазы использовали метанол и смесь метанол:вода в соотношении 9:1. Хроматограммы накладывали друг на друга при помощи программы для сбора и обработки хроматографических данных Millennium³² Chromatography Manager производства фирмы Waters. Ординаты хроматограмм также приводили к единому для всех хроматограмм значению.

Хроматографирование смеси, состоящей из 2,3,3',4,4'-пентахлор-,

2,3',4,4',5-пентахлор- и 3,3',4,4'-тетрахлорбифенила проводили в градиентном режиме на колонке РАН в следующих условиях: подвижная фаза А – вода : метанол (95 : 5); фаза Б – вода : метанол (5:95); скорость подвижной фазы – 0,5 см³/мин; А – 1 мин, 2–16 мин – линейный градиент, 16–30 – 100 % фаза Б.

Хроматографирование смесей Aroclor 1221, 1242, 1254 и 12 копланарных ПХБ проводили на колонке с привитой фазой РАН в градиентном режиме подвижной фазы при следующих условиях: подвижная фаза А – вода, фаза Б – метанол; скорость подвижной фазы – 0,5 см³/мин, детектирование при $\lambda=250$ нм; А – 0 мин; 0–25 мин – линейный градиент, 25–30 – 100 % фаза Б [154].

2.2.12. Методика исследования микропримесей копланарных ПХБ в пробах гидробионтов (мышечной ткани рыб) методом ГХ/МС в режиме SIM (система GC6890N/MSD5975 InertXL/Autoinjector 7683B фирмы Agilent Technologies с квадрупольным анализатором масс)

Определение копланарных ПХБ в пробах биоты проводили методом хромато-масс-спектрометрии (ХМС) в следующих условиях: газовый хроматограф Agilent Technologies GC6890N с масс-селективным детектором MSD5975 Inert XL и автоинжектором Autoinjector 7683B [69].

Калибровку прибора выполняли по метанольным растворам следующих 10 стандартных образцов в диапазоне концентраций 5–500 мкг/л: 3,4,4',5-тетрахлорбифенил (RPC-096S), 3,3',4,4'-тетрахлорбифенил (RPC-036S), 2',3,4,4',5-пентахлорбифенил (RPC-156S), 2,3',4,4',5,5'-гексахлорбифенил (RPC-100S), 2,3,4,4',5-пентахлорбифенил (RPC-108S), 3,3',4,4',5-пентахлорбифенил (RPC-102S), 2,3,3',4,4',5'-гексахлорбифенил (RPC-164S), 3,3',4,4',5,5'-гексахлорбифенил (RPC-90S), 2,3,3',4,4',5-гексахлорбифенил (RPC-055S), 2,3,3',4,4',5,5'-гептахлорбифенил (RPC-137S) (номера по каталогу Ultra Scientific, 2001 г.). Нижний предел обнаружения метода составил для тетра- и пентахлорбифенилов и гекса- и гептахлорбифенилов соответственно 0,05 и 0,10 мкг/кг мокрого веса мышечной ткани рыб.

Хроматографические условия работы прибора: колонка фирмы Agilent Technologies – HP-5MSI, длина – 30 м, внутренний диаметр – 0,25 мм, степень покрытия – 0,25 мкм; газ-носитель – He, 1 см³/мин при температурной коррекции расхода газа-носителя; температурный режим – изократический период при 60 °С – 1 мин, градиент температуры 60 → 300 °С со скоростью 6 °С/мин и 20 мин – изократический период при 300 °С; объем вводимой пробы – 1 мкл без деления потока, через 1 мин – деление потока 1:50.

Масс-спектрометрические условия работы прибора: параметры детектора – режим SIM при детектировании ионов ПХБ с m/z 290, 292, 294, 324, 326, 328, 358, 360, 362, 392, 394, 396 при ЭИ (70 эВ).

Очищенные концентраты копланарных ПХБ объемом 1 мкл вводили шприцем Гамильтона в PTV-инжектор хроматографа без расщепления потока в автоматическом режиме. Хроматографические условия: газ-носитель – гелий, входное давление – 25 psi, программирование температуры термостата колонок – от 60 до 160 °С со скоростью 25 °С/мин и от 160 до 300 °С со скоростью 6 °С/мин, затем – изотерма в течение 5 мин при 300 °С, колонка – HP-5MSI (30м·0,25мм·0,25мкм) фирмы Agilent Technologies. Метод ГХ/МС реализован на приборе Agilent Technologies GC6890N/MSD5975 Inert XL/Autoinjector 7683B. Получены хроматограммы стандартных смесей ПХБ, Aroclor 1254 и 1260 при различных концентрациях 100, 20, 4, 2, 0,8, 0,4 и 0,2 мг/дм³ [69].

2.3. Схема определения хлорорганических пестицидов и полихлорированных бифенилов в тканях и органах гидробионтов различных водных систем

Для изучения качественного и количественного состава микропримесей ХОП и ПХБ, включая копланарные, в мышечной ткани рыб представлялось необходимым разработать схему аналитического исследования этих соединений, применение которой позволило бы наиболее полно решать задачи

идентификации и определения указанных токсических соединений, содержащихся в биологических тканях и органах, методом ГХ/МС. Разработана схема исследования биологических образцов рыб, которая включает выделение, концентрирование, идентификацию и определение микроколичеств ХОП, суммарного содержания и изомерно-специфического состава ПХБ, содержания индивидуальных копланарных ПХБ в этих объектах (рис. 2.2).

Схема исследования указанных СОЗ в тканях и органах гидробионтов [68–70, 153–155] включает следующие этапы работ:

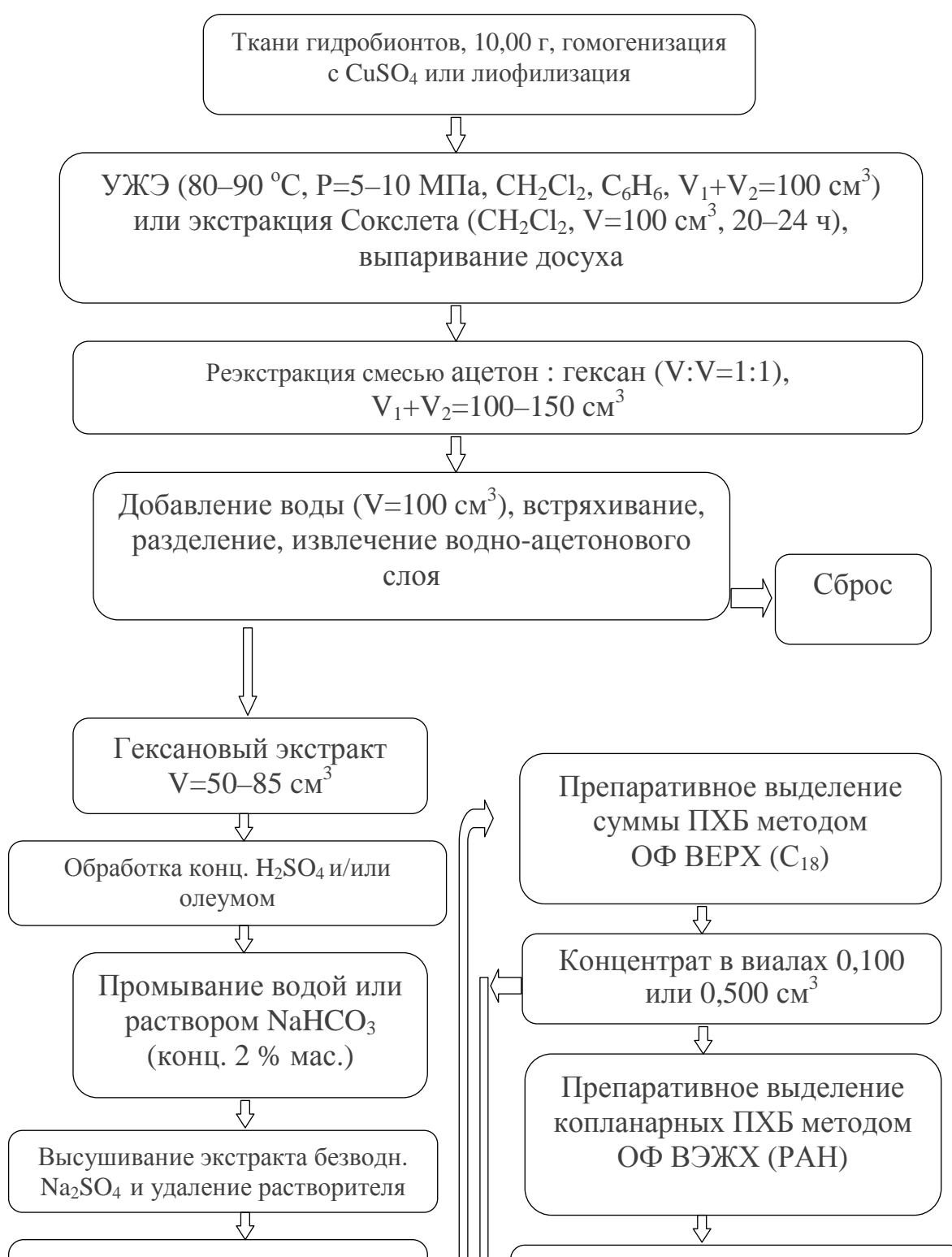


Рис. 2.2. Схема определения ХОП и ПХБ методами УЖЭ и ЭС.

1) разработка эффективных стадий методики пробоподготовки микропримесей ХОП, ПХБ и копланарных ПХБ методами УЖЭ и препаративной ВЭЖХ для их выделения из гидробионтов природных водных объектов бассейна р. Днепр;

2) оптимизация условий выделения и количественного определения ХОП, ПХБ и копланарных ПХБ методом ГХ/МС при ЭИ по ТГС в режимах полного сканирования (полный диапазон масс) (режим SCAN) и селективного мониторинга ионов по избранным (характеристическим) ионам (режим SIM);

3) применение способа препаративной ВЭЖХ для очистки концентратов ОЛОС гидробионтов с целью выделения персистентных суперэкоотоксикантов;

4) апробация и применение схем определения и мониторинга ХОП, ПХБ и копланарных ПХБ.

Применение олеума (дымящая концентрированная H_2SO_4 , содержащая 10–60 % SO_3) на стадии очистки оправдано, поскольку происходит дополнительное удаление балластных органических веществ. Происходит разрушение соединений, содержащих непредельные связи. На этой стадии также происходит дегидратация высших спиртов с образованием непредельных соединений с последующим их окислением и глубоким разрушением. Хотя большинство балластных ароматических соединений, включая природные стероиды, удаляется при обработке концентрированной H_2SO_4 , но наиболее полное удаление соединений этого класса происходит под действием олеума с образованием различных сульфопроизводных. Многие элементоорганические

соединения (N-, S-, P-содержащие и другие) растворяются в олеуме с последующей глубокой деструкцией. При применении этой процедуры можно достичь увеличения отношения сигнал/шум в 100 раз по сравнению с применением только концентрированной H_2SO_4 .

На основе разработанных и усовершенствованных методик пробоподготовки концентратов и их исследования методами ГХ/МС в режиме SIM и ГХ/ЭЗД представлена схема определения и мониторинга ХОП, суммарного содержания и изомерно-специфического состава ПХБ, содержания индивидуальных копланарных ПХБ в этих биологических объектах (рис. 2.2), которая включает следующие отдельные стадии, а именно: (1) УЖЭ хлорорганических соединений из липидных тканей гидробионтов; (2) обработка гексанового экстракта олеумом; (3) жидкостно-экстракционное выделение ХОП и ПХБ гексаном из органическо-кислотной массы; (4) препаративное выделение копланарных бифенилов из смеси ХОП и ПХБ; (5) разделение, идентификация и определение ХОП, ПХБ и копланарных ПХБ в режиме SIM методом ГХ/МС.

Схема реализована (апробирована и применена) для определения и мониторинга указанных соединений в липидных тканях гидробионтов различных водных систем Украины.

РАЗДЕЛ 3

УСТАНОВЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ ПРОБОПОДГОТОВКИ ХЛОРОРГАНИЧЕСКИХ ПЕСТИЦИДОВ И ПОЛИХЛОРИРОВАННЫХ БИФЕНИЛОВ ИЗ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ РЫБ

В данном разделе представлены результаты выделения липидной фракции из мышечной ткани рыб, содержащей хлорорганические соединения (ХОП, ПХБ и копланарные ПХБ), методом УЖЭ и подбор условий варианта УЖЭ органическими растворителями и их смесями, а также ступенчатыми градиентами растворителей из мышечной ткани рыб, при которых достигается:

- максимальные полнота и скорость извлечения целевых соединений при минимальных затратах времени на экстракцию;
- минимальное присутствие в экстракте балластных (нежелательных) высокомолекулярных гидрофильных соединений;
- небольшой расход растворителей, необходимый для извлечения целевых соединений (низкая себестоимость экстракции).

3.1. Метод ускоренной жидкостной экстракции

Схема пробоподготовки ХОП, ПХБ с использованием метода УЖЭ представлена в разделе 2. При разработке метода УЖЭ на первом этапе проведен эксперимент с тестовыми образцами мышечной ткани рыб методом

ЭС, приводящего к исчерпывающей жидкостной экстракции органических соединений из твердых образцов и дальнейшее сравнение метода УЖЭ проводили относительно классического метода.

Представлены результаты выделения липидной фракции из мышечной ткани рыб, содержащей хлорорганические соединения (ХОП, ПХБ, копланарные ПХБ и ПХДД), методом УЖЭ и результаты выделения копланарных бифенилов из общего концентрата смеси ХОП и ПХБ методом микропрепаративной ВЭЖХ в аналитическом масштабе с целью их анализа методом ГХ/МС.

Масса экстрагируемых органических соединений. Результаты определения массы экстрагируемых органических соединений для 10 параллельных определений тестового образца № 3 метиленхлоридом в аппарате Сокслета представлены в табл. 3.1. Среднее значение массы составляет $284,2 \pm 2,2$ мг. Относительное стандартное отклонение составляет 0,8 %.

Таблица 3.1. □ Масса экстрагируемых органических соединений из тестового образца № 3 метиленхлоридом в аппарате Сокслета

Опыт п/п	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Масса, мг	287	283	284	281	284	281	287	286	284	285
Масса ср., мг	$284,2 \pm 2,2$ (0,8 %)									

Результаты определения массы экстрагируемых органических соединений для пяти тестовых образцов ткани, полученных способами А (навеска влажной ткани перетерта с безводным CuSO_4 до сухой однородной массы) и Б (навеска влажной ткани, высушенной лиофильной сушкой), при экстракции метиленхлоридом, диэтиловым эфиром и бензолом представлены в табл. 3.2.

Средние значения масс тестовых образцов № 1 □ 5 ткани, полученных по способу А, соответственно составляют 161,0; 211,7; 280,7; 124,0; 298,7, и, по способу Б, □ 159,7; 208,7; 288,7; 120,3; 303,0 мг. Отклонения масс образцов от

среднего значения находятся в интервалах и соответственно составляют $1,1 \square 3,6$ \square по способу А и $1,5 \square 7,1$ % \square по способу Б. Отклонения масс от среднего значения (160,4; 210,2; 284,7; 122,2; 300,9 мг) для одних и тех же образцов, приготовленных разными способами, соответственно составляют 0,9; 2,1; 5,7; 2,6; 3,0 %. Из данного эксперимента следует, что оба способа подготовки образцов по классическому варианту ЭС по массе выделенных органических соединений дают практически хорошо совпадающие результаты, отличие которых находится в интервале $0,9 \square 5,7$ %.

Таблица 3.2. \square Масса экстрагируемых органических соединений тестовых образцов ткани, приготовленных разными способами, в аппарате Сокслета

Про- ба	Общая масса экстрагируемых органических соединений, мг							
	Способ А				Способ Б			
	мети- лен- хло- рид	диэти- ловый эфир	бен- зол	среднее	мети- лен- хло- рид	диэти- ловый эфир	бен- зол	среднее
1	162	166	155	161,0 \pm 5,6 (3,5 %)	158	166	155	159,7 \pm 5,7 (3,6 %)
2	213	205	217	211,7 \pm 6,1 (2,8 %)	212	206	208	208,7 \pm 3,1 (1,5 %)
3	284	270	288	280,7 \pm 9,5 (3,4 %)	297	281	288	288,7 \pm 8,0 (2,8 %)
4	126	127	119	124,0 \pm 4,4 (3,6 %)	122	111	128	120,3 \pm 8,6 (7,1 %)
5	300	301	295	298,7 \pm 3,2 (1,1 %)	315	300	294	303,0 \pm 10,8 (3,6 %)

Концентрация ХОП и ПХБ. Во всех экстрактах, полученных двумя альтернативными способами, идентифицированы ХОП и ПХБ и определена их концентрация методом ГХ/МС (табл. 3.3).

Средние значения концентраций 4,4'-ДДЭ тестовых образцов № 1 \square 5 ткани, полученных по способу А, соответственно составляют 527,3; 138,7; 64,7; 135,3; 45,7, и, по способу Б, \square 530,7; 148,3; 64,7; 133,7; 54,0 мкг/кг массы влажного вещества и аналогично для: 4,4'-ДДД \square 745,0; 164,7; 56,0; 415,3; 71,0

и 740,7; 163,0; 54,7; 417,7; 69,0; 4,4'-ДДТ □ 228,0; 169,0; 56,0; 345,0; 53,0 и 229,0; 164,7; 62,3; 344,3; 55,7; ПХБ □ 2294,3; 1576,0; 1011,7; 5539,0; 347,7 и 2337,0; 1482,3; 924,7; 5448,3; 359,7 мкг/кг массы влажного вещества.

Отклонения концентраций 4,4'-ДДЭ образцов от среднего значения находятся в интервалах и соответственно составляют 1,3□10,8 □ по способу А и 1,8□13,0 % □ по способу Б и аналогично для: 4,4'-ДДД □ 1,2□12,5 и 1,4□9,3; 4,4'-ДДТ □ 2,8□22,8 и 2,7□16,1; ПХБ □ 1,2□7,1 и 1,9□10,5 %.

Таблица 3.3. □ Концентрации 4,4'-ДДЭ, 4,4'-ДДД, 4,4'-ДДТ и ПХБ ($C_{4,4'-ДДЭ}$, $C_{4,4'-ДДД}$, $C_{4,4'-ДДТ}$, $C_{ПХБ}$, мкг/кг массы влажного вещества) в пробах ткани

Про-ба	Способ А				Способ Б			
	мети-лен-хлорид	диэти-ловый эфир	бен-зол	среднее	мети-лен-хлорид	диэти-ловый эфир	бен-зол	среднее
1	2	3	4	5	6	7	8	9
$C_{4,4'-ДДЭ}$								
1	528	520	534	527,3±7,0 (1,3 %)	541	522	529	530,7±9,6 (1,8 %)
2	145	132	139	138,7±6,5 (4,7 %)	144	150	151	148,3±3,8 (2,6 %)
3	64	58	72	64,7±7,0 (10,8 %)	60	68	66	64,7±4,2 (6,5 %)
4	134	130	142	135,3±6,1 (4,5 %)	139	127	135	133,7±6,1 (4,5 %)
5	50	45	42	45,7±4,0 (8,8 %)	54	47	61	54,0±7,0 (13,0 %)
$C_{4,4'-ДДД}$								
1	736	745	754	745,0±9,0 (1,2 %)	731	751	740	740,7±10,0 (1,4 %)
2	171	159	164	164,7±6,0 (3,6 %)	170	167	152	163,0±9,6 (5,9 %)
3	59	48	61	56,0±7,0 (12,5 %)	56	49	59	54,7±5,1 (9,3 %)
4	421	395	430	415,3±18,2 (4,4 %)	428	399	426	417,7±16,2 (3,9 %)
5	71	65	77	71,0±6,0	73	64	70	69,0±4,6

				(8,5 %)				(6,7 %)
$C_{4,4'-ДДТ}$								
1	228	244	212	228,0±16,0 (7,0 %)	214	250	223	229,0±18,7 (8,2 %)
2	176	161	170	169,0±7,5 (4,4 %)	157	166	171	164,7±7,1 (4,3 %)
3	57	49	62	56,0±6,6 (11,8 %)	51	66	70	62,3±10,0 (16,1 %)
4	349	334	352	345,0±9,6 (2,8 %)	340	355	338	344,3± 9,3 (2,7 %)
5	51	42	66	53,0±12,1 (22,8 %)	60	55	52	55,7±4,0 (7,2 %)
$C_{ПХБ}$								
1	2300	2214	2369	2294,3±77, 7 (3,4 %)	2451	2348	2213	2337,3±119,4 (5,1 %)
2	1520	1587	1621	1576,0±46, 7 (3,0 %)	1398	1465	1584	1482,3±94,2 (6,4 %)
3	961	1020	1054	1011,7±47, 1 (4,7 %)	902	1031	841	924,7±97,0 (10,5 %)
4	5482	5521	5614	5539,0±67, 8 (1,2 %)	5332	5512	5501	5448,3±100,9 (1,9 %)
5	355	320	368	347,7±24,8 (7,1 %)	357	384	338	359,7±23,1 (6,4 %)

Отклонения концентраций 4,4'-ДДЭ от среднего значения для одних и тех же образцов, приготовленных разными способами, соответственно составляют 0,5, 4,7, 0,0, 0,8, 11,8 % и аналогично для: 4,4'-ДДД □ 0,4, 1,2, 1,6, 0,4, 2,0; 4,4'-ДДТ □ 0,3, 1,8, 7,6, 0,1, 3,5; ПХБ □ 1,3, 4,3, 6,4, 1,2, 2,4 %.

Из данного эксперимента также следует, что оба способа подготовки образцов по классическому варианту ЭС органических соединений дают практически совпадающие результаты. Интервал совпадения определяемых концентраций приведенных соединений составляет 0,1 □ 11,8 %. Поскольку ЭС приводит к практически полному извлечению органических соединений из твердых образцов, средние значения масс экстрагируемых органических соединений и концентраций ХОП и ПХБ принимали за 100 % их содержания в тестовых образцах ткани и дальнейшее сравнение степени извлечения соединений по методу УЖЭ проводили относительно величин степени

извлечения по методу Сокслета.

Экстрагируемые и водорастворимые соединения. В тех случаях, когда не использовали колонку 3 (раздел 2, рис. 2.1), плотно заполненную безводным CuSO_4 , масса экстрагируемых органических соединений в некоторых случаях превышала массу, полученную при ЭС. Сухие остатки не полностью растворялись в гексане, но частично растворялись в воде. Водорастворимую часть экстрагируемых органических соединений анализировали методом гель-фильтрационной ВЭЖХ.

На рис. 3.1 представлена хроматограмма водорастворимой части экстракта из ткани, полученного методом УЖЭ без пропускания через картридж с безводным CuSO_4 . Пик 1 представляет собой смесь гидрофильных высокомолекулярных соединений с молекулярными массами более 13 кДа. УФ-спектр этого пика не имеет четкого максимума поглощения и не позволяет определить принадлежность данных соединений к определенному классу. Такой спектр свидетельствует о наличии множества различных функциональных групп в составе молекул, регистрируемых в виде этого пика. Пики (группа 2) с временем удерживания 12–20 мин (м.м. в диапазоне 2–5 кДа) имеют максимумы поглощения при $\lambda=260$ нм и, вероятно, принадлежат продуктам деградации высокомолекулярных нуклеиновых кислот. Эти соединения отсутствуют в экстрактах, пропущенных через картридж с безводным CuSO_4 .

Установлено, что УЖЭ позволяет легко в режиме on-line удалять из экстракта гидрофильные балластные соединения, мешающие определению ХОП и ПХБ, даже в тех случаях, когда для экстракции ткани используют смеси, содержащие смешивающиеся с водой растворители.

На рис. 3.2 представлена интегральная кривая дифференциального лазерно-рефрактометрического детектора, характеризующая извлечение органических соединений из ткани методом УЖЭ. Провал перед пиком обусловлен выходом пузырьков воздуха из ячейки экстракции. Как видно из этого рисунка, наиболее интенсивно экстракция происходит в начале процесса

(наибольшее количество органических соединений содержится в первых 4 см³ экстракта). Потом извлечение происходит медленно и кривая приближается к нулевому значению, но не достигает его даже после пропускания 25 см³ метиленхлорида.

Влияние температуры. При проведении УЖЭ, в зависимости от имеющегося оборудования (рис. 2.1, 3.1, 3.2), не всегда удобно использовать высокие температуры экстракционной ячейки. Чтобы определить оптимальную температуру, при которой достигается удовлетворительное извлечение гидрофобных соединений из образцов ткани, тестовые образцы экстрагировали при температурах 20, 40, 60, 80, 100 и 120 °С. Остальные параметры экстракции при этом сохраняли постоянными для всех проб (растворитель – метиленхлорид при прохождении со скоростью 10 см³/мин в течение 6 мин).

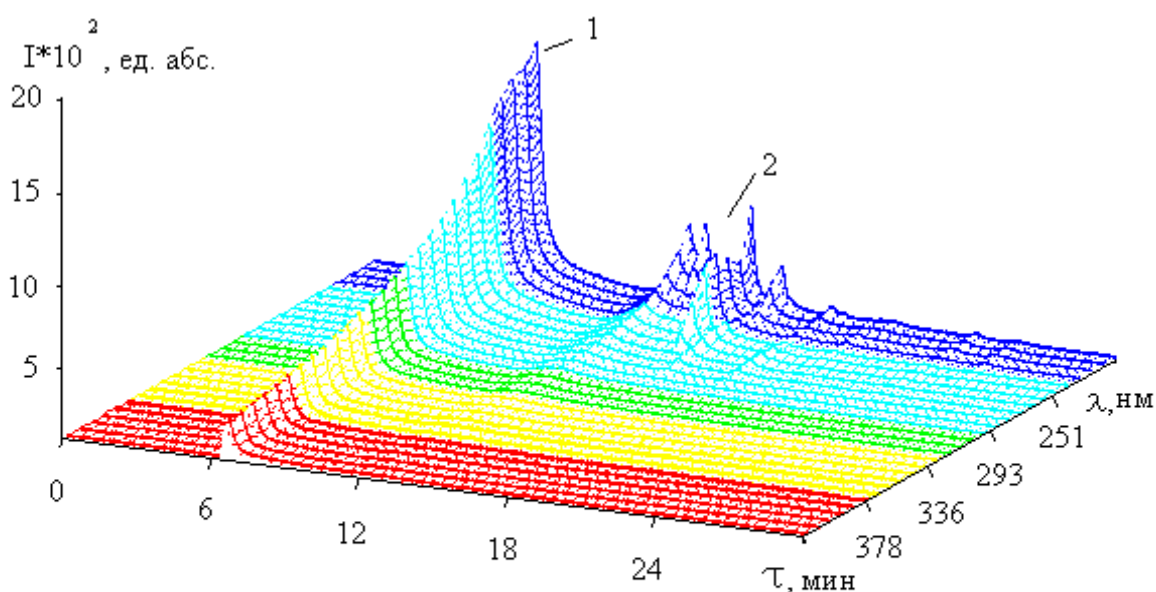


Рис. 3.1. Хроматограмма высокомолекулярных соединений, экстрагированных из ткани, в трехмерном представлении, полученная методом ВЭЖХ в следующих условиях: жидкостный хроматограф – Hewlett-Packard HP 1050 с

диодно-матричным детектором HP DAD 1050 в режиме сканирования спектра в диапазоне 220–400 нм; колонка – Waters Ultrahydrogel™ 250 размером 7,8×300 мм; подвижная фаза – (фосфатный буферный раствор, pH 6,5 + 33 г/дм³ Na₂SO₄·10H₂O) : ацетонитрил (9 : 1); скорость – 0,7 см³/мин, объем вводимой пробы – 50 мкл. Калибровка молекулярных масс выполнена по следующим стандартным образцам: цитохром С (Fluka 17917, м.м. = 13 кДа, τ = 12,1 мин), аprotинин (Fluka 17916, м.м. = 6,5 кДа, τ = 14,2 мин), окситоцин (Sigma O 3251, м.м. = 1 кДа, τ = 26,8 мин).

