

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ФАКУЛЬТЕТ ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК
Кафедра аналитической химии

**РАЗРАБОТКА УНИФИЦИРОВАННОЙ МЕТОДИКИ
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЕСТИЦИДОВ
В ОБЪЕКТАХ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ
С ПОМОЩЬЮ ВЭЖХ**

Дипломная работа студентки 6 курса
Овсянниковой Елены Юрьевны

Научный руководитель:
д.х.н. Барам Григорий Иосифович

к.х.н. Кобрина Виолетта Николаевна

Лимнологический институт СО РАН
отдел хроматографии

Новосибирск-2004

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
1. ВВЕДЕНИЕ.....	5
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	6
2.1. Введение.....	6
2.2. Проблемы аналитической химии пестицидов.....	7
2.3. Пестициды, определяемые методом ВЭЖХ.....	8
2.4. Обращенно-фазная ВЭЖХ.....	10
2.4.1. Неподвижные обращенные фазы.....	10
2.4.2. Подвижные фазы в обращенно-фазной ВЭЖХ.....	11
2.4.3. Детектирование в ВЭЖХ.....	12
2.5. Объекты, в которых контролируется содержание пестицидов.....	13
2.6. Особенности нормирования содержания остаточных количеств пестицидов.....	14
2.6.1. Воздух рабочей зоны.....	14
2.6.2. Почва.....	15
2.6.3. Атмосферный воздух.....	16
2.6.4. Вода водоемов.....	17
2.7. Методы подготовки образцов объектов окружающей среды.....	17
2.7.1. Отбор проб воздуха.....	18
2.7.2. Отбор проб в водоемах.....	18
2.7.3. Отбор проб почвы.....	19
2.7.4. Подготовка водных образцов для определения пестицидов методом ВЭЖХ....	19
2.7.4.1. Жидко-жидкостная экстракция.....	19
2.7.4.2. Твердофазная экстракция.....	20
2.7.4.3. Твердофазная микроэкстракция.....	21
2.7.4.4. Применение концентрирующих колонок.....	22
2.7.4.5. Сверхкритическая жидкостная экстракция.....	22
2.7.5. Подготовка образцов почвы.....	23
3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	
3.1. Оборудование.....	24
3.2. Материалы.....	24
3.3. Методы.....	25
3.3.1. Твердофазная экстракция пестицидов.....	25
3.3.2. Жидко-жидкостная экстракция пестицидов.....	25

3.3.3. Отбор проб воды для определения пестицидов.....	25
3.4. Подготовка к выполнению измерений.....	25
3.4.1. Приготовление элюента "А".....	25
3.4.2. Приготовление растворов пестицидов для формирования базы данных "Пестициды".....	26
3.4.3. Выполнение хроматографического анализа.....	26
3.5. Подготовка хроматографа.....	26
3.6. Формирование ВЭЖХ-УФ базы данных "Пестициды".....	28
3.7. Количественное определение пестицидов методом ВЭЖХ-УФ с иденти- фикацией по базе данных "Пестициды".....	29
4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	
4.1. Постановка задачи.....	30
4.2. Формирование базы данных "Пестициды".....	31
4.3. Апробация экстракционных методов концентрирования пестицидов из водных растворов.....	36
4.3.1. Твердо-фазная экстракция пестицидов из воды.....	36
4.3.2. Жидкостная экстракция пестицидов из воды.....	39
4.4. Определение пестицидов в природных водах.....	40
5. ВЫВОДЫ.....	44
6. ЛИТЕРАТУРА.....	45

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография
- ВДК - временно допустимые концентрации
- ВДК_{п.} - временно допустимые концентрации в почве
- ЖЖЭ - жидко-жидкостная экстракция
- МВИ - методика выполнения измерения
- МТФЭ - твердофазная экстракция в микромасштабе
- ОБУВ - ориентировочный безвредный уровень воздействия
- ОДК - ориентировочно допустимая концентрация
- ОФ - обращенная фаза
- ПДК - предельно допустимая концентрация
- ПДК_{в.} - предельно допустимая концентрация в воде
- ПДК_{м.р.} - предельно допустимая максимальная разовая концентрация
- ПДК_{п.} - предельно допустимая концентрация в почве
- ПДК_{пр.} - предельно допустимая концентрация в продуктах питания
- ПДК_{р.з.} - предельно допустимая концентрация в рабочей зоне
- ПДК_{сс.} - предельно допустимая концентрация среднесуточная
- СКЖЭ - жидкостная экстракция в сверхкритических условиях
- ТФЭ - твердофазная экстракция
- УФ - ультрафиолетовый

1. ВВЕДЕНИЕ

Загрязнение окружающей среды продуктами жизнедеятельности человека – одна из самых важных проблем, вставшей перед человечеством в середине 20-го века. Необходимость ее решения осознана на международном уровне, и охрана природы стала неотъемлемой частью международного права. Эти обстоятельства послужили мощным стимулом развития экологической науки, неотъемлемым разделом которой является аналитическая химия окружающей среды. Именно во многом благодаря усилиям химиков-аналитиков мы стали яснее понимать причинно-следственные механизмы, приводящие к локальным и глобальным изменениям в природе под действием техногенных факторов.

Очевидно, что наши успехи в изучении окружающей среды и ее защиты от загрязнения напрямую зависят от качества и количества информации, поток которой обеспечивают специалисты в области химического анализа. Эта наука бурно прогрессирует и сейчас она уже в состоянии решать задачи, за которые еще недавно никто не брался. В первую очередь к ним относятся, так называемые, скриннинговые задачи. В отличие от классического подхода, когда "каждое вещество анализируется с помощью специальной методики", скриннинг требует анализировать много веществ с помощью одной универсальной. Применительно к окружающей среде "классик" последовательно проверяет в исследуемом объекте присутствие вещества X, Y, Z..., а скриннинговый метод позволяет осуществить проверку всех веществ из большого списка за один эксперимент. Такими веществами могут быть, например, опасные экотоксиканты – пестициды. Их перечень состоит из более чем 1000 названий, и разработка универсальной методики анализа этих соединений представляется весьма актуальной.

Традиционно скриннинговые методики основываются на применении метода газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Однако, метод ГХ-МС пригоден только для анализа летучих и термостабильных соединений. Если говорить об "универсальном" методе, то такой нам видится высокоэффективная жидкостная хроматография с УФ- или МС-детектированием. В отличие от других, ВЭЖХ-УФ в силу многих причин проще внедрить в рутинную практику экологической аналитической химии, что весьма важно.

Целью данного исследования является разработка унифицированной методики определения пестицидов в водных растворах с применением ВЭЖХ-УФ и проверка ее возможностей на примере анализа образцов природных вод.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Применение ВЭЖХ для определения пестицидов в окружающей среде

2.1. Введение

Одной из важнейших и сложных задач аналитической химии окружающей среды является осуществление контроля содержания пестицидов в сельскохозяйственной продукции, а также в природных водах, в почве и в атмосфере сельскохозяйственных районов, где эта продукция производится.

Пестициды (*pestis* – зараза, *cide* – убивать) – собирательный термин, охватывающий все химические вещества, используемые для борьбы с микроорганизмами, растениями и животными, вредоносными и нежелательными с точки зрения сохранности урожая в процессе его выращивания, уборки и хранения. Пестициды используются для защиты морских судов от обрастания различными видами микроорганизмов и водорослей, нарушающих нормальную плавучесть судов и уменьшающими скорость хода, для борьбы со слизевобразованием в бумажной и некоторых других отраслях промышленности. Существует классификация пестицидов в зависимости от их назначения. К важнейшим типам пестицидов относятся:

- инсектициды – вещества для борьбы с насекомыми;
- гербициды – вещества для борьбы с сорняками;
- фунгициды – вещества для борьбы с болезнями и фитопатогенными грибами-возбудителями заболеваний растений;
- акарициды – вещества для борьбы с клещами;
- зооциды – вещества для борьбы с грызунами.

Проблема загрязнения окружающей среды пестицидами возникла в середине 50-х годов прошлого века, когда производство и применение этих веществ приняли массовый характер. С одной стороны, только с их помощью можно было обеспечить постоянно растущую потребность человечества в продовольствии, а с другой – пестициды как экотоксиканты с каждым годом оказывали все более заметное влияние на живую природу и на здоровье человека.

Понимание опасности применения пестицидов привело, в конечном счете, к тому, что в развитых странах были разработаны документы на уровне законов, которые строго нормируют содержание пестицидов в продовольствии и в объектах окружающей среды, и эти законы постоянно совершенствуются и ужесточаются. В Российской Федерации основными документами, которые определяют правила использования пестицидов и

правила их контроля в окружающей среде, в продовольственном сырье и в продуктах питания являются документы [1-4].

В конце 20-го века заметную роль в регулировании применения пестицидов стали играть такие международные организации как ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения при ООН (World Health Organization – WHO) и ФАО – Организация при ООН по вопросам продовольствия и сельского хозяйства (Food and Agricultural Organization – FAO). Благодаря их усилиям применение целого ряда экологически особо-опасных пестицидов (например, ДДТ) во многих странах было запрещено. Работа по выявлению дальних последствий применения пестицидов, которая приняла уже международный характер, все более усиливается. Также постоянно совершенствуется международное природоохранное законодательство.

Постоянно возрастающее внимание к экологическим проблемам привело к формированию специального раздела аналитической химии – аналитической химии окружающей среды. В отличие от "классической" аналитической химии, она имеет дело со сложными многокомпонентными объектами исследования (природные воды, почва, донные осадки, атмосфера, растительные и животные ткани), в которых вещества-аналиты присутствуют иногда в очень низких концентрациях. Важно отметить, что такая специфика послужила толчком к интенсивному развитию уже известных и к появлению новых методов химического анализа, так как без совершенной системы аналитического контроля невозможно грамотно применять химические средства защиты растений, оценивать состояние окружающей среды, контролировать безопасность продуктов питания.

2.2. Проблемы аналитической химии пестицидов

Поиск оптимальных методов анализа пестицидов – одна из важнейших проблем аналитической химии. С современных позиций к ним, в первую очередь, относятся капиллярная газовая хроматография (ГХ), высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), тонкослойная хроматография (ТСХ) и капиллярный электрофорез (КЭ) [5]. Эти методы обладают высокой разделяющей способностью, необходимой при анализе многокомпонентных образцов, и высокой чувствительностью, позволяющей определять пестициды на уровне концентраций 1 мкг/дм^3 и ниже [6].

Выбор конкретного метода анализа во многом определяется самой аналитической задачей. К типичным задачам можно отнести следующие:

- определение пестицидов на разных стадиях их производства, приготовления готовых форм, при их хранении;
- определение остаточных количеств пестицидов в сельскохозяйственной продукции, в почве и в природных водах;
- определение пестицидов в биологических образцах;
- определение пестицидов в продуктах питания, в атмосфере, в питьевой воде.

Две последние задачи являются наиболее сложными, так как они требуют одновременного определения не заведомо известных веществ, а набора соединений из всего списка применяемых на практике пестицидов, количество которых превышает 1000 названий. Задачи такого типа иногда называют скриннинговыми. Их решают, главным образом, с помощью метода ГХ с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС), когда идентификация пестицидов осуществляется по заранее созданной библиотеке масс-спектров [7].

Учитывая большое разнообразие пестицидов при выборе методов их определения предпочтение, очевидно, надо отдавать "универсальным" методикам. Лаборатория, работающая по принципу "для каждого вещества свой метод анализа", может обеспечить высокую производительность лишь только по отношению к относительно малому количеству веществ. Переход от одной группы пестицидов к другой требует больших затрат времени на перестройку и калибровку приборов, приготовление стандартов и пр.

Рассматривая химико-аналитические методы с точки зрения их "универсальности" по отношению к анализу пестицидов, можно сделать следующие замечания.

Метод ТСХ достаточно чувствительный и простой в исполнении, однако в силу своей относительно невысокой разрешающей способности "универсальным" быть не может.

Метод ГХ обладает очень высокой разрешающей способностью, но его применение ограничивается термической лабильностью ряда пестицидов и необходимостью привлекать различные способы химической дериватизации многих пестицидов для повышения их летучести.

Метод КЭ, имея высокую разрешающую способность, не обеспечивает приемлемую концентрационную чувствительность и требует весьма высокую степень концентрирования образца, что часто нельзя осуществить из-за ограниченной растворимости пестицидов.

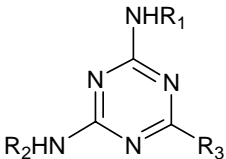
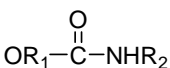
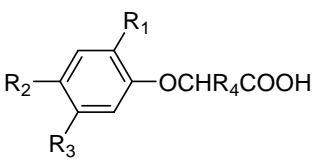
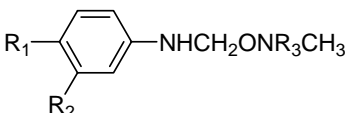
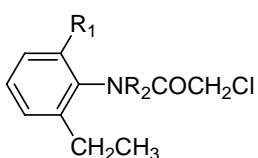
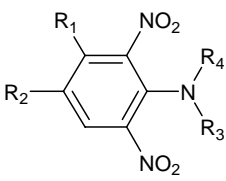
Метод ВЭЖХ обеспечивает для решения многих задач достаточное разрешение, не требует, как правило, предварительной дериватизации и пригоден для анализа

термолабильных пестицидов. В сочетании с ГХ он позволяет решить практически все задачи, и именно эти два метода нашли наибольшее распространение в современной экологической аналитической химии.

2.3. Пестициды, определяемые методом ВЭЖХ

К пестицидам, определяемым в мировой практике методом ВЭЖХ, относятся труднолетучие и термолабильные соединения. Группы этих веществ и отдельные представители из каждой группы приведены в табл. 1.

Таблица 1. Главные группы пестицидов, определяемые ВЭЖХ.

