

УДК 543.544.43:54.064

НОВЫЙ МЕТОД ОЧИСТКИ ЖИРОСОДЕРЖАЩИХ ЭКСТРАКТОВ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ ПОЛИБРОМДИФЕНИЛОВЫХ ЭФИРОВ

© 2019 г. А. А. Шелепчиков^{1,2,*}, В. В. Овчаренко¹, А. И. Кожушкевич¹, Е. С. Бродский², А. А. Комаров¹, К. А. Турбабина¹, А. М. Калантаенко¹

¹Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов (ВГНКИ)

123022 Россия, Москва, Звенигородское ш., 5

²Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук (ИПЭЭ РАН)
119791 Россия, Москва, Ленинский просп., 33

*E-mail: dioxin@mail.ru

Поступила в редакцию 13.11.2017 г.

После доработки 01.07.2018 г.

Принята к публикации 01.07.2018 г.

Разработан метод пробоподготовки для определения полибромированных дифениловых эфиров (ПБДЭ) (от одного до десяти атомов брома) в пробах кормов и пищевых продуктов, содержащих около 0.5 г животного жира или растительного масла, методами хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения и тандемной масс-спектрометрии. Изучена возможность использования различных реактивов для очистки экстрактов путем химических реакций и фракционирования. Показано, что физико-химические свойства ПБДЭ и полихлорированных бифенилов (ПХБ) имеют существенные различия, и для определения полного спектра ПБДЭ необходимо использовать иные методы пробоподготовки, чем в случае ПХБ. Выбранные условия очистки экстрактов на колонке, содержащей силикат калия, флорисил и импрегнированный серной кислотой силикагель, и фракционирования на активированном нейтральном оксиде алюминия обеспечивают степень извлечения ПБДЭ не менее 75%. Очистка экстрактов может быть проведена без использования галогенорганических растворителей. Описаны также практические аспекты выполнения инструментального анализа и обеспечения качества измерений.

Ключевые слова: полибромированные дифениловые эфиры, пробоподготовка, фракционирование, пищевые продукты и корма, биологические объекты, органические загрязнители.

DOI: 10.1134/S0044450219040133

Полибромированные бифениловые эфиры являются продуктами целевого промышленного синтеза и применяются для снижения горючести полимерных материалов. Производство ПБДЭ началось в 1970-х годах в Германии. Существуют три основных промышленных продукта: пента-, окта- и декабромбифениловый эфир (ДеБДЭ). Последний преимущественно используется в электронной промышленности, на его долю приходится примерно 82% мирового производства; два других препарата являются смесями конгенов, применяемыми при производстве пластиков и в мебельной промышленности [1, 2].

Всего существует 209 конгенов ПБДЭ, содержащих от одного до десяти атомов брома. Из-за громоздких названий по систематической номенклатуре в названиях ПБДЭ используют арифметические номера, совпадающие с номерами ИЮПАК для полихлорированных бифенилов с заместителями в тех же положениях ароматиче-

ских колец [3]. Например, БДЭ-99 соответствует 2,2',3',4',5-ПеБДЭ; для обозначения групп изомеров по степеням бромирования применяют общепринятые приставки, образованные из корней греческих и латинских числительных (моно-, ди-, три-, тетра- и т.д.), а также сокращенные аббревиатуры (МоБДЭ, ДиБДЭ, ТрБДЭ, ТБДЭ и т.д.).

Активное изучение загрязнения окружающей среды и биологических объектов ПБДЭ началось около 20 лет назад [4]. Результаты этих исследований послужили причиной запрета или ограничения использования ПБДЭ в США и в Евросоюзе, а в 2009 г. технические смеси пента- и октабромбифениловых эфиров были включены в расширенный список Стокгольмской конвенции о стойких органических загрязнителях; ДеБДЭ является кандидатом на включение в этот список. Общепринятые подходы к выполнению определения этих веществ не сформировались. По структуре ПБДЭ аналогичны ПХБ, и можно

предположить, что и методы их выделения будут похожи. На практике это справедливо только для среднебромированных соединений, которые являются наиболее распространенными объектами определения [5]. Реже определяют высокобрмированные конгенеры, включая ДеБДЭ, что связано с проблемой хроматографирования этих соединений. Моно- и дибромбифениловые эфиры определяют еще реже, причем авторы работ [6–8], признавая возможность их определения, отмечают проблему низких степеней извлечения или вообще не приводят их для МоБДЭ.

Данная статья посвящена разработке способа очистки жиросодержащих экстрактов, позволяющего определять ПБДЭ с любыми степенями бромирования, для мониторинга уровней загрязнения кормов и продуктов питания. Описаны также другие практические аспекты анализа и их взаимосвязь с процедурой пробоподготовки.

ОСОБЕННОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛИБРОМИРОВАННЫХ ДИФЕНИЛОВЫХ ЭФИРОВ

Как и большинство методов следового органического анализа, определение ПБДЭ в различных объектах состоит из трех основных этапов — экстракции, очистки (отделения целевых соединений от других экстрагируемых компонентов матрицы) и инструментального анализа. Экстракция из проб животного происхождения липофильных органических загрязнителей, к которым относятся ПБДЭ, фактически сводится к экстракции жира, что является довольно простой задачей. Сложнее экстрагировать ПБДЭ из проб растительного происхождения, в которые они попадают из атмосферы или из почвы. В обоих случаях можно использовать методики экстракции, доказавшие свою эффективность для ПХБ или полихлорированных дибензо-*n*-диоксинов и дибензофуранов (ПХДД/Ф), так как нет никаких предпосылок считать, что метод экстракции, эффективный для ПХБ и тем более для ПХДД/Ф, окажется непригодным для ПБДЭ. В связи с этим в данной работе мы не рассматриваем стадию экстракции.

Размер навески и соответствующая процедура очистки экстрактов зависят от требований к чувствительности количественного определения и имеющегося измерительного оборудования. Уровни ПБДЭ в пробах условно можно охарактеризовать как значительно меньшие, чем уровни ПХБ, но более высокие, чем уровни ПХДД/Ф. Основным методом определения ПБДЭ является газовая хроматография—масс-спектрометрия высокого разрешения (ГХ—МС-ВР) — метод, который применяют для количественного определения ПХДД/Ф, где предъявляются высочайшие требования к чувствительности.

