



CHEMICAL BULLETIN

of Kazakh National University

<http://bulletin.chemistry.kz/>



УДК 543.054.2/9:544.33

http://dx.doi.org/10.15328/chemb_2014_235-46

Е. Сайлауханулы*, Ф.Б. Амутова,
Б.Н. Кенесов, М.А. Нурсейтова

Центр физико-химических методов исследования и анализа,
Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

*E-mail: s.erbolat@mail.ru

Оптимизация стадии пробоподготовки для чувствительного определения метаболитов ДДТ в продуктах питания методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии

В связи со сложностью обнаружения следовых количеств хлорорганических пестицидов (ХОП) в продуктах питания (на уровне нг/кг), существует острая необходимость в разработке высокочувствительных и недорогих методов анализа. Данная работа посвящена разработке недорогой методики пробоподготовки для высокочувствительного определения ХОП методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Оптимизированная пробоподготовка включает экстракцию органическим растворителем, очистку пропусканием через многослойную колонку на основе модифицированного силикагеля и концентрирование до малого объема. Установлено, что объем н-гексана 100 мл является оптимальным для полного извлечения метаболитов ДДТ из колонки. На стадии очистки потери аналитов не превышают 20%, а при концентрировании – 30%. В ходе оптимизации пределы обнаружения ХОП снижены до 12 нг/кг. Пределы воспроизводимости определения ДДЭ и ДДД не превышают 25 и 27%, соответственно. Проведено обследование продуктов питания животного и растительного происхождения с г. Алматы с помощью оптимизированной методики пробоподготовки, по результатам которого ДДЭ и ДДД обнаружены в 55 из 70 отобранных образцов. Наибольшие концентрации ХОП обнаружены в образце коровьего молока (ДДЭ – 1,07 нг/г, ДДД – 2,46 нг/г) и рыбы (ДДД – 88,6 нг/кг).

Ключевые слова: оптимизация; пробоподготовка; хлорорганические пестициды; газовая хроматография; масс-спектрометрия.

Е. Сайлауханулы, Ф.Б. Амутова, Б.Н. Кенесов, М.А. Нурсейтова

Азық-түлік өнімдерінде ДДТ метаболиттерін газ хроматография – масс-спектрометрия әдісімен сезімталдығын анықтау үшін үлгіні дайындау сатысын оңтайландыру

Хлорорганикалық пестицидтердің (ХОП) азық-түлік өнімдерінде іздік мөлшерлерін (нг/кг деңгейінде) анықтаудың күрделілігіне қарай жоғары сезімтал және арзан талдау әдістерін әзірлеу қажеттілігі туындап отыр. Берілген жұмыс газды хроматография және масс-спектрометриялық детектірлеудің көмегімен ХОП жоғары сезімтал анықтауға арзан сынама дайындау әдістемесін әзірлеуге арналған. Оңтайландырылған сынама дайындау сатысы органикалық еріткішпен экстракциялаудан, модификацияланған силикагель негізінде көп сатылы колонканың көмегімен тазалаудан және аз көлемге дейін концентрлеуден тұрады. ДДТ метаболиттерін колонкадан максималды бөліп алу үшін элюенттің оңтайлы көлемі 100 мл н-гексан екені анықталды. Тазалау сатысында аналиттердің шығыны 20%, ал концентрлеу кезінде 30% аспайды. Оңтайландыру барысында ХОП анықтау шегі 12 нг/кг төмендетілді. ДДЭ мен ДДД анықтаудың қайталау шегі үшін 25 және 27%-дан аспайды. Оңтайландырылған сынама дайындау әдістемесінің көмегімен Алматы қаласында жануар және өсімдік текті азық-түлік өнімдерінің талдауы жүргізілді. Талдаудың нәтижесінде ДДЭ мен ДДД алынған 70 өнімнің 55-інде анықталды. ХОП ең көп концентрациясы сиыр сүтінде (ДДЭ 1,07 нг/г, ДДД 2,46 нг/г) және балықта анықталды (ДДД 88,6 нг/кг).

Түйін сөздер: оптимизация; сынама дайындау; хлорорганикалық пестицидтер; газды хроматография; масс-спектрометрия.

Y. Sailaukhanuly, F. Amutova, B. Kenessov, M. Nurseitova

Optimization of sample preparation for sensitive determination of ddt metabolites in food by gas chromatography – mass spectrometry

Detection of trace amounts of organochlorine pesticides in food (ng/kg) is very complex and expensive. Therefore, development of highly sensitive and inexpensive methods is of high importance. The current study is devoted to the development of inexpensive method for sample preparation and highly sensitive determination of organochlorine pesticides using gas chromatography with mass spectrometric detection. Optimized sample preparation includes extraction of analytes from samples by organic solvent, purification by passing through a multilayer column based on modified silica and concentration to a small volume. It was established that 100 mL was optimal volume of n-hexane for complete elution of analytes from the column. Analytes losses during purification stage were 20%, during concentration step - 30%. Optimization of the method allowed to decrease limit of detection of organochlorine pesticides up to 12 ng/kg. Limits of reproducibility of DDE and DDD did not exceed 25 and 27%, respectively. Screening of food samples having animal and plant origin taken in Almaty, Kazakhstan was conducted using optimized sample preparation method. Results showed that 55 out of 70 samples were contaminated by DDE and DDD. The highest concentrations were found in samples of milk (DDE 1.07 ng/g, DDD 2.46 ng/g) and fish (DDD 88.6 ng/kg).

Key words: optimization; sample preparation; organochlorine pesticides; gas chromatography; mass-spectrometry.

Введение

Благодаря стойкости пестициды, в частности ДДТ, стали одними из первых глобальных загрязнителей. Пестициды обладают высокой биологической активностью, способностью к миграции по биологическим цепям и представляют высокую опасность для здоровья населения и среды обитания. Попав в организм человека, пестициды меняют ход биологических процессов в организме, что в отдельных случаях приводит к нарушению его физиолого-биохимических функций. Непосредственный контакт с пестицидными препаратами или потребление продукции с высоким их содержанием могут стать причиной острых отравлений и даже гибели людей [1-2].

