

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛИБРОМДИФЕНИЛОВЫХ ЭФИРОВ В РЫБЕ И РЫБНОЙ ПРОДУКЦИИ МЕТОДОМ ГАЗОЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

О.Н. Тимофеева, И.С. Гринкевич, О.В. Шуляковская

РУП «Научно-практический центр гигиены», Республика Беларусь, 220012, г. Минск, ул. Академическая, 8

Целью работы являлась разработка методики определения полибромдифениловых эфиров (ПБДЭ) в рыбе и рыбной продукции для контроля содержания примесей в продуктах питания и в объектах окружающей среды в целом. Изучены условия хроматографирования (температурные режимы, влияние скорости и величины деления потока газа-носителя с применением капиллярных колонок HP-1, DB-5, HP-50+, DB-1;) и разрушающие и неразрушающие липиды методы очистки экстракта при определении ПБДЭ. Предложена методика определения 2,2,4,4-тетрабромдифенилового эфира (БДЭ-47), 2,2,4,4,5-пентабромдифенилового эфира (БДЭ-99) и декабромдифенилового эфира (БДЭ-209) в рыбе и рыбной продукции методом газожидкостной хроматографии с электрозахватным детектором. Метод основан на экстракции ПБДЭ из пробы смесью гексан – ацетон (3:1), очистке экстракта концентрированной серной кислотой (соотношение фаз «гексан – серная кислота» – 5:1). Вторую стадию очистки проводят методом твердофазной экстракции с использованием картриджей «SiOH-H₂SO₄/SA» и гексана в качестве элюента. Газохроматографический анализ при определении БДЭ-47 и БДЭ-99 осуществляют на низкополярной капиллярной колонке DB-5 (30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм) при программировании температуры колонки. При определении БДЭ-209 используют неполярную капиллярную колонку DB-1 (15 м × 0,25 мм × 0,1 мкм) при программировании температуры колонки.

Расчет содержания БДЭ-47 и БДЭ-99 проводят с внутренним стандартом (2,2,3,4,4-пентабромдифениловый эфир (БДЭ-85)), БДЭ-209 методом абсолютной калибровки. При определении БДЭ-209 используется матричная калибровка. Диапазон концентраций градуировочных растворов для определения БДЭ-47 и БДЭ-99 – 0,005–0,05 мкг/см³, БДЭ-209 – 0,05–0,3 мкг/см³. Методика позволяет измерять содержание БДЭ-47 и БДЭ-99 в диапазоне 0,0002–0,05 мкг/кг исследуемого продукта; БДЭ-209 – в диапазоне 0,002–0,3 мкг/кг. Расчитаны метрологические характеристики методики.

Ключевые слова: полибромдифениловые эфиры, 2,2,4,4-тетрабромдифениловый эфир, 2,2,4,4,5-пентабромдифениловый эфир, декабромдифениловый эфир, рыба, рыбная продукция, газожидкостная хроматография, электрозахватный детектор.

Особое внимание, которое уделяется в настоящее время полибромдифениловым эфирам (ПБДЭ), обусловлено их широким применением в промышленности в качестве антивоспламенителей, стойкостью в окружающей среде, способностью к биоаккумуляции и высокой токсичностью и канцерогенностью для человека.

Полибромдифениловые эфиры представляют собой класс дидвухциклических ароматических эфиров, в которых в первом и втором бензольных кольцах атомы водорода замещены атомами брома. Количество атомов брома в молекуле – $n + t = 2 \div 10$ (рис. 1). Существует 209 конгенов ПБДЭ. В зависимости от количества атомов брома в молекуле выделяют

10 гомологических групп ПБДЭ: моно-, ди-, три-, тетра-, пента-, гекса-, гепта-, окта-, нона- и декабромдифенилы. Указанные гомологические группы представлены 3, 12, 24, 42, 46, 42, 24, 12, 3 и 1 изомерами соответственно.

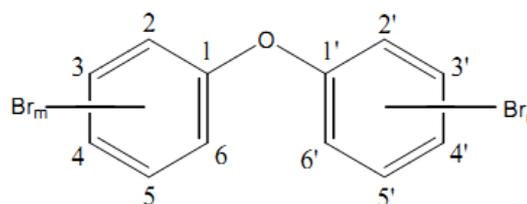


Рис. 1. Общая структура полибромдифениловых эфиров

© Тимофеева О.Н., Гринкевич И.С., Шуляковская О.В., 2016

Тимофеева Ольга Николаевна – ведущий химик лаборатории химии пищевых продуктов (e-mail: rspch@rspch.by, тел.: 8 (375) 284-13-80).

Гринкевич Ирина Сергеевна – химик лаборатории химии пищевых продуктов (e-mail: rspch@rspch.by, тел.: 8 (375) 284-13-80).

Шуляковская Ольга Васильевна – кандидат химических наук, заведующий лабораторией химии пищевых продуктов (e-mail: rspch@rspch.by, тел.: 8 (375) 284-13-80).

ПБДЭ структурно являются аналогами таких стойких органических загрязнителей, как полихлорированные бифенилы (ПХБ) и диоксины, и проявляют сходные с ними химические свойства.

Из-за своей низкой реакционной способности и гидрофобности они достаточно устойчивы в условиях окружающей среды. Так, ПБДЭ могут находиться в воздухе в виде взвеси частиц, которые затем оседают с пылью, загрязняя почву, или смываются осадками, попадая в воду. ПБДЭ плохо растворимы в воде, в связи с чем там не были найдены их высокие концентрации.

