

УДК 543.64:543.635.6:504.064

К.К.Цымбалюк, Ю.М.Деньга, В.П.Антонович**ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕДУРЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИХ АРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ В БИОТЕ**

Проведена оптимизация процедуры определения полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) в образцах биоты (рыбы, мидии, водоросли) методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием. Показано преимущество использования для экстракции ПАУ бинарных смесей органических растворителей. Оптимизированная методика апробирована на стандартных образцах биоты: SRM IAEA – 140 и 142.

ВВЕДЕНИЕ. Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ, полиарены) — ограниченно-летучие стойкие органические загрязнители — обладают канцерогенным, мутагенным, тератогенным, гепатотоксическим действиями. Они способны аккумулироваться в липидных тканях живых организмов и вызывать тяжелые заболевания. Группа полициклических ароматических углеводородов насчитывает более 10000 соединений, а в объектах окружающей среды определяют более 100 ПАУ. Основными антропогенными источниками эмиссии полиаренов в окружающую среду являются выбросы промышленных предприятий (образуются при высокотемпературной переработке органического сырья), автотранспорт (в выхлопных газах автомобилей обнаружено более 150 ПАУ), авиация, судоходство, добыча и транспортировка нефти [1, 2]. Из природных источников, создающих фоновый уровень ПАУ, следует отметить их синтез некоторыми растениями и микроорганизмами [3], лесные пожары, вулканическую активность.

Среди 16 приоритетных ПАУ наиболее токсичным является бенз(*a*)пирен, который можно обнаружить в табачном дыме, питьевой воде и продуктах питания. Сложность защиты окружающей среды и человека от ПАУ связана с низкими концентрациями этих веществ в природных водах, донных отложениях и биоте.

Рекомендуемые различной нормативно-аналитической документацией методики определения микроколичеств ПАУ в биоте [4, 5] предусматривают использование достаточно больших навесок анализируемых образцов (до 10—20 г),

продолжительную и трудоемкую предварительную процедуру извлечения аналитов, большой расход дорогостоящих высококачественных органических растворителей (гексан, дихлорметан и др.), сложные стадии отделения суммы полиаренов от нецелевых органических веществ.

Как правило, для определения ПАУ используются методы газовой хроматографии (ГХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Разделение приоритетных 16 ПАУ, достаточное для количественного анализа, достигается применением либо капиллярных колонок в газовой хроматографии, либо высокоэффективных колонок, используемых в ВЭЖХ [6, 7]. Необходимо учитывать, что колонка, хорошо разделяющая калибровочные смеси шестнадцати ПАУ, не гарантирует того же на фоне сопутствующих органических соединений в исследуемых пробах. В целях упрощения анализа, а также для достижения высокого качества получаемых результатов большинство аналитических процедур содержит этап предварительного отделения (фракционирования) ПАУ от сопутствующих соединений в пробах. Чаще всего в этих целях используют методы колоночной хроматографии с применением в качестве сорбентов силикагеля и оксида алюминия. Однако в полученных очищенных экстрактах (особенно в экстрактах биоты) могут содержаться алкилпроизводные ПАУ, бифенилы, ароматические производные дибензодиоксана и дибензофурана, а также много других соединений. В связи с тем, что разделительный потенциал хроматографических колонок ограничен, достоверность

© К.К.Цымбалюк, Ю.М.Деньга, В.П.Антонович, 2012

идентификации соединений может быть дополнительно повышена применением высокоселективных детекторов, например, масс-селективных.