Эффективный способ снижения риска попадания в организм человека хлорорганических пестицидов (ХОП) – это регулярный контроль и мониторинг их содержания в продуктах питания и объектах окружающей среды. Благодаря стойкости и липофильности ХОП показывают значительную стабильность в окружающей среде с тенденцией к биоаккумуляции, ведущей к их наличию в продуктах питания, особенно с высоким содержанием жира [3-4].

Сложность обнаружения ХОП заключается в том, что они могут находиться в продуктах в очень низких концентрациях, на уровне нг/кг. Данные о концентрациях токсических веществ в продуктах питания, производимых и реализуемых в Казахстане, весьма немногочисленны, что обусловлено сложностью анализа, требующего применения хроматографических методов анализа и проведения интенсивной и дорогостоящей пробоподготовки [5-6]. Как правило, про-

боподготовка включает такие стадии, как экстракция, очистка и концентрирование.

Для изучения распределения, миграции и накопления хлорорганических пестицидов в пищевых продуктах необходимы экспресс-методики, позволяющие определять токсичные вещества на уровне следовых количеств. Кроме высокой чувствительности, приоритетными характеристиками являются экологичность и экономичность анализа.

В Государственный Реестр Республики Казахстан и стран СНГ внесены различные ГОСТ методики и МУК по определению ХОП в образцах продуктов питания методом газожидкостной хроматографии с электрозахватным детектированием. Основные стандартные методики представлены в таблице 1.

Методики включают экстракцию пестицидов органическим растворителем, очистку экстрактов с помощью колоночной хроматографии на основе силикагеля или Флоризила, концентрирование (упариванием) экстракта с последующим анализом методом газовой хроматографии. Методы, представленные в таблице предназначены в основном для анализа остаточных количеств пестицидов ДДТ и его метаболитов, изомеров ГХЦГ (альфа-, бета-, гамма-ГХЦГ), кельтана, альдрина и гептахлора. Имеющиеся методики являются трудоемкими и время затратными, используют большое количество дорогостоящих растворителей и материалов, что затрудняет их применение на практике, особенно для массового анализа проб.

В западных странах для определения ХОП в продуктах питания применяют стандартные методики US EPA (Агентство по охране окру-

жающей среды США), EN и ISO [11-19], также основанные на газовой хроматографии с масс-спектрометрическим или электрозахватным детектированием. Для данных методик также характерна трудоемкая и затратная пробоподготовка, включающая экстракцию, концентрирование и очистку. Для очистки экстрактов от матрицы применяют различные сорбенты, включая силикагель и Флоризил.

Как показано выше, классические методики позволяют определять ДДТ в продуктах питания на уровне до 100 нг/кг. Однако для изучения распределения, миграции и накопления метаболитов ДДТ в пищевых продуктах необходимы методики, позволяющие определять данные аналиты в концентрациях на 1-2 порядка ниже (1-10 нг/кг).

Повышение чувствительности и снижение предела обнаружения методики определения возможны следующими способами:

1) использование более чувствительного детектора (масс-спектрометр высокого разрешения либо тройной квадрупольный масс-спектрометрический детектор);

2) повышение степени концентрирования в ходе пробоподготовки.

Первый способ требует применение весьма дорогостоящего (стоимость более 300 тыс. долларов США) и сложного оборудования, что значительно повышает стоимость исследований. Кроме того, данное оборудование доступно лишь в ограниченном числе лабораторий Казахстана, что потенциально снижает вероятность конечного использования разработанной методики.

Таблица 1 – Стандартные методы подготовки образцов продуктов питания для определения ХОП

Характеристики	ГОСТ 30349-96	ГОСТ 23452-79	МУК 3151-84	МУК2142-80	МУ 1222-75
Источники	[7]	[8]	[9]	[10]	[11]
Аналиты	ДДТ и его метаболиты ДДЭ и ДДД, а,β,γ-ГХЦГ(линдан), гептахлор, кельтан, альдрин	ДДТ и его метаболиты ДДД и ДДЭ, а,β,γ-ГХЦГ(линдан), гептахлор	ДДТ и его метаболиты ДДЭ и ДДД, а,β,γ-ГХЦГ(линдан)	ДДТ и его метаболиты ДДД и ДДЭ, гептахлор, кельтан, альдрин, гексахлоран, метоксичлор, дактал, тедион, эфирсульфонат	ДДТ и его метаболиты ДДЭ и ДДД, а,β,γ-ГХЦГ(линдан)
Этапы пробоподготовки	ТЖ/ЖЖ экстракция; очистка на колонке с силикагелем АСК; упаривание досуха, растворение сухого остатка в нгексане	ЖЖ экстракция; очистка на колонке с силикагелем АСК; концентрирование упариванием до 0,1-0,2 мл	ЖЖ экстракция, очистка на колонке с флоризилом, концентрирование	ТЖ/ЖЖ экстракция; очистка на колонке с силикагелем АСК; концентрирование упариванием до 1 мл	ТЖ экстракция; первичная очистка «вымораживанием», окончательная очистка колоночной хроматографией на силикагеле АСК
Предел обнаружения, мг/кг	0,007	0,005	0,1-50	0,04-0,05	0,02-0,08
Степень извлечения, %	65-85	н/д	69-99	81-87	н/д
Метод анализа	ГХ-ЭЗД	ГХ-ЭЗД	ГХ-ЭЗД	ТХ	ТХ
Преимущества	Малозатратность, селективность	Селективность	Простота, избирательность	Селективность	Селективность
Недостатки	Потери аналитов при очистке и концентрировании; относительно низкая чувствительность	Расход реактивов; потери аналитов при очистке и концентрировании; низкая чувствительность	Трудоемкость; низкая чувствительность	Трудоемкость; большой расход реактивов	Высокая вероятность потери аналитов

Второй способ является менее затратным, однако требует экспериментальной оптимизации для решения технических проблем. Высокая степень концентрирования может быть достигнута только упариванием растворителя до ультрамалых объемов (20-50 мкл). Однако для этого необходимо эффективно очистить экстракт от жира и других малолетучих соединений, содержащихся в продуктах питания. При недостаточной эффективности очистки упарить экстракт до малого объема невозможно. Кроме того, остатки жира могут привести к загрязнению устройства для ввода проб газового хроматографа и капиллярной колонки.