ПБДЭ – липофильные соединения, имеют способность к биоаккумуляции. В человеческой крови, жировой ткани и материнском молоке, рыбе и птичьих яйцах обнаружены 2,4,4-трибромдифениловый эфир (БДЭ-28), 2,2,4,4-тетрабромдифениловый эфир (БДЭ-47), 2,2,4,4,5-пентабромдифениловый эфир (БДЭ-99), 2,2,4,4,6-пентабромдифениловый эфир (БДЭ-100), 2,2,4,4,5,5-гексабромдифениловый эфир (БДЭ-153), 2,2,4,4,5,6-гексабромдифениловый эфир (БДЭ-154) [8,16]. Содержание ПБДЭ в тканях человека и биоте быстро увеличивается.

В природных условиях и в живых организмах происходит трансформация ПБДЭ (биодеградация, фотодegradация) в направлении конгенов, содержащих меньше атомов брома. Так, несмотря на наличие в коммерчески используемых смесях всех конгенов ПБДЭ, включая декабромдифениловый эфир (БДЭ-209), в природных объектах чаще обнаруживают БДЭ-47, БДЭ-99, БДЭ-100 [8, 16].

Основной путь поступления ПБДЭ в организм человека – с пищей, особенно содержащей большое количество жира, например, жирной рыбой. Сообщается о содержании ПБДЭ в овощах, мясе (свинина, говядина), растительных маслах, морской рыбе, моллюсках и ракообразных, яйцах до 569,3 мкг/г. Наиболее загрязненным ПБДЭ продуктом является жир печени рыб, используемый как биологически активная добавка – до 2100 мкг/г. Имеются также данные о загрязнении пресноводной рыбы [8,16]. В зерновых, фруктах и корнеплодах ПБДЭ не обнаружены. Более низкобробированные конгены (тетра-, пента-) могут содержаться в воздухе и проникать в организм человека в результате вдыхания.

Изучение научной литературы показало, что определение содержания ПБДЭ чаще всего проводят методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ), применяя капиллярные колонки

с неполярными (100%-метилполисилоксан) и низкополярными жидкими фазами (5%-фенилдиметилполисилоксан, 5%-фенил-(арилен)-95%-метилполисилоксан). Детектирование при определении ПБДЭ методом ГЖХ может проводиться с использованием масс-спектрометрического (МС, МС-МС) или электрозахватного (ДЭЗ) детекторов [2,3,6,10,13]. ДЭЗ используется для определения относительно высоких концентраций ПБДЭ, что может быть применимо в целях мониторинга ПБДЭ.

Газохроматографическое определение ПБДЭ имеет ряд сложностей. ПБДЭ обладают низкой летучестью, и для их газохроматографического определения требуются высокие температуры. Однако высокобробированные конгены ПБДЭ, например БДЭ-209, могут быть при этом нестабильны, поэтому авторы [2,10] рекомендуют использовать короткие колонки для сокращения времени температурного воздействия на пробу. Кроме того, в связи с присутствием в окружающей среде различных галогенсодержащих контаминантов, при хроматографировании ПБДЭ могут совместно элюироваться с хлорорганическими пестицидами (ХОП), полихлорированными бифенилами (ПХБ) или с другими конгенерами ПБДЭ. Например, такими критическими парами являются ПХБ 194 и БДЭ-120, ПХБ 180 и БДЭ-47, ПХБ 194 и БДЭ-120. Указанных выше проблем в некоторых случаях можно избежать путем подбора оптимального температурного режима колонки и скорости газа-носителя [3,8]. Фракционирование пробы методами колоночной хроматографии или методом ГФЭ с выделением отдельных фракций ПБДЭ, ХОП и ПХБ перед хроматографированием также позволяет решить проблему совместно элюирующихся примесей [2, 10, 12, 14].

Для экстракции ПБДЭ используют полярные растворители (хлороформ, ацетон, дихлорметан) или комбинации неполярных и полярных или слабополярных растворителей (гексан – ацетон (1:1, 3:1), гексан – дихлорметан (9:1), циклогексан – ацетон (3:1), дихлорметан – гексан (25:75), гексан – эфир, петролейный эфир – диэтиловый эфир). Для извлечения ПБДЭ могут применяться традиционные для извлечения жира растворители: смеси хлороформ – метанол (2:1) или хлороформ – этанол (2:1) [10, 16].

Экстракция ПБДЭ по Сокслету является эффективной, так как образец находится в контакте с горячим растворителем (гексан, дихлорметан, смеси растворителей) [2, 9, 10, 12].

Однако такие способы экстракции требуют больших количеств растворителя и затрат времени (6–24 ч).

Используют также ускоренную экстракцию растворителями (ASE), экстракцию под давлением (PLE) [7, 10, 11]. Авторы [6, 14, 15] рекомендуют для извлечения ПБДЭ экстракцию PLE при температурах 60–150 °С, давлении 7–14 МПа.

Исследователями [2] предложена ускоренная техника экстракции в присутствии микроволнового излучения (MAE). Такая техника экстракции требует небольших количеств растворителей, может быть автоматизирована, однако является дорогостоящей.

Для экстракции ПБДЭ может применяться метод твердофазной экстракции (ТФЭ), позволяющий сократить расход растворителей для экстракции и время пробоподготовки, совместить стадии экстракции и очистки экстракта [6]. Также используются картриджи для ТФЭ с нейтральным наполнителем (силикагель) для одновременной экстракции ПБДЭ и очистки экстрактов из рыбы [4].

При экстракции ПБДЭ из многокомпонентной пищевой матрицы в растворитель переходят совместно экстрагирующиеся вещества (липиды, гуминовые кислоты, каротиноиды). Наиболее полная экстракция аналитов, например, смесью гексан – ацетон, приводит к практически полному извлечению липидов из образца. В случае жирной рыбы при навеске образца 5 г количество извлеченных может составлять 0,5 г. В связи с этим очистке экстракта при определении ПБДЭ уделится большое внимание.