Благодаря высокой чувствительности и селективности ГХ—МС-ВР в ряде случаев можно анализировать очень маленькие навески проб с минимальной очисткой, например, пропуская экстракт через пипетку Пастера, заполненную силикагелем, импрегнированным серной кислотой, и/или фильтрацией пробы через активированный силикагель или флорисил. Такой подход не только экономит растворители и сорбенты, но и позволяет снизить загрязнения холостого опыта, так как ПБДЭ присутствуют практически во всех растворителях и сорбентах. В нашем случае такой прием неприменим, так как необходимо иметь возможность работать с образцами, содержащими достаточно большое количество жира.

Вследствие структурного подобия ПБДЭ и ПХБ для очистки экстрактов обычно предлагается использовать приемы, которые ранее были апробированы для ПХБ. Основным способом можно считать разрушение и сорбцию лабильных компонентов матрицы на многослойной колонке, состоящей из слоев силикагеля, импрегнированного серной кислотой и гидроксидом или силикатом калия, разделенных безводным сульфатом натрия, и фракционирование на оксиде алюминия, когда определяемые вещества элюируют смесью, содержащей несколько процентов дихлорметана (ДХМ) в гексане. Аналогичный алгоритм очистки реализован в наиболее известной системе автоматической пробоподготовки фирмы FMS Inc (Waltham, MA, USA). Однако на системе FMS Total-Prep при анализе пробы рыбной муки по методике, предложенной производителем для среднебромированных БДЭ, нами получены степени извлечения 44–77%, МоБДЭ в экстракте отсутствовал, степень извлечения ДиБДЭ не превышала 15%, а уровень загрязнения холостого образца БДЭ-47 при использовании специализированных одноразовых колонок для ПБДЭ производства FMS составил около 20 пг. С проблемой потери низкобромированных конгенов сталкивались и другие пользователи систем FMS [9, 10]. Радикальное увеличение объема растворителей и использование чистого дихлорметана вместо его смеси с гексаном не позволяет достичь для МоБДЭ степени извлечения даже 10% [11]. В методике Министерства окружающей среды канадской провинции Онтарио, использующей систему автоматической пробоподготовки FMS, предусматривается возможность определения ПБДЭ, содержащих не менее трех атомов брома [12]. Разработчики метода 1614 — официальной методики определения ПБДЭ американского Агентства по охране окружающей среды (Environmental Protection Agency, EPA), вероятно, также сталкивались с проблемой извлечения моно- и ди-БДЭ, на что указывает отсутствие критериев оценки степеней извлечения для этих соединений [13], при этом они не использовали систему

автоматической прободготовки, а построили методику по аналогии с методом 1668 для определения ПХБ [14].

Отдельной проблемой при определении ПБДЭ является возможность их хроматографического разделения: кроме отсутствия колонок, позволяющих разделить все существующие изомеры [15, 16], эти вещества обладают низкой летучестью при недостаточной термостабильности. Полибромированные дифениловые эфиры, содержащие до 5–6 атомов брома, можно определять методом ГХ–МС с обычными для ПХДД/Ф- или ПХБ-анализа колонками типа DB-5ms (5% 1,4-бис(диметилсилокси)фенилендиметилполисилоксан) или NT-8 (8% фенилполикарбонат силоксан) длиной 25–30 м с толщиной слоя неподвижной фазы 0.22–0.25 мкм, но для более тяжелых конгенов наблюдается резкий спад чувствительности вплоть до полного исчезновения хроматографических пиков. Имеются сведения [15] об определении БДЭ-209 на длинных колонках с различными неподвижными фазами, однако необходимо принимать во внимание количество вещества, вводимое в прибор. По нашему опыту, проблема хроматографирования БДЭ-209 напоминает ситуацию с ДДТ, когда термодеструкции подвержено некоторое постоянное количество вещества, т.е. чем больше вещества введено, тем меньше относительная величина потери. Для того, чтобы иметь возможность гарантированно определять субнаграммовые количества высокобромированных ПБДЭ, целесообразно использовать специальную хроматографическую колонку J&W DB-5ht длиной 10–15 м с более тонким слоем (0.1 мкм) инертной неподвижной фазы (95% метил, 4% фенил, 1% винилсиликон). На такой колонке можно регистрировать ПБДЭ со всеми степенями бромирования, но качество разделения изомеров будет довольно низким, и возможно сильное искажение пиков в начальной части хроматограммы. При этом недостаточная очистка экстрактов обычно не сказывается на высокобромированных соединениях. Для получения надежных количественных результатов следует использовать не менее двух разных хроматографических колонок.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Литературные данные и наш опыт показывают, что потери низкобромированных дифениловых эфиров имеют место при фракционировании на активированном оксиде алюминия и могут отсутствовать в упрощенных методиках, например, при удалении основного количества жира вымораживанием и доочистке на многослойной колонке [7] или при использовании гель-хроматографии [17]. К сожалению, эти и другие известные нам варианты очистки экстрактов без фракционирования сложно рассматривать как

универсальные приемы для рутинного определения следов ПБДЭ в жиросодержащих матрицах.

Имеются данные [18] о низких, но не нулевых степенях извлечения моно- и ДиБДЭ, полученные с использованием для очистки экстрактов почв картриджи с оксидом алюминия или с добавлением его в патрон для ускоренной жидкостной экстракции, однако информации о марке картриджа или типе оксида алюминия не приведено. В методике определения ПБДЭ со всеми степенями бромирования в молоке [19] также отсутствуют данные об использованных картриджах.

Невозможность количественно элюировать МоБДЭ с активированного щелочного оксида алюминия дихлорметаном и толуолом дала основание предположить, что происходит дебромирование или иное химическое превращение определяемых веществ, т.е. нарушается базовый принцип методик количественного анализа – отсутствие химических реакций (кроме целевой дериватизации) между определяемыми веществами и применяемыми реагентами. Мы решили не пытаться адаптировать имеющиеся методики анализа для определения полного спектра ПБДЭ, а создать новую методику, для чего необходимо было изучить возможность применения различных сорбентов и приемов.

