ГЛАВА 2

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТОЙКИХ ОРГАНИЧЕСКИХ ЗАГРЯЗНЯЮЩИХ ВЕЩЕСТВ (СОЗ) В РАЗЛИЧНЫХ КОМПОНЕНТАХ ЭКОСИСТЕМ ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО РЕГИОНА

*В.Ю. Цыганков^{1,2}, М.Д. Боярова¹, М.М. Донец¹,
А.Н. Гумовский¹, Ю.П. Гумовская¹*

Показаны методы определения стойких органических загрязняющих веществ в различных компонентах экосистем Дальневосточного региона России. Описаны методы подготовки проб биологического материала, хроматографический анализ и расчеты СОЗ.

Ключевые слова: СОЗ, методы пробоподготовки, хроматография.

¹ Школа биомедицины, Дальневосточный федеральный университет (ДВФУ), 690922, Владивосток, о. Русский, п. Аякс, 10. E-mail: tsig_90@mail.ru.

² Школа естественных наук, Дальневосточный федеральный университет (ДВФУ), 690922, Владивосток, о. Русский, п. Аякс, 10.

¹ School of Biomedicine, Far Eastern Federal University, 10 Ajax Bay, Russky Island Vladivostok, Russia, 690922. E-mail: tsig_90@mail.ru.

² School of School of Natural Sciences, Far Eastern Federal University, 10 Ajax Bay, Russky Island Vladivostok, Russia, 690922.

Для цитирования: Цыганков В.Ю., Боярова М.Д., Донец М.М., Гумовский А.Н., Гумовская Ю.П. Методы определения стойких органических загрязняющих веществ (СОЗ) в различных компонентах экосистем Дальневосточного региона // Стойкие органические загрязняющие вещества (СОЗ) в Дальневосточном регионе: моря, организмы, человек : монография / В.Ю. Цыганков, М.М. Донец, Н.К. Христофорова [и др.] ; науч. ред. В.Ю. Цыганков. – Владивосток : Изд-во Дальневост. федерал. ун-та, 2020. – С. 62–69. – <https://doi.org/10.24866/7444-4891-2/62-69>.

For citing: Tsygankov V.Yu., Boyarova M.D., Donets M.M., Gumovskiy A.N., Gumovskaya Yu.P. Methods for the persistent organic pollutants (POPs) determination in various components of the ecosystems of the Far Eastern region // Persistent organic pollutants (POPs) in the Far Eastern Region: Seas, Organisms, Human : monograph / V.Yu. Tsygankov, M.M. Donets, N.K. Khristoforova [et al.] ; ed. by V.Yu. Tsygankov. – Vladivostok : Publishing House of the Far Eastern Federal University, 2020. – P. 62–69. – <https://doi.org/10.24866/7444-4891-2/62-69>.

CHAPTER 2. METHODS FOR THE PERSISTENT ORGANIC POLLUTANTS (POPS) DETERMINATION IN VARIOUS COMPONENTS OF THE ECOSYSTEMS OF THE FAR EASTERN REGION

*V.Yu. Tsygankov^{1,2}, M.D. Boyarova¹, M.M. Donets¹,
A.N. Gumovskiy¹, Yu.P. Gumovskaya¹*

Methods for determination of persistent organic pollutants in various components of ecosystems of the Russian Far East region are shown. Methods for preparing samples of biological material, chromatographic analysis and POP calculations are described.

Key words: POPs, methods of sample preparation, chromatography.

Определение массового содержания стойких органических загрязняющих веществ (СОЗ) в биологических образцах выполняют как правило методом газовой хроматографии с детектором электронного захвата и масс-селективным детектором. В наших исследованиях мы использовали нижеприведенные методы.

2.1. Подготовка проб биологических образцов гидробионтов

Цель пробоподготовки состоит в экстракции липидов ацетоном и гексаном с последующим разрушением жировых компонентов концентрированной серной кислотой.

Замороженные пробы (– 20°C) доставлялись в лабораторию. Навеску образца ткани (10 г) гомогенизировали в микроизмельчителе тканей в течение 5 мин в смеси 20 см³ ацетона и 10 см³ гексана. После этого сосуд с гомогенатом помещали в центрифугу, центрифугировали в течение 15 мин (3000 об/мин) и переносили жидкую часть в делительную воронку объемом

250 см³. К остатку биологического материала в сосуде добавляли смесь из 20 см³ гексана и 2 см³ диэтилового эфира, гомогенизировали в течении 5 мин, центрифугировали, жидкую часть соединяли с первой порцией, остаток в сосуде промывали смесью 10 см³ гексана и 1 см³ диэтилового эфира. К объединенным экстрактам добавляли 60 см³ 0,9%-ного раствора хлорида натрия и содержимое встряхивали в течение 2–5 мин. Отделяли гексановый слой, водно-ацетоновый экстрагировали еще дважды порциями гексана по 10 см³. Гексан отгоняли на роторном испарителе и взвешивали навеску полученного жира. Далее снова заливали гексаном.