Применяемые для очистки экстракта методы можно разделить на методы, разрушающие и не разрушающие липиды. Очистка экстракта ПБДЭ с разрушением липидов может осуществляться обработкой экстракта концентрированной серной кислотой или этанольным раствором щелочи [3, 9, 13]. Для неразрушающей липиды очистки используют нейтральные адсорбенты: силикагель, флоризил, оксид алюминия [3, 7]. Применяются многослойные адсорбционные колонки с несколькими адсорбентами одновременно [4, 11, 12]. Возможно комбинирование разрушающих и неразрушающих липиды методов с применением смеси силикагеля с серной кислотой [2, 4].

В работах [2, 12] предлагают для очистки экстракта применять метод гелепроникающей хроматографии (ГПХ) на колонках с наполнителем на основе полистиролдивинилбензола,

а дополнительную очистку осуществлять с использованием флоризила или силикагеля. Очистка методом твердофазной экстракции (ТФЭ) может быть проведена с использованием картриджа с нейтральным наполнителем (силикагель, флоризил), модифицированным адсорбентом с привитыми функциональными группами, многослойными комбинированными фазами [4, 13]. При очистке экстракта могут также применяться комбинации вышеперечисленных методов [2, 4, 9, 12].

Растущий интерес к влиянию ПБДЭ на окружающую среду привел к необходимости разработки аналитических методов их количественного определения в широком спектре природных объектов, в том числе в продуктах питания, которые являются основным путем поступления ПБДЭ в организм человека. Несмотря на глобальное распространение и тенденцию увеличения содержания ПБДЭ в тканях человека и биоте, в Республике Беларусь содержание ПБДЭ не регламентировано и официальные методики их определения в объектах окружающей среды отсутствуют. Разработка гигиенических нормативов и методик выполнения измерений по определению ПБДЭ позволит контролировать уровень загрязнения ими окружающей среды.

Цель работы – разработка методики определения ПБДЭ в рыбе и рыбной продукции. Для этого необходимо было решить следующие задачи: установить оптимальные условия хроматографирования, разработать условия экстракции, изучить различные методы очистки с целью установления оптимальных, разработать методику определения ПБДЭ и установить ее метрологические характеристики.

Материалы и методы. Изучены условия хроматографирования и методы очистки экстракта при определении БДЭ-47, БДЭ-99 и БДЭ-209 в рыбе и рыбной продукции.

Исследования условий хроматографирования проведены с использованием стандартных растворов БДЭ-47, БДЭ-99 в гексане с концентрацией 0,0001; 0,001; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 мкг/см³; БДЭ-209 с концентрацией 0,001; 0,01; 0,1; 0,5 мкг/см³ в гексане; смеси ХОП (изомеров гексахлорциклогексана (ГХЦГ), ДДТ и его метаболитов ДДЕ и ДДД, альдрин, гептахлор) и ПХБ (смесь ПХБ 28, 52, 101, 138, 153, 180, 209) с концентрацией 0,1 мкг/см³ в гексане.

При изучении условий хроматографирования ПБДЭ применяли различные по полярности и длине кварцевые капиллярные колонки: не-

полярная HP-1 (100%-диметилполисилоксан) длиной 30 м; низкополярная DB-5 (5%-фенил-метилполисилоксан) длиной 30 м; среднеполярная HP-50+ (50%-фенил-метилполисилоксан) длиной 30 м; неполярная DB-1 (100%-диметилполисилоксан) длиной 15 м.

Исследования по изучению условий очистки экстрактов проведены на образцах рыбы и рыбной продукции (пюре для детского питания из рыбы, хек свежемороженый, скумбрия свежемороженая). Выделение жира из рыбы и рыбной продукции проводили смесью гексан – ацетон (1:1). Масса пробы составляла 5 г. После удаления растворителей на ротонном испарителе полученный жир взвешивали и использовали для изучения условий очистки. Количество жира, выделенного из одной пробы, составляло 0,2–0,5 г.

При проведении очистки проб использовали концентрированную серную кислоту по ГОСТ 4204-77; адсорбенты силикагель и флоризил производства Macherey-Nagel (0,063–0,200 мм); картриджи для ТФЭ Chromabond SiOH, Florisil®, NH₂, CN, OH; SiOH-H₂SO₄/SA, SA/SiOH, NAN производства Macherey-Nagel, объемом 3 и 6 см³, содержащие 500–1000 мг адсорбента.

Анализ проводили на газовом хроматографе «Хроматэк Кристалл 5000.2», оснащенном ДЭЗ. В качестве газа-носителя использовали водород.

Результаты и их обсуждение. Изучены температурные режимы хроматографирования ПБДЭ, влияние скорости и величины деления потока газа-носителя на их определение на приведенных выше капиллярных колонках.

Показано, что применение колонок HP-1, DB-5, HP-50+, DB-1 не удовлетворяет условиям одновременного определения БДЭ-47, БДЭ-99 и БДЭ-209, сильно отличающихся по летучести. Для определения БДЭ-47 и БДЭ-99 выбрана колонка DB-5, а для определения БДЭ-209 – колонка DB-1, на которых изучены параметры хроматографирования. Установлены оптимальные значения температур детектора – 300 °С, испарителя – 260–270 °С. Проведено изучение величины деления потока газа-носителя в испарителе при хроматографировании ПБДЭ. Оптимальной величиной деления потока выбрано значение 1:10, обеспечивающее достаточную площадь пика для определения БДЭ-47 и БДЭ-99 на уровне 0,0001 мкг/см³ при объеме вводимой пробы 2 мкл. При определении БДЭ-209 использование ввода пробы с делением потока газа-носителя ухудшало воспроизво-

димость результатов. Кроме того, наблюдался «эффект матрицы»: в присутствии примесей, характерных для пробы, наблюдалось увеличение пика БДЭ-209 в 4 раза. В связи с этим определение БДЭ-209 проводили без деления потока, в присутствии примесей пищевой матрицы.

