

Ускоренная жидкофазная экстракция липидной фракции из биоты

Скринник М.М.¹, Милюкин М.В.²

¹ Публичное акционерное общество “Фармак”, ул. Фрунзе, 63, г. Киев, 04080

² Отдел аналитической химии и радиохимии, Институт коллоидной химии и химии воды им. А.В. Думанского НАН Украины, бул. Вернадского, 42, г. Киев, m_milyukin@mail.ru

Поступила: 25 сентября 2013 г / Принята к публикации: 17 февраля 2014 г

Проведено исследование влияния различных факторов, таких как температура, объем растворителя, скорость подачи растворителя в методе ускоренной жидкофазной экстракции (УЖЭ) на степень извлечения гидрофобных органических соединений из биоты различными растворителями и их смесями. На основе оптимизации условий проведения процесса разработана, апробирована и применена экспрессная методика УЖЭ гидрофобных органических соединений из образцов мышечной ткани рыб (10 мин), при которой достигается высокая открываемость целевых соединений из проб, составляющая 85–90 %. При этом в экстракт не попадает вода и водорастворимые вещества. Данная методика не требует использования дорогого оборудования, применима для проведения мониторинга хлорорганических пестицидов (ХОП) и полихлорированных бифенилов (ПХБ) в образцах биоты и решения других практических задач.

M.M. SKRYNNYK, M.V. MILYUKIN ACCELERATED SOLVENT EXTRACTION OF THE LIPID FRACTION FROM BIOTA. Accelerated Solvent Extraction (ASE) has been investigated for the influence of different factors such as temperature, volume of solvent, rate of solvent passage on recovery of hydrophobic organic compounds from biota by different solvent and their mixtures. Basing on process optimization we developed, approbated and used express procedure for extraction of organic compounds from fish muscles tissue (10 min). This procedure recovers 85–90 % of organochlorine pesticides (OCPs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) from fish muscles tissue. In this case water and water-soluble compounds are not present in the extract. This procedure does not require expensive equipment, and can be used for OCPs and PCBs monitoring in biota samples and solving other practical tasks.

Ключевые слова: ускоренная жидкофазная экстракция, хлорорганические пестициды, полихлорированные бифенилы, биота, мышечная ткань рыб

Keywords: accelerated solvent extraction, organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls, biota, fish muscle tissue

Хлорорганические пестициды (ХОП) и полихлорированные бифенилы (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, а также суперэкоксиканты, такие как полихлорированные дибензофураны (ПХДФ) и дибензо-*п*-диоксины (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. Существующие методы экстракции органических соединений имеют много недостатков: большие затраты времени (экстракция в аппарате Сокслета (ЭС)) [1, 2], недостаточная полнота извлечения (ультразвуковая экстракция (УЗЭ)) [1, 3], использование дорогостоящего оборудования (сверхкритическая флюидная экстракция (СФЭ)) [1, 4, 5] и ускоренная жидкофазная экстракция (УЖЭ)) [5–7]. 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 [5–10].

За последние 20 лет проведен систематический мониторинг этих соединений в природных и питьевых водах бассейна р. Днепр [11–14]. Для более полной оценки угрозы для человека и водных экосистем, которую представляют ХОП и

ПХБ, выполнено исследование по их определению в мышечной ткани рыб и получены надежные результаты о содержании этих соединений [6, 15–17].

Цель работы – 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 минимальной затрате времени на экстракцию;
- минимальное присутствие в экстракте балластных (нежелательных) высокомолекулярных гидрофильных соединений;
- небольшой расход растворителей, необходимый для извлечения целевых соединений (низкая себестоимость экстракции).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объекты исследования. Для определения оптимальных условий УЖЭ липидной фракции из биоты подготовлено 5 тестовых образцов тканей, в которые вошли особи одного возраста (одной группы), отловленные в одно и то же время в одном и том же месте. Данные о тестовых пробах представлены в табл. 1.

