

На правах рукописи

АЗАРОВА ИРИНА НИКОЛАЕВНА

**ВЭЖХ метод определения ди(2-этилгексил)фталата
для изучения его поведения в экосистеме озера Байкал**

Специальность 05.11.11. – хроматография и хроматографические приборы

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Иркутск

2003

Работа выполнена в Лимнологическом институте Сибирского отделения РАН.

Научный руководитель:

доктор химических наук

Г.И.Барам

Официальные оппоненты:

доктор химических наук, профессор

О.А.Шпигун

кандидат химических наук

И.В.Назимов

Ведущая организация:

Институт катализа им. Г.К.Борескова

Сибирского отделения РАН

Защита диссертации состоится 30 сентября 2003 г. в 15 часов на заседании диссертационного совета Д 002.246.03 в Институте физической химии РАН по адресу: 119991, Москва, Ленинский пр., д.31.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института физической химии РАН.

Автореферат разослан 28 августа 2003 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,
кандидат химических наук



Л.Н.Коломиец

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Одним из важнейших направлений экологических исследований является осуществление химического мониторинга, который дает представление не только о состоянии отдельного объекта окружающей среды или экосистемы в целом, но и позволяет изучать механизмы функционирования экосистемы. Без химического мониторинга невозможно прогнозирование путей развития экосистемы и планирование природоохранных мероприятий.

При проектировании системы химического мониторинга необходимо учитывать множество факторов, которые определяются особенностями природного объекта, а также самими поставленными целями и задачами. С точки зрения аналитической химии важнейшими этапами проектирования являются следующие: выбор вещества-аналита, наблюдение за которым должно дать необходимую для решения поставленной задачи информацию; выбор объектов, в которых предстоит анализировать вещество-аналит; определение месторасположения станций отбора проб и составление графика пробоотбора; выбор химико-аналитического метода анализа с учетом объема планируемой работы. Очевидно, что создание системы мониторинга для больших экосистем (например, озеро Байкал вместе с его водосборным бассейном) требует весьма значительных затрат, снизить которые можно, в первую очередь, путем оптимизации всех звеньев системы.

Один из самых эффективных способов оптимизации системы химического мониторинга – осуществление анализов непосредственно на местах отбора проб. Это позволяет не только отказаться от транспортировки образцов в стационарные лаборатории, но и оперативно менять план и объем исследований, исходя из полученных результатов. Для определения веществ-аналитов в объектах водных экосистем перспективным методом анализа образцов в условиях полевой лаборатории является микроколоночная ВЭЖХ, которая не требует для работы больших объемов органических растворителей, а также применения сложных процедур подготовки проб, характерных для метода газовой хроматографии.

Решение всех вышеперечисленных проблем, связанных с созданием систем химического мониторинга объектов окружающей среды, нам представляется, безусловно, актуальным.

Цель и задачи исследования.

1. Усовершенствовать систему химического мониторинга экосистемы озера Байкал, добавив к списку анализируемых соединений вещество, концентрация которого в различных объектах экосистемы определялась бы, главным образом, глобальными процессами.
2. Обосновать целесообразность выбора ди(2-этилгексил)фталата (ДЭГФ) в качестве вещества-аналита, представляющего интерес для изучения его поведения в экосистеме озера Байкал.
3. Разработать и апробировать методику определения ДЭГФ в байкальской воде с помощью ВЭЖХ, позволяющую осуществлять анализы в условиях полевой лаборатории.
4. Разработать и апробировать ВЭЖХ методики определения ДЭГФ в различных объектах экосистемы озера Байкал – в воде притоков Байкала и в р. Ангаре, в снегу, во льду, в почве и донных отложениях – для оценки уровня содержания ДЭГФ.
5. Разработать и апробировать ВЭЖХ методики определения ДЭГФ в культуральных жидкостях микроорганизмов и в жировых тканях рыб и байкальской нерпы для оценки скорости биodeградации ДЭГФ и степени его биоаккумуляции.

Научная новизна представленной работы заключается в следующем:

1. Сделан обоснованный выбор ДЭГФ в качестве химического трассера для изучения типичных процессов, протекающих в экосистеме озера Байкал.
2. Разработан и апробирован в условиях полевой лаборатории метод ВЭЖХ анализа ДЭГФ в воде с прямым концентрированием пробы на аналитической колонке с обращенной фазой. Предел обнаружения метода составил 0.02 мкг/л, что позволяет его использовать для определения ДЭГФ в природных водах фоновых районов мира.

3. Разработаны ВЭЖХ методики для определения ДЭГФ в донных отложениях, в почве, в культуральных жидкостях микроорганизмов и методика определения суммарного содержания фталатов в жировых тканях рыбы и тюленя.
4. Сделана оценка уровней содержания ДЭГФ в водных объектах экосистемы озера Байкал: в поверхностной и глубинной воде озера, в водах основных притоков Южного Байкала и р. Ангара. Показано, что за последние 6 лет концентрация ДЭГФ в байкальской воде снизилась более, чем в 4 раза.
5. Получены данные об уровне концентраций ДЭГФ в ледовом покрове озера, снежном покрове в направлении от Иркутска к Байкалу, в донных осадках и почве, данные о суммарном содержании фталатов в жировой ткани нерпы и омуля.

Практическая значимость работы. Разработан высокочувствительный метод ВЭЖХ-определения ДЭГФ в природных водах (предел обнаружения 0.02 мкг/л), пригодный для применения в условиях полевой лаборатории и позволяющий осуществлять мониторинг ДЭГФ. Данные мониторинга могут представлять интерес для изучения процессов атмосферного переноса и перемешивания природных вод.

Получены данные о содержании экотоксиканта ДЭГФ в различных объектах уникальной экосистемы озера Байкал, позволяющие оценить уровень ее загрязнения по сравнению с другими районами мира.

Методики, разработанные для определения ДЭГФ в различных объектах экосистемы озера Байкал, могут быть применены в исследованиях других экосистем.

На защиту выносятся следующие положения:

1. Обоснование целесообразности выбора ДЭГФ в качестве химического трассера для изучения типичных процессов, протекающих в экосистеме озера Байкал.
2. Метод ВЭЖХ анализа ДЭГФ в воде с прямым концентрированием проб на колонке с обращенно-фазовым сорбентом с пределом обнаружения ДЭГФ 0.02 мкг/л, пригодный для проведения анализов в условиях полевой лаборатории.

3. ВЭЖХ методики определения ДЭГФ в донных отложениях, в почве, в культуральных жидкостях микроорганизмов и методика определения суммарного содержания фталатов в жировых тканях рыбы и тюленя.
4. Данные об уровнях содержания ДЭГФ в водных объектах экосистемы озера Байкал: в поверхностной и глубинной воде озера, в водах основных притоков Южного Байкала и р. Ангара.
5. Данные об уровне концентраций ДЭГФ в ледовом покрове озера, снежном покрове в направлении от Иркутска к Байкалу, в донных осадках и почве; данные о суммарном содержании фталатов в жировой ткани нерпы и омуля.

Апробация работы. Основные результаты исследований были доложены на: Всероссийском симпозиуме по теории и практике хроматографии и электрофореза (Москва. 13-17 апреля 1998 г.); Всероссийском симпозиуме по химии поверхности, адсорбции и хроматографии (Москва. 12-16 апреля 1999 г.); VI Конференции "Аналитика Сибири и Дальнего Востока" (Новосибирск. 21-24 ноября 2000 г.); 3-ем Международном симпозиуме по методам разделения в биологических науках (Москва. 13-18 мая 2003 г.).