Цель работы — оптимизация процедуры подготовки проб биоты при определении в них 16 приоритетных полиаренов. Идентификацию и количественное определение индивидуальных ПАУ в их сложных смесях проводили с помощью наиболее эффективного для таких задач метода хромато-масс-спектрометрии после предварительного выделения и концентрирования суммы полиаренов из анализируемых объектов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ. Использовали следующие приборы и вспомогательное оборудование: хромато-масс-спектрометр Agilent 7890A/5975C, термостат на шесть мест Electromantle ME, а также растворители — гексан, дихлорметан, ацетон, толуол, метанол, гептан, этилацетат — производства фирмы Sigma Aldrich, квалификации Pesticide Residue Analysis, оксид алюминия и силикагель для колоночной хроматографии, сульфат натрия производства фирмы Merck. Для градуировки хромато-масс-спектрометра применяли стандартную смесь, содержащую 16 полиаренов, производства фирмы Supelco (№ 4-9156) с концентрацией каждого компонента 2000 мкг/мл, растворенных в смеси ацетон:бензол (1:1), из которой были приготовлены калибровочные смеси с концентрациями каждого компонента 0.1, 1.0, 10.0, 100.0 и 500 нг/мл. Интервал определяемых концентраций ПАУ составляет от 0.1 до 500 мкг/кг. В качестве внутреннего стандарта использовали дейтерированный пирен (pyrene- d_{10}) производства Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA).

Пробы биоты (гомогенат мидий, водоросли) высушивали до воздушно-сухого состояния с помощью лиофильной сушки в аппарате CHRIST ALPHA 1-4. Исследуемый образец массой 2 г перемешивали с элементной медью и добавляли раствор внутреннего стандарта, после чего проводили экстракцию ПАУ в аппарате Сокслета органическими растворителями и их смесями. Полученный экстракт упаривали на ротонном испарителе до 5 мл, затем до 1 мл под током азота. ПАУ в биоте, как правило, находятся в относительно низких концентрациях по сравнению с алифатическими углеводородами, содержание которых на 2—3 порядка выше. Поэтому упаренный экстракт подвергали фракци-

онированию на колонке, последовательно заполненной силикагелем, оксидом алюминия и сульфатом натрия. Первую фракцию элюировали 20 мл гексана. В ней преимущественно содержатся алифатические углеводороды. Вторую фракцию, в которой содержатся ПАУ, элюировали 30 мл смеси гексан:дихлорметан (9:1). Упаривали под слабым током азота до 1 мл и подвергали качественному и количественному анализу на хромато-масс-спектрометре. Условия хромато-масс-спектрометрического анализа приведены в табл. 1.

Использование инжектора с программируемой температурой ввода (ПТИ) позволяет сни-

Т а б л и ц а 1
Условия хромато-масс-спектрометрического анализа 16 приоритетных ПАУ

Параметр	Характеристика
Капиллярная колонка	HP-5MS (30 м·0.25 мм·0.25 мкм)
Инжектор	ПТИ
Режим работы инжектора	С отгонкой растворителя
Объем вводимой пробы	10 мкл
Температурная программа инжектора	
Начальная температура	40 °С
Выдержка	0.5 мин
Скорость нагрева	700 °С/мин
Вторая температура	350 °С
Выдержка	2 мин
Конечная температура	300 °С
Время отгонки растворителя	0.5 мин
Скорость вентилирования	100 мл/мин
Температурная программа термостата	
Начальная температура	40 °С
Выдержка	4 мин
Скорость нагрева	20 °С/мин
Вторая температура	120 °С
Выдержка	1 мин
Скорость нагрева	7 °С/мин
Конечная температура	280 °С
Выдержка	20 мин
Условия работы масс-селективного детектора	
Температура интерфейса	285 °С
Температура источника ионов	230 °С
Тип ионизации	ЭУ, 70 эВ
Метод сбора данных	СИМ

Т а б л и ц а 2

Характеристические ионы полиаренов (m/z)

№	Соединение	Ион для обсчета	Дополнительные ионы	№	Соединение	Ион для обсчета	Дополнительные ионы
1	Нафталин	128	127; 129	9	Бенз(<i>a</i>)антрацен	228	229; 114
2	Аценафтилен	152	153; 151	10	Хризен	228	229; 114
3	Аценафтен	154	153; 152	11	Бенз(<i>b</i>)флуорантен	252	253; 126
4	Флуорен	166	165; 167	12	Бенз(<i>k</i>)флуорантен	252	253; 125
5	Фенантрен	178	176; 179	13	Бенз(<i>a</i>)пирен	252	253; 126
6	Антрацен	178	89; 179	14	Индено(1,2,3- <i>cd</i>)пирен	276	138; 227
7	Флуорантен	202	203; 101	15	Дибенз(<i>a,h</i>)антрацен	278	139; 279
8	Пирен	202	203; 101	16	Бензо(<i>g,h,i</i>)перилен	276	138; 277

зять пределы обнаружения определяемых ПАУ и, соответственно, уменьшить навески анализируемых образцов и объем Сокслет-экстрактора (объем растворителей). В предварительных опытах было установлено, что такие изменения не ухудшают метрологические характеристики методики (относительные стандартные отклонения не превышали 30—35 %).