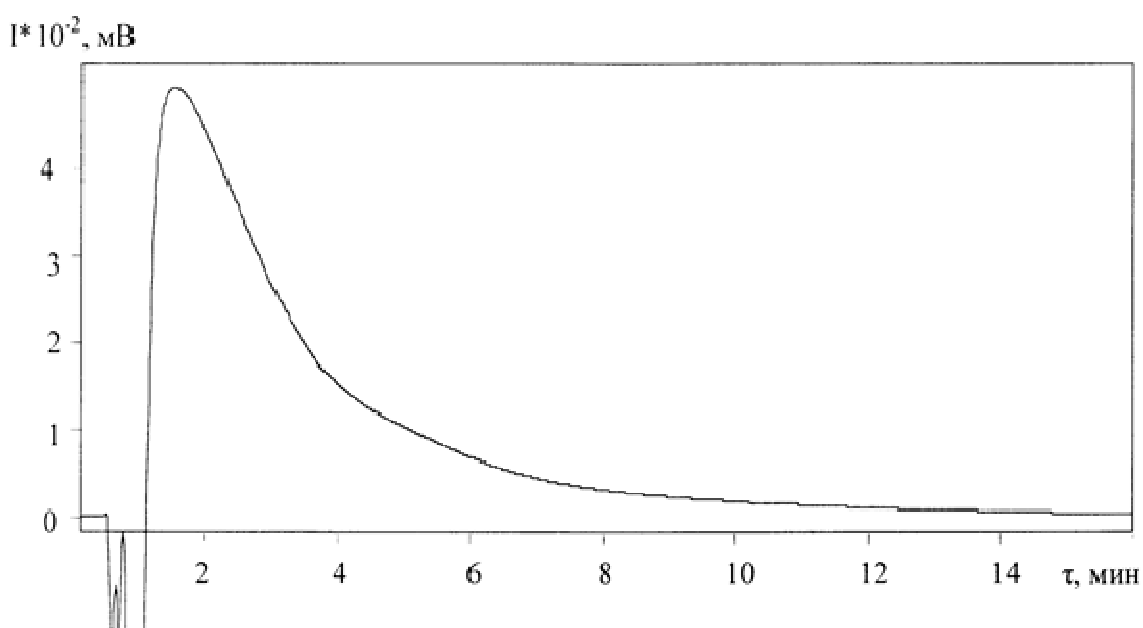


Рис. 3.2. Регистрация экстрагируемых органических соединений из ткани на выходе из системы УЖЭ при лазерно-рефрактометрическом детектировании.

Степень извлечения неполярных соединений (R, %) выражали как процент массы сухого остатка экстракта, полученного методом УЖЭ, от средней массы сухого остатка экстракта, полученного при использовании исчерпывающей экстракции в аппарате Сокслета и рассчитывали по формуле:

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

Результаты определения степени извлечения неполярных органических

соединений из проб мышечной ткани рыб при разных температурах экстракции представлены в табл. 3.4 и более наглядно □ зависимость R_T от температуры экстракции на рис. 3.3.

Полученные результаты показывают, что при низких температурах экстракции 20–40 °С степень извлечения органических соединений из всех тестовых образцов ткани низкая □ 60–70 % и возрастает с повышением температуры экстракции. При температурах 40–60 °С степень экстракции повышается и при дальнейшем увеличении температуры до 100–120 °С приближается к выходу на “плато”, при этом достигается степень извлечения гидрофобных соединений 80–87 %. Показано, что для УЖЭ образцов ткани вполне достаточной может быть температура 80–90 °С, при этом достигается степень извлечения 78–85 %. Повышение температуры экстракционной ячейки до 120 °С приводит к повышению полноты извлечения только на 2–3 %.

Таблица 3.4. □ Степень извлечения неполярных органических соединений (R_T) из тестовых образцов методом УЖЭ при разных температурах

Проба	R_T , %					
	20 °С	40 °С	60 °С	80 °С	100 °С	120 °С
1	64,2	75,0	80,4	82,2	84,1	84,9
2	61,1	71,4	76,5	78,2	79,8	80,6
3	66,5	77,1	81,8	83,4	84,7	85,5
4	60,7	71,6	77,4	79,4	81,2	82,0
5	68,6	78,9	83,6	85,3	86,6	87,0

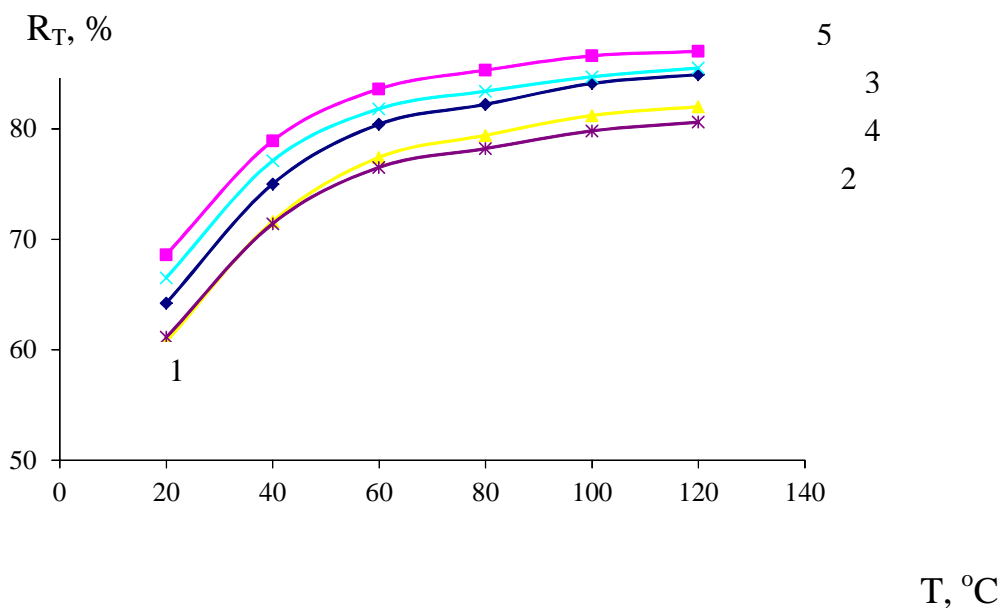


Рис. 3.3. Зависимость степени извлечения гидрофобных соединений из тестовых образцов (номер 1–5) ткани от температуры экстракции.

Как видно из табл. 3.4, при температуре 20 °C из ткани извлекается 60–70 % органических соединений при расходе 60 см³ метиленхлорида. Очевидно, что в данных условиях нерационально собирать экстракт после 20 см³ растворителя, израсходованного на экстракцию.

Степень извлечения от температуры и объема растворителя. Для определения объема растворителя, достаточного для извлечения основной массы органических соединений из образца ткани, рассмотрим экстракцию тестового образца № 5 при указанных температурах. Метиленхлорид собирали в 6 колб по 10 см³ (фракции I–VI). Массу экстрагируемых органических соединений определяли отдельно в каждой фракции. Концентрации ХОП и ПХБ также определяли отдельно в каждой фракции для серии, полученной при температуре экстракции 60 °C.

Степень извлечения гидрофобных соединений R_T при разных температурах в каждой фракции представлена в табл. 3.5 и на рис. 3.4.

Таблица 3.5. □ Степень извлечения гидрофобных соединений R_T в собранных

фракциях (1–6) и неэкстрагированные вещества (7) тестового образца № 5 при разных температурах в нормализованном виде от массы, определенной при ЭС

Т, °С	R _Т , %						
	1	2	3	4	5	6	7
20	56,8	5,9	2,7	1,5	1,0	0,7	31,4
40	67,5	5,4	2,8	1,5	1,0	0,7	21,1
60	75,5	4,1	1,9	1,1	0,6	0,4	16,4
80	78,0	4,3	1,1	0,9	0,8	0,3	14,6
100	82,3	3,7	0,3	0,2	0,1	0,1	13,3
120	84,0	2,6	0,2	0,1	0,1	0,0	13,0

Из представленного материала видно, что степень извлечения гидрофобных соединений R_Т, существенно зависит от температуры экстракции и мало зависит от объема растворителя, израсходованного на экстракцию. Например, при проведении УЖЭ при 100 °С, в первых 20 см³ экстракта содержится около 86 % извлекаемых органических соединений, а в следующих 40 см³ – менее 1 %; при УЖЭ при 20 °С эти цифры составляют соответственно 63 и 6 %. Поскольку органические соединения растворены в жидкой и твердой фракции липидной ткани матрицы, слабо связанные вещества жидкой фракции (около 65 %) извлекаются при температуре 20 °С, в то время как другие – очень сильно связаны с твердой фракцией и не извлекаются даже при 120 °С.

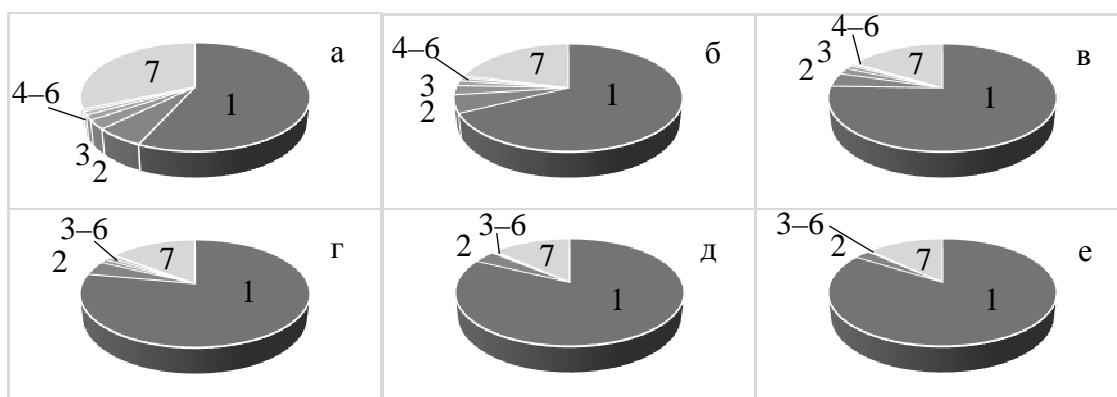


Рис. 3.4. Степень извлечения гидрофобных соединений тестового образца № 5 в собранных фракциях (1–6) и неэкстрагированные вещества (7) при разных температурах экстракции: а – 20, б – 40, в – 60, г – 80, д – 100, е – 120 °С.

Открываемость внутреннего стандарта. Для того, чтобы определить поведение целевых соединений при проведении УЖЭ в пробу № 5, которую экстрагировали при 60 °С, вводили внутренний стандарт – 2,3,3',4,4',5-гексахлорбифенил (2,3,3',4,4',5-ГХБ) в соответствии с приведенной ранее методикой.

Концентрации 4,4'-ДДЭ, ПХБ и внутреннего стандарта в разных фракциях экстрактов представлены в табл. 3.6.

Из представленного материала следует, что открываемость внутреннего стандарта (около 100 %) достигается уже при 60 °С. Поскольку 4,4'-ДДЭ и ПХБ связаны с матрицей, их извлечение при этой температуре происходит неполностью. Поэтому внутренний стандарт может использоваться только для оценки потерь целевых соединений в процессе пробоподготовки, но не для оценки их открываемости в пробах.

Таблица 3.6. □ Концентрации 4,4'-ДДЭ, ПХБ и 2,3,3',4,4',5-ГХБ во фракциях I–VI экстракта тестового образца № 5

№ фракции	Концентрация соединения, мг/кг влажного вещества		
	2,3,3',4,4',5-ГХБ	ПХБ	4,4'-ДДЭ
I	1,4	0,25	0,33
II	0,5	0,87	0,10
III	0,1	0,17	0,25
IV	0	н/д	н/д
V	0	н/д	н/д
VI	0	н/д	н/д

ХОП и ПХБ в образцах ткани ассоциированы с жировой фракцией и их степень извлечения близкая к степени извлечения остальных гидрофобных

соединений, поэтому масса экстрагируемых веществ при изучении закономерностей проведения УЖЭ может служить критерием для оценки извлечения ХОП и ПХБ (не надо каждый раз определять их концентрации методом ГХ/МС).

Давление экстракции. Давление растворителя в ячейке экстракции не вводили как параметр процесса. Оно создавалось насосом и зависело от скорости подачи растворителя и температуры экстракции. В процессе экстракции давление растворителя увеличивалось со временем (рис. 3.5). При извлечении органических соединений из ткани одновременно происходит экстракция воды и растворимых в ней соединений. В колонке 3 (раздел 2, рис. 2.1) при пониженной температуре вода поглощается безводным CuSO_4 . При этом увеличивается объем соли и растет сопротивление колонки. При высоких температурах вода экстрагируется более интенсивно, чем при низких, в связи с этим процесс происходит при более высоких давлениях.

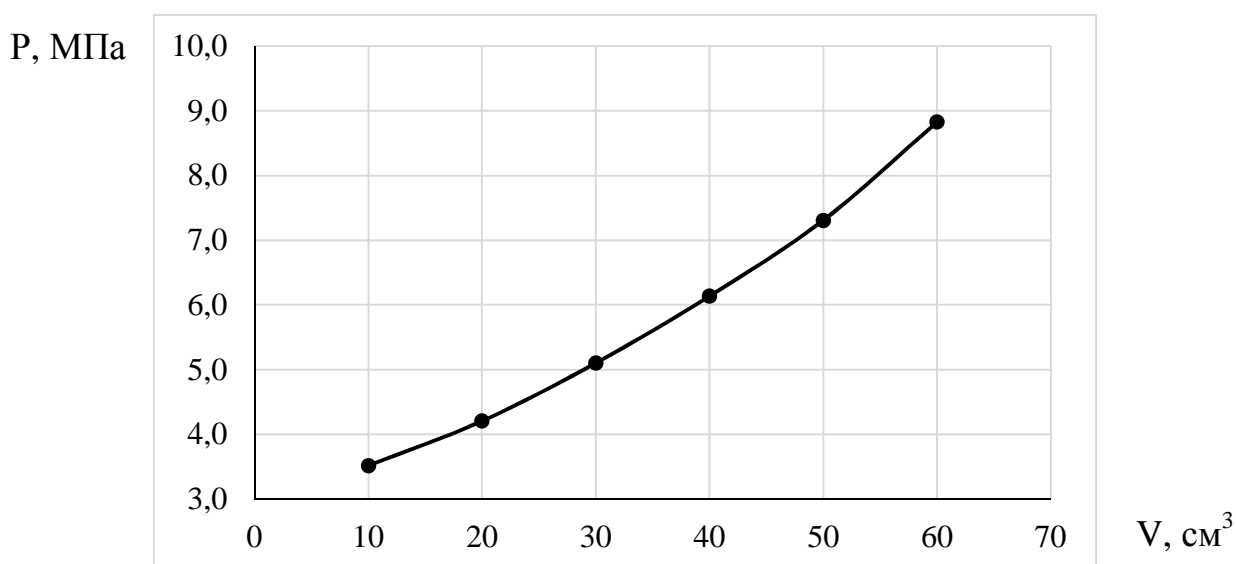


Рис. 3.5. Зависимость давления в ячейке экстракции (P) от объема метилхлорида (V), использованного на экстракцию тестового образца № 1, при температуре экстракции 60 °С.

Влияние скорости подачи растворителя. Изучено влияние скорости

подачи растворителя на экстракцию органических соединений из ткани. В табл. 3.7 представлена степень извлечения гидрофобных органических соединений из тестовых образцов при их экстракции метиленхлоридом при 80 °С при скорости подачи органического растворителя 2 и 10 см³/мин. По массе экстрагируемых органических соединений в каждом тестовом образце определяли степень извлечения гидрофобных органических соединений, которая представлена в табл. 3.7.

Поскольку равновесие между соединениями в растворителе и материале матрицы наступает быстро, трудно установить оптимальную скорость подачи растворителя. Понятно, что при высоких скоростях подачи растворителя, экстракция происходит при более высоких давлениях, чем при низких скоростях, и время взаимодействия с материалом матрицы увеличивается. Высокие скорости подачи растворителя дают возможность сократить время экстракции.

Таблица 3.7. □ Степень извлечения (R) гидрофобных органических соединений из тестовых образцов при скоростях потока метиленхлорида V₁=2 и V₂=10 см³/мин

Проба	R, %	
	V ₁	V ₂
1	81,8	82,2
2	77,9	78,2
3	80,3	83,4
4	78,8	79,4
5	85,1	85,3

Оптимальный выбор растворителя. Проведено экспериментальное исследование относительно оптимального выбора растворителя для извлечения органических соединений из ткани в условиях УЖЭ.

Для выбора растворителя, способного экстрагировать наибольшее количество органических соединений, проводили УЖЭ тестовых проб в оптимальных условиях, подобранных ранее: температура – 80 °С, скорость

потока растворителя – 10 см³/мин, объем экстракта – 50 см³. Для всех проб условия использования разных растворителей были одинаковы. В качестве растворителей использовали метиленхлорид, диэтиловый эфир, бензол, хлороформ, этилацетат, четыреххлористый углерод, дихлорэтан, толуол, гексан, гептан. Извлечение гидрофобных органических соединений при УЖЭ разными растворителями представлено в табл. 3.8.

Оптимальный выбор смесей растворителей. Для УЖЭ использовали также смеси растворителей: метиленхлорид : метанол; метиленхлорид : ацетон; метиленхлорид : ацетонитрил; бензол : метанол; бензол : ацетон; бензол : ацетонитрил; диэтиловый эфир : метанол; диэтиловый эфир : ацетон; диэтиловый эфир : ацетонитрил в соотношении 9 : 1. Более высокие концентрации метанола, ацетона или ацетонитрила в этих смесях приводили к интенсивному извлечению воды из пробы и к забиванию колонки с безводным CuSO₄. Степень извлечения R неполярных соединений при УЖЭ смесями растворителей представлена в табл. 3.8.

Таблица 3.8. □ Степень извлечения (R) гидрофобных органических соединений из тестовых образцов ткани (№ 1–5) при УЖЭ разными органическими растворителями и их смесями

Растворитель или смесь растворителей	R, %				
	1	2	3	4	5
Метиленхлорид	82,2	78,2	83,4	79,4	85,3
Диэтиловый эфир	76,5	70,8	82,4	77,7	83,3
Бензол	80,5	84,3	85,6	82,3	84,6
Хлороформ	80,2	79,1	83,3	80,8	86,0
Этилацетат	75,6	72,1	82,2	77,9	82,4
Четыреххлористый углерод	81,3	75,6	79,8	81,1	84,1
Дихлорэтан	81,4	80,2	81,4	78,1	86,2
Толуол	81,0	76,2	84,1	80,3	85,0
Гексан	54,3	42,5	60,6	57,9	63,2
Гептан	52,6	42,3	61,0	59,9	61,7
Метиленхлорид : метанол	82,2	77,3	81,2	82,0	84,4
Метиленхлорид : ацетон	84,7	78,2	81,0	79,0	85,1
Метиленхлорид : ацетонитрил	80,4	76,5	83,3	80,5	86,3

Бензол : метанол	81,1	76,6	84,6	80,9	86,3
Бензол : ацетон	83,3	80,8	81,3	82,1	83,2
Бензол : ацетонитрил	79,5	79,2	80,7	82,0	84,9
Диэтиловый эфир : метанол	81,2	79,5	85,6	80,3	85,1
Диэтиловый эфир : ацетон	82,4	75,9	84,3	81,1	82,0
Диэтиловый эфир : ацетонитрил	81,6	78,8	84,8	82,6	83,0

Из представленного экспериментального материала следует, что при использовании релевантного растворителя (или смеси растворителей) достигается:

- извлечение 75–85 % неполярных веществ;
- невозможно выбрать универсальный растворитель, при использовании которого гарантированно достигается высокое извлечение для любого образца ткани (более 90 %).

Последовательная экстракция растворителями и их смесями. Изучена также последовательная экстракция образцов ткани разными органическими растворителями и их смесями. Пробы тестовых образцов ткани экстрагировали при 80 °С и скорости подачи растворителя 10 см³/мин с трехкратной сменой растворителя на последующий растворитель (или смесь растворителей) – диэтиловый эфир, метиленхлорид, бензол : метанол в соотношении 9 : 1, хлороформ и собирали 40 см³ первого растворителя и по 10 см³ последующих в отобранные фракции (I–IV) для каждой из 5 проб тестовых образцов. После УЖЭ, те же пробы экстрагировали в аппарате Сокслета хлороформом в течение 24 ч (V фракция). Определяли массу экстрагируемых органических соединений в каждой фракции. Результаты последовательной экстракции разными органическими растворителями и исчерпывающей экстракции в аппарате Сокслета тестовых образцов мышечной ткани рыб представлены в табл. 3.7.

Таблица 3.9 □ Степень извлечения (R) гидрофобных органических соединений из тестовых образцов ткани (№ 1–5) при последовательной УЖЭ разными органическими растворителями и их смесями

Растворитель	R, %				
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5
Диэтиловый эфир	77	72	81	78	83
Метиленхлорид	12	14	7	5	10
Бензол : метанол (9 : 1)	5	6	4	3	3
Хлороформ	0,6	0,5	0,6	0,8	0,8
Хлороформ, ЭС	5,4	7,5	7,4	13,2	3,2

Применение растворителей и смесей для последовательной экстракции, как и предыдущие рассмотренные варианты извлечения, также не приводит к полному исчерпывающему извлечению органических соединений.

Для полного извлечения необходима ЭС. Однако данная методика не предусматривает полного извлечения целевых органических соединений. Указанной степени извлечения вполне достаточно для представления точности и правильности определенных уровней содержания ХОП и ПХБ в исследуемых биологических матрицах.

РАЗДЕЛ 4

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХЛОРООРГАНИЧЕСКИХ ПЕСТИЦИДОВ И ПОЛИХЛОРИРОВАННЫХ БИФЕНИЛОВ В ГИДРОБИОНТАХ БАССЕЙНА Р. ДНЕПР МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ / МАСС- СПЕКТРОМЕТРИИ

Общеизвестно и, как уже отмечено нами ранее, ХОП, ПХБ и ПХДД являются загрязняющими веществами антропогенного происхождения.

В экстракты из биологических матриц эти соединения попадают вместе с веществами жировой ткани, которые мешают определению данных соединений методом ГХ/МС. Массы сухих остатков экстрактов, полученных из навесок гидробионтов (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 являются самыми токсичными 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 являются трудоемкими и требуют больших затрат времени и использования больших количеств особо чистых растворителей или даже растворителей, приготовленных для выполнения целевых задач специального назначения. 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 алюминия и активированного угля [146, 148, 152]. Данный метод выделения требует больших затрат времени для подготовки и проверки сорбентов, упаковки хроматографических колонок, а также значительного расхода органических растворителей и их смесей. Существуют методы выделения ПХБ и ПХДД методом ВЭЖХ в полупрепаративном масштабе [156]. Эти методы позволяют получать высококачественное разделение целевых и балластных соединений, но являются дорогостоящими. В работе [157] описан метод выделения диоксиноподобных веществ из человеческой плазмы методом аффинной хроматографии на сорбенте с привитыми моноклональными антителами. Другой подход к определению веществ с диоксиновой биологической активностью – иммуноферментный анализ [158]. Это относительно простой метод мониторинга, который уступает ГХ/МС по чувствительности и информативности.

Прежде, чем приступить к определению ХОП, ПХБ и других подобных соединений, необходимо разработать методики выделения ХОП, ПХБ и ПХДД

из экстрактов биологического материала, при которых достигается: 1) минимальное наличие 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.

4.1. Препаративное выделение хлорорганических пестицидов, полихлорированных бифенилов и диоксинов из экстрактов гидробионтов для определения методом газовой хроматографии/масс-спектрометрии (способы очистки исходных концентратов)

Фракционирование экстрактов мышечной ткани 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.

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

Экстракты из гидробионтов, полученные по классическому методу ЭС или с использованием УЖЭ [68], упаривали на роторном испарителе досуха и немедленно растворяли не менее, чем в 10 см³ гексана (Riedel-de-Haën N 34412).

Данные методики подробно описаны в разделе 2.

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 о.с.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 по методике, приведенной в разделе 2.

Для выделения ПХДД из концентратов проб мышечной ткани рыб использовали метод ВЭЖХ. Методика приведена в разделе 2.

Для определения времени удерживания ПХБ и ПХДД использовали соответственно модельную смесь Aroclor 1254 (Supelco N 48707) с общей концентрацией ПХБ 20 мг/дм³ и раствор 2,3,7,8-ГХДД (Supelco N 4-8599) в концентрации 1 мг/дм³.

Сухие остатки проб биологического материала растворяли в метиленхлориде и вводили в инжектор жидкостного хроматографа, в соответствии с приведенной методикой в разделе 2.

Чтобы оценить степень очистки реальных проб ХОП, ПХБ и ПХДД от мешающих их определению веществ жировой ткани гидробионтов, которая достигается после стадии хроматографического выделения целевых соединений, реальные пробы после очистки концентрированной серной кислотой, а так же концентраты фракций целевых соединений хроматографировали на газовом хроматографе Varian 3400 с пламенно-ионизационным детектором (ПИД) по методике, приведенной в разделе 2.

Для выбора оптимальных условий очистки проб от остаточных балластных соединений материала матрицы выполнена их идентификация методом ГХ/МС. Хроматограмма по полному ионному току балластных органических соединений биологического образца, очищенного минерализацией концентрированной серной кислотой, представлена на рис. 4.1.

$I \cdot 10^{-7}$, усл. ед.