Методика приготовления модельных образцов биоты для установления открываемости аналита в пробах при проведении УЖЭ органических соединений. Мышечную ткань рыб гомогенизировали в электрической мясорубке в течение 5 мин. Полученную массу (гомогенизат) хранили в плотно закрывающемся стеклянном сосуде при температуре -20°C . 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°C , и растирали до получения однородного, сухого и сыпучего порошка. Полученную смесь количественно переносили во флакон объемом 100 см^3 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

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

Способ Б. По 10.00 г гомогенизата взвешивали в чашке Петри, замораживали до -60°C и лиофилизировали при следующих условиях: давление – 0.5 атм, начальная температура – -40°C , линейный градиент температуры до $+60^{\circ}\text{C}$ со скоростью $2^{\circ}\text{C}/\text{ч}$. Общее время лиофилизации – 48 ч. Лيوфилизированные образцы хранили во флаконах объемом 100 см^3 , плотно закрытых пробкой при комнатной температуре в месте, защищенном от прямых солнечных лучей.

Пробы биоты, полученные по способу А и Б, трижды экстрагировали в аппарате Сокслета разными растворителями с целью определения общей массы экстрагируемых органических соединений и концентраций ПХБ и ХОП. Пробу помещали в мешок из белой ситцевой ткани, размером $6 \times 10\text{ см}$. Мешки предварительно экстрагировали в аппарате Сокслета в тех же условиях, в которых проводили экстракцию проб. Для экстракции органических соединений из 10 г биоты, использовали аппарат Сокслета с объемом экстракционной ячейки 30 см^3 . Объем растворителя, взятый для экстракции, составлял не менее 60 см^3 .

Для экстракции органических соединений из биоты использовали 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 ПХБ и ХОП методом ГХ/МС использовали растворители, специально предназначенные для анализа ПХДД, ПХДФ и ПХБ производства Riedel-de-Haën.

Температуру водяной бани устанавливали на $10\text{--}15^{\circ}\text{C}$ выше температуры кипения используемого растворителя. Экстракцию органических соединений проводили в течение $18\text{--}24\text{ ч}$. После завершения экстракции, аппарат Сокслета извлекали из водяной бани, охлаждали, снимали обратный холодильник и ставили в вытяжной шкаф.

Таблица 1. Образцы рыб, использованные 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	с. 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.

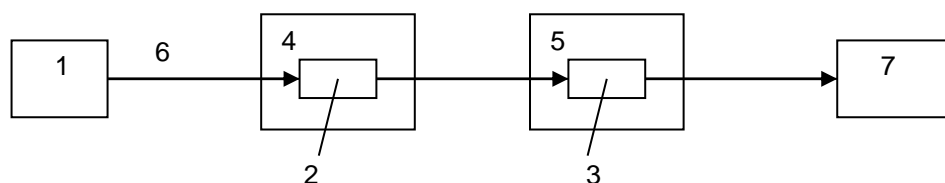


Рис. 1. Схематическое изображение системы для УЖЭ.

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 рекстрагировали гексаном. Хранили в плотно закрытой колбе при комнатной температуре в защищенном от прямых солнечных лучей месте.

Устанавливали среднюю массу общей суммы экстрагируемых органических соединений с точностью до 0.0005 г весовым методом (аналитические весы Sartorius BL 210 S).

Оборудование и метод проведения УЖЭ (рис. 1). 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. 1) [5]. 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.

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 UltrahydrogelTM 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, t = 12,1 мин), апро-

тинин (Fluka 17916, М.м. = 6.5 кДа, t = 14.2 мин), окситоцин (Sigma O 3251, М.м. = 1 кДа, t = 26.8 мин) (рис. 2).

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.

Микрошприцем Hamilton (MICROLITERTM N 710) объемом 100 мкл отбирали 200 мкл исходного раствора и помещали в мерную колбу (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 пробу и помещали в вialу объемом 2 см³ (Agilent Technologies N 5182-0544) и закрывали тефлоновой крышкой (Agilent Technologies N 5182-0564).