Идентификацию ПАУ проводили по временам удерживания и характеристическим ионам определяемых соединений (табл. 2). В режиме селективной регистрации ионов (СИМ) для каждого соединения использовали 3 иона: ион для обсчета и 2 дополнительных иона для повышения надежности идентификации пика.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ. Сокслет-экстракцию широко и успешно применяют для извлечения не только ПАУ, но и полихлорированных бифенилов, хлорорганических пестицидов и др. Полнота извлечения аналитов из различных матриц (объектов анализа) в аппарате Сокслета зависит от природы используемого растворителя и времени экстракции. Эти параметры, рекомендуемые нормативно-аналитической документацией [4], установлены, как правило, эмпирически без учета гидрофобно-гидрофильного баланса аналитов в анализируемых пробах и растворителей.

Нами для экстракции ПАУ были испытаны 8 различных систем, состоящих из индивидуальных растворителей и их сме-

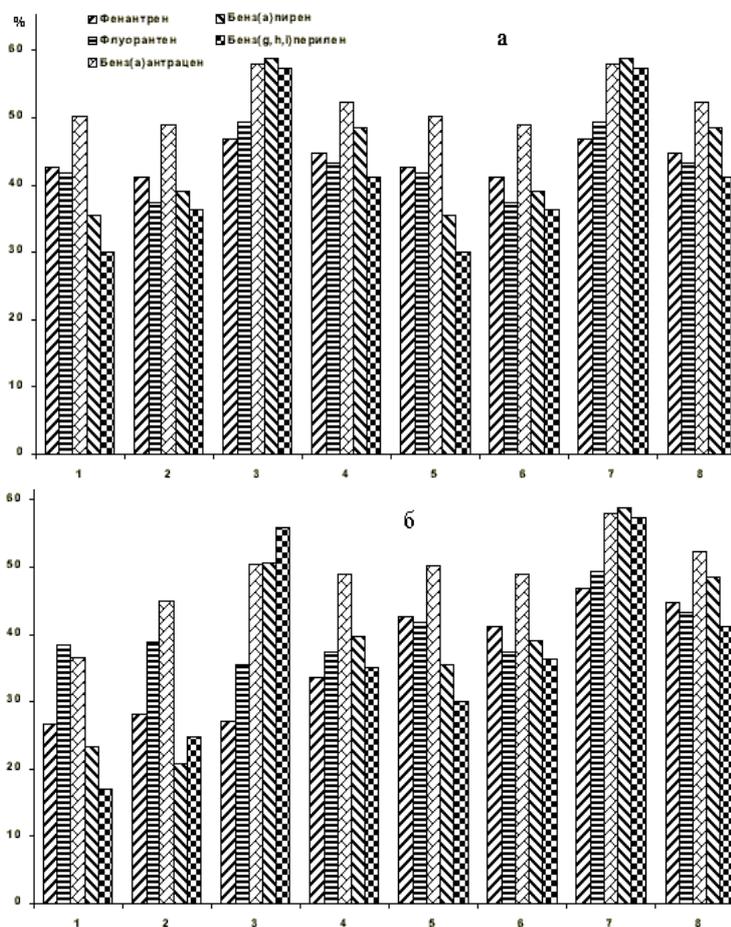


Рис. 1. Эффективность извлечения ПАУ различными растворителями и их смесями за 4 ч из стандартного образца состава гомогенатов мидий IAEA-142 (а) и водорослей IAEA-140 (б). 1 — гексан; 2 — циклогексан; 3 — толуол; 4 — дихлорметан; 5 — гексан : ацетон (3:1); 6 — циклогексан : ацетон (3:1); 7 — циклогексан : дихлорметан (1:1); 8 — дихлорметан : метанол (3:1).

