

УДК 628.394.1:574.632(265.53)

**А.П. Черняев, Е.Ю. Рычкова, Н.Б. Кондриков, Е.Н. Зык\***

Дальневосточный федеральный университет,  
690922, г. Владивосток, о. Русский, пос. Аякс, 10

## СОВРЕМЕННАЯ МОДИФИКАЦИЯ СПОСОБА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ХОП В ОРГАНИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ

Разработан метод определения хлорорганических пестицидов (ДДТ и его метаболиты, ГХЦГ и его изомеры, ГХБ), включающий в себя жидкость — жидкостную экстракцию пестицидов под действием ультразвуковых колебаний и последующим анализом исследуемых веществ методом газожидкостной хроматографии. Степень извлечения ДДТ и  $\gamma$ -ГХЦГ из тканей гидробионтов составила соответственно  $78 \pm 2$  и  $91 \pm 2$  %. Показано, что суммарное содержание ХОП в мышцах минтая, выловленного в Охотском море, находилось в пределах от 25 до 73 мкг/г липидов.

**Ключевые слова:** ДДТ, ГХЦГ, ГХБ, газожидкостная хроматография, гидробионты.

**Chernyaev A.P., Rychkova E.Yu., Kondrikov N.B., Zyk E.N.** Modern modification of the method for determination of organochlorine pesticides in organic vehicles // *Izv. TINRO*. — 2017. — Vol. 188. — P. 244–250.

New method for determination of organochlorine pesticides (DDT and its metabolites, HCH and its isomers) is presented. The method includes a liquid-liquid extraction of pesticides under ultrasound and the substance analysis by gas-liquid chromatography. The degree of DDT and  $\gamma$ -HCH extracting from tissues of marine organisms is  $(78 \pm 2)$  % and  $(91 \pm 2)$  %, respectively. The total content of organochlorine pesticides in muscles of walleye pollock from the Okhotsk Sea is evaluated by this method in the range from 25 to 73  $\mu\text{g/g}$  of lipids.

**Key words:** DDT, HCH, HCB, gas chromatography, walleye pollock.

### Введение

Пестициды — особая группа химических соединений, являющихся ксенобиотиками, преднамеренно вносимыми в компоненты окружающей среды с целью уничтожения определенных живых организмов. Большинство из используемых пестицидов были разработаны в середине прошлого века и являются стабильными и высоко устойчивыми в окружающей среде, поэтому, кроме ожидаемых положительных эффектов (сохранение урожая), они способны длительное время сохраняться в неизменном виде в компонентах экосистем, накапливаться по трофическим цепям, попадать в организм человека и крайне негативно влиять на его здоровье, а также на биологическое разнообразие и нормальное функционирование живых организмов (Ноймайстер, 2003).

---

\* Черняев Андрей Павлович, кандидат химических наук, заведующий лабораторией, старший научный сотрудник, e-mail: [chernyaev.ap@dvfu.ru](mailto:chernyaev.ap@dvfu.ru); Рычкова Екатерина Юрьевна, магистрант, e-mail: [k-rychkova@mail.ru](mailto:k-rychkova@mail.ru); Кондриков Николай Борисович, доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой, e-mail: [kondrikov.nb@dvfu.ru](mailto:kondrikov.nb@dvfu.ru); Зык Екатерина Николаевна, магистрант, e-mail: [katya\\_250393@mail.ru](mailto:katya_250393@mail.ru).

Chernyaev Andrey P., Ph.D., head of laboratory, e-mail: [chernyaev.ap@dvfu.ru](mailto:chernyaev.ap@dvfu.ru); Rychkova Ekatherina Yu., student, e-mail: [k-rychkova@mail.ru](mailto:k-rychkova@mail.ru); Kondrikov Nickolay B., D.Sc., professor, head of department, e-mail: [kondrikov.nb@dvfu.ru](mailto:kondrikov.nb@dvfu.ru); Zyk Ekatherina N., student, e-mail: [katya\\_250393@mail.ru](mailto:katya_250393@mail.ru).

В зависимости от химического строения пестицидов обычно выделяют несколько больших групп: хлорорганические соединения, фосфорорганические соединения, производные карбаматов, производные хлорфеноксикислот, пиретроиды. Общеизвестно, что самой опасной группой являются хлорорганические пестициды (ХОП), большинство из них в десятки тысяч раз токсичнее известных неорганических ядов. Отдельные представители ХОП (ДДТ и его метаболиты, ГХЦГ и его изомеры, ГХБ) включены в так называемую «чертову дюжину», а их применение регулируется международным соглашением (Стокгольмская конвенция о стойких органических загрязнителях, г. Стокгольм (Швеция), принятая и вступившая в силу 17 мая 2004 г.) (Максименко, 2003).