Тип пестицида	Характерный представитель
<p>Триазины</p> 	<p>Атризин: $R_1 = -CH_2CH_3$, $R_2 = -CH(CH_3)_2$, $R_3 = -Cl$ Симазин: $R_1 = -CH_2CH_3$, $R_2 = -CH_2CH_3$, $R_3 = -Cl$</p>
<p>Карбаматы</p> 	<p>Хлорпрофам: $R_1 = -CH(CH_3)_2$, $R_2 = -C_6H_4Cl$</p>
<p>Арилоксиуксусные кислоты</p> 	<p>2,4-Д: $R_1 = -Cl$, $R_2 = -Cl$, $R_3 = -H$, $R_4 = -H$ 2,4,5-Т: $R_1 = -Cl$, $R_2 = -Cl$, $R_3 = -Cl$, $R_4 = -H$</p>
<p>Фенилмочевины</p> 	<p>Линурон: $R_1 = -Cl$, $R_2 = -Cl$, $R_3 = -OCH_3$ Хлортолурун: $R_1 = -CH_3$, $R_2 = -Cl$, $R_3 = -CH_3$</p>
<p>Амиды</p> 	<p>Алахлор: $R_1 = -CH_2CH_3$, $R_2 = -CH_2OCH_3$</p>
<p>Динитроанилины</p> 	<p>Трифлуралин: $R_1 = -H$, $R_2 = -CF_3$, $R_3 = -(CH_2)_2CH_3$, $R_4 = -(CH_2)_2CH_3$</p>

2.4. Обращенно-фазная ВЭЖХ

2.4.1. Неподвижные обращенные фазы

В настоящее время около 90% всех определений низкомолекулярных веществ методом ВЭЖХ выполняют на химически привитых фазах, главным образом фазах с привитыми алкильными группами (обращенных фазах) [8], и пестициды не являются здесь исключением. Большинство обращенных фаз синтезируют на основе силикагеля и гораздо реже используют в качестве основы окиси алюминия или циркония. Известны также обращенные фазы, синтезированные на основе полистирола, поперечно сшитого дивинилбензолом.

Типичный в ВЭЖХ сорбент на основе силикагеля обладает следующими свойствами:

- удельный объем пор – 0,7-0,8 мл/см³;
- удельная поверхность – 300 м²/г;
- диаметр пор 100-300 Å;
- размер частиц – 3, 5, 7 или 10 мкм;
- форма частиц – сферическая или, реже, неправильная;
- тип радикала – *n*-октадецил (C18), *n*-октил (C8) или *n*-бутил (C4);
- содержание углерода в сорбенте типа "C18" – 15-22% (в/в).

Такие сорбенты обладают высокой механической прочностью и выдерживают перепад давления в колонке до 50-100 МПа. Они гидролитически устойчивы в диапазоне рН от 2 до 7. Упаковывают их, как правило, в колонки, изготовленные из нержавеющей стали, которые имеют диаметр 2-5 мм и длину 100-250 мм.

Наиболее часто используемой фазой является фаза C18. На ней в настоящее время выполняется большая часть анализов. Фазы C8 и C4 обладают сходными с фазой C18 свойствами, но имеет меньшую емкость. Остальные фазы обладают низкой емкостью и используются для выполнения специальных анализов. Эффективность колонок с фазами C18, имеющими размер частиц 5 мкм, достигает 100000 теоретических тарелок на 1 м.

Важной особенностью обращенных фаз является присутствие на поверхности силикагеля свободных силанольных групп, которые по той или иной причине не связаны с алкильным радикалом. Их количество сводят к минимуму путем специальной обработки сорбента низкомолекулярными алкилсиланами (например, триметилхлорсилан). Эта процедура получила название *end capping*. Силанольные группы при рН более 3 обладают способностью сорбировать катионы (например, амины, катионы тяжелых металлов),

которые, в свою очередь, вызывают вторичную адсорбцию анионов и веществ, склонных к образованию с ионами тяжелых металлов комплексных соединений.

2.4.2. Подвижные фазы в обращенно-фазной ВЭЖХ

В основе обращенно-фазовой жидкостной хроматографии (ОФ ЖХ) лежат гидрофобные взаимодействия между веществом-аналитом, сорбентом и подвижной фазой (элюентом), причем свойства элюента, определяемые его составом, оказывают решающее влияние на удерживание аналита и селективность колонки в самых широких пределах [8].

Элюотропный ряд растворителей, применяемых в ОФ ВЭЖХ в качестве подвижной фазы, в порядке возрастания их элюирующей силы выглядит следующим:



Все эти растворители бесконечно смешиваются с водой и обладают хорошим пропусканием в области ультрафиолетового (УФ) спектра, что важно при использовании УФ-фотометрического детектора, который чаще всего применяется в ВЭЖХ. Смеси этих растворителей с водой имеют приемлемо низкую вязкость, т.е. не вызывают слишком большой перепад давления в колонке при элюировании с оптимальной скоростью потока (линейная скорость потока около 1 мм/сек). Минимальной вязкостью обладают смеси вода-ацетонитрил, что во многом определило наибольшую популярность ацетонитрила. Кроме того, эти смеси поглощают коротковолновое УФ излучение (190-210 нм) в наименьшей степени.

При хроматографии анионов и катионов слабых кислот и оснований важно обеспечить стабильность значения рН элюента, т.е. он должен обладать буферными свойствами. С этой целью, в зависимости от величины требуемого значения рН, в него вводят ту или иную соль слабого основания или кислоты (сульфаты, фосфаты, ацетаты, формиаты, соли триметил- или триэтиламмония). Концентрация буфера обычно составляет 0,001-0,1 М.

Для увеличения удерживания гидрофильных анионов в состав подвижной фазы вводят гидрофобные ионы противоположного знака, которые образуют с ионами-аналитами гидрофобные ионные пары. Такой вариант ОФ ВЭЖХ называется ион-парным [9, 10].

Для разделения веществ, обладающих существенно различающимися коэффициентами сорбции, состав подвижной фазы в процессе хроматографии часто изменяют в сторону увеличения силы элюента. Такой способ хроматографирования

называется градиентным, в отличие от изократического, т.е. разделения при постоянном составе элюента [7].

2.4.3. Детектирование в ВЭЖХ

Для регистрации изменения концентрации элюирующихся из колонки веществ, т.е. для записи хроматограммы, в ВЭЖХ используют самые разные детекторы с проточными измерительными ячейками от простейших фотометров и кондуктометров до сложных и дорогих масс-спектрометров и ЯМР-спектрометров [7, 11-16].

Наибольшее распространение получили фотометрические детекторы, которые пригодны для регистрации самого широкого круга веществ. Эти детекторы представляют собой либо фотометры с фиксированной длиной волны, перестраиваемой с помощью набора светофильтров, либо спектрофотометры, в которых длина волны монохроматора перестраивается путем поворота дифракционной решетки или призмы. Многие из таких детекторов позволяют регистрировать не только поглощение при любой заданной длине волны в диапазоне 190-800 нм, но и записывать спектр поглощения раствора вещества в элюенте. Полученная таким образом спектральная информация значительно расширяет аналитические возможности метода и повышает надежность идентификации пиков веществ на хроматограмме, что, в свою очередь, во много раз снижает вероятность получения ошибочного результата.

УФ-детекторы обладают весьма высокой чувствительностью, которая определяется концентрацией вещества в растворе и величиной его экстинкции. Типичный предел обнаружения для многих веществ с помощью этих детекторов составляет 1-10 нг в инжестируемом образце.

Для регистрации веществ, не имеющих поглощения в спектральном диапазоне детектора, применяют различные способы химической дериватизации этих веществ с целью получения поглощающих производных. Этот прием часто используют для детектирования аминов, карбоновых кислот, альдегидов, сахаров и т.д. [17, 18]. Карбаматы часто определяют в виде флюоресцирующих производных с помощью детектора флюориметра. Это позволяет повысить чувствительность определения по сравнению с фотометрированием в десятки раз [19, 20].

Другим способом регистрации не поглощающих веществ является применение косвенного (непрямого) детектирования. Для реализации такого детектирования в элюент вводят поглощающее свет вещество, обладающее близкими по отношению к аналиту хроматографическими свойствами (вещество-конкурент). В этом случае элюент имеет

заметное поглощение и в результате конкурентных процессов, протекающих в колонке, не поглощающие свет вещества-аналиты элюируются в виде "отрицательных пиков".

2.5. Объекты, в которых контролируется содержание пестицидов

Широкое использование пестицидов приводит к заметному загрязнению почвы, грунтовых и поверхностных вод, сельскохозяйственной продукции. Ряд пестицидов, особенно хлорорганические, обладают высокой устойчивостью и могут сохраняться в окружающей среде длительное время. В настоящее время множество этих веществ циркулирует в окружающей среде и не исчезнет, по крайней мере, в течение еще нескольких десятилетий, даже если их применение во всем мире будет немедленно прекращено. Все без исключения пестициды оказались токсикантами, способными включаться в общий круговорот веществ и передаваться по трофическим цепям во все звенья экологической системы, включая человека. Опасность пестицидов обусловлена также тем, что они способны распространяться далеко за пределы района непосредственного применения, охватывая поражающим эффектом огромные территории. Менее стойкие пестицидные препараты также являются причиной не меньшего беспокойства, поскольку продукты их распада часто оказываются во много раз токсичнее исходного соединения.

По характеру воздействия на организм человека пестициды, согласно ГОСТам 12.1.005-76 и 12.1.007-76 отнесены к веществам 1-3-го классов опасности. При работе с пестицидами возможно воздействие таких опасных производственных факторов как повышенная концентрация пестицидов и продуктов их трансформации в атмосферном воздухе, в воздухе рабочей зоны, в водоемах, в почве, растениях, в строительных материалах. Пестициды оказывают токсическое действие на работающих через дыхательные пути, желудочно-кишечный тракт, неповрежденную кожу и слизистые оболочки органов зрения и обоняния.

Действие пестицидов на организм человека определяется главным образом химической природой активного вещества, его дозой, продолжительностью воздействия и общим состоянием организма. По мнению экологов, загрязнение окружающей среды пестицидами - одна из самых серьезных проблем современности, т.к. неконтролируемое применение ядохимикатов в сельском хозяйстве все чаще приводит к серьезным нарушениям в различных звеньях экосистемы, ухудшает основные свойства почвы, воды, воздуха, растительности и пищевых продуктов, тем самым, затрагивая здоровье населения всего земного шара. В настоящее время в биосфере циркулирует более 5 миллионов

химических веществ искусственного происхождения, и ежегодно к этому количеству добавляются многие тысячи новых. Пестициды, еще 8-10 лет назад занимавшие среди приоритетных загрязнителей 8-9 место, теперь стоят в этом списке на 1-3 месте [21].

2.6. Особенности нормирования содержания остаточных количеств пестицидов

2.6.1. Воздух рабочей зоны

Пестициды, поступающие в воздух рабочей зоны, могут стать причиной острых, подострых, хронических отравлений, а также различных отклонений в состоянии здоровья работников. Хронические отравления обнаруживаются современными методами исследований, как в течение трудового стажа, так и в отдаленные сроки жизни настоящего и последующего поколений.

ПДК в воздухе рабочей зоны должны быть установлены для тех соединений, содержание которых в воздушной среде может обладать вредным для здоровья действием. Пестициды в воздухе могут находиться в виде газов, паров, аэрозолей, а также их смесей.

Гигиеническое регламентирование химических соединений в воздухе рабочей зоны, как правило, проводится в три этапа: 1) обоснование временных допустимых концентраций (ВДК или ОБУВ); обоснование ПДК_{р.з.}; корректирование ПДК_{р.з.} путем анализа условий труда работающих и состояния их здоровья.

В основе регламентирования ПДК_{р.з.} лежит принцип пороговости вне зависимости от характера действия - общетоксического, раздражающего, канцерогенного, мутагенного и т. п. Для установления ПДК_{р.з.} токсикологическое исследование проводится в полном объеме. Это положение в первую очередь относится к следующим соединениям:

- подлежащим широкому внедрению в практику;
- относящимся к малоизученным и неизученным;
- опасным с точки зрения развития отдаленных и тяжелых последствий.

Для обоснования ПДК_{р.з.} необходимы следующие сведения и экспериментальные данные:

- об условиях производства и применения вещества и о его агрегатном состоянии при поступлении в воздух;
- о химическом строении и физико-химических свойствах вещества (формула, молекулярная масса, плотность, точки плавления и кипения, давления паров при 20 °С и насыщающей концентрации, химическая стойкость - гидролиз, окисление и др., растворимость в воде, жирах и других средах, растворимость газов в воде, показатель преломления, поверхностное натяжение, энергия разрыва связей;

– о токсичности и характере действия химических соединений при однократном воздействии на организм.

Для утверждения ПДК_{р.з.} и включения его в санитарное законодательство должна быть разработана методика определения данного пестицида в воздушной среде с достаточной чувствительностью, обеспечивающей определение величин ПДК в анализируемом объеме воздуха.

2.6.2. Почва

Принципы нормирования пестицидов в почве - установление ПДК_п - значительно отличаются от принятых для воздуха рабочей зоны, атмосферного и воды водоемов. Отличие объясняется тем, что поступление вредных веществ в организм непосредственно из почвы имеет место в исключительных случаях и в незначительных количествах. В основном пестициды, находящиеся в почве, могут поступать в организм через контактирующие с почвой среды (воздух, вода, растения).

При нормировании пестицидов, находящихся в почве, в первую очередь следует останавливаться на тех, которые могут мигрировать в атмосферный воздух, продуктовые растения или грунтовые воды. Регламентирование осуществляется в два этапа: первый этап проводится на лабораторных моделях, второй - в полевых условиях. Исследование начинается со сбора информации о фоновых концентрациях вещества, путях его поступления в почву, физико-химических свойствах, параметрах токсичности, механизме действия и методе определения вещества. Затем определяется стойкость химического соединения в почве; устанавливается допустимая концентрация химического вещества в почве, гарантирующая переход его в растения в количестве, не превышающем ПДК_{пр} (для продуктов питания). Определяется допустимая концентрация химического вещества в почве (для летучих веществ), гарантирующая его переход в атмосферный воздух в количестве, не превышающем установленное ПДК для атмосферного воздуха. Определяется допустимая концентрация химического вещества в почве, гарантирующая переход его в грунтовые воды в количестве, не превышающем ПДК для воды водоемов; определяется допустимая концентрация химического вещества в почве, не влияющая на процессы самоочищения и почвенный микробиос.

На основании этих исследований устанавливается лимитирующий показатель вредности и ПДК_п. Когда ПДК_п еще не обоснованы или их экспериментальное обоснование нецелесообразно (ограниченный объем применения, малая - менее 2 месяцев - стойкость в почве и др.), проводится расчет ВДК_п (ОДК) - временно допустимая

концентрация (ориентировочно допустимая концентрация) химического соединения в почве, установленная расчетным путем, мг/кг (временный норматив на 3 года). ВДК_{п.} устанавливаются для пестицидов, которые находятся на стадии государственных производственных испытаний или допущенных к опытно-производственному применению. Обязательным условием утверждения ВДК_{п.} является наличие метода химического контроля остаточных количеств пестицида в почве.

Расчет ВДК_{п.} проводится на основе предельно допустимых концентраций соответствующего пестицида в овощах или плодовых культурах по следующей формуле:
 $ВДК_{п.} = 1,23 + 0,48 \lg ПДК_{пр.}$

2.6.3. Атмосферный воздух

Предельно допустимые концентрации химических соединений в атмосферном воздухе устанавливаются по двум показателям - максимально разовым ПДК_{м.р.} (30 мин) и среднесуточным ПДК_{с.с.} (24 ч). Наиболее важны среднесуточные концентрации, превышение которых указывает на возможное неблагоприятное токсическое действие регламентируемых веществ. Максимальные разовые концентрации устанавливаются для веществ, обладающих преимущественно раздражающим или рефлекторным действием.