По 100 мкл оставшегося раствора микрошприцем Hamilton (MICROLITERTM N 710) объемом 100 мкл вводили в навески ткани перед добавлением CuSO₄. Растворы хранили в плотно закрытой стеклянной посуде при –20°C не более 3 мес.

Методика регистрации органических соединений методом лазерной рефрактометрии. Экстрагируемые органические соединения регистрировали лазерным дифференциальным рефрактометрическим детектором Waters 410 при λ=930 нм (рис. 3) на выходе из системы для УЖЭ при температуре экстракционной ячейки 20 °С. В качестве растворителя использовали метилхлорид при скорости подачи 2 см³/мин.

Методика определения ХОП и ПХБ методом ГХ/МС. Разработанные методики определения ХОП и ПХБ, включая копланарные, в образцах биоты подробно описаны в [6, 15, 17].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор оптимальных условий пробоподготовки ХОП и ПХБ из мышечной ткани рыб. Представлены результаты выделения липидной фракции из мышечной ткани рыб, содержащей хлорорганические соединения (ХОП, 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.

При разработке метода УЖЭ на первом этапе проведен эксперимент с тестовыми образцами мышечной ткани рыб методом экстракции Сокслета, приводящего к исчерпывающей жидкостной экстракции органических соединений из твердых образцов и дальнейшее сравнение этого метода проводили относительно классического метода.

Масса экстрагируемых органических соединений. Результаты определения массы экстрагируемых органических соединений для 10 параллельных определений тестового образца № 3 метиленхлоридом в аппарате Сокслета представлены в табл. 2. Среднее значение массы составляет 284.2 мг. Относительное стандартное отклонение составляет 0.8 %.

Результаты определения массы экстрагируемых органических соединений для пяти тестовых образцов ткани, полученных способами А (навеска мокрой ткани перетерта с безводным CuSO_4 до сухой однородной массы) и Б (навеска мокрой ткани, высушенной лиофильной сушкой), при экстракции метиленхлоридом, диэтиловым эфиром и бензолом представлены в табл. 3.

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 1.1–3.6 – по способу А и 1.5–7.1 % – 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 экстракции Сокслета по массе выделенных органических соединений дают практически хорошо совпадающие результаты, отличие которых находится в интервале 0.9–5.7 %.

Концентрация ХОП и ПХБ. Во всех экстрактах, полученных двумя альтернативными способами, идентифицированы ХОП и ПХБ и определена их концентрация методом ГХ/МС (табл. 4).

Средние значения концентраций 4,4'-ДДЭ тестовых образцов № 1–5 ткани, полученных по способу А соответственно составляют 527.3, 138.7, 64.7, 135.3, 45.7 и по способу Б – 530.7, 148.3, 64.7, 133.7, 54.0 мкг/кг мокрого веса и аналогично для: 4,4'-ДДД – 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 мокрого веса.

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 %.

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 экстракции Сокслета органических соединений дают практически хорошо совпадающие результаты. Интервал совпадения определяемых концентраций приведенных соединений составляет 0.1–11.8 %.

Поскольку экстракция Сокслета приводит к практически полному извлечению органических соединений из твердых образцов, то 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 сравнивали относительно величин степени извлечения по методу Сокслета.

Экстрагируемые и водорастворимые соединения. В тех случаях, когда не использовали колонку 3 (рис. 1), плотно заполненную безводным CuSO_4 , 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 гелевой фильтрационной ВЭЖХ.

На рис. 2 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 .