Исследуемые объекты. Эффективность разрабатываемой методики проверяли на трех видах проб: свином жире, рыбьем жире и подсолнечном масле – представителях трех основных жиросодержащих матриц: животной, рыбной и растительной. Значение предельно допустимых концентраций или иные нормативы содержания ПБДЭ в кормах и пищевых продуктах отсутствуют, в директиве Евросоюза о мониторинге этих соединений в пищевых продуктах указан предел определения на уровне не ниже 10 пг/г сырого веса [20]. Исходя из того, что для определения ПБДЭ и ПХДД/ПХДФ используют одни и те же приборы, а при рутинном определении последних навески содержат не более 3–5 г жира, можно считать, что 0.5 г жира должно быть достаточно для оценки содержания ПБДЭ.

Аппаратура. На предварительной стадии исследований использовали тройной квадруполь Thermo TSQ8000 Evo в режиме МС/МС с газовым хроматографом Trace 1310GC, оснащенным колонкой Thermo TR-5MS длиной 30 м, диаметром 0.25 мм, толщиной слоя неподвижной фазы 0.25 мкм. Пробу объемом 1.5 мкл вводили в режиме без деления потока при температуре инжектора 290°C, начало продувки инжектора через 1.5 мин. Начальная температура термостата хроматографа 140°C, выдержка при этой температуре 2 мин, далее нагрев до 220°C со скоростью 10 град/мин, затем нагрев до 245°C со скоростью

Таблица 1. Условия хроматографического разделения

Параметр	Колонка		
	J&W DB-5ht	SGE BPX-5	SGE HT-8
Начальная температура, выдержка	170°C, 1.5 мин	160°C, 2 мин	135°C, 2 мин
Нагрев, скорость	До 240°C, 20 град/мин до 270°C, 15 град/мин до 295°C, 10 град/мин	До 220°C, 8 град/мин до 295°C, 6 град/мин	До 170°C, 15 град/мин до 270°C, 3 град/мин до 295°C, 5 град/мин
Выдержка при конечной температуре	13.5 мин	20 мин	5.2 мин
Температура инжектора	290°C	285°C	275°C
Режим ввода пробы	1 мкл, без деления потока, 1.5 мин	1 мкл, без деления потока, 1.9 мин	1 мкл, без деления потока, 1 мин
Расход газа-носителя (гелий)	1.3 мл/мин, постоянный поток	0.8 мл/мин, постоянный поток	0.8 мл/мин, постоянный поток

5 град/мин и до 290°C со скоростью 10 град/мин, выдержка при этой температуре до окончания элюирования. В этих условиях возможно определение от МоБДЭ до ГкБДЭ иногда ГпБДЭ. Использование техники МС/МС в ряде случаев позволяет получать более удобные для интерпретации масс-хроматограммы, особенно в случае ДиБДЭ, точные массы и времена удерживания которых близки к ПexБ, однако погрешность определения степеней извлечения изотопномеченных стандартов выше, что более подробно описано ниже.

Регистрировали остальные ПБДЭ, а также выполняли подтверждающее определение низкобромированных конгенов на хромато-масс-спектрометре высокого разрешения Waters AutoSpec Premier на колонках J&W DB-5ht (длина 10 м, внутренний диаметр 0.25 мм, толщина слоя неподвижной фазы 0.1 мкм), SGE BPX-5 (длина 25 м, внутренний диаметр 0.22 мм, толщина слоя неподвижной фазы 0.25 мкм) и SGE HT-8 (длина 25 м, внутренний диаметр 0.25 мм, толщина слоя неподвижной фазы 0.25 мкм), соединенных с масс-спектрометром через капилляр длиной 2.5 м, внутренним диаметром 0.15 мкм. Температурные режимы приведены в табл. 1.

Для каждого изотопномеченного и нативного ПБДЭ регистрировали два изотопных характеристических иона, проверяли правильность изотопного соотношения и рассчитывали среднее значение ионного тока изотопного кластера, которое затем использовали для количественных расчетов и определения степени извлечения.

Экстракцию проводили на установках для ускоренной жидкостной экстракции Dionex ASE 200 и Thermo ASE 350 с картриджами на 33 и 100 мл.

Для химической очистки и фракционирования проб использовали стеклянные колонки длиной 200 мм и внутренним диаметром 14 мм, а также длиной 150 мм и внутренним диаметром 10 мм, имеющие сужение с одной стороны и шлифовое соединение 14/23 с другой для соединения с резервуаром.

Растворители и материалы. Использовали следующие сорбенты: щелочной оксид алюминия, активность по Брокману I (Sigma-Aldrich, 199443); нейтральный оксид алюминия активность по Брокману I (Sigma-Aldrich, 199974); нейтральный оксид алюминия, тип WN-6, активность Супер I (Sigma-Aldrich, A1522-500); флорисил (0.150–0.250 мм, Merck 1.12994.1001); флорисил PR (Merck 20280); силикагель 60 (0.063–0.100 мм, Merck 1.07734.9025), силикагель высокочистый (70–230 меш, Merck 7754). Способ подготовки перечисленных материалов различался в разных опытах и рассмотрен ниже; активированные сорбенты охлаждали до 80°C, переносили в герметичную тару, где хранили до использования.

Сульфат натрия (Acros organics 196640050) прокаливали в течение 16 ч при 550°C, охлаждали до 80°C, переносили в герметичную тару, где хранили до использования. Силикат калия синтезировали, добавляя при постоянном перемешивании силикагель в эквимолярный раствор гидроксида калия в метаноле, реакционную смесь оставляли на сутки в эксикаторе, затем избыток метанола декантировали, продукт высушивали и выдерживали в течение 16 ч при 250°C. Силикагель, импрегнированный серной кислотой, готовили смешиванием активированного силикагеля с конц. H₂SO₄ до образования однородной массы. При фракционировании образцов колонки с сор-

бендом кондиционировали 15–20 мл гексана перед нанесением пробы.

Смеси изотопномеченных стандартов ПБДЭ (MBDE-MXG и PBDE-ISS-G) и смесь нативных конгенов (BRF-PAR) приобретали у фирмы Wellington Laboratories.

Растворители от различных поставщиков проверяли на отсутствие мешающих компонентов. Проблема загрязнения в холостом опыте ниже.