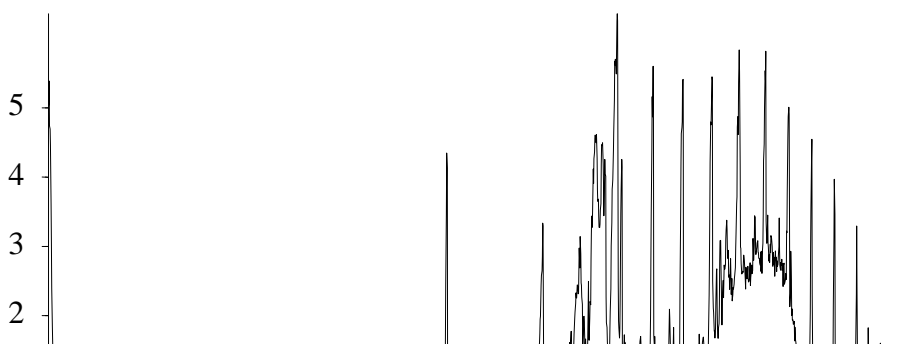


Рис. 4.1. Хроматограмма ТИС балластных соединений образца ткани гидробионта, очищенного минерализацией концентрированной серной кислотой.

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 наличие в источнике ионов создает лишнее парциальное давление паров, что подавляет общую чувствительность МСД. В образце балластных соединений мышечной ткани гидробионта, очищенного 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 *n*-карбоновые кислоты, *n*-алканы, изоалканы, стероиды и продукты их деградации, а также хлорированные производные углеводородов.

На рис. 4.2 представлена реконструированная хроматограмма (экстракт из ТИС, режим SCAN) биологического образца Киевского водохранилища по характеристическому для жирных кислот иону с m/z 129.

$I \cdot 10^{-5}$, усл.ед.



Рис. 4.2. Реконструированная хроматограмма (экстракт из ТИС, режим SCAN) по характеристическому для жирных кислот иону с m/z 129.

На рис. 4.3 представлены масс-спектры пика пальмитиновой кислоты из образца биоты (скан 1150–1152) и полученный в результате поиска по библиотеке масс-спектров Wiley 275.

В пробе идентифицированы *n*-карбоновые кислоты (C_{10} – C_{20}). Пальмитиновая кислота мешает определению трихлорбифенилов, так как при ее фрагментации образуется интенсивный ион M^{+*} с m/z 256 и время выхода ее пика близкое к времени выхода трихлорбифенилов. Другие карбоновые кислоты также мешают определению тетрахлор-, пентахлор-, гексахлор- и гептахлорбифенилов, а также ДДЭ, ДДД и ДДТ методом ГХ/МС.

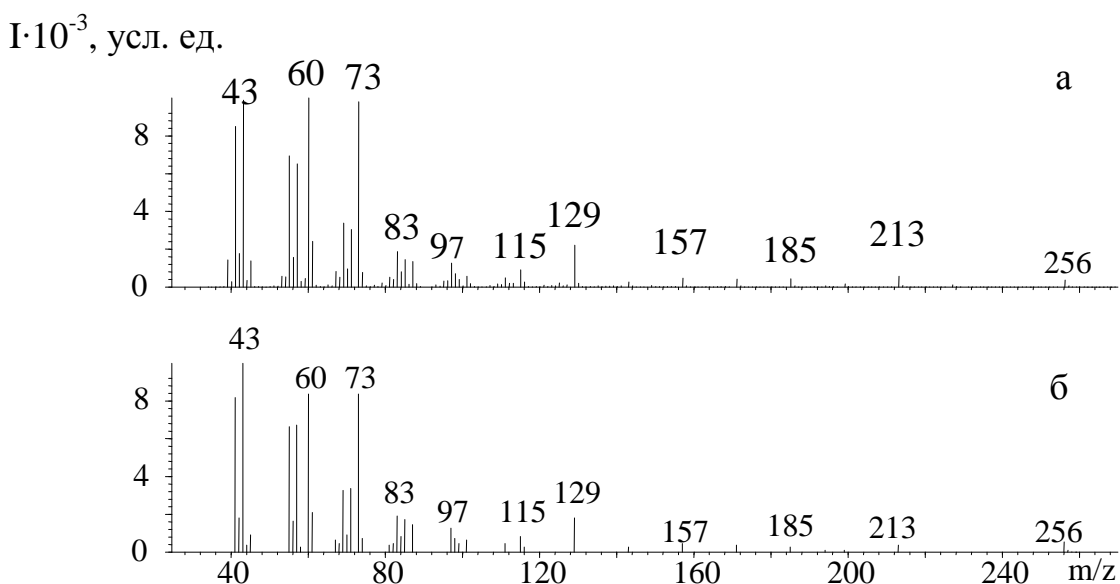


Рис. 4.3. Масс-спектры пальмитиновой кислоты из мышечной ткани рыбы (режим SCAN) (а) и полученный в результате поиска по библиотеке Wiley 275 (б). Степень соответствия – 98 %.

На рис. 4.4 представлена реконструированная хроматограмма (экстракт из ТИС, режим SCAN) образца гидробионта Киевского водохранилища по характеристическому для алканов иону с m/z 85.

На этом рисунке видно несколько гомологических рядов углеводородов, самый интенсивный из которых принадлежит *n*-алканам, остальные – изоалканам. 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.

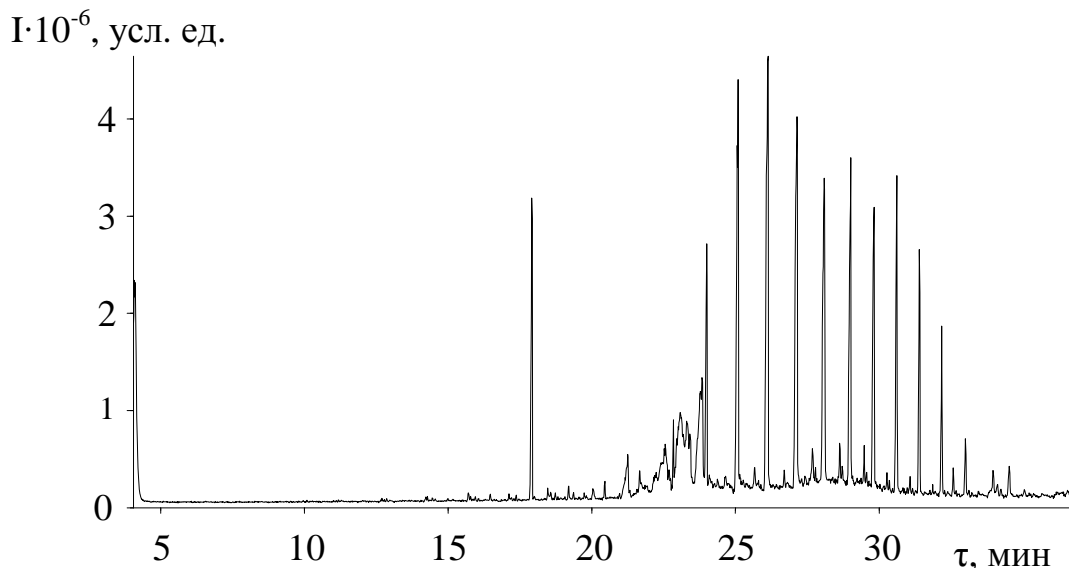


Рис. 4.4. Реконструированная хроматограмма образца гидробионта (экстракт из ТИС, режим SCAN) по характеристическому для алифатических углеводородов иону с m/z 85.

На рис. 4.5 представлены масс-спектры *n*-алкана (скан 1878–1881) из образца гидробионта и полученный в результате поиска по библиотеке масс-спектров Wiley 275.

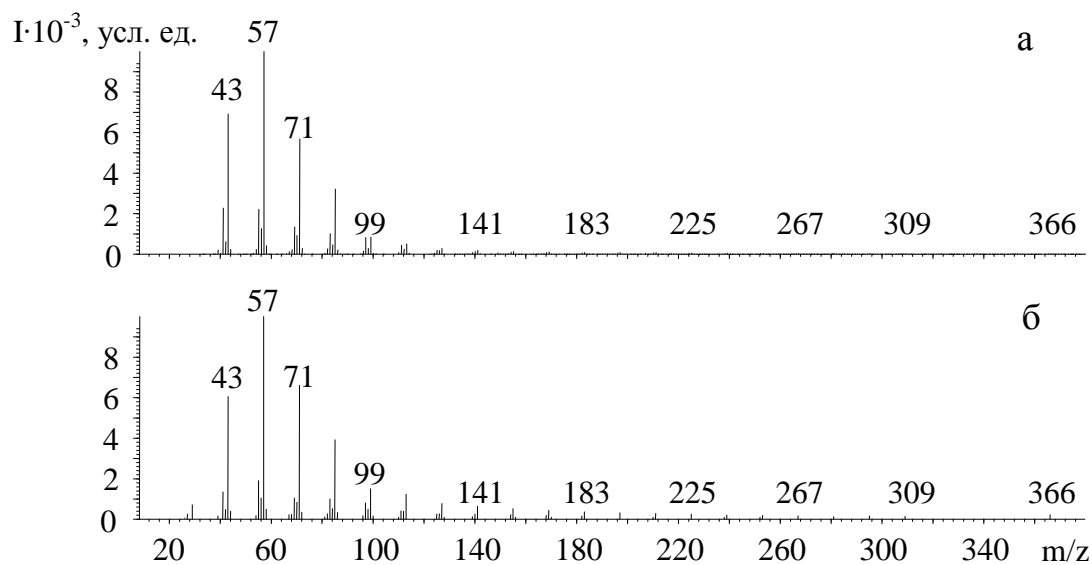


Рис. 4.5. Масс-спектры алифатического углеводорода *n*-тетракозана из образца биоты (режим SCAN) (а) и полученный в результате поиска по библиотеке Wiley 275 (б). Степень соответствия – 95 %.

На рис. 4.6 представлена реконструированная хроматограмма (экстракт из ТИС, режим SCAN) образца биоты Киевского водохранилища по характеристическому для холестерина иону с m/z 355.

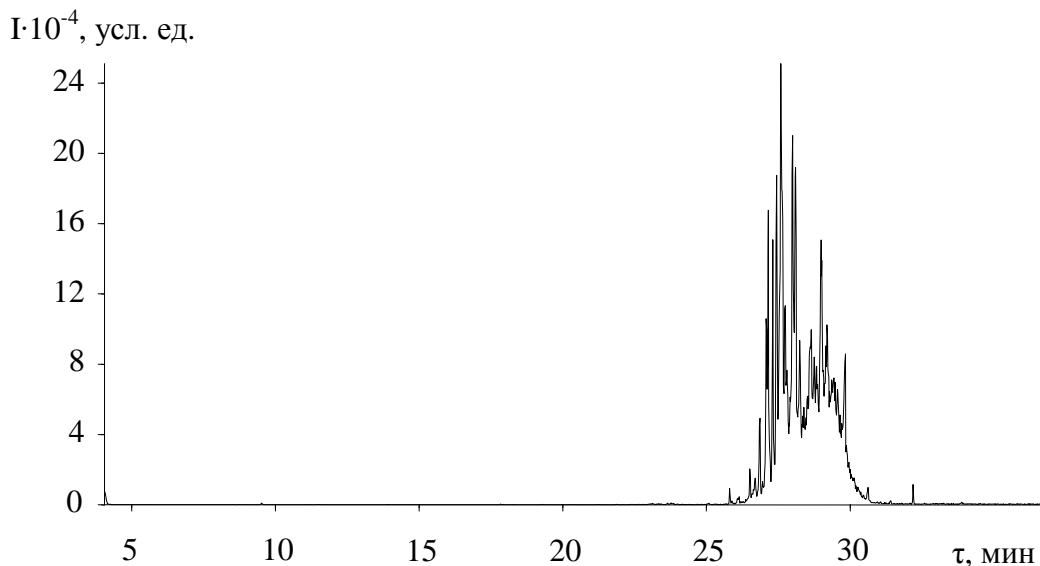


Рис. 4.6. Реконструированная хроматограмма образца гидробионта (экстракт из ТИС, режим SCAN) по характеристическому для холестерина иону с m/z 355.

На рис. 4.7 представлены масс-спектры стерина из образца гидробионта (скан 1543–1541) и полученный в результате поиска по библиотеке масс-спектров Wiley 275.

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 неопределенностью, например, стероидам [97]. Так как эти соединения могут частично разлагаться в процессе хроматографирования, их пики накладываются друг на друга и на пики углеводов, достоверная их идентификация затруднена. Учитывая происхождение проб, можно с

уверенностью утверждать, что эти балластные вещества являются стероидами и продуктами их деградации в результате окисления и высоких температур процесса хроматографирования.

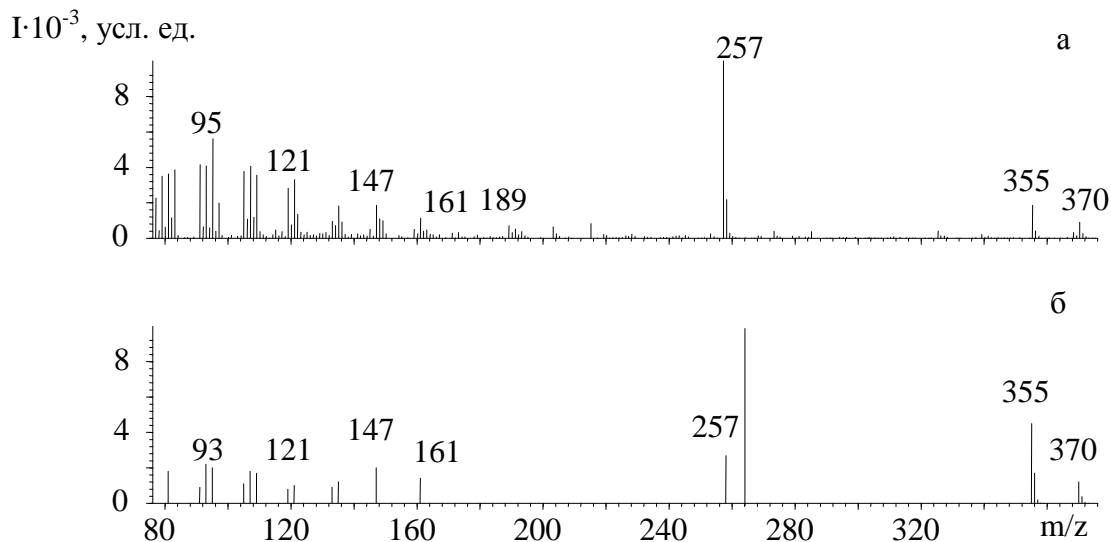


Рис. 4.7. Масс-спектры стерина из мышечной ткани рыб (режим SCAN) (а) и полученного в результате поиска по библиотеке Wiley 275 (5- α ,17- β -холест-14-ен) (б). Степень соответствия – 78 %.

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 времени и растворителей. Принципы и методы микропрепаративной ВЭЖХ для разных классов органических соединений описаны в монографии [159]. 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, полученные на обращенно-фазной колонке (C_{18}) в условиях, использовавшихся для препаративного выделения ПХДД из реальных смесей, представлены на рис. 4.8. Из хроматограммы определены объемы элюента, в которых будут находиться ПХБ и ПХДД, выделенные из реальных объектов исследования.

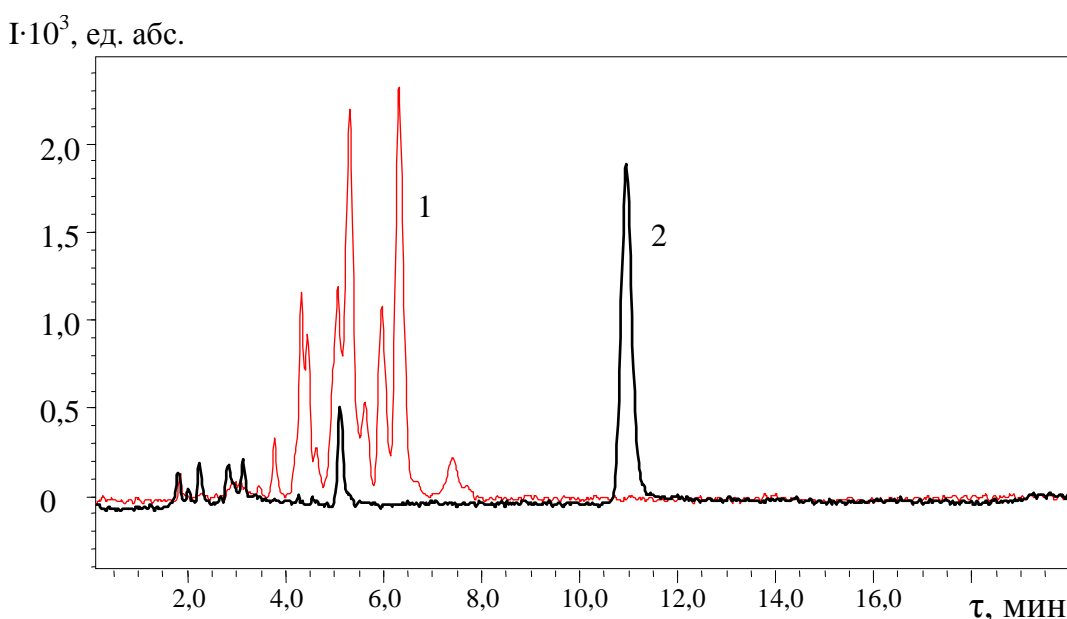


Рис. 4.8. Хроматограммы модельной смеси Aroclor 1254 и раствора 2,3,7,8-ТХДД на обращенно-фазной колонке (C_{18}) в условиях, использовавшихся для препаративного выделения ПХДД: 1 – смесь Aroclor 1254, 2 – 2,3,7,8-ТХДД.

В качестве маркера для препаративного выделения ПХДД выбран самый токсичный изомер – 2,3,7,8-ТХДД. Из представленной хроматограммы видно, что ПХБ попадают в 3–9 см³ элюента, а 2,3,7,8-ТХДД – отделен от них и попадает в 11–12 см³. Так как объем удерживания ПХБ с увеличением степени хлорирования в данных условиях хроматографирования увеличивается [156], то, по аналогии, можно предположить, что ожидаемый объем удерживания ПХДД с количеством атомов хлора 5–7 (самые токсичные изомеры) составит

более 10 см³.

Методика препаративного выделения ПХДД апробирована на реальных пробах гидробионтов бассейна р. Днепр. Степень очистки проб от балластных веществ оценивалась по хроматограммам 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. 4.9. Из представленных хроматограмм видно, что после препаративного выделения целевых соединений, достигается существенная очистка пробы от большей части балластных. Из проб практически полностью удаляются все идентифицированные соединения (*n*-карбоновые кислоты, алканы, хлорированные алканы, стероидные соединения и оставшиеся после обработки концентрированной H₂SO₄ 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, полученным из трех разных образцов рыб. Получили следующие степени очистки проб: 144, 176 и 12. Низкая степень очистки (12) пробы, представленной на рис. 4.9,в, обусловлена присутствием неидентифицированного соединения, которое частично попадает в данную фракцию. Присутствие таких пиков нетипично для проб гидробионтов. Степень очистки этой пробы от идентифицированных балластных соединений, которые присутствуют в большинстве проб мышечной ткани гидробионтов, рассчитано отдельно, при этом пик неидентифицированного соединения не учитывали. Полученная степень очистки составила 160.

Обработка экстрактов из гидробионтов окислителем перед хроматографическим выделением целевых соединений дает возможность уменьшить количество балластных на 2–3 порядка.

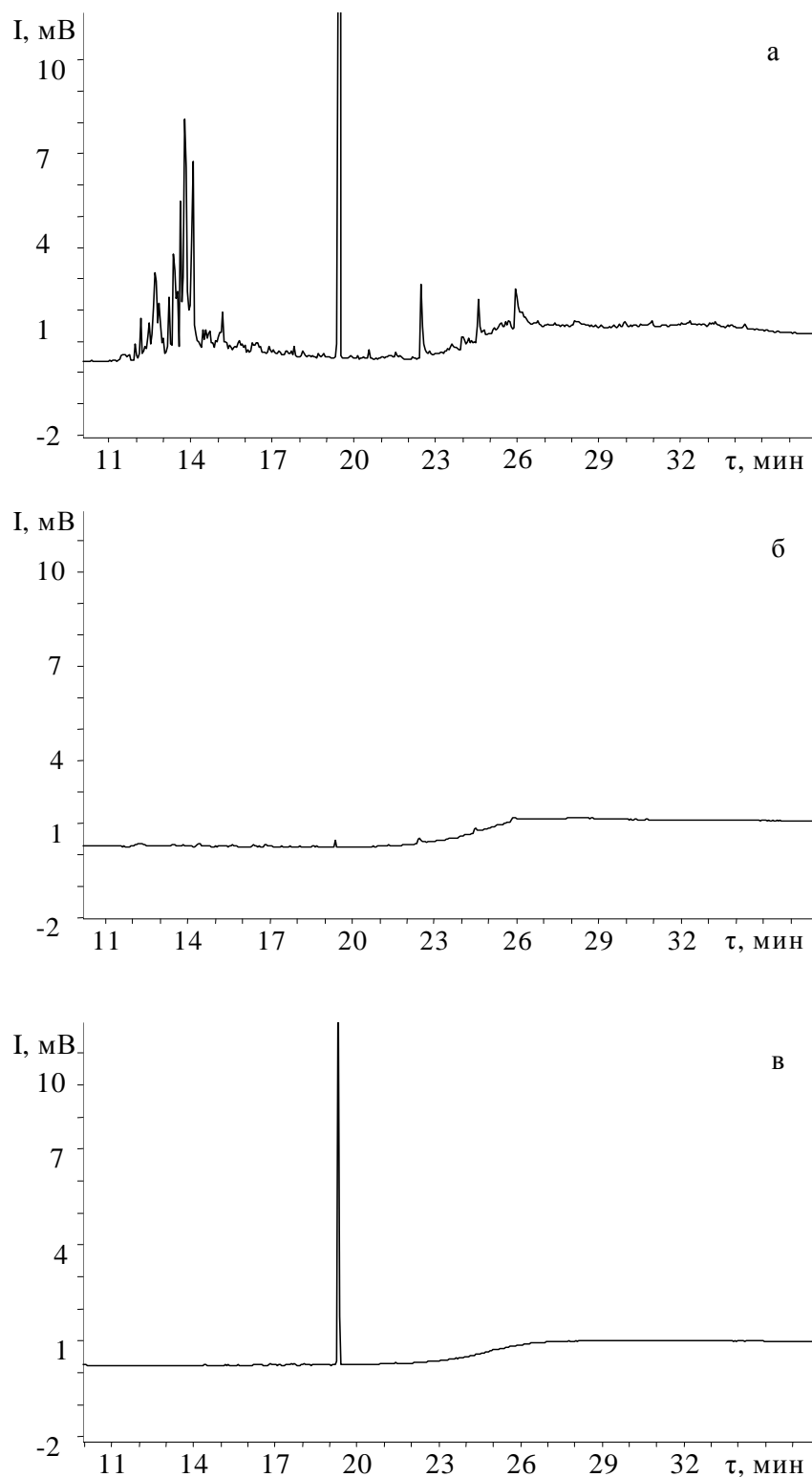


Рис. 4.9. Хроматограммы (ГХ/ПИД) балластных соединений пробы мышечной ткани рыб после очистки концентрированной H_2SO_4 (а); фракции, содержащей ХОП и ПХБ (б); фракции, содержащей ПХДД (в).

Это позволило выполнять дальнейшие фракционирование пробы методом ВЭЖХ в аналитическом масштабе. Таким образом, разработана методика быстрого выделения ПХДД из экстрактов проб мышечной ткани 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 мышечной ткани рыб по данной методике на стадию препаративного выделения расходуется 25 см³ метанола и 3 см³ метилхлорида. Процедура хроматографического выделения целевых соединений занимает 20 мин, подготовка колонки к фракционированию следующей пробы – 8 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.

4.2. Определение хлорорганических пестицидов и полихлорированных бифенилов в гидробионтах бассейна р. Днепр методом газовой хроматографии / масс-спектрометрии в очищенных концентратах

За последние 25 лет проведен систематический мониторинг ХОП и ПХБ в природных и питьевых водах рек Днепра и Десны [21–24], природных водах рек Днепра, Днестра, Дуная, Западного Буга, Южного Буга [66, 67], донных отложениях и гидробионтах Днепро-Бугского лимана, дельты Дуная, бухт Черного моря □ Севастопольская, Балаклава [16–18].

Для более полной оценки угрозы для человека и водных экосистем, которую представляют ХОП и ПХБ, представлялось необходимым выполнить исследование по определению концентраций этих токсических соединений в мышечной ткани рыб и оценить точность и правильность полученных результатов относительно установленных уровней содержания токсикантов.

Идентификация и определение концентраций ХОП и ПХБ в мышечной ткани рыбы бассейна р. Днепр, отловленной в сентябре–октябре 2003 г., выполнены по разработанным методикам, которые представлены в разделах 2 и 3 [68, 69].

Для идентификации и определения ХОП и ПХБ в пробах мышечной ткани рыб в данной серии эксперимента использовали газовый хроматограф Hewlett-Packard 5890 Series II с масс-селективным детектором 5972 MSD.

Методика исследования подробно представлена в разделе 2.

Детектирование ХОП (4,4'-ДДЭ, 2,4'-ДДД, 4,4'-ДДД, 4,4'-ДДТ) проводили в режиме SIM в разные периоды исследований в зависимости от мешающего влияния посторонних примесей по характеристическим ионам с m/z для: 4,4'-ДДЭ □ 246, 248 (группа 1), 176, 246, 248 (группа 2), 176, 246, 248 (группа 3); 2,4'-ДДД, 4,4'-ДДД и 4,4'-ДДТ □ 165, 235, 237 (группа 1, 2, 3), а также в некоторых экспериментах □ и других пестицидов при ЭИ (70 эВ). Характеристические ионы для различных периодов исследования представлены в табл. 4.1.

Таблица 4.1. □ Характеристические ионы с m/z для регистрации хроматограмм ХОП по ГИС в режиме SIM методом ГХ/МС

№ п/п	Пестицид	Характеристические ионы, m/z		
		Группа I	Группа II	Группа III
1	α-, β-, γ-, δ-ГХЦГ	109, 181, 219	109, 181, 183	109, 181, 183
2	Гептахлор	100, 135, 272	100, 135, 272	100, 272, 274
3	Альдрин	101, 263	101, 263	66, 220, 263
4	Гептахлорэпоксид	237, 263, 353	237, 263, 353	351, 353, 355
5	Эндосульфат I и II	170, 195, 243	170, 195, 243	195, 241
6	Дильдрин	108, 246, 263, 318	108, 246, 263, 318	79, 263, 279
7	Эндрин	170, 195, 263, 281	170, 195, 263, 281	81, 82, 263
8	Эндринальдегид	165, 235, 250, 346	165, 235, 250, 346	67, 250, 345
9	Эндосульфат сульфат	272, 387	272, 387	272, 387, 422
10	4,4'-ДДЭ	246, 248	176, 246, 248	176, 246, 248
10	4,4'-ДДД, 4,4'-ДДТ	165, 235, 237	165, 235, 237	165, 235, 237

Детектирование ПХБ (три-, тетра-, пента-, гекса-, гепта-, октахлоризомеры) проводили в режиме SIM при электронной ионизации (70 эВ) в разные периоды исследований в зависимости от мешающего влияния посторонних примесей по одним и тем же характеристическим ионам с m/z для: три- □ 256, 258, 260, тетра- □ 290, 292, 294, пента- □ 324, 326, 328, гекса- □ 358, 360, 362, гепта- □ 392, 394, 396, окта- □ 426, 428, 430. Характеристические ионы представлены в табл. 4.2.

