

На правах рукописи



Крапивкин Борис Анатольевич

**РАЗРАБОТКА ДВУХУРОВНЕВОЙ СИСТЕМЫ КОНТРОЛЯ
ПОЛИХЛОРИРОВАННЫХ БИФЕНИЛОВ
В КОРМАХ И ПИЩЕВОМ СЫРЬЕ**

16 00 06 - ветеринарная санитария, экология, зоогигиена и
ветеринарно-санитарная экспертиза

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Москва – 2007

Работа выполнена в отделе безопасности кормов и пищевых продуктов Федерального государственного учреждения «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГУ «ВГНКИ»)

Научный руководитель: доктор биологических наук
Комаров Александр Анатольевич

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, профессор,
Заслуженный деятель науки РФ
Талапов Герман Александрович
ГНУ ВНИИВСГЭ Россельхозакадемии
доктор ветеринарных наук, профессор
Андрианова Татьяна Геннадьевна
Московский государственный университет
прикладной биотехнологии

Ведущая организация: **Московская государственная академия
ветеринарной медицины и биотехнологии
имени К.И. Скрябина**

Защита диссертации состоится « 23 » мая 2007 г в 12 часов на заседании диссертационного совета Д 006 008 01 при Государственном научном учреждении Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии, гигиены и экологии Российской академии сельскохозяйственных наук по адресу 123022, г Москва, Звенигородское шоссе, д 5, ГНУ ВНИИВСГЭ

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Всероссийского научно-исследовательского института ветеринарной санитарии, гигиены и экологии

Автореферат разослан «10» апреля 2007 г

Ученый секретарь
диссертационного совета



Е С Майстренко

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Полихлорированные бифенилы (ПХБ) принадлежат к группе хлорированных углеводородов ПХБ производились промышленностью в больших количествах начиная с 1929 г Благодаря их физико-химическим свойствам, таким как негорючесть, химическая стабильность, высокая температура кипения, низкая теплопроводность и высокие диэлектрические постоянные, технические смеси ПХБ широко использовались в ряде промышленных производств в трансформаторах, конденсаторах, тепловых и гидравлических системах, красителях, клеях, пластиках и т д Термическая, химическая стабильность и способность ПХБ биоаккумулироваться в пищевых цепях, сделали их опасными контаминантами окружающей среды (Ошин Л А и др , 1978, Ivanov V and Sandell E , 1992, Смирнов А М , Таланов Г А , 1994, 2000, SCAN, 2000, Комаров А А , 2003, CICAD 55, 2003)

Практически все страны запретили производство ПХБ в 70-е годы из-за их высокой токсичности и стойкости в окружающей среде, однако большие количества этих веществ все еще используются в электротехническом оборудовании, на предприятиях машиностроения, химической, легкой, нефтегазовой промышленности (ATSDR, 2000, SCAN, 2000, CICAD 55, 2003, Gallani B and Voix A , 2004)

Сейчас, когда производство ПХБ запрещено, загрязнение окружающей среды происходит за счет их испарения и утечки из промышленного оборудования, а также в ходе неправильной его утилизации По оценкам экспертов, около 35% общего объема произведенных ПХБ все еще присутствует в окружающей среде (Ruth E et al , 1998, Руднева В Я , 2003, Международный проект по ликвидации СОЗ, 2006)

До последнего времени, при определении допустимого содержания ПХБ в кормах и пищевых продуктах, учитывалось содержание только «маркерных» конгенов, которые являются доминирующими контаминантами Однако токсичность данных конгенов относительно низка, а данных по содержанию наиболее опасных «диоксиноподобных» конгенов ПХБ, которые по своим токсикологическим свойствам намного важнее, до сих пор недостаточно (Комаров А А , 2003, Майстренко В Н , Клюев Н А , 2004)

Диоксиноподобные ПХБ относятся к группе стойких экотоксикантов, обладающих канцерогенным, тератогенным, эмбриотоксическим, мутагенным действием и способных наносить вред человеку, сельскохозяйственным, диким животным и окружающей среде даже в очень низких концентрациях (Ahlborg U G et al , 1992, Попова А Ю , 2000, Руднева В Я , 2001, Жуленко В Н и др , 2002, Hahn M , 2004, Colborn T , 2004, Kimura-Kuroda J et al , 2005)

Негативное воздействие ПХБ на здоровье человека сделало актуальным проведение мониторинга контаминации кормов и пищевого сырья этими соединениями

Для обеспечения выполнения работ по мониторингу необходимо создание чувствительных и специфичных методов контроля В соответствии с международными правилами, контроль опасных контаминантов должен осуществляться в рамках двухуровневой системы, включающей скрининговые и арбитражные (подтверждающие) методы анализа (Commission Decision 2002/657/EC, 2002)

Наиболее перспективным является использование ГЖХ-ЭЗД для скринингового определения индивидуальных конгенов ПХБ, поскольку она обладает высокой чувствительностью, простотой проведения анализа и низкой стоимостью Для арбитражных исследований перспективным является использование ГЖХ-МС-МС, так как этот метод обладает высокой чувствительностью и селективностью определения ПХБ

Цель и задачи исследований. Целью работы являлась разработка двухуровневой системы контроля маркерных и диоксиноподобных ПХБ в кормах и пищевом сырье, включающей скрининговое определение этих ксенобиотиков методом ГЖХ-ЭЗД и арбитражный анализ положительных образцов методом ГЖХ-МС-МС

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи

- Разработать эффективные способы экстракции, очистки и фракционирования ПХБ из образцов кормов и пищевого сырья,
- Оптимизировать условия хроматографического определения маркерных и диоксиноподобных ПХБ с использованием детектора электронного захвата и масс-спектрометрического детектора типа «ионная ловушка»,

- Разработать методики скринингового и арбитражного определения ПХБ в кормах и пищевом сырье и провести их метрологическую аттестацию,
- Оценить правильность разработанных методов путем испытания международных стандартных образцов с аттестованным содержанием ПХБ,
- Провести мониторинговые исследования образцов рыбной муки и рыбы для оценки степени их загрязненности ПХБ