В то время как в большинстве зарубежных стран для установления стандарта, учитываются главным образом эпидемиологические данные о влиянии загрязнений атмосферного воздуха на здоровье населения, в нашей стране доминирует экспериментальный подход. Проведение эксперимента с точно заданными условиями не только обеспечивает большую точность полученных данных, но, главное, позволяет устанавливать контролирующие показатели, не дожидаясь появления неблагоприятных для здоровья населения последствий.

Важным моментом является выбор исследуемых концентраций. Обычно выбирают три концентрации: первая на уровне порога запаха, вторая в 3-5 раз выше и третья в 3-5 раз ниже. Если исследуемое вещество не обладает запахом, то концентрации для токсикологического эксперимента рассчитываются по формулам, опирающимся на регламентируемые гигиенические, токсикологические показатели или на физико-химические параметры и особенности структуры вещества.

При проведении эксперимента с ранее не изученными веществами подбор максимальных концентраций производится по аналогии с подобными по химической структуре веществами.

2.6.4. Вода водоемов

В основу гигиенического норматива - ПДК_в - берут максимальные загрязнения в воде водоемов, при которых сохраняются безопасность для человека и нормальные условия водопользования. Сброс сточных вод в водоемы должен быть максимально ограничен. Следует помнить, что для подавляющего числа пестицидов, поступающих в водоемы, нет способов удаления их при очистке воды, поэтому превышать установленные для воды нормативы нельзя.

В основе регламентирования концентрации химических соединений в воде, лежат следующие три основные критерия вредности: а) влияние на общий санитарный режим водоема; б) влияние на органолептические свойства воды; в) влияние на здоровье населения. Данные для определения ПДК_в получают исключительно из экспериментов. Существуют методические схемы, которые позволяют провести необходимые исследования и обосновать ПДК_в по одному из трех лимитирующих признаков нормирования.

2.7. Методы подготовки образцов объектов окружающей среды

Подготовка образца всегда преследует одновременно несколько целей:

- удаление из образца компонентов, мешающих идентификации пиков веществ-аналитов на хроматограмме;
- удаление из образца нерастворимых частиц, включая микроорганизмы, а также компонентов, загрязняющих аналитическую колонку и уменьшающих, тем самым, срок ее эксплуатации;
- перевод вещества-аналита в растворимую форму;
- концентрирование раствора вещества-аналита до уровня концентрации, позволяющей его регистрировать в инжектируемом в колонку объеме пробы [22].

В области аналитической химии окружающей среды процедуру подготовки образца к анализу методом ВЭЖХ формализовать крайне трудно по вполне понятным причинам: она определяется не только тем, какое вещество (вещества) необходимо определить, но и какой объект при этом выбирается для исследования. Такими объектами могут быть "чистые" атмосферные осадки и "грязные" дымовые газы, "чистые" поверхностные воды и "грязные" сточные воды предприятий, "чистые" озерные и морские донные отложения и "грязные" донные отложения очистных сооружений, "чистые" почвы и "грязные" грунты из мест захоронений отходов. А если учесть, что даже "чистые" природные объекты всегда заметно отличаются друг от друга, то становится ясно, что в

аналитической химии окружающей среды подготовка образца к хроматографическому анализу является важнейшей, если не определяющей, стадией всего анализа.

Понимая сложность задачи подготовки образца, трудно отдать предпочтение какому-либо одному методу. Несмотря на очевидный прогресс, наблюдаемый в этой области, в последнее десятилетие благодаря развитию метода твердофазной экстракции и ее микроварианта [23-26], до сих пор остаются актуальными традиционные методы: жидкостная экстракция, адсорбция, осаждение, дистилляция, химическая обработка образца и химическая дериватизация веществ - аналитов [22, 27]. Когда же речь идет о комплексном исследовании образца, предусматривающем одновременное определение в нем многих разнородных веществ, то процедура подготовки такого образца требует разработки специальной и, порой, весьма сложной стратегии [28, 29].

Остановимся подробнее на методах подготовки образцов наиболее часто встречающихся при использовании в качестве аналитического метода ВЭЖХ.

2.7.1. Отбор проб воздуха

Пестициды в воздухе могут находиться в виде газов, паров, аэрозолей, а также их смесей. Отбор проб воздуха для определения пестицидов осуществляют тремя способами:

- путем поглощения пестицидов на специальных (аэрозольных) фильтрах, через которые продувают заданный объем воздуха с помощью компрессоров (аспираторов);
- путем продувки заданного объема воздуха через трубку, заполненную селективным адсорбентом-поглотителем;
- путем поглощения пестицидов органическим растворителем, помещенным в емкость-ловушку, через которую продувают заданный объем воздуха.

2.7.2. Отбор проб в водоемах

Проба воды, взятая для анализа, должна отражать условия и место ее взятия, причем объем пробы должен соответствовать выбранной методике анализа и быть достаточным. Отбор проб из рек, ручьев, водохранилищ, озер, прудов, родников, колодцев, скважин дренажей ведется на глубине 0,2-0,3 м под поверхностью воды пробоотборным прибором (бутыль, батометр) с учетом скорости движения воды [30]. Объем воды, необходимый для полного анализа, отбирается в стеклянную бутылку и консервируется (если анализ будет проводиться через сутки и более).

2.7.3. Отбор проб почвы

В нашей стране каких-либо единых общепринятых норм для санитарной оценки почвы пока нет; отсутствуют и стандартные методы исследования почвы. При анализе почвы в качестве санитарных показателей определяют рН, растворимость, концентрацию контролируемого соединения. Отбор проб обычно производят с участка площадью 25 м² в 3-5 точках по диагонали с глубины 0,25 м, а при необходимости - с глубины 0,75-2 м. Взятые с каждого горизонта пробы перемешивают и такую пробу в количестве 1 кг отправляют на анализ. Пробы отбираются в банки с ватными пробками.

2.7.4. Подготовка водных образцов для определения пестицидов методом ВЭЖХ

2.7.4.1. Жидко-жидкостная экстракция

Влияние водной матрицы может быть причиной ошибок в количественном определении, и снижение этого влияния является важной целью, учитываемой при разработке конкретной методики определения пестицидов.

Жидко-жидкостная экстракция (ЖЖЭ) - классический способ извлечения пестицидов из водных образцов. Обычно проводят повторяющуюся несколько раз экстракцию из 500-1000 мл водного образца в делительной воронке. Наиболее популярным растворителем является дихлорметан. Он способен экстрагировать соединения с различной полярностью и легко упаривается. Методы Агентства по охране окружающей среды США (EPA US) 8120 и 8140 используют ЖЖЭ с помощью дихлорметана для определения в воде 15 хлорорганических и 21 фосфорорганических пестицидов. Для извлечения гербицидов – производных карбоновых кислот – исходную воду подкисляют до рН<2 и затем экстрагируют неионизованные молекулы диэтиловым эфиром или дихлорметаном [31].

Классическая ЖЖЭ трудно автоматизируется, требует больших объемов токсичных растворителей и весьма продолжительна по времени. Разделению слоев растворителей при анализе сильно загрязненных вод часто мешает образование устойчивых эмульсий. В таких случаях рекомендуют одиночную длительную ЖЖЭ делительной воронке объемом 1 л с растворителем, тяжелее воды [32].

Хотя классическая ЖЖЭ имеет много недостатков, она продолжает совершенствоваться. Так появилась микроЖЖЭ [33], разработанная как альтернативный метод для определения гербицида алахлор и двух его метаболитов. Принцип микроЖЖЭ – экстракция из большого объема воды (400 мл) очень маленьким объемом растворителя

(500 мкл толуола) – может быть применена в качестве подготовки пробы для анализа методом ГХ без стадии испарения, что важно для определения высоколетучих соединений. В сравнении с твердофазной экстракцией этот метод подготовки пробы быстрее и дешевле. Данных о применимости микроЖЖХ для экстракции других пестицидов нам в литературе найти не удалось.

Большое число разных гербицидов (фенилмочевины, триазины, динитроанилины, хлорацетамиды и урацилы) экстрагируют из пищевых продуктов механическим встряхиванием или гомогенизацией с органическими растворителями, такими как метанол, ацетонитрил, часто смешанными с водой дихлорметаном или этилацетатом, иногда при кислом значении pH [34].

Высокополярные гербициды, такие как глифосат, нерастворимы в большинстве органических растворителей и их экстрагируют водой или водой с хлороформом, иногда при кислом значении pH. При этой процедуре другие растворимые в воде компоненты (аминокислоты, аминсахара и др.) экстрагируются также. Их присутствие мешает определению глифосатов и делает необходимой очистку экстрактов, которая чаще всего осуществляется на ионообменных хроматографических колонках [35].

Бипиридиновые пестициды (дикват и паракват - четвертичные аммониевые соединения) обычно экстрагируют из матриц дефлегмацией или нагреванием с серной или с соляной кислотами, после чего проводят твердо-фазную экстракцию и хроматографию [35].

2.7.4.2. Твердофазная экстракция

Твердофазная экстракция (ТФЭ) как метод подготовки образцов известна уже 50 лет. Ее преимущества: экономия времени и растворителей, исключение опасности образования эмульсий, возможность выделения следовых количеств аналита, возможность автоматизации [36]. Особенно часто ТФЭ применяют при анализе природных вод.

Для выделения из воды пестицидов методом ТФЭ применяют, главным образом, колонки-картриджи, заполненные 0,5-2 мл фазы C18 (размер частиц 30-40 мкм) [36]. Процедура включает в себя следующие этапы:

- кондиционирование колонки – промывка дистиллированной водой;
- пропускание через колонку образца воды (200-1000 мл) со скоростью 5-10 мл/мин;
- промывка колонки слабым элюентом для удаления слабо сорбированных примесей;
- элюирование веществ-аналитов (пестицидов);
- промывка колонки сильным элюентом для удаления сильно сорбированных веществ.

ТФЭ активно применяют для определения триазиновых пестицидов [37] и продуктов их распада - гидроксид-*s*-триазинов, гербицидов - производных мочевины, *N*-метилкарбаматов и их полярных метаболитов [5, 38-42], хлорорганических и фосфорорганических инсектицидов [43], полярных пестицидов [44, 45] пиретроидов [46], триазольных и пиримидиновых пестицидов. Разработаны методы ТФЭ многокомпонентных смесей, включающие большое число пестицидов различных классов [42, 47 48, 49, 50]. Для повышения эффективности экстракции полярных пестицидов иногда применяют колонки со смесью двух сорбентов, например фаз С18 и Фенил [37, 51].

При ТФЭ кислот на фазах С18 для уменьшения потерь раствор образца целесообразно подкислить до $pH < 2$ [52]. Для ТФЭ неионных соединений иногда применяют графитированные сорбенты и фазы, представляющие собой макросетчатые стирол-дивинилбензолные полимеры [53].

Варианты различных методик концентрирования пестицидов приведены в обзорах [54, 55]. Так для пестицидов триазиновой группы, производных мочевины и группы феноксикислот успешно используют картриджи с активированной графитированной сажей *Carbopack B*, ионообменные смолы в ацетатной форме и фазу пропил-*NH*₂. Для ТФЭ фосфорорганических пестицидов применяют мембранные диски из полистирол-дивинилбензола типа "*XAD*".

В статье [43] приводится сравнение трех различных поли(диметилсилоксан)-дивинилбензолных волокон для экстракции многокомпонентных остатков пестицидов четырех групп: фосфорорганических, хлорорганических, пиретроидов и триазинов в образцах воды. Для этих соединений достигнуты пределы обнаружения 1-30 нг/л, 1-10 нг/л, 10-20 нг/л, 8-50 нг/л соответственно.

2.7.4.3. Твердофазная микроэкстракция

Рутинный мониторинг пестицидов требует быстрых методов анализа. В последнее время начал активно применяться микровариант ТФЭ (МТФЭ) [23, 48, 51, 56], при котором сорбция веществ из воды осуществляется на волокнах гидрофобных полимеров, помещаемых прямо в стакан, установленный на магнитной мешалке. В обзоре [57] подробно рассмотрены вопросы оптимизации МТФЭ и приведены таблицы, позволяющие ориентироваться в выборе условий МТФЭ для различных веществ, в том числе и для многих пестицидов. В таблицах указаны оптимальные объемы экстрагентов, pH раствора,

время экстракции, объемы аналитов, температура и время десорбции, описаны методики концентрирования остатков пестицидов из воде, из почвы, из пищевых продуктов.

2.7.4.4. Применение концентрирующих колонок

Если перед аналитической колонкой установить колонку небольшого объема с тем же сорбентом, а между ними установить переключающий кран, то принцип ТФЭ можно осуществлять в режиме *"on line"*. В этом варианте все элюаты на вспомогательных стадиях промывки концентрирующей колонки направляют мимо аналитической колонки и только при элюировании веществ-аналитов колонки соединяют последовательно [5, 47]. Главное преимущество этого подхода – возможность полной автоматизации процедуры подготовки пробы. Этот метод использовали для анализа нескольких пестицидов в водных матрицах. Эффективность метода зависит от оптимизации двух параметров – выбора размеров первой (концентрирующей) колонки и выбор "правильной" элюирующей силы подвижной фазы. Чтобы расширить применимость этого метода для одновременного определения пестицидов с различными полярностями была разработана компьютерная модель хроматографии для оптимизации условий тандемной градиентной ВЭЖХ.

2.7.4.5. Сверхкритическая жидкостная экстракция

Сверхкритическая жидкостная экстракция (СКЖЭ) является относительно новым методом, применяемым для извлечения веществ с помощью специальных экстрагентов – "сверхкритических" жидкостей. Такими экстрагентами могут быть жидкие CO_2 , NH_3 , пропан, бутан и др. [37]. Перечисленные газы переходят в жидкое состояние при высоких давлениях, поэтому СКЭЖ проводят в автоклавах. После окончания экстракции давление в автоклавах сбрасывают до атмосферного, газ-экстрагент улетает, и в автоклаве остаются только экстрагированные вещества. Их растворяют в подходящих растворителях и растворы анализируют.

СКЖЭ используется главным образом для анализа различных классов пестицидов в почвах, тканях животных и растений. Регулируют эффективность экстракции путем добавок к экстрагенту других растворителей. Наиболее распространенный соразработитель, добавляемый к углекислоте - метанол. Его добавление позволяет преодолеть матричные эффекты, когда пестициды, прочно связанные с матрицей, чистой углекислотой не экстрагируются [37]. Кроме этого, добавка метанола или ацетона повышает растворимость в углекислоте полярных соединений.

Прямая СКЖЭ редко используется для экстракции аналитов из водной матрицы. Ограничение метода связано с проблемой образования льда и с проблемой удаления воды из экстрактов. Подробные сведения о СКЖХ можно найти в обзоре [54].