В настоящее время для анализа хлорорганических соединений в объектах окружающей среды и биологическом материале используют современные физико-химические методы (жидкостный, газовый варианты хроматографии с электронзахватным (ЭЗД) и масс-спектрометрическим (МС) детектированием, ультрафиолетовую и инфракрасную спектрометрию), позволяющие определять микроследовые количества токсичных соединений, однако в большинстве из них слабым звеном является подготовка проб к анализу: она длительна во времени, состоит из нескольких циклов, в результате которых происходит трансформация и потеря исследуемых компонентов. Таким образом, эти методы являются малоприменимыми в качестве рутинных при больших объемах исследований (<http://chitalky.ru/?p=3177>).

Нами предложен метод определения ХОП в тканях гидробионтов, включающий в себя экстракцию исследуемых компонентов из предварительно лиофилизированных образцов четыреххлористым углеродом и последующей делипидизацией полученных экстрактов под действием ультразвуковых колебаний.

### Материалы и методы

В качестве образцов и модельных сред для исследования использовали образцы минтая *Theragra chalcogramma*, собранные в Охотском море (вдоль западной части Курильских островов) (рис. 1).



Рис. 1. Карта района отбора проб минтая в Охотском море (карта составлена с помощью программы Google Earth 7.0.3.8542)

Fig. 1. Scheme of walleye pollock sampling in the Okhotsk Sea (from: Google Earth 7.0.3.8542)

Охотское море — типичное материково-окраинное море, далеко вдающееся в азиатский материк и почти повсеместно имеющее естественные сухопутные границы, за исключением узких проливов, соединяющих его с Тихим океаном и Японским морем. Глубинную циркуляцию вод Охотского моря формируют тихоокеанские течения, заходящие в море через глубоководные проливы Курильских островов (Добровольский, Залогин, 1982; Шунтов, 2001).

Минтай — ценная промысловая придонно-пелагическая рыба семейства тресковых, широко распространённая в северной части Тихого океана. Образцы для иссле-

дований были выловлены в Охотском море, немедленно заморожены и доставлены в лабораторию для дальнейшего анализа. В лаборатории гидробионтов дефростировали при комнатной температуре и препарировали, разделяя на ткани. Полученные ткани лиофилизировали и измельчали с помощью гомогенизатора до однородного состояния. Всего было проанализировано 50 образцов мышечных тканей минтая.

#### *Реактивы*

- стандарты ХОП (ДДТ,  $\gamma$ -ГХЦГ) — ГСО 7379-97, 7889-01;
- четыреххлористый углерод (о.с.ч.);
- четыреххлористый углерод (х.ч.);
- кислота серная, конц. (х.ч.);
- вода дистиллированная (ГОСТ 6709-72);
- гексан (х.ч.);
- натрий сернокислый безводный (х.ч.);
- гидрокарбонат натрия (х.ч.);
- индикаторные полоски PHAN для определения pH (ERBA Lachema, Чехия);
- бидистиллированную воду получали перегонкой дистиллированной воды. В 1 дм<sup>3</sup> дистиллированной воды растворяли 2,5 г перманганата калия и 10 см<sup>3</sup> концентрированной серной кислоты. Перегонку проводили с дефлегматором (h = 60 см), первую фракцию объемом 20 см<sup>3</sup> отбрасывали.

#### *Аппаратура, условия анализа*

Газохроматографический анализ проводили на газовом хроматографе Agilent 6890 Plus с масс-селективным детектором 5973N (Agilent Technologies, USA). Колонка кварцевая капиллярная HP5-MS (30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм); газ-носитель — гелий, скорость потока 1 мл/мин; температура инжектора 300 °С; температурная программа анализа: 50 °С (1 мин) — 20 °С/мин — 300 °С; режим полного сканирования в диапазоне 60–350 m/z; объем вводимой пробы — 2 мкл без деления потока; задержка по растворителю — 2 мин. Для ультразвуковой экстракции использовали ультразвуковую баню Bandelin Electronic Sonorex Super D-12207 (Германия), 230 В, 30 кГц, 0,3 А.