Таблица 4.2. – Характеристические ионы ПХБ M^+ , $[M+2]^+$, $[M+4]^+$ и соотношение их интенсивностей $I_{M^+} / I_{[M+2]^+} / I_{[M+4]^+}$

Изомеры ПХБ	M^+ , $[M+2]^+$, $[M+4]^+$, m/z	$I_{M^+} / I_{[M+2]^+} / I_{[M+4]^+}$, Aroclor 1254 и 1260 ¹	$I_{M^+} / I_{[M+2]^+} / I_{[M+4]^+}$, Aroclor 1254 ²	$I_{M^+} / I_{[M+2]^+} / I_{[M+4]^+}$, Aroclor 1260 ²
Тетра-	290, 292, 294	8:10:5	8:10:5	–
Пента-	324, 326, 328	6,6:10:6,6	6,2:10:6,2	6,2:10:6,5
Гекса-	358, 360, 362	5:10:8	5:10:8	5,3:10:7,9
Гепта-	392, 394, 396	5:10:10	4,5:10:10	4,5:10:9,6
Окта-	426, 428, 430	3,6:8,4:10	–	4:10:12

¹ GC HP5890 Series II/MSD HP5970B, 5971, 5972A;

² Agilent GC6890N/MSD5975I;

ХОП и ПХБ идентифицировали по временам удерживания и по характеристическим ионам с использованием электронной библиотеки масс-спектров Wiley 275, а для ПХБ – также по соответствию соотношений интенсивностей ионов M^+ , $[M+2]^+$, $[M+4]^+$ полученных масс-спектров [21, 24] теоретически рассчитанным соотношениям [97]. Для идентификации использовали также соотношение между указанными характеристическими ионами, полученными на других приборных комплексах (табл. 4.2.2) [28].

Концентрации целевых соединений определяли по соотношениям интенсивностей характеристических ионов этих соединений на хроматограммах калибровочных растворов к их интенсивностям на хроматограммах испытуемых растворов. Рассчитывали концентрации ХОП и

ПХБ как средние значения, полученные по нескольким соответствующим характеристическим ионам.

Во всех исследованных пробах мышечной ткани рыб идентифицированы ХОП и ПХБ, определены их концентрации и изомерно-специфический состав ПХБ.

На рис. 4.10 представлены реконструированные хроматограммы (экстракты из полного ионного тока (TIC), режим SIM) образцов мышечной ткани рыб по характеристическим для 4,4'-ДДЭ ионам с m/z 246 (а), 248 (б) и 318 (в) и по характеристическим для 2,4'-ДДД, 4,4'-ДДД и 4,4'-ДДТ ионам с m/z 235 (г) и 237 (д).

На рис. 4.11 представлены масс-спектры соединений: 4,4'-ДДЭ, 2,4'-ДДД, 4,4'-ДДД и 4,4'-ДДТ из хроматограмм образцов биоты и результаты библиотечного поиска по библиотеке Wiley 275.

На рис. 4.12 представлены реконструированные хроматограммы (экстракты из TIC, режим SIM) образцов биоты по характеристическим для ПХБ ионам M^+ , $[M+2]^+$, $[M+4]^+$.

На рис. 4.13 представлены масс-спектры ПХБ из хроматограмм образцов гидробионтов и результаты библиотечного поиска по библиотеке Wiley 275.

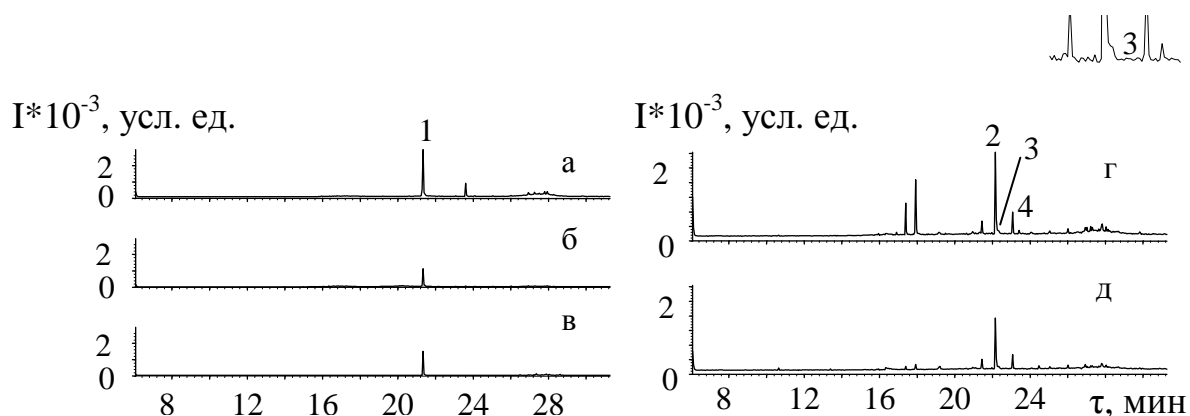


Рис. 4.10. Реконструированные хроматограммы (экстракты из TIC, режим SIM) образца мышечной ткани рыб по характеристическим ионам со следующими m/z : 246 (а), 248 (б) и 318 (в) для 4,4'-ДДЭ (пик 1) и 235 (г) и 237 (д) – для 2,4'-ДДД (пик 2), 4,4'-ДДД (пик 3) и 4,4'-ДДТ (пик 4).

ХОП и ПХБ идентифицированы в образцах мышечной ткани рыб по временам удерживания их пиков на масс-хроматограммах (реконструированных хроматограммах) по характеристическим ионам, а также по масс-спектрам в режиме SIM. Для всех соединений, кроме октахлорбифенилов, получены совпадающие с высокой вероятностью (74–95 %) результаты поиска по библиотеке масс-спектров Wiley 275. Соотношения ионов $M^+/[M+2]^+/[M+4]^+$ масс-спектров ПХБ из хроматограмм реальных проб соответствуют теоретически рассчитанным [97] для всех изомеров, включая октахлорбифенилы.

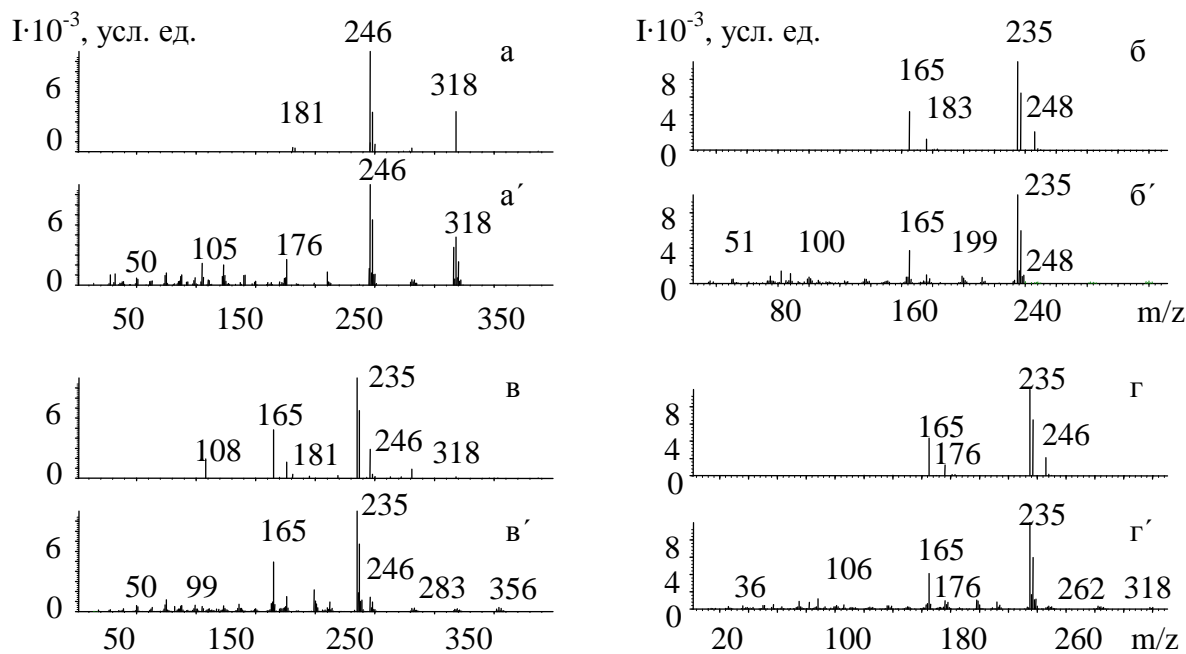


Рис. 4.11. Масс-спектры соединений из реальных смесей: 4,4'-ДДЭ (а), 2,4'-ДДД (б), 4,4'-ДДД (в), и 4,4'-ДДТ (г) из хроматограмм образцов мышечной ткани рыб (режим SIM) и масс-спектры этих же соединений из библиотеки Wiley 275 соответственно а', б', в' и г'. Степень соответствия: 4,4'-ДДЭ – 27, 2,4'-ДДД – 87, 4,4'-ДДД – 60 и 4,4'-ДДТ – 90 %.

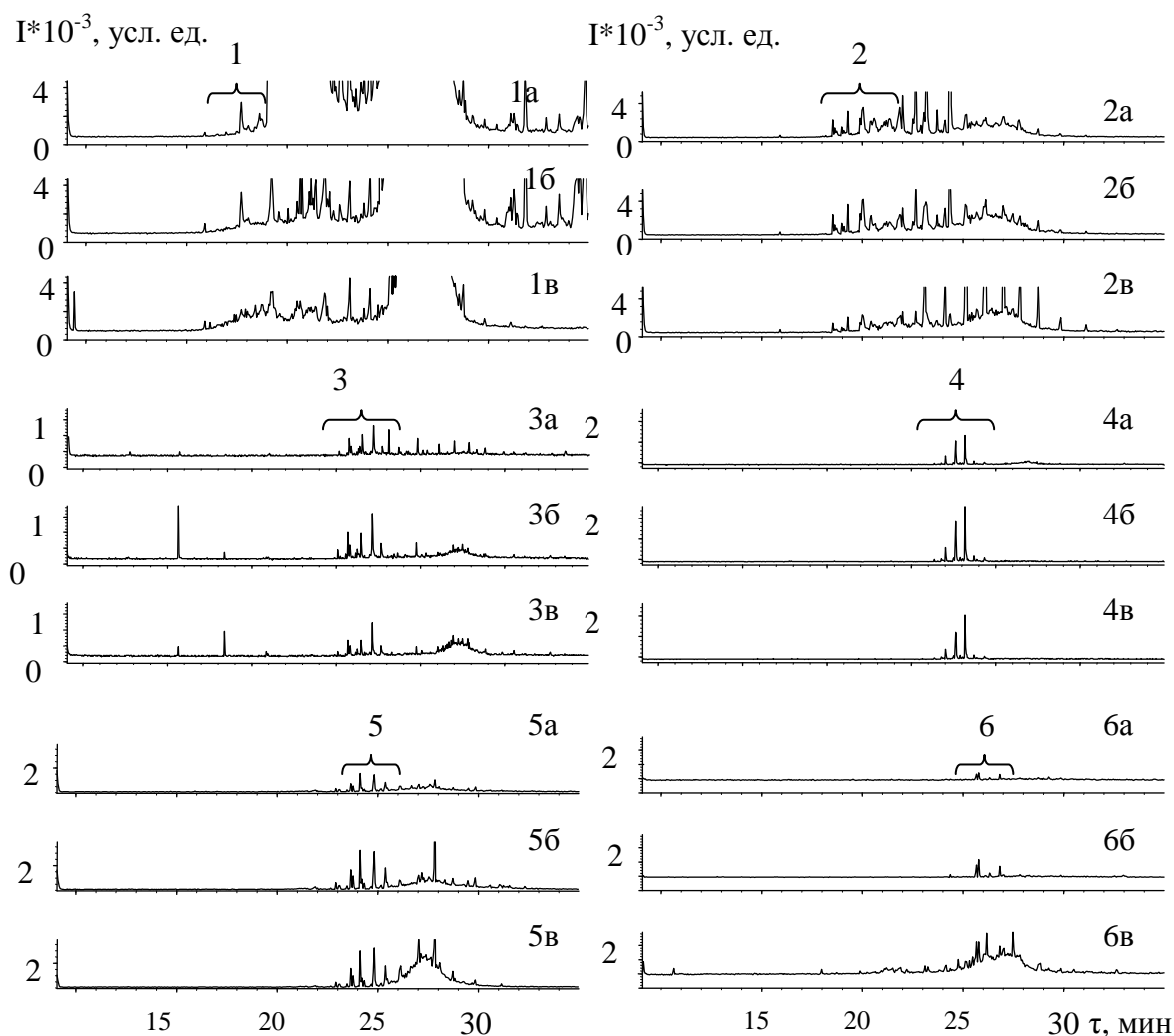


Рис. 4.12. Реконструированные хроматограммы (экстракты из ГИС, режим SIM) образцов биоты по характеристическим ионам M^+ , $[M+2]^+$, $[M+4]^+$ для изомеров ПХБ с m/z : трихлорбифенилов – 256 (1а), 258 (1б), 260 (1в); тетрахлорбифенилов – 290 (2а), 292 (2б), 294 (2в); пентахлорбифенилов – 324 (3а), 326 (3б), 328 (3в); гексахлорбифенилов – 358 (4а), 360 (4б), 362 (4в); гептахлорбифенилов – 392 (5а), 394 (5б), 396 (5в); октахлорбифенилов – 426 (6а), 428 (6б), 430 (6в). Обозначение: 1 – 6 – временные окна, в которых идентифицированы соответственно три-, тетра-, пента-, гекса-, гепта- и октахлорбифенилы в калибровочных смесях ПХБ.

Концентрации ХОП и ПХБ в образцах гидробионтов бассейна р. Днепр представлены в табл. 4.3, которые рассчитаны в нг/г массы влажного вещества. Рассчитана суммарная концентрация 2,4'-ДДД и 4,4'-ДДД.

Установлен изомерно-специфический состав ПХБ гидробионтов бассейна р. Днепр. Данные о концентрациях ПХБ с разным количеством атомов хлора в молекуле представлены в табл. 4.4.

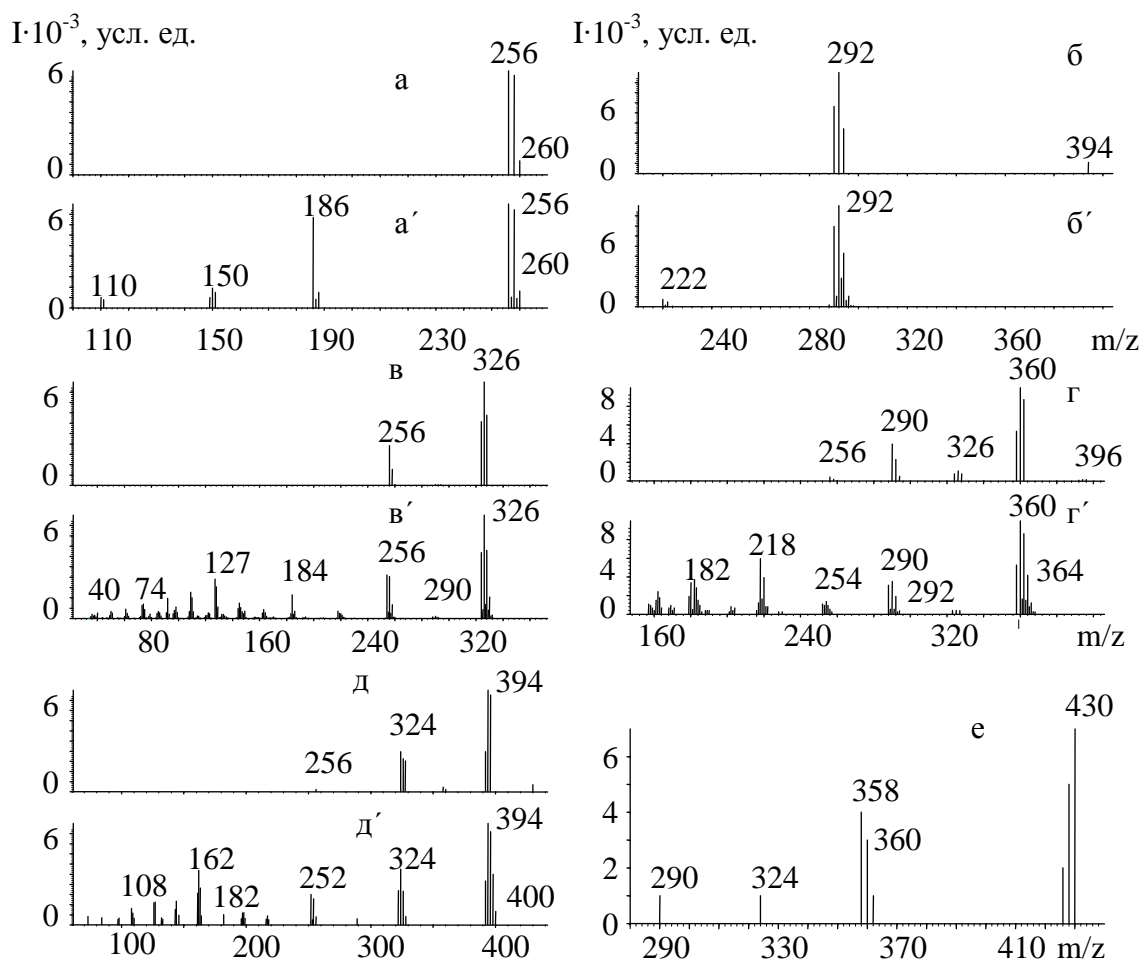


Рис. 4.13. Масс-спектры изомеров ПХБ из хроматограмм биоты (режим SIM): а – три-, б – тетра-, в – пента-, г – гекса-, д – гепта-, е – октахлорбифенилы и масс-спектры этих же соединений из библиотеки Wiley 275 соответственно а', б', в', г' и д'. Степень соответствия: три- – 74, тетра- – 93, пента- – 93, гекса- – 91 и гепта- – 95 %. Для октахлорбифенилов соответствующие спектры в библиотеке Wiley 275 не найдены.

Таблица 4.3. □ Концентрация ХОП и ПХБ в образцах мышечной ткани рыб

№ пробы	Концентрация ХОП и ПХБ, нг/г массы влажного вещества			
	4,4'-ДДЭ	2,4'-ДДД + 4,4'-ДДД	4,4'-ДДТ	ПХБ
1	528	736	228	2300
2	145	171	176	1520
3	64	59	57	961
4	134	421	349	6482
5	50	71	51	355
6	65	87	84	434
7	203	245	201	4 812
8	296	289	204	3 752
9	200	240	118	2 336
10	445	461	358	1 373
11	1 595	2 410	1 160	13 486
12	93	68	56	1 443
13	0	0	0	0
14	196	213	178	1 304
15	1 260	1 489	274	6 109
16	238	73	0	960

Таблица 4.4. □ Изомерно-специфический состав ПХБ в мышечной ткани рыб

№ пробы	Концентрация изомеров ПХБ, нг/г массы влажного вещества			
	Тетрахлор-	Пентахлор-	Гексахлор-	Гептахлор-
1	135	948	1 012	205
2	121	618	657	124
3	38	465	405	53
4	412	2 601	2 998	471
5	46	160	149	0
6	52	184	198	0
7	202	1 683	2 152	775
8	166	1 387	1 813	386
9 ¹	234	1 011	987	104
10	186	797	343	47
11 ^{1, 2}	914	5 389	6 072	1 111
12	69	601	647	126
13	0	0	0	0
14	111	538	564	91
15 ¹	348	2 409	2 898	454
16	38	465	404	53

Примечания:

¹ идентифицированы трихлорбифенилы, ² идентифицированы октахлорбифенилы.

Определение изомерно-специфического состава дает дополнительную информацию о токсичности ПХБ. Наиболее токсичными для млекопитающих являются тетра-, пента- и гексахлорбифенилы [85].

Из представленного материала по определению изомерно-специфического состава ПХБ видно, что в наибольших концентрациях во всех пробах гидробионтов содержатся ПХБ с числом атомов хлора $Cl_n=5-6$. Для проб 11 и 15 построены диаграммы концентраций ПХБ с $Cl_n=4-7$ (рис. 4.2.5).

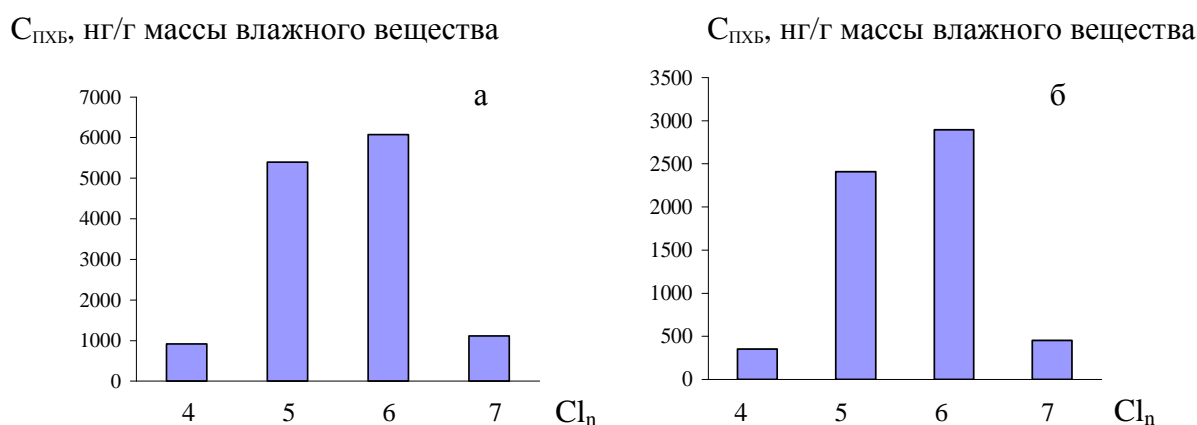


Рис. 4.5. Изомерно-специфический состав ПХБ с $Cl_n=4-7$ для проб 11 (а) и 15 (б).

Тетра- и гептахлорбифенилы находятся в меньших концентрациях, чем пента- и гексахлорбифенилы. Уровни содержания тетра- и гептахлоризомеров находятся в интервалах $4,0 \square 13,5$ и $3,4 \square 16,1$ %, что в среднем соответственно составляет 7,4 и 7,8 % от общей суммы ПХБ. Низкие концентрации три- и октахлорбифенилов по сравнению с остальными ПХБ идентифицированы только в пробах с высокими концентрациями ПХБ. Концентрации этих соединений не определяли. Данные по определению изомерно-специфического состава ПХБ, представленные в [16], также свидетельствуют о преобладании в биоте пента- и гексахлорбифенилов.

Исследования степени извлечения аналитов из проб показали, что использовавшимся методом УЖЭ извлечено 85–115 % целевых соединений по сравнению с классическим методом ЭС. Нижний предел обнаружения суммы

ПХБ составил 10 нг/г; пестицидов – 10 нг/г массы влажного вещества мышечной ткани рыб.

Из представленного материала по определению концентраций ХОП и ПХБ можно сделать вывод, что самыми загрязненными участками бассейна р. Днепр являются Киевское, Каневское и Кременчугское водохранилища. В образцах мышечной ткани рыб из притоков р. Днепр концентрации ХОП и ПХБ ниже, чем в р. Днепр. Такая ситуация, по-видимому, объясняется большой промышленной нагрузкой на водоемы в г. Киеве и его окрестностях. Кроме этого, образцы мышечной ткани рыб из притоков в большинстве случаев имели меньший возраст и вследствие этого ХОП и ПХБ еще не накопились в их тканях. В работе [16] концентрации ХОП и ПХБ в тканях мышечной ткани рыб из бассейна р. Днепр определены соответственно в диапазоне 11,9–45,4 и 10,7–76,7 нг/г массы влажного вещества. Наибольшие концентрации этих соединений найдены в Каховском водохранилище. В работах [160, 161] обобщены данные о концентрациях ХОП и ПХБ в мышечной ткани рыб из различных пресных водоемов мира. Высокие концентрации ПХБ зафиксированы в промышленно развитых странах – Германии, Швейцарии, Финляндии, США (соответственно 2100, 575, 6850, 124000 нг/г массы влажного вещества). Наименьшие концентрации содержатся в биоте из водоемов Антарктики, Южной Африки, Исландии (менее 1 нг/г массы влажного вещества). Аналогичная картина наблюдается по распределению ХОП. Наибольшие концентрации 4,4'-ДДЭ обнаружены в США, Германии, Польше (соответственно 2900, 230, 360 нг/г массы влажного вещества). Полученные уровни содержания ХОП и ПХБ в мышечной ткани рыб бассейна р. Днепр свидетельствуют о повышенной степени угрозы для человека и водных экосистем. Экологическое состояние р. Днепр требует систематического мониторинга ХОП и ПХБ, а также мер, направленных на удаление этих соединений из пищевых цепей гидробионтов.

РАЗДЕЛ 5

ПРЕПАРАТИВНОЕ ВЫДЕЛЕНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОПЛАНАРНЫХ ПОЛИХЛОРИРОВАННЫХ БИФЕНИЛОВ В ТКАНЯХ ГИДРОБИОНТОВ БАССЕЙНА Р. ДНЕПР МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ / МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

Копланарные ПХБ содержатся в объектах окружающей среды (вода, воздух, почва, гидробионты) в малых количествах по сравнению с остальными изомерами ПХБ, поэтому они не могут быть надежно идентифицированы и определены методом ГХ/МС без препаративного выделения.

Принимая во внимание сложность поставленной задачи выделения копланарных ПХБ ввиду близких физико-химических свойств копланарных и некопланарных ПХБ и наличия в пробах других балластных соединений, которые остаются в них после очистки концентрированной серной кислотой или олеумом [68], выделение копланарных ПХБ на примере модельных смесей Aroclor и проб мышечной ткани рыб проводили в две стадии: 1) грубое отделение фракции, содержащей все ПХБ, от балластных веществ жировой ткани методом микропрепаративной ВЭЖХ на колонке C_{18} ; 2) тонкое выделение фракции (или фракций), не содержащей ПХБ, которые мешают определению копланарных ПХБ, методом микропрепаративной обращенно-фазной ВЭЖХ. Принципы и методы микропрепаративного выделения органических соединений различных классов представлены в монографии [159].