Степени извлечения и критерии оценки качества очистки. При использовании изотопномеченных внутренних стандартов, особенно в варианте метода изотопного разбавления, величины степеней извлечения зачастую не играют важной роли, а погрешность их определения может быть весьма высокой. Так, согласно методике ЕРА при определении ПХДД/ПХДФ допустим интервал степеней извлечения от 16 до 279% [21]; в Евросоюзе для количественного определения ПХДД/ПХДФ приемлемым считается интервал 60–120% [22]. Для ПБДЭ, содержащих от трех до девяти атомов брома, согласно методу ЕРА 1614 степени извлечения ПБДЭ должны находиться в пределах от 25 до 150%, а для ДеБДЭ от 20 до 200% [13]. В настоящее время доступны несколько смесей изотопномеченных внутренних стандартов ПБДЭ, содержащих не менее одного изомера каждой степени бромирования. Для оценки степеней извлечения предлагается использовать смеси не более чем из трех ПБДЭ, содержащих четыре, шесть и девять атомов брома (в нашем случае конгены 79, 138 и 206), что из-за большой разницы в массах характеристических ионов и термодеструкции ПБДЭ неизбежно увеличивает погрешность определения степеней извлечения. В нашей работе при МС/МС-детектировании коэффициент чувствительности БДЭ-3 относительно БДЭ-79 в разные дни отличался в 1.5–2 раза, на магнитно-секторном приборе этот эффект выражен меньше, но все равно необходимо регулярно повторять ввод градуировочной смеси стандартов. Искажение результатов определения степени извлечения может возникать также из-за наложения компонентов матрицы на определяемые вещества, вызывающего локальную потерю чувствительности масс-спектрометра. Этот эффект проявляется как “проседание” значений степеней извлечения либо их резкое возрастание при наложении на пик определяемого соединения. В методе изотопного разбавления это не ведет к искажению количественных результатов (при условии отсутствия наложения на регистрируемые ионы), но при обычной реализации метода внутреннего стандарта возможны искажения результатов количественного анализа в несколько раз.

Еще один источник погрешности при определении степеней извлечения вызван термодеструк-

цией или иными потерями при хроматографировании. Наиболее сильно эта проблема выражена для ДеБДЭ; в некоторых случаях остаточные компоненты матрицы снижают этот эффект, из-за чего расчетные значения степеней извлечения могут систематически превышать 100%. Можно оценить влияние этого фактора и внести поправочные коэффициенты, сопоставив изменение величины аналитического сигнала в ряду изотопномеченных стандартов, используемых для расчета степеней извлечения для чистых смесей и исследуемых проб.

Кроме потерь ПБДЭ при очистке, в литературе упоминается [11] возможность разложения высокобромированных конгенов на свету. Также очевидно, что МоБДЭ обладает достаточно высокой летучестью и нужно уделять особое внимание концентрированию проб и их хранению.

В силу высокой неопределенности оценки степеней извлечения в пилотных экспериментах ниже мы приводим только полуколичественную оценку.

Любая методика рутинного анализа — это практически всегда компромисс между качеством очистки, себестоимостью и степенью извлечения; чем лучше сбалансированы эти параметры, тем более эффективной можно считать методику. Сами по себе высокие степени извлечения не являются важным требованием при рутинном анализе. Более важным критерием является их стабильность при работе с разными матрицами. Если не рассматривать крайний случай, когда остаточное количество компонентов матрицы в итоговом экстракте таково, что невозможно получить масс-хроматограммы, то качество очистки является достаточно субъективным параметром. Кроме чисто визуальной характеристики — отсутствия окрашивания или помутнения при концентрировании очищенного экстракта до ~10 мкл, мы использовали следующие критерии оценки качества очистки:

- отсутствие искажений хроматографических пиков по сравнению с чистыми стандартами;
- отсутствие резкой дегградации хроматографической колонки (постоянство времен удерживания);
- отсутствие зашкаливающих пиков или “горбов” на масс-хроматограммах по полному ионному току.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Химическая деструкция примесей. Оценили стабильность имеющихся изотопномеченных ПБДЭ при пропускании их через силикагель, импрегнированный серной кислотой, или силикат калия при комнатной температуре и при 85°C в установке для ускоренной жидкостной экстрак-

ции Dionex ASE 200. Использовали смеси, приготовленные из силикагеля, активированного при температуре от 130 до 180°C, с содержанием серной кислоты от 30 до 44%. Полученные результаты не показали значимых потерь при использовании силиката калия. В случае силикагеля, импрегнированного серной кислотой, можно считать стабильными ПБДЭ со степенью бромирования три и выше. Для низкбромированных конгенов получены неоднозначные результаты, свидетельствующие о деструкции по крайней мере на свежеприготовленных высокоактивных смесях.

Актуальной тенденцией в аналитической практике является использование установок для ускоренной жидкостной экстракции (УЖЭ) не только для экстракции из различных объектов, но и для очистки экстрактов или для совмещения обеих стадий [5, 23]. Повышенная температура при УЖЭ увеличивает скорость химической деструкции матрицы, но она же и сам способ экстракции практически исключают возможность эффективной сорбционной очистки. Спорным моментом также является эффективность экстракции алифатическими растворителями. В нашем случае при анализе рыбной муки с разными вариантами заполнения картриджа силикагелем, импрегнированным серной кислотой, силикатом калия и флорисилом степени извлечения варьировали от 25 до ~100% при низком качестве очистки. Этот результат можно было предсказать, так как, основываясь на опыте определения ПХБ, можно утверждать, что для подавляющего большинства биологических проб необходима как минимум двухстадийная очистка, сочетающая химическую деструкцию матрицы и фракционирование.

Фракционирование. Для очистки ПХБ и ПХДД/Ф фракционированием чаще всего рекомендуется использовать щелочную форму оксида алюминия. Мы провели опыт на колонке, содержащей 4 г сорбента (активирован при 600°C в течение 16 ч), с последовательным элюированием 20 мл гексана, 20 мл смеси гексан–ДХМ (19 : 1, по объему) и 50 мл смеси гексан–ДХМ (2 : 3, по объему). В этих условиях во вторую фракцию попадают ПХБ, кроме копланарных конгенов, которые вместе с ПХДД/ПХДФ элюируются в третью фракцию. Моно- и дибромБДЭ были потерянны, остальные ПБДЭ распределились между двумя последними фракциями, что показывает существенные различия физико-химических свойств ПХБ и ПБДЭ.