Наиболее эффективным методом очистки образцов от мешающих соединений является колоночная хроматография. Для очистки образец пропускают через колонку, заполненную выбранным адсорбентом и элюируют подобранным растворителем.

Целью данной работы была оптимизация стадий очистки и концентрирования для чувствительного определения хлорорганических пестицидов в продуктах питания методом газовой хромато-масс-спектрометрии с минимальными затратами на пробоподготовку. Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- 1) разработка недорогой и эффективной колонки для очистки экстрактов от тяжелой матрицы;
- 2) установление оптимальных параметров элюирования метаболитов ДДТ;
- 3) установление степени извлечения и потеря аналитов в ходе очистки;
- 4) совершенствование методики концентрирования;
- 5) установление степени извлечения и потеря аналитов в ходе концентрирования.

Эксперимент

Разработку методики проводили на газовом хроматографе с масс-спектрометрическим детектором 6890/5973N (Agilent, США), оснащенный автосамплером Combi-PAL (CTC Analytics AG, Швейцария). Образец объемом 1,0 мкл при помощи автосамплера вводили в устройство для ввода пробы, нагретое до 250°C в режиме без деления потока. Режим продувки испарителя ГХ со скоростью потока 50 мл/мин активировали через 1 мин после ввода образца. Для разделения использовали капиллярную колонку DB-35MS

(Agilent, США) длиной 30 м, внутренним диаметром 0,25 мм и толщиной пленки 0,25 мкм. Газ-носитель (гелий марки «А») подавали в режиме постоянной скорости потока, составляющей 1,0 мл/мин (средняя линейная скорость потока 36 см/с). Температуру термостата колонки программировали от 40°C (выдержка 1 мин) до 160°C (выдержка 3 мин) со скоростью нагрева 20°C/мин с последующим нагревом до 300°C (выдержка 15 мин) со скоростью 3°C/мин. Температуры интерфейса, квадрупольного источника ионного масс-спектрометрического детектора составляли 300, 150 и 230°C, соответственно. Напряжение на электронном умножителе и другие параметры тонкой настройки МСД оптимизировали с использованием функции автонастройки, реализованной в программном обеспечении MSD ChemStation версии E.02.02 SP1 (Agilent, США). Задержка растворителя для минимализации нагрузки на филамент и электронный умножитель детектора составляла 12 мин, что достаточно для элюирования н-декана из колонки. Для наиболее чувствительного детектирования использовали режим мониторинга выбранных ионов (SIM) с m/z 235 (ДДТ, ДДД), 246 (ДДЭ). Последний метод позволяет существенно увеличить селективность метода, а выигрыш в чувствительности достигает 100 раз. Время анализа 1 пробы составило 48,33 мин. Для подтверждения отсутствия аналитов и мешающих соединений в ГХ перед анализом экспериментальных образцов анализировали холостой образец (гексан).

Оценка повторяемости и воспроизводимости

Оценка повторяемости и воспроизводимости измерений метаболитов ДДТ в образцах картофеля для всего диапазона концентраций выполнены в соответствии с РМГ 61-2003 путем статистической обработки результатов анализа образцов [19].

Диапазон исследуемых концентраций от 5 до 500 мкг/л был поделен на три поддиапазона от 5 до 50; от 50 до 100 и от 100 до 500 мкг/л. Образцы для оценивания (ОО) представляли собой экстракты картофеля (100 мл), в которые вносили определенное количество ХОП, отвечающее каждому поддиапазону, соответственно, OO^{-1} ; OO^{-2} и OO^{-3} , где: 1) OO^{-1} концентрация 5 мкг/л; 2) OO^{-2} концентрация 50 мкг/л; 3) OO^{-3} концентрация 500 мкг/л; Определение метрологических характеристик, в первую очередь,

основано на определении концентрации ДДЭ и ДДД в образцах овощей. Концентрация аналитов была рассчитана с использованием градуировочных зависимостей площадей пиков ДДЭ и ДДД от их концентрации. Тангенсы углов наклона калибровочных зависимостей для ДДД и ДДЭ составляют 0,3823 ($R^2=0,9991$) и 0,9658 ($R^2=0,9992$), соответственно.

В связи с невозможностью организации эксперимента в разных лабораториях экспериментальные данные были получены в одной лаборатории в условиях внутрилабораторной прецизионности (серии результатов единичного анализа получали в разное время, разными операторами, используя разные партии реактивов одного типа, разные наборы мерной посуды и т.д.). Результаты единичного анализа внутри каждой серии получены в условиях повторяемости.

Определение предела обнаружения метода

Предел обнаружения метода был рассчитан согласно EPA 40CFR136 protocol. Десять стандартных растворов ДДЭ и ДДД с концентрациями равными 5 мкг/л анализировали разработанной методикой, после чего рассчитанные значения стандартных отклонений умножали на коэффициент Стьюдента для 99% вероятности (2,896).

Результаты и обсуждения

Разработка недорогой и эффективной колонки для очистки экстрактов от тяжелой матрицы

При подборе состава колонки использовали принципы нормально-фазовой хроматографии, которая основана на полярной стационарной и неполярной подвижной фазах. Данный метод позволит гидрофобным неполярным анализам, к которым относятся ДДТ и его метаболиты, беспрепятственно проходить через колонку. Менее гидрофобные полярные соединения должны адсорбироваться в колонке полярной стационарной фазой.