Научная новизна. Разработаны оригинальные условия подготовки проб методом ускоренной экстракции растворителями (УЭР) (экстрагент – н-гексан, температура экстракции 80°C, два цикла экстракции по 5 мин, микроволновая сушка и гомогенизация пробы с сернокислым натрием, многослойное заполнение экстракционной ячейки силикагелем и силикагелем, импрегнированным серной кислотой), позволяющие повысить эффективность извлечения маркерных и диоксиноподобных ПХБ из пищевого сырья и кормов, значительно сократить время экстракции, объемы экстрагентов и одновременно проводить очистку экстрактов

Впервые арбитражное определение маркерных и диоксиноподобных ПХБ в кормах и пищевом сырье реализовано на хромато-масс-спектрометре с масс анализатором типа «ионная ловушка» в резонансном режиме тандемной масс-спектрометрии (МС-МС) и регистрации положительных ионов, что существенно снижает стоимость проведения анализов при сохранении высокой чувствительности и соблюдении международных требований по анализу этих контаминантов. Разработаны условия скринингового определения методом ГЖХ-ЭЗД как маркерных, так и диоксиноподобных ПХБ

С целью гармонизации отечественных и международных подходов к оценке качества результатов измерений, проведена оценка расширенной неопределенности измерения индивидуальных конгенов ПХБ при анализе кормов и пищевого сырья методами ГЖХ-МС-МС и ГЖХ-ЭЗД

Практическая значимость работы Создана комплексная двухуровневая система контроля содержания ПХБ в пищевом сырье и кормах, позволяющая проводить определение маркерных и диоксиноподобных ПХБ скрининговым и арбитражным (подтверждающим) методами

Проведена метрологическая аттестация методик выполнения измерений (МВИ) маркерных и диоксиноподобных ПХБ, позволяющих проводить их количественное измерение в соответствии с международными требованиями

Разработанные МВИ включены в методические рекомендации (МР) по арбитражному и скрининговому определению маркерных и диоксиноподобных ПХБ в кормах, кормовых добавках и пищевом сырье МР утверждены Минсельхозом РФ и используются при государственном мониторинге образцов пищевого сырья и кормов для оценки их загрязненности ПХБ

Использование относительно недорогих и простых в эксплуатации масс-спектрометров типа «ионная ловушка» позволило обеспечить невысокую стоимость анализа при достижении высокой чувствительности и селективности определения ПХБ

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы доложены на 3-ей Международной конференции «Экстракция органических соединений» (Воронеж, 2005), конференции молодых ученых ФГУ «ВГНКИ» (Москва, 2006), 15 Международном симпозиуме по анализу гормонов и остатков лекарственных средств в пищевых продуктах (Антверпен, Бельгия, 2006), международном конгрессе по аналитической химии ICAS-2006 (Москва, 2006)

Публикации. По теме диссертации опубликовано 6 статей и тезисов докладов, 2 методические рекомендации

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

- 1 Разработка способов экстракции и очистки ПХБ из пищевого сырья и кормов с использованием метода УЭР
- 2 Оптимизация условий анализа маркерных и диоксиноподобных ПХБ методами ГЖХ-ЭЗД и ГЖХ-МС-МС
- 3 Проведение метрологической аттестации и контроля правильности результатов определения ПХБ в пищевом сырье и кормах с использованием международных аттестованных стандартных образцов
- 4 Результаты мониторингового определения маркерных и диоксиноподобных ПХБ в рыбной муке и рыбе

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 203 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, собственные исследования, обсуждение результатов, выводы, практические предложения, список литературы, включающий 223 источника, 40 из которых опубликовано в отечественных и 183 – в зарубежных изданиях, и приложения Работа иллюстрирована 38 рисунками и 42 таблицами

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы

Оптимизацию условий экстракции ПХБ из образцов кормов и пищевого сырья проводили методом УЭР Использовали УЭР установку ASE 200 (Dionex, США) с экстракционными ячейками на 33 см³ и приемными флаконами на 60 см³ Изучали влияние параметров работы экстрактора на эффективность извлечения ПХБ Исследовали различные варианты заполнения экстракционных ячеек для получения экстрактов пригодных для анализа методами ГЖХ-ЭЗД и ГЖХ-МС-МС без проведения дополнительных стадий очистки При заполнении экстракционных ячеек использовали комбинацию различных сорбентов (флорисил, диатомитовая земля, силикагель, сернистый натрий, сернистый магний), а также проводили подбор органических растворителей, позволяющих эффективно извлекать ПХБ из различных матриц

Подбор УЭР условий экстракции ПХБ выполняли на образцах кормов и пищевого сырья с искусственной добавкой нативных конгенов ПХБ, а также на международных аттестованных стандартных образцах При разработке методики пробоподготовки использованы следующие матрицы рыбная мука, рыбий жир, рыба, комбикорм, растительное масло, мясокостная мука, животные жиры, мясо, печень, почки, молоко

Для коррекции потерь ПХБ при пробоподготовке вносили в экстракционную ячейку смесь меченых изотопами ¹³C аналогов маркерных и диоксиноподобных конгенов производства Wellington Laboratories (Канада) Полученные УЭР экстракты упаривали на ротационном испарителе с 20 – 50 мкл ундеканового раствора изотопно-меченых внутренних стандартов до объема 0,5 – 1,0 см³ с последующим

концентрированием в токе азота на нагревательном модуле Pterse (США) При ГЖХ-ЭЗД анализе в качестве внутреннего стандарта использовали октахлорнафталин

Для повышения селективности определения диоксиноподобных конгенов ПХБ проводили фракционирование полученных УЭР экстрактов методом колоночной хроматографии на активированном угле Для этого готовили 10% смесь активированного угля на обращеннофазном сорбенте Bondesil C18 – 40 мкм (Varian, США) В качестве хроматографической колонки использовали пастеровские пипетки, заполненные приготовленной смесью активированного угля с обращеннофазным сорбентом (высота слоя сорбента 10 ± 1 мм) Для промывки колонки после нанесения УЭР экстракта использовали смесь дихлорметана с н-гексаном (50/50, об /об) Элюирование копланарных конгенов проводили 10 см^3 толуола Полученные элюаты очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле, импрегнированным серной кислотой