5.1. Препаративное выделение копланарных бифенилов для определения методом газовой хроматографии / масс-спектрометрии

Для выполнения данной задачи необходимо было провести выбор хроматографической системы и условий выделения копланарных ПХБ из смеси

ПХБ, при которых достигается: 1) адекватная степень очистки целевых соединений; 2) высокая скорость выделения; 3) малый расход растворителей; 4) простота исполнения.

Методики подбора оптимальных условий выделения методом препаративной ВЭЖХ и анализа микропримесей копланарных ПХБ в пробах мышечной ткани рыб методом ГХ/МС в режиме SIM (система GC6890N/MSD5975 InertXL/Autoinjector 7683B фирмы Agilent Technologies с квадрупольным анализатором масс), представлены в разделе 2.

Хроматограммы, на которых показаны копланарные ПХБ, наложенные на смесь Aroclor 1221, 1242, 1254 представлены на рис. 5.1.

На хроматограммах смеси Aroclor 1221, 1242, 1254 (элюирование ПХБ происходит в виде группы неразделенных пиков или одного пика) проводили общую базовую линию для всех пиков. В точке начала выхода первого пика на хроматограмме смеси 12 копланарных ПХБ ее разделяли на две части. Рассчитывали соотношение суммарной площади пиков левой части хроматограммы к правой. Таким образом получали коэффициент α , при помощи которого оценивали степень перекрытия выхода целевых и нецелевых соединений на разных колонках. Чем больше этот коэффициент, тем лучше происходит отделение копланарных ПХБ от некопланарных. Получены следующие значения α : для колонки с привитой функциональной группой CN – 0 (разделение отсутствует); C_8 – 0,757; C_{18} – 2,195; Phenyl – 0,421; PАН – 2,395.

На колонках с привитыми группами CN (рис. 5.1,а) и C_8 (рис. 5.1,б) в данных условиях разделение неудовлетворительное из-за плохого удерживания соединений (неполярная подвижная фаза). На колонке с привитой фазой CN, при использовании метанола в качестве подвижной фазы, разделение соединений проходит по нормально-фазному механизму (подвижная фаза менее полярна, чем неподвижная) [162].

Для колонки с привитой группой C_{18} (рис. 5.1,в) механизм удерживания соединений тот же, что и для C_8 , но за счет более длинной углеводородной цепи достигается хорошее удерживание ПХБ при использовании метанола в

качестве подвижной фазы. Чтобы усилить взаимодействие молекул ПХБ с привитой фазой по обращенно-фазному механизму, можно добавлять воду в подвижную фазу. Эта процедура в некоторых случаях улучшит отделение копланарных ПХБ от некопланарных, но усложнит дальнейшую подготовку проб.

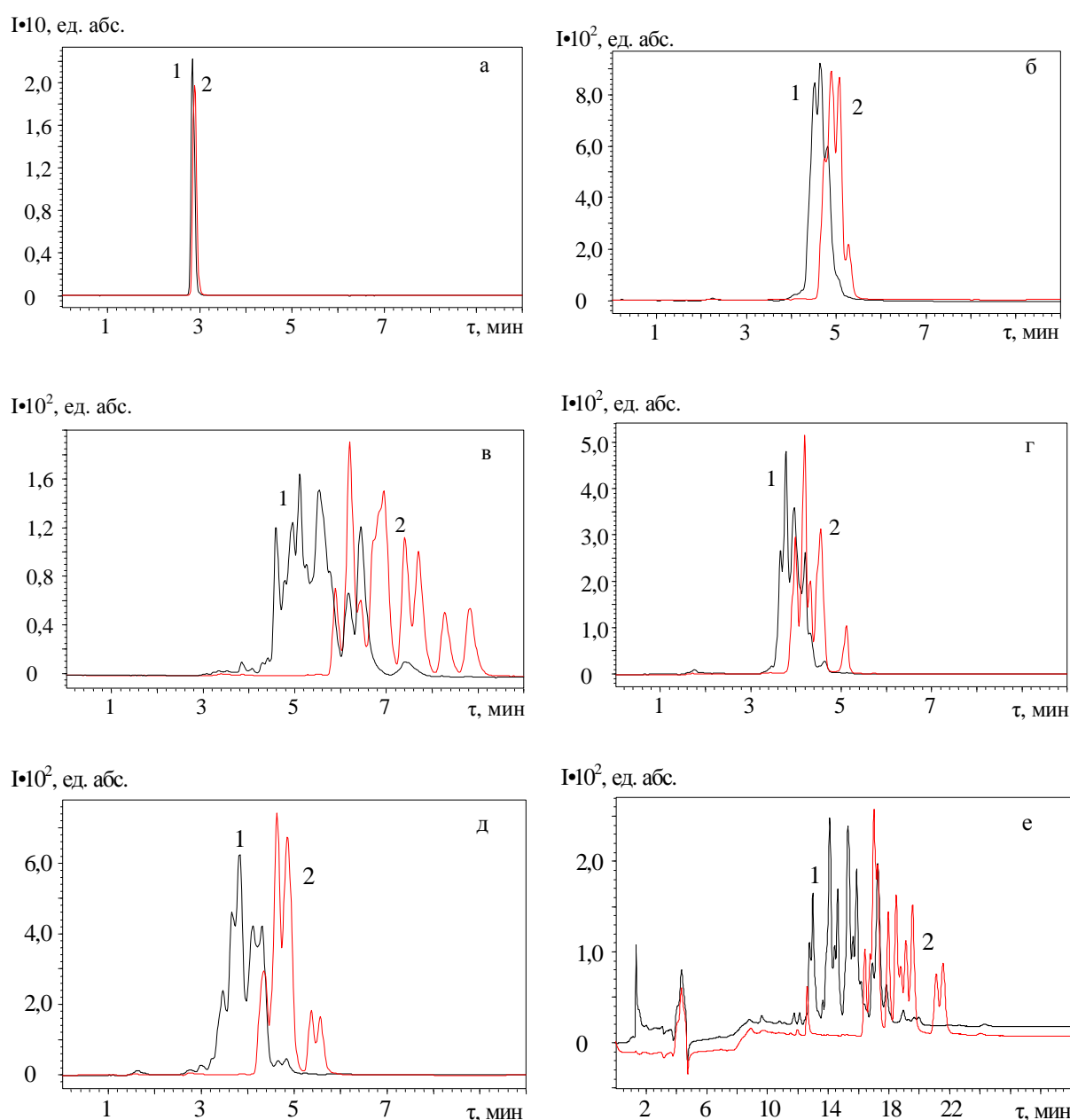


Рис. 5.1. Хроматограммы смеси Aroclor 1221, 1242, 1254 (1), наложенные на хроматограммы смеси 12 копланарных ПХБ (2), на разных хроматографических колонках в изократических условиях (а–д) и в режиме линейного градиента (е). Колонки: а – CN, б – C_8 , в – C_{18} , г – Phenyl, д, е – PAH.

Копланарные ПХБ удерживаются привитым слоем сильнее, чем некопланарные с тем же количеством атомов хлора в молекуле. Вероятно, это связано с более сильными донорно-акцепторными взаимодействиями между сорбентом и копланарными ПХБ. Этим обуславливается и более сильное удерживание ПХБ с высокими степенями хлорирования [163]. Механизм удерживания ПХБ привитым слоем также может включать электростатические, диполь-дипольные взаимодействия и образование водородных связей.

На колонке с привитой функциональной группой Phenyl (рис. 5.1,г) $\alpha=0,421$, хотя даже визуально заметно, что пики разделены лучше, чем на C_8 . Данная неподвижная фаза лучше взаимодействует с ПХБ благодаря наличию бензольных колец (π - π -взаимодействие), но механизм этого взаимодействия не позволяет полностью отделить копланарные ПХБ от некопланарных.

На колонке с привитой группой РАН (рис. 5.1,д) получено самое высокое значение $\alpha=2,395$. Молекулы ПХБ в данных условиях хорошо взаимодействуют с привитым слоем, что можно увидеть визуально по профилю хроматограмм. Кроме π - π -взаимодействий (в отличие от колонки с привитой фенильной группой), в этом случае возникают стерические затруднения для ПХБ с неплоской геометрией молекулы, вследствие меньшей площади контакта сорбата с плоскими молекулами привитой функциональной группы. Разделение молекул ПХБ с близкой полярностью происходит аналогично разделению хиральных соединений, описанному в [82]. Для разработки методики препаративного выделения копланарных ПХБ выбраны колонки РАН ($\alpha=2,395$) и C_{18} ($\alpha=2,195$), на которых в наименьшей степени перекрывались области элюирования копланарных ПХБ со смесью Aroclor 1221, 1242, 1254.

С целью получения характеристики удерживания соединений, независимую от размеров колонки и скорости расхода элюента, для колонок C_{18} и РАН определили коэффициенты емкости для каждого из 12 копланарных ПХБ в данных условиях (табл. 5.1). Для этого хроматографировали модельные растворы каждого из 12 копланарных ПХБ с целью определения времен удерживания каждого соединения и мертвого объема системы. Коэффициенты

емкости рассчитывали по формуле [164]:

$$k' = (t_R - t_0) / t_0,$$

где t_R – время удерживания соединения, t_0 – время удерживания неудерживаемого соединения.

Таблица 5.1. □ Коэффициенты емкости копланарных ПХБ на колонках РАН и C_{18} в приведенных ранее условиях хроматографирования

ПХБ	Коэффициент емкости, 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)

Из полученного экспериментального материала определения k' следует: 1) данные соединения по-разному удерживаются на РАН и C_{18} (очередность элюирования соответствует порядковому номеру, приведенному в скобках и существенно отличается); 2) общая закономерность примерно одинакова – сначала элюируются ПХБ с меньшей степенью хлорирования, затем – с большей.

Полученные хроматограммы для трех выбранных соединений – 2,3,3',4,4'-пентахлорбифенила (1), 2,3,4,4',5-пентахлорбифенила (2) и 3,3',4,4'-тетрахлорбифенила (3) – представлены на рис. 5.2. Из хроматографических данных по удерживанию этих соединений определили коэффициенты разделения (r_s) пиков 1 и 2 и 2 и 3 (табл. 5.2) по формуле [164]:

$$r_s = 2(t_{ry} - t_{rx}) / (w_{sy} + w_{sx}),$$

где t_{ry} и t_{rx} – времена удерживания соединений x и y , w_{sy} и w_{sx} – ширина оснований пиков соединений x и y .

Таблица 5.2. □ Коэффициенты разделения (R_s) пиков 1 и 2 и 2 и 3 на колонках РАН и C_{18} при использовании разных подвижных фаз: метанол (а, в), метанол : вода (9 : 1) (б, г)

Пик	R_s			
	РАН		C_{18}	
	а	б	В	Г
1 и 2	0,15	0,84	1,18	2,54
2 и 3	0,74	0,67	1,97	4,54

Для обоснования выбора неподвижной (привитой) фазы хроматографической колонки для выделения копланарных ПХБ считаем необходимым показать нетипичное для обращенно-фазных колонок разделение трех изомеров ПХБ на колонке с привитой фазой РАН. Для сравнения приведено разделение этих же соединений на классической обращенно-фазной колонке C_{18} в тех же условиях. Наблюдается разный порядок выхода ПХБ: на РАН 3,3',4,4'-тетрахлорбифенил выходит последним, а на C_{18} – первым. Добавление еще одного атома хлора к этому соединению в положение 2 приводит к тому, что 2,3,3',4,4'-пентахлорбифенил на C_{18} удерживается сильнее, чем тетрахлор-изомер с меньшим количеством атомов хлора. На колонке РАН – наоборот. Увеличение полярности подвижной фазы (добавление 10 % воды) на колонке (привитой фазе) C_{18} приводит к более полному разделению пиков (оба коэффициента разделения увеличились примерно в 2 раза для обеих пар соединений). На колонке (привитой фазе) РАН – коэффициент разделения между пиками 1 и 2 увеличился, а между пиками 2 и 3 – уменьшился, т. е. разделение ухудшилось.

Для успешного выделения фракции копланарных ПХБ важным условием является полярность подвижной фазы и условия хроматографирования

соединений. На предыдущих хроматограммах (рис. 5.2), 3,3',4,4'-тетрахлорбифенил элюируется последним ($t_R = 4,3$ мин), а на хроматограмме,

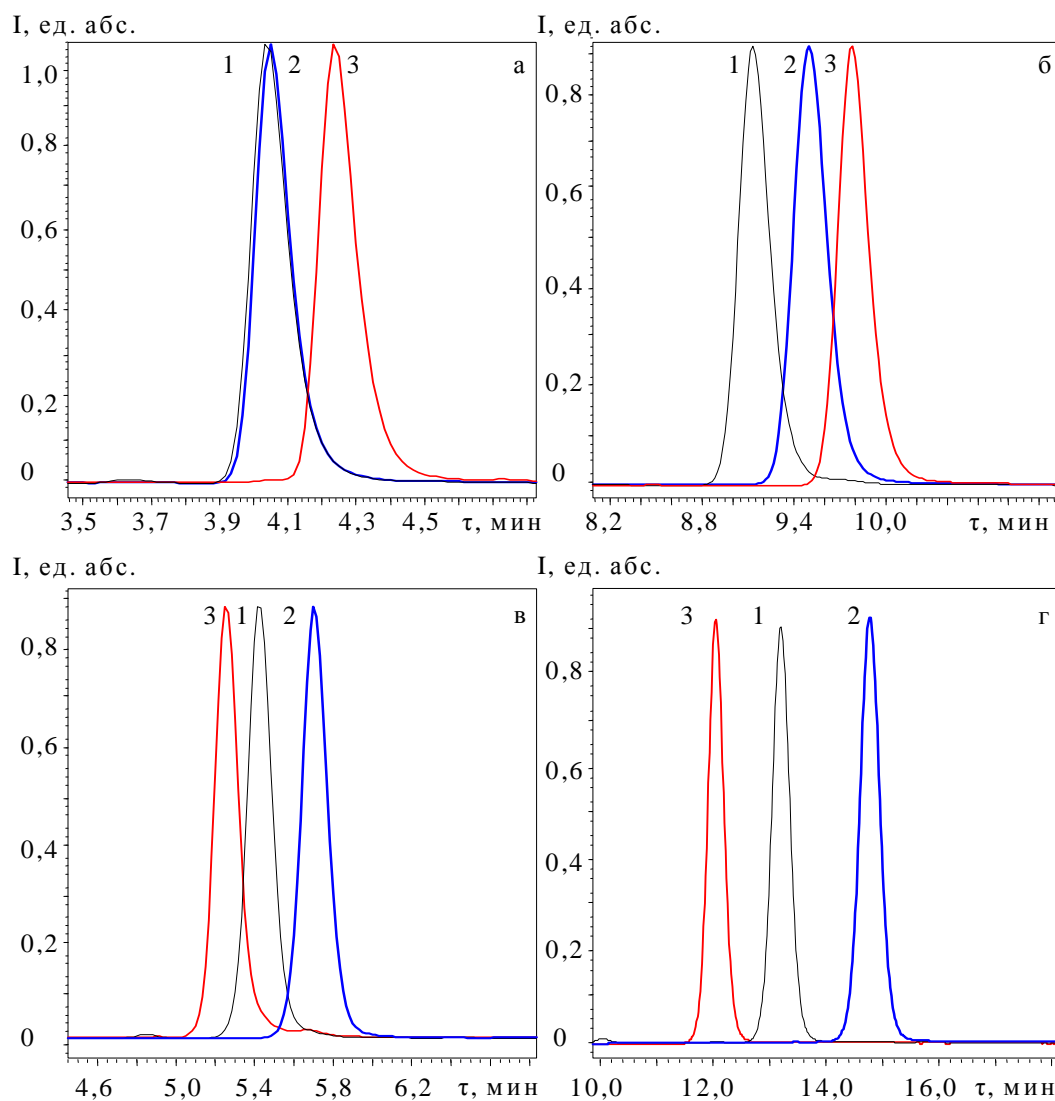


Рис. 5.2. Хроматограммы модельных растворов индивидуальных ПХБ, полученные на колонках с привитыми фазами РАН (а, б) и C₁₈ (в, г). В качестве подвижной фазы использовали метанол (а, в) и смесь метанол : вода (9 : 1) (б, г). 1 – 2,3,3',4,4'-пентахлорбифенил, 2 – 2,3',4,4',5-пентахлорбифенил, 3 – 3,3',4,4'-тетрахлорбифенил.

полученной в градиентном режиме (рис. 5.3), наибольшее время удерживания у 2,3,3',4,4'-пентахлорбифенила. Таким образом, в зависимости от условий, на колонке с привитой фазой РАН может изменяться порядок элюирования ПХБ. При этом изменяется и характер отделения копланарных ПХБ от общей массы ПХБ.

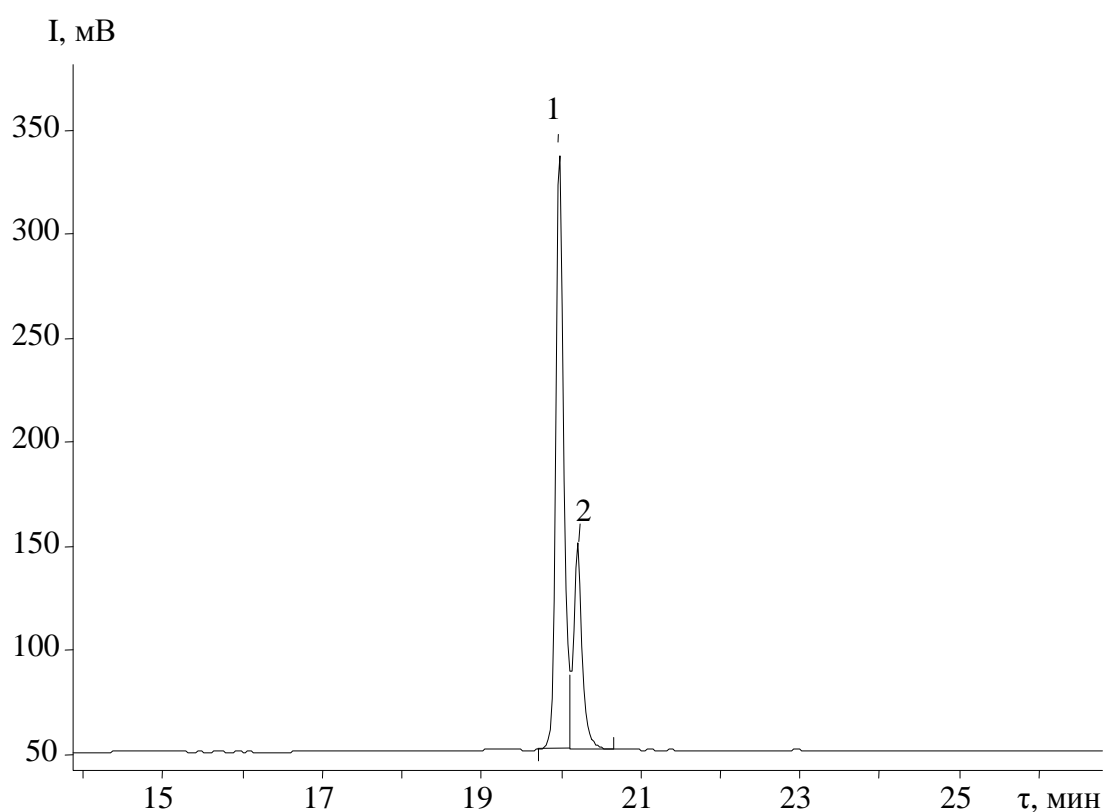


Рис. 5.3. Хроматограмма смеси 2,3,3',4,4'-пентахлор-, 2,3',4,4',5-пентахлор- и 3,3',4,4'-тетрахлорбифенила, полученная на колонке с привитой фазой РАН в градиентных условиях: 1 — 3,3',4,4'-тетрахлорбифенил + 2,3',4,4',5-пентахлорбифенил; 2 — 2,3,3',4,4'-пентахлорбифенил.

“Аномальное” поведение ПХБ на данной привитой фазе можно показать сравнением разделения ПХБ на колонках C_{18} и РАН. Допустим, что на привитой фазе C_{18} ПХБ удерживаются только в зависимости от полярности: чем полярнее подвижная фаза, тем сильнее контакт молекул с привитым слоем, тем больше коэффициент емкости k' и тем лучше разделение пиков.

Неподвижная фаза РАН – это фаза с привитыми ПАУ, состоящая, в основном, из молекул, содержащих четыре бензольных кольца ориентированных в одной плоскости. В этом случае определенный вклад в удерживание соединений вносит стерическое распознавание (π – π -взаимодействие) [164]. При умеренной полярности подвижной фазы между молекулами ПХБ и привитой неподвижной фазой устанавливается миграционное равновесие. При этом, независимо от полярности молекулы, копланарные ПХБ более глубоко проникают в привитый слой и сильнее с ним взаимодействуют, чем те молекулы ПХБ, у которых бензольные кольца ориентированы в разных плоскостях. Этим можно объяснить большие времена удерживания копланарных ПХБ на колонке РАН по сравнению с изомерами с тем же количеством атомов хлора, входящими в состав смесей Aroclor.

Если подвижная фаза полярная, то молекулы, независимо от геометрической ориентации бензольных колец, более интенсивно взаимодействуют с привитым слоем и основным фактором, влияющим на их удерживание, становится полярность, а влияние стерического взаимодействия будет менее ощутимым по сравнению с другими механизмами удерживания. Поэтому на рис. 5.2,б степень разделения между пиками 2 и 3 ухудшается при повышении полярности подвижной фазы, т. е. пик 3 выходит первым при хроматографировании на C_{18} и он перемещается по оси абсцисс, чтобы занять свое место перед пиком 2 (рис. 5.2,г), хотя в действительности этого не происходит в данных условиях хроматографирования. Изменяя хроматографические условия и полярность подвижной фазы, можно изменить порядок элюирования ПХБ на колонке РАН (рис. 5.3). Поэтому для успешного выделения копланарных ПХБ полярность подвижной фазы должна быть достаточно умеренной для проявления эффекта избирательного удерживания плоских молекул, но не слишком слабой, так как разделение может быть недостаточным из-за чрезмерной элюирующей силы подвижной фазы.

На рис. 5.1,е представлены хроматограммы смеси Aroclor 1221, 1242,

1254 и смеси 12 индивидуальных ПХБ в градиентном режиме на колонке с привитой фазой РАН. Из представленных хроматограмм видно, что хроматографирование в градиентном режиме существенно улучшает разделение между пиками ПХБ – увеличивает эффективность хроматографической колонки, но не увеличивает коэффициент отделения копланарных ПХБ ($\alpha=2,35-2,45$).

На обращенно-фазных колонках мало удерживаются (хорошо отделяются) моно-, ди- и трихлоризомеры ПХБ, которые не мешают определению копланарных ПХБ методом ГХ/МС. Поэтому для оценки степени выделения копланарных ПХБ выбрали смесь Aroclor 1254, состоящую преимущественно из тетрахлор-, пентахлор-, гексахлор- и гептахлоризомеров ПХБ, которые мешают определению копланарных изомеров и хуже от них отделяются.

На хроматограммах смеси Aroclor 1254, полученных на колонках с привитыми фазами C_{18} и РАН (рис. 5.4), обозначили 12 точек, соответствующих началу выхода каждого из 12 копланарных ПХБ (на колонке с привитой фазой РАН некоторые точки накладываются друг на друга). Таким образом, при переключении потока элюента в пробоотборник в обозначенный на хроматограммах момент времени, достигается полное попадание данного соединения в собираемую фракцию C_{18} (рис. 5.4,а) и РАН (рис. 5.4,б).

Чтобы оценить степень очистки копланарных ПХБ от смеси Aroclor 1254, для всех пиков на хроматограмме проводили общую базовую линию и интегрировали как один пик, площадь которого принимали за 100 %. В точке, в которой следует начать собирать фракцию определенного копланарного ПХБ (или группы ПХБ), хроматограмму расщепляли на две части. Площадь половины хроматограммы, находящаяся слева служит количественной мерой части смеси Aroclor 1254, от которой удалось очистить пробу, та, что находится справа – эквивалентна тому количеству ПХБ, которое попадет в пробу вместе с копланарными ПХБ. Допустив, что все изомеры ПХБ одинаково поглощают свет при $\lambda=250$ нм, получаем степень очистки целевых соединений

нормализацией площадей двух частей хроматограммы. При препаративном выделении фракции копланарных ПХБ, можно отделить группу соединений, состоящую из разного числа изомеров. Чем меньшее число изомеров выделяют, тем меньше в нее попадает мешающих определению копланарных ПХБ некопланарных изомеров. Степени очистки копланарных ПХБ при выделении на колонках C_{18} и РАН представлены в табл. 5.3.

Выделение одного изомера из смеси ПХБ методом ВЭЖХ можно легко выполнить, собрав узкую фракцию элюата, в которую он попадает на колонке C_{18} . Дополнительная очистка на колонке с другой привитой функциональной группой (например, РАН) в большинстве случаев позволит существенно повысить чистоту нужного изомера, так как в механизм удерживания ПХБ включены другие факторы (например, π - π -взаимодействия и стерические затруднения), в результате чего профили хроматограмм сильно отличаются друг от друга.

В случае выделения копланарных ПХБ для определения методом ГХ/МС задача усложняется тем, что нужно выделить сразу несколько ПХБ, желательно в одну фракцию. Среди целевых соединений есть гомологи с количеством атомов хлора в молекуле 4–7. Как показано ранее, степень хлорирования ПХБ сильно влияет на их удерживание на колонках с привитыми группами C_{18} и РАН. Разница между целевыми и балластными соединениями состоит в геометрическом строении молекулы и именно это положено в основу их разделения: неподвижная фаза распознает плоские молекулы и взаимодействует с ними сильнее, чем с остальными. Вследствие этого, копланарные тетрахлоризомеры удерживаются дольше, чем некопланарные тетра-, пента- и некоторые гекса- и гептахлорбифенилы. Такого разделения достаточно для их надежного определения методом ГХ/МС.

Для определения копланарных пентахлорбифенилов наличие гексахлорбифенилов нежелательно, так как они могут помешать определению первых методом ГХ/МС. Чтобы избежать этого, фракцию копланарных ПХБ можно разбить на две части, и анализировать каждую из них отдельно. Исходя

из задачи, имеющегося оборудования и с учетом изомерно-специфического состава реальных проб, можно сделать выбор копланарных ПХБ для определения.