В качестве полярных адсорбентов в аналитической практике наиболее широко применяются оксид алюминия, силикагель и Флоризил. Флоризил является наиболее эффективным, но дорогим адсорбентом. Оксид алюминия – наиболее доступный, однако наименее эффективный адсорбент. Силикагель имеет наилучшее соотношение эффективность: стоимость, поэтому он был выбран в качестве основного адсорбента для колонки.

Также неоспоримым преимуществом силикагеля является его высокая инертность и воз-

можность модификации химическими реагентами. Для эффективной очистки от наиболее гидрофобных жирных кислот силикагель модифицируют серной кислотой.

Кроме малолетучих соединений, необходимо также очищать образец от воды, которая препятствует концентрированию, а ее высокое содержание может привести к постепенному разрушению стационарной фазы капиллярной газохроматографической колонки и повреждению масс-спектрометрического детектора. Очистку органических растворителей и экстрактов проводят предварительно осушенными гигроскопичными соединениями: хлорид кальция, сульфат натрия и др. Для очистки экстрактов от воды было принято решение добавить тонкий слой сульфата натрия в колонку [20].

Колонка для очистки была заполнена в следующем порядке (рисунок 1):

- 1) стекловолно (для удержания адсорбентов в колонке);
- 2) 1 г активированного силикагеля;
- 3) 2 г силикагеля с 44% содержанием серной кислоты;
- 4) 1 г силикагеля с 22% содержанием серной кислоты;
- 5) 1 г активированного силикагеля;
- 6) 2 г безводного Na_2SO_4 .

Внутренний диаметр колонки выбирается в зависимости от желаемой эффективности разделения, скорости элюирования и массы адсорбента. В ходе предварительных экспериментов было установлено, что оптимальной является длина активной части колонки 5-10 см, что позволяет добиться оптимальной скорости элюирования в 4-6 мл/мин.

Определение оптимальных условий элюирования аналитов

Согласно теории нормально-фазовой хроматографии, для наиболее эффективного удерживания слабополярных аналитов необходимо элюирование наиболее гидрофобным растворителем (гексан, пентан, гептан). По сравнению с другими сильно гидрофобными растворителями, н-гексан имеет наименьшую стоимость, что положительным образом сказывается на общей стоимости анализа. Основное требование к растворителям, используемым для высокочувствительных анализов, – отсутствие даже незначительных следов определяемых соединений. Для элюирования ДДТ и его метаболитов

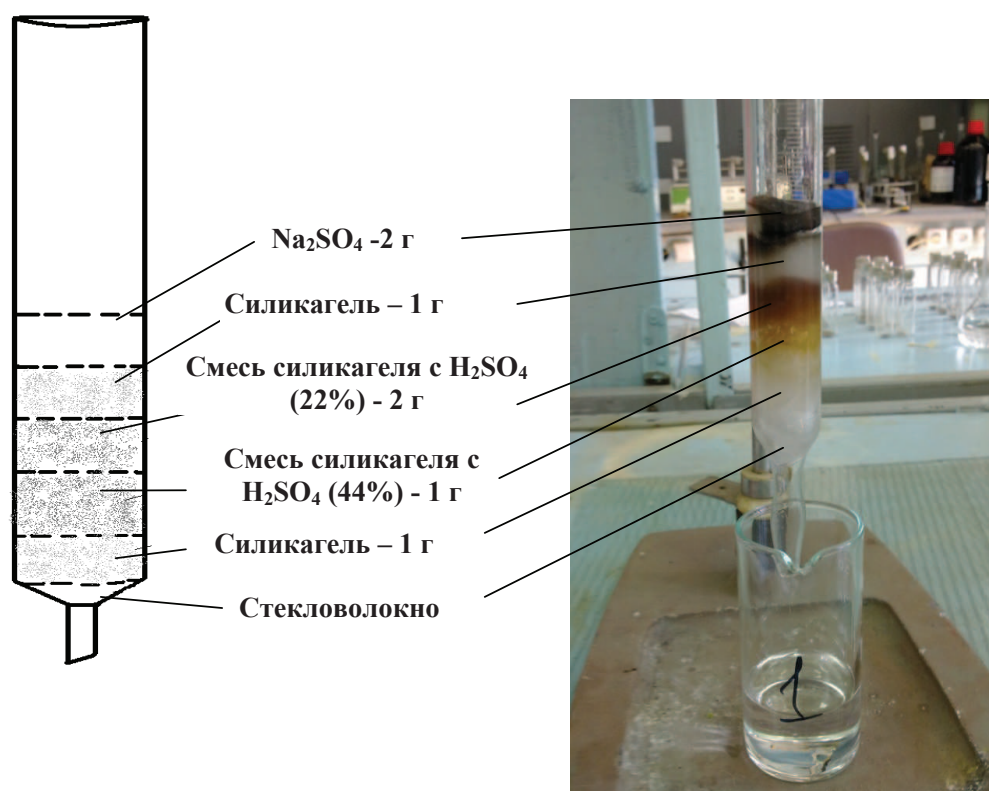


Рисунок 1 – Колонка для очистки экстрактов от жира

был выбран н-гексан, сертифицированный для анализа пестицидов (Sigma-Aldrich). Объем экстракта из продуктов питания составляет 40-50 мл. При пропускании данного объема экстракта через колонку часть анализов остается в колонке, что обусловлено мертвым объемом колонки, который соответствует объему пространства между частицами адсорбента и может достигать 50% от объема самого адсорбента.

Целью эксперимента было установить объем н-гексана, необходимый для полного элюирования ХОП из колонки для очистки.

Колонку активировали пропусканием 20 мл гексана, после чего в нее вносили рабочий раствор ДДД и ДДЭ объемом 50 мл с концентрацией 100 мкг/л. На выходе из колонки последовательно собирали фракции объемом по 10 мл каждая. Для полного элюирования анализов через колонку дополнительно пропускали 100 мл н-гексана. В результате было собрано 15 фракций по 10 мл (рисунок 3).