Анализ полученных концентратов проводили методами ГЖХ-ЭЗД на газовом хроматографе модели «3800» с детектором электронного захвата (Varian, США) и ГЖХ-МС-МС на хромато-масс-спектрометре модели «Saturn 2000» (Varian, США) с масс-спектрометрическим детектором типа «ионная ловушка»

При разработке хроматографических условий проводили оценку селективности анализа ПХБ на трех капиллярных колонках VF-5 ms ($50\text{м} \times 0,25\text{мм} \times 0,25\text{мкм}$), CP-Sil 8 CB for PCB ($50\text{м} \times 0,25\text{мм} \times 0,25\text{мкм}$) и CP-Sil 5/C18 CB for PCB ($100\text{м} \times 0,25\text{мм} \times 0,1\text{мкм}$) (Varian, США)

Для идентификации и количественного определения ПХБ использовали аттестованные стандартные растворы нативных и изотопно-меченых конгенов ПХБ производства Wellington Laboratories (Канада), IRMM (Бельгия) и Restek (США) Количественное определение осуществляли методом внутреннего стандарта с помощью программного обеспечения Saturn WS и Star WS (Varian, США) по площади пиков идентифицированных соединений Идентификацию анализов проводили с соблюдением международных критериев в соответствии с Решением Комиссии ЕС 2002/657/ЕС от 12 августа 2002 года

При ГЖХ-МС-МС анализе использовали метод ионизации электронным ударом с автоматическим определением времени ионизации и воздействие на ионы методом МС-МС. Настройку параметров воздействия на ион предшественник проводили в резонансном режиме МС-МС.

Метрологическую аттестацию разработанных МВИ выполняли по результатам их метрологической экспертизы, проведенной ФГУП «ВНИИМС» (г. Москва) и расчетно-экспериментального оценивания неопределенности измерения на основе определения основных показателей, характеризующих эффективность МВИ, в соответствии с руководством ЕВРАХИМ/СИТАК «Количественное описание неопределенности в аналитических измерениях» (2002), ГОСТ Р 8 563-96 и ГОСТ Р ИСО 5725-2002.

Контроль правильности результатов измерения массовой доли ПХБ с использованием разработанных МВИ проводили путем анализа международных стандартных образцов IRMM-446 – свиного жира с аттестованным содержанием маркерных ПХБ, BCR-349 – рыбьего жира из печени трески с аттестованным содержанием маркерных ПХБ, WMF-01 лиофилизованного мяса карпа с аттестованным содержанием диоксиноподобных ПХБ.

С использованием разработанных методик проводили мониторинговые исследования содержания маркерных и диоксиноподобных ПХБ в рыбной муке и рыбе. В ходе исследования было проанализировано 220 образцов рыбной муки и 60 образцов рыбы.

2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.2.1. Отработка условий хроматографического разделения ПХБ

При отработке газохроматографических условий анализа ПХБ на начальном этапе работы использовали растворы стандартных образцов ПХБ AROCHLOR 1016/1254 (Restek), BP-MXM (Wellington Laboratories), содержащий конгенеры 3, 15, 28, 52, 101, 114, 138, 153, 180, 194, 206, 209, ТК-ВРА-CST (Wellington Laboratories), содержащий диоксиноподобные конгенеры 81, 77, 105, 114, 118, 123, 126, 156, 157, 167, 169, 189 и BP-MS (Wellington Laboratories) содержащий 62 конгенера ПХБ. При ГЖХ-ЭЗД идентификацию конгенов проводили по времени удерживания. При

ГЖХ-МС идентификации кроме времени удерживания использовали масс-спектры электронного удара

В результате проведенной работы были оптимизированы хроматографические условия анализа ПХБ и определено время их удерживания на указанных капиллярных колонках с учетом условий ГЖХ-ЭЗД и ГЖХ-МС-МС детектирования. В таблице 1 приведены хроматографические условия анализа ПХБ на использованных капиллярных колонках. Капиллярная колонка VF-5ms показала необходимую селективность, наименьший уровень фона и стабильность работы при максимальных температурных режимах и поэтому была использована для системы ГЖХ-МС-МС. В таблице 2 приведено время удерживания ПХБ в разработанных условиях ГЖХ-МС-МС на колонке VF-5 ms

Таблица 1

Газохроматографические условия определения ПХБ

№	Метод	Капиллярная колонка	Хроматографические условия
1	ГЖХ-ЭЗД ГЖХ-МС	CP-Sil 8CB for PCB (50м×0,25мм×0,25мкм)	Газ носитель гелий – 1,1 см ³ /мин Инжектор 1079, вкладыш ID 2 мм 1 для проб объемом до 1 мкл температура 280°C, 0 – 3 мин в режиме splitless, с 3 мин режим split 1/10, 2 для проб объемом от 1 до 3 мкл температура 90°C – 0,3 мин, нагрев 90° – 280°C 200°C/мин, 280°C до 30 мин, 0 – 0,3 мин split 1/10, с 0,3 мин до 3 мин splitless, с 3 мин split 1/10, Термостат колонки 90°C – 2,0 мин, нагрев от 90°C до 150°C – 15,0°C/мин, от 150°C до 300°C – 3,0°C/мин, 300°C до 60 мин
2	ГЖХ-ЭЗД ГЖХ-МС	CP-Sil 5/C18 CB for PCB (100м×0,25мм×0,1мкм)	Газ носитель гелий – 2,0 см ³ /мин Параметры инжектора по №1 Термостат колонки 75°C – 2,0 мин, нагрев от 75°C до 150°C – 15,0°C/мин, от 150°C до 280°C – 1,5°C/мин, 280°C до 100 мин
3	ГЖХ-МС	VF-5 ms (50м×0,25мм×0,25мкм)	Газ носитель гелий – 0,8 см ³ /мин Параметры инжектора по №1 Термостат колонки 120°C – 1,0 мин, от 120°C до 150°C – 15,0°C/мин, от 150°C до 280°C – 2,5°C/мин, 280°C до 60 мин

Время удерживания (RT) ПХБ на колонке VF-5 ms (50м×0,25мм×0,25мкм)