Таблица 2. Масса экстрагируемых органических соединений из тестового образца № 3 метилхлоридом 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±2.2 (0.8%)									

Таблица 3. 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			
	метилхлорид	диэтиловый эфир	бензол	среднее	метилхлорид	диэтиловый эфир	бензол	среднее
1	162	166	155	161.0±5.6 (3.5%)	158	166	155	159.7±5.7 (3.6%)
2	213	205	217	211.7±6.1 (2.8%)	212	206	208	208.7±3.1 (1.5%)
3	284	270	288	280.7±9.5 (3.4%)	297	281	288	288.7±8.0 (2.8%)
4	126	127	119	124.0±4.4 (3.6%)	122	111	128	120.3±8.6 (7.1%)
5	300	301	295	298.7±3.2 (1.1%)	315	300	294	303.0±10.8 (3.6%)

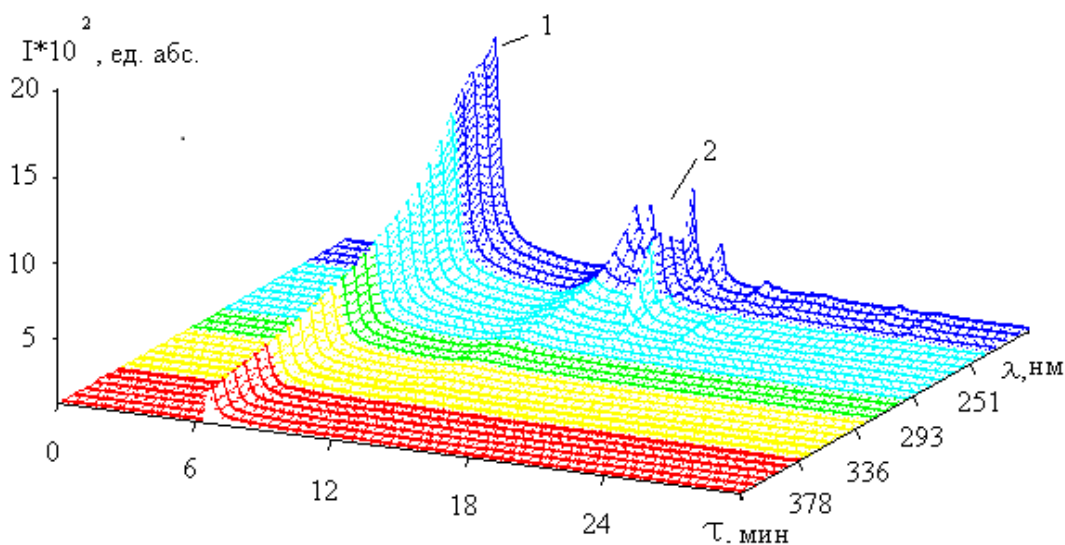


Рис. 2. Хроматограмма высокомолекулярных соединений, экстрагированных из ткани, в трехмерном представлении, полученная методом ВЭЖХ (Условия хроматографирования: оборудование - жидкостный хроматограф Hewlett-Packard HP 1050 с диодно-матричным детектором HP DAD 1050 в режиме сканирования спектра в диапазоне 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, t = 12.1 мин), аprotинин (Fluka 17916, М.м. = 6.5 кДа, t = 14.2 мин), окситоцин (Sigma O 3251, М.м. = 1 кДа, t = 26.8 мин)).

Таблица 4. Концентрации 4,4'-ДДЭ, 4,4'-ДДД, 4,4'-ДДТ и ПХБ ($C_{4,4'-\text{ддэ}}$, $C_{4,4'-\text{ддд}}$, $C_{4,4'-\text{ддт}}$, $C_{\text{пхб}}$, мкг/кг мокрого веса) в пробах ткани

Про-ба	Способ А				Способ Б			
	метилен-хлорид	диэтило-вый эфир	бензол	среднее	метилен-хлорид	диэтило-вый эфир	бензол	среднее
$C_{4,4'-\text{ддэ}}$								
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%)
$C_{4,4'-\text{ддд}}$								
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 (8.5%)	73	64	70	69.0±4.6 (6.7%)
$C_{4,4'-\text{ддт}}$								
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%)
$C_{\text{пхб}}$								
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%)

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 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. 1–3), 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°C. Остальные параметры экстракции при этом сохраняли

постоянными для всех проб (растворитель – метиленхлорид при прохождении со скоростью 10 см³/мин в течение 6 мин).