Наряду со щелочной формой оксида алюминия, для определения ПХБ, ПБДЭ и ПХДД/ПХДФ в методиках ЕРА предусматривается возможность использования кислотной формы, однако разработчики методик указывают, что она обладает меньшей активностью, обеспечивая меньшую

эффективность очистки. Примеров практического использования этого сорбента мы не обнаружили, тем не менее, проверили возможность его использования. В эксперименте с кислотной формой оксида алюминия (4 г, активирован при 130°C в течение 16 ч) при последовательном элюировании 20 мл гексана, 20 мл смеси гексан–ДХМ (19 : 1, по объему), 20 мл смеси гексан–ДХМ (3 : 1, по объему) и 20 мл смеси гексан–ДХМ (2 : 3, по объему) ПБДЭ распределились между второй и третьей фракциями без явных потерь, т.е. данный сорбент можно рассматривать как вариант дополнительной очистки проб.

Существенное различие свойств ПБДЭ и ПХБ наблюдали также при использовании флорисила PR. Этот сорбент используют при определении ПХБ и различных пестицидов в случаях, когда применение оксида алюминия невозможно или недостаточно эффективно [24, 25]. На колонке с 2 г флорисила PR (активированного при 180°C в течение 16 ч) при такой же последовательности элюирования ПХДЭ распределились по всем фракциям, в то время как ПХБ количественно элюируются гексаном или смесью с небольшим содержанием ДХМ в гексане. Хотя нет оснований считать, что происходит потеря определяемых веществ, использование флорисила PR представляется нерациональным.

Испытали обычный флорисил (активированный при 180°C в течение 16 ч и при 675°C в течение 24 ч). В обоих случаях колонки элюировали последовательно: 30 мл гексана, 25 мл смеси гексан–ДХМ (3 : 1, по объему) и 40 мл ДХМ. В первой системе стандарты распределились между первыми двумя фракциями; во второй основная часть находилась в гексановой фракции, а во фракции ДХМ имелись только следовые количества. Таким образом, этот сорбент не подходит для сорбции ПБДЭ из раствора, но может быть использован для удаления других компонентов матрицы.

Последним испытанным сорбентом стал нейтральный оксид алюминия, использование которого не предусмотрено методиками ЕРА для ПХБ или ПБДЭ, но он является эффективным при определении полициклических ароматических углеводородов. В первых экспериментах (4 г, активирован при 400°C в течение 16 ч) отсутствовал проскок ПБДЭ при промывке гексаном, а все стандарты количественно элюировались 20 мл смеси гексан–ДХМ (4 : 1, по объему), однако в дальнейшем стала наблюдаться потеря моно- и ДиБДЭ. При снижении температуры активированная до 200°C потеря не происходило, но качество очистки существенно ухудшилось. Очевидно, что потеря моно- и ДиБДЭ связана с проблемой десорбции, а не с химическими превращениями. Данная гипотеза нашла подтверждение при элю-

ировании метанолом, когда моно- и ДиБДЭ десорбировались количественно. Однако практического значения этот способ элюирования не имеет, так как метанол растворяет оксид алюминия, который осаждается из раствора при концентрировании. Последовательное элюирование колонки смесью гексан–метанол (19 : 1, по объему) и смесями гексан–ДХМ–метанол в объемных соотношениях 17 : 1 : 2, 8 : 1 : 1 и 10 : 9 : 1 (здесь и далее каждая фракция 20 мл) не позволило достичь количественного элюирования МоБДЭ. При элюировании чистым толуолом получили нулевые степени извлечения для МоБДЭ и ДиБДЭ; изопропанолом элюировались менее 50%. Количественной десорбции всех ПБДЭ удалось достичь при использовании смеси гексан–диэтиловый эфир (4 : 1, по объему). Смесью, содержащей в 2 раза меньше эфира, элюировалось не менее 70% низкобромированных ПБДЭ и количественно остальные.

Двухстадийная очистка. Фракционирование является важным инструментом тонкой очистки, но неселективная сорбция редко позволяет количественно отделить микрокомпоненты от основных компонентов матрицы. Ранее отмечено, что более эффективным является сочетание фракционирования и химической очистки. Применение силикагеля, импрегнированного серной кислотой, — стандартный прием удаления макроколичеств жира и многих других экстрагируемых компонентов матрицы при определении ПХБ и других веществ, выдерживающих такое воздействие, но осмоление или омыление органических веществ под воздействием серной кислоты приводит к “слипанию” колонки, из-за чего снижается скорость прохождения растворителя. Кроме того, продукты реакции обладают неконтролируемыми сорбционными свойствами, что затрудняет работу, ведет к потерям определяемых веществ и повышенному расходу растворителей. Мы применили другой подход — связывание основного количества жирных кислот силикатом калия и флорисилом (силикат магния). Несмотря на близкую природу этих веществ, вероятно, они по-разному связывают разные компоненты жировой матрицы. Наибольшую эффективность показала колонка, содержащая слой флорисила между двумя слоями силиката калия, разделенных слоем безводного сульфата натрия, и слой силикагеля, импрегнированного серной кислотой, в нижней части колонки для удаления остаточных компонентов матрицы. Пробы в 5 мл гексана наносили на сухую колонку, определяемые вещества элюировали 50 мл гексана. Элюат фракционировали на колонке с нейтральным оксидом алюминия. Наносить раствор на колонку с оксидом алюминия можно без концентрирования, либо упарив на ротаторном испарителе до 2–3 мл. Схема очистки и количество сорбентов и растворителей пока-

заны на рис. 1. Результаты определения ПБДЭ в пробе рыбьего жира приведены в табл. 2. Каждый очищенный экстракт по два раза анализировали на длинной и короткой хроматографических колонках. Степени извлечения всех конгенов ПБДЭ в пробах рыбьего жира составляли не менее 83%, только в холостом опыте для БДЭ-3 и БДЭ-197 получены более низкие значения. Как видно из табл. 2, результаты характеризуются очень хорошей воспроизводимостью при определении как концентраций нативных ПБДЭ, так и степеней извлечения, что демонстрирует надежность предлагаемого метода. Высокие степени извлечения дают возможность снизить расход растворителей, который составляет 110 мл; это более чем в четыре раза меньше, чем при использовании установки автоматической пробоподготовки фирмы FMS Total-Prep. Загрязнение в холостом опыте сопоставимо со значениями, полученными на установке FMS, что допустимо для умеренно загрязненных проб, но в случае малых концентраций ПБДЭ искажает результаты.