при ГЖХ-МС-МС детектировании

№	№ конгенера по ИЮПАК	RT, мин	№	№ конгенера ИЮПАК	RT, мин	№	№ конгенера по ИЮПАК	RT, мин	№	№ конгенера по ИЮПАК	RT, мин
1	1	13,71	38	65/62	28,81	75	145/81	35,98	112	159/187/182	43,27
2	2	14,85	39	35	29,06	76	116/115	36,28	113	183	43,62
3	3	15,86	40	104	29,09	77	120/85	36,47	114	162	43,63
4	10/4	17,09	41	44	29,36	78	136/148	36,48	115	128	43,93
5	9/7	18,52	42	59	29,52	79	77	36,49	116	167	44,04
6	6	19,18	43	42/37	29,60	80	110	36,68	117	185	44,36
7	8/5	19,60	44	72	29,95	81	154	36,82	118	174/181	44,88
8	14	20,12	45	71	30,14	82	82	37,29	119	177	45,24
9	19	20,86	46	64/41	30,23	83	151	37,58	120	202	45,52
10	30	21,43	47	68	30,39	84	135/144/124	37,88	121	171	45,58
11	11	22,12	48	96	30,57	85	147	38,16	122	156	45,66
12	13/12/18	22,33	49	40/57	30,79	86	108/107	38,18	123	173	45,95
13	17	22,48	50	103	30,84	87	123	38,41	124	157	46,01
14	15	22,49	51	100	31,20	88	139/149	38,42	125	201/204	46,08
15	27/24	23,05	52	67	31,21	89	118/106	38,53	126	172/192	46,35
16	16/32	23,61	53	58	31,44	90	140	38,69	127	197	46,57
17	34/23	24,22	54	63	31,60	91	143/134	39,16	128	180	46,80
18	29	24,53	55	94	31,80	92	131/142	39,26	129	193	46,98
19	54	24,56	56	61/74	31,88	93	122	39,29	130	191	47,26
20	26	24,83	57	70/76	32,13	94	114	39,35	131	200	47,64
21	25	25,01	58	98/102	32,31	95	133/165	39,46	132	169	48,30
22	31	25,41	59	80/66	32,41	96	188/146/161	39,71	133	170	48,79
23	50	25,45	60	93/95/121/88	32,45	97	153/184	40,15	134	190	48,89
24	28	25,52	61	91	32,91	98	105	40,31	135	198	49,21
25	21/33/20	26,17	62	55	33,01	99	132/168	40,35	136	199	49,42
26	53	26,23	63	155	33,48	100	127	40,54	137	203/196	49,79
27	51	26,57	64	56/60	33,59	101	141	41,02	138	189	50,75
28	22	26,69	65	92	33,69	102	179	41,16	139	208	51,73
29	45	27,06	66	84	33,95	103	137	41,66	140	195	51,79
30	36	27,07	67	101/89/90	34,09	104	176	41,67	141	207	52,26
31	46/39	27,61	68	113/99/79	34,47	105	130	41,70	142	194	53,13
32	69	27,74	69	119/112	34,99	106	164/163/138/160	42,06	143	205	53,50
33	52/73	27,91	70	150	35,00	107	158	42,25	144	206	55,67
34	43/49	28,21	71	83/109/78	35,25	108	186	42,26	145	209	57,84
35	38	28,22	72	152	35,57	109	178	42,61			
36	47	28,43	73	97/86/125	35,61	110	129/126	42,75			
37	48/75	28,50	74	87/111/117	35,97	111	166/175	43,08			

2.2.2. Отработка условий ГЖХ-ЭЗД и ГЖХ-МС-МС детектирования ПХБ

На этапе разработки методик контроля ПХБ были выбраны две системы детектирования – ГЖХ-ЭЗД и ГЖХ-МС-МС. Выбор такого тандема обусловлен целым рядом причин. ГЖХ-ЭЗД является наиболее простой, высокочувствительной и доступной системой на аналитическом рынке РФ, а также широко представлена в производственных лабораториях. Для арбитражных исследований в международной практике используют масс-спектрометрические детекторы (Commission Decision 2002/657/EC, 2002). Среди масс-спектрометрических детекторов для анализа ПХБ наибольшее распространение получили масс-спектрометры высокого разрешения и тандемные масс-спектрометры с тройным квадруполем или квадрупольной ионной ловушкой. Важными аргументами в пользу МС-МС низкого разрешения служат высокая чувствительность, простота в обслуживании и сравнительно низкая стоимость подобных систем.

Полученные сравнительные результаты определения чувствительности двух детекторов в разработанных условиях детектирования показали сопоставимые результаты. Однако отклик ЭЗД существенно зависел от количества атомов хлора в молекуле ПХБ и отличался в 40 раз для монохлорбифенила и наохлаорбифенила. Для ГЖХ-МС-МС отклик детектора не зависел от уровня хлорирования бифенила, а существенное влияние на чувствительность оказывал подбор оптимальных условий диссоциации иона предшественника, ионный фон колонки или пробы. Предел обнаружения для ионной ловушки в режиме МС-МС при резонансной диссоциации выбранного иона составил 0,4 – 0,6 пкг для индивидуального конгенера, что соответствует в пересчете на навеску (3 г с концентрированием экстракта в 20 мкл ундекана и вводом в ГЖХ-МС-МС систему 3 мкл концентрата) – 0,9 – 1,3 пкг/г.