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:

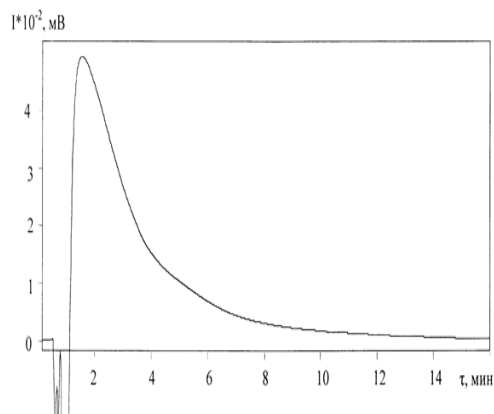


Рис. 3. Регистрация экстрагируемых органических соединений из ткани на выходе из системы УЖЭ при лазерно-рефрактометрическом детектировании

$$R = m_{\text{ужэ}} / m_{\text{Сокслет}} \cdot 100\%$$

Результаты определения степени извлечения неполярных органических соединений из проб мышечной ткани рыб при разных температурах экстракции представлены в табл. 5. Более наглядно зависимость R_T от температуры экстракции представлена на рис. 4.

Полученные результаты показывают (табл. 5 и рис. 4), что при низких температурах экстракции 20–40°C степень извлечения органических соединений из всех тестовых образцов ткани низкая – 60–70 % и возрастает с повышением температуры экстракции. При температурах 40–60°C степень экстракции повышается и при дальнейшем увеличении температуры до 100–120°C 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°C, при этом достигается степень извлечения 78–85 %. Повышение температуры экстракционной ячейки до 120°C приводит к повышению полноты извлечения только на 2–3 %. Как видно из табл. 5, 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.

Влияние температуры и объема растворителя на степень извлечения. 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. 6 и на рис. 5.

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

Таблица 5. Степень извлечения неполярных органических соединений (R_T) из тестовых образцов методом УЖЭ при разных температурах

Проба	R_T , %					
	20°C	40°C	60°C	80°C	100°C	120°C
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

Таблица 6. Степень извлечения гидрофобных соединений R_T в собранных фракциях (I–VI) тестового образца № 5 при разных температурах в нормализованном виде от массы, определенной при экстракции в аппарате Сокслета

T, °C	R_T , %					
	I	II	III	IV	V	VI
20	56.8	5.9	2.7	1.5	1.0	0.7
40	67.5	5.4	2.8	1.5	1.0	0.7
60	75.5	4.1	1.9	1.1	0.6	0.4
80	78.0	4.3	1.1	0.9	0.8	0.3
100	82.3	3.7	0.3	0.2	0.1	0.1
120	84.0	2.6	0.2	0.1	0.1	0.0