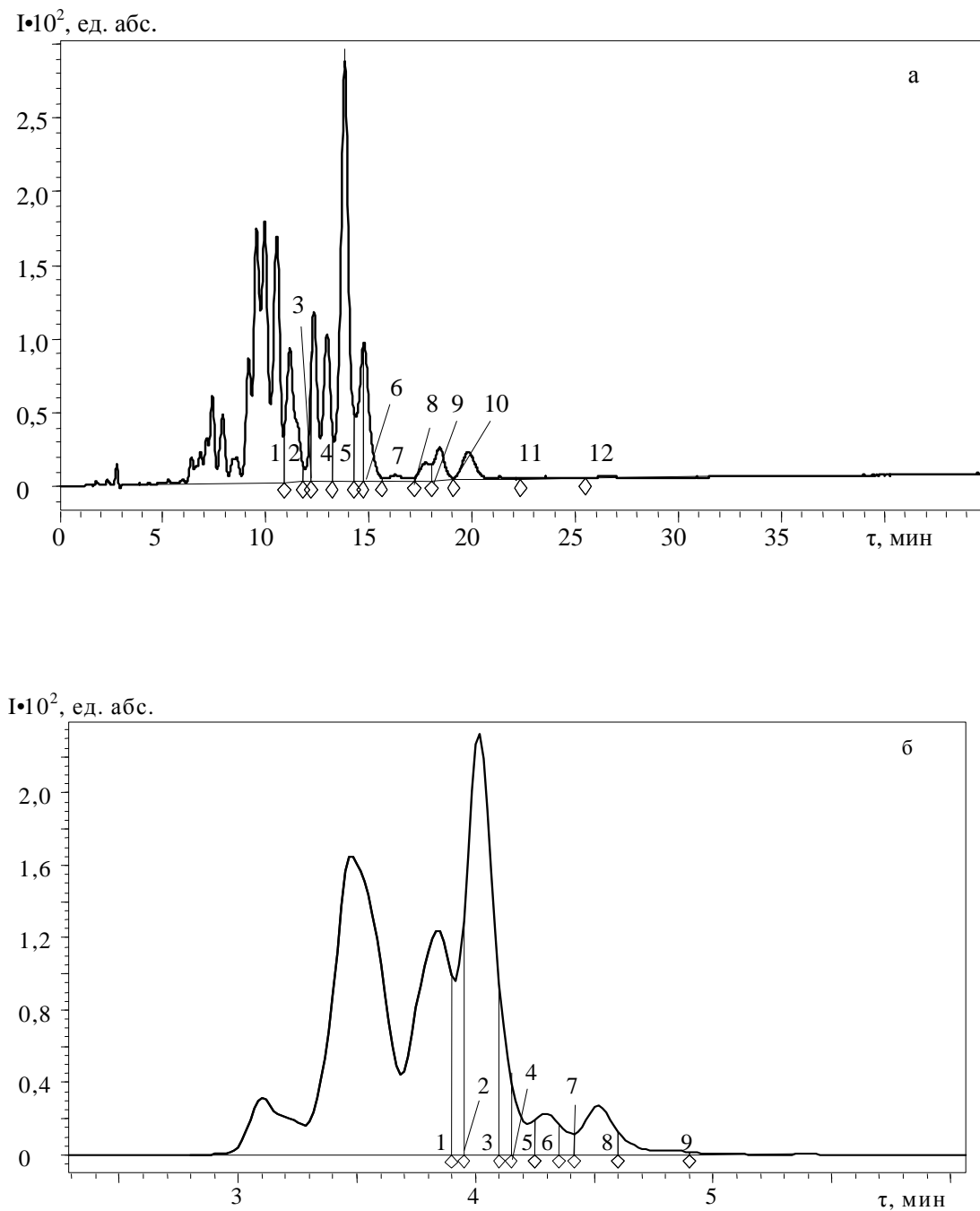


Рис. 5.4. На хроматограммах смеси Agoclor 1254 отмечены места начала выхода каждого из 12 копланарных ПХБ на колонках с привитыми фазами C_{18} (а) (обозначено цифрами 1–12) и РАН (б) (обозначено цифрами 1–9).

Самыми токсичными для человека и млекопитающих являются 3,3',4,4',5-пентахлор- и 3,3',4,4',5,5'-гексахлорбифенил (TEQ соответственно – 0,1 и 0,01), для птиц – 3,4,4',5-тетрахлор-, 3,3',4,4'-тетрахлор- и 3,3',4,4',5-пентахлорбифенил (TEQ соответственно – 0,1, 0,05 и 0,1) [85].

Таблица 5.3. □ Степень очистки копланарных ПХБ от смеси Aroclor 1254 при препаративном выделении на колонках РАН и C₁₈

Изомер ПХБ	РАН		C ₁₈	
	Степень очистки, %	Количество изомеров, открываемость которых в данной фракции составляет 100 % ¹	Степень очистки, %	Количество изомеров, открываемость которых в данной фракции составляет 100 % 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

¹ Во фракцию копланарных ПХБ, вместе с выбранным изомером, можно собрать все остальные копланарные изомеры, степень очистки которых равна или больше степени очистки выбранного изомера. Например, если на колонке РАН выделять 3,3',4,4',5-пентахлорбифенил, во фракцию можно собрать еще 2,3,3',4,4',5,5'-гептахлор- и 3,3',4,4',5,5'-гексахлорбифенил, причем степень очистки фракции будет равна 98,9 %.

На колонке РАН можно выделить 10 из 12 копланарных ПХБ (включая все не-*орто*-замещенные изомеры) со степенью очистки от смеси Aroclor 1254 – 88 %. Такая степень очистки позволяет надежно идентифицировать методом ГХ/МС все 10 соединений в образцах мышечной ткани рыб из р. Днепр. Если изомерно-специфический состав реальных проб такой, что в смеси присутствуют мешающие определению изомеры, фракцию копланарных ПХБ

можно разбить на две части и каждую анализировать методом ГХ/МС отдельно. Например, в первую половину можно собрать 3,4,4',5-тетрахлор-, 3,3',4,4'-тетрахлор-, 2',3,4,4',5-пентахлор- и 2,3,4,4',5-пентахлорбифенил (эта фракция не содержит некопланарных тетрахлор- и пентахлорбифенилов, которые мешают определению), а во вторую – все изомеры, которые выходят после них. В этом случае степень очистки от Aroclor 1254 первой фракции (4 копланарных ПХБ) составит $100 - (95,4 - 88,0) = 92,6$, второй (6 копланарных ПХБ) – 95,4 % (см. табл. 5.3). Если нет возможности выделить копланарные ПХБ на колонке РАН, то это можно сделать на C_{18} (для лучшего разделения соединений в этом случае целесообразно использовать в качестве подвижной фазы смесь метанол : вода (9 : 1) либо градиентный режим), ограничившись при этом выделением самых токсичных изомеров, например, 3,3',4,4',5-пентахлор- и 3,3',4,4',5,5'-гексахлорбифенила. Один цикл выделения составляет около 30 мин. Степень очистки целевых соединений от смеси Aroclor 1254 составит около 99 %.

Концентраты ПХБ, препаративно выделенные из тканей гидробионтов на колонке C_{18} , очищены от основной массы балластных соединений, таких, как жирные кислоты, углеводороды, стероиды и продукты их деградации, но могут содержать другие нежелательные вещества, например, хлорированные углеводороды в небольших концентрациях. При выделении фракции копланарных ПХБ пробы одновременно освобождаются от большей части оставшихся балластных соединений.

Учитывая характер проб (небольшие количества ПХБ в пробе, высокая устойчивость целевых соединений к физико-химическим воздействиям, поглощение света в УФ-диапазоне, близость физико-химических свойств целевых и балластных соединений), в качестве инструмента для пробоподготовки выбрана ВЭЖХ в аналитическом масштабе. Это дало возможность разработать методику выделения микроколичеств копланарных ПХБ с целым рядом преимуществ, которыми обладают современные высокоэффективные методы разделения перед выделением на колонках

низкого давления. Разработана методика быстрого (одна хроматограмма занимает 6 мин) выделения копланарных ПХБ из смеси ПХБ на обращенно-фазной колонке с привитыми ПАУ. Одновременно с выделением фракции копланарных ПХБ происходит очистка пробы от оставшихся после минерализации и предварительной хроматографической очистки на C_{18} балластных веществ. Подобрана оптимальная подвижная фаза для выделения – метанол (либо метанол с добавлением небольшого количества воды или неполярного органического модификатора, например, метиленхлорида) (пропускает УФ-свет, подходит по полярности, объем фракции копланарных ПХБ составляет $1 \text{ см}^3/\text{цикл}$ и легко упаривается). Метод не требует больших затрат органических растворителей (на 1 цикл используется 5 см^3 метанола), простой в исполнении – можно детектировать элюирование соединений в режиме on-line и легко оптимизировать условия выделения, установить процент попадания каждого целевого соединения по хроматограммам УФ-детектора (не надо анализировать каждую фракцию методом ГХ/МС). Использование современного оборудования позволяет полностью автоматизировать этот этап подготовки проб. Данный метод имеет высокую производительность – возможность подготовить к анализу методом ГХ/МС пробу копланарных ПХБ за 20–25 мин.

5.2. Определение копланарных полихлорированных бифенилов в мышечной ткани рыб бассейна р. Днепр методом газовой хроматографии / масс-спектрометрии

Как уже отмечено ранее, ПХБ обладают общетоксическим и канцерогенным действиями. Они вследствие липофильности способны накапливаться в липидных тканях живых организмов, концентрироваться по трофической цепи и, в конечном итоге, накапливаться в организме человека, вызывая различные тяжелые заболевания. Ситуация значительно усугубляется возможными синергическими эффектами за счет совместного воздействия СОЗ

и тяжелых металлов, радионуклидов и других менее токсических химических веществ на живые организмы.

Систематические данные относительно идентификации ПХБ и об уровнях их содержания в водных системах (вода, донные отложения, гидробионты) весьма ограничены.

Определение ПХБ в водных системах занимает важное место в аналитической химии объектов окружающей среды. Требования к анализам во многих ведущих странах мира пересмотрены в сторону ужесточения – понижения пределов обнаружения. Возросшие требования привели к использованию для этих целей новых методических подходов и методологий, нового высокочувствительного, селективного и надежного хроматографического и хромато-масс-спектрометрического оборудования.

В Украине имеется некоторый опыт в определении ПХБ [21–25, 68, 154, 165–169]. В НАН Украины разработана методология исследования и проведен систематический мониторинг ПХБ в природных и питьевых водах бассейна р. Днепр высокоэффективными и высокоинформативными физико-химическими методами анализа, в частности методами ГХ/ЭЗД и ГХ/МС [21–25]. Для более полной оценки угрозы для человека и данной водной экосистемы, которую представляют ПХБ, по разработанной методологии выполнено исследование мышечной ткани рыб и получены достоверные данные о содержании этих соединений [68]. В работе [154] показано препаративное выделение копланарных ПХБ из мышечной ткани рыб бассейна р. Днепр методом обращенно-фазной ВЭЖХ.

Из изложенного материала следует, что определение копланарных ПХБ в объектах окружающей среды вообще и в биологическом материале гидробионтов в частности представляет практический интерес. Данные о содержании этих соединений в гидробионтах бассейна р. Днепр отсутствуют.

Рассмотрим проведение идентификации и определения концентрации копланарных ПХБ в мышечной ткани рыб бассейна р. Днепр.

В работе использовали образцы мышечной ткани рыб, отловленных в

бассейне р. Днепр (раздел 2, табл. 2.1). Определение копланарных ПХБ проводили в образцах рыб, содержащих наиболее высокую общую концентрацию ПХБ (раздел 4, табл. 4.3) [68]. Экстракция ПХБ из образцов и препаративное выделение общей фракции ПХБ проведены по методике, описанной в разделе 2 (пункты 2.2.7, 2.2.8) [68, 153]. Препаративное выделение копланарных ПХБ из экстрактов, а также оценка открываемости аналитов выполнены по методике, приведенной также в разделе 2 (пункт 2.2.8) [154].

Определение копланарных ПХБ в пробах мышечной ткани рыб проводили методом ГХ/МС на газовом хроматографе Agilent Technologies GC6890N с масс-селективным детектором MSD5975 Inert XL и автоинжектором Autoinjector 7683B по методике, изложенной в разделе 2 (пункт 2.2.11).

Идентификацию ПХБ проводили по временам удерживания и по характеристическим ионам с использованием электронной библиотеки масс-спектров Wiley 275, а также по соответствию соотношений интенсивностей ионов M^+ , $[M+2]^+$, $[M+4]^+$ полученных масс-спектров [21, 24] теоретически рассчитанным соотношениям [97]. Концентрацию целевых соединений определяли по соотношениям интенсивностей характеристических ионов этих соединений на хроматограммах калибровочных растворов к их интенсивностям на хроматограммах испытуемых растворов. Концентрацию ПХБ рассчитывали как среднее значение, полученное по 12 приведенным характеристическим ионам.

Эквивалентную токсичность рассчитывали как сумму произведений концентраций индивидуальных ПХБ на их индексы эквивалентной токсичности [85].

Результаты определения копланарных ПХБ в образцах мышечной ткани рыб, содержащих наиболее высокую общую концентрацию ПХБ [68], представлены в табл. 5.4.

Выделение фракции копланарных ПХБ методом микропрепаративной ВЭЖХ [155] позволило надежно идентифицировать и количественно определить 10 из 12 копланарных ПХБ в образцах мышечной ткани рыбы,

включая 4 не-орто-замещенных ПХБ – самых токсических для человека и/или животных. Хроматограммы образцов мышечной ткани рыб до и после препаративного выделения копланарных ПХБ показаны на рис. 5.5.

В приведенных условиях хроматографирования копланарные ПХБ имеют времена удерживания несколько большие, чем большинство их изомеров с тем же числом атомов хлора в молекуле. Поскольку 2,3,3',4,4',5'- и 2,3,3',4,4',5'-гексахлорбифенилы элюируются одним пиком, в расчетах учитывали их суммарное содержание. Эти изомерные соединения имеют одинаковый индекс эквивалентной токсичности.

Таблица 5.4. Концентрация копланарных ПХБ в мышечной ткани рыб бассейна р. Днепр

Изомеры ПХБ	Концентрация копланарных ПХБ в пробах, мкг/кг массы влажного вещества						
	1	4	7	8	9	11	15
3,4,4',5-тетра (1)	1,0	2,8	2,2	2,5	0,8	6,6	3,0
3,3',4,4'-тетра (2)	35,2	49,8	52,9	45,1	31,9	133,2	62,5
2',3,4,4',5-пента (3)	6,0	9,4	10,2	8,6	5,5	26,5	11,1
2,3,4,4',5- пента (4)	8,7	8,8	9,6	10,0	9,3	29,3	14,2
3,3',4,4',5-пента (5)	0,3	0,9	0,7	0,6	0,4	2,0	0,9
2,3',4,4',5,5'-гекса (6)	0,9	1,1	1,5	2,0	0,7	4,7	2,8
2,3,3',4,4',5'-гекса + 2,3,3',4,4',5-гекса (7)	3,0	5,2	5,5	5,4	3,5	17,4	7,6
3,3',4,4',5,5'-гекса (8)	<0,10	<0,10	0,1	0,1	<0,10	0,3	0,2
2,3,3',4,4',5,5'-гепта (9)	<0,10	0,1	0,2	0,1	0,4	0,3	0,3

Балластные тетрахлорбифенилы удалены из анализируемых образцов до концентраций ниже предела обнаружения метода. На хроматограммах присутствуют только пики двух целевых копланарных тетрахлорбифенилов. Некопланарные пента- и гексахлорбифенилы содержатся в невысоких концентрациях. В результате препаративного выделения нагрузку этих балластных веществ уменьшили в 10–20 раз. Мешающее влияние

некопланарных ПХБ на определение целевых соединений сведено к минимуму. Нецелевые гептахлорбифенилы присутствуют в анализируемой фракции в более высоких концентрациях, однако существенно не мешают определению копланарного 2,3,3',4,4',5,5'-гептахлорбифенила.

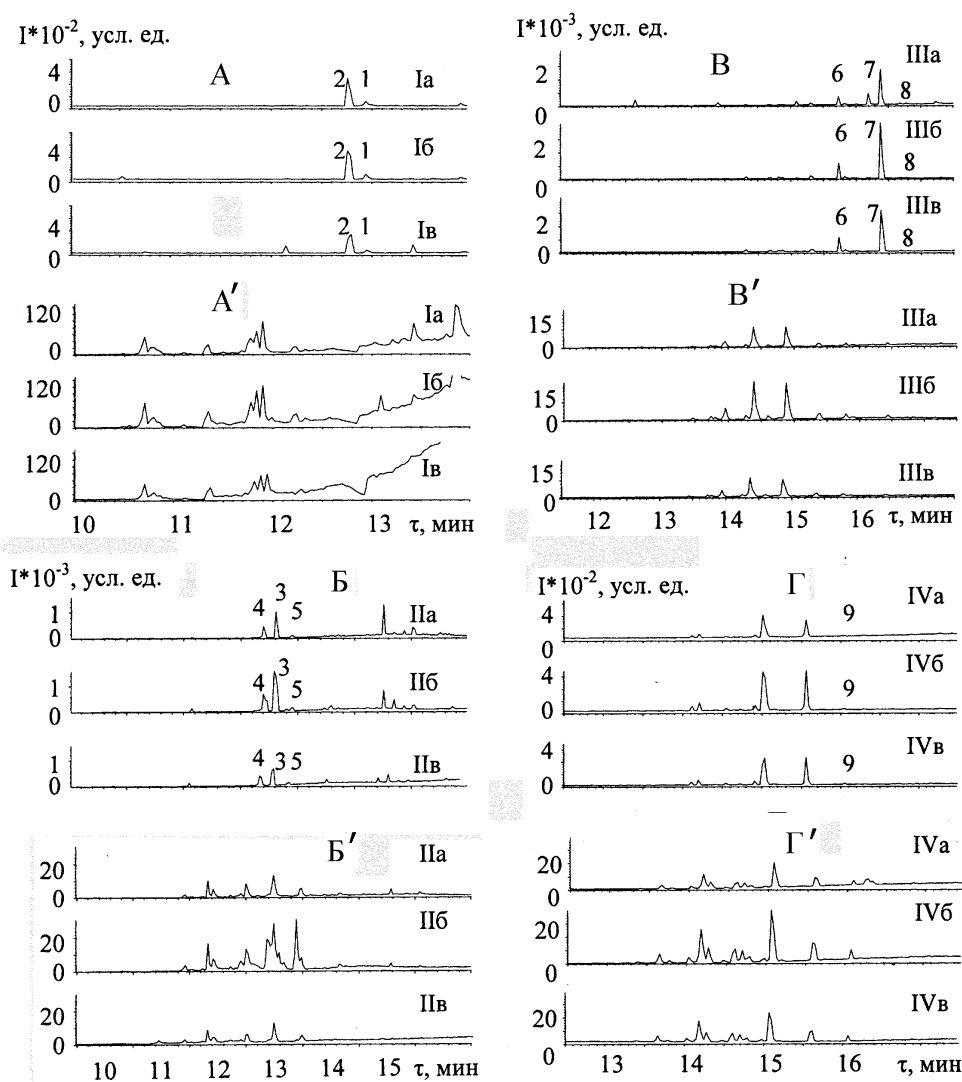


Рис. 5.5. Реконструированные хроматограммы (экстракты из ТИС, режим SIM) образца 11 мышечной ткани рыб, очищенного методом препаративного выделения копланарных ПХБ (верхние хроматограммы) и олеумом (нижние хроматограммы) по характеристическим ионам M^+ , $[M+2]^+$, $[M+4]^+$ с m/z 290 (Ia), 292 (Iб), 294 (Iв) тетрахлорбифенилов; 324 (IIa), 326 (IIб), 328 (IIв) пентахлорбифенилов; 358 (IIIa), 360 (IIIб), 362 (IIIв) гексахлорбифенилов; 392 (IVa), 394 (IVб), 396 (IVв) гептахлорбифенилов. Обозначение: I–IV – временные окна, в которых идентифицированы соответственно тетра-, пента-, гепта- и гексахлорбифенилы в модельных смесях ПХБ. 1–9 – обозначения индивидуальных копланарных ПХБ соответственно табл. 5.4.

Во всех проанализированных образцах мышечной ткани рыб методом ГХ/МС идентифицированы копланарные ПХБ, определены их концентрации и рассчитаны вклады каждого из них в общую токсичность для человека в эквиваленте токсичности 2,3,7,8-ТХДД (табл. 5.5).

Таблица 5.5. Общая концентрация ПХБ в пробах мышечной ткани рыб и токсичность для человека копланарных ПХБ в пересчете на токсичность 2,3,7,8-ТХДД

Проба	Общая концентрация ПХБ	Общая концентрация копланарных ПХБ	Токсичность в диоксиновом эквиваленте
	мкг/кг массы влажного вещества		нг/кг массы влажного вещества
1	2300	55,1	0,04
4	5482	78,1	0,10
7	4812	82,9	0,09
8	3752	74,4	0,07
9	2336	52,5	0,05
11	13486	220,3	0,24
15	6109	102,6	0,11

Из данных, представленных в табл. 5.4 видно, что во всех образцах в наибольшей концентрации присутствует 3,3',4,4'-тетрахлорбифенил (соединение 2). На рис. 5.6 представлена диаграмма для пробы 15, на которой концентрация копланарных ПХБ и вклад каждого из них в токсичность в диоксиновом эквиваленте выражены в процентах. Несмотря на невысокую концентрацию, наибольший вклад в общую токсичность вносит 3,3',4,4',5-пентахлорбифенил (табл. 5.4, соединение 5) из-за высокого фактора эквивалентной токсичности этого соединения (0,1). Изомерные соединения – 3,3',4,4',5,5'-гекса- и 2,3,3',4,4',5,5'-гептахлорбифенилы (табл. 5.4, соответственно соединения 8 и 9) содержатся в невысоких концентрациях и не выявлены в некоторых пробах, вклад в токсичность первого из них ощутим даже в малой концентрации из-за высокого эквивалента токсичности (0,01), а

второго – ничтожно мал. Такая картина типична для всех исследованных проб.

Наиболее высокие концентрации копланарных ПХБ и их токсичности в диоксиновом эквиваленте обнаружены в образцах с высокими общими концентрациями ПХБ: в Каневском, Киевском и Кременчугском водохранилищах (пробы 11, 15 и 4).

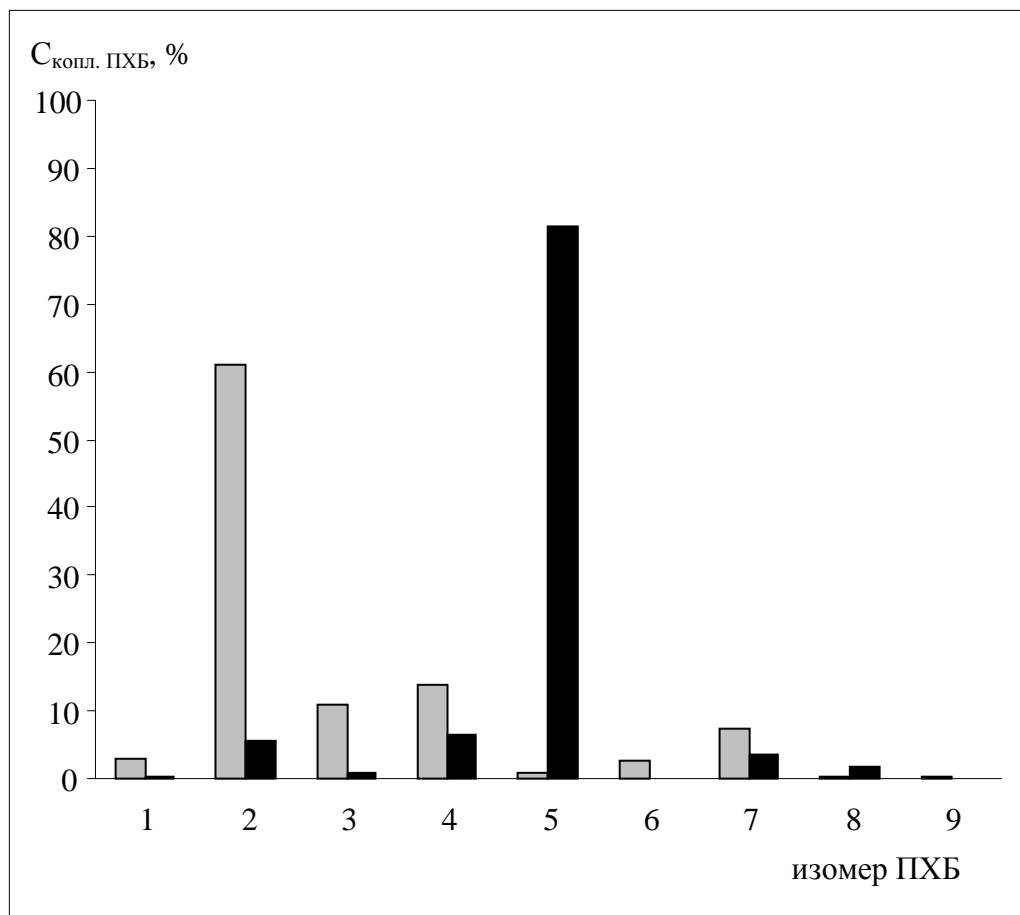


Рис. 5.6. Концентрации (слева) ($C_{\text{копл. ПХБ}}$, %) и вклады в токсичность (справа) изомеров ПХБ 1–9 в пробе 15 в процентном выражении (нумерация соединений в табл. 5.4 соответствует рис. 5.5).

В образцах мышечной ткани рыбы из бассейна р. Днепр методом ГХ/МС определены 10 копланарных ПХБ и рассчитаны их токсичности в диоксиновом эквиваленте. Метод препаративного выделения этих соединений из экстрактов мышечной ткани апробирован на модельных системах и применен к исследованию реальных образцов гидробионтов водных систем.

РАЗДЕЛ 6

БИОДОСТУПНОСТЬ ХЛОРООРГАНИЧЕСКИХ ПЕСТИЦИДОВ И ПОЛИХЛОРИРОВАННЫХ БИФЕНИЛОВ ДЛЯ ГИДРОБИОНТОВ БАССЕЙНА Р. ДНЕПР

В последние годы для оценки экологических рисков от попадания в поверхностные воды токсических СОЗ используются результаты изучения их распространенности, путей перемещения, степени аккумуляции и биодоступности в объектах водной среды. В Украине систематические работы в этом направлении до последнего времени не проводились, главным образом, по причине отсутствия соответствующей методологии исследования, которая содержит химический анализ, – единой для всех объектов водной системы – воды, донных отложений, гидробионтов, что позволяет получить достоверные и воспроизводимые результаты, на основе последних можно сделать правильные выводы. ХОП и ПХБ относятся к биодоступным токсическим СОЗ.

Для решения проблемы биодоступности ХОП и ПХБ необходимо было определить уровни их содержания в природной воде и мышечной ткани рыб на уровне наноконцентраций ($1,0 \text{ нг/дм}^3$ и 10 нг/дм^3 массы влажного вещества).