Условия МС-МС оптимизировали с использованием программного обеспечения Saturn WS. Для расчета оптимального уровня удерживающего поля использовали следующее правило: значение m/z наименьшего дочернего иона делили на коэффициент 1,4. Значение этого коэффициента получено из соотношения между $q_z \text{ max} = 0,908$ ($\beta_z = 1$) and $q_z = 0,64$ ($\beta_z = 0,5$). При использовании данного правила, дочер-

ние ионы попадают в область наивысшей стабильности работы ионной ловушки (March R E and Hugues R J , 1989)

При рассчитанном уровне удерживающего поля (CID RF, m/z) определили оптимальные значения амплитуд активации (CID, Вольт) для ионов предшественников маркерных и диоксиноподобных ПХБ Для повышения селективности МС-МС анализа резонансную активацию выполняли на M+2 или M+4 ионах предшественниках с окном изоляции 1,5 m/z Количественная обработка данных на дочерних ионах, полученных после потери двух атомов хлора показала более воспроизводимые результаты, чем при использовании ионов [(M+2/+4)-Cl]⁺ Соотношения относительных ионных интенсивностей кластера ионов [(M+2/+4)-2Cl]⁺ показали наибольшую стабильность в соответствии с требованиями к МС-МС детектированию (Commission Decision 2002/657/EC, 2002) В таблице 3 приведены оптимизированные параметры метода воздействия на ионы в режиме МС-МС

Таблица 3

Основные параметры метода воздействия на ионы в режиме МС-МС

Конгенер ПХБ	Ион предшественник, m/z	CID RF, m/z	CID, Вольт	Дочерние ионы, m/z
28	258 (M+2)	133	1 2	186/188
28L	270 (M+2)	141	1 2	198/200
52, 81, 77	292 (M+2)	157	1 2	220/222
52L, 81L, 77L, 70L	304 (M+2)	166	1 2	232/234
101, 105, 114, 118, 123, 126	326 (M+2)	181	1 6	254/256
101L, 105L, 114L, 118L, 123L, 126L, 111L	338 (M+2)	190	1 6	266/268
138, 153, 156, 157, 167, 169	360 (M+2)	206	1 6	288/290
138L, 153L, 156L, 157L, 167L, 169L	372 (M+2)	214	1 6	300/302
180, 189	396 (M+4)	231	1 6	324/326
180L, 189L, 170L	408 (M+4)	240	1 6	336/338

В результате оптимизации специализированных условий МС-МС получили следующие значения параметров

1. Общие параметры: температура ионной ловушки – 220°C, температура блока сопряжения – 250°C, температура вакуумируемого блока – 60°C, диапазон регистрируемых значений масс – 126 – 500 m/z, окно изоляции масс – 1,5 m/z, продолжительность периода сканирования – 0,5 сек, дополнительное напряжение на умножи-

теле – 200 Вольт, ток эмиссии катода – 50-90 мкА, значение «Target TIC» – 2000, значение напряжения продольной модуляции – 4,0 Вольт

2. Специализированные параметры резонансного метода: уровень удерживающего RF поля – 48 m/z, амплитуда вспомогательного широкополосного сигнала – 40 Вольт, амплитуда широкополосного сигнала – 30 Вольт, время изоляции – 5 мсек, время диссоциации – 20 мсек, диапазон модуляции – 2, скорость модуляции удерживающего поля – 5600 микросекунд, величина сдвига сигнала активации – 0 Герц

На рис 1 приведены MS-MS масс-спектры диоксиноподобных ПХБ в разрабатываемых условиях резонансной диссоциации

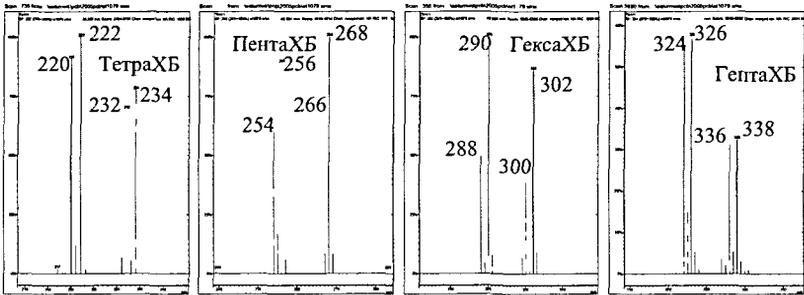


Рис 1 Масс-спектры нативных и изотопно-меченых диоксиноподобных ПХБ

2.2.3. Экстракция ПХБ и методы очистки экстрактов

На этапе пробоподготовки обрабатывали эффективные и экономичные способы экстракции и очистки ПХБ из кормов и пищевого сырья для дальнейшего определения методами ГЖХ-МС-МС и ГЖХ-ЭЗД. Важными критериями в выборе метода пробоподготовки были время пробоподготовки, расход растворителей и сорбентов, степень очистки образцов для целей ГЖХ-МС-МС и ГЖХ-ЭЗД.

Основной целью при разработке условий экстракции методом УЭР была оптимизация условий экстракции, при которых конечный экстракт использовался для стадии концентрирования без дополнительных стадий очистки. Такой подход обусловлен, прежде всего, необходимостью анализа максимального количества образцов в течение рабочего дня. Минимизация времени пробоподготовки особенно актуальна при широкомасштабных мониторинговых исследованиях. Например, стан-

дартная процедура экстракции в аппарате Сокслета занимает 12 – 18 часов, что не приемлемо при массовых исследованиях. Деконтаминация стеклянной посуды после экстракции по методу Сокслета также занимает значительное время. Недостаточная деконтаминация стеклянной посуды может приводить к ложноположительным результатам. Главное преимущество УЭР заключается в значительном сокращении времени экстракции и расходуемого количества реактивов. Так большинство аналитов методом УЭР может быть экстрагировано с высокой эффективностью за 15 – 30 мин. При этом расход растворителей будет минимальным, а процесс экстракции можно совмещать с процессом очистки или селективной экстракции аналитов.

В качестве экстрагента использовали n-гексан и n-гексан с добавкой более полярных растворителей (ацетон, дихлорметан, этилацетат, толуол, изопропанол). На рисунке 2 приведены разработанные схемы заполнения экстракционных ячеек, позволяющие сочетать процесс экстракции и очистки.

Схема № 1	Схема № 2
Фильтр бумажный	Фильтр бумажный
Сернистый натрий до фильтра	Сернистый натрий до фильтра
3 г пробы с 10 г сернистого натрия	1 г пробы с 5 г сернистого натрия
Фильтр из стекловолокна	Фильтр из стекловолокна
Силикагель с 40% серной кислоты (С/С) 2 г	С/С 2 г
Силикагель 1 г	Силикагель 1 г
С/С 2 г	С/С 2 г
Силикагель 1 г	Силикагель 1 г
С/С 2 г	С/С 3 г
Силикагель 2 г	Силикагель 1 г
Силикагель 2 г	С/С 2 г
Фильтр бумажный	Силикагель 2 г
	Фильтр бумажный

Рис. 2. Схемы заполнения экстракционных ячеек для экстракции маркерных (схема № 2) и диоксиноподобных ПХБ (схема № 1) методом УЭР.