Гексановый экстракт очищали концентрированной серной кислотой до получения бесцветного слоя серной кислоты. Гексановые слои отмывали от кислоты раствором бикарбоната натрия, затем дистиллированной водой до нейтральной реакции по универсальному индикатору. Отмытый экстракт сушили, фильтруя через безводный серноокислый натрий. Очищенный гексановый экстракт упаривали на роторном испарителе. Полученный экстракт разделяли неполярными (для ПХБ) и полярными (для ХОП) растворителями на хроматографической колонке с сорбентом Florisil® [1, 3, 4, 6].

2.2. Подготовка проб биологических жидкостей человека

Кровь отбирают в пробирки Vassuete с цитратом натрия (объем 9 см³). Грудное молоко собирают в контейнеры для биологического материала, замораживают и транспортируют в лабораторию.

Навеску крови вносят сразу в колбу с ацетоном напрямую. Например, в образец крови 9 г пропорционально вносят 18 см³ ацетона, интенсивно встряхивают и добавляют 13,5 см³ гексана, помещают на шейкер на 30 мин., затем отстаивают 15 мин. Жидкую фазу гомогената декантируют через простой фильтр (Белая лента), смоченный гексаном, в делительную воронку. Содержимое воронки двукратно промывают порциями гексана по 2–3 см³. В делительную воронку вносят 50 см³ 1% раствор KCl, встряхивают и отстаивают до разделения фаз. После разделения водно-ацетоновый слой удаляют. Далее проводят отмывку концентрированной

серной кислотой и разделить на колонке с сорбентом по принципу работы с биологическими образцами гидробионтов.

Навеску мочи заливают ацетоном, встряхивают, добавляют гексан и экстрагируют на шейкере на 30 мин., переносят в делительную воронку и отстаивают 15 мин. После разделения фаз водно-ацетоновый слой удаляют. Далее проводят отмывку концентрированной серной кислотой и разделение на колонке с сорбентом по принципу работы с биологическими образцами гидробионтов.

Для подготовки проб грудного молока в делительную воронку вносят 2–5 см³ грудного молока, 1 см³ 5% оксалата калия и 5 см³ этанола. Воронку встряхивают в течение 1 мин. После этого в воронку вносят 10 см³ диэтилового эфира и встряхивают 1 мин., затем 5 см³ *n*-гексана и встряхивают 1 мин. После разделения фаз эфирный слой сливают. Оставшийся в воронке слой фильтруют через безводный сульфат натрия, смоченный в гексане и ставят на роторный испаритель до полного выпаривания гексана. После стабилизации веса липофильного экстракта колбу взвешивают для определения навески липидов. Далее снова заливают гексаном и проводят отмывку концентрированной серной кислотой и разделение на колонке с сорбентом по принципу работы с биологическими образцами гидробионтов [1, 2].

2.3. Приготовление стандартных растворов СОЗ

Для приготовления стандартных растворов ХОП и ПХБ использовались стандартные образцы (Dr. Ehrenstorfer и AccuStandard) α -ГХЦГ, β -ГХЦГ, γ -ГХЦГ, δ -ГХЦГ, *p,p'*-ДДТ, *p,p'*-ДДД, *p,p'*-ДДЕ, *o,p'*-ДДТ, *o,p'*-ДДД, *o,p'*-ДДЕ и смесь **28**, **52**, 155, **101**, 118, 143, **153**, **138**, **180***, 207 ПХБ конгенов, с установленными метрологическими характеристиками – содержание основного вещества 99,4–99,6 % с погрешностью определения 0,4 %. Для хроматографии использовались рабочие стандартные растворы ХОП и ПХБ с концентрацией 20 нг/мл, приготовленные путем разбавления стандартных растворов соответствующим объемом *n*-гексана. Также использовалась библиотека «Pesticides».

*Индикаторные ПХБ.

2.4. Хроматографический анализ и расчет содержания СОЗ

Определение содержания хлорорганических пестицидов (ХОП) и полихлорированных бифенилов в биологических образцах выполняли на газовом хроматомасс-спектрометре Shimadzu GC MS-QP 2010 Ultra с автодозатором АОС-5000 [5]. Для исследования использовали капиллярную колонку SLB-5, газ-носитель – гелий (скорость потока 1 мл/мин) Температуры инжектора и детектора составляли 250 и 150°C, соответственно. Программа нагрева – увеличение температуры до 100°C в течение 4 мин, нагрев до 310°C со скоростью 7°C/мин, и удерживание конечной температуры в течение 6 мин. 2 мкл исследуемой смеси вносились в режиме без разделения, с последующим открытием разделяющего порта через 1 минуту. Ионизация веществ в газовой фазе осуществлялась в режиме электронной ионизации. Мониторинг избранных ионов (SIM) был разработан согласно настройкам и пределам обнаружения прибора. Для каждого уровня хлорирования отслеживались два иона (M^+ и $[M+2]^+$ ионы). Для идентификации исследуемого соединения в качестве подтверждающих критериев использовались время выхода, масса и относительное содержание подтверждающего иона. Площади пиков измерялись программой GCMS Postrun Analysis.