Из каждой фракции отбирали по 1 мл, переносили в виалы объемом 2 мл и анализировали методом ГХ-МС. Интегрирование хроматограмм проводили по ионам с m/z 246 (ДДЭ) и

235 (ДДД), далее по площадям пиков рассчитывали концентрации анализов в каждой фракции. По результатам хроматографирования строили график концентраций ДДЭ и ДДД в зависимости от объема элюата с момента ввода образца (рисунок 2).

Согласно полученной зависимости, первым элюируется ДДЭ, полностью вымываясь из колонки при объеме гексана 80 мл. По мере снижения концентрации ДДЭ в элюате, растет концентрация ДДД в нем, который полностью выходит из колонки при объеме гексана 100 мл. Задержка ДДД в колонке можно объяснить меньшей гидрофобностью ДДД ($\log K_{ow} = 6,02$) по сравнению с ДДЭ ($\log K_{ow} = 6,51$) и большим сродством первого к силикагелю.

Зная концентрации анализов во всех фракциях, была рассчитана степень извлечения и потери анализов в ходе всей пробоподготовки. Степень извлечения ДДЭ из колонки составила 86,9%, а ДДД – 54,9%. Большие потери ДДД можно объяснить накопленной систематической погрешностью хроматографического анализа 10 образцов, на основании которых рассчитывали суммарную степень извлечения.

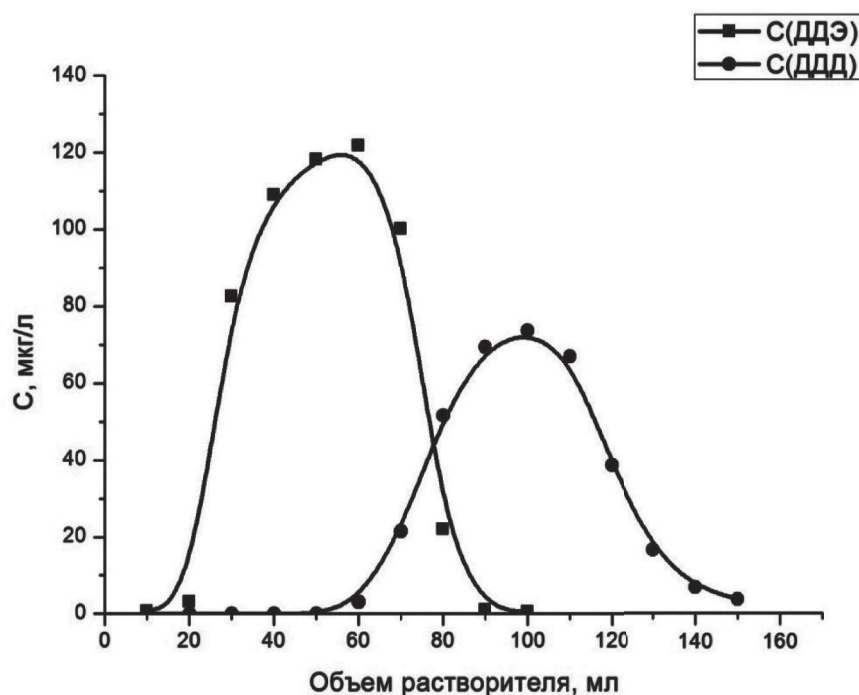


Рисунок 2 - Элюирование ДДЭ и ДДД через колонку для очистки

Целью следующего эксперимента было установить реальные значения потерь ДДД и ДДЭ в ходе очистки. Для проведения эксперимента готовили растворы, содержащие: 1) ДДЭ; 2) ДДД; 3) ДДЭ + ДДД.

Концентрация каждого ХОП в данных растворах составляла 100 мкг/л, объем каждого раствора – 50 мл. Для приготовления рабочих растворов в мерную колбу объемом 50 мл при помощи микрошприца вносили по 50 мкл соответствующего ХОП и доводили н-гексаном до метки. Для проверки воспроизводимости эксперимента каждый раствор готовили в двух параллелях. В результате было получено 6 растворов.

Перед пропуском растворов через колонку для очистки из них отбирали по 1 мл на ГХ анализ для определения истинных концентраций ДДЭ и ДДД.

Приготовленные растворы пропускали через предварительно кондиционированную колонку для очистки и собирали в колбу объемом 250 мл. Далее в колонку для очистки дополнительно вносили 100 мл н-гексана для полного элюирования аналитов. Полученные растворы также анализировали методом ГХ-МС.

В таблице 2 представлены усредненные значения концентраций и степеней извлечения.

Концентрации ХОП рассчитывали путем метода внешней калибровки. Также были определены абсолютные количества ХОП в растворах, и представлены в таблице 2 в виде масс ДДЭ и ДДД. Степени извлечения определяли согласно формуле 1:

$$\frac{x_1}{x_2} \times 100\% , \quad (1)$$

где X_1 – площадь пика или концентрация аналитов в растворе перед внесением в колонку;

X_2 – площадь пика или концентрация аналитов в растворе после очистки.

Степени извлечения ДДЭ в отдельно приготовленном растворе и в смеси с ДДД составляет около $84 \pm 0,2$ и $81 \pm 5\%$, соответственно. Для ДДД в отдельно приготовленном растворе степень извлечения составляет 87 ± 2 ; а в смеси – $74 \pm 7\%$.

Из полученных результатов видно, что потери ДДЭ и ДДД в ходе очистки составляют 15% в отдельно приготовленных растворах и 20% – в смеси. Предположительно, потери аналитов могут быть вызваны процессами их химической трансформации и испарения в процессе очистки, а также накопленной систематической ошибкой хроматографического анализа экспериментальных образцов.

Таблица 2 - Степени извлечения ДДЭ и ДДД

Аналиты	V _{исх} , мл	V _{кон} , мл	m _{исх} , мкг	m _{кон} , мкг	Степень извлечения, %
ДДЭ	50	140	5,67	4,78	84,2
ДДД	50	140	3,98	3,48	87,2
ДДЭ (смесь ДДЭ и ДДД)	50	140	5,55	4,49	80,8
ДДД (смесь ДДЭ и ДДД)	50	140	4,45	3,06	73,9

Разработка методики концентрирования

Как было отмечено выше, наиболее эффективное и простое концентрирование аналогичных образцов основано на упаривании растворителя до ультрамалых объемов, для чего необходимо очистить образец от нелетучих соединений матрицы.