Для разработанных схем заполнения экстракционных ячеек получили оптимизированные условия параметров экстракции методом УЭР, которые приведены в таблице 4

Таблица 4

Оптимизированные условия экстракции ПХБ методом УЭР

Параметры	Условия
Температура	80°C
Время нагрева	5 мин
Количество циклов	2
Растворитель	n-гексан
Давление	10 МПа
Время термостатирования	5 мин
Объем растворителя	60% от объема ячейки
Объем ячейки	33 см ³
Время продувки азотом	100 секунд

Суммарное время экстракции одной пробы в разработанных условиях УЭР составило 20 мин, объем экстракта – 42 – 45 см³

Абсолютные извлечения маркерных и диоксиноподобных ПХБ (без коррекции изотопно-мечеными стандартами) в разработанных условия приведены в таблицах 5 и 6 В качестве матрицы использовали следующие образцы комбикорм, рыбная мука, жмых, отруби пшеничные, мясокостная мука, растительное масло, свиной жир, рыбий жир, мясо, печень, почки, рыба, молоко Для каждой матрицы было исследовано по шесть образцов

Таблица 5

Извлечение маркерных ПХБ из проб кормов и пищевого сырья

№	Конгенер ПХБ по номенклатуре ИЮПАК	Извлечение, %, n=78	Относительное стандартное отклонение (СКО) результатов определения извлечения, %
1	28	97	4
2	52	96	3
3	101	99	4
4	138	93	3
5	153	96	3
6	180	90	5

Извлечение диоксиноподобных ПХБ из проб кормов и пищевого сырья

№	Конгенер ПХБ по номенклатуре ИЮПАК	Извлечение, %, n=78	СКО результатов определения извлечения, %
1	81	88	12
2	77	90	12
3	123	84	8
4	118	88	5
5	114	81	7
6	105	89	5
7	126	85	10
8	167	84	12
9	156	82	17
10	157	85	20
11	169	71	9
12	189	55	16

Для сравнения двух систем концентрирования, полученные УЭР экстракты упаривали до объема $0,5 - 1,0 \text{ см}^3$ на ротационном испарителе при температуре $35 - 37^\circ\text{C}$ и остаточном атмосферном давлении $0,2 - 0,3 \text{ атм}$, а другую часть экстрактов упаривали до объема $0,5 \text{ см}^3$ на концентраторе Кудерна-Дэниша. Время упаривания на ротационном испарителе составило $5 - 6 \text{ мин}$. Время упаривания экстракта на концентраторе Кудерна-Дэниша – $25 - 30 \text{ мин}$. Результаты количественного определения ПХБ в зависимости от условий упаривания отличались в границах погрешности измерения. Поэтому дальнейшую работу проводили с концентрированием экстрактов на ротационном испарителе.

Так как в процессе исследований установлено, что на эффективность УЭР экстракции влияет содержание влаги в образце, были оптимизированы условия сушки образцов в микроволновой печи в течение $2 - 5 \text{ мин}$. При разработке схем заполнения экстракционных ячеек изучали влияние содержания жира в образце на эффективность комбинированной экстракции и очистки. Подобраны оптимальные количества сорбентов и органических растворителей для селективной экстракции ПХБ с сорбцией жира в экстракционной ячейке.

2.2.4. Метрологическая аттестация методик определения ПХБ

Аттестацию методик проводили расчетно-экспериментальным способом совместно с ФГУП «ВНИИМС» (г Москва) МВИ аттестованы в соответствии с ГОСТ Р 8 563-96 и ГОСТ Р ИСО 5725-2002 и устанавливают скрининговый и арбитражный (подтверждающий) методы для идентификации и количественного определения маркерных (28, 52, 101, 138, 153 и 180 конгенеры) и диоксиноподобных (77, 81, 105, 114, 118, 123, 126, 156, 157, 167, 169 и 189 конгенеры) ПХБ в кормах, кормовых добавках и пищевом сырье

С целью реализации алгоритма оценивания неопределенности выполняли измерение массовой доли ПХБ в образцах рыбной муки с добавкой маркерных и диоксиноподобных конгенов ПХБ. Исследования проводили в следующих диапазонах концентраций – 1,0 – 1500,0 мкг/кг при массе анализируемой пробы 1 г для маркерных и 2,0 – 2500,0 нг/кг при массе анализируемой пробы 3 г для диоксиноподобных ПХБ. Анализируемые диапазоны были разбиты на 4 – 6 поддиапазонов. Всего на каждой пробе в аттестуемых диапазонах выполнено 40 – 60 измерений по процедуре МВИ. На основании результатов исследований вычисляли неопределенность измерений и промежуточные сопутствующие величины. В ходе метрологической аттестации была рассчитана расширенная неопределенность для аттестованных диапазонов массовой доли маркерных и диоксиноподобных ПХБ (таблицы 7 – 8).

Таблица 7

Расширенная неопределенность измерений маркерных ПХБ методом ГЖХ-МС-МС

Конгенер ПХБ	Диапазон измерений массовой доли ПХБ, мкг/кг		
	от 1,0 до 10,0 вкл	св 10,0 до 100,0 вкл	св 100,0 до 1500,0 вкл
	Расширенная неопределенность при коэффициенте охвата $k=2$ (границы относительной погрешности, %, при $P=0,95$)		
28	17	13	10
52	14	12	8
101	14	15	13
138	22	20	15
153	21	19	14
180	35	14	11

Расширенная неопределенность измерений диоксиноподобных ПХБ
методом ГЖХ-МС-МС

Конгенер ПХБ	Диапазон измерений массовой доли ПХБ, нг/кг		
	от 2 0 до 10,0 вкл	св 10,0 до 250,0 вкл	св 250,0 до 2500,0 вкл
	Расширенная неопределенность при коэффициенте охвата k=2 (границы относительной погрешности, %, при P=0,95)		
81	30	16	15
77	17	14	10
123	14	11	12
118	24	19	15
114	24	11	12
105	16	11	12
126	16	11	11
167	11	13	9
156	13	12	11
157	20	18	14
169	31	20	12
189	16	14	14