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов, выводов и списка литературы. Материал диссертации изложен на 117 страницах текста, содержит 21 рисунок и 9 таблиц. В списке цитируемой литературы 190 наименований.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 01-05-97241).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.

1. Выбор вещества-трассера для изучения его поведения в экосистеме оз. Байкал.

Экосистема оз. Байкал уникальна во многих отношениях. Возраст Байкала – 25 млн. лет; максимальная глубина – 1637 м; длина – 636 км; максимальная ширина – 79.5 км; длина береговой линии – более 2000 км; площадь водного зеркала – 31500 км²; объем воды – 23000 км³; площадь водосборного бассейна – около 570000 км². Ежегодно в Байкал втекает с притоками и вытекает через р. Ангара 60 км³ воды. Время полного замещения байкальской воды водами притоков составляет более 300 лет.

Состав байкальской воды изучен весьма подробно и достаточно хорошо исследовано поведение в экосистеме озера многих веществ. Однако это относится лишь к соединениям (кроме биогенных элементов), концентрация которых меньше 1 нг/л (микрокомпоненты) или больше 0.1 мг/л (макрокомпоненты). Учитывая объем Байкала, легко показать, что общее количество микрокомпонента в озере при его концентрации 1 нг/л составляет всего 23 тонны, а количество макрокомпонента ($C \geq 0.1$ мг/л) составляет, напротив, огромную величину – 2.3 и более млн. тонн. Концентрация микрокомпонента в водном теле озера может значительно изменяться в течение короткого времени в силу многих причин, и причины этих изменений трудно объяснить. С другой стороны, ожидать заметного изменения концентрации макрокомпонента в течение разумного времени не приходится, т.к. для этого необходимо внести в озеро или вывести из него слишком большое количество вещества. Очевидно, что ни микро-, ни макрокомпонент в качестве вещества-трассера для изучения, например, механизмов перемешивания байкальской воды, не подходят. Для этих целей необходим химически устойчивый трассер, концентрация которого составляет примерно 1 мкг/л (общее количество в озере – примерно 23000 тонн), и который должен быть экзогенного происхождения, чтобы изменение его концентрации можно было интерпретировать однозначно.

Единственным найденным ранее в байкальской воде веществом, удовлетворяющим этим требованиям, является ди(2-этилгексил)фталат (ДЭГФ).

Диэфир *орто*-фталевой кислоты ДЭГФ – один из самых распространенных пластификаторов полихлорвинила, продукт крупнотоннажного химического синтеза – попадает в окружающую среду из промышленных и коммунальных выбросов и, в силу своей химической устойчивости, долго сохраняется в воде.

2. Разработка метода определения ДЭГФ в байкальской воде.

ДЭГФ определяют в воде с помощью ГХ или ВЭЖХ с предварительным концентрированием пробы методами жидко-жидкостной или твердофазной экстракции (ТФЭ). Когда концентрация ДЭГФ в воде меньше 10 мкг/л, необходимо обращать особое внимание на опасность загрязнения образца "вторичным" ДЭГФ из лабораторного фона (посуда, воздух, растворители, химикаты).

Для определения ДЭГФ мы использовали хроматограф "Милихром А-02" (ЗАО "ЭкоНова", Новосибирск) с обращенно-фазовой короткой колонкой малого объема (2x75 мм, $V_0 \approx 0.2$ мл) и УФ фотометрической детекцией (рис. 1).

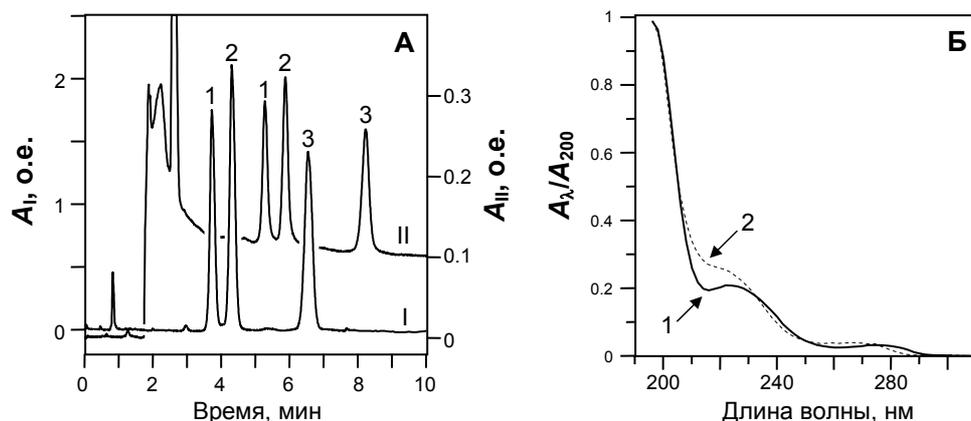


Рис. 1. Разделение фталатов (А) и их УФ спектры (Б).

Колонка 2x75 мм с Nucleosil 100-5 C₁₈; элюент: CH₃CN-H₂O (90:10); скорость потока 0.2 мл/мин; детекция при $\lambda=200$ нм; температура +50⁰С.

Образцы: **I**- 2 мкл раствора фталатов (каждого по 500 мг/л) в MeOH; **II**- 10 мл раствора фталатов (каждого по 20 мкг/л) в H₂O; **1**- ДЭГФ; **2**- ди-*n*-октилфталат; **3**- ди-*n*-нонилфталат. Спектры записывали во время хроматографирования после остановки потока вблизи максимумов соответствующих пиков; 1- спектры ДЭГФ, ди-*n*-октилфталата, ди-*n*-нонилфталата; 2- спектр *n*-бутилбензилфталата.

Эффективность колонки, равная 5000 теоретических тарелок, обеспечивала достаточно хорошее отделение ДЭГФ от его ближайших гомологов – ди-*n*-октил- и ди-*n*-нонилфталатов. Фталаты имеют близкие УФ спектры (исключение – *n*-бутилбензилфталат) с характерным спектральным отношением

$A_{210}/A_{200}=0.35\pm 0.02$. При двухволновой детекции эта величина использовалась как дополнительный параметр для идентификации пика на хроматограмме.

По сравнению с колонками 4-4.6x150-250 мм наша колонка обеспечивала увеличение отношения "сигнал/шум" в 10-15 раз. Предел обнаружения ДЭГФ при амплитуде шума детектора $A_{200}\approx 0.0004$ о.е. ("сигнал/шум" $=3$) составлял ≈ 1 нг/пик. Эта величина определяет необходимую степень концентрирования проб байкальской воды, содержание ДЭГФ в которой соответствует 0.1-1 мкг/л.

Совместно с А.Л.Верещагиным и А.Г.Горшковым для концентрирования проб мы разработали микрокартриджи для ОФ ТФЭ (50 мг Silasorb C₁₈ (LC), 15 мкм), которые по сравнению с типичными коммерчески доступными (например, Bakerbond spe Octadecyl, 3 мл, 500 мг, 40-50 мкм) позволяли ускорить процедуру и уменьшить объем органических растворителей. Апробация картриджей обоих типов показала, что если при концентрации ДЭГФ в воде 10 мкг/л степень его извлечения лишь немногим больше 100% (см. табл. 1), то при концентрации 1 мкг/л она превышала 200%, что говорит о "вторичном" загрязнении пробы этим веществом из лабораторного фона.