сей — дихлорметан, гексан, циклогексан, толуол, гексан:ацетон (3:1), циклогексан:ацетон (3:1), дихлорметан:метанол (3:1), циклогексан:дихлорметан (1:1). На рис. 1 показаны степени извлечения 5 полиаренов, достигнутые за 4 ч экстракции из стандартного образца состава гомогената мидий IAEA-142 (а) и водорослей IAEA-140 (б) с аттестованным содержанием ПАУ.

Из приведенных данных следует, что за 4 ч экстракции не удается достичь количественного извлечения ПАУ. Лучшие результаты для гомогената мидий на уровне 30—40 % в случае “легких” ПАУ дают дихлорметан (ДХМ), циклогексан, толуол, а также смеси циклогексан:ацетон (3:1)

и ДХМ:метанол (3:1). В случае “тяжелых” ПАУ наибольшие степени извлечения достигаются при использовании смесей циклогексан : ацетон (3:1) и ДХМ:метанол (3:1). Из-за сложностей работы с толуолом (высокая температура кипения) этот растворитель в дальнейшей работе не применяли. В случае гомогената водорослей при использовании для извлечения ПАУ индивидуальных растворителей их эффективность такая же, как и в случае с гомогенатом мидий, но при применении смеси циклогексан : дихлорметан (1:1) удалось достичь 50—60 % извлечения за 4 ч.

В дальнейшем для экстракции полиаренов из гомогената мидий использовали дихлорме-