Изучено разделение смеси веществ, содержащихся в природных объектах и проявляющих сходные свойства, – ХОП, ПХБ, ПБДЭ. При хроматографировании стандартного раствора смеси ПБДЭ, ХОП и ПХБ с концентрацией 0,1 мкг/см³ на колонке DB-5, выбранной для определения БДЭ-47 и БДЭ-99, наблюдалось перекрывание пиков, близких по свойствам БДЭ-47 и ПХБ-180. Установлено, что в этом случае при программировании температуры колонки с увеличением продолжительности температурного участка программы при 220 °С улучшалось разделение критической пары БДЭ-47 и ПХБ 180. Наилучшие результаты были достигнуты при использовании программирования, начиная с 90 °С со скоростью 15 °/мин до 220 °С, далее повышение температуры до 300 °С со скоростью 8 °С/мин. Это позволяет проводить определение БДЭ-47 и БДЭ-99 в присутствии схожих по свойствам ХОП и ПХБ, а также исключить при проведении пробоподготовки фракционирование ПХБ и ПБДЭ.

При программировании температуры колонки DB-1 с уменьшением продолжительности высокотемпературного участка при 300 °С и увеличении скорости набора температуры улучшалась форма пика, уменьшалась ширина, что может быть связано с уменьшением разложения БДЭ-209 при температуре. Использование режима программирования температуры колонки DB-1 (110 °С – 30 °С/мин – 200 °С (3 мин) – 60 °С – 300 °С) позволяет уменьшить высокотемпературное воздействие на БДЭ-209, улучшить характеристики пика. Увеличение продолжительности температурного участка программы при 200 °С позволяет эффективно отделить на хроматограмме пики примесей. Полученные хроматограммы приведены на рис. 2, 3.

При выбранных оптимальных условиях хроматографирования установлено, что графики зависимости площадей пиков БДЭ-47 и БДЭ-99 от концентрации растворов линейны в широком диапазоне 0,0001–0,1 мкг/см³; график зависимости площади пика БДЭ-209 от концентрации раствора линейен при содержании БДЭ-209 в диапазоне 0,001–0,3 мкг/см³. Определение БДЭ-47 и БДЭ-99 в рыбе и рыбной продукции при массе

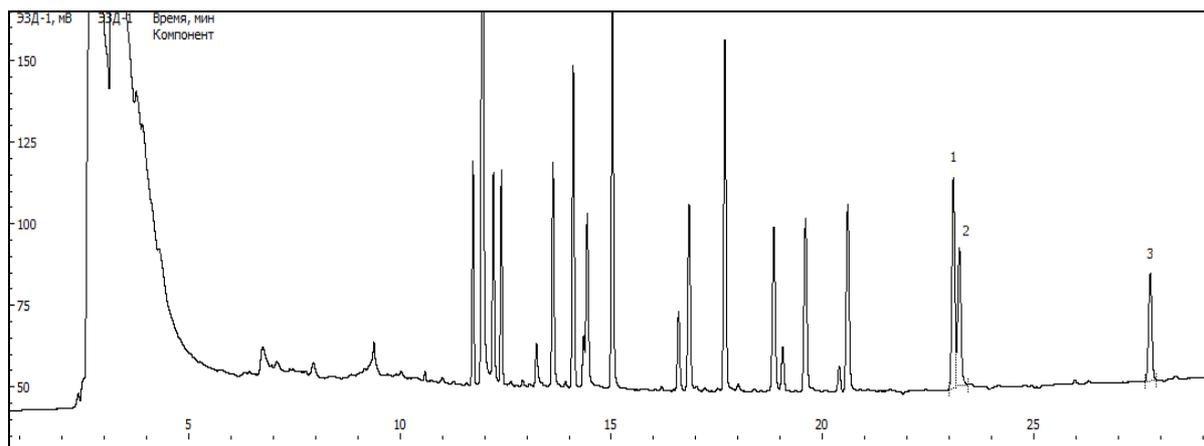


Рис. 2. Хроматограмма стандартного раствора смеси ХОП, ПХБ и ПБДЭ.
Пики: 1 – ПХБ 180; 2 – БДЭ-47; 3 – БДЭ-99

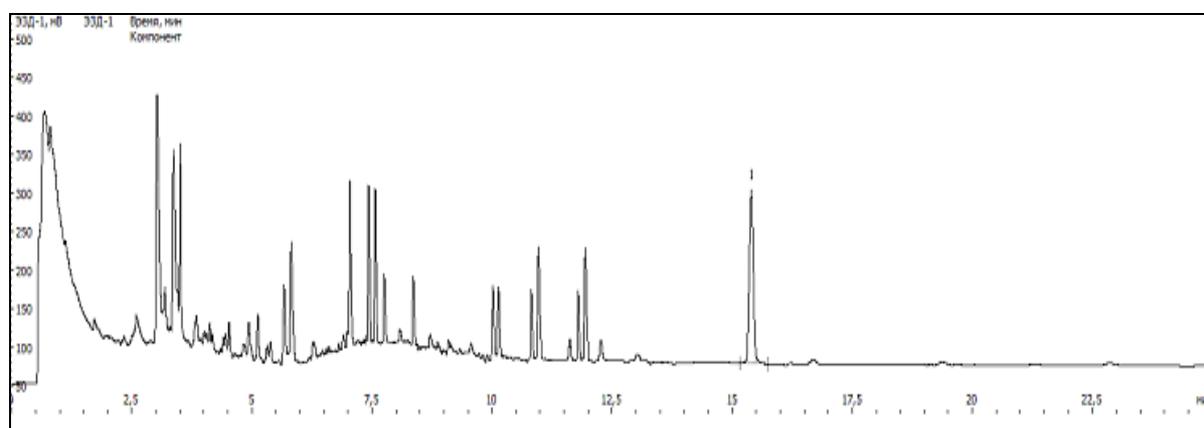


Рис. 3. Хроматограмма пробы рыбы с внесением стандартного раствора БДЭ-209.
Пики: 1 – БДЭ-209

пробы 5 г возможно на уровне 0,0002 мг/кг, а БДЭ-209 – на уровне 0,002 мг/кг.