Таблица 1. Средние значения степени извлечения основных фталатов из модельных водных растворов (%) методом ТФЭ ($n=5$).

Фталаты:	<i>n</i> -бутилбенилфталат	ди- <i>n</i> -бутилфталат	ДЭГФ	ди- <i>n</i> -октилфталат
10 мкг/л	55	107	110	84
1 мкг/л	-	-	216	-

Чтобы свести опасность "вторичного" загрязнения пробы к минимуму, в дальнейшем концентрирование осуществлялось непосредственно на аналитической колонке. Применять предколонку в нашем случае представлялось нецелесообразным, т.к. это заметно уменьшило бы эффективность аналитической колонки из-за значительного внеколоночного уширения хроматографического пика, вызванного размытием зоны в межколоночном соединении.

Пробы воды объемом до 10 мл вводили в колонку насосом "А" хроматографа "Милихром А-02" порциями по 2 мл в автоматическом режиме с последующим элюированием с помощью насоса "Б" (рис. 2-1). Пробы объемом до 50 мл вводили отдельным насосом, который подсоединяли прямо к инжектору хроматографа (рис. 2-2).

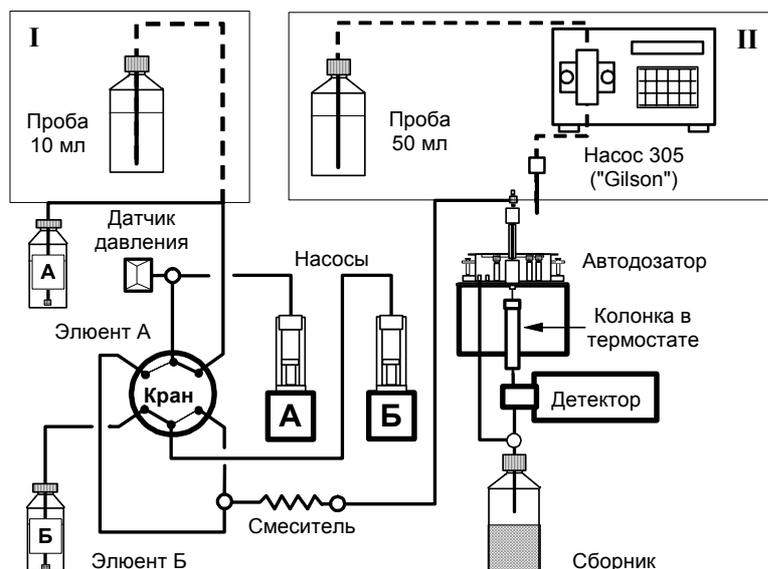


Рис. 2. Схема хроматографа "Милихром А-02" и способы ввода проб воды большого объема.

I- ввод пробы с помощью насоса "А".

II- ввод пробы с помощью дополнительного насоса.

Для определения ДЭГФ методом ВЭЖХ байкальская вода представляется удобным объектом. Малое содержание взвешенных частиц и микроорганизмов позволяет вводить в колонку пробы воды большого объема без фильтрования.

Примеры хроматограмм, полученных после ввода в колонку больших объемов воды, показаны на рис. 3. Исключение процедуры фильтрования позволило, с одной стороны, определить общее содержание ДЭГФ (растворенного и адсорбированного на частицах), а с другой – минимизировать возможность вторичного загрязнения пробы. Практика показала, что без предварительного фильтрования через колонку можно пропустить до 500-1000 мл глубинной байкальской воды, после чего необходима замена входного фильтра.

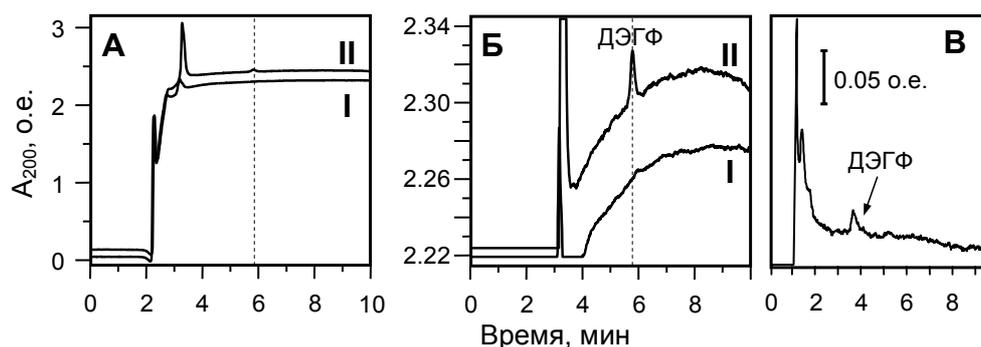


Рис. 3. Определение ДЭГФ в воде Южного Байкала.

А и Б- хроматограммы воды без добавки (I) и с добавкой ДЭГФ (II). В- хроматограмма воды (объем образца 50 мл). Колонки 2x75 мм Nucleosil 100-5 C₁₈ (А и Б) и Silasorb SPH-C₁₈, 5 мкм (В); элюент: MeOH-H₂O (90:10); F=0.2 мл/мин; t=+50⁰С. Образцы: I- 10 мл воды (глубина 1000 м, 2001 г.); II- образец I с добавкой ДЭГФ до концентрации 1 мкг/л; В- 50 мл воды (глубина 500 м, 2002 г., концентрация ДЭГФ 0.29±0.02 мкг/л).

Доказательством того, что в образце **I** на рис. 3 **А** и **Б** содержание ДЭГФ действительно было мало (<0.2 мкг/л), и это не явилось следствием проскока ДЭГФ через колонку в результате "коллапса" обращенной фазы, послужил опыт с добавкой ДЭГФ (хроматограмма **II**). Площадь пика ДЭГФ на хроматограмме **II** соответствует расчетной.

Необходимым условием для осуществления расчета является установление калибровочной зависимости площади пика ДЭГФ (S_{200}) от его количества в пике ($Q_{\text{ДЭГФ}}$). Эта зависимость в диапазоне от 0 до 400 нг ДЭГФ в пике выражалась уравнением $S_{200}=0.023Q_{\text{ДЭГФ}}$ (рис. 4). Расчетная площадь пика ДЭГФ, соответствующая 10 нг (10 мл, 1 мкг/л), составляет 0.230 о.е.*сек; площадь пика на хроматограмме **I** (рис. 3) составила 0.043 о.е.*сек; после добавки ДЭГФ площадь пика увеличилась до 0.295 о.е.*сек. Полученное приращение площади пика, равное 0.252 о.е.*сек, составляет 110% от расчетного и является доказательством отсутствия коллапса ОФ при вводе в колонку 10 мл водного раствора.

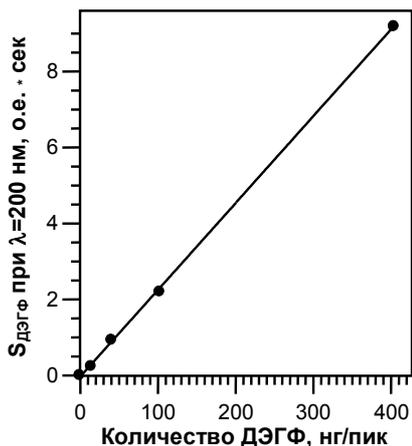


Рис. 4. Калибровочная зависимость для ДЭГФ.