2.2.5. Контроль правильности результатов измерения ПХБ с использованием международных аттестованных стандартных образцов

Для подтверждения правильности результатов измерений, получаемых с использованием разработанных МВИ, проводили контроль смещения (степени близости полученных результатов к аттестованному значению) результатов количественного химического анализа с использованием аттестованных стандартных образцов в соответствии с алгоритмом расчета, приведенным в Руководстве ЕВРА-ХИМ/СИТАК. Результаты количественных измерений признавали удовлетворительными при условии выполнения неравенства

$$\left| \overline{X_{k,c}} - X_{k,a} \right| \leq \sqrt{U_{k,c}^2 + U_{k,a}^2} \quad (1)$$

где
 $\overline{X_{k,c}}$ – среднее значение массовой доли k-го конгенера в анализируемой пробе,
 $X_{k,a}$ – аттестованное содержание k-го конгенера в стандартном образце,

U_{ka} – расширенная неопределенность с коэффициентом охвата 2 аттестованного значения k-го конгенера в стандартном образце

U_{kc} – расширенная неопределенность с коэффициентом охвата 2 результатов количественного анализа k-го конгенера, полученных при соблюдении требований МВИ

Идентификацию аналитов в стандартных образцах проводили с соблюдением международных требований, регламентируемых Решением Комиссии ЕС № 2002/657 Для идентификации ПХБ необходимо обеспечить наличие не менее 3-х идентифицирующих критериев Для МС-МС данное количество критериев соответствует двум дочерним ионам при условии, что отклонения относительных ионных интенсивностей не превышают регламентируемые Решением допустимые значения

В таблице 9 приведены сравнительные данные по извлечению маркерных ПХБ разработанным способом и аттестованному содержанию в стандартном образце IRMM-446

Таблица № 9

Результаты определения ПХБ в свином жире (IRMM-446)

Маркерные ПХБ	Аттестованное содержание в IRMM-446,	*Неопределенность стандартного образца,	Результаты анализа,	*Неопределенность результатов анализа,	Контроль смещения результатов количественного анализа, $ \bar{X}_{kc} - X_{kd} \leq \sqrt{U_{kc}^2 + U_{kd}^2}$
	мкг/кг		n=10		
28	29,6	4,2	31,1	3,7	$1,5 \leq 5,6$
52	25,5	3,6	24,5	5,3	$1,0 \leq 6,4$
101	30,0	8,0	31,0	3,5	$1,0 \leq 8,7$
118	30,2	5,4	30,9	3,2	$0,7 \leq 6,3$
138	32,0	8,0	32,9	2,6	$0,9 \leq 8,4$
153	30,8	4,8	31,8	3,4	$1,0 \leq 5,9$
180	29,8	5,0	28,7	2,1	$1,1 \leq 5,4$
Сумма	207,0	22,0	210,9	21,1	$3,9 \leq 30,5$

*- расширенная неопределенность с коэффициентом охвата 2

В таблице 10 приведены сравнительные данные по извлечению диоксиноподобных ПХБ разработанным способом и аттестованному содержанию в стандартном образце WMF-01

Результаты определения ПХБ в мясе карпа (WMF-01)

Диоксиноподобные ПХБ	Аттестованное содержание в WMF-01, n=70 нг/кг	*Неопределенность стандартного образца, нг/кг	Результаты анализа, n=10 нг/кг	*Неопределенность рез-тов анализа, нг/кг	Контроль смещения результатов количественного анализа, $ \bar{X}_{\text{кп}} - X_{\text{кд}} \leq \sqrt{U_{\text{кп}}^2 + U_{\text{кд}}^2}$
77	2233	720	2840	400	$607 \leq 824$
81	201	58	245	74	$44 \leq 94$
105	49050	14200	45160	5193	$3890 \leq 15120$
114	3523	1670	3050	329	$473 \leq 1702$
118	130100	32500	122360	18354	$7740 \leq 37325$
123	4233	2620	4130	471	$103 \leq 2662$
126	739	260	615	65	$124 \leq 268$
156	14890	5020	13150	1407	$1740 \leq 5213$
157	3488	870	2980	525	$508 \leq 1016$
167	9750	3090	8760	823	$990 \leq 3198$
169	76	30	84	26	$8 \leq 40$
189	2016	611	1820	260	$196 \leq 664$

*- расширенная неопределенность с коэффициентом охвата 2

Результаты количественного определения маркерных и диоксиноподобных ПХБ согласуются с неравенством (1) Таким образом, результаты их количественного определения можно признать удовлетворительными

2.2.6. Результаты мониторингового определения ПХБ

С использованием разработанных методик проводили мониторинговые исследования содержания маркерных и диоксиноподобных ПХБ в рыбной муке и рыбе В таблице 11 суммированы полученные данные по контаминации рыбной муки и рыбы

Таблица 11

Результаты определения маркерных и диоксиноподобных ПХБ

Наименование образцов	Количество образцов	Количество образцов не соответствовавших МДУ	Показатели, не соответствовавшие МДУ
Рыбная мука	220	4 (1,8%)	Маркерные ПХБ ¹
		20 (9,1%)	Диоксиноподобные ПХБ ²
Рыба	60	2 (3,3%)	Маркерные ПХБ ³
		5 (8,3%)	Диоксиноподобные ПХБ ⁴

Однако в 8,3% образцов рыбы и 9,1% рыбной муки обнаружено превышение МДУ по содержанию диоксиноподобных ПХБ

Диапазон загрязненности диоксиноподобными ПХБ рыбной муки и рыбы составил 0,2 – 9,0 нг/кг ТЭК ВОЗ. Образцы рыбной муки и рыбы из Атлантического и Тихого океанов отличались низкой контаминацией диоксиноподобными ПХБ на уровне 0,2 – 1,4 нг/кг ТЭК ВОЗ. Загрязненность образцов рыбной муки и рыбы из Балтийского моря составила 1,0 – 9,0 нг/кг ТЭК ВОЗ. На долю 126 конгенера в этих образцах приходилось свыше 80% суммарной токсичности выраженной в нг/кг ТЭК ВОЗ.