2.7.5. Подготовка образцов почвы

Подготовка образцов почвы - достаточно сложная и трудоемкая процедура, так как вещества почвы обладают значительной сорбционной способностью. Для повышения выхода веществ-аналитов экстракцию проводят в микроволновых печах и в ультразвуковых ваннах. Сочетание микроволновой экстракции с ОФ ЖХ с УФ детектором применяется, например, для определения фенилмочевинных гербицидов в почве как для одного соединения, так и для многокомпонентных смесей. Оно позволяет определять вещества в почве при их концентрации около 10-50 мкг/кг при степени извлечения 80-120%. Отмечено, что для старых образцов почвы эти показатели значительно хуже [33].

3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1. Оборудование

В работе использовали жидкостный хроматограф "Милихром А-02" (ЗАО "ЭкоНова", Новосибирск), устройство которого описано в работе [58].

Весы аналитические "Adventurer" и весы технические "Scout II" фирмы "Ohaus Europe" (Швейцария); *pH*-метр "Анион-4100" (НПП "Инфраспак-Аналит", Новосибирск); магнитная мешалка "ПЭ-6110" (АО "Экрос", С.-Петербург); микроцентрифуга "MiniSpin" (Eppendorf, Германия); пипетки переменного объема до 100 и 1000 мкл со сменными наконечниками "Ленпипет Колор"; пипетки на объемы 20 и 200 мкл ЗАО "ТермоЛабсистемс" (С.-Петербург).

3.2. Материалы

Для твердофазной экстракции использовали картриджи BAKERBOND spe Octadecyl (3 мл, 500 мг) фирмы "J.T.Baker" (США).

Ацетонитрил для ВЭЖХ "сорт 1" ("Криохром", Санкт-Петербург); метанол "ч.д.а."; вода, очищенная на установке "Milli-Q" ("Millipore", США); вода бидистиллированная; хлороформ "ч".

Для формирования базы данных использовали хроматографически чистые (по данным ВЭЖХ-УФ) препараты с содержанием основного вещества не менее 95%.

Стандартные образцы пестицидов фирмы "PolyScience" (США).

Хроматографическая колонка 2x75 мм с сорбентом ProntoSIL 120-5-C18 AQ.

Основные свойства обращенной фазы ProntoSIL 120-5-C18 AQ ("Bischoff Chromatography", Германия): форма зерен – сферическая; диаметр зерна – $5 \pm 1,5$ мкм; диаметр пор силикагеля – 120 \AA ; площадь поверхности – $300 \text{ м}^2/\text{г}$; объем пор – $1 \text{ см}^3/\text{г}$; содержание углерода – 13% (вес.).

Аттестованную смесь "БД-2003" (раствор калия бромистого, уридина, кофеина, *o*-нитроанилина, *m*-нитроанилина) и концентрат элюента "А" были любезно предоставлены ЗАО "ЭкоНова" (Новосибирск).

Орто-нитроанилин фирмы "ALDRICH" (США).

3.3. Методы

3.3.1. Твердофазная экстракция пестицидов

Для ТФЭ пестицидов из водных растворов использовали картриджи BAKERBOND spe Octadecyl (3 мл, 500 мг). Пробу воды подавали в картридж со скоростью не выше 5 мл/мин при помощи вакуумирования.

При работе с картриджами применяли процедуру подготовки пробы, включающую в себя следующие стадии:

- кондиционирование (3 мл метанола);
- промывку (3 мл воды, не допуская высыхания патрона);
- нанесение пробы исследуемой воды;
- элюирование пестицидов (3 мл ацетонитрила);
- упаривание растворителя в токе гелия, растворение остатка в 100 мкл ацетонитрила.

3.3.2. Жидко-жидкостная экстракция пестицидов

Для жидкостной экстракции пестицидов из водных образцов использовали стеклянные колбы с притертыми стеклянными пробками.

Образцы воды объемом 400 мл экстрагировали трижды по 10 мл хлороформа, интенсивно встряхивая каждый раз в течение трех минут. Смесь оставляли отстаиваться до полного разделения фаз, отбирали 5 мл органической фазы (50% от добавленного объема хлороформа) в коническую стеклянную пробирку на 10 мл и экстракт упаривали на кипящей водяной бане до влажного остатка, который затем растворяли в 100 мкл ацетонитрила и анализировали.

3.3.3. Отбор проб воды для определения пестицидов

Пробы поверхностной воды отбирали в стеклянные бутылки емкостью 1 л, герметично закрывали пробками с вкладышами из алюминиевой фольги и хранили в темноте при температуре +4°C не более 3-х суток. Перед набором пробы бутылки трижды промывали исследуемой водой.

3.4. Подготовка к выполнению измерений

3.4.1. Приготовление элюента "А"

10 мл раствора концентрата элюента "А" вносили стеклянной пипеткой в мерную колбу на 200 мл, доводили объем раствора до метки дистиллированной

водой и перемешивали, доводили рН до 2.2. Состав полученного раствора: 0.2 М LiClO₄ в 0.005 М HClO₄.

3.4.2. Приготовление растворов пестицидов для формирования базы данных "Пестициды"

Брали навеску препарата пестицида 10 мг. Готовили 50 мл раствора стандартного образца пестицида в воде, метаноле или ацетонитриле, в зависимости от его растворимости. Навеску образца брали из расчета концентрации определяемого компонента 0.2 мг/мл. При необходимости растворение проводили при нагревании на водяной бане. Растворы хранили в темноте при +4°C.

3.4.3. Выполнение хроматографического анализа

Анализы выполняли на колонке с ProntoSIL-120-5-C18 AQ согласно аттестованным методикам выполнения измерений (МВИ) "Массовая концентрация УФ-поглощающих веществ. Методика выполнения измерений методом ВЭЖХ" и "Хроматографические параметры УФ-поглощающих веществ. Методика выполнения измерений методом ВЭЖХ" (регистрационные свидетельства №37-03 и №38-03; № ФР.1.31.2003.00950 и №ФР.1.31.2003.00951 в Федеральном реестре методик выполнения измерений) в следующих условиях:

Элюент "А": 0.2 М LiClO₄-0.005 М HClO₄

Элюент "Б": ацетонитрил

Градиентное элюирование по программе:

Степень градиента (шаг)	Объем, мкл	Доля элюента "Б", %
Регенерация	800	5
0	0	5
1	4000	100
2	4300	100

Скорость потока: 100 мкл/мин

Температура термостата колонки: 40°C

Длина волны детектора: 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280 и 300 нм

Постоянная времени детектора: 0.18 с

Объем пробы: 4 мкл.

3.5. Подготовка хроматографа

Хроматограф готовили в соответствии с руководством по его эксплуатации. После приготовления элюентов проверяли их пригодность по контрольной

хроматограмме в условиях по п. 3.4.3. (проба – 4 мкл воды) для проверки наличия УФ-поглощающих примесей в подвижной фазе. Элюенты считаются пригодными, если высота пиков веществ-примесей при любой из 8 длин волн детектирования не превышает 0.02 е.о.п. (рис. 1).

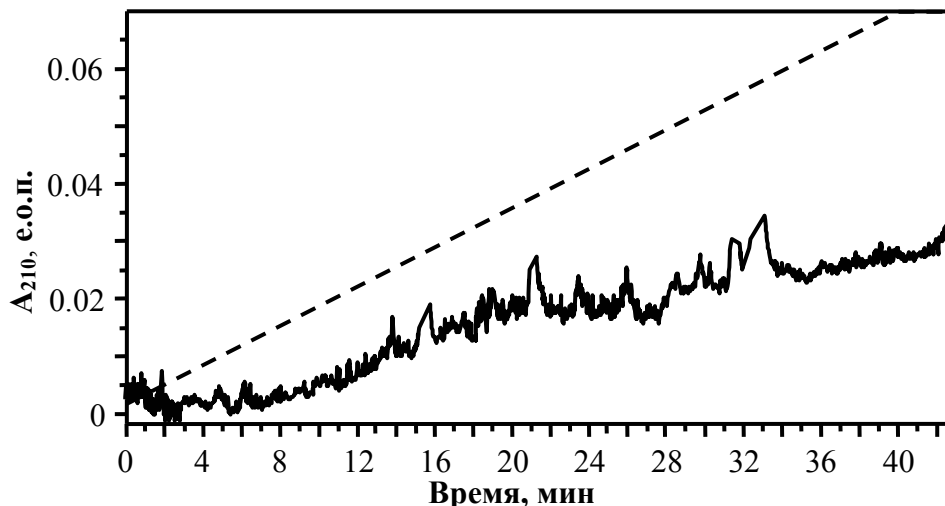


Рис.1. Хроматограмма без образца для проверки чистоты элюентов "А" и "Б".
Условия хроматографирования в п. 3.4.

Перед выполнением серии анализов правильность работы хроматографа проверяли по результатам хроматографирования тестовой смеси "БД-2003" в условиях п. 3.4.3. Пример хроматограммы смеси "БД-2003" приведен на рис. 2.

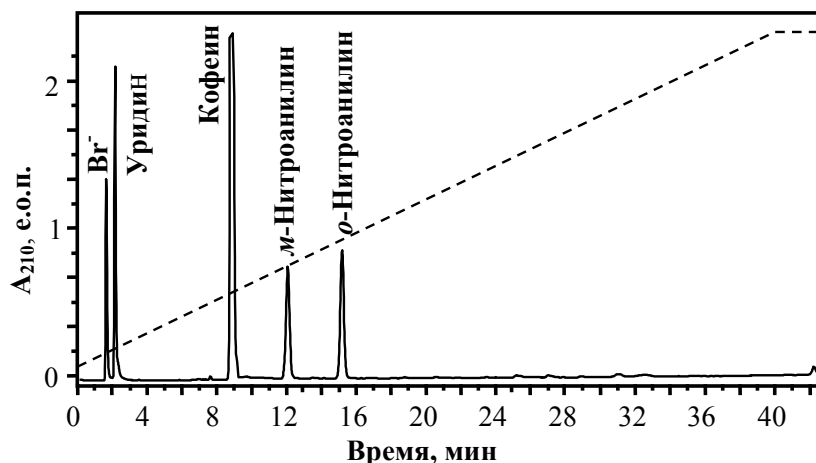


Рис. 2. Хроматограмма тестовой смеси "БД-2003".

Полученную хроматограмму обрабатывали с помощью расчетной программы "Мультихром" (ЗАО "Амперсенд", Москва) и полученные данные сравнивали с соответствующими аттестованными параметрами из МВИ №37-03 и №38-03 (см. табл. 2). Хроматограф считается пригодным для проведения анализов с целью формирования базы данных или выполнения анализов образцов для

определения в них пестицидов по базе данных только в том случае, если все экспериментально полученные параметры совпадают с параметрами из табл. 2 с учетом указанных доверительных интервалов.

Таблица 1. Аттестованные хроматографические и спектральные параметры веществ, входящих в смесь "БД-2003".

Вещество	Параметры	Аттестованное значение параметра	Границы относительной погрешности, %, $P=0.95$
1. Бромид-ион	Объем удерживания	150	± 6
2. Уридин	Спектральные отношения $S_{280/250}$	0.50	± 6
3. Кофеин	Спектральные отношения $S_{280/220}$	0.76	± 5
4. <i>m</i> -Нитроанилин	Спектральные отношения $S_{260/230}$	0.60	± 4
5. <i>o</i> -Нитроанилин	Объем удерживания	1525	± 4
	Спектральные отношения $S_{220/210}$	1.69	± 3
	Спектральные отношения $S_{230/210}$	1.74	± 5
	Спектральные отношения $S_{240/210}$	1.07	± 7
	Спектральные отношения $S_{250/210}$	0.57	± 7
	Спектральные отношения $S_{260/210}$	0.39	± 6
	Спектральные отношения $S_{280/210}$	0.59	± 4
	Спектральные отношения $S_{300/210}$	0.31	± 7
	Площадь пика S_{210} , мкл*о.е.п.	1.04	± 7
	Асимметрия пика $A_{10\%}$ при $\lambda=210$ нм	24.8	± 4

3.6. Формирование ВЭЖХ-УФ базы данных "Пестициды".

Для формирования базы данных "Пестициды" растворы веществ с концентрацией 0.2 мг/мл, приготовленные по п. 3.4.2, дважды хроматографировали в условиях по п. 3.4.3. и записывали спектр раствора пестицида (для справки) вблизи максимума хроматографического пика после остановки потока. Рассчитывали (как среднее из двух хроматограмм) объем удерживания, площадь пика и спектральные отношения $S_{\lambda/210}$. Полученные значения вносили в идентификационную таблицу.

3.7. Количественное определение пестицидов методом ВЭЖХ-УФ с идентификацией по базе данных "Пестициды"

Для определения пестицидов в растворе пробы проводили анализ по п. 3.4.3. Рассчитывали объем удерживания, площадь пика и спектральные отношения $S_{\lambda}/210$. Полученные значения сравнивали с величинами из базы данных. Если для пика вещества "X" они совпадали (в пределах допустимой погрешности) с соответствующими параметрами для пестицида "У" из базы данных, то делалось заключение о том, что вещество "X" является пестицидом "У". После этого проводили расчет концентрации пестицида в пробе путем сравнения площади его пика на хроматограмме с площадью "стандартного" пика из базы данных.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Постановка задачи

Пестициды отнесены к приоритетным экотоксикантам, и поэтому, должны находиться под постоянным контролем в объектах окружающей среды. Мониторинг пестицидов предусматривает их количественное определение в широком интервале концентраций, включающем уровень фона. Среди методов анализа, которые применимы к определению пестицидов, в первую очередь относятся высокоэффективные варианты газовой и жидкостной хроматографии.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) - один из самых информативных аналитических методов. Он широко используется во всех развитых странах, но, по сравнению с другими физико-химическими методами анализа, требует весьма высокой квалификации персонала, а стоимость одного анализа достигает нескольких десятков и даже сотен долларов США. Таким образом, упрощение самой процедуры ВЭЖХ-анализа и снижение ее стоимости предоставляется важной задачей.

Указанные недостатки ВЭЖХ обусловлены тем, что для каждого пестицида (или группы пестицидов) нормативные документы регламентируют свой "уникальный" вариант ВЭЖХ-анализа. Это приводит к необходимости часто перестраивать хроматограф, что занимает много времени и требует определенного опыта. Кроме того, аналитическая лаборатория, выполняющая анализы с привлечением многих разных методик, вынуждена содержать целый склад дорогостоящих колонок, органических растворителей и стандартных образцов пестицидов.