Колонка 2x75 мм Nucleosil 100-5 C_{18} . Элюент: MeOH-H₂O (90:10); скорость потока 0.2 мл/мин; температура +50⁰С; длина волны $\lambda=200$ нм. Образцы: по 5 мкл растворов ДЭГФ в метаноле с концентрациями 2, 8, 20 и 80 мкг/мл. Коэффициент корреляции 0.998.

Метрологические характеристики разработанной нами методики определения ДЭГФ приведены в табл. 2. Их оценивали на образцах, полученных добавлением к очищенной от фталатов воде метанольных растворов ДЭГФ и на пробах байкальской воды. Данные свидетельствуют об отсутствии значимых систематических погрешностей. При концентрации ДЭГФ 0.3 мкг/л и отношении сигнал/шум=10 $s_r=0.2$.

Вертикальные концентрационные профили ДЭГФ для Байкала имеют весьма сложную форму, которую можно интерпретировать лишь учитывая механизмы перемешивания воды в озере и пути попадания ДЭГФ в озеро. Сравнение профилей, полученных в 1996 и 2002 годах (рис. 5), показывает, что

за 6 лет средняя концентрация ДЭГФ уменьшилась не менее, чем в 4 раза (с 0.8 до 0.2 мкг/л). Это вполне коррелирует с уменьшением объемов мирового производства ДЭГФ с 4 млн. тонн в год в конце 80-х годов до 1.35 млн. тонн в 1995 г.

Таблица 2. Правильность и воспроизводимость методики определения ДЭГФ в пробах воды ($n=12$, $P=0.95$). Объем пробы воды 10 мл.

Введено, мкг/л	Найдено, мкг/л	s_r
200	202±2	0.02
100	99±2	0.02
50	51±1	0.03
10	10.2±0.4	0.06
1	0.97±0.08	0.13
0.5	0.49±0.05	0.16

Концентрация ДЭГФ в водах Северного и Среднего Байкала (см. табл. 3) по своим значениям близка к величинам, полученным для вод Южного Байкала.

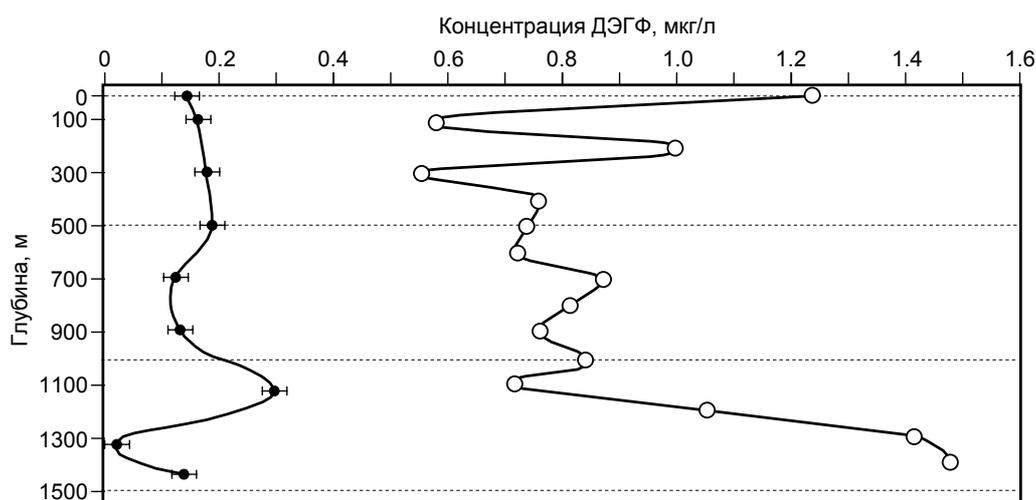


Рис. 5. Глубинные профили концентрации ДЭГФ в Южном Байкале.

● – июль 2002 г.; ○ – сентябрь 1996 г. [Baram et al., 1997].

Таблица 3. Результаты определения ДЭГФ в воде оз. Байкал, полученные в условиях корабельной лаборатории в июле 2002 г. ($n=2$).

Район отбора проб	Глубина, м	$C_{\text{ДЭГФ}}$, мкг/л
Северный Байкал (мыс Заворотный)	0	0.18±0.02
	500	0.29±0.02
	900	0.24±0.02
Средний Байкал (мыс Ижимей)	0	0.09±0.02
	500	0.19±0.02
	1000	0.19±0.02
	1600	0.20±0.02

3. Определение ДЭГФ в притоках озера Байкал и в р. Ангара.

Определение ДЭГФ в воде притоков Байкала проводилось для выявления значимых источников эмиссии ДЭГФ, обеспечивающих его поступление в озеро. Места отбора проб воды выбирались из тех соображений, что малые притоки Южного Байкала находятся в районе, где выпадает наибольшее количество осадков, а р. Селенга является крупнейшим притоком Байкала.

ДЭГФ определяли в речных водах по той же методике, что и в байкальской воде. Проблемы возникли только при работе с водой из р. Селенга, которая содержала до 50 мг/л взвешенных частиц – через 5-10 анализов приходилось менять входной фильтр колонки. Результаты суммированы в табл. 4.

Содержание ДЭГФ во взвеси из селенгинской воды составило 1.5 ± 0.6 мкг/г ($n=4$), что соответствует примерно 50% его общего количества.

Таблица 4. Результаты определения ДЭГФ в образцах воды из разных участков экосистемы озера Байкал, полученные в условиях полевой лаборатории в 2001 г.

Дата	Район отбора проб	Описание образцов	$C_{\text{ДЭГФ}}$, мкг/л ($n=2, P=0.95$)	
Июнь	Юж. Прибайкалье	р.Снежная	<0.1	
		р.Переемная		
		р.Утулик		
		р.Солзан	0.1÷0.2	
		р.Хара-Мурин		
		р.Сухая		
		р.Селенга (выше г.Улан-Удэ)		0.1÷0.2
		р.Селенга (ниже г.Улан-Удэ)		0.3±0.1
Участки в дельте р.Селенга	0.1÷0.2			
Август	р.Селенга	Выше г.Улан-Удэ	0.1÷0.2	
		Ниже г.Улан-Удэ	0.3±0.1	
		Участки в дельте р.Селенга	<0.1	
Сентябрь	р.Ангара	г.Иркутск (Академгородок)	0.1÷0.2	
		г.Ангарск	0.3±0.1	
			0.5±0.2	

Из приведенных в табл. 4 данных следует, что в 2001 г. содержание ДЭГФ в речных водах, впадающих в Байкал, было практически таким же, как в водах Южного Байкала (0.1-0.2 мкг/л). В этом смысле притоки Байкала нельзя рассматривать как заметные локальные источники эмиссии ДЭГФ.

Интерес представляют результаты определения ДЭГФ в р. Селенга (рис. 6). Полученные данные свидетельствуют о том, что очистные сооружения

г. Улан-Удэ сбрасывают заметные количества ДЭГФ, но он не попадает в Байкал, т.к. в дельте Селенги его концентрация снижается до фоновых значений.

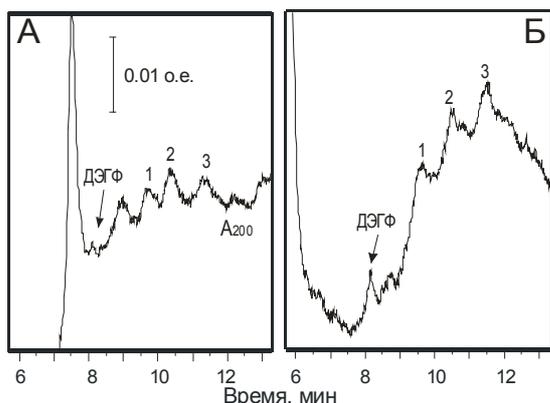


Рис. 6. ДЭГФ в воде р. Селенга выше (А) и ниже (Б) по течению от г. Улан-Удэ.