Для оценки биодоступности ХОП и ПХБ использовали образцы мышечной ткани рыб, отловленных в бассейне р. Днепр в 2003, 2011 и 2012 гг. Образцы природных вод для определения ХОП и ПХБ были отобраны в местах, которые находились вблизи городских водопроводных станций бассейна р. Днепр. Полученные уровни содержания ХОП и ПХБ в природной воде и биоматериале были использованы для оценки биодоступности этих соединений.

Табл. 6.1 представляет превышение критического уровня (Critical Tissue Level, CTL) и фактор биоконцентрирования (Bioconcentration factor, BCF, $\text{дм}^3/\text{кг}$) 4,4'-ДДЭ, 4,4'-ДДД, 4,4'-ДДТ и ПХБ в мышечной ткани рыб, которые были рассчитаны з данных концентраций 4,4'-ДДЭ, 4,4'-ДДД, 4,4'-ДДТ и общей концентрации ПХБ в воде. BCF равняется концентрации вещества в мышечной

ткани рыбы в мг/кг влажной массы разделенной на концентрацию вещества в воде (мг/дм³), в которой организм находился. Получены следующие значения BCF для мышечной ткани (дм³/кг): 4,4'- ДДЭ \square $5,0 \cdot 10^4 \square 4,5 \cdot 10^6$, 4,4'-ДДД \square $1,0 \cdot 10^4 \square 2,6 \cdot 10^6$, 4,4'-ДДТ \square $1,0 \cdot 10^4 \square 2,4 \cdot 10^5$ и ПХБ \square $1,0 \cdot 10^4 \square 7,0 \cdot 10^5$. Допустимыми считаются следующие уровни BCFs для тканей пресноводных рыб: для 4,4'-ДДЕ, 4,4'-ДДД, 4,4'-ДДТ \square 54000, суммы ПХБ \square 31000 [169].

Таблица 6.1. Превышение критического уровня (Critical Tissue Level) и фактор биоконцентрирования (Bioconcentration Factor) для мышечных тканей рыбы для 4,4'-ДДТ и его метаболитов и суммы ПХБ согласно результатов исследования осенью 2011 (*) и весной 2012 гг. (**), р. Днепр.

Соединение	Образцы рыбы									Интервал значений
	1-1 ^{**}	1-2 ^{**}	2-1 ^{**}	2-2 ^{**}	3-1 ^{**}	4-1 ^{**}	5-1 ^{**}	5-2 ^{**}	3-1 [*]	
$C_{4,4'\text{-ДДТ и метаболиты, ПХБ сумма}} / \text{CTL}$										
4,4'-ДДЭ	0,7	0,6	2,0	3,3	1,7	5,6	43,3	48,3	3,3	0,6 \square 48,3
4,4'-ДДД	6,5	19,8	5,6	12,0	10,9	8,2	111,0	71,5	0,2	0,2 \square 111,0
4,4'-ДДТ	1,3	5,7	2,4	4,1	5,4	6,3	21,5	15,7	0,7	0,7 \square 21,5
Сумма ПХБ	4,0	10,0	8,4	8,8	7,7	8,1	25,8	13,7	0,4	0,4 \square 25,8
$\text{BCF}_{4,4'\text{-ДДТ и метаболиты, ПХБ сумма}} \cdot 10^5, \text{ дм}^3/\text{кг}$										
4,4'-ДДЭ	0,7	0,5	1,9	3,1	1,6	5,2	40,0	45,0	3,1	0,5 \square 45,0
4,4'-ДДД	1,5	4,5	1,3	2,8	2,5	1,9	26,0	17,0	0,1	0,1 \square 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 \square 2,4
Сумма ПХБ	1,1	2,7	2,3	2,4	2,1	2,2	7,0	3,7	0,1	0,1 \square 7,0

Превышение CTL и BCF для мышечных тканей рыбы для 4,4'-ДДТ и его метаболитов суммы ПХБ согласно с результатами исследования осенью 2003 г. в реках Днепр и Десна соответственно составляют $1,0 \square 44,6$ и $0,8 \square 8,5$ и $(0,1 \square 35,9) \cdot 10^5$ и $(0,2 \square 33,0) \cdot 10^5$ дм³/кг (табл. 6.2), а также осенью 2011 и весной 2012 гг. в р. Днепр \square $0,2 \square 111,0$ и $(0,1 \square 45,0) \cdot 10^5$ дм³/кг (табл. 6.1). Более низкие значения CTL и BCF для мышечных тканей рыб получены для притоков р. Днепр: соответственно $1,1 \square 27,6$ и $(0,1 \square 24,1) \cdot 10^5$ дм³/кг (табл. 6.3).

Таблица 6.2. Превышение критического уровня (Critical Tissue Level) и фактор биоконцентрирования (Bioconcentration Factor) для мышечных тканей рыбы для 4,4'-ДДТ и его метаболитов и суммы ПХБ согласно результатов исследования осенью 2003 г. в реках Днепр и Десна (*).

Соединение	Образцы рыбы										Интервал значений
	1	2	4	7	12	11	14	5*	6*	10*	
	$C_{4,4'\text{-ДДТ и метаболиты, ПХБ сумма}} / \text{CTL}$										
4,4'-ДДЭ	9,8	2,7	2,5	3,8	1,7	29,5	3,6	0,9	1,2	8,2	0,9□29,5
4,4'-ДДД	13,6	3,2	7,8	4,5	1,3	44,6	3,9	1,3	1,6	8,5	1,3□44,6
4,4'-ДДТ	4,2	3,3	6,5	3,7	1,0	21,5	3,3	0,9	1,6	6,6	0,9□21,5
Сумма ПХБ	5,3	3,5	12,3	9,1	3,4	31,4	3,0	0,8	1,0	3,2	0,8□31,4
	$\text{BCF}_{4,4'\text{-ДДТ и метаболиты, ПХБ сумма}} \cdot 10^{-5}, \text{дм}^3/\text{кг}$										
4,4'-ДДЭ	10,1	2,8	2,6	3,9	1,8	30,5	3,8	3,7	4,8	33,0	1,8□33,0
4,4'-ДДД	11,0	2,5	6,3	3,7	1,0	35,9	3,2	4,1	5,0	26,3	1,0□35,9
4,4'-ДДТ	0,2	0,2	0,3	0,2	0,1	1,0	0,2	0,2	0,3	1,4	0,1□1,4
Сумма ПХБ	1,7	1,1	4,7	3,5	1,0	9,7	0,9	0,7	0,8	2,6	0,7□9,7

Таблица 6.3. Превышение критического уровня (Critical Tissue Level) и фактор биоконцентрирования (Bioconcentration Factor) для мышечных тканей рыбы для 4,4'-ДДТ и его метаболитов и суммы ПХБ согласно результатов исследования осенью 2003 г. в притоках бассейна р. Днепр (*).

Соединение	Образцы рыбы					Интервал значений
	3*	8*	9*	15*	16*	
	$C_{4,4'\text{-ДДТ и метаболиты, ПХБ сумма}} / \text{CTL}$					
4,4'-ДДЭ	1,2	5,5	3,7	23,3	4,4	1,2□23,3
4,4'-ДДД	1,1	5,4	4,4	27,6	1,4	1,1□27,6
4,4'-ДДТ	1,1	3,8	2,2	5,1	□	1,1□5,1
Сумма ПХБ	2,2	8,7	5,4	14,2	2,2	2,2□14,2
	$\text{BCF}_{4,4'\text{-ДДТ и метаболиты, ПХБ сумма}} \cdot 10^{-5}, \text{дм}^3/\text{кг}$					
4,4'-ДДЭ	1,3	5,7	3,8	24,1	4,6	1,3□24,1
4,4'-ДДД	0,9	4,3	3,6	22,2	1,1	0,9□22,2
4,4'-ДДТ	0,1	0,2	0,1	0,2	□	0,1□0,2
Сумма ПХБ	0,7	2,7	1,7	4,4	0,7	0,7□4,4

Результаты, полученные при исследовании мышечной ткани рыбы бассейна р. Днепр в течение нескольких лет, показали, что гидрофобные органические соединения (ХОП и ПХБ) биодоступны, т.е. способны в значительной мере аккумулироваться гидробионтами. В предыдущих работах [17, 18] установлена токсичность донных отложений из эстуариев Украины для некоторых водных организмов, живущих в придонном слое. Концентрации антропогенных загрязняющих веществ определены на обширных территориях эстуариев в биологических организмах из этих мест. Для оценки вклада органических соединений в токсичность донных отложений применены три направления: простая корреляция от концентрации определяемых токсикантов, по эмпирическим величинам токсичности [170] и методике идентификации токсичности (Toxicity Identification Evaluations □ TIE) [171]. Полученные результаты свидетельствуют о биоконцентрировании указанных токсикантов по трофической цепи.

ВЫВОДЫ

В работе решена научно-методологическая проблема исследования группы ОЛОС, которая включает химический анализ и мониторинг экотоксикантов ХОП и ПХБ в гидробионтах. Разработаны рациональные методы пробоподготовки и определения токсических хлорорганических соединений, реализованные современными хроматографическими и хромато-масс-спектрометрическими методами исследования – ГХ/ЭЗД, ВЭЖХ при детектировании в УФ/Вид диапазоне спектра, ГХ/МС с масс-селективным детектированием в режимах SCAN и SIM, что позволяет установить их уровни содержания и оценить биодоступность и токсикологическое состояние гидробионтов бассейна р. Днепр.

1. Впервые разработана методология исследования ХОП и ПХБ (изомерно-специфический состав и копланарные ПХБ) в гидробионтах бассейна р. Днепр, которая направлена на выделение, концентрирование, идентификацию и определение этих соединений на уровне наноконцентраций методами ГХ/ЭЗД, ГХ/МС, что позволило надежно проводить химический мониторинг этих токсических соединений.

2. Обоснована необходимость реализации рационального соединения процедур пробоподготовки для выделения методом ускоренной жидкостной экстракции (УЖЭ), очистки, концентрирования полученных экстрактов и режимов хроматографического разделения сложных смесей, масс-селективного детектирования, способов идентификации и заключительного хроматографического и хромато-масс-спектрометрического (метод ГХ/МС при ЭИ по полному ионному току в режимах SCAN и SIM) определения микроколичеств ХОП и ПХБ в гидробионтах. При этом достигнуто повышение чувствительности и селективности аналитического сигнала определяемых органических соединений на 2 порядка.

3. На основе комплекса разработанных методик создана, апробирована и применена схема определения и мониторинга ХОП и ПХБ в гидробионтах

методами ГХ/ЭЗД, микропрепаративной ВЭЖХ, ГХ/МС. Установлены уровни содержания этих токсикантов и зафиксированы закономерности их изменения в гидробионтах.

4. Решена целевая задача идентификации и количественного определения ХОП и ПХБ (общего содержания, изомерно-специфического состава и содержания копланарных изомеров) в гидробионтах методом ГХ/МС в режиме SIM на уровне 10 нг/г массы влажного вещества.

5. Установлены закономерности изменения уровней содержания ХОП и ПХБ в гидробионтах относительно ТЕQ по результатам мониторинга с целью оценки их токсичности в бассейне р. Днепр. Оценена токсичность гидробионтов.

6. Оценена биодоступность ХОП и ПХБ в гидробионтах бассейна р. Днепр согласно значений превышения критического уровня (CTL, Critical Tissue Level) и фактора биоконцентрирования (BCF, Bioconcentration Factor) для мышечных тканей рыбы для 4,4'-ДДТ и его метаболитов и суммы ПХБ по результатам исследования в 2003 и 2011–2012 гг. в бассейне р. Днепр.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Björklund E. Determination of persistent organic pollutants in solid environmental samples using accelerated solvent extraction and supercritical fluid extraction: exhaustive extraction and sorption/desorption studies of PCBs (doctoral dissertation). – Lund: Lund University, 1998.
2. Прокофьев А.К. Определение полихлорированных дибензо-*n*-диоксинов, дибензофуранов, бифенилов и хлорсодержащих пестицидов в объектах окружающей среды // Успехи химии. – 1990. – Т. 59, Вып. 11. – С. 1799–1817.
3. Федоров Л.А., Мясоедов Б.Ф. Диоксины: химико-аналитические аспекты проблемы // Успехи химии. – 1990. – Т. 59, Вып. 11. – С. 1818–1866.
4. Федоров Л.А. Диоксины как фундаментальный фактор техногенного загрязнения живой и неживой природы // Практическая сертификация (Научно-производственное малое предприятие (НПМП) “Контроль”). – 1992. – Вып. 4–5. – С. 3–15.
5. Новикова М.Б. Определение полихлорированных дибензодиоксинов и дибензофуранов. Методология ЕРА // Практическая сертификация (НПМП “Контроль”). – 1992. – Вып. 4–5. – С. 16–21.
6. Holmes W.E., Carmichael D., Pinson J.W. Беспощадные диоксины // Практическая сертификация (НПМП “Контроль”). – 1992. – Вып. 4–5. – С. 21–25.
7. Евдокимов К.Ю. Диски EMPORE™ для анализа диоксинов – новые возможности // Практическая сертификация (НПМП “Контроль”). – 1992. – Вып. 4–5. – С. 33–35.
8. Белов А.Б. Исследование изомеров полихлорированных дибензо-*n*-диоксинов методом капиллярной газо-жидкостной хроматографии // Практическая сертификация (НПМП “Контроль”). – 1992. – Вып. 4–5. – С. 35–37.
9. Программа действий “Повестка дня на 21 век” (конференция ООН

- “Планета Земля” по окружающей среде и развитию, июнь 1992 г., Рио-де-Жанейро (Бразилия)). – Женева (Швейцария): публикация Центра “За наше общее будущее” (составитель М. Китинг). – 1993.
10. Global programme of action for the protection of the marine environment from land-based activities. Decision 18/32 of the UNEP governing council: persistent organic pollutants / <http://www.chem.unep.ch/pops/indxhtmls/gc1832en.html>.
 11. Hagen P.E. The Stockholm convention on persistent organic pollutants / P.E. Hagen, M.P. Walls // Natural Resources and Environment. – 2005. – Vol. 19, N 4. – P. 49–52.
 12. Голубовська-Онісімова Г.М., Тимченко О.І., Цигульова О.М., Тарасова Н.В. [и др.]. Дослідження політики та законодавства у сфері управління хімічними речовинами в Україні. – Київ: ВЕГО “МАМА-86”), 2005. – 95 с.
 13. Федоров Л.А. Диоксины в России // Практическая сертификация (НПМП “Контроль”). – 1992. – Вып. 4. –5. – С. 26–32.
 14. Брагинский Л.П., Комаровский Ф.Я., Мережко А.И. Персистентные пестициды в экологии пресных вод. – Киев: Наук. думка, 1979. – 141 с.
 15. Брагинский Л.П. Пестициды и жизнь водоемов. – Киев: Наук. думка, 1972. – 228 с.
 16. Chemical contaminants in fish and sediment core samples from the Dnipro river, Ukraine, 1994 / W.L. Lockhart, C.G. Muir, P. Wilkinson, A.

- Yarechevski [et al.] // *Water Quality Research Journal of Canada*. – 1998. – Vol. 33, N 4. – P. 489–509.
17. Concentration and distribution of hydrophobic organic contaminants and metals in the estuaries of Ukraine / R.M. Burgess, A.V. Terletskaia, M.V. Milyukin, M.I. Povolotsky [et al.] // *Marine Pollution Bulletin*. – 2009. – Vol. 58, N 8. – P. 1103–1115.
 18. Distribution, magnitude and characterization of the toxicity of Ukrainian estuarine sediments / R.M. Burgess, I.M. Konovets, L.S. Kipnis, Lyashenko A.V. [et al.] // *Marine Pollution Bulletin*. – 2011. – Vol. 62, N 11. – P. 2442–2462.
 19. Structure and taxonomic diversity of benthic diatom assemblage in a polluted marine environment (Balaklava Bay, Black Sea) / A. Petrov, E. Nevrova, A. Terletskaia, M. Milyukin [et al.] // *Polish Botanical Journal*. – 2010. – Vol. 55, N 1. – P. 183–197.
 20. Комплексная характеристика донных отложений разнотипных водных объектов авандельты Килийского рукава Дуная / В.Д. Романенко, А.В. Ляшенко, С.А. Афанасьев, И.Н. Коновец [и др.] // *Гидробиологический журнал*. – 2011. – Т. 46, № 3. – С. 3–20.
 21. Милукин М.В. Идентификация и определение полихлорированных бифенилов в природных и питьевых водах методом хромато-масс-спектрометрии / М.В. Милукин // *Укр. хим. журн.* – 2003. – Т. 69, № 7. – С. 43–51.
 22. Милукин М.В. Твердофазная экстракция в определении ограниченно-летучих органических соединений в воде методом хромато-масс-спектрометрии / М.В. Милукин // *Укр. хим. журн.* – 2005. – Т. 71, № 10. – С. 93–104.
 23. Goncharuk V.V. Evaluation of contamination level of Dnieper river basin by organic and inorganic toxicants / V.V. Goncharuk, M.V. Milyukin // Chapter in the Book “Bioavailability of Organic Xenobiotics in the Environment –

- Practical Consequences for the Environment” / [ed. Ph. Baveye, J.C. Block, V.V. Goncharuk]. – Dordrecht (The Netherlands): Kluwer Acad. Publ., 1999. – NATO ASI Series 2: Environment – Vol. 64. – P. 35–56.
24. Milyukin M.V. Determination of isomeric-specific composition of polychlorinated biphenyls in natural and drinking waters of Dnieper river basin in Kiev region using gas chromatography and mass spectrometry / M.V. Milyukin // Role of Interfaces in Environmental Protection / [ed. by S. Barany]. – Dordrecht (The Netherlands): Kluwer Acad. Publ., 2003. – NATO Science Series: 4. Earth and Environmental Sciences – Vol. 24. – P. 103–120.
25. Милюкин М.В. Мониторинг органических загрязняющих веществ природных и питьевых вод / М.В. Милюкин // Экологические аспекты современных технологий охраны водной среды / [под ред. В.В. Гончарука]. – К.: Наук. думка, 2005. – Гл. 9. – С. 306–321, С.387–389.
26. Милюкин М.В. Аналитическая химия хлорорганических ксенобиотиков водных систем / М.В. Милюкин // Перспективы развития фундаментальных и прикладных исследований в области физики, химии и биологии воды / [под ред. В.В. Гончарука]. – К.: Наук. думка, 2011. – Гл. 14. – С. 311–328, С. 399–401.
27. Митропольський О.Ю., Наседкін Є.І., Осокіна Н.П. Екогеохімія Чорного моря. – К.: Академперіодика, 2006. – 279 с.
28. Милюкин М.В., Гончарук В.В. Химический мониторинг органических экотоксикантов в водных системах. – К.: Наук. думка, 2016. – 312 с.
29. Осокина Н.П. Эколого-гигиеническая оценка содержания пестицидов в объектах окружающей среды Донбасского региона / Н.П. Осокина // Екологія довкілля та безпека життєдіяльності. – 2002. – № 4. – С. 10–13.
30. Осокина Н.П. Пестициды в минеральных водах Закарпатского региона и здоровье / Н.П. Осокина, В.М. Шестопапов, И.П. Онищенко // Екологія довкілля та безпека життєдіяльності. – 2002. – № 1. – С. 66–71.
31. Хлорорганические соединения в северо-западной части Черного моря /

- Н.В. Жерко, В.Н. Егоров, Л.В. Малахова, Ю.Г. Артемов // Экология моря. – 2000. – Вып. 51. – С. 88–91.
32. Жерко Н.В. Сравнительная оценка степени загрязнения мидий и донных осадков акваторий Карадагских и Севастопольских бухт хлорорганическими соединениями / Н.В. Жерко, Л.В. Малахова, О.Ю. Бочко // Экология моря. – 2002. – Вып. 61. – С. 81–84.
33. Малахова Л.В. Вміст і розподіл хлорорганічних ксенобіотиків у компонентах екосистем Чорного моря: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук / Л.В. Малахова. – Севастополь, 2006. – 21 с.
34. Korshenko A. Chapter 3. The State of Chemical Pollution (3.2. The State of Chlorinated Pesticides) / A. Korshenko, S. Melnikov // State of the Environment of the Black Sea (2001–2006/7) / [ed. Temel Oguz. Publications of the Commission on the Protection of the Black Sea Against Pollution (BSC)]. – Istanbul, Turkey, 2008-3. – 448 p.
35. Occurrence of pesticides, polychlorinated biphenyls (PCBs), and heavy metals in sediments from the Dniester river, Moldova / Y. Sapozhnikova, E. Zubcov, N. Zubcov, D. Schlenk // Archives of Environmental Contamination and Toxicology. – 2005. – Vol. 49. – P. 439–448.
36. Юфит С.С. Мусоросжигательные заводы – помойка на небе. Промышленные полигоны – конец мусорному кризису. Диоксины в грудном молоке (Лекции). – Н. Новгород: Изд-во Нижегородской гос. мед. академии. – 1999. – 84 с.
37. Determination of PCBs in fatty tissues by means of several detection techniques / J. Hajšlova, K. Holadova, V. Kocourek, J. Poustka [et al.] // Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschungs. – 1993. – Vol. 197. – P. 562–569.
38. Recent developments in comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC). I. Introduction and instrumental set-up / M. Adahchour, J. Beens, R.J.J. Vreuls, U.A.Th. Brinkman // Trends in Analyt. Chem. – 2006. – Vol.

- 25, N 5. – P. 438–454.
39. Recent developments in comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC). II. Modulation and detection / M. Adahchour, J. Beens, R.J.J. Vreuls, U.A.Th. Brinkman // *Trends in Analyt. Chem.* – 2006. – Vol. 25, N 6. – P. 540–553.
40. Recent developments in comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC). III. Applications for petrochemicals and organohalogenes / M. Adahchour, J. Beens, R.J.J. Vreuls, U.A.Th. Brinkman // *Trends in Analyt. Chem.* – 2006. – Vol. 25, N 7. – P. 726–741.
41. Recent developments in comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC). IV. Further applications, conclusions and perspectives / M. Adahchour, J. Beens, R.J.J. Vreuls, U.A.Th. Brinkman // *Trends in Analytical Chemistry.* – 2006. – Vol. 25, N 8. – P. 821–840.
42. Attempt to unravel the composition of toxaphene by comprehensive two-dimensional gas chromatography with selective detection / P. Korytar, L.L.P. van Stee, P.E.G. Leonards, J. de Boer [et al.] // *J. of Chromatography A.* – 2003. – Vol. 994. – P. 179–189.
43. Group separation of organohalogenated compounds by means of comprehensive two-dimensional gas chromatography / P. Korytar, P.E.G. Leonards, J. de Boer, U.A.Th. Brinkman // *J. of Chromatography A.* – 2005. – Vol. 1086. – P. 29–44.
44. Eljarrat E. Priority lists for persistent organic pollutants and emerging contaminants based on their relative toxic potency in environmental samples / E. Eljarrat E., D. Barcelo // *Trends in Analyt. Chem.* – 2003. – Vol. 22, N 10. – P. 655–665.
45. Analysis of PCBs in biotic matrices by two-demensional GC-ECD / J. Hajšlova, R. Schoula, K. Holadova, J. Poustka // *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* – 2014. – Vol. 60. – P. 163–173.
46. Occurrence of persistent organochlorine contaminants in human milk

collected in several regions of Czech Republic / R. Schoula, J. Hajšlova, V. Bencko, J. Poustka [et al.] // *Chemosphere*. – 1996. – Vol. 33, N 8. – P. 1485–1494.

47. Determination of polychlorinated biphenyls in biotic matrices using gas chromatography–microwave-induced plasma atomic emission spectrometry / J. Hajšlova, P. Cuhra, M. Kempny, J. Poustka [et al.] // *J. of Chromatography A*. – 1995. – Vol. 699. – P. 231–239.
48. Weber W.J., Jr., Huang W. A distributed reactivity model for sorbtion by soils and sediments. 4. Intraparticle heterogeneity and phase-distribution relationships under nonequilibrium conditions // *Environ. Sci. Technol.* – 1996. – Vol. 30. – P. 881–888.
49. Determining PCB sorption/desorption behavior on sediments using selective supercritical fluid extraction, Part I, Desorption from historically-contaminated samples / E. Björklund, S. Bøwadt, L. Mathiasson., S.B. Hawthorne // Chapter V in the Book Björklund E. Determination of persistent organic pollutants in solid environmental samples using accelerated solvent extraction and supercritical fluid extraction: exhaustive extraction and sorption/desorption studies of PCBs (doctoral dissertation). – Lund: Lund University, 1998.
50. Discrete behavior of organic pollutants during supercritical fluid extraction (SFE) / S.B. Hawthorne, E. Björklund, J.J. Langenfeld, S. Bøwadt [et al.] // Appendix AI in the Book Björklund E. Determination of persistent organic pollutants in solid environmental samples using accelerated solvent extraction and supercritical fluid extraction: exhaustive extraction and sorption/desorption studies of PCBs (doctoral dissertation). – Lund: Lund University, 1998.