Исследованы условия очистки экстракта от совместно экстрагирующихся липидов при применении разрушающих и неразрушающих липиды методов очистки: концентрированной серной кислоты; метода перераспределения между двумя несмешивающимися жидкостями (жидкость-жидкостная экстракция, экстракционный метод); на колонке с использованием адсорбентов; методом твердофазной экстракции (ТФЭ). При проведении очистки экстракционным методом использовали двухфазные системы «алифатический углеводород – полярный органический растворитель», применяемые для выделения таких гидрофобных соединений, как ХОП, ПХБ: гексан – ДМФА, гексан – ДМСО, гексан – ацетонитрил. При изучении очистки экстракта методом колоночной хроматографии применяли нейтральные адсорбенты (силикагель, флоризил) и растворители и смеси раство-

рителей различной полярности: гексан, гексан – диэтиловый эфир (94:6; 85:15; 3:1), гексан – дихлорметан (1:1). Масса адсорбента составляла 4–8 г (дальнейшее увеличение массы адсорбента приводит к большому расходу растворителей и времени пробоподготовки). Изучение очистки экстракта методом ТФЭ осуществляли с использованием картриджей на основе силикагеля или флоризила (SiOH, Florisil®, NH₂, CN, OH) и картриджей с комбинированным адсорбентом (SiOH-H₂SO₄/SA, SA/SiOH, NAN).

Установлено, что для проведения очистки экстракта при определении ПБДЭ в рыбной продукции может применяться однократное воздействие концентрированной серной кислотой в течение 10 мин при соотношении фаз «гексан – серная кислота» (5:1). При этом разрушение липидов проходит на 82,3 %. Очистка применима для проб с большим содержанием жира – до 0,5 г. Воздействие серной кислоты на ПБДЭ в растворе незначительно. Очистка с при-

менением концентрированной серной кислоты удовлетворяет условиям количественного определения БДЭ-47, БДЭ-99 и БДЭ-209, однако является недостаточной для дальнейшего газохроматографического анализа.

Изучен способ проведения очистки экстракционным методом (перераспределение между двумя несмешивающимися жидкостями различной полярности; жидкость – жидкостная экстракция). Использовали двухфазные системы «алифатический углеводород – полярный органический растворитель», применяемые для экстракционного выделения таких гидрофобных соединений, как ХОП, ПХБ: гексан – ДМФА, гексан – ДМСО, гексан – ацетонитрил. Определяли величины констант распределения БДЭ-47, БДЭ-99 и БДЭ-209, характеризующие эффективность выделения целевых компонентов, степень извлечения [1].

Установлено, что при использовании в качестве полярной фазы ДМФА и ДМСО и соотношения фаз «гексан – полярный растворитель» (1:1), константы распределения ПБДЭ были меньше единицы (0,11–0,30) – вещество переходит в полярную фазу. Наиболее эффективно из неполярного растворителя ПБДЭ экстрагируются диметилформамидом – степень извлечения составляла 88,7–89,6 %. Для БДЭ-209 во всех изученных системах растворителей степень извлечения была меньше, чем для БДЭ-47 и БДЭ-99. Оптимальным может считаться соотношение фаз «гексан – ДМФА» (1:2), при котором степень очистки составляла 74,2 %, а степень извлечения изученных ПБДЭ – 89,0–93,8 %. Увеличение количества жира в пробе до 0,5 г существенно не влияло на степень извлечения ПБДЭ. Однако применение данного метода требует осуществления дополнительной стадии очистки.

При изучении очистки экстракта методом колоночной хроматографии на нейтральных адсорбентах (силикагель, флоризил) использовали растворители и смеси растворителей различной полярности: гексан, гексан – диэтиловый эфир (94:6; 85:15; 3:1), гексан – дихлорметан (1:1). Известно, что ПБДЭ элюируются в полярной фракции, а промывание колонки неполярным растворителем позволяет отделить плохо сорбирующиеся компоненты пробы. Однако выход БДЭ-47, БДЭ-99 и БДЭ-209 наблюдался уже в первой фракции (масса адсорбента – 4 г, высота слоя адсорбента – 11 см, объем 1 фракции – 10 см³) и составлял 5,9–8,0 %. Основное количество ПБДЭ элюировалось во второй фракции, независимо от полярности ис-

пользуемого элюента: выход ПБДЭ составлял 82,9–89,1 %. Для всех изученных элюентов установлены сравнимые значения выхода ПБДЭ по фракциям. Объем элюента, обеспечивающий полный выход ПБДЭ, составлял 30 см³.

Установлено, что при элюировании смеси ХОП, ПХБ и ПБДЭ неполярным растворителем не наблюдалось четкого разделения указанных веществ по фракциям: элюирование ХОП и ПХБ частично происходило совместно с ПБДЭ.

При увеличении массы адсорбента степень очистки экстракта увеличивалась незначительно. Движение липидной фракции регистрировалось визуально и проходило со скоростью потока элюента. Выход липидной фракции, как и выход ПБДЭ, наблюдался уже в первых 10 см³ элюента. Степень извлечения ПБДЭ при этом также существенно не изменялась. Аналогичные данные получены и с использованием флоризила.

Таким образом, применение для очистки экстракта колоночной хроматографии с использованием силикагеля и флоризила удовлетворяет условиям количественного определения БДЭ-47, БДЭ-99 и БДЭ-209, однако не обеспечивает достаточную степень очистки от липидов, является трудоемким, времязатратным процессом.