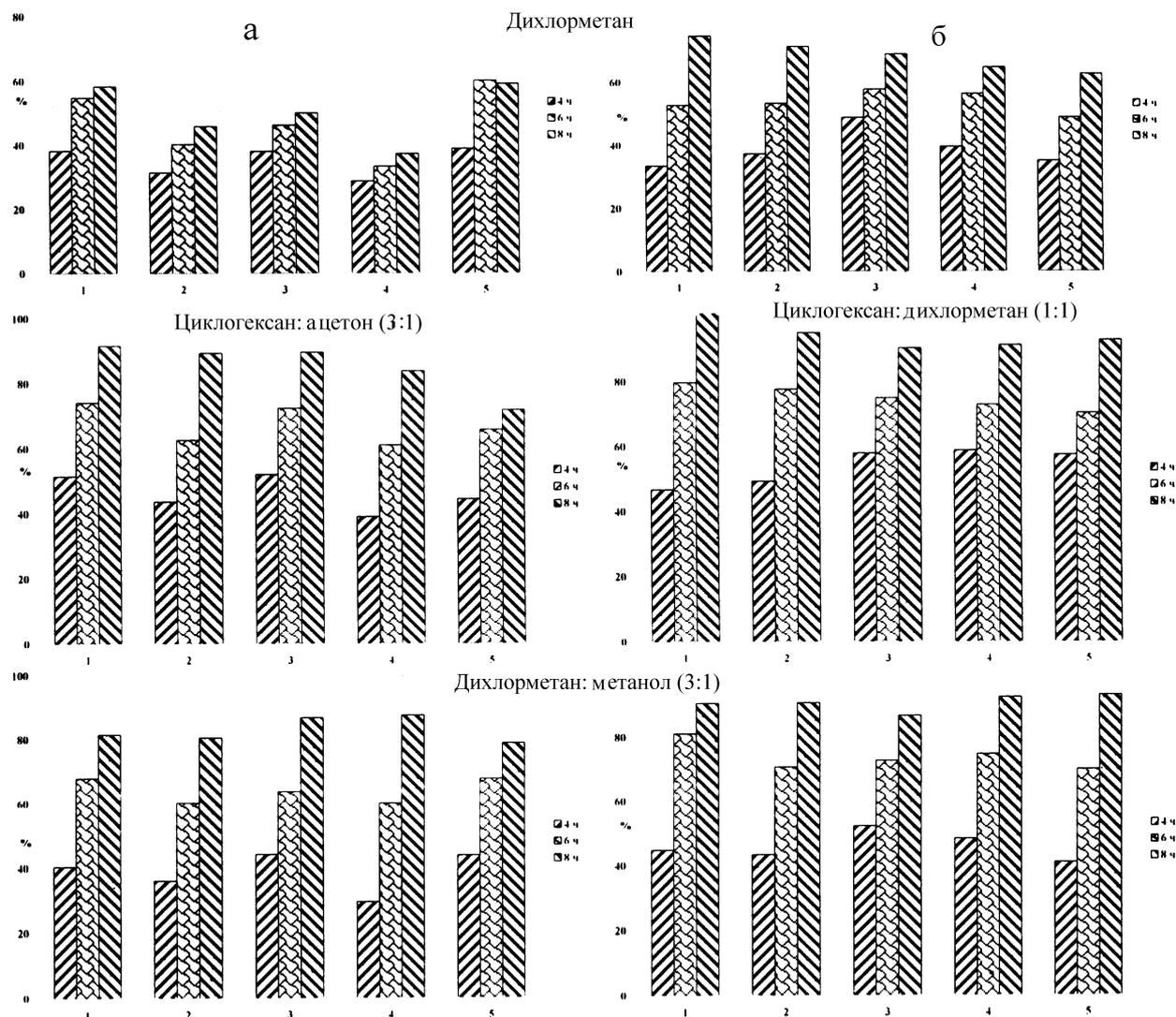


Рис. 2. Степени извлечения ПАУ за 4, 6, 8 ч растворителями и их смесями из гомогенатов мидий (а) и водорослей (б): 1 — фенантрен; 2 — флуорантен; 3 — бензо(а)антрацен; 4 — бензо(а)пирен; 5 — бензо(г, h, i)перилен.

тан, гексан:ацетон (3:1) и ДХМ:метанол (3:1), а из гомогената водорослей — дихлорметан, циклогексан: дихлорметан (1:1) и ДХМ:метанол (3:1).

На рис. 2 показаны степени извлечения 16 полиаренов из гомогенатов мидий IAEA-142 и водорослей IAEA-140 за 4, 6, 8 ч экстракции. Как видно из рис. 2, а, наивысшие степени извлечения 72—92 % за 8 ч в случае гомогената мидий получены при использовании смесей гексан:ацетон (3:1) и дихлорметан:метанол (3:1), степени извлечения составляли 79—88 %. В случае экстракции из образцов водорослей (рис. 2, б) наивысшие степени извлечения 93—101 % за 8 ч получены для смеси циклогексан:дихлорметан (1:1), а при использовании смеси дихлорметан:метанол (3:1) степени извлечения составляли 87—94 %. Лучшие степени извлечения ПАУ из образцов водорослей, по всей видимости, можно объяснить меньшим содержанием липидов в матрице.

При экстракции смесью гексан:ацетон (3:1) из гомогената мидий извлечение высших ПАУ хуже, чем из смеси дихлорметан:метанол (3:1). В случае экстракции из водорослей степени извлечения высших и низших ПАУ сопоставимы. Следует отметить, что степень извлечения бензо(*g,h,i*)перилена во всех случаях ниже степеней извлечения более “легких” ПАУ. Одним из объяснений этого факта может быть мешающее влияние коэкстрагируемых соединений, время выхода которых на масс-хроматограммах совпадает с временем выхода бензо(*g,h,i*)перилена.

Низкие степени извлечения, полученные при экстракции дихлорметаном, по сравнению со смесями с полярными растворителями, по-видимому, обусловлены тем, что гидрофобные растворители хуже проникают в частицы биоты, где сорбированы ПАУ, а добавка полярных гидрофильных растворителей облегчает этот доступ.

Обычно Сокслет-экстракцию ПАУ из биоты проводят в течение 24 ч [4]. Полученные нами результаты позволяют сделать вывод о возможности сокращения времени экстракции до 8 ч при использовании смеси гексан:ацетон (3:1) для гомогената мидий и циклогексан:дихлорметан (1:1) в случае гомогената водорослей.