Решение проблемы нам видится в разработке "универсальной" методики определения пестицидов, выполняемой методом градиентной хроматографии на одной колонке с одним набором растворителей и пригодной для определения большого числа веществ от полярных до неполярных. Такой подход был применен ранее при создании унифицированной методики, предназначенной для определения фармацевтических субстанций и наркотиков методом обращенно-фазной ВЭЖХ с многоволновым УФ-детектированием на хроматографе "Миличром А-02" [59]. Исключение необходимости перестройки хроматографа при переходе с определения одного вещества к другому позволило отказаться от обязательной в таких случаях калибровки хроматографа по стандарту вещества-аналита. Это, в свою очередь, явилось предпосылкой к превращению

хроматографа в специализированный заранее откалиброванный анализатор, в котором все калибровочные параметры сохраняются в виде базы данных. Наряду с временем удерживания и нормированной площадью пика, набор параметров для каждого вещества включал в себя спектральные характеристики вещества в виде семи спектральных отношений S_{λ}/S_{210} (отношение площадей пиков вещества при фотометрическом детектировании при длинах волн детектора 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280 и 300 нм), необходимых для надежной идентификации пиков на хроматограмме.

В конце 2003 г. методика выполнения измерений методом ВЭЖХ в режиме анализатора была аттестована Госстандартом РФ. Она была взята нами без изменений для формирования базы данных ВЭЖХ-УФ "Пестициды", с помощью которой было бы возможно осуществлять качественное и количественное определение пестицидов в природных водах.

4.2. Формирование базы данных "Пестициды"

Формирование базы данных осуществляли по п. 3.6. Для каждого образца определяли объем (время) удерживания, площадь пика при 210 нм, спектральные отношения и для справки записывали полный УФ-спектр раствора вещества после остановки потока элюента вблизи максимума хроматографического пика. Типичная стандартная хроматограмма показана на рис. 3. В таблице 2 приведены усредненные хроматографические и спектральные данные для атразина, полученные из двух экспериментов, которые были внесены в базу данных "Пестициды".

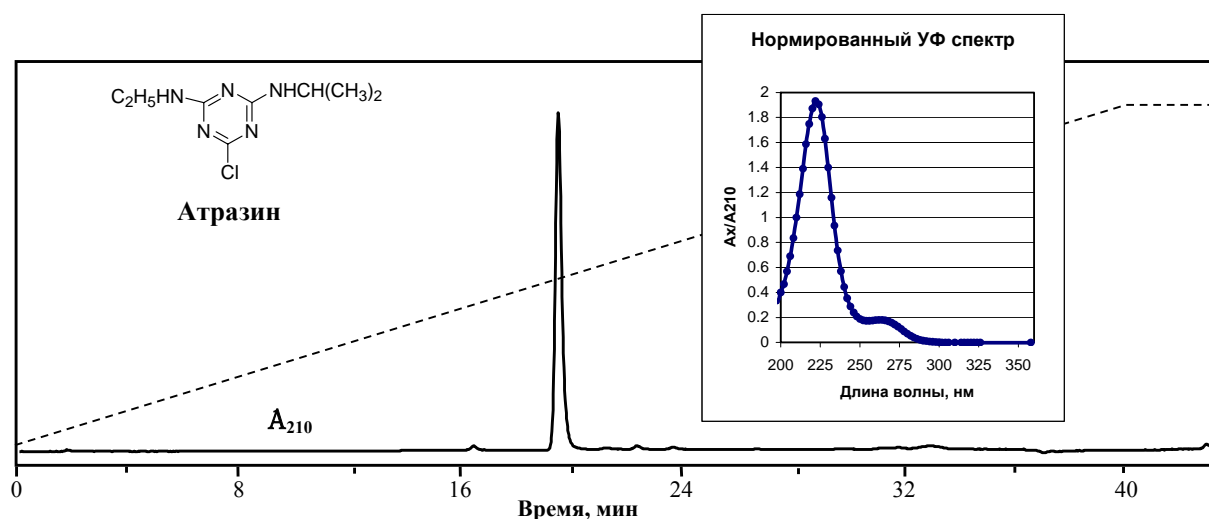


Рис. 3. Стандартная хроматограмма и УФ-спектр атразина.

Таблица 2. Усредненные хроматографические и спектральные характеристики атразина, полученные из двух хроматограмм.

V_r , мкл	S_{210} е.о.п.*мкл	$R=S_{\lambda}/S_{210}$						
		S_{220}	S_{230}	S_{240}	S_{250}	S_{260}	S_{280}	S_{300}
1944	70.18	1.85	1.38	0.44	0.19	0.18	0.07	0.04

Таким образом, была сформирована база хроматографических и спектральных данных для 45 пестицидов, большинство из которых определяются в аналитической практике, в основном, методом ОФ ВЭЖХ-УФ. Все полученные параметры суммированы в таблице 3. Структурные формулы пестицидов, включенных в базу данных, показаны в таблице 4.

Так как все эксперименты были сделаны в условиях, регламентированных методиками № ФР.1.31.2003.00950 и № ФР.1.31.2003.00951, то метрологические характеристики всех параметров, включенных в базу данных "Пестициды" также определяются этими документами. Мы приводим их ниже.

Наименование параметра X	Диапазон измерений	Границы погрешности измерений ($P=0,95$)		Предел повторяемости, ($n=2, P=0,95$)		Предел воспроизводимости, ($m=2, P=0,95$)	
		относит., %, δ	абсолют. Δ	относит., %, r	абсолют. $r_{абс}$	относит., %, R	абсолют. $R_{абс}$
Массовая концентрация, мг/мл	0,2	± 10		4		10	
Удельная площадь пика S_{a210} , е.о.п.*мкл мг/мл	125-1250	± 5		3		7	
Объем удерживания V_R , мкл	150-4300	± 10		4		11	
Спектральное отношение S_{λ}/S_{210}	0,10-1,00 св.1,00-10,0	± 8	$\pm 0,03$	4	0,02	10	0,03
Площадь пика S_{210} , е.о.п.*мкл	25-250	± 5		3		7	

Таблица 3. База данных "Пестициды". Хроматографические и спектральные данные.

№	Пестицид	V _R , мкл	S ₂₁₀ е.о.п.*мкл	S _i /S ₂₁₀						
				220	230	240	250	260	280	300
1	Алахлор	2622	50.0	0.63	0.20	0.06	0.03	0.03	0.01	0.00
2	Атразин	1944	70.2	1.85	1.38	0.44	0.19	0.18	0.07	0.04
3	Банвел Д	1735	67.3	0.54	0.23	0.17	0.09	0.04	0.04	0.05
4	Бендиокарб	1815	53.5	0.28	0.23	0.16	0.03	0.06	0.19	0.00
5	Бенефин	3392	38.9	0.85	0.78	0.65	0.46	0.38	0.45	0.20
6	Бентазон	1948	89.3	0.80	0.38	0.36	0.26	0.07	0.04	0.08
7	Гексахлорбензол	3746	112.6	1.24	0.43	0.23	0.08	0.05	0.00	0.01
8	Гептахлор	3576	15.8	0.72	0.35	0.13	0.03	0.00	0.00	0.00
9	Гутион	2345	57.9	1.27	1.15	0.57	0.28	0.20	0.32	0.28
10	2,4-Д	2030	54.8	0.49	0.52	0.16	0.02	0.03	0.11	0.01
11	2,4-Д Ме эфир	2491	61.2	0.50	0.53	0.16	0.01	0.02	0.11	0.01
12	2,4-Д изо Октил эфир	3716	39.7	0.47	0.50	0.16	0.01	0.02	0.10	0.02
13	2,4-ДБ	2344	67.6	0.43	0.51	0.24	0.02	0.02	0.10	0.03
14	2,4-ДБ Ме эфир	2856	59.7	0.43	0.51	0.25	0.02	0.02	0.10	0.03
15	Дактал	2921	113.2	0.77	0.33	0.22	0.04	0.01	0.01	0.03
16	ДДД	3389	57.8	0.71	0.98	0.57	0.05	0.03	0.01	0.00
17	ДДЕ	3749	58.4	0.70	0.69	0.71	0.70	0.57	0.27	0.02
18	ДДТ	3649	47.7	0.75	0.79	0.79	0.11	0.04	0.01	0.00
19	Димилин	2597	49.6	0.56	0.55	0.58	0.66	0.70	0.37	0.05
20	Дихлобенил	2264	221.0	0.20	0.16	0.15	0.02	0.00	0.03	0.04
21	Диурон	2036	99.3	0.55	0.25	0.50	0.76	0.44	0.04	0.03
22	Карбофуран	1841	39.2	0.58	0.36	0.05	0.03	0.08	0.27	0.00
23	Метоксихлор	3177	45.9	0.64	0.78	0.64	0.52	0.22	0.11	0.00
24	Метомил	930	17.9	1.47	2.50	2.30	0.83	0.14	0.00	0.00
25	Парадихлорбензол	2674	28.4	1.91	1.42	0.04	0.02	0.04	0.04	0.00
26	Пентахлорфенол	2894	155.2	0.64	0.26	0.16	0.06	0.03	0.02	0.05
27	Прометон	1819	80.0	1.00	0.80	0.73	0.50	0.18	0.01	0.00
28	Прометрин	2036	65.2	1.30	1.21	1.06	0.88	0.82	0.26	0.02
29	Пропазин	2231	60.26	1.90	1.45	0.47	0.19	0.18	0.07	0.00
30	Пропанил	2253	101.7	0.43	0.23	0.43	0.63	0.48	0.05	0.01
31	Рамрод	2113	43.6	0.58	0.36	0.16	0.07	0.04	0.01	0.00
32	Ридомил	2022	47.2	0.56	0.14	0.04	0.02	0.03	0.01	0.00
33	Симазин	1649	67.8	1.82	1.31	0.41	0.18	0.18	0.07	0.00
34	Суми-8	2701	44.6	0.83	0.55	0.58	0.66	0.58	0.20	0.03
35	Суми-Альфа	3687	58.6	0.71	0.54	0.23	0.06	0.04	0.06	0.00
36	2,4,5-Т	2259	126.2	0.32	0.24	0.16	0.03	0.01	0.04	0.04
37	2,4,5-Т Ме эфир	2720	108,2	0.32	0.24	0.16	0.03	0.01	0.04	0.04
38	2,4,5-Т изо Окт эфир	3864	71.3	0.32	0.24	0.17	0.03	0.01	0.04	0.04
39	Тебутиурон	1555	14.3	0.82	0.98	1.88	2.87	2.74	0.30	0.01
40	Темик	1536	22.1	0.42	0.18	0.27	0.30	0.20	0.03	0.00
41	Триаллат	3447	50.5	0.70	0.41	0.21	0.07	0.02	0.00	0.00
42	Трифлуралин	3386	36.2	0.86	0.80	0.67	0.48	0.41	0.48	0.21
43	Фузилад	3301	25.4	1.03	0.90	0.47	0.31	0.31	0.27	0.02
44	Хлорпрофам	2522	128.9	0.23	0.32	0.46	0.18	0.02	0.03	0.00
45	Циперметрин	3641	72.7	0.68	0.45	0.23	0.06	0.03	0.05	0.00

Таблица 4. База данных "Пестициды". Структурные формулы пестицидов.