Испаритель ротационный ИП-1-ЛТ, Labtex, (Россия). Вакуумный насос Laborport N 840.3 FT.18 (Германия).

#### *Выделение хлорорганических пестицидов из образцов гидробионтов*

Навеску предварительно лиофилизированных и измельченных тканей ( $\approx$  2 г) помещали в плоскодонную колбу и экстрагировали целевые компоненты на ультразвуковой бане в течение 15 мин четыреххлористым углеродом дважды по 20 см<sup>3</sup>. После каждого цикла экстракции полученные супернатанты фильтровали через бумажный фильтр «белая лента» и объединяли. К экстракту прибавляли 15 см<sup>3</sup> концентрированной серной кислоты и вновь помещали на ультразвуковую баню на 15 мин. Органический и кислотный слой помещали в делительную воронку и после полного их расслоения кислотную часть отбрасывали. Для нейтрализации следов кислоты органический слой промывали 3 %-ным раствором гидрокарбоната натрия. Нейтрализованный органический слой фильтровали через слой безводного сульфата натрия для удаления следов воды. Полученный экстракт упаривали в круглодонной колбе на ротационном испарителе (T = 50 °С) под вакуумом (P = 0,01 МПа) досуха. Сухой остаток растворяли в 1,00 см<sup>3</sup> гексана и подвергали газохроматографическому анализу. Хроматографический анализ, построение градуировочных зависимостей проводили специалисты лаборатории молекулярного анализа (ШЕН ДВФУ). Результаты интерпретировали с помощью программных средств AGILENT и библиотек NIST.

#### *Исследование полноты извлечения ХОП методом «введено–найдено»*

Для исследования степени извлечения исследуемых пестицидов в модельные образцы вводили стандартное количество ДДТ и  $\gamma$ -ГХЦГ (50 мкл раствора в гексане с концентрацией 1 мкг/см<sup>3</sup>). Пробоподготовку и хроматографический анализ проводили в соответствии с методом, описанным выше.

### *Определение нижней границы определяемых концентраций (НГОК) исследуемых ХОП методом ГХ*

Для определения нижней границы определяемых концентраций ХОП получали хроматограммы стандартных растворов исследуемых соединений. Нижней границей определяемых концентраций считали массу компонента, дающую сигнал детектора хроматографа в 3 раза выше среднего уровня сигнала шумов.

### *Определение пределов обнаружения ХОП*

Для исследований пределов обнаружения ХОП готовили серию модельных образцов лиофилизированных тканей мяты, в которые вносили известные количества исследуемых пестицидов. Образцы проводили через все этапы пробоподготовки и подвергали хроматографическому анализу. При этом пределом обнаружения считали то количество внесенного в пробу препарата, которое давало пик, соответствующий НГОК.

### *Статистическая обработка данных*

Статистическая обработка включала в себя оценку результатов анализа и анализ разбросов ошибки от средней величины. Оцениваемые величины характеризовались выборками из пяти измерений. Для оценки точности полученных результатов использовался метод объективной статистической оценки результатов анализа — метод Стьюдента. При применении этого метода предполагалось, что оцениваемое математическое ожидание выборки имеет заведомо нормальное или близкое к нормальному распределение, а представляющая его выборка имеет малый объем ( $n = 5$ ).

Грубые промахи выявлялись при помощи критерия Фишера.

Расчет производился при помощи описательной статистики из пакета анализа данных Microsoft Excel 2007 (Гармаш, Сорокина, 2012).

## **Результаты и их обсуждение**

Первым этапом при разработке методики является оценка аналитических возможностей используемого оборудования — нижней границы определяемых концентраций исследуемых веществ. Для этого хроматографическому анализу подвергали растворы, полученные последовательным разбавлением стандартного раствора. Время удерживания и нижние границы определяемых концентраций исследованных соединений представлены в таблице.

Время удерживания и нижние границы определяемых концентраций исследуемых ХОП  
Retention times and detection limits of organochlorine pesticides

№	Название ХОП	$t_R$ , мин	НГОК, пг
1	4,4'-ДДТ	25,882	50
2	$\gamma$ -ГХЦГ	18,868	1

Как уже было отмечено выше, серьезным недостатком большинства описанных в литературе и применяемых методик является чрезвычайно длительное время проведения пробоподготовки: легкоокисляемые липиды и пигменты, входящие в состав гидробιονтов, при использовании метода экстракции, описанного в Методах определения микроколичеств пестицидов... (1983), окисляются при многократной смене серной кислоты (до 5 раз) в течение суток. Нами показано, что степень извлечения целевых компонентов с использованием этого метода зачастую не превышает 60 %. Низкая степень экстракции и невоспроизводимые результаты могут быть связаны с деструкцией исследуемых компонентов при длительном контакте с концентрированной кислотой.