Полученные результаты проверялись на газовом хроматографе Shimadzu GC-2010 Plus с детектором электронного захвата ECD. Капиллярная колонка Shimadzu HiCap CBP5. Температура колонки 210°C, инжектора 250°C, детектора – 280°C. Газ-носитель – аргон, давление на входе – 2 кг/см², делитель потока 1:60, скорость потока газа-носителя через колонку – 0,5 мл/мин [5, 6].

Хроматографы калибровали по стандартным растворам СОЗ (рис. 2.1). Идентификацию проводили по относительному времени удерживания. Количественное определение проводили согласно калибровочному графику, построенному на основе стандартных растворов пестицидов.

Для оценки качества использованной методики применялся метод стандартных добавок. К мышечным тканям минимум 7 (от 7 до 10) образцов биоматериала добавлялись известные количества исследуемых соединений. Пробоподготовка и исследование смешанных образцов осуществлялась по указанному выше методу.

Рис. 2.1. Типичная хроматограмма раствора стандартов стойких органических загрязняющих веществ (СОЗ)

Результаты показали, что средняя воспроизводимость концентраций аналитов варьировала от 94,6 до 103,7%, что говорит о надежности полученных данных, о воспроизводимости и эффективности аналитических методов. Пределы обнаружения рассчитывались, как 3 стандартных отклонения 7-10 проб в смешанных со стандартами образцах. Для аналитов, которые не определялись в смешанных пробах, пределы обнаружения определялись как количество аналита в образце в соответствии с минимальной концентрацией калибровочного стандарта. Для исследованных ХОП и ПХБ пределы обнаружения составили: α -ГХЦГ – 0,2–0,3, β -ГХЦГ – 0,1–0,2, γ -ГХЦГ – 0,3–0,5, *p,p'*-ДДТ – 0,6–0,7, *o,p'*-ДДТ – 0,2–0,6, *p,p'*-ДДД – 0–0,1, *o,p'*-ДДД – 0,1–0,2, *p,p'*-ДДЕ – 0,1–0,2, *o,p'*-ДДЕ – 0,1–0,4 нг/г; 28 ПХБ – 0,5–0,6, 52 ПХБ – 0,4–0,7, 155 ПХБ – 0,1–0,5, 101 ПХБ – 0,6–0,8, 118 ПХБ – 0,7–0,8, 143 ПХБ – 0,2–0,7, 153 ПХБ – 0–0,1, 138 ПХБ – 0,2–0,3, 180 ПХБ – 0,5–0,6 и 207 ПХБ – 0,7–0,8 нг/г.

Статистический анализ результатов осуществлялся с помощью программного обеспечения IBM SPSS Statistics для Mac OS и Windows. Достоверность данных оценивали с помощью двустороннего критерия Краскала-Уоллиса с уровнем значимости $p \leq 0,05$, непараметрического критерия Манна-Уитни с уровнем значимости $p \leq 0,05$, и коэффициента корреляции Спирмена. Результаты представлены в виде диапазона концентраций (min-max) и среднего значения со стандартным отклонением (Mean $\pm$ SD).

2.5. Список литературы

1. Гумовская, Ю.П. Способ подготовки пробы для газохроматографического определения хлорорганических соединений в биоматериале / Ю.П. Гумовская, А.Н. Гумовский, В.Ю. Цыганков, М.М. Донец, М.Д. Боярова. – М.: Федеральный институт промышленной собственности (ФИПС). – Патент № 2713661 RU от 06.02.2020.

2. Гумовская, Ю.П. Способ подготовки пробы для газохроматографического определения хлорорганических соединений в биоматериале / Ю.П. Гумовская, А.Н. Гумовский, В.Ю. Цыганков, М.М. Донец, М.Д. Боярова. – М.: Федеральный институт промышленной собственности (ФИПС). – Патент № 2727589 RU от 22.07.2020.

3. Клисенко, М.А. Методы определения микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах и внешней среде / М.А. Клисенко,

А.А. Калинина, К.Ф. Новикова, Г.А. Хохолькова. – М.: Колос, 1992. – Т. 1. – 566 с.

4. Цыганков, В.Ю. Способ подготовки пробы для газохроматографического определения пестицидов в биоматериале / В.Ю. Цыганков, М.Д. Боярова. – М.: Федеральный институт промышленной собственности (ФИПС). – Патент № 2543360 RU от 27.01.2015.

5. Tsygankov, V.Yu. Organochlorine pesticide accumulation in seabirds and marine mammals from the Northwest Pacific / V.Yu. Tsygankov, O.N. Lukyanova, M.D. Boyarova // Marine Pollution Bulletin. – 2018. – V. 128. – P. 208–213.

6. Tsygankov, V.Yu. Sample Preparation Method for the Determination of Organochlorine Pesticides in Aquatic Organisms by Gas Chromatography / V.Yu. Tsygankov, M.D. Boyarova // Achievements in the Life Sciences. – 2015. – V. 9. – No. 1. – P. 65–68.