При изучении очистки экстракта ПБДЭ методом ТФЭ установлено, что при использовании картриджей на основе силикагеля или флоризила (SiOH, Florisil[®], NH₂, CN, OH) и неполярного элюента (гексан) БДЭ-47, БДЭ-99 и БДЭ-209 полностью выходили в первой неполярной фракции, в последующих более полярных фракциях ПБДЭ не обнаружены. Степень извлечения при очистке на указанных картриджах составляла 98,0–101,5 % и отличалась незначительно для различных модификаций адсорбента. При использовании картриджей с комбинированным адсорбентом (SiOH-H₂SO₄/SA, SA/SiOH, NAN) ПБДЭ выходили во второй слабополярной фракции, что, по-видимому, связано с наличием ионного взаимодействия ПБДЭ и адсорбента. Степень извлечения составляла 98,5–101,7 %.

Показано, что объем элюента при очистке экстракта ПБДЭ с использованием картриджей объемом 3 см³ должен составлять не менее 9 см³. Наилучшие результаты по очистке получены с использованием картриджей с комбинированным адсорбентом (силикагель в смеси с катионообменной бензилсульфоновой кислотой) при содержании жира в пробе до 0,05 г.

Сравнение изученных методов очистки при определении БДЭ-47, БДЭ-99 и БДЭ-209 приведено в таблице.

Сравнительная характеристика методов очистки

Параметр	Метод очистки			
	1	2	3	4
	Очистка конц. серной кислотой	Экстракционная очистка	Очистка на колонке с адсорбентами	Очистка методом ТФЭ
Количество жира в пробе, г	< 0,5	< 0,3	< 0,2	< 0,1
Степень извлечения ПБДЭ, %	98,4–99,2	92,5–96,8	97,4–98,5	98,5–101,3
Степень очистки, %	82,3	62,5	63,5–79,3	81,5–83,2
Время выполнения, мин	< 20	< 30	60–120	< 15
Количество растворителей, см ³	–	50–100	50–100	10–50
Дополнительное оборудование	Не требует	Не требует	Не требует	Система для ТФЭ с вакуумным насосом
Недостатки	Агрессивн. реактив	–	Трудоемкий (подготовка адсорбента)	Высокая стоимость расходн. материалов – картриджей
Применимость для очистки экстракта	Основная очистка	Основная очистка	Дополнит. очистка	Дополнит. очистка

Так, учитывая количество жира в пробе и степень очистки, которую обеспечивает метод, методы 1 и 2 могут быть применимы на первой стадии очистки, методы 3 и 4 – как дополнительная стадия очистки. Методы 1, 2 и 4 имели минимальное время проведения, что важно при мониторинговых исследованиях, а методы 1 и 4, кроме того, преимущество по количеству используемых растворителей. Незначительное влияние на концентрацию изученных ПБДЭ в процессе очистки экстрактов делает возможным комбинирование изученных методов. Оптимальным является сочетание очистки экстракта концентрированной серной кислотой (метод 1) и дополнительной очистки на картриджах для ТФЭ с комбинированным адсорбентом (метод 4).

На основе проведенных исследований разработана методика определения ПБДЭ (БДЭ-47, БДЭ-99 и БДЭ-209) в рыбе и рыбной продукции. Метод основан на экстракции ПБДЭ из пробы рыбы смесью гексан – ацетон (3:1). К навеске продукта массой (5 г) добавляют 20 г безводного сульфата натрия, перетирают до рассыпчатого состояния. Экстракцию ПБДЭ проводят 30 см³ смеси гексан – ацетон (3:1) дважды при центрифугировании (10 мин при скорости вращения 5000 об./мин). Для дальнейшего анализа количество жира должно составлять не более 0,5 г.

После отгонки растворителей и растворения сухого остатка в 30 см³ гексана проводят очистку экстракта концентрированной серной кислотой в делительной воронке в течение 10 мин. Соотношение фаз «гексан – серная кислота» – 5:1. Вторую стадию очистки проводят методом ТФЭ с использованием картриджей SiOH-H₂SO₄/SA и 10 см³ гексана в качестве элюента.

Газохроматографический анализ при определении БДЭ-47 и БДЭ-99 осуществляют на низкополярной капиллярной колонке DB-5 (30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм) при программировании температуры колонки; при определении БДЭ-209 – на неполярной капиллярной колонке DB-1 (15 м × 0,25 мм × 0,1 мкм) при программировании температуры колонки (условия программирования приведены выше).

Содержание БДЭ-47 и БДЭ-99 рассчитывают методом калибровки с внутренним стандартом (БДЭ-85), БДЭ-209 – методом абсолютной калибровки. При определении БДЭ-209 используется матричная калибровка. Диапазон концентраций градуировочных растворов для определения БДЭ-47 и БДЭ-99 – 0,005–0,05 мкг/см³, БДЭ-209 – 0,05–0,3 мкг/см³. Диапазон измерения БДЭ-47 и БДЭ-99 составляет 0,0002–0,05 мг/кг исследуемого продукта; диапазон измерения БДЭ-209 – 0,002–0,3 мг/кг.

Расчитаны метрологические характеристики методики. Расширенная стандартная неопределенность измерений БДЭ-47, БДЭ-99 и БДЭ-209 составляет 27,4–37,2 %.

Выводы. Таким образом, разработана методика определения полибромдифениловых эфиров в рыбе и рыбной продукции, включающая стадии экстракции, очистки экстракта и количественного определения методом газожидкостной хроматографии с электрозахватным детектором. Диапазон измерения БДЭ-47 и БДЭ-99 составляет 0,0002–0,05 мг/кг исследуемого продукта; диапазон измерения БДЭ-209 – 0,002–0,3 мг/кг. Разработанная методика позволит контролировать содержание ПБДЭ в рыбе и рыбной продукции с целью гигиенического мониторинга загрязнения продуктов питания стойкими органическими загрязнителями в Республике Беларусь.