Колонка 2x75 мм с Nucleosil 100-5 C₁₈; элюент: MeOH-H₂O (90:10); скорость потока 0.15 мл/мин; температура +50°C. Образец: 10 мл воды с добавкой 5% изопропилового спирта. 1, 2 и 3 – неидентифицированные пики.

4. Определение ДЭГФ в снеге, во льду, в дождевой воде.

Снежный покров является естественным аккумулятором поступающих из атмосферы веществ. Количество этих веществ в снеге можно использовать для интегральной оценки объема их поступления на подстилающую поверхность за зимний период, а также для трассирования выбросов от локального источника эмиссии. Результаты такого исследования, выполненного нами в марте 1997 г., приведены на рис. 7. Снеговую воду перед анализом фильтровали через фильтр из пористой нержавеющей стали с порами 2 мкм.

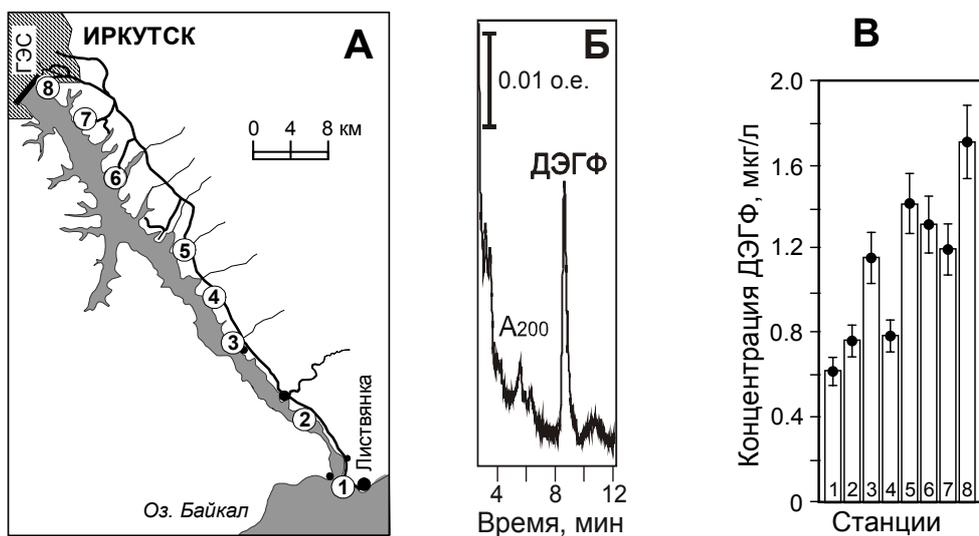


Рис. 7. Определение ДЭГФ в снежном покрове.

А – схема отбора проб снега вдоль Иркутского водохранилища (март 1997). Б – хроматограмма снеговой воды со станции №8. В – содержание ДЭГФ в снеговой воде из снега, отобранного вдоль Иркутского водохранилища (от оз. Байкал до плотины Иркутской ГЭС). Колонка 2x75 мм, Nucleosil 100-5 C₁₈; элюент – MeOH-H₂O (85:15); F=0.2 мл/мин; t=+40°C.

Как следует из рис. 7 В, долина р. Ангары является для Байкала заметным источником эмиссии ДЭГФ.

Эффективной аккумулирующей средой по отношению к ДЭГФ является байкальский лед. Это показали исследования, проведенные в марте-апреле 2001 г. в лаборатории, располагавшейся на льду Южного Байкала (рис. 8). Высокая концентрация ДЭГФ во льду по сравнению с его концентрацией в воде делает это вещество весьма интересным химическим трассером, полезным для изучения особенностей перемешивания байкальских вод в период таяния льда.

Повышенное содержание ДЭГФ в придонной воде (рис. 8 В) можно объяснить тем, что в ней было много взвешенных частиц, хорошо адсорбирующих фталат.

Найденное нами содержание ДЭГФ в глубинной байкальской воде в зимнее время, когда озеро покрыто льдом, заметно ниже, чем в летнее. Две вероятные причины этого явления – деградация ДЭГФ микроорганизмами и (или) адсорбция ДЭГФ на поверхности взвешенных частиц и осаждение с ними на дно.

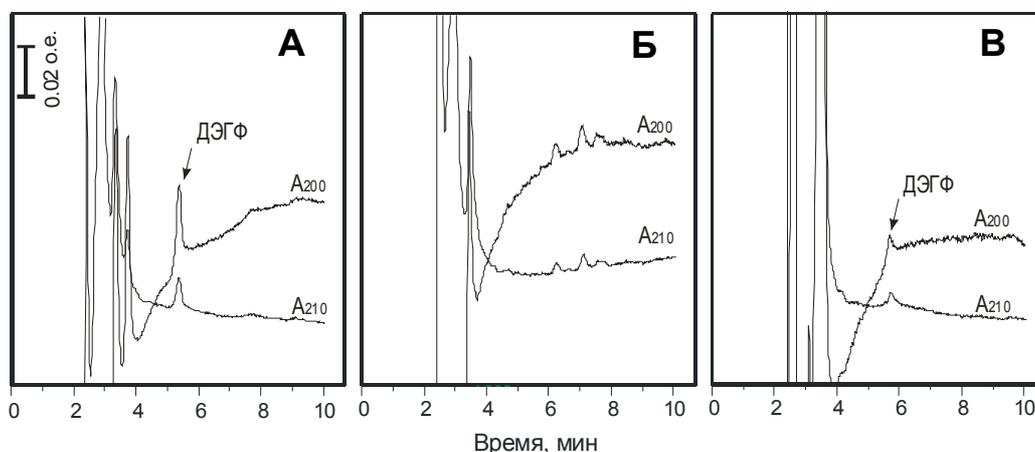


Рис. 8. Определение ДЭГФ во льду (А), в поверхностной (подледной) (Б) и в придонной воде (В).

Колонка 2x75 мм, Nucleosil 100-5 C₁₈; элюент: MeOH-H₂O (90:10); F=0.2 мл/мин; t=+50°C. Образцы: по 10 мл. Концентрация ДЭГФ в объектах составила (мкг/л): лед (верхние 10 см) – 1.33±0.26; поверхностная (подледная) вода – <0.1; глубинная вода (100-1200 м) – <0.1; придонная вода (1360 м) – 0.46±0.12.

Содержание ДЭГФ в дождевой воде в черте г. Иркутска составило <0.3÷0.3±0.1 мкг/л (июнь 1998 г.), что близко к фоновым значениям.

5. Определение ДЭГФ в почве.

Для оценки содержания ДЭГФ в почве пробы были отобраны сразу после таяния снежного покрова. По данным о концентрации ДЭГФ в осадках, приведенным выше, ежегодное поступление ДЭГФ из атмосферы на почву оценивается в $200 \div 400$ мкг/(м²·год). Если весь ежегодно поступающий ДЭГФ аккумулируется в верхних 5 мм почвы, то его концентрация в ней должна быть приблизительно 100 нг/г (в расчете на сухой вес при влажности образца почвы 50%). За несколько лет, при условии отсутствия разложения, концентрация ДЭГФ должна быть соответственно выше. В любом случае уровень концентрации ДЭГФ, равный 100 нг/г, можно считать ожидаемым и, исходя из него, формулировать требования к чувствительности методики анализа.