При проведении эксперимента в качестве модельного образца были использованы лиофилизированные мышечные ткани мяты. Предварительная лиофилизация образца позволила практически полностью избавиться от влаги, создающей серьезные затруднения при экстракции/реэкстракции искомых компонентов, среди которых — образование эмульсии, аквакомплексов, изомеризация, трансформация, а зачастую и деструкция отдельных компонентов. Кроме этого, необходимо отметить, что применение лиофилизации вместо высокотемпературной сушки позволяет минимизировать потери исследуемых компонентов.

Для достижения максимально полной степени извлечения хлорорганических пестицидов на этапе пробоподготовки нами был использован метод ультразвуковой экстракции (физический фактор деструкции) для максимального высвобождения из внутриклеточного пространства и клеточных оболочек (состоящих из гидрофобных фосфолипидов) исследуемых хлорорганических соединений. Это позволило сократить время пробоподготовки более чем в 10 раз. Кроме физического разрушения клеток обезвоженной матрицы образца, для достижения максимального эффекта экстракцию проводили органическим растворителем, обладающим максимальным сродством с исследуемыми соединениями, — четыреххлористым углеродом.

Показано, что степень извлечения целевых компонентов с использованием предложенного метода была достоверно выше, чем при использовании метода, описанного ранее (Методы..., 1983), на 20–35 % и составила от 78 до 91 %.

На этапе очистки от липидов и соэкстрагирующихся компонентов, как и в методике (Методы..., 1983), была использована концентрированная серная кислота, но вместо длительного встряхивания на шейкере исследовали воздействие на смесь ультразвуковых колебаний, благодаря чему время воздействия кислоты на экстракт было уменьшено с 5 ч до 30 мин. Необходимо отметить, что вместо 3–5-кратного воздействия серной кислоты (Методы..., 1983) нам удалось обойтись однократным воздействием кислоты на экстракт.

Сокращение времени и намного более эффективное действие серной кислоты на соэкстрагирующие компоненты при очистке экстракта с воздействием на него ультразвуковых волн было продемонстрировано при проведении хроматографического разделения смеси и анализе хлорорганических пестицидов. Результаты представлены на рис. 2, 3.

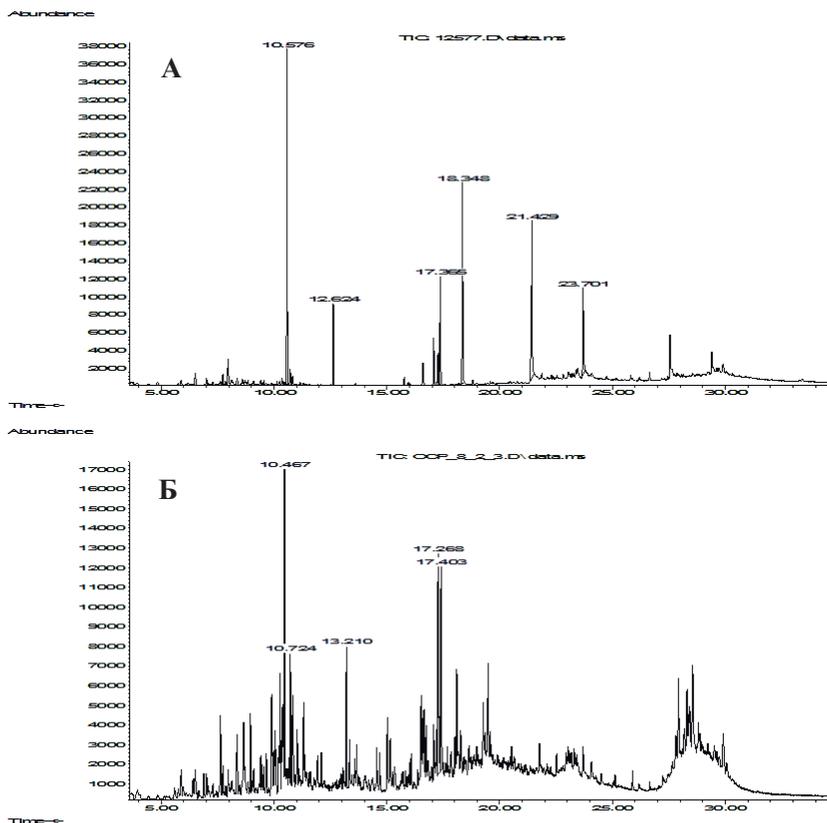


Рис. 2. Хроматограмма экстракта мышцы минтая (модельный образец с внесенным стандартом ХОП), полученного модифицированным методом (А) и с использованием методики (Б) (Методы..., 1983)