Разработанная методика пробоподготовки обеспечивает необходимую степень очистки. Единственной проблемой является контроль конечного объема после концентрирования. Для решения данной проблемы существует несколько способов:

- 1) упаривание досуха и добавление желаемого объема растворителя;
- 2) внесение внутреннего стандарта.

Недостаток первого метода – возможные потери аналитов. Внесение внутреннего стандарта избавляет от необходимости контроля объема и позволяет увеличить точность определения. Однако это приводит к усложнению как самого метода анализа, так и калибровки, а также всех расчетов.

Был предложен третий способ – добавление желаемого объема малолетучего растворителя непосредственно перед концентрированием. Данный растворитель не будет испаряться в ходе концентрирования, и конечный объем будет строго постоянным.

Технически этап концентрирования было предложено разбить на 2 этапа:

- 1) концентрирование с 50 до 1 мл в стакане на плитке;
- 2) концентрирование с 1 мл до 40 мкл в токе воздуха.

Как показала апробация, данная схема позволяет быстро и эффективно проводить концентрирование очищенных экстрактов, содержащих ДДТ и его метаболиты.

Определение потерь в ходе концентрирования

Неотъемлемой частью этапа концентрирования являются потери аналитов. Их весьма тяжело избежать даже при небольшой разнице температур кипения аналитов и растворителя. Для наиболее летучего аналита, ДДТ, данная разница составляет (более 200°C). Целью данного этапа работы было установить потери ДДЭ и ДДД в ходе этапа концентрирования.

Рабочие растворы, содержащие ДДЭ и ДДД в концентрациях 5 и 1 мкг/л, объемами 50 мл и 1 мл концентрировали упариванием до 1 мл и 40 мкл, соответственно. Образцы анализировали до и после концентрирования. Начальная концентрация (5 мкг/л) была выбрана таким образом, чтобы площади пиков ХОП раствора после концентрирования попали в линейный диапазон градуировочной зависимости.

Как видно из результатов, приведенных в таблице 3, при упаривании элюата с 50 до 1 мл, потери составляют 10-22%, тогда как при концентрировании образца с 1 мл до 40 мкл, потери составляют 25-28%.

Определение предела обнаружения и метрологических характеристик методики выполнения измерений концентрации метаболитов ДДТ в овощах методом ГХ/МС

Пределы обнаружения ДДЭ и ДДД составили 12 и 22 нг/кг, соответственно.

Рассчитанные значения ошибки величин повторяемости для ДДЭ и ДДД не превышают 9,3 и 9,8%, ошибки величин воспроизводимости – 25 и 27%, соответственно в каждой пробе картофеля (таблицы 4-5) [21].

Апробация оптимизированной методики

Семьдесят образцов продуктов питания (овощи, молоко, рыба), отобранные в точках розничной торговли в городе Алматы, были про-

анализированы на содержание ХОП с использованием оптимизированной пробоподготовки и ГХ-МС. Результаты анализа продуктов питания показали наличие в 55 образцах остаточных количеств ДДТ, ДДЭ и ДДД. Наибольшие концентрации ХОП были обнаружены в образце рыбы, приобретенной в точках розничной торговли и домашнего коровьего молока. Максимальная концентрация ДДЭ (4,43 нг/г) обнаружена в образце рыбы. Максимальная концентрация ДДЭ в образце молока составила 1,07 нг/г, а ДДД – 2,46 нг/г. Наибольшие концентрации ДДД были зарегистрированы в образцах огурцов (5,2 нг/кг) и рыбы (88,6 нг/кг). Всего, 55 из 70 образцов были загрязнены ХОП. Согласно полученным хроматограммам (рисунки 3-4), эффективность отделения пиков аналитов от матрицы находится на высоком уровне.

Заключение

Таким образом, оптимизирована методика пробоподготовки для определения ДДЭ и ДДД в продуктах питания. Установлено, что 100 мл н-гексана является оптимальным объемом элюента для максимального извлечения метаболитов ДДТ из образцов пищевых продуктов; установлены степени извлечения и потери аналитов в ходе стадии очистки и концентрирования. Степени извлечения в ходе стадии очистки для ДДЭ в отдельно приготовленном растворе и в смеси с ДДД составляет около $84 \pm 0,2$ и $81 \pm 5\%$, соответственно, а для ДДД в отдельно приготовленном растворе степень извлечения составляет 87 ± 2 ; а в смеси – $74 \pm 7\%$. На стадии очистки потери аналитов составляют 15% при концентрировании экстрактов до 40 мкл - 25%. Пределы воспроизводимости определения ДДЭ и ДДД не превышают

Таблица 3 - Потери ДДД и ДДЭ в ходе концентрирования упариванием

Пестициды	$V_{исх}$, мл	$V_{кон}$, мл	$m_{исх}$, нг	$m_{кон}$, нг	Потери, %
ДДЭ	50	1	140	120	22,7
ДДД	50	1	250	230	10,6
ДДЭ	1	0,04	30	20	28,2
ДДД	1	0,04	70	50	25,8

Таблица 4 - Значения величин повторяемости, воспроизводимости и их пределов для методики определения ДДЭ в образцах картофеля

№ п/п	Среднее содержание ХОП в пробе, X_m , нг/кг	СКО, показатель повторяемости, S_{nm}	Предел повторяемости, r_{nm}		СКО, $S_{R_{nm}}$	Показатель воспроизводимости, σ_{Rm}	Предел воспроизводимости, R_m	
			нг/кг	%			нг/кг	%
1	49,5	1,6	4,3	8,7	12	4,4	12	25
2	404	13,2	33	8,1	83	11,1	83	21
3	2470	100	278	9,3	515	190	520	17