Предел определения ДЭГФ в почве по разработанной нами методике составляет 17 нг/г сухого веса, степень извлечения 90% ($C_{\text{ДЭГФ}}=200$ нг/г сухого вещества, $n=4$). Хроматограмма экстракта почвы с добавкой ДЭГФ (160 нг/г сухого веса, влажность 47,5%) приведена на рис. 9. Был проведен анализ 12 образцов почвы, взятых с поверхности (в слое $2 \div 5$ мм) и с глубины 50 и 100 мм. В пробах поверхностного слоя концентрация ДЭГФ была на уровне $17 \div 20$ нг/г сухого веса, в остальных образцах ниже предела обнаружения.

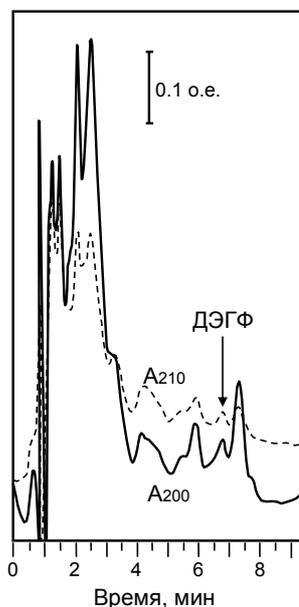


Рис.9. Хроматограмма экстракта почвы с добавкой ДЭГФ.

Колонка 2x75 мм, Nucleosil 100-5 C₁₈; элюент "А": H₂O; элюент "Б": MeOH; градиент: 85% "Б" 9 мин, 100% "Б" 3 мин; скорость потока 0,2 мл/мин; температура +50°С. Образец: 20 мкл метанольного раствора экстракта образца почвы массой 2 г.

Найденное низкое содержание ДЭГФ в почве можно объяснить весьма быстрой его биodeградацией, что согласуется с литературными данными.

6. Определение ДЭГФ в донных осадках озера Байкал.

Донные отложения водоемов можно рассматривать как потенциальный источник вторичной эмиссии фталатов, и исследование содержания ДЭГФ в донных осадках является важной частью многих мониторинговых программ.

Скорость накопления осадков в оз. Байкал мала и составляет для Южной котловины $0.6 \div 0.7$ мм/год. За 50 лет с начала крупнотоннажного производства фталатов в мире и, соответственно, их эмиссии в атмосферу, толщина накопленного в озере осадка, содержащего ДЭГФ, не превышает $35 \div 50$ мм.

Результаты анализа образцов осадков приведены в табл. 5; хроматограмма показана на рис. 10. Предел обнаружения ДЭГФ – 30 нг в 1 г сухого вещества. Степень извлечения ДЭГФ гексаном составила 90% при $C_{\text{ДЭГФ}}=200$ нг/г ($n=4$).

Таблица 5. Концентрации ДЭГФ в донных отложениях оз. Байкал.

Глубина донных осадков, мм от поверхности	$C_{\text{ДЭГФ}}$, нг/г сухого веса ($n=2$)
0÷5	43±10
5÷10	30±15
10÷15	<30
15÷20	<30
45÷50	<30
90÷100	<30

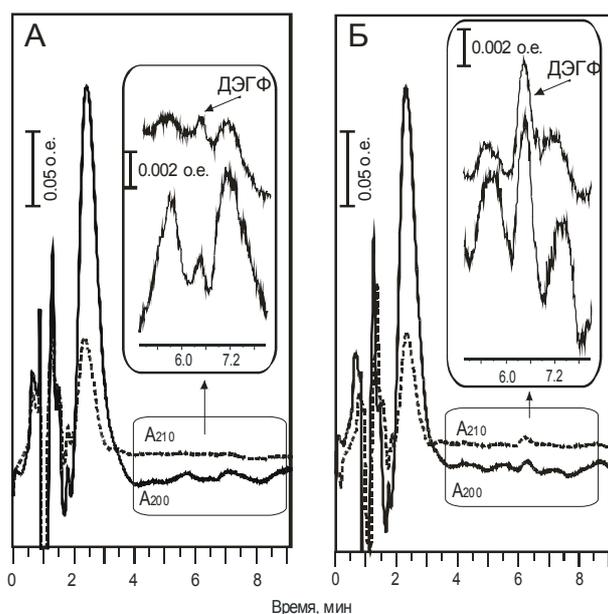


Рис. 10. Хроматограммы экстрактов донных отложений из оз. Байкал.

А– экстракт слоя осадка с глубины $0 \div 0.5$ см.

Б– экстракт **А** с добавкой ДЭГФ. Колонка 2×75 мм с Nucleosil 100-5 C_{18} ; элюент "А": H_2O ; элюент "Б": $MeOH$; градиент: 85% "Б" 9 мин, 100% "Б" 3 мин; скорость потока 0.2 мл/мин; температура $+50^\circ C$. Образец: 10 мкл метанольного раствора экстракта образца донных отложений массой 2 г.

Принимая среднюю концентрацию ДЭГФ в воде оз. Байкал равной 0.2 мкг/л и среднюю его концентрацию в верхних 10 мм осадка равной 40 мкг/кг,

можно оценить коэффициент аккумуляции (K_A) ДЭГФ в осадке как $K_A = C_{OC}/C_B$, где C_{OC} – концентрация ДЭГФ в донных отложениях (мкг на 1 кг сухого вещества); C_B – концентрация ДЭГФ в воде (мкг/кг).

Полученное значение K_A , составляющее около 200, говорит о том, что осадки являются "емким" аккумулятором ДЭГФ, а сам процесс образования осадков представляется важнейшим путем вывода ДЭГФ из водной толщи озера.

Для оценки способности байкальских осадков сорбировать ДЭГФ мы исследовали кинетику адсорбции на двух образцах с разным содержанием органического углерода (рис. 11).

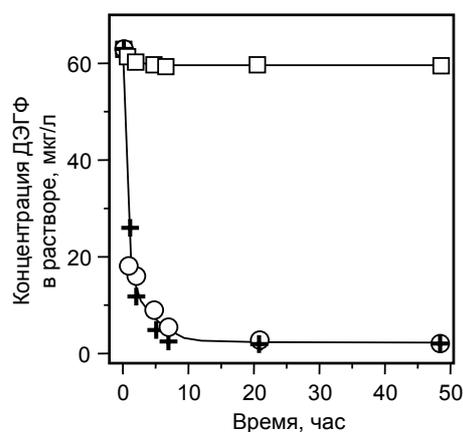


Рис. 11. Кинетические кривые адсорбции ДЭГФ на частицах осадка.

⊕ и ○- кривые для водных растворов ДЭГФ с осадками №1 (3.70% $C_{орг}$) и №2 (1.52% $C_{орг}$) соответственно; □- контроль (раствор ДЭГФ без осадка). Объем суспензии 400 мл, концентрация твердых частиц 5 г/л, концентрация ДЭГФ 60 мкг/л. Температура 22°C.