Fig. 2. Chromatogram of the extract of pollock muscle (model sample with introduced standard of organochlorine pesticide) prepared using the modified method (А) and the standard method described in (Методы..., 1983) (Б)

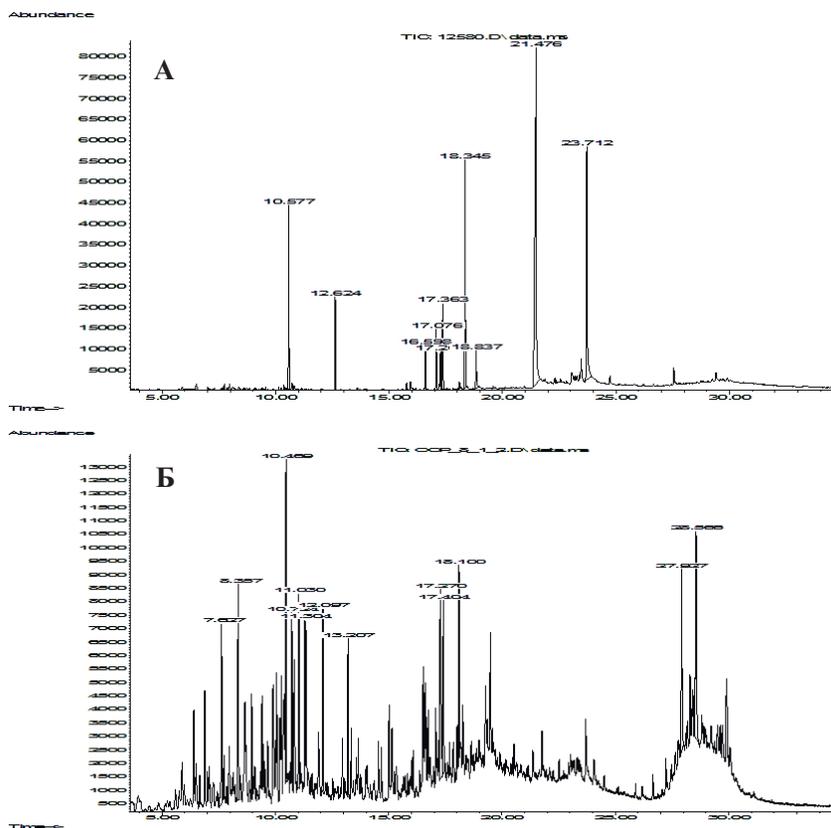


Рис. 3. Хроматограмма экстракта мышцы минтая, выловленного в Охотском море, обработанного модифицированным методом (А) и с использованием методики (Б) (Методы..., 1983)  
 Fig. 3. Chromatogram of the extract of pollock muscle (sample from the Okhotsk Sea), prepared using the modified method (А) and the standard method (Б) (from: Методы..., 1983)

На хроматограмме (рис. 2, А и рис. 3, А) практически отсутствовали горбы и множественные группы пиков, характерные для соэкстрагирующихся примесей и серьезно затрудняющие обработку хроматограмм, в отличие от методики (Методы..., 1983) (рис. 2, Б и рис. 3, Б).

Для оценки метрологических характеристик предложенного метода проводили статистический анализ данных для каждого исследуемого компонента.

Статистическая обработка экспериментальных данных ДДТ с применением критерия Стьюдента показала, что наблюдаемое различие между сравниваемыми выборками не является значимым, что свидетельствует об отсутствии систематической ошибки. Оценка грубых промахов показала их отсутствие в исследуемой выборке.

Показано, что найденное содержание ХОП в контрольных пробах, содержащих стандартные вещества и проведенных через весь цикл пробоподготовки, составило  $100 \pm 7\%$ .