Список литературы

1. Коренман И.М. Экстракция в анализе органических веществ. – М.: Химия, 1970. – 200 с.
2. Bayen S., Lee H. K., Obbard J. P. Determination of polybrominated diphenyl ethers in marine biological tissues using microwave-assisted extraction // J. of Chromatography A. – 2004. – № 1035. – P. 291–294.
3. Covaci A., Voorspoels S., de Boer J. Determination of brominated flame retardants, with emphasis on polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in environmental and human samples // Environment International. – 2003. – № 29. – P. 735–756.
4. Development of a matrix solid-phase dispersion method for the screening of polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls in biota samples using gas chromatography with electron-capture detection / A. Martínez, M. Ramil, R. Montes, D. Hernanz, E. Rubi, I. Rodriguez, R. Cela Torrijos // J. of Chromatography A. – 2005. – № 1072. – P. 83–91.
5. Eljarrat E., de la Cal A., Barceló D. Potential chlorinated and brominated interferences on the polybrominated diphenyl ether determinations by gas chromatography – mass spectrometry // J. of Chromatography A. – 2003. – № 1008. – P. 181–192.
6. Evaluation of for capillary columns for the analysis of organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in human serum for epidemiologic studies / E. Rogers, M. Petreas, J.-S. Park, G. Zhao, M.J. Charles // J. of Chromatography B. – 2004. – № 813. – P. 269–285.
7. Gensler M., Honikel K.O. Development and evaluation of a methods for the determination of polybrominated diphenylethers (PBDE) in food and feed // Tagung Brominated Flame Retardants 2007, Amsterdam, Niederlande, 24. – 27.04.2007.
8. Hellstrom T. Brominated flame retardants (PBDE and PBB) in sludge – a problem? // VAV, The Swedish Water and Wastewater Association: Report № M 113 (eng). – 2000. – 31 p.
9. Johnson A., Olson N. Analysis and occurrence of polybrominated diphenyl ethers in Washington State freshwater fish // Arch. Environ. Contam. Toxicol. – 2001. – № 41. – P. 339–344.
10. Król S., Zabiegała B., Namieśnik J. PBDEs in environmental samples: Sampling and analysis // Talanta. – 2012. – № 93. – P. 1–17.
11. Liquori L., Bjørsvik H.R. Extraction, isolation, and purification of analytes from samples of marine origin – A multivariate task // J. of Chromatography B. – 2012. – № 910. – P. 46–53.
12. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in foodstuffs: human exposure through the diet / A. Bocio, J.M. Llobet, J.L. Domingo, J. Corbella, A. Teixido, C.Casas // J. Agric. Food Chem. – 2003. – № 51. – P. 3191–3195.
13. Polybrominated diphenyl ethers in breast milk from Uppsala County, Sweden / Y. Lind, P.O. Darnerud, S. Atuma, M. Aune, W. Becker, R. Bjerselius, S. Cnattingius, A. Glynn / Environmental Research. – 2003. – № 93. – P. 186–194.
14. Pressurized liquid extraction for the simultaneous analysis of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers from soil by GC-TOF-MS detection / H.-M. Park, S.-M. Hong, M.R. Augustin-Camacho, W. Dirwono, K.-B. Lee // J. of Chromatographic Science. – 2009. – № 47. – P. 681–688.
15. The analysis of halogenated flame retardants by GC-HRMS in environmental samples / T.M. Kolic, L. Shen, K. MacPherson, L. Fayez, T. Gobran, P.A. Helm, C.H. Marvin, G.Arsenault, E.J. Reiner // Journal of Chromatographic Science. – 2009. – № 47. – P. 83–91.
16. Toxicological profile for polybrominated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers – U.S. Department of health and human services. Public health service. Agency for toxic substances and disease registry. – 2004. – 619 p.

Тимофеева О.Н., Гринкевич И.С., Шуляковская О.В. Методика определения полибромдифениловых эфиров в рыбе и рыбной продукции методом газожидкостной хроматографии // Анализ риска здоровью. – 2016. – №3. – С. 70–79. DOI: 10.21668/health.risk/2016.3.08

METHOD OF DETERMINING OF POLYBROMINATED DIPHENYL ETHERS IN FISH AND FISH PRODUCTS BY THE METHOD OF LIQUID CHROMATOGRAPHY

O.N. Timofeeva, I.S. Grinkevich, O.V. Shulyakovskaya

RUE "Scientific practical center of hygiene", 8 Academicheskaya St., Minsk, 220012, Belarus

The aim of the work was to develop a methodology for determining of polybrominated diphenyl ethers (PBDE) in fish and fish products for the control of impurities content in the food and environmental objects in general. The conditions of chromatography (temperature conditions, the impact of the speed and magnitude of dividing of the gas-carrier stream using a HP-1 capillary columns, the DB-5, HP-50 +, DB-1;) and lipids destructive and non-destructive cleaning methods of extract during the determination of PBDEs. The method of determination of 2,2,4,4-Tetrabromodiphenyl ether (BDE-47), 2,2,4,4,5-pentabromodiphenyl ether (BDE-99) and decabromodiphenyl ether (BDE-209) in fish and fish products by the liquid chromatography with electron detector was suggested. The method of PBDE is based on the extraction of samples with hexane-acetone (3:1), purification of the extract with concentrated sulfuric acid (phase ratio hexane-sulfuric acid – 5:1). The second purification step is carried out by using solid phase extraction cartridges «SiOH-H₂SO₄/SA» and hexane as the eluent. Gas chromatographic analysis of the determination of BDE-47 and BDE-99 is carried out on low-polar capillary column DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm) with the programming of the column temperature. In determining the BDE-209 a DB-1 nonpolar capillary column was used (15 m x 0.25 mm x 0.1 μm) with the column temperature programming.