51. Determining PCB sorption/desorption behavior on sediments using selective supercritical fluid extraction. Part II. Sorption from water / S.B. Hawthorne, E. Björklund, S. Bøwadt, L. Mathiasson // Chapter VI in the Book Björklund E. Determination of persistent organic pollutants in solid environmental samples using accelerated solvent extraction and supercritical fluid extraction: exhaustive extraction and sorption/desorption studies of PCBs (doctoral dissertation). – Lund: Lund University, 1998.
52. Determining PCB sorption/desorption behavior on sediments using selective supercritical fluid extraction: Part III, Describing PCB extraction with simple diffusion models / K. Pilorz, E. Björklund, S. Bøwadt, L. Mathiasson [et al.] // Chapter VII in the Book Björklund E. Determination of persistent organic pollutants in solid environmental samples using accelerated solvent extraction and supercritical fluid extraction: exhaustive extraction and sorption/desorption studies of PCBs (doctoral dissertation). – Lund: Lund University, 1998.
53. Raynie D.E. Modern extracton techniques / D.E. Raynie // Anal. Chem. □ 2006. □ Vol. 78 (12). □ P. 3997□4004.
54. Henry M.C. Supercritical fluid chromatography, Pressurized liquid extraction, and Supercritical fluid extraction / M.C. Henry // Anal. Chem. □ 2006. □ Vol. 78 (12). □ P. 3909□3916.
55. Hyötyläinen T. Potential of effective extraction techniques and new analytical systems for profiling the marine environment / T. Hyötyläinen, M.-L. Riekkola // Trends in Anal. Chem. □ 2007. □ Vol. 26, N 8. □ P. 788□808.
56. Garsia-Ayuso L.E. Employing focused microwaves to counteract conventional Soxhlet extraction drawbacks / L.E. Garsia-Ayuso, M.D. Luque de Castro // Trends in Anal. Chem. □ 2001. □ Vol. 20, N 1. □ P. 28□34.
57. Giergielewicz-Mozajska H. Accelerated solvent extraction (ASE) in the analysis of environmental solid samples □ Some aspects of theory and practice / H. Giergielewicz-Mozajska, L. Dabrowski, J. Namesnik // Critical

- Reviews in Analyt. Chem. □ 2001. □ Vol. 31, N 3. □ P. 149□165.
58. Abrha Y. Polychlorinated biphenyl (PCB) recovery from spiked organic matrix using accelerated solvent extraction (ASE) and Soxhlet extraction / Y. Abrha, D. Raghavan // Journal of Hasardous Material. □ 2000. □ Vol. 80, N 1□3. □ P. 147□157.
 59. Helaleh M.I.H. Automated pressurized liquid extaction (PLE) and automated power-prep TM clean-up for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons, organo-chlorinated pesticides and polychlorinated biphenyls in marine samples / M.I.H. Helaleh, A. Al-Rashdan // Anal. Methods. □2013. □ Vol. 5. □ P. 1617□1622.
 60. Comparison of accelerated solvent extraction and Soxhlet extraction for the determination of PCBs in seven Baltic Sea sediments / C. Bandh, E. Bj□rklund, L. Mathiasson, C. N□f [et al.] // Environ. Sci. and Techn. □ 2000. □ Vol. 34, N 23. □ P. 4995□5000.
 61. Method EPA 3500B. Organic extraction and sample preparation, 1996.
 62. Method EPA 3540C. Soxhlet Extraction, 1996.
 63. Method EPA 3550B. Ultrasonic Extraction, 1996.
 64. Method EPA 3560/3561. Supercritical Fluid Extraction, 1996.
 65. Method EPA 3545. Accelerated Solvent Extraction, 1996.
 66. Милюкин М.В. Идентификация и определение хлорорганических пестицидов в природной воде бассейна Днепра методом газовой хроматографии/масс-спектрометрии / М.В. Милюкин, И.В. Гогоман // Методы и объекты химического анализа. – 2011. – Т. 6, № 4. – С. 214–223.
 67. Милюкин М.В. Идентификация и определение полихлорированных бифенилов в природной воде бассейна р. Днепр методом газовой хроматографии/масс-спектрометрии / М.В. Милюкин, В.В. Гончарук // Статья в кн. “Каталитические, сорбционные, микробиологические и интегрированные методы для защиты и ремедиации окружающей среды”

- [Под ред. О.П. Таран и В.Н. Пармона]. □ Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2013. □ С. 128□139 (Гл. 2, ст. 2.3) (Интеграционные проекты СО РАН; вып. 45).
68. Скринник М.М. Определение хлорорганических пестицидов и полихлорированных бифенилов в биоте бассейна Днепра методом газовой хроматографии / масс-спектрометрии / М.М. Скринник, М.В. Милюкин // Укр. хим. журн. – 2007. – Т. 73, № 10. – С. 105–109.
 69. Скринник М.М. Определение копланарных полихлорированных бифенилов в биоте бассейна Днепра методом газовой хроматографии/масс-спектрометрии / М.М. Скринник, М.В. Милюкин // Укр. хим. журн. – 2010. – Т. 76, № 7. – С. 65–69.
 70. 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.
 71. Method EPA 3620B. Florisil cleanup, 1996.
 72. Method EPA 3535. Solid-phase extraction (SPE), 1996.
 73. 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.
 74. Милюкин М.В. Определение параметров сорбции органических токсикантов, солюбилизированных TRITON X-100, при их концентрировании пористыми полимерными сорбентами из водных растворов /М. Милюкин, М. Скринник, М. Горбань // Методы и объекты химического анализа. – 2015. – Т. 10, № 4. – С. 189–194.
 75. Method EPA 3660. Sulfur cleanup, 1996.
 76. Method EPA 3665. Sulfuric acid/Permanganate cleanup, 1996.

77. Determination of felodipine in tablets using accelerated solvent extraction / E. Björklund, M. Järemo, L. Mathiasson, L. Karlsson [et al.] // *J. Liq. Chrom. and Rel. Technol.* – 1998. – Vol. 21, N 4. – P. 535–549.
78. Comparison of accelerated solvent extraction and soxhlet extraction for the determination of PCBs in seven Baltic sediments / C. Bandh, E. Björklund, C. Näf, Y. Zebühr [et al.] // Chapter III in the Book Björklund E. Determination of persistent organic pollutants in solid environmental samples using accelerated solvent extraction and supercritical fluid extraction: exhaustive extraction and sorption/desorption studies of PCBs (doctoral dissertation). – Lund: Lund University, 1998.
79. Accelerated solvent extraction of PCBs in solid environmental samples / E. Björklund, S. Bøwadt, T. Nilsson, L. Mathiasson // Chapter II in the Book Björklund E. Determination of persistent organic pollutants in solid environmental samples using accelerated solvent extraction and supercritical fluid extraction: exhaustive extraction and sorption/desorption studies of PCBs (doctoral dissertation). – Lund: Lund University, 1998.
80. Illustration of important mechanisms controlling mass transfer in supercritical fluid extraction / E. Björklund, M. Järemo, L. Mathiasson, J. Å. Jönsson [et al.] // *Anal. Chim. Acta.* – 1998. – Vol. 368. – P. 117–128.
81. Bridging the automation gap between sample preparation and analysis: an overview of SFE, GC, GC-MS, and HPLC applied to environmental samples / D.R. Gere, C.R. Knipe, P. Castelli, J. Hedrick [et al.] // *J. Chromatogr. Sci.* – 1993. – Vol. 31. – P. 246–258.
82. Химия привитых поверхностных соединений / Под ред. Г.В. Лисичкина. – М.: Физматлит, 2003. – 592 с.
83. Method EPA 3640A. Gel-permeation cleanup (GPC), 1996.
84. Accuracy and precision of determination of chlorinated pesticides and polychlorinated biphenyls with automated interpretation of mass spectrometric data / A.L. Alford-Stevens, T.A. Bellar, J.W. Eichelberger,

- W.L. Budde // *Anal. Chem.* – 1986. – Vol. 58, N 9. – P. 2022–2029.
85. Toxic equivalency factors (TEF) for PCBs, PCDDs, PCDFs for human and wildlife / M. van den Berg, L. Birnbaum, A.T.C. Bosveld, B. Brunström [et al.] // *Environmental Health Perspectives.* – 1998. – Vol. 106, N 12. – P. 775–792.
 86. A survey of drinking water supplies in the province of Ontario for dioxins and furans / B. Jobb, M. Uza, R. Hunsinger, K. Roberts [et al.] // *Chemosphere.* – 1990. – Vol. 20, N 10–12. – P. 1553–1558.
 87. Ho A.K.W. Chlorinated dioxins/furans in sewage and sludge of municipal water pollution control plants / A.K.W. Ho, R.E. Clement // *Chemosphere.* – 1990. – Vol. 20, N 10–12. – P. 1549–1552.
 88. Investigation of the utility of various mixed and halogenated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and biphenyls as surrogate/internal and injection standards / D. Waddell, J. Sparling, B. Chittim, S. Safe // *Chemosphere.* – 1990. – Vol. 20, N 10–12. – P. 1299–1306.
 89. Isolating planar chlorobiphenyls from marine life / B.K. Haines, T.L. King, R. Tokarczyk, J.F. Uthe [et al.] // *Hewlett–Packard Peak.* – N 1. – 1998. – P. 2–4.
 90. Bunce N.J. Development of rapid screening assay for PCDDs and PCDFs / N.J. Bunce, R. Logan, U.A. Schneider // *Chemosphere.* – 1990. – Vol. 20, N 10–12. – P. 1417–1422.
 91. Validation studies of an automated preconcentration water sampler (APS) for chlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans / M. Uza, R. Hunsinger, T. Thompson, R.E. Clement // *Chemosphere.* – 1990. – Vol. 20, N 10–12. – P. 1349–1354.
 92. Gullett B.K. The effect of metal catalysts on the formation of polychlorinated dibenzo-p-dioxin and polychlorinated dibenzofuran precursors / B.K. Gullett, K.R. Bruce, L.O. Beach // *Chemosphere.* – 1990. – Vol. 20, N 10–12. – P. 1945–1952.
 93. Application of tandem quadrupole mass spectrometry for the ultra-trace

- determination of the polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans / E.J. Reiner, D.H. Schellenberg, V.Y. Taguchi, R.S. Mercer [et al.] // *Chemosphere*. – 1990. – Vol. 20, N 10–12. – P. 1385–1392.
94. Doherty L. The analyses of polychlorinated biphenyls (PCBs) in an oil matrix with the HP5972A MSD // Hewlett–Packard MS Application Note 93-6. – 1993. – 8 p.
95. Firor R.L. Analysis of polychlorinated biphenyls using automated cool on-column injection into 250-micron capillary columns // Hewlett–Packard Application Note 228-197. – 1992. – 4 p.
96. Klee M.S. Optimized conditions for EPA–608 analysis using an HP-5 Series 530 μ capillary column / Hewlett–Packard Application Note 228-101. – 1989. – 6 p.
97. Зенкевич И.Г., Иоффе Б.В. Интерпретация масс-спектров органических соединений. – Л.: Химия, 1986. – 176 с.
98. Method EPA 8410A. Gas chromatography / Fourier transform infrared (GC/FT-IR) spectrometry for semivolatile organics: capillary column.
99. Persistent organochlorine residues in sediments from the Black Sea / G. Fillmann, J.W. Readman, I. Tolosa, J. Bartocci [et al.] // *Marine Pollut. Bull.* – 2002. – Vol. 44. – P. 122–133.
100. Assessment of the Mediterranean sediments contamination by persistent organic pollutants / A. Gomez-Gutierrez, E. Garnacho, J. M. Bayona, J. Albaiges // *Environ. Pollut.* – 2007. – Vol. 148. – P. 396–408.
101. Occurrence of PAHs, PCBs and organochlorine pesticides in the Tohghui River of Beijing, China / Z. Zhang, J. Huang, G. Yu, H. Hong // *Environ. Pollut.* – 2004. – Vol. 130, N 2. – P. 249–261.
102. Occurrence of dissolved PAHs in the Jinsha river (Panzhihua) – upper reaches of the Yangtze river, Southwest China / J. Huang, Z. Zhang, G. Yu // *J. Environ. Monit.* – 2003. – Vol. 5. – P. 604–609.
103. Transport and fate of organochlorine pesticides in the river Wuchuan,

- Southeast China / Z. Zhang, H. Hong, J.L. Zhou, G. Yu [et al.] // *J. Environ. Monit.* – 2002. – Vol. 4. – P. 435–441.
104. Risks posed by trace organic contaminants in coastal sediments in the Pearl river delta, China / C.N. Fung, G.J. Zheng, D.W. Connell, X. Zhang [et al.] // *Marine Pollut. Bull.* – 2005. – Vol. 50. – P. 1036–1049.
105. Цымбалюк К.К. Определение полициклических ароматических углеводородов в донных отложениях Черного моря методом хромато-масс-спектрометрии / К.К. Цымбалюк, Ю.М. Деньга, В.П. Антонович // *Укр. хим. журн.* – 2009. – Т. 75, № 5. – С. 45–49.
106. Цымбалюк К.К. Оптимизация процедуры определения полициклических ароматических углеводородов в черноморских донных отложениях / К.К. Цымбалюк, Ю.М. Деньга, В.П. Антонович // *Методы и объекты химического анализа.* – 2011. – Т. 6, № 2. – С. 110–117.
107. Determination of 16 priority polycyclic aromatic hydrocarbons in bottom sediments of the Danube estuarine coast by GC/MS / К.К. Tsymbalyuk, Y.M. Den'ga, N.A. Berlinsky, V.P. Antonovich // *Geo-Eco-Marina.* – 2011. – Vol. 17. – P. 67–72.
108. Mussel-based monitoring of trace metal and organic contaminations along the east coast of China using *Perna viridis* and *Mytilus edulis* / C.N. Fung, J.C.W. Lam, G.J. Zheng, D.W. Connell [et al.] // *Environ. Pollut.* – 2004. – Vol. 127. – P. 203–216.
109. Incidence and levels of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in lake Ontario commercial fish / J.J. Ryan, P.-Y. Lau, J.C. Pilon, D. Lewis [et al.] // *Environ. Sci. Technol.* – 1984. – V. 18. – P. 719–721.
110. Organochlorine contaminants in Arctic marine food chains: identification, geographical distribution and temporal trends in polar bears / R.J. Norstrom, M. Simon, D.C.G. Muir, R.E. Schweinsburg / *Environ. Sci. Technol.* – 1988. – V. 22. – P. 1063–1071.
111. Muir D.C.G., Norstrom R.J., Simon M. Organochlorine contaminants in

- Arctic marine food chains: accumulation of specific polychlorinated biphenyls and chlordane-related compounds / D.C.G. Muir., R.J. Norstrom, M. Simon // *Environ. Sci. Technol.* – 1988. – V. 22. – P. 1071–1079.
112. Dietary accumulation and sustained hepatic mixed function oxidase enzyme induction by 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran in rainbow trout / D.C.G. Muir, A.L. Yarechewski, D.A. Metner, W.L. Lockhart [et al.] // *Environ. Toxicology and Chemistry.* – 1990. – V. 9. – P. 1463–1472.
113. Dietary 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran in rainbow trout: accumulation, disposition, and hepatic mixed-function oxidase enzyme induction / D.C.G. Muir, A.L. Yarechewski, D.A. Metner, L. Lockhart // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 1992. – V. 117. – P. 65–74.
114. Levels of PCDDs, PCDFs and non-ortho PCBs in dietary supplement fish oil obtained in Spain / B. Jimenez, C. Wright, M. Kelly, J.R. Startin // *Chemosphere.* – 1996. – V. 32, N 3. – P. 461–467.
115. Exposure of remote maritime populations to coplanar PCBs / E. Dewailly, J.J. Ryan, C. Laliberte, S. Bruneau [et al.] // *Environ. Health Perspectives.* – 1994. – V. 102. – Suppl. 1. □ P. 205–209.
116. Hong C.S. Coplanar PCBs in fish and mussels from marine and estuarine waters of New York State / C.S. Hong, B. Bush, J. Xiao // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* – 1992. – V. 23, N 1. – P. 118–131.
117. Highly toxic coplanar PCBs: occurrence, source, persistency and toxic implications to wildlife and humans / S. Tanabe, N. Kannan, A. Subramanian, S. Watanabe [et al.] // *Environ. Pollution.* – 1987. – V. 47, N 2. – P. 147–163.
118. PCDDs, PCDFs and coplanar PCBs in coastal and marketing fishes in Japan. / K. Takayama, H. Miyata, M. Mimura, T. Kashimoto // *Japanese J. of Toxicol. and Environ. Health.* – 1991. – V. 37, N 2. – P. 125–131.
119. Method for the determination of three toxic non-ortho-chlorine substituted coplanar PCBs in environmental samples at part-per-trillion levels / S. Tanabe, N. Kannan, T. Wakimoto, R. Tatsukawa // *Intern. J. of Environ. Anal.*

- Chem. – 1987. – V. 29. – P.199–213.
120. Hong C.-S. Determination of mono and non-ortho coplanar PCBs in fish / C.-S. Hong, B. Bush // *Chemosphere*. – 1990. – 47, № 1–2. – P. 173–181.
 121. Koslowski S.E. The distribution of 42 PCBs, including three coplanar congeners, in the food web of the Western Basin of Lake Erie / S.E. Koslowski, C.D. Metcalfe, R. Lazar, G.D. Haffner // *J. Great Lakes Res.* – 1994. – 20 (1) – P. 118–131.
 122. Schulz-Bull D.E. Distribution of individual chlorobiphenyls (PCB) in solution and suspension in the Baltic Sea / D.E. Schulz-Bull, G. Petrick, N. Kannan, J.C. Duinker // *Marine Chem.* – 1995. – 48 – P. 245–270.
 123. Ling Y.-C. PCDDs and coplanar PCBs in sediment and fish samples from the Er-Jen River in Taiwan / Y.-C. Ling, D.-K. Soong, M.-K. Lee // *Chemosphere*. – 1993. – Vol. 3. – P. 2863–2872.
 124. Brown F.R. Levels of PBDEs, PCDDs, PCDFs, and coplanar PCBs in edible fish from California coastal waters / F.R. Brown, J. Winkler, P. Visita, J. Dhalival [et al.] // *Chemosphere*. – 2006. – 64. – P. 276–286.
 125. Koistinen J. Bioaccumulation of dioxins, coplanar PCBs, PCDEs, HxCNs, R-PCNs, R-PCPHs and R-PCBBs in fish from a pulp-mill recipient watercourse / J. Koistinen, J. Paasivirta, M. Lahtiperä // *Chemosphere*. – 1993. – Vol. 27, № 1–3. – P.149–156.
 126. Schechter A. Partitioning of dioxins, dibenzofurans and coplanar PCBs in blood, milk, adipose tissue, placenta and cord blood from five American women / A. Schechter, I. Kassis, O. Papke // *Chemosphere*. – 1998. – Vol. 77, № 9–12. – P. 1817–1823.
 127. Bright D.A. Differential bioaccumulation of non-ortho-substituted and other PCB congeners in coastal Arctic invertebrates and fish / D.A. Bright, S.L. Grundy, K.J. Reimer // *Environ. Sci. Technol.* – 1995. – Vol. 29. – P. 2504–2512.
 128. Muir D. Bioaccumulation of PCBs and chlorinated pesticides in seals, fishes

- and invertebrates from the White Sea, Russia / D. Muir, T. Savinova, V. Savinov, L. Alexeeva [et al.] // *The Sci. of the Total Environ.* – 2003. – Vol. 306. – P. 111–131.
129. Borga K. Bioaccumulation factors for PCBs revisited / K. Borga, A.T. Fisk, B. Hargrave, P.F. Hoekstra [et al.] // *Environ. Sci. Technol.* – 2005. – Vol. 39. – P. 4523–4532.
130. Swackhamer D.L. Bioaccumulation of PCBs by algae: kinetics versus equilibrium / D.L. Swackhamer, R.S. Scoglund // *Environ. Toxicol. and Chem.* – 1992. – Vol. 12. – P. 831–838.
131. Borga K. Biological and chemical factors of importance in the bioaccumulation and trophic transfer of persistent organochlorine contaminants in arctic marine food webs / K. Borga, A.T. Fisk, P.F. Hoekstra, D.C.G. Muir // *Environ. Toxicol. and Chem.* – 2004. – Vol. 23, № 10. – P. 2367–2385.
132. Van der Oost R. Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*) I. Bioaccumulation: biota-sediment ratios of PCBs, OCPs, PCDDs and PCDFs / R. Van der Oost, A. Opperhuizen, K. Satumalay, H. Heida [et al.] // *Aquatic Toxicol.* – 1996. – Vol. 35. – P. 21–46.
133. Chan H.M. Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyl congeners in ooligan grease: a traditional food fat of British Columbia first nations / H.M. Chan, M. El Khoury, M. Sedgemore, S. Sedgemore [et al.] // *J. of Food Composition and Analysis.* – 1996. – Vol. 9. – P. 32–42.
134. Jaouen-Madoulet A. Validation of an analytical procedure for polychlorinated biphenyls, coplanar polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental samples / A. Jaouen-Madoulet, A. Abarnou, A.-M. Le Guellec, V. Loizeau, F. Leboulenger // *J. of Chromatog. A.* – 2000. – Vol. 886. – P. 153–173.
135. Therdteppitak A. Determination of organochlorine pesticides in commercial fish by gas chromatography with electrone capture detector and confirmation

- by gas chromatography – mass spectrometry / A. Therdteppitak, K. Yammeng // *Sci. Asia.* – 2003. – Vol. 29. – P. 127–134.
136. Stoichev T. Comparison of extraction procedures for determination of organochlorine pesticides in fish / T. Stoichev, N. Rizov, A. Kolarska, F. Ribarova [et al.] // *J. of the Univ. of Chem. Technology and Metallurgy.* – 2005. – Vol. 40, N 3. – P. 251–254.
137. Kafilzadeh F. Determination of organochlorine pesticide residues in water, sediments and fish from lake Parishan, Iran / F. Kafilzadeh, A.H. Shiva, R. Malekpour, H.N. Azad // *World J. of Fish and Marine Sci.* – 2012. – 4 (2). – P. 150–154.
138. Цымбалюк К.К. Оптимизация процедуры определения полициклических ароматических углеводородов в биоте / К.К. Цымбалюк, Ю.М. Деньга, В.П. Антонович // *Укр. хим. журн.* – 2012. – Т. 78, № 12. – С. 111–117.
139. Yang X. Multiresidue method for determination of 88 pesticides in berry fruits using solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry: Determination of 88 pesticides in berries using SPE and GC–MS / X. Yang, H. Zhang, Y. Liu, J. Wang [et al.] // *Food Chem.* – 2011. – Vol. 127. – P. 855–865.
140. Method EPA 8081A. Organochlorine pesticides by gas chromatography, 1996.
141. Method EPA 608. Organochlorine pesticides and PCBs, 2001.
142. Method EPA 8082. Polychlorinated biphenyls (PCBs) by gas chromatography, 1996.
143. Method EPA 8082A. Polychlorinated biphenyls compounds (PCBs), 2001.
144. Method EPA 8100. Polynuclear aromatic hydrocarbons, 1986.
145. Method EPA 8280A. The analysis of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and polychlorinated dibenzofurans by high resolution gas chromatography/low resolution mass spectrometry (HRGC/LRMS), 1996.
146. Method EPA 8290. Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs) and

- polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) by high-resolution gas chromatography/high-resolution mass spectrometry (HRGC/HRMS) (Procedures for the collection, handling, analysis and reporting of wipe tests performed within the laboratory), 1994.
147. Method EPA 0023A. Sampling method for polychlorinated dibenzo-*p*-dioxines and dibenzofuran emissions from stationary sources, 1996.
 148. Method EPA 1613. Revision R.: Tetra- through octa-chlorinated dioxins and furans by isotope dilution HRGC/HRMS. □ EPA No. 68-C3-0337, 1994.
 149. Method EPA 8310. Polynuclear aromatic hydrocarbons, 1986.
 150. Method EPA 9078. Screening test methods for polychlorinated biphenyls in soil, 1996.
 151. Method EPA 9079. Screening test methods for polychlorinated biphenyls in transformer oil, 1996.
 152. Method EPA 1668A. Chlorinated biphenyl congeners in water, soil, sediment and tissue by HRGC/HRMS. □ EPA No. EPA-821-R-00-002, 1999.
 153. Скринник М.М., Милюкин М.В. Препаративное выделение хлорорганических пестицидов, полихлорированных бифенилов и диоксинов из экстрактов биоты для определения методом газовой хроматографии / масс-спектрометрии // Методы и объекты химического анализа. – 2006. – Т. 1, № 2. – С. 152–158.
 154. Скринник М.М., Милюкин М.В. Препаративное выделение копланарных полихлорированных бифенилов для определения методом газовой хроматографии / масс-спектрометрии // Укр. хим. журн. – 2007. – Т. 73, № 12. – С. 97–104.
 155. 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 // Book of abstracts of International conference “Analytical Chemistry and Chemical Analysis (AC α CA-O5)” devoted to 100 anniversary of Anatoly Babko (Kyiv, Ukraine, September 12–18, 2005). –

- Kiev, 2005. – P. 235.
156. Identification of dioxin-like and estrogenic compounds in sediment using CALUX® assay-directed fractionation combined with two-dimensional comprehensive GC×GC–ToF MS / C. Houtman, E. Jover, M. Adahchour [et al.] // *Organohalogen Compounds*. – 2004. – Vol. 66. – P. 704–710.
 157. On the isolation of polychlorinated *p*-dioxins and furans from serum samples using immunoaffinity chromatography high-resolution gas chromatography-mass spectrometry / J.K. Huwe, W.L. Shelver, D.G. Patterson, W.E. Turner // *J. Chromatogr. B*. – 2001. – Vol. 757, № 2. – P. 285–293.
 158. Highly sensitive dioxin immunoassay and its application to soil and biota samples / G. Shan, W.R. Leeman, S.G. Gee, J.R. Sanborn [et al.] // *Anal. Chim. Acta*. – 2001. – Vol. 444. – P. 169–178.
 159. Бидлингмейер Б. Препаративная жидкостная хроматография. – М.: Мир, 1990. – 360 с.
 160. Organochlorines in New Zealand: Ambient concentrations of selected organochlorines in rivers / S.J. Buckland, P.D. Jones, H.K. Ellis, R.T. Salter // *Report Ministry for the Environment, Wellington, 1998*. – P. 40–48.
 161. Organochlorines in New Zealand: Ambient concentrations of selected organochlorines in rivers / S. Scobie, S.J. Buckland, H.K. Ellis, R.T. Salter // *Report Ministry for the Environment, Wellington, 1999*. – P. 35–40.
 162. Millennium Software User's Guide: Vol. 2. – USA: Waters Corporation, 1994.
 163. Isolation of toxic polychlorinated biphenyls by electron donor–acceptor high-performance liquid chromatography on a 2-(1-prenyl)ethyl dimethylsilylated silica column / P. Haglund, L. Asplund, U. Järnberg, B. Jansson // *J. Chromatogr. A*. – 1990. – Vol. 507. – P. 389–398.
 164. Шатц В.Д., Сахартова О.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография. – Рига: Зинатне, 1988.
 165. Клисенко М.А., Калинина А.А., Новикова К.Ф., Хохолькова Г.А.

- Методы определения микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах и внешней среде: Справочник. – Т. 1. – М.: Колос, 1992. – 567 с.
166. Клисенко М.А., Калинина А.А., Новикова К.Ф., Хохолькова Г.А. Методы определения микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах и внешней среде: Справочник. – Т. 2. – М.: Агропромиздат, 1992. – 416 с.
167. Скринник М.М. Определение дибензо-*n*-диоксинов и копланарных полихлорированных бифенилов в биоте методом газовой хроматографии/масс-спектрометрии / М.М. Скринник, М.В. Милюкин // Тези доповідей Міжнародної конференції “Хроматографічні методи аналізу органічних сполук”, присвяченої 100-річчю з дня народження чл.-кор. АН України М.А. Ізмайлова (4–7 вересня, 2007, Київ). – Київ, 2007. – С. 38.
168. 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 // Рефераты докладов II Международного форума “Аналитика и аналитики” (22–26 сентября, 2008, Воронеж, Россия). – Воронеж, Воронеж. гос. технол. акад., 2008. – Т. 2. – С. 381.
169. EPA Guidance for assessing bioaccumulative chemicals of concern in sediment. Oregon Department Environmental Quality Division. □ 2007.
170. EPA 905/R-00/007. Prediction of sediment toxicity using consensus-based freshwater sediment quality guidelines / C.G. Ingersoll, D.D. MacDonald, N. Wang [et al.] – Chicago, 2000.
171. EPA/600/R-07/080. Sediment toxicity identification evaluation (TIE). Phases I, II, and III guidance document / K.T. Ho, R.M. Burgess, D.R. Mount [et al.] – Washington, 2007.