Проблема холостого опыта. В отличие от ПХДД/Ф, когда, по крайней мере для конгенов, дающих значимый вклад в суммарный эквивалент токсичности [26], можно достичь исчезающе малого уровня загрязнения холостого опыта, в случае ПБДЭ и ПХБ полностью решить проблему холостого опыта невозможно.

Источники попадания ПБДЭ и ПХБ в холостую пробу имеют общую природу, следовательно, пути решения проблемы также аналогичны. Потенциальными источниками загрязнения приходится считать все сорбенты, растворители, посуду, синтетические полимерные материалы, а также воздух в лаборатории. Вклад каждого источника различен, зависит от квалификации сорбента или растворителя и может меняться от партии к партии. Вклад в загрязнение растворителей, имеющих квалификацию “pesticide grade” или предназначенных для определения ПХДД/Ф и ПХБ, обычно очень низок, но и их расход целесообразно минимизировать и не только из экономических соображений. Также следует уделять внимание выбору и подготовке сорбентов, отказаться от контактирующих с растворителями пластиков, прокаливать стеклянную посуду. Кроме этого, необходимо обеспечивать чистоту экстракторов [27] и многообразовой стеклянной посуды, которую желательно силанизировать [28]. Все эти мероприятия даже при переносе пробоподготовки в изолированное помещение со специальной системой очистки воздуха не гарантируют полного решения проблемы холостого опыта [29].

Мы не ставили задачу достижения ультранизких пределов обнаружения и ограничились минимизацией поступления загрязнений из двух основных источников, которыми оказались сили-

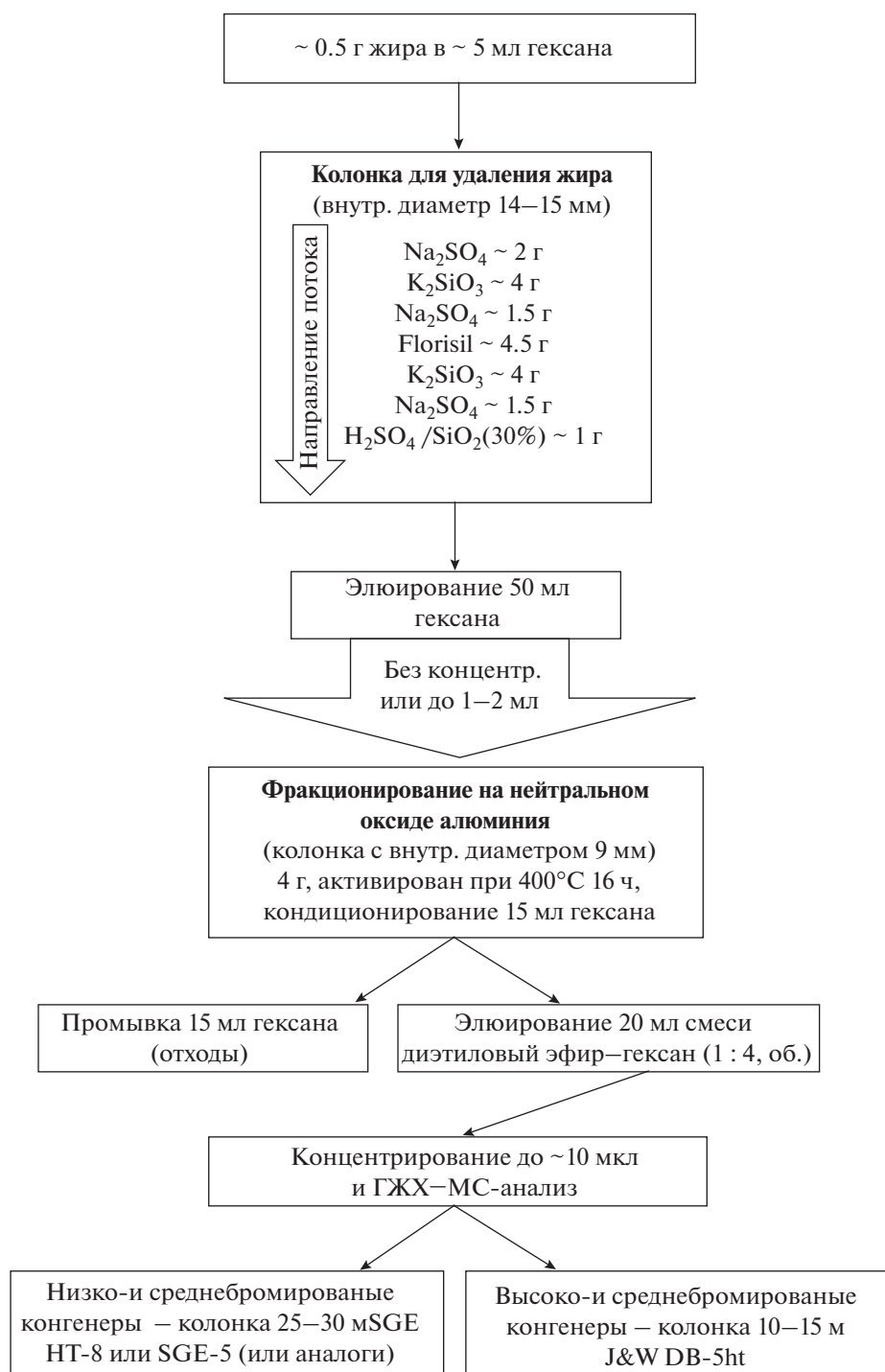


Рис. 1. Схема очистки жиросодержащих экстрактов при определении ПБДЭ со степенями бромирования от 1 до 10.