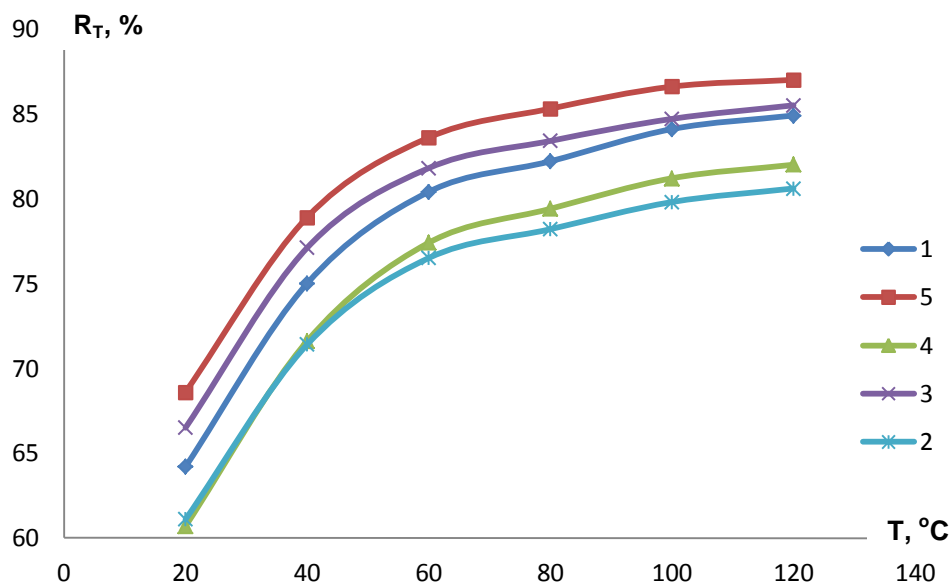


Рис. 4. Зависимость степени извлечения гидрофобных соединений из тестовых образцов (номера 1–5) ткани от температуры экстракции.

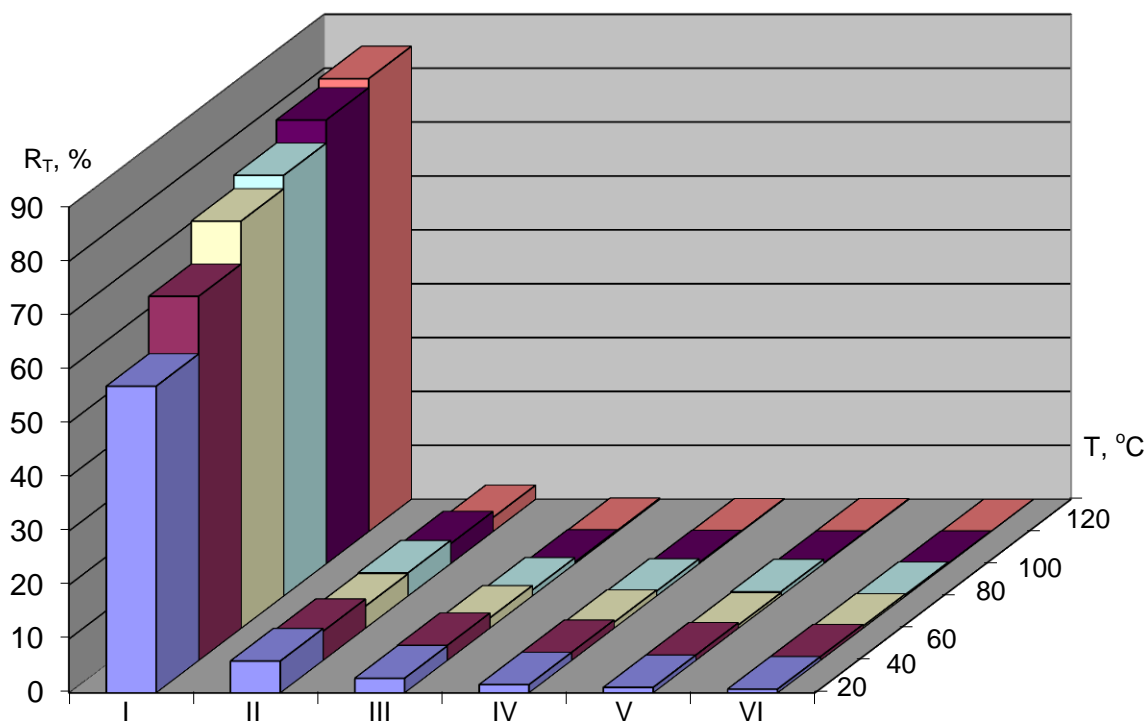


Рис. 5. Степень извлечения гидрофобных соединений R_T тестового образца № 5 в собранных фракциях (I – VI) при разных температурах экстракции.