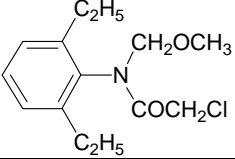
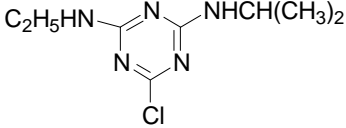
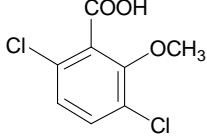
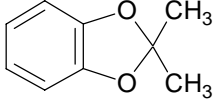
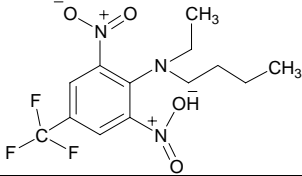
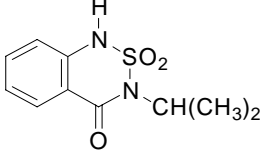
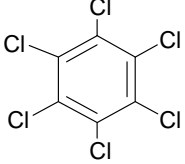
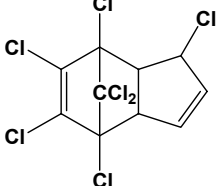
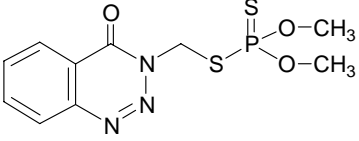
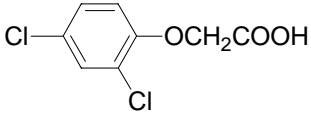
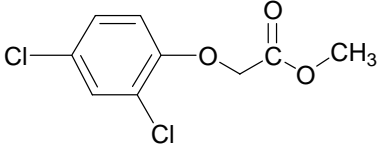
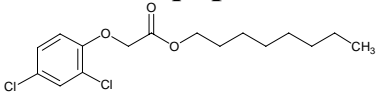
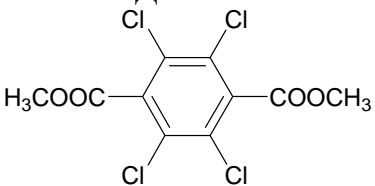
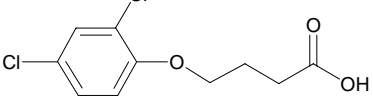
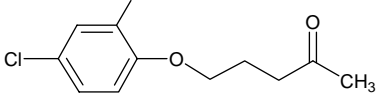
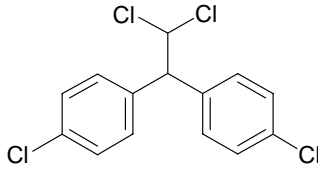
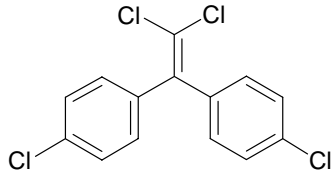
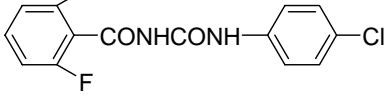
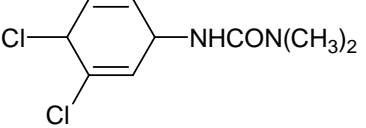
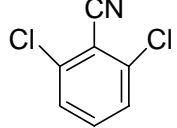
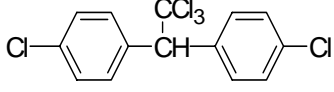
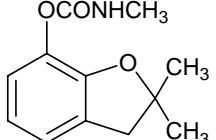
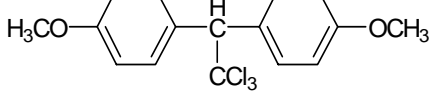
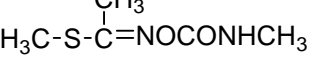
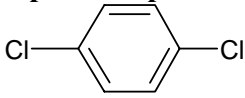
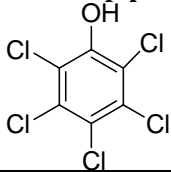
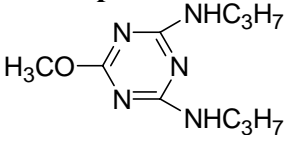
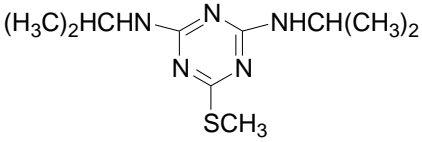
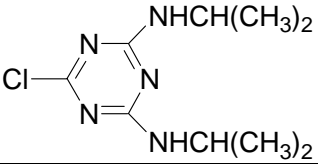
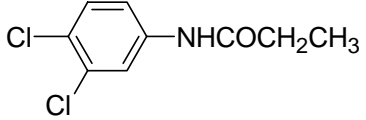
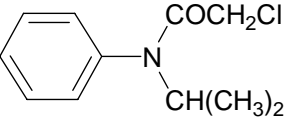
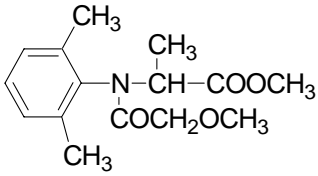
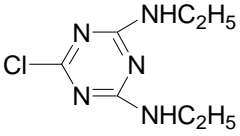
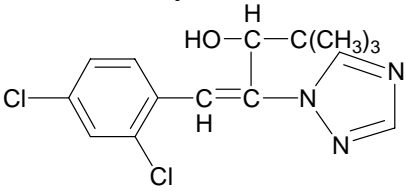
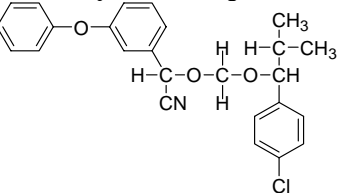
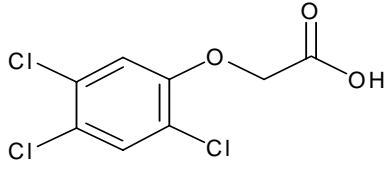
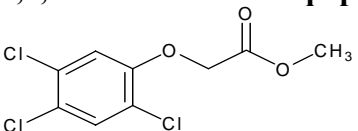
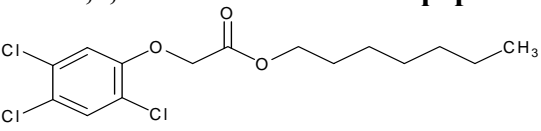
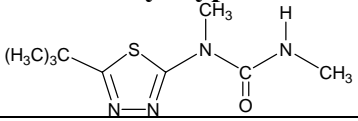
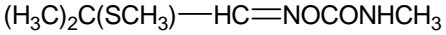
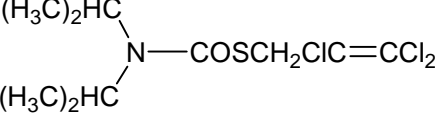
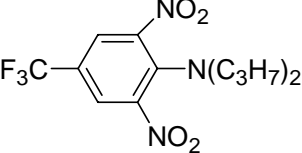
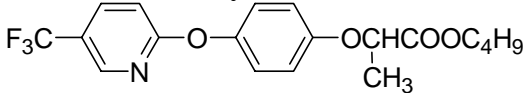
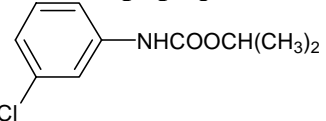
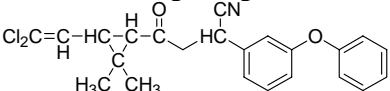
<p>Алахлор</p> 	<p>Атразин</p> 	<p>Банвел Д</p> 
<p>Бендиокарб</p> 	<p>Бенефин</p> 	<p>Бентазон</p> 
<p>Гексахлорбензол</p> 	<p>Гептахлор</p> 	<p>Гутион</p> 
<p>2,4-Д</p> 	<p>2,4-Д Метилловый эфир</p> 	<p>2,4-Д изо Октиловый эфир</p> 
<p>Дактал</p> 	<p>2,4-ДБ</p> 	<p>2,4-ДБ Метилловый эфир</p> 
<p>ДДД</p> 	<p>ДДЕ</p> 	<p>Димилин</p> 
<p>Диурон</p> 	<p>Дихлобенил</p> 	<p>ДДТ</p> 
<p>Карбофуран</p> 	<p>Метоксиклор</p> 	<p>Метомил</p> 

Таблица 4. База данных "Пестициды". Структурные формулы пестицидов (продолжение).

<p>Парадихлорбензол</p> 	<p>Пентахлорфенол</p> 	<p>Прометон</p> 
<p>Прометрин</p> 	<p>Пропазин</p> 	<p>Пропанил</p> 
<p>Рамрод</p> 	<p>Ридомил</p> 	<p>Симазин</p> 
<p>Суми-8</p> 	<p>Суми-Альфа</p> 	<p>2,4,5-Т</p> 
<p>2,4,5-Т Метилловый эфир</p> 	<p>2,4,5-Т изоОктиловый эфир</p> 	
<p>Тебутиурон</p> 	<p>Темик</p> 	
<p>Триаллат</p> 	<p>Трифлуралин</p> 	
<p>Фузилад</p> 	<p>Хлорпрофам</p> 	
<p>Циперметрин</p> 		

4.3. Апробация экстракционных методов концентрирования пестицидов из водных растворов

Согласно методике № ФР.1.31.2003.00950 база данных "Пестициды" позволяет гарантировано определять индивидуальные пестициды в растворах при их концентрации около 200 мг/л. Для того, чтобы с ее помощью можно было определять пестициды в природных водах, в которых предельно допустимые уровни их концентраций во много раз ниже, необходимо провести концентрирование пробы. При определении пестицидов в разбавленных растворах наиболее распространенными методами концентрирования являются жидко-жидкостная и твердо-фазная экстракции (ЖЖЭ и ТФЭ). Мы апробировали оба этих метода для уровня концентрации пестицидов 100 мкг/л при концентрировании образца в 4000 раз (объем исходного образца – 400 мл, объем раствора концентрата – 100 мкл) и показали их пригодность для решения поставленных задач.

4.3.1. Твердо-фазная экстракция пестицидов из воды

ТФЭ пестицидов из воды осуществляли на колонке-картридже с фазой C18. Этот сорбент используют для извлечения из водных растворов веществ, обладающих средней и слабой полярностью. Процедуру концентрирования апробировали на растворе *орто*-нитроанилина. 400 мл раствора этого вещества в дистиллированной воде с концентрацией 100 мкг/л пропускали через колонку для ТФЭ, элюировали *орто*-нитроанилин ацетонитрилом порциями по 100 мкл и каждую фракцию анализировали. Содержание *орто*-нитроанилина во фракциях приведено на рис. 4, из которого следует, что практически все нанесенное на колонку вещество элюировалось во фракциях 4-8.

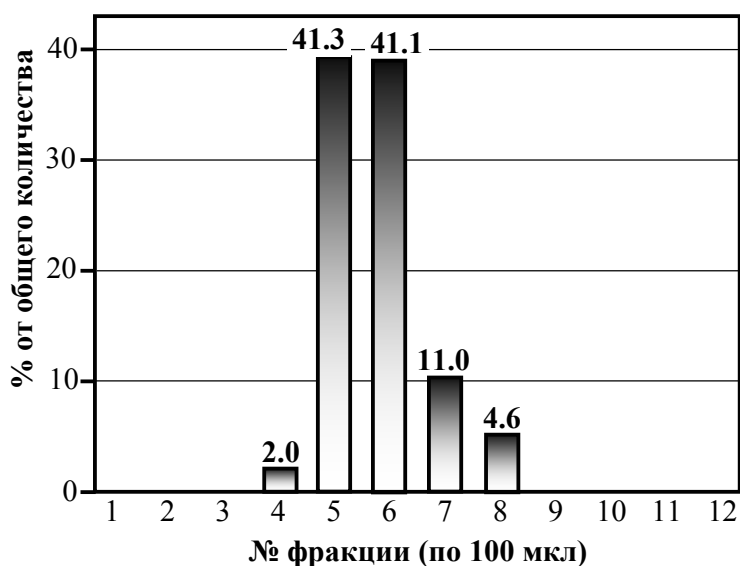


Рис. 4. Распределение *о*-нитроанилина по фракциям при элюировании с картриджа для ТФЭ.

Аналогичные эксперименты были проведены с более гидрофобными веществами – атразином и пропазином (рис.5). Они, как и ожидалось, полностью элюировались в несколько больших объемах – 9000 и 1000 мкл. В дальнейшем, для гарантированного извлечения всех пестицидов из картриджа, отбирали 1500 мкл элюата.

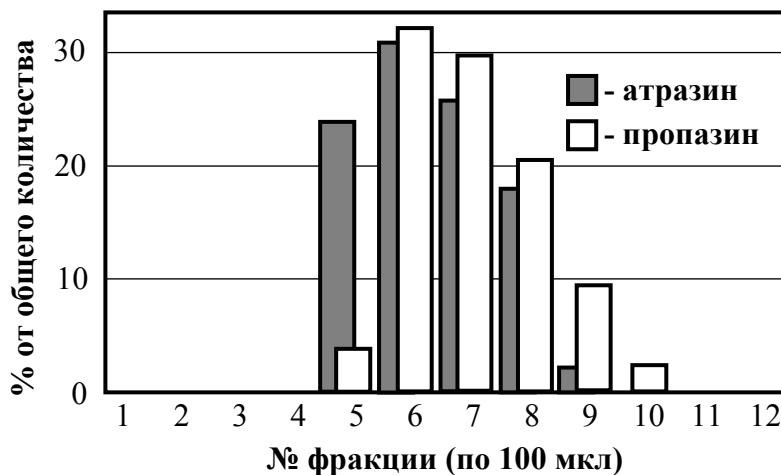


Рис. 5. Распределение атразина и пропазина по фракциям при элюировании с картриджа для ТФЭ.

Для оценки степени извлечения пестицидов из воды методом ТФЭ готовили растворы веществ, принадлежащих к разным классам органических соединений, в очищенной дистиллированной воде с концентрацией каждого пестицида 100 мкг/л. Пропускали по 400 мл этих растворов через картридж с фазой C18, элюировали пестициды 1.5 мл ацетонитрила, упаривали отобранный элюат до 100 мкл и анализировали полученный концентрат в стандартных условиях. Хроматограммы приведены на рис. 6.

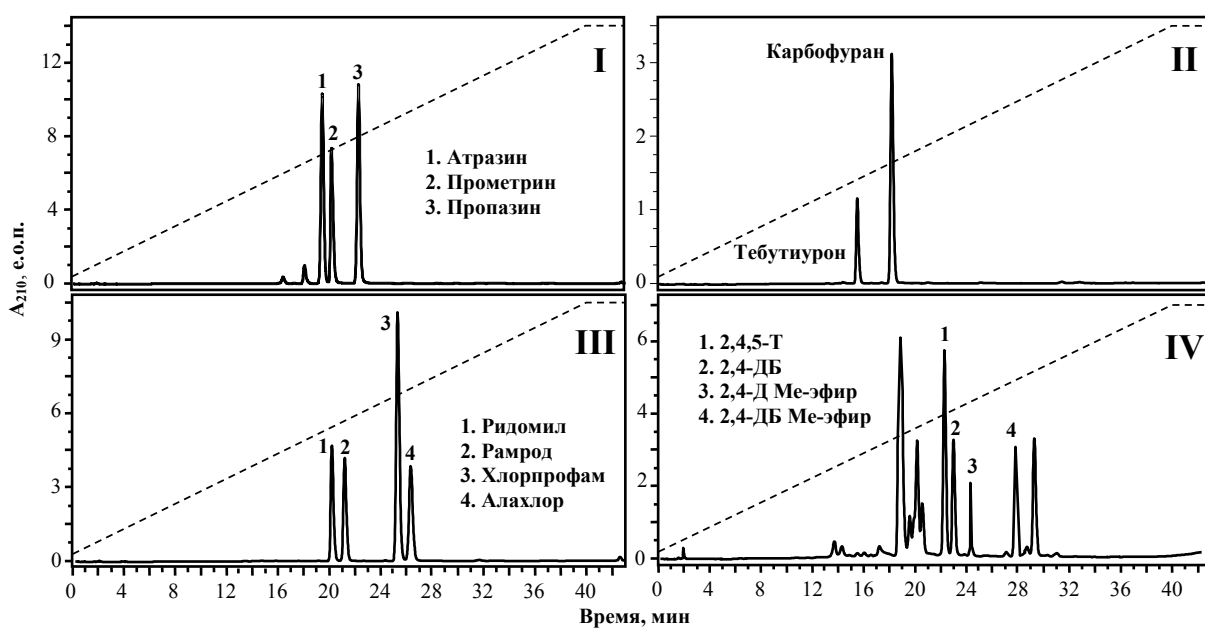


Рис. 6. Определение растворенных в дистиллированной воде пестицидов после их концентрирования методом ТФЭ.

Идентификацию пиков пестицидов на хроматограммах проводили путем сравнения их объемов удерживания и спектральных отношений со справочными параметрами из базы данных "Пестициды" (см. табл. 4). Как видно из табл. 5 для всех пестицидов все спектральные отношения совпали в пределах погрешности. Группа пиков на хроматограмме IV осталась неидентифицированной, так как их спектральные отношения не совпали ни с одним набором параметров из базы данных. Эти вещества являются, видимо, примесями, которые попали в пробу из лабораторного фона.

Таблица 5. Идентификация пиков пестицидов на хроматограммах, приведенных на рис. 4.
БД – параметры из базы данных "Пестициды", Хром – из хроматограммы.