При исследовании степени извлечения использовали метод «введено–найдено», для этого в модельный образец вводили стандартные образцы ДДТ и  $\gamma$ -ГХЦГ (линдана). Степень извлечения ДДТ и  $\gamma$ -ГХЦГ из тканей гидробионтов составила соответственно  $78 \pm 2$  и  $91 \pm 2\%$ , что позволяет использовать предложенный метод в качестве рутинного и прецизионного при анализе хлорорганических пестицидов в биологических объектах.

#### Определение ХОП в образцах тканей гидробионтов

Из хлорорганических пестицидов в образцах тканей минтая *Th. chalcogramma*, обитающего в Охотском море, были обнаружены ДДТ и его метаболиты, а содержание ГХЦГ и его изомеров находилось ниже границы определяемых концентраций. Среди идентифицированных ХОП во всех образцах минтая обнаружено относительно

высокое содержание гексахлорбензола (ГХБ). Согласно общепринятым принципам представление результатов содержания хлорорганических соединений ведется в микрограммах ХОП на 1 г массы липидов. Это связано с высокой липофильностью ХОП и их активным депонированием в жиросодержащих тканях. Среднее содержание липидов в исследуемых образцах составляло 0,01 г на грамм сырой массы мышечной ткани (1 %). Таким образом, общее суммарное содержание ХОП в тканях гидробионтов находилось в пределах от 25 до 73 мкг/г липидов. Концентрация ГХБ составляла от 14 до 60 мкг/г липидов, ДДТ — от 3 до 6 мкг/г липидов, а его метаболиты ДДД и ДДЕ были обнаружены в относительно сравнимых количествах — от 2 до 4 мкг/г липидов.

Для определения времени поступления ДДТ в организм гидробионтов были рассчитаны коэффициенты отношения содержания ДДТ к содержанию ДДЕ. По литературным данным известно, что при значении коэффициента ДДТ/ДДЕ больше единицы считают, что поступление пестицидов в организм гидробионтов было относительно недавним.

Результаты расчета показали, что все организмы, выловленные в разных районах Охотского моря, имеют коэффициенты давности поступления меньше единицы (0,1–0,8), таким образом, можно сделать вывод о сравнительно давнем поступлении в них ХОП. Как следствие этого, можно сделать заключение об отсутствии поступления в воды моря пестицидов группы ДДТ с терригенным стоком, что косвенно свидетельствует о прекращении использования ДДТ в сельскохозяйственных целях предприятиями Российской Федерации, согласно принятым международным конвенциям о прекращении его использования.

### Заключение

Разработан метод определения хлорорганических пестицидов в тканях гидробионтов, включающий в себя экстракцию исследуемых компонентов из предварительно лиофилизированных образцов четыреххлористым углеродом и последующей делипидизацией полученных экстрактов под действием ультразвуковых колебаний. Оценены метрологические характеристики предложенного варианта пробоподготовки, на основании которых метод можно считать воспроизводимым и прецизионным, что позволяет использовать его в рутинных исследованиях санитарно-гигиенической оценки гидробионтов. Суммарное содержание ХОП в мышцах минтая, выловленного в Охотском море, находилось в пределах от 25 до 73 мкг/г липидов, а рассчитанный коэффициент давности поступления ДДТ позволяет сделать вывод о сравнительно давнем его поступлении в экосистему Охотского моря.

*Определение хлорорганических соединений было произведено в лаборатории молекулярного анализа ШЕН ДВФУ и поддержано грантом Российского научного фонда (проект № 14-50-00034).*

### Список литературы

- Гармаш А.В., Сорокина Н.М. Метрологические основы аналитической химии: изд. 3-е, исправл. и доп. — М. : МГУ им. М.В. Ломоносова, 2012. — 47 с.
- Добровольский А.Д., Залогин Б.С. Моря СССР : учеб. пособие для вузов. — М. : МГУ, 1982. — 192 с.
- Максименко О. Пестициды с точки зрения химика // Наука и жизнь. — 2003. — № 3. — С. 56–57.
- Методы определения микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах и внешней среде : справочник / М.А. Клисенко, Ф.Р. Мельцер, К.Ф. Новикова и др. — М. : Колос, 1983. — 304 с.
- Ноймайстер Л. Руководство к действию в области пестицидов. — Гамбург : ПАН Германии, 2003. — 47 с.
- Шунтов В.П. Биология дальневосточных морей России : моногр. — Владивосток : ТИПРО-центр, 2001. — Т. 1. — 579 с.

*Поступила в редакцию 27.12.16 г.*

*Принята в печать 27.01.17 г.*