Таблица 7. 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 мокрого веса		
	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

Открываемость внутреннего стандарта. Для того, чтобы определить поведение целевых соединений при проведении УЖЭ в пробу № 5, которую экстрагировали при 60°C, 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. 7.

Из представленного материала следует, что открываемость внутреннего стандарта (около 100 %) достигается уже при 60°C. 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. 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. 6). При извлечении органических соединений из ткани одновременно происходит экстракция воды и растворимых в ней соединений. В колонке 3 (рис. 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.

Влияние скорости подачи растворителя. Изучено влияние скорости подачи растворителя на экстракцию органических соединений из ткани. В табл. 8 представлена степень извлечения гидрофобных органических соединений из тестовых образцов при их экстракции метилхлоридом при 80°C при скорости подачи органического растворителя 2 и 10 $\text{см}^3/\text{мин}$.

По массе экстрагируемых органических соединений в каждом тестовом образце определяли степень извлечения гидрофобных органических соединений, которая представлена в табл. 8.

Поскольку равновесие между соединениями в растворителе и материале матрицы наступает слишком быстро, поэтому трудно установить оптимальную скорость подачи растворителя.

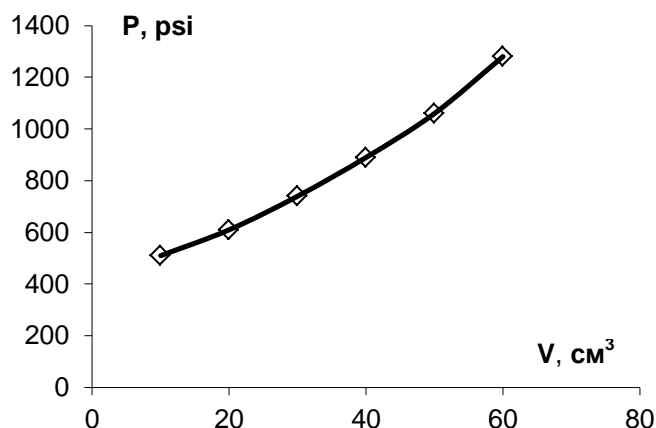


Рис. 6. Зависимость давления в ячейке экстракции от объема метилхлорида, использованного на экстракцию тестового образца № 1, при температуре экстракции 60°C.

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.

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°C, скорость потока растворителя – 10 $\text{см}^3/\text{мин}$, объем экстракта – 50 см^3 . Для всех проб условия использования разных растворителей были одинаковы. В качестве растворителей использовали метилхлорид, диэтиловый эфир, бензол, хлороформ, этилацетат, четыреххлористый углерод, дихлорэтан, толуол, гексан, гептан. Извлечение гидрофобных органических соединений при УЖЭ разными растворителями представлено в табл. 9.

Таблица 8. Степень извлечения (R) гидрофобных органических соединений из тестовых образцов при скоростях потока метилхлорида $V_1=2 \text{ см}^3/\text{мин}$ и $V_2=10 \text{ см}^3/\text{мин}$

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

Таблица 9. Степень извлечения (R) гидрофобных органических соединений из тестовых образцов ткани (№ 1–5) при УЖЭ разными органическими растворителями и их смесями

Растворитель	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

Таблица 10. Степень извлечения (R) гидрофобных органических соединений из тестовых образцов ткани (№ 1–5) при последовательной УЖЭ разными органическими растворителями и их смесями.

Растворитель	R, %				
	Образец №1	Образец №2	Образец №3	Образец №4	Образец №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, Сокслет	5.4	7.5	7.4	13.2	3.2

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 CuSO_4 . Степень извлечения R неполярных соединений при УЖЭ смесями растворителей представлена в табл. 9.

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°C 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). Опре-

деляли массу экстрагируемых органических соединений в каждой фракции.

Результаты степени извлечения последовательной экстракции разными органическими растворителями и исчерпывающей экстракции в аппарате Сокслета тестовых образцов мышечной ткани рыб представлены в табл. 10.