Из кривых следует, что в наших условиях оба осадка, независимо от содержания органического углерода, практически полностью сорбируют ДЭГФ из воды за 10-20 часов. Оценку ожидаемой концентрации ДЭГФ в осадке можно сделать путем рассуждений, основанных на следующих допущениях: средняя концентрация ДЭГФ в байкальской воде не изменялась последние 25 лет и составляла 0.2 мкг/л; среднее содержание взвешенных частиц – 0.4 мг/л; скорость осадконакопления – 0.6 мм/год; влажность верхнего слоя осадка – 80%.

Из этих исходных данных следует, что масса осадка, накопившегося за год на 1 $дм^2$ дна, составит ≈ 1 г в пересчете на сухое вещество. Так как масса взвешенных частиц в столбе воды 1000 м x 1 $дм^2$ равна ≈ 4 г, то захоранивается в осадке за год $\approx 25\%$ из этого количества. Предполагая, что весь ДЭГФ, содержащийся в водной толще, связан с частицами, его количество в осевшей взвеси составит за год 50 мкг/ $дм^2$. Это соответствует концентрации в осадке 50 мкг на 1 г сухого веса, что в 1000 раз больше найденной нами величины.

Принимая во внимание, что период полураспада (гидролиза) ДЭГФ в

нейтральной среде оценивается в 2000 лет, можно предположить, что единственной причиной очень низкой концентрации ДЭГФ в донных осадках Байкала является его деградация под действием микроорганизмов.

7. Изучение биodeградации ДЭГФ микроорганизмами.

Явление биodeградации ДЭГФ различными видами бактерий известно. В экспериментах по изучению биodeградации ДЭГФ мы использовали микроорганизмы, выделенные из различных объектов экосистемы оз. Байкал, актиномицеты *Micromonospora purpurea* и *Streptomyces sp.*; аэробные бактерии из рода *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens* и *P. putida*); бактерии из рода *Bacillus*.

Скорость биodeградации ДЭГФ оценивали по изменению его концентрации в культуральной среде (речная и озерная вода) методом ОФ ВЭЖХ (см. рис. 12 А). Практически все микроорганизмы и их природные сообщества разрушали ДЭГФ с заметной скоростью (примеры на рис. 12 Б и В).

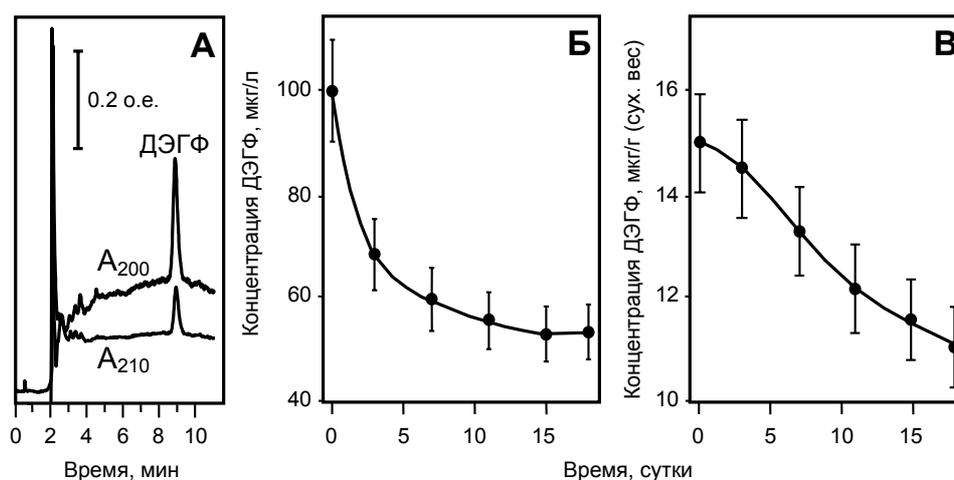


Рис. 12. Изучение биodeградации ДЭГФ микроорганизмами.

А- определение ДЭГФ в культуральной жидкости *Micromonospora purpurea* (штамм М110). Колонка 2x75 мм с Nucleosil 100-5 C₁₈; элюент: Н₂О-МеОН (15:85); скорость потока 0.2 мл/мин; температура +50°С. Образец: 2 мл культуральной жидкости (С_{ДЭГФ}=180±2 мкг/л). **Б-** динамика деградации ДЭГФ в воде из р. Селенги. **В-** динамика деградации ДЭГФ в донных осадках.

Лимитирующим фактором роста численности микроорганизмов в опытах, где в качестве среды использовалась маломинерализованная природная вода, был, очевидно, дефицит биогенных элементов ("бедные" среды). Этим можно объяснить неполную деградацию ДЭГФ в наших экспериментах.

8. Биоаккумуляция ДЭГФ в жире омуля и нерпы.

Гидрофобные химически устойчивые соединения, попадая в водоемы, имеют свойство накапливаться в жировой ткани водных организмов, причем, чем выше уровень трофической (пищевой) цепи, занимаемый организмом, тем больше коэффициент биоаккумуляции. Имеющаяся в литературе информация о содержании фталатов в тканях ряда организмов весьма ограничена, а биоаккумуляцию фталатов на Байкале, насколько нам известно, никто не изучал.

В качестве объектов исследования нами был выбран жир представителей высших трофических уровней экосистемы оз. Байкал – омуля и нерпы (байкальский тюлень). Определение ДЭГФ в жировой ткани является сложной аналитической задачей, но уровень концентрации этого "главного" фталата можно весьма просто оценить по количеству *орто*-фталевой кислоты (*о*-ФК), если гидролизовать жир и все содержащиеся в нем фталаты. Такой метод анализа был нами разработан совместно с Е.Д. Кирюхиной.

Омыление жира проводили в течение 12 часов, и за это время фталаты также полностью гидролизировались, о чем свидетельствует кинетическая кривая гидролиза ДЭГФ – одного из самых устойчивых фталатов (см. рис. 13).

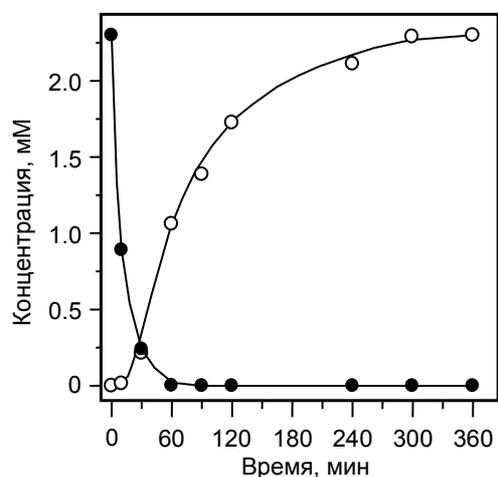


Рис. 13. Кинетика щелочного гидролиза ДЭГФ.

○ – концентрация *орто*-фталевой кислоты;
 ● – концентрация ДЭГФ.
 Начальная концентрация ДЭГФ $2.3 \cdot 10^{-3}$ М;
 растворитель: 1 М КОН в MeOH:H₂O (80:20);
 температура +50°C.

Результаты определения *о*-ФК в жире нерпы приведены на рис. 14. Идентификацию пика *о*-ФК на хроматограммах проводили по двум критериям: по времени удерживания и по спектральному отношению (отношению площадей пиков $S_{240}/S_{230}=0.71\pm 0.02$). Результаты определения суммы фталатов в жире омуля и нерпы и коэффициенты биоаккумуляции (в расчете на среднюю концентрацию фталатов в воде оз. Байкал 0.5 мкг/л) приведены в табл. 6.