Последовательность операций оптимизированной в данном исследовании методики определения ПАУ в биоте представлена на рис. 3.

Для контроля правильности результатов,

получаемых по разработанной методике определения полиаренов в биоте, которая включает оптимизированную процедуру пробоподготовки, анализировали международные стандартные

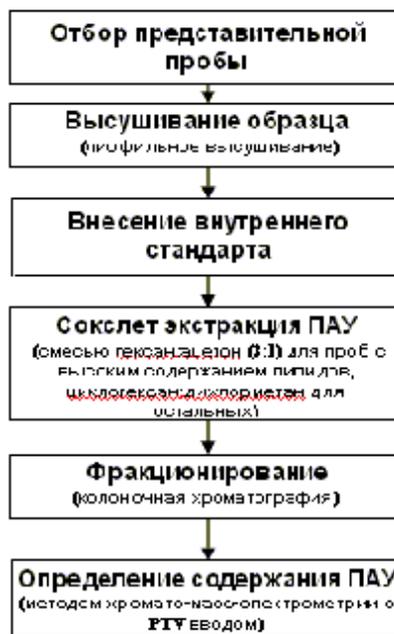


Рис. 3. Схема определения ПАУ в биоте.

Таблица 3
Результаты определения ПАУ в SRM IAEA-140 (мкг/кг)

Соединение	Аттестованное значение	Доверительный интервал	Полученное значение
Нафталин	17	9–43	22.3
Аценафтен	3.4	3.3–7	4.1
Флуорен	6.5	4.6–16	4.9
Фенантрен	76	40–113	65.7
Антрацен	14	4–93	22.9
Флуорантен	88	57–110	103.5
Пирен	67	46–79	54.6
Бенз(<i>a</i>)антрацен	25	14–32	19.5
Хризен	40	25–49	44.7
Бенз(<i>b</i>)флуорантен	36.5	33–37	36.6
Бенз(<i>k</i>)флуорантен	19	15–27	22.4
Бенз(<i>a</i>)пирен	20	16–22	17.4
Индено(1,2,3- <i>cd</i>)пирен	33	20–53	29.1
Дибенз(<i>a,h</i>)антрацен	4.5	2.6–16	6.4
Бензо(<i>g,h,i</i>)перилен	20	17–35	23.3

образцы состава гомогенатов морских водорослей SRM IAEA-140 и мидий SRM IAEA-142 с аттестованным содержанием ПАУ. Соответствующие данные приведены в табл. 3.

Все полученные нами данные укладываются в соответствующие доверительные интервалы. Это указывает на возможность применения предложенной в этой работе методики определения приоритетных полициклических ароматических углеводородов в образцах биоты.

Предложенная нами методика определения полиаренов применена для установления содержания 16 приоритетных ПАУ в мидиях, отобранных на станциях мониторинга “УкрНЦЭМ” и “Аркадия”. Полученные данные приведены на рис. 4. Как видно из рисунка, в наибольших концентрациях в мидиях на двух станциях обнаружены нафталин (от 44.5 до 66.1 мкг/кг), фенантрен (56.1 до 77.4 мкг/кг) и флуорантен (от 69.1 до 88.3 мкг/кг). Близкие значения по содержанию ПАУ в мидиях на станциях мониторинга “УкрНЦЭМ” и “Аркадия” можно объяснить их географической близостью расположения.