ВЫВОДЫ

1 Разработана двухуровневая система контроля загрязненности кормов и пищевого сырья маркерными и диоксиноподобными ПХБ, включающая скрининговое определение этих ксенобиотиков методом ГЖХ-ЭЗД и арбитражное – ГЖХ-МС-МС.

2 Предложены эффективные условия извлечения ПХБ из проб кормов, кормовых добавок и пищевого сырья методом УЭР (экстрагент – н-гексан, температура экстракции 80°C, два цикла экстракции по 5 мин, микроволновая сушка и гомогенизация пробы с сернокислым натрием, многослойное заполнение экстракционной ячейки силикагелем и силикагелем, импрегнированным серной кислотой), позволяющие в течение 20 минут проводить их экстракцию и очистку с использованием 42 – 45 см³ растворителя.

3 Оптимизированы условия ГЖХ-ЭЗД и ГЖХ-МС-МС методом резонансной диссоциации, позволяющие с высокой селективностью и чувствительностью проводить скрининговое и арбитражное определение маркерных ПХБ в диапазоне 1,0 – 1500,0 мкг/кг и диоксиноподобных – 2,0 – 2500,0 нг/кг.

4 Проведена метрологическая аттестация разработанных методик, в результате которой оценена расширенная неопределенность измерения массовой доли маркерных и диоксиноподобных ПХБ в кормах и пищевом сырье методами ГЖХ-ЭЗД и ГЖХ-МС-МС. Правильность результатов измерений, полученных с использованием

аттестованных методик, подтверждена путем идентификации и количественного определения маркерных и диоксиноподобных ПХБ в международных аттестованных стандартных образцах

5 В результате мониторинговых исследований установлено превышение МДУ диоксиноподобных ПХБ в 8,3% образцов рыбы и 9,1% рыбной муки. Полученные данные свидетельствуют о необходимости проведения системного мониторинга контаминации кормов и пищевого сырья ПХБ

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Разработаны и внедрены в практику

1 «Методические рекомендации по арбитражному определению полихлорированных бифенилов в кормах, кормовых добавках и пищевом сырье методом газожидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором», Свидетельство о метрологической аттестации МВИ № 22-07 от 15 марта 2007 г, утверждены Минсельхозом РФ 5 апреля 2007 г

2 «Методические рекомендации по скрининговому определению полихлорированных бифенилов в кормах, кормовых добавках и пищевом сырье методом газожидкостной хроматографии с детектором электронного захвата», Свидетельство о метрологической аттестации МВИ № 21-07 от 15 марта 2007 г, утверждены Минсельхозом РФ 5 апреля 2007 г

Разработанные МР предназначены для проведения мониторинга маркерных и диоксиноподобных ПХБ в кормах, кормовых добавках и пищевом сырье

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1 Комаров, А А Извлечение полихлорированных бифенилов из рыбной муки методом ускоренной экстракции под давлением / Комаров А А , Крапивкин Б А // Доклады РАСХН – 2005 – № 2 – С 233-234
- 2 Komarov A A Application of gas chromatography - ion trap mass spectrometry for determination of dioxin-like PCBs in food and feed / Komarov A A , Крапивкин Б А , Panin A N // Book of Abstracts International Congress on Analytical Sciences ICAS-2006 Moscow, Russia 25-30 June, 2006 – V 2 – P 476
- 3 Komarov A Accelerated solvent extraction and gas chromatography – ion trap mass spectrometry determination of PCBs from feed and food matrices / Komarov A , Крапивкин В , Panin A // 5th International Symposium On Hormone And Veterinary Drug Residue Analysis held at the Province of Antwerp House, Antwerp, Belgium May 16-19, 2006 Abstract Book – University Gent – 2006 – P 137
- 4 Комаров, А А Определение полихлорированных бифенилов в рыбной муке и рыбе методом tandemной масс-спектрометрии / Комаров А А, Крапивкин Б А // Материалы Всероссийского ветеринарного конгресса и XIV Международного Московского конгресса по болезням мелких домашних животных – М – 2006 – С 179-180
- 5 Крапивкин, Б А Определение диоксиноподобных полихлорированных бифенилов методом tandemной масс-спектрометрии в рыбной муке / Крапивкин Б А , Комаров А А , Панин А Н // Журнал Ветеринарная практика – 2007 – № 3(34) – С 26-29
- 6 Крапивкин, Б А Разработка методов определения полихлорированных бифенилов / Крапивкин Б А , Комаров А А , Панин А Н // Российский ветеринарный журнал – 2007 – № 1 – С 6-8

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВОЗ	- Всемирная Организация Здравоохранения
ГЖХ	- газожидкостная хроматография
ГЖХ-МС	- газожидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектором
ГЖХ-МС-МС	- газожидкостная хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектированием
ГЖХ-ЭЗД	- газожидкостная хроматография с детектором электронного захвата
ИЮПАК	- Международный союз чистой и прикладной химии
МВИ	- методика выполнения измерений
МДУ	- максимально допустимый уровень
МС-МС	- тандемная масс-спектрометрия
МР	- методические рекомендации
ПХБ	- полихлорированные бифенилы
ТЭК ВОЗ	- токсический эквивалент смеси диоксиноподобных веществ полученный с использованием ТЭФ ВОЗ
ТЭФ ВОЗ	- коэффициент (фактор) эквивалентной токсичности ВОЗ для диоксиноподобных веществ
УЭР	- ускоренная экстракция растворителями
ФГУП	- Федеральное государственное унитарное предприятие
«ВНИИМС»	«Всероссийский научно-исследовательский институт метрологической службы»
IRMM	- институт референтных материалов и измерений (Бельгия)
RT	- Retention Time (время удерживания)
split	- режим работы инжектора хроматографа с делением потока газа носителя
splitless	- режим работы инжектора хроматографа без деления потока газа носителя

Заказ № 146/04/07 Подписано в печать 16 04 2007 Тираж 150 экз Усл п л 1, 5



ООО "Цифровичок", тел (495) 797-75-76, (495) 778-22-20
www.cfr.ru, e-mail info@cfr.ru