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 экстракция Сокслета. 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.

ВЫВОДЫ

Разработана, апробирована и применена методика УЖЭ гидрофобных органических соединений из образцов мышечной ткани рыб (10 мин), при которой достигается высокая открываемость целевых соединений из проб, составляющая 85–90 %. При этом в экстракт не попадает вода и растворимые в ней вещества. На экстракцию соединений из одной пробы расходуется 70–80 см³ органических растворителей. Данная методика не требует использования дорогого оборудования и позволяет быстро и практически полностью извлекать целевые соединения из образцов биоты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Method EPA 3500B. Organic extraction and sample preparation, 1996.
2. Method EPA 3540C. Soxhlet Extraction, 1996.
3. Method EPA 3550B. Ultrasonic Extraction, 1996.
4. Method EPA 3560/3561. Supercritical Fluid Extraction, 1996.
5. 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, E. Björklund. Lund: Lund University, 1998.
6. Skrynnyk M.M., Milyukin M.V. Determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in biota of Dnieper river basin by gas chromatography/mass spectrometry. *Ukr.Khim.Zhurn.* 2007, 73(10), 105–109.
7. Helaleh M.I.H., Al-Rashdan A. Development of Different Strategies for the Clean-Up of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) Congeners Using Pressurized Liquid Extraction. *Anal. Methods.* 2013, 5, 1617–1622.
8. Abrha Y., Raghavan D. Polychlorinated biphenyl (PCB) recovery from spiked organic matrix using accelerated solvent extraction (ASE) and Soxhlet extraction. *J. Hazardous Mat.* 2000, 80(1–3), 147–157.
9. Bandh C., Björklund E., Mathiasson L. Näf C., Zebühr Y. Comparison of Accelerated Solvent Extraction and Soxhlet Extraction for the Determination of PCBs in Baltic Sea Sediments. *Environ. Sci. Technol.* 2000, 34(34), 4995–5000.
10. Giergielewicz-Mozajska H., Dabrowski L., Namesnik J. Accelerated Solvent Extraction (ASE) in the Analysis of Environmental Solid Samples — Some Aspects of Theory and Practice. *Critical Reviews in Analyt. Chem.* 2001, 31(3), 149–165.
11. Goncharuk V.V., Milyukin M.V. Chapter in the Book “Bioavailability of Organic Xenobiotics in the Environment – Practical Consequences for the Environment”. Ed. by Ph. Baveye, J.–C. Block, V.V. Goncharuk. Dordrecht (The Netherlands): Kluwer Academic Publishers, 1999. NATO ASI Series: 2. Environment, 64, 35–56.
12. Milyukin M.V. Identification and determination of polychlorinated biphenyls in natural and drinking waters by chromat-mass-spectrometry methods. *Ukr.Khim.Zhurn.* 2003, 69(7), 43–51.
13. Milyukin M.V. Chapter in the Book “Role of Interfaces in Environmental Protection”, Ed. by S. Barany. Dordrecht (The Netherlands): Kluwer Academic Publishers, 2003. NATO Science Series: IV Earth and Environmental Sciences, 24, 103–120.
14. Milyukin M.V. Solid-phase extraction in determination of semivolatile organic compounds in water by chromatography and mass spectrometry. *Ukr. Khim. Zhurn.* 2005, 71(10), 93–104.
15. Skrynnyk M.M., Milyukin M.B. Preparative isolation of coplanar polychlorinated biphenyls for determination by gas chromatography/mass-spectrometry. *Ukr.Khim.Zhurn.* 2007, 73(12), 97–104.
16. Skrynnyk M.M., Milyukin M.V. 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). 2005, p. 235.
17. Skrynnyk M.M., Milyukin M.V. Gas chromatographic/mass spectrometric determination of coplanar polychlorinated biphenyls in biota of Dnieper river basin. *Ukr.Khim.Zhurn.* 2010, 76(7), 65–69.