Таблица 5 - Значения величин повторяемости, воспроизводимости и их пределов для методики определения ДДД в образцах картофеля

№ п/п	Среднее содержание ХОП в пробе, X_m , нг/кг	СКО, показатель повторяемости, S_{nm}	Предел повторяемости, r_{nm}		СКО, $S_{R_{nm}}$	Показатель воспроизводимости, σ_{Rm}	Предел воспроизводимости, R_m	
			нг/кг	%			нг/кг	%
1	82,3	2,5	6,7	8,2	23	8	23	27
2	384	14	38	9,8	102	36,5	102	26
3	5624	174	482	8,6	1237	446	1237	22

25 и 27%, соответственно. Пределы обнаружения ДДЭ и ДДД снижены до 12 и 22 нг/кг, соответственно. Проведено обследование продуктов питания животного и растительного происхождения с г. Алматы с помощью оптимизированной методики пробоподготовки. Наибольшие концентрации ХОП обнаружены в образце коровьего молока и рыбы. Определены величины повторяемости, воспроизводимости и их пределов для

методики выполнения измерений концентраций ДДЭ и ДДД в продуктах питания.

Благодарности

Работа выполнена в рамках проекта «Разработка базы методических подходов к решению вопросов продовольственной безопасности на основе физико-химических и биологических исследований» (Министерство образования и науки Республики Казахстан).

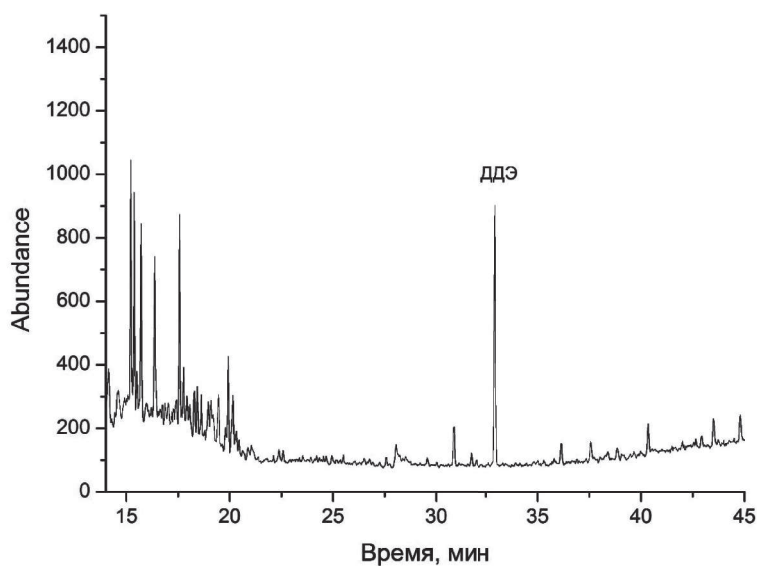


Рисунок 3 – Хроматограмма экстракта из образца рыбы (вобла, Балхаш) по 246 (ДДЭ) иону

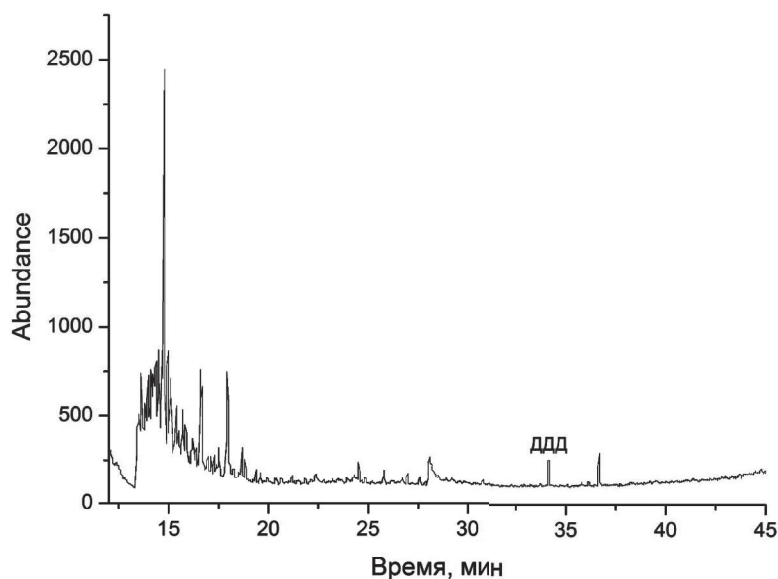


Рисунок 4 – Хроматограмма экстракта из образца рыбы (вобла, Балхаш) по 235 (ДДД) иону