Согласно предложенной методике, были определены концентрации полиаренов в икре черноморского бычка и в гомогенате его мышечной ткани. Бычки выловлены в районе станции мо-

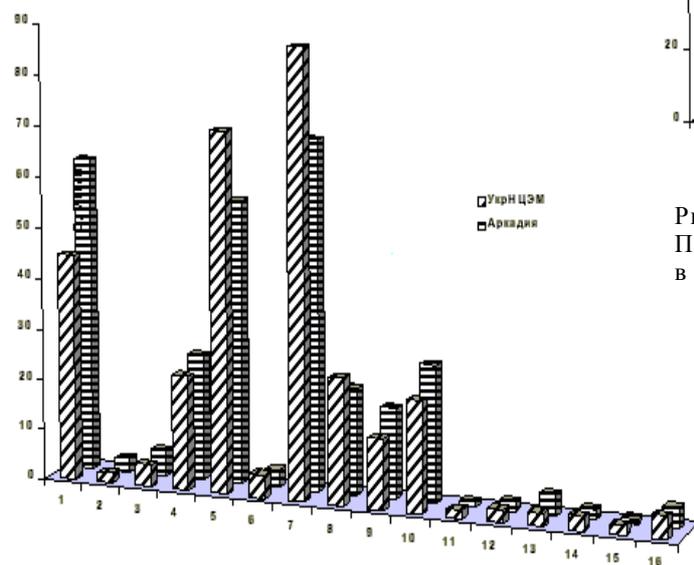


Рис. 4. Результаты определения 16 приоритетных ПАУ в мидиях, отобранных на станциях мониторинга УкрНЦЭМ и Аркадия. Здесь и на рис. 5 цифры под рисунком соответствуют номерам соединений в табл. 2.

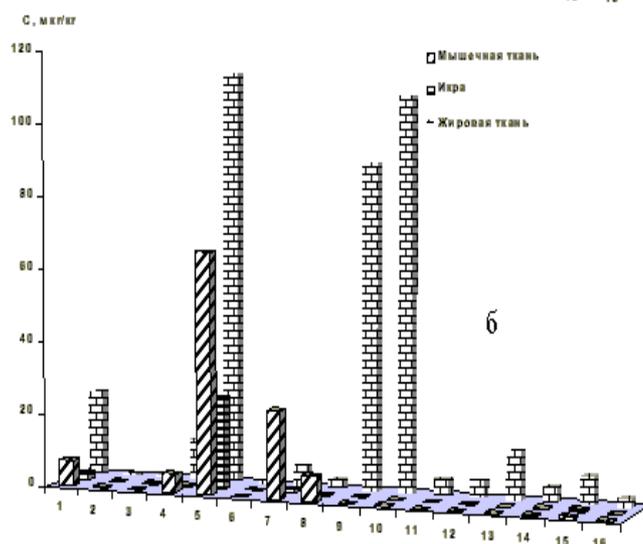
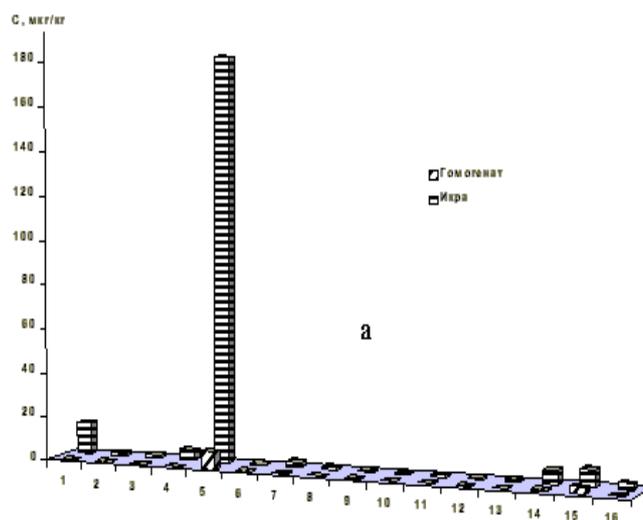


Рис. 5. Результаты определения 16 приоритетных ПАУ в гомогенате и икре черноморского бычка (а); в икре и тканях пеленгаса (б).

иторинга УкрНЦЭМ. Результаты определения представлены на рис. 5, а.

Как следует из полученных данных, концентрация ПАУ в икре бычка значительно выше, чем в гомогенате мышечной ткани. Установлено, что в икре бычка содержание фенантрена в 24 раза, а нафталина — в 140 раз выше, чем в мышечной ткани. Накопление липофильных полиаренов в икре черноморского бычка можно объяснить ее высокой жирностью. В ходе исследования состояния Хаджибейского лимана в 2011 году в районе сброса сточных вод со станции биологической очистки

были выловлены образцы рыб (пеленгаса), в икре и тканях (мышечная, жировая) которой определены 16 приоритетных полиаренов согласно разработанной нами методике. На рис. 5, б представлены соответствующие результаты определения.