кагель и флорисил. В силу специфики физико-химических свойств силикагеля, его практически невозможно очистить от примесей, не ухудшив его сорбционные свойства, поэтому решением проблемы стала замена обычного силикагеля 60 на высокочистый аналог. Для очистки флорисила выполнили УЖЭ изопропанолом и гексаном при

180°C. В обоих случаях уровень загрязнения сократился в несколько раз, но остался выше требуемого. Лучший результат дает прокаливание флорисила в муфельной печи при 595°C в течение 12 ч, однако при этом повышается его сорбционная активность, что приводит к резкому падению степеней извлечения в холостом опыте. Добавле-

Таблица 2. Концентрации и степени извлечения (R_{ex}) полибромированных дифениловых эфиров при анализе пробы рыбьего жира

Аналит	Проба 1		Проба 2		Проба 3		s_r , %		Холостой опыт	
	c , пг/г	R_{ex} , %	c , пг/г	R_{ex} , %	c , пг/г	R_{ex} , %	c	R_{ex}	c , пг/г*	R_{ex} , %
БДЭ-3	<23	84	<25	87	<18	87		1.9	<51	65
БДЭ-15	6.1	101	5.9	92	5.1	92	9.1	5.6	2.2	87
БДЭ-28	69	108	69	102	70	100	0.8	3.8	1.8	95
БДЭ-47	569	105	572	100	574	98	1.5	3.5	42	83
БДЭ-79**	82	—	89	—	97	—	8.9	—	<1.3	
БДЭ-100	158	97	166	91	161	89	2.5	4.7	22	94
БДЭ-99	227	88	242	85	223	83	4.5	3.0	100	92
БДЭ-126	3.3	102	3.1	102	3.9	88	12.8	8.6	<1.9	86
БДЭ-154	177	97	189	98	205	96	7.7	0.9	7.3	111
БДЭ-153	56	121	54	118	53	113	2.9	3.3	4.0	112
БДЭ-138**	<2.8	—	<2.5	—	<3.1	—		—	<3.1	
БДЭ-183	6.1	115	6.1	98	7.0	93	8.8	11.5	<1.1	87
БДЭ-197	3.4	91	3.1	89	2.8	84	9.7	3.8	<2.2	74
БДЭ-207	4.8	101	4.5	96	3.8	92	9.6	4.6	4.8	105
БДЭ-206**	7.1	—	<10	—	<6.5	—	6.7	—	<2.5	
БДЭ-209	57	86	58	91	50	99	6.9	6.8	43	84

* В пересчете на навеску 0.5 г.

** Стандарты, добавляемые после пробоподготовки, для контроля степеней извлечения.

Таблица 3. Результаты определения концентраций и степеней извлечения (R_{ex}) полибромированных дифениловых эфиров в пробах жиров

Аналит	Рыбий жир		Свиной жир		Подсолнечное масло		Холостой опыт	
	c , пг/г	R_{ex} , %	c , пг/г	R_{ex} , %	c , пг/г	R_{ex} , %	c , пг/г*	R_{ex}
БДЭ-3	<22	104	<33	92	<26	100	<0.7	80
БДЭ-15	3.4	91	0.6	98	<0.8	95	<0.5	93
БДЭ-28	69	96	—	102	<1.1	90	<0.4	98
БДЭ-47	539	116	22	103	1.7	108	1.9	97
БДЭ-79*	76	—	<0.3	—	<2	—	<0.4	—
БДЭ-100	150	116	4	99	1.1	91	0.7	92
БДЭ-99	220	113	30	87	7.5	81	5.1	88
БДЭ-126	3.0	103	<0.7	89	<0.6	86	<0.3	98
БДЭ-154	186	111	2.4	98	<4.6	105	1.0	98
БДЭ-153	51	114	4.8	115	<3.9	94	0.6	98
БДЭ-138**	<1.9	—	<2.2	—	<3.3	—	<1.2	—
БДЭ-183	5.5	95	2.0	88	<1.1	79	0.8	97
БДЭ-197	2.4	88	<2.8	79	<2.4	77	<2.8	105
БДЭ-207	4.6	89	9.1	101	15.0	91	3.8	103
БДЭ-206**	3.4	—	<10	—	9.7	—	<8.3	—
БДЭ-209	26	98	64	98	166	93	<29	88

* В пересчете на навеску 0.5 г.

** Стандарты, добавляемые после пробоподготовки, для контроля степеней извлечения.

ние 5% ДХМ к гексану при элюировании колонки решило эту проблему. Как видно из результатов, полученных при анализе трех жировых матриц и холостого опыта (табл. 3), нам удалось снизить уровень загрязнения холостого опыта, снизив пределы определения, при этом степени извлечения остаются стабильно высокими.

Разработанная методика предназначена для определения ПБДЭ в пробах кормов и продуктов питания, содержащих около 0.5 жира, однако используемые в ней приемы позволяют применять метод для анализа больших навесок либо с небольшими модификациями использовать для анализа других матриц, а также для определения других веществ, например ПХБ, хлорорганических пестицидов или полициклических ароматических углеводородов (при исключении из схемы очистки силикагеля, импрегнированного серной кислотой). В предложенном методе на очистку одной пробы расходуется относительно небольшие количества сорбентов и всего 110 мл растворителей, причем процедура может быть проведена без использования галогенорганических растворителей, а стабильно высокие степени извлечения демонстрируют потенциал оптимизации себестоимости анализа в дальнейшем.