Пестицид		V _r , мкл	S ₂₁₀ е.о.п.*мкл	R=S _λ /S ₂₁₀						
				S ₂₂₀	S ₂₃₀	S ₂₄₀	S ₂₅₀	S ₂₆₀	S ₂₈₀	S ₃₀₀
Атразин	БД:	1944	70.2	1.85	1.38	0.44	0.19	0.18	0.07	0.04
	Хром:	1937	85.5	1.87	1.37	0.44	0.19	0.18	0.07	0.04
Прометрин	БД:	2036	65.2	1.30	1.21	1.06	0.88	0.82	0.26	0.02
	Хром:	2009	81.9	1.31	1.21	1.06	0.87	0.81	0.26	0.02
Пропазин	БД:	2231	60.26	1.90	1.45	0.47	0.19	0.18	0.07	0.00
	Хром:	2219	91.2	1.91	1.43	0.46	0.20	0.18	0.07	0.00
Тебутиурон	БД:	1555	14.3	0.82	0.98	1.88	2.87	2.74	0.30	0.01
	Хром:	1558	17.3	0.83	0.98	1.86	2.84	2.71	0.29	0.01
Карбофуран	БД:	1841	39.2	0.58	0.36	0.05	0.03	0.08	0.27	0.00
	Хром:	1828	51.5	0.60	0.37	0.05	0.02	0.08	0.28	0.00
Ридомил	БД:	2022	47.2	0.56	0.14	0.04	0.02	0.03	0.01	0.00
	Хром:	2002	72.8	0.55	0.14	0.04	0.02	0.02	0.01	0.00
Рамрод	БД:	2113	43.6	0.58	0.36	0.16	0.07	0.04	0.01	0.00
	Хром:	2102	69.2	0.59	0.37	0.16	0.06	0.3	0.00	0.00
Хлорпрофам	БД:	2522	128.9	0.23	0.32	0.46	0.18	0.02	0.03	0.00
	Хром:	2517	185.3	0.24	0.33	0.47	0.18	0.02	0.03	0.00
Алахлор	БД:	2622	50.0	0.63	0.20	0.06	0.03	0.03	0.01	0.00
	Хром:	2616	83.6	0.62	0.21	0.07	0.03	0.03	0.01	0.00
2,4,5-Т	БД:	2259	126.2	0.32	0.24	0.16	0.03	0.01	0.04	0.04
	Хром:	2254	120.4	0.34	0.26	0.18	0.04	0.02	0.05	0.04
2,4-ДБ	БД:	2344	67.6	0.43	0.51	0.24	0.02	0.02	0.10	0.03
	Хром:	2326	76.6	0.43	0.51	0.25	0.03	0.02	0.10	0.03
2,4-Д Ме эфир	БД:	2491	61.2	0.50	0.53	0.16	0.01	0.02	0.11	0.01
	Хром:	2469	31.0	0.49	0.51	0.15	0.01	0.02	0.09	0.01
2,4-ДБ Ме эфир	БД:	2856	59.7	0.43	0.51	0.25	0.02	0.02	0.10	0.03
	Хром:	2838	33.1	0.44	0.48	0.24	0.02	0.02	0.10	0.01

После определения концентрации пестицидов в пробе по площади их пиков S_{210} относительно стандартных значений из базы данных, вычисляли степень извлечения пестицидов из воды с учетом коэффициента концентрирования 4000. Эти величины приведены в табл. 6. Для всех пестицидов степень извлечения составила более 50%, что считается для ТФЭ вполне приемлемым. Исключение – метиловые эфиры 2,4-Д и 2,4-ДБ. Причина их низкой степени извлечения требует дополнительных исследований.

Таблица 6. Степень извлечения пестицидов из воды методом ТФЭ.

Пестицид	Степень извлечения, %			
	Проба №1	Проба №2	Проба №3	Среднее (n=3)
Атразин	76.1	77.8	77.2	77.0
Прометрин	62.8	60.9	61.5	61.7
Пропазин	75.7	74.9	75.9	75.5
Тебутиурон	58.5	60.4	57.0	58.6
Карбофуран	62.0	64.6	65.7	64.0
Рамрод	79.3	74.2	70.0	74.5
Хлорпрофам	71.9	68.4	65.5	68.6
Алахлор	83.5	77.6	76.9	79.3
Ридомил	77.2	70.8	77.6	75.2
2,4,5-Т	55.2	47.0	50.1	50.8
2,4-ДБ	59.0	56.7	55.6	57.1
2,4-Д Метиловый эфир	18.0	25.3	21.8	21.7
2,4-ДБ Метиловый эфир	27.6	25.4	27.1	26.7

4.3.2. Жидкостная экстракция пестицидов из воды

Жидкостная экстракция пестицидов является альтернативой ТФЭ. В отношении водных образцов этот метод получил название жидко-жидкостная экстракция (ЖЖХ). По сравнению с ТФЭ он менее универсален, так как позволяет использовать лишь ограниченный набор растворителей и их смесей, которые не смешиваются с водой (в ТФЭ этой проблемы нет), трудно автоматизируем, но, с другой стороны, может быть реализован практически в любой лаборатории. Другое достоинство ЖЖЭ – существенно более высокая производительность при необходимости извлечения веществ из больших объемов (более 500 мл) воды. И, наконец, при ЖЖЭ кислот и аминов, для повышения степени их извлечения можно изменять в широких пределах значение рН воды,

тогда как при ТФЭ на картриджах с фазой С18 этого делать нельзя из-за гидролитической лабильности сорбента.

Мы апробировали метод ЖЖЭ для концентрирования пестицидов в 4000 раз, используя в качестве экстрагента хлороформ. В качестве модельных использовали растворы смесей некоторых пестицидов в дистиллированной воде с концентрацией по 100 мкг/л каждого. После ЖЖЭ из 400 мл раствора 3 раза по 10 мл хлороформа, хлороформ упаривали, остаток растворяли в 100 мкл ацетонитрила и полученный раствор анализировали в стандартных условиях. Хроматограммы показаны на рис. 7.

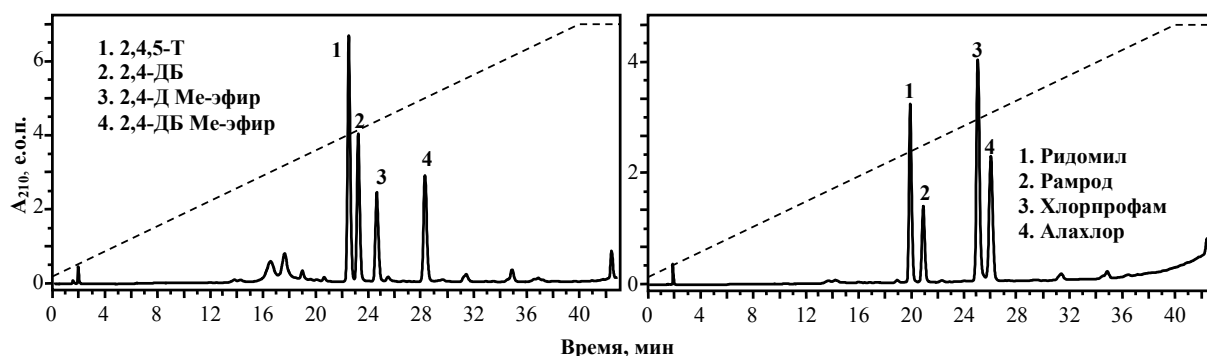


Рис. 7. Определение растворенных в дистиллированной воде пестицидов после их концентрирования методом ЖЖЭ.

Все пики пестицидов были однозначно идентифицированы по базе данных, как по объемам удерживания, так и по спектральным отношениям.

В табл. 7 приведены степени извлечения пестицидов из воды. Для 4-х последних веществ потери превысили 50%, что связано, видимо, с низким коэффициентом их распределения в системе "вода-хлороформ". Очевидно, что степень извлечения этих пестицидов можно увеличить путем замены хлороформа на более "селективный" для них растворитель, например, этилацетат. Отсутствие "универсального" экстрагента для всех пестицидов – важное обстоятельство, ограничивающее применимость ЖЖЭ для решения скриннинговых аналитических задач.

4.4. Определение пестицидов в природных водах

Оба метода концентрирования пестицидов – ТФЭ и ЖЖЭ – были применены при анализе вод из водопровода и природных водоемов. Пробы воды отбирали в 2004 г. из р. Обь (вблизи Октябрьского моста в г. Новосибирске, 4 мая), из р. Иня (вблизи устья, 9 мая), из р. Зырянка (около насосной станции

садоводства "Нива", 9 мая), из Обского водохранилища (в районе пляжа "Неоком", 7 марта), из Бердского залива (из проруби в 300 м от берега напротив санатория "Сосновка", 7 марта).

Таблица 7. Степень извлечения пестицидов из воды экстракцией хлороформом.

Пестицид	Степень извлечения, %			
	Проба №1	Проба №2	Проба №3	Среднее (n=3)
2,4,5-Т	57.4	65.8	58.0	60.4
2,4-ДБ	66.6	76.0	67.2	69.9
2,4-Д Ме эфир	48.4	55.8	50.0	51.4
2,4-ДБ Ме эфир	64.8	73.2	65.0	67.7
Рамрод	20.3	18.7	20.1	19.7
Хлорпрофам	22.2	21.3	21.7	21.7
Алахлор	36.9	36.4	36.3	36.5
Ридомил	40.4	40.7	40.1	40.4

Все отобранные образцы вод были проэкстрагированы методом ТФЭ и проанализированы в стандартных условиях. Хроматограммы приведены на рис. 8 и 9. На каждой из них присутствует более десятка хроматографических пиков, но ни один из них не был идентифицирован по базе данных как пестицид.

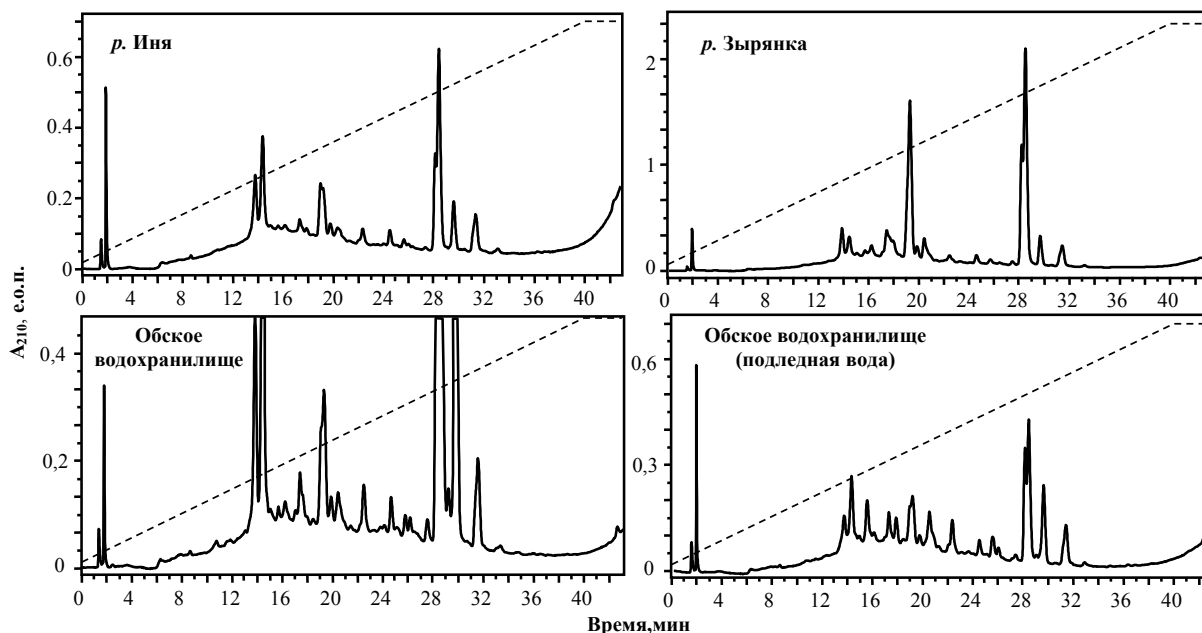


Рис. 8. Определение пестицидов в природных водах после ТФЭ.

С одной стороны, это объясняется тем, что база данных "Пестициды" включает в себя лишь 45 веществ (5-10% пестицидов, использующихся на

практике), а с другой – обнаруженные УФ-поглощающие вещества могут относиться к другим классам загрязнителей или иметь природное происхождение. В данном случае полученные результаты свидетельствуют о больших возможностях обзорной ОФ ВЭЖХ, а идентификация неизвестных веществ, регистрируемых этим методом, представляется нам важным направлением аналитической химии окружающей среды.

Только один пестицид – 2,4-ДБ – был обнаружен в образце воды, взятой из р. Обь, как после ТФЭ, так и после ЖЖЭ (рис. 9). Несмотря на его низкую концентрацию, 2,4-ДБ был надежно идентифицирован по базе данных и по объему удерживания, и по спектральным отношениям (табл. 8). Концентрация 2,4-ДБ в образце воды составила около 9 мкг/л, что в два раза ниже его ПДК [3].

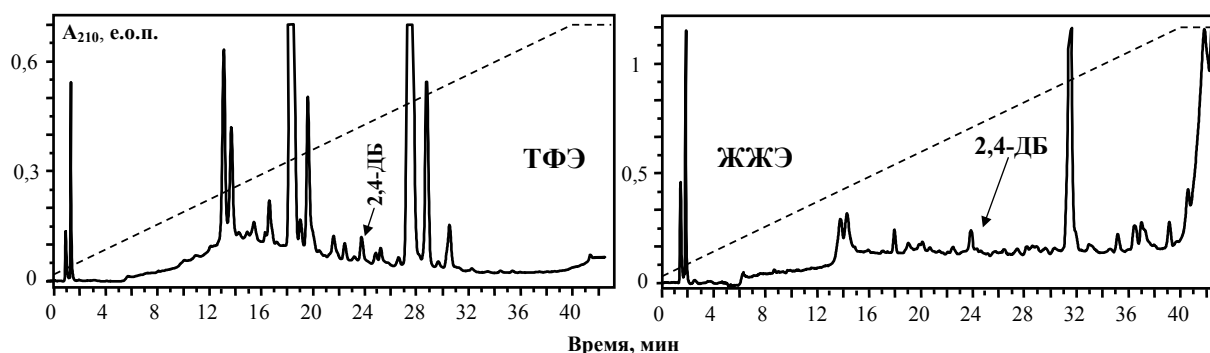


Рис. 9. Определение пестицидов в образце воды из р. Обь после ТФЭ и ЖЖЭ.

Таблица 8. Идентификация 2,4-ДБ, обнаруженного в воде из р.Обь.

	V_r , мкл	$R=S_{\lambda}/S_{210}$						
		S_{220}	S_{230}	S_{240}	S_{250}	S_{260}	S_{280}	S_{300}
База данных	2344	0.43	0.51	0.24	0.02	0.02	0.10	0.03
После ТФЭ	2329	0.41	0.49	0.27	0.03	0.01	0.10	0.03
После ЖЖЭ	2375	0.43	0.50	0.23	0.03	0.01	0.09	0.03

Известно, что при исследовании загрязненных вод следует учитывать возможное мешающее влияние относительно большого количества растворенных веществ и взвешенных частиц (влияние матрицы) на правильность получаемых результатов. Для оценки влияния матрицы мы провели ряд экспериментов с добавками пестицидов в образцы воды с последующим определением этих пестицидов после экстракции. Хроматограммы приведены на рис. 10, а данные по степени извлечения пестицидов – в табл. 9.