Calculation of the content of BDE-47 and BDE-99 is carried out with the internal standard (2,2, 3,4,4-pentabromodiphenyl ether (BDE-85)), BDE-209 by absolute calibration. In determining the BDE-209 the calibration matrix was used. The range of concentrations of the calibration solutions for the determination of BDE-47 and BDE-99 is 0.005–0.05 g/cm³, for BDE-209 0.05–0.3 g/cm³. The technique allows the measurement of BDE-47 and BDE-99 in the range of 0.0002–0.05 mg/kg of the product concerned; BDE-209 – in the range of 0.002–0.3 mg/kg. The metrological characteristics of the method were calculated.

Key words: polybrominated diphenyl ethers, 2,2,4,4-Tetrabromodiphenyl ether, 2,2,4,4,5-pentabromodiphenyl ether, decabromodiphenyl ether, fish, fish products, gas-liquid chromatography, electron capture detector.

References

1. Korenman I.M. Jekstrakcija v analize organicheskih veshhestv [Extraction in the analysis of organic substances]. Moscow: Himija, 1970, 200 p. (in Russian).
2. Bayen S., Lee H. K., Obbard J. P. Determination of polybrominated diphenyl ethers in marine biological tissues using microwave-assisted extraction. *J. of Chromatography A*, 2004, no. 1035, pp. 291–294.
3. Covaci A., Voorspoels S., de Boer J. Determination of brominated flame retardants, with emphasis on polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in environmental and human samples. *Environment International*, 2003, no. 29, pp. 735–756.
4. Martínez A., Ramil M., Montes R., Hernanz D., Rubi E., Rodriguez I., Cela R. Torrijos. Development of a matrix solid-phase dispersion method for the screening of polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls in biota samples using gas chromatography with electron-capture detection. *J. of Chromatography A*, 2005, no. 1072, pp. 83–91.
5. Eljarrat E., de la Cal A., Barceló D. Potential chlorinated and brominated interferences on the polybrominated diphenyl ether determinations by gas chromatography – mass spectrometry. *J. of Chromatography A*, 2003, no. 1008, pp. 181–192.
6. Rogers E., Petreas M., Park J.-S., Zhao G., Charles M. J. Evaluation of for capillary columns for the analysis of organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in human serum for epidemiologic studies. *J. of Chromatography B*, 2004, no. 813, pp. 269–285.

© Timofeeva O.N., Grinkevich I.S., Shulyakovskaya O.V., 2016

Timofeeva Ol'ga Nikolaevna – leading chemist of Laboratory of Food Chemistry (e-mail: rspch@rspch.by; tel.: +7 (375) 284-13-80).

Grinkevich Irina Sergeevna – chemist of Laboratory of Food Chemistry (e-mail: rspch@rspch.by; tel.: +7 (375) 284-13-80).

Shulyakovskaya Ol'ga Vasilievna – Candidate of Chemistry Sciences, Head of Food Products Chemical Laboratory (e-mail: rspch@rspch.by; tel.: +7 (375) 284-13-80).

7. Gensler M., Honikel K.O. Development and evaluation of a methods for the determination of polybrominated diphenylethers (PBDE) in food and feed. *Tagung Brominated Flame Retardants 2007*, Amsterdam, Niederlande, 24, 27.04.2007.
8. Hellstrom T. Brominated flame retardants (PBDE and PBB) in sludge – a problem? *VAV, The Swedish Water and Wastewater Association: Report no. M 113 (eng)*, 2000, 31 p.
9. Johnson A., Olson N. Analysis and occurrence of polybrominated diphenyl ethers in Washington State freshwater fish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 2001, no. 41, pp. 339–344.
10. Król S., Zabiegała B., Namieśnik J. PBDEs in environmental samples: Sampling and analysis. *Talanta*, 2012, no. 93, pp. 1–17.
11. Liquori L., Bjørsvik H.R. Extraction, isolation, and purification of analytes from samples of marine origin – A multivariate task. *J. of Chromatography B*, 2012, no. 910, pp. 46–53.
12. Bocio A., Llobet J.M., Domingo J.L., Corbella J., Teixido A., Casas C. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in foodstuffs: human exposure through the diet. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, no. 51, pp. 3191–3195.
13. Lind Y., Darnerud P.O., Atuma S., Aune M., Becker W., Bjerselius R., Cnattingius S., Glynn A. Polybrominated diphenyl ethers in breast milk from Uppsala County, Sweden. *Environmental Research*, 2003, no. 93, pp. 186–194.
14. Park H.-M., Hong S.-M., Augustin-Camacho M.R., Dirwono W., Lee K.-B. Pressurized liquid extraction for the simultaneous analysis of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers from soil by GC-TOF-MS detection. *J. of Chromatographic Science*, 2009, no. 47, pp. 681–688.
15. Kolic T.M., Shen L., MacPherson K., Fayez L., Gobran T., Helm P.A., Marvin C.H., Arsenault G., Reiner E.J. The analysis of halogenated flame retardants by GC-HRMS in environmental samples. *Journal of Chromatographic Science*, 2009, no. 47, pp. 83–91.
16. Toxicological profile for polybrominated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers – U.S. Department of health and human services. Public health service. *Agency for toxic substances and disease registry*, 2004, 619 p.

Timofeeva O.N., Grinkevich I.S., Shulyakovskaya O.V. Method of determining of polybrominated diphenyl ethers in fish and fish products by the method of liquid chromatography. Health Risk Analysis. 2016, no. 3, pp. 70–79. DOI: 10.21668/health.risk/2016.3.08.eng