Наибольшие концентрации приоритетных ПАУ (фенантрен, бенз(*a*)антрацен и хризен) выявлены в жировой ткани. Интересен тот факт, что установленные концентрации большинства ПАУ в икре были меньше, чем в жировой ткани. В мышечной ткани концентрации ПАУ самые низкие. Данные для большинства ПАУ позволяют представить следующую схему накопления полиаренов в органах рыб: жировая ткань > икра > мышечная ткань. Полученные нами результаты удовлетворительно согласуются с литературными данными о концентрациях и распределении (преимущественном накоплении) ПАУ в рыбах [8, 9].

ВЫВОДЫ. Использование в качестве экстрагента полиаренов смесей органических растворителей позволило в 3 раза сократить время, необходимое для 80—95 %-го извлечения суммы 16 приоритетных ПАУ. Необходимо отметить, что сугубо инструментальные улучшения чувствительности конечной стадии анализа (за счет ввода большого объема пробы, РТВ-инъекции, режима селективного мониторинга ионов) дает возможность уменьшить навески анализируемых образцов биоты (с 20 до 2 г), сократить объем расходуемых растворителей (с 250—400 до 100 мл).

РЕЗЮМЕ. Проведено оптимізацію процедури визначення поліциклічних ароматичних вуглеводнів у зразках біоти (риби, мідії, водорості) методом га-

зової хроматографії з мас-селективним детектуванням. Показано перевагу використання для екстракції ПАВ бінарних сумішей органічних розчинників. Оптимізована методика апробована на стандартних зразках біоти: SRM IAEA-140 та 142.

SUMMARY. Optimization of procedure of the polycyclic aromatic hydrocarbons determining in samples of biota (fish, mussels, algae) by gas chromatography with mass selective detection was made. It was shown the advantage of organic solvents binary mixtures using for extraction of PAH. The optimized method was tested on standard samples of biota: SRM IAEA-140 and 142.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Jacob J.* // Pure Appl. Chem. -1996. -**68**, № 2. -P. 301.
2. *Harrison R.M., Smith D.J.T., Luhan L.* // Environ. Sci. Technol. -1996. -**30**, № 3. -P. 825.
3. *Филатов В.А., Худoley В.В.* // Журн. эколог. химии. -1993. -**2**, № 4. -С. 313.
4. *Wenzl T., Simon R., Kleiner J., Anklam E.* // Trend. Analyt. Chem. -2006. -**25**, № 7. -P. 716.
5. *Deutsche Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach 35 LMBG: Bestimmung von Benzo(a)pyren in (geraucherten) Fleischerzeugnissen (Screening-Verfahren) Methode I. LMBG L 07.00-26 (1983); Bestimmung von Benzo(a)pyren in (geraucherten) Fleischerzeugnissen (Screening-Verfahren) Methode II. LMBG L 07.00-27 (1983); Bestimmung von Benzo(a)pyren in (geraucherten) Fleischerzeugnissen (Screening-Verfahren) Methode II. LMBG L 07.00-40 (1989).*
6. *Цымбалюк К.К., Деньга Ю.М., Антонович В.П.* // Методы и объекты химического анализа. -2011. -**6**, № 2. -С. 110.
7. *Burgess R. M., Terletskaia A.V., Milyukin M.V. et al.* // Marine Pollution Bull. -2011. -**62(11)**. -P. 2442.
8. *Oost R., Beyer J., Vermeulen N.* // Environ. Toxicol. Pharmacol. -2003. -**13**. -P. 57.
9. *Fang J., Wu R., Zheng G. et al.* // Sci. Total Environ. -2009. -**407**. -P. 4327.

Украинский научный центр экологии моря, Одесса
Физико-химический институт им. А. В. Богатского
НАН Украины, Одесса

Поступила 22.01.2012