Авторы выражают благодарность Центру безопасности экосистем биофака МГУ за техническую поддержку.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *La Guardia M.J., Hale R.C., Harvey E.* Detailed polybrominated diphenyl ether (PBDE) congener composition of the widely used penta-, octa-, and deca-PBDE technical flame-retardant mixtures // *Environ. Sci. Technol.* 2006. V. 40. № 20. P. 6247.
2. U.S. department of health and human services. *Toxicological profile for polybrominated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers.* Atlanta: Public health service agency for toxic substances and disease registry, 2004. 619 p.
3. *Ballschmitter K., Zell M.* Analysis of polychlorinated biphenyls (PCB) by glass capillary gas chromatography // *Fresenius Z. Anal. Chem.* 1980. V. 302. P. 20.
4. *Boer J., Cofino W.P.* First world-wide interlaboratory study on polybrominated diphenylethers (PBDEs) // *Chemosphere.* 2002. V. 46. № 5. P. 625.
5. *Berton P., Lana N.B., Ríos J.M., García-Reyes J.F., Altamirano J.C.* State of the art of environmentally friendly sample preparation approaches for determination of PBDEs and metabolites in environmental and biological samples: A critical review // *Anal. Chim. Acta.* 2016. V. 905. P. 24.
6. *Lacorte S., Ikonomidou M.G.* Occurrence and congener specific profiles of polybrominated diphenyl ethers and their hydroxylated and methoxylated derivatives in breast milk from Catalonia // *Chemosphere.* 2009. V. 74. P. 412.
7. *Shin J., Boo H., Bang E., Gorinstein S., Seo J.* Development of a cleanup method for polybrominated diphenyl ether (PBDE) in fish by freezing-lipid filtration // *Eur. Food Res. Technol.* 2012. V. 235. P. 295.
8. *Huwe J.K., Lorentzen M., Thuresson K., Bergman A.* Analysis of mono- to deca-brominated diphenyl ethers in chickens at the part per billion level // *Chemosphere.* 2002. V. 46. № 5. P. 635.
9. *Blanco S.L., Vieites J.M.* Single-run determination of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) di- to deca-brominated in fish meal, fish oil and fish feed by isotope dilution: Application of automated sample purification and gas chromatography/ion trap tandem mass spectrometry (GC/ITMS) // *Anal. Chim. Acta.* 2010. V. 672. № 1–2. P. 137.
10. *Pirard C., De Pauw E., Focant J.-F.* New strategy for comprehensive analysis of polybrominated diphenyl ethers, polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans and polychlorinated biphenyls by gas chromatography coupled with mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* 2003. V. 998. № 1–2. P. 169.
11. *Wyrzykowska B., Tabor D., Gullett B.K.* Same-sample determination of ultratrace levels of polybromodiphenylethers, polybromodibenzo-p-dioxins/furans, and polychlorodibenzo-p-dioxins/furans from combustion flue gas // *Anal. Chem.* 2009. V. 81. № 11. P. 4334.
12. Ontario ministry of the environment and climate change. *The determination of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, dioxinlike polychlorinated biphenyls (dlPCBs), polychlorinated naphthalenes (PCNs) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in biota samples by automated sample extraction/cleanup and gas chromatography-high resolution mass spectrometry (GC-HRMS).* Method code: E3481. 2014.
13. U.S. Environmental Protection Agency. *Method 1614 brominated diphenyl ether congeners in water, soil, sediment, biosolids and tissue by HRGC/HRMS.* Washington, D.C.: Office of Water Office of Science and Technology Engineering and Analysis Division, 2010. 94 p.
14. U.S. Environmental protection agency. *Method 1668B Chlorinated biphenyl congeners in water, soil, sediment, biosolids, and tissue by HRGC/HRMS.* Washington, D.C.: Office of water office of science and technology engineering and analysis division, 2008. 133 p.
15. *Korytár P., Covaci A., Boer J., Gelbin A., Brinkman U.A.Th.* Retention-time database of 126 polybrominated diphenyl ether congeners and two Bromkal technical mixtures on seven capillary gas chromatographic columns // *J. Chromatogr. A.* 2005. V. 1065. № 2. P. 239.
16. *Wei H., Yang R., Li A., Christensen E.R., Rockn K.J.* Gas chromatographic retention of 180 polybrominated diphenyl ethers and prediction of relative retention under various operational conditions // *J. Chromatogr. A.* 2010. V. 1217. № 17. P. 2964.
17. *Eguchi A., Isobe T., Ramu K., Tue N.M., Sudaryanto A., Devanathan G., Viet P.H., Tana R.S., Takahashi S., Subramanian A., Tanabe S.* Soil contamination by brominated flame retardants in open waste dumping sites in Asian developing countries // *Chemosphere.* 2013. V. 90. № 3. P. 2365.

18. Cal A., Eljarrat E., Barcelo D. Determination of 39 polybrominated diphenyl ether congeners in sediment samples using fast selective pressurized liquid extraction and purification // *J. Chromatogr. A*. 2003. V. 1021. № 1–2. P. 165.
19. Lacorte S., Guillamon M. Validation of a pressurized solvent extraction and GC-NCI-MS method for the low level determination of 40 polybrominated diphenyl ethers in mothers' milk // *Chemosphere*. 2008. 73. 1. 70.
20. European Commission // *Official J. European Union*. 2014. L 65. 39.
21. U.S. Environmental Protection Agency. *Method 1613 tetra- through octa-chlorinated dioxins and furans by isotope dilution HRGC/HRMS*. Washington, D.C.: Office of Water Engineering and Analysis Division, 1994. 89 p.
22. European Commission. *Commission regulation (EU) No 589/2014 of 2 June 2014 laying down methods of sampling and analysis for the control of levels of dioxins, dioxin-like PCBs and non-dioxin-like PCBs in certain foodstuffs and repealing Regulation (EU) No 252/2012* // *Official J. European Union*. 2014. L 164. P. 18.
23. Wiberg K., Sporning S., Haglund P., Björklund E. Selective pressurized liquid extraction of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and dioxin-like polychlorinated biphenyls from food and feed samples // *J. Chromatogr. A*. 2008. V. 1138. № 1–2. P. 55.
24. U.S. Environmental protection agency. *Method 3620c florasil cleanup*. 1999. 28 p.
25. Шелепчиков А.А., Бродский Е.С., Жильников В.Г., Фешин Д.Б. Определение полихлорированных бифенилов и пестицидов в объектах окружающей среды и биоматериалах методом хроматомасс-спектрометрии высокого разрешения // *Масс-спектрометрия*. 2008. Т. 5. № 4. С. 245.
26. Van den Berg M., Birnbaum L.S., Denison M., De Vito M., Farland W., Feeley M., Fiedler H., Hakansson H., Hanberg A., Haws L., Rose M., Safe S., Schrenk D., Tohyama C., Tritscher A., Tuomisto J., Tysklind M., Walker N., Peterson R.E. The 2005 World Health Organization reevaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds // *Toxicol. Sci*. 2006. V. 93. № 2. P. 223.
27. Fernández-González V., Grueiro-Noche G., Concha-Graña E., Turnes-Carou M.I., Muniategui-Lorenzo S., López-Mahía P., Prada-Rodríguez D. Troubleshooting with cell blanks in PLE extraction // *Anal. Bioanal. Chem*. 2006. V. 383. № 2. P. 174.
28. Raccanelli S., Guerzoni S., Rossini P., Favotto M. Monitoring POPs (PCDD/F, PCB, HCB, PAH, DDT) in atmospheric deposition: sampling and analytical problems // *Organohalogen Comp*. 2002. V. 58. P. 49.
29. Ferrario J., Byrne C., Dupuy A.E. Background contamination by coplanar polychlorinated biphenyls (PCBs) in trace level high resolution gas chromatography/high resolution mass spectrometry (HRGC/HRMS) analytical procedures // *Chemosphere*. 1997. V. 34. № 11. P. 2451.