Литература

- 1 Fedorov L, Yablokov A. Pesticides. The Chemicals Weapon that Kills Life. – Sofia-Moscow: Pensoft, 2004. – 137 p. ISBN 954-642-205-3.
- 2 Котелевцев С.В. Мутагенные и канцерогенные соединения в окружающей среде: возможность контроля и потенциальные опасности // Жизнь без опасностей. Здоровье. Профилактика. Долголетие. – 2009. – № 4-1. – С.62-71
- 3 Сайлауханулы Е., Кенесов Б., Батырбекова С., Хамитова К., Дзекунув В., Карлсен Л., Наурызбаев М. Решение вопросов по стойким органическим загрязнителям // Промышленность Казахстана. – 2012. – Т.2, №71. – С. 46-51.
- 4 Официальный сайт ФАО. - www.fao.org.
- 5 Апсеметова М.А., Кужукеева М.Б., Бердичева М.В. Оценка безопасности пищевых продуктов в Республике Казахстан и рекомендации по усовершенствованию контроля // Здоровье и болезнь. – 2010. – №6 (91). – С. 20-22.
- 6 Нажметдинова А.Ш. Загрязненность продуктов питания остаточными количествами пестицидов и нитратов // Здоровье и болезнь. – 2009. – № 4. – С. 138-139.
- 7 ГОСТ 30349-96. Плоды, овощи и продукты их переработки. Методы определения остаточных количеств хлорорганических пестицидов. – Введ.1996-10-04. - М.: Изд-во стандартов, 2003. – 8 с.
- 8 ГОСТ 23452-79. Молоко и молочные продукты. Методы определения остаточных количеств хлорорганических пестицидов. – Введ.1991-12-29. – М.: Изд-во стандартов, 1991.
- 9 МУК 3151-84. Методические указания по избирательному газохроматографическому определению хлорорганических пестицидов биологических средах (моче, крови, жировой ткани и грудном женском молоке). – М.: Изд-во стандартов, 1984.
- 10 МУК 2142-80. Методические указания по определению хлорорганических пестицидов в воде, продуктах питания, кормах и табачных изделиях методом хроматографии в тонком слое. – М.: Изд-во стандартов, 1984.
- 11 МУ 1222-75. Определение хлорорганических пестицидов в мясе, мясопродуктах и животных жирах хроматографией в тонком слое. – М.: Изд-во стандартов, 1984.
- 12 EN 15741:2009. Animal feeding stuffs – Determination of OC-pesticides and PCB's by GC/MS. April, 2009
- 13 EPA 8082A Method. Polychlorinated biphenyls by gas chromatography. November, 2000. – 46 p.
- 14 EPA 8080A Method. Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls by gas chromatography. September, 1994. - 46 p.
- 15 EN 1528: 1996-1. Determination of pesticides and polychlorinated biphenyls (PCBs) – Part 1: General. November, 1996.
- 16 EN 1528: 1996-2. Determination of pesticides and polychlorinated biphenyls (PCBs) – Part 2: Extraction of fat, pesticides, PCBs, and determination of fat content. November, 1996.
- 17 EN 1528-3: 1996. Determination of pesticides and polychlorinated biphenyls (PCBs) – Part 3: Clean-up methods. November, 1996.
- 18 EN 1528-4: 1996. Determination of pesticides and polychlorinated biphenyls (PCBs) – Part 4: Determination, confirmatory tests, miscellaneous.
- 19 ISO 8260:2008. Milk and milk products. Determination of organochlorine pesticides and polychlorobiphenyls. Method using capillary gas-liquid chromatography with electron- capture detection. – ISO. – 2009. – 24 p.
- 20 Beyer A., Biziuk M. Applications of sample preparation techniques in the analysis of pesticides and PCBs in food // Food Chemistry. – 2008. – Vol. 108. – P.669–680. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.11.024
- 21 ПМГ 61-2003. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки. Введен 01.01.2005. – М., 2004. – 125 с.

References

- 1 Fedorov L, Yablokov A (2004) Pesticides. The Chemicals Weapon that Kills Life. – Pensoft, Sofia-Moscow. – ISBN 954-642-205-3.
- 2 Cotelevcev SV (2009) Life without danger. Health. Prevention. Longevity [Zhizn bez opasnostey. Zdorove. Profilaktika. Dolgoletie] 4-1:62-71. (in Russian).
- 3 Sailaukhanuly E, Kenessov B, Bатырбекова S, Khamitova K, Dzekunov V, Carlsen L, Naurzybayev M (2012) Kazakhstan Industry [Promyshlennost Kazakhstana] 2:46-51
- 4 FAO official website. - www.fao.org
- 5 Apsemetova M, Kuzhukееva M, Berdichev M (2010) Health and Disease [Zdorov'e i bolezn] 6:20-22. (in Russian).
- 6 Nazhmetdinova A (2009) Health and Disease [Zdorov'e i bolezn] 4:138-139. (in Russian).
- 7 GOST 30349-96. Fruits, vegetables and derived products. Methods for the determination of residues of organochlorine pesticides. Izdatelstvo Standartov, Moscow, Russia, 2003. (in Russian)
- 8 GOST 23452-79. Milk and milk products. Methods for the determination of residues of organochlorine pesticides. Izdatelstvo Standartov, Moscow, Russia, 1991. (in Russian)
- 9 MUK 3151-84. Methodological guidelines for electrol gas chromatographic determination of organochlorine pesticides biological fluids (urine, blood, adipose tissue and breast milk). Izdatelstvo Standartov, Moscow, Russia, 1984. (in Russian)
- 10 MUK 2142-80. Methodological guidance for determining organochlorine pesticides in water, food, feed and tobacco products by thin-layer chromatography. Izdatelstvo Standartov, Moscow, Russia, 1984. (in Russian)

- 11 MU 1222-75. Determination of organochlorine pesticides in meat, meat products and animal fats in a thin layer chromatography. Izdatelstvo Standartov, Moscow, Russia, 1984 (in Russian).
- 12 EN 15741:2009. Animal feeding stuffs – Determination of OC-pesticides and PCB's by GC/MS. April, 2009
- 13 EPA 8082A Method. Polychlorinated biphenyls by gas chromatography. November, 2000. –P.46.
- 14 EPA 8080A Method. Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls by gas chromatography. September, 1994. - P.46
- 15 EN 1528: 1996-1. Determination of pesticides and polychlorinated biphenyls (PCBs) – Part 1: General. November, 1996.
- 16 EN 1528: 1996-2. Determination of pesticides and polychlorinated biphenyls (PCBs) – Part 2: Extraction of fat, pesticides, PCBs, and determination of fat content. November, 1996.
- 17 EN 1528-3: 1996. Determination of pesticides and polychlorinated biphenyls (PCBs) – Part 3: Clean-up methods. November, 1996.
- 18 EN 1528-4: 1996. Determination of pesticides and polychlorinated biphenyls (PCBs) – Part 4: Determination, confirmatory tests, miscellaneous.
- 19 ISO 8260:2008. Milk and milk products. Determination of organochlorine pesticides and polychlorobiphenyls. Method using capillary gas-liquid chromatography with electron- capture detection.
- 20 Beyer A, Biziuk M (2008) Food Chem 108:669–680.
- 21 RMG 61-2003. Measures of accuracy, correctness, precision methods of quantitative chemical analysis. Methods of Evaluation. Izdatelstvo Standartov, Moscow, Russia, 2004.