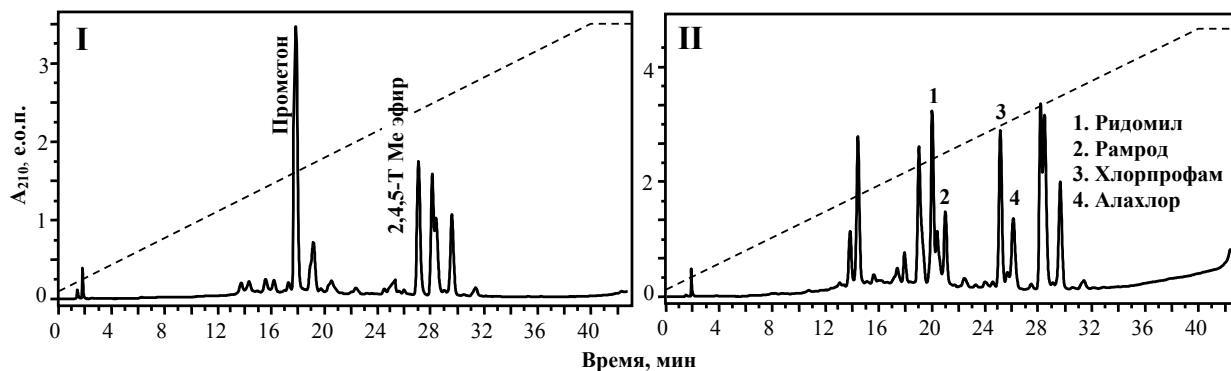


Рис. 10. Определение пестицидов в образцах воды из водопровода (I) и из р. Зырянка (II).

Пестициды были растворены в воде (по 100 мкг/л) и извлечены из раствора методом ТФЭ.

Таблица 9. Извлечение добавленных пестицидов из образца водопроводной воды и воды из р. Зырянка.

Пестицид	Степень извлечения, %		
	Проба №1	Проба №2	Среднее (n=2)
Прометон	69.8	64.2	67.0
2,4,5-Т Ме эфир	20.7	17.4	19.1
Рамрод	31.3	29.7	30.5
Хлорпрофам	18.8	18.9	18.9
Алахлор	26.6	29.9	28.3
Ридомил	54.1	56.1	55.1

Обращает на себя внимание довольно значительное количество УФ-поглощающих веществ (кроме добавленных пестицидов), обнаруженных в водопроводной воде. Возможно, какие-то из них являются опасными. На степень извлечения прометона и 2,4,5-Т Ме эфира "матрица" водопроводной воды заметного влияния не оказывает. Однако, в случае образца воды из р. Зырянка, влияние матрицы видно отчетливо. По сравнению с экспериментами с растворами пестицидов в дистиллированной воде (см. табл. 6), степень извлечения добавленных в речную воду пестицидов уменьшилась в 1.5-4 раза. Для предотвращения потерь аналитов в таких случаях необходимо предпринимать специальные меры. К ним могут относиться, например, повышение ионной силы в образце воды, изменение величины рН, повышение температуры при экстракции.

5. ВЫВОДЫ

1. Разработана методика определения 45 пестицидов методом ВЭЖХ с многоволновым УФ-детектированием.
2. Сформирована база данных хроматографических и спектральных характеристик для 45 пестицидов, позволяющая определять их без предварительной калибровки хроматографа.
3. Разработаны методики концентрирования водных растворов пестицидов с использованием твердо-фазной и жидкостной экстракции, сопряженные с определением пестицидов методом ВЭЖХ-УФ.
4. Разработанные методики успешно апробированы при анализе водопроводной воды и воды из природных источников.

6. ЛИТЕРАТУРА

1. Федеральный закон "О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения".
2. Федеральные санитарные правила, нормы и гигиенические нормативы. 2.3.2. ПРОДОВОЛЬСТВЕННОЕ СЫРЬЕ И ПИЩЕВЫЕ ПРОДУКТЫ. Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов. Санитарные правила и нормы СанПиН 2.3.2.560-96. М., Госкомсанэпидемнадзор России 1997.
3. 1.1. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ. Гигиенические нормативы содержания пестицидов в объектах окружающей среды (перечень). ГН 1.1.546-96. М., Госкомсанэпидемнадзор России 1997, с.4.
4. 2.1.4. ПИТЬЕВАЯ ВОДА И ВОДОСНАБЖЕНИЕ НАСЕЛЕННЫХ МЕСТ. Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества. Санитарные правила и нормы СанПиН 2.1.4.559-96. М., Госкомсанэпидемнадзор России 1997.
5. *Eash D.T., Bushway R.J.* Herbicide and plant growth regulator analysis by capillary electrophoresis. //J. Chromatogr. 2000. V.880. P.281–294.
6. Методы анализа токсикантов в пищевых продуктах. Аналит. обзоры/ГПНТБ СО РАН и др. Новосибирск. 1993. 116 с. (Сер. Экология. Вып. 27)
7. Азарова И.Н. ВЭЖХ метод определения ди(2-этилгексил)фталата для изучения его поведения в экосистеме озера Байкал. Кандидатская диссертация. Лимнологический институт СО РАН. 2003.
8. *Бауэр Г., Энгельгард Х., Хениен А., и др.* Высокоэффективная жидкостная хроматография в биохимии. Москва: Мир, 1988. 688 с., ил.
9. *Стыскин Е.Л., Ицксон Л.Б., Брауде Е.В.* Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография. М.: Химия, 1986. 288 с.
10. *Balinova A.* Ion-pairing mechanism in the solid-phase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of acidic herbicides in water. //J. Chromatogr. 1996. V.728. P.319–324.
11. *Galera M.M., Vidal J.L.M., Frenich A.G., Garcia M.D.G.* Evaluation of multiwavelength chromatograms for the quantification of mixture of pesticides by high-performance liquid chromatography – diode array detection with multivariate calibration. //J. Chromatogr. A. 1997. V.778. P.139-149.

12. *Medvedovici A., David F., Sandra P.* Determination of the rodenticides warfarin, diphenadione and chlorophacinone in soil samples by HPLC-DAD. //Talanta. 1997. V.44. P.1633-1640.
13. *Aguilara C., Ferrer I., Borrulla F., Marce R.M., Barcelo D.* Monitoring of pesticides in river water based on samples previously stored in polymeric cartridges followed by on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-diode array detection and confirmation by atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. //Analytica Chimica Acta. 1999. V.386. P.237-248.
14. *Van der Heeft E., Dijkman E., Baumann R.A., Hogendoorn E.A.* Comparison of various liquid chromatographic methods involving UV and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric detection for the efficient trace analysis of phenylurea herbicides in various types of water samples. //J. Chromatogr. A. 2000. V.879. P.39-50.
15. *Schreiber A., Efer J., Engewald W.* Application of spectral libraries for high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure ionisation mass spectrometry to the analysis of pesticide and explosive residues in environmental samples. //J. Chromatogr. A. 2000. V.869. P.411-425.
16. *Slobodnik J., Hogenboom A.C., Louter A.J.H., Brinkman U.A.T.* Integrated system for on-line gas and liquid chromatography with a single mass spectrometric detector for the automated analysis of environmental samples. //J. Chromatogr. A. 1996. V.730. P.353-373.
17. *Stalikas C.D., Konidari C.N.* Analytical methods to determine phosphonic and amino acid group-containing pesticides. //J. Chromatogr. A. 2001. V.907. P.1-19.
18. *De Llasera M.P.G., Bernal-Gonzales M.* Presence of Carbamate Pesticides in Environmental Waters from the Northwest of Mexico: Determination by Liquid Chromatography. //Wat. Res. 2001. V.35. No.8. P.1933-1940.
19. *Hill K.M., Hollowell R.H., Dal Cortivo L.A.* Determination on N-Methylcarbamate Pesticides in Well Water by Liquid Chromatography with Post-column Fluorescence Derivatization. //Anal. Chem. 1984. V.56. P.2465-2472.
20. *McGarvey B.D.* High-performance liquid chromatographic methods for the determination of N-methylcarbamate pesticides in water, soil, plants and air. //J. Chromatogr. 1993. V.642. P.89-105.
21. *Юданова Л.А.* Пестициды в окружающей среде. Новосибирск: ГПИТБ СО АН СССР. 1989. - 140 с.

22. *LeBlanc G. A.* Review of EPA Sample Preparation Techniques for Organic Compound Analysis of Liquid and Solid Samples. //LC-GC. 2001. V.19. No.11. P.1120-1130.
23. *Alpendurada M. de F.* Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis. //J. Chromatogr. A. 2000. V.889. P.3-14.
24. *Ferrer I., Barcelo D.* Validation of new solid-phase extraction materials for the selective enrichment of organic contaminants from environmental samples. //Trends in Anal. Chem. 1999. V.18. No.3. P.180-192.
25. *Rossi D.T., Zhang N.* Automating solid-phase extraction: current aspects and future prospects. //J. Chromatogr. A. 2000. V.885. P.97–113.
26. *Majors R.E.* Trends in Sample Preparation. //LC-GC North America. 2002. V.No.12. P.1098-1113.
27. *Barcelo D. (Ed.).* Sample Handling and Trace Analysis of Pollutants: Techniques, Applications and Quality Assurance. Amsterdam: Elsevier. 2000. 1116 pp.
28. *Cortazar E., Zuloaga O., Sanz J., Raposo J.C., Etxebarria N., Fernandez L.A.* MultiSimplex optimisation of the solid-phase microextraction–gas chromatographic mass spectrometric determination of polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls and phthalates from water samples. //J. Chromatogr. 2002. V.978. P.165–175.
29. *Farre M., Kloter G., Petrovic M., Alonso M.C., de Alda M.J.L., Barcelo D.* Identification of toxic compounds in wastewater treatment plants during a field experiment. //Analytica Chimica Acta. 2002. V.426. P.19-30.
30. *Беспамятнов Г.П., Кротов Ю.А.* Предельно допустимые концентрации химических веществ в окружающей среде. Справочник. - Л.: Химия, 1985. - 585 с., ил.
31. *Balinova A.* Strategies for chromatographic analysis of pesticide residues in water. //J. Chromatogr. 1996. V.754. P.125–135.
32. *Байерман К.* Определение следовых количеств органических веществ. М.: Мир, 1987. - 429 с., ил.
33. *Molins C, Hogendoorn E.A., Dijkman E., Heusinkveld, Baumann R.A.* Determination of linuron and related compounds in soil by microwave-assisted solvent extraction and reversed-phase liquid chromatography with UV detection. //J. Chromatogr. 2000. V.869. P.487–496.
34. *Tadeo J.L., Sanchez-Brunete C., Perez R.A., Fernandez M.D.* Analysis of herbicide residues in cereals, fruits and vegetables. Madrid: Elsevier. 2000. V. 882 P.175–191.
35. *Smith R.M.* Extractions with superheated water. //J. Chromatogr. 2002. V.975. P.31–46.

36. *Liska I.* Fifty years of solid-phase extraction in water analysis – historical development and overview. //J. Chromatogr. 1999. V.842. P.373–390.
37. *Pacakova V., Stulik K., Yiskra Y.* High-performance separations in the determination of triazine herbicides and their residues. //J. Chromatogr. 1996. V.754. P.17–31.
38. *Nunes G.S., Ribeiro M.L., Polese L., Barcelo D.* Comparison of different clean-up procedures for the determination of N-methylcarbamate insecticides in vegetable matrices by highperformance liquid chromatography with UV detection. //J. Chromatogr. 1998. V.795. P.43–51.
39. *Pico Y., Molto J.C., Manes J.* Solid-phase extraction of quaternary ammonium herbicides. //J. Chromatogr. 2000. V.885. P.3–16.
40. *Martha J.M. Well, Lan Zhou Yu.* Solid-phase extraction of acidic herbicides. //J. Chromatogr. 2000. V.885. P.237–250.
41. *Yang S.S., Goldsmith A.I., Smetena I.* Recent advances in the residue analysis of N-Methylcarbamate pesticides. //J. Chromatogr. 1996. V.754. P.3–16.
42. *Nogueira J.M.F., Tom S., Pat S.* Considerations on ultra trace analysis of carbamates in water samples. //J. Chromatogr. 2003. V.996. P.133–140.
43. *Goncalves C., Alpendurada M.F.* Comparison of three different poly(dimethylsiloxane)-divinylbenzene fibres for the analysis of pesticide multiresidues in water samples: structure and efficiency. //J. Chromatogr. 2002. V.963. P.19–26.
44. *Slobodnik J., Öztezkizan Ö., Lingeman H., Brinkman U.A.Th.* Solid-phase extraction of polar pesticide from environmental water samples on graphitized carbon and Empore-activated carbon disks and on-line coupling to octadecyl-bonded silica analytical columns. //J. Chromatogr. 1996. V.750. P.227–238.
45. *Brouwer E.R., Kofman S., Brinkman U.A.Th.* Selected procedures for the monitoring of polar pesticides and related microcontaminants in aquatic samples. //J. Chromatogr. 1995. V.703. P.167–190.
46. *Chen Z-M., Wang Y-H.* Chromatographic method for the determination of pyrethrin and pyrethroid pesticide residues in crops, foods and environmental samples. Review. //J. Chromatogr. 1996. V.754. P.367–395.
47. *Mondello L., Dugo P., Dugo G., Lewis A.C., Bartle K.D.* High- performance liquid chromatography coupled on-line with high resolution gas chromatography. State of the art. //J. Chromatogr. 1999. V.842. P.373–390.
48. *Junker-Buchheit A., Witzemberger M.* Pesticide monitoring of drinking water with the help of solid-phase extraction a HPLC. //J. Chromatogr. 1996. V.737. P.67–74.

49. *Hatrik S., Tekel J.* Extraction methodology and chromatography for the determination of residual pesticides in water. //J. Chromatogr. 1996. V.733. P.217–233.
50. *Torres C.M., Pico Y., Manes Y.* Determination of pesticides residues in fruit and vegetables. //J. Chromatogr. 1996. V.754. P.301–331.
51. *Huck C.W., Bonn G.K.* Recent developments in polymer-based sorbents for solid-phase extraction. //J. Chromatogr. 2000. V.885. P.51–72.
52. *Balinova A.* Strategies for chromatographic analysis of pesticides residues in water. //J. Chromatogr. 1996. V.754. P.125–135.
53. *Motohashi N., Nagashima H, et. al.* Official multiresidue methods of pesticides analysis in vegetables, fruits and soil. //J. Chromatogr. 1996. V.754. P.333–346.
54. *Hennion M-C.* Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. //J. Chromatogr. 1999. V.856. P.3–54.
55. *Bruzzoniti M.C., Sarzanini C., Mentasti E.* Preconcentration of contaminants in water analysis. //J. Chromatogr. 2002. V.902. P.289–309.
56. *Gou Y., Eisert R., Pawliszyn J.* Automated in-tube solid-phase microextraction–high-performance liquid chromatography for carbamate pesticide analysis. //J. Chromatogr. 2000. V.873. P.137–147.
57. *Beltran Y, Lopes F.J., Fernandez F.* Solid-phase microextraction in pesticide residue analysis. //J. Chromatogr. 2000. V.885. P.389–404.
58. *Baram G. I.* Portable liquid chromatograph for mobile laboratories. 1. Aims. //J. Chromatogr. 1996. V.728. P.387–399.
59. *Барам Г. И. и др.* Новые возможности высокоэффективной жидкостной хроматографии в фармакопейном анализе. //Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2003. Т.135. №1. С.75-79.