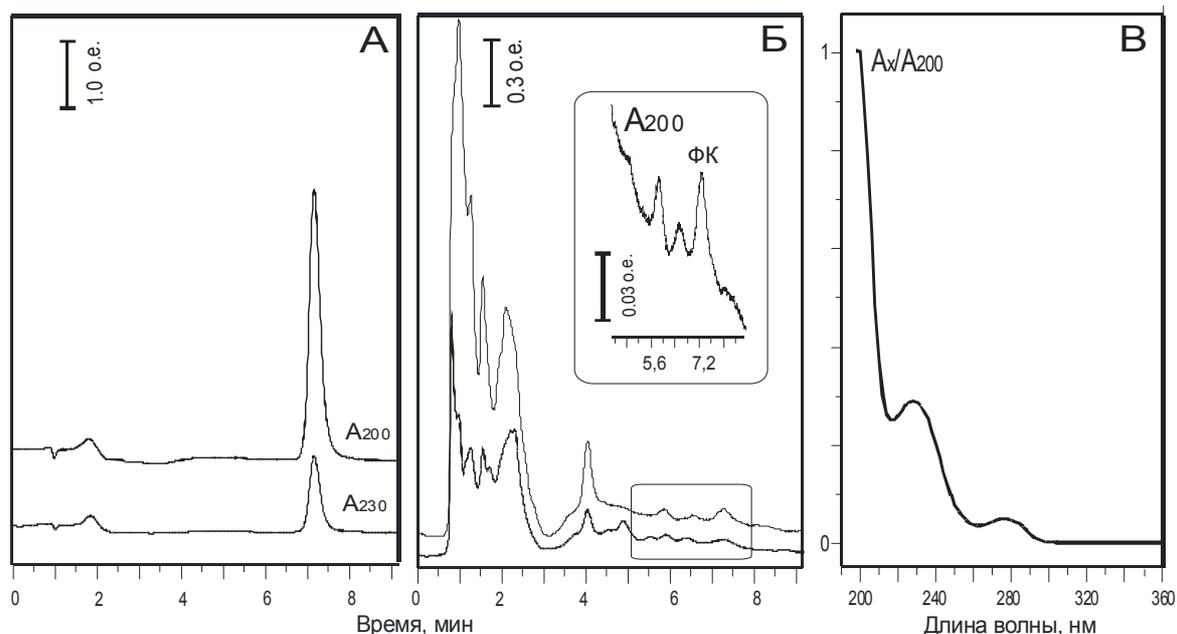


Рис. 14. Хроматограммы раствора *орто*-фталевой кислоты (А), водного раствора щелочного гидролизата жира нерпы (Б) и нормированный УФ спектр *орто*-фталевой кислоты (В).

Колонка 2x75 мм с Silasorb SPH-C₁₈ (5 мкм); элюент А: MeOH-0.1 М Н₃РO₄, рН 2 (5:95); элюент В: MeOH; изократическое элюирование: 7% В; скорость потока 0.2 мл/мин; температура +40°C. Образцы: А- 2 мкл водного раствора бифталата калия (1 мг/мл); Б- 20 мкл нейтрализованного гидролизата жира нерпы. УФ спектр *орто*-фталевой кислоты (В) записан во время хроматографии после остановки потока вблизи максимума хроматографического пика.

Таблица 6. Суммарное содержание фталатов в жире омуля и нерпы.

Образец	Сумма фталатов, мг/кг	Коэффициент биоаккумуляции
Жир омуля (n=4)	0.45±0.09	900
Жир нерпы (n=8)	1.24±0.25	2500

По сравнению с хлорорганическими соединениями (например, ДДТ), степень биоаккумуляции фталатов оказалась в тысячи раз меньше. Вероятно, это связано с различием механизмов аккумуляции.

9. О плане изучения поведения ДЭГФ в экосистеме оз. Байкал.

Планирование исследования поведения ДЭГФ в экосистеме оз. Байкал определялось географическими особенностями экосистемы и физико-химическими свойствами ДЭГФ, определяющими его поведение в отдельных звеньях водной экосистемы. Получение достаточно полной картины предполагало

выявление источников эмиссии ДЭГФ в озеро, определение его содержания в разных частях акватории и глубинах озера, оценку скорости выведения ДЭГФ из экосистемы (вынос с водами р. Ангара, осаждение на дно на взвешенных частицах, деградация микроорганизмами, биоаккумуляция в биоте). Схема отбора образцов, характерная для такого рода исследования и которая, по нашему мнению, обеспечила необходимый объем данных, приведена на рис. 5.



Рис. 15. Схема исследованного района экосистемы оз. Байкал и местá отбора проб.

- - населенные пункты;
- * - ледовая станция.
- ▲ - места отбора проб глубинной байкальской воды.
- - места отбора проб речной воды.
- * - места отбора проб снега.

Расположение точек отбора проб на схеме было обусловлено необходимостью получения следующей информации:

- содержание ДЭГФ в байкальской воде на разных глубинах в Северном, Среднем и Южном Байкале в летнее и зимнее время;
- содержание ДЭГФ в снежном покрове от Иркутска до Байкала для оценки количества ДЭГФ, поступающего в Южный Байкал по долине р. Ангара в результате атмосферного переноса;
- содержание ДЭГФ в воде малых рек, берущих начало в горах Хамар-Дабана (количество выпадающих в год осадков превышает 1000 мм), для оценки поступления ДЭГФ из атмосферы в Южный Байкал;
- содержание ДЭГФ в воде р. Селенга для оценки поступления ДЭГФ из водосборного бассейна этого крупнейшего притока Байкала;
- содержание ДЭГФ в воде р. Ангара для оценки выносимого из Байкала количества ДЭГФ.

Выводы.

1. Усовершенствована система химического мониторинга экосистемы озера Байкал путем включения в список анализируемых соединений ди(2-этилгексил)фталата (ДЭГФ), концентрация которого в различных объектах экосистемы определяется, главным образом, глобальными процессами.

2. Разработан метод ВЭЖХ-анализа ДЭГФ в воде с прямым концентрированием проб на колонке 2x75 мм с обращенно-фазовым сорбентом. Предел обнаружения метода составил 0.02 мкг/л, что позволяет его использовать для определения ДЭГФ в природных водах фоновых районов мира. Для обеспечения этого предела обнаружения разработаны способы очистки растворителей и лабораторной посуды от следов ДЭГФ, позволяющие максимально снизить вероятность вторичного загрязнения проб. Показана применимость метода для определения ДЭГФ в природных водных объектах с относительно низким содержанием органических веществ и взвешенных частиц (вода оз. Байкал, речная вода, атмосферные осадки). Метод апробирован в условиях полевой лаборатории.

3. Разработаны ВЭЖХ-методики для определения ДЭГФ в донных отложениях, в почве, в жировых тканях рыбы и тюленя, в культуральных жидкостях микроорганизмов.

4. Сделана оценка уровней содержания ДЭГФ в водных объектах экосистемы озера Байкал: в поверхностной и глубинной воде озера, в водах основных притоков Южного Байкала и р. Ангара. Показано, что за последние шесть лет концентрация ДЭГФ в байкальской воде снизилась более, чем в 4 раза.

5. Получены данные об уровне концентраций ДЭГФ в ледовом покрове озера, снежном покрове в направлении от Иркутска к Байкалу, в донных осадках и почве, данные о суммарном содержании фталатов в жировой ткани нерпы и омуля. Накопленная информация может быть использована для организации оптимизированной системы химического мониторинга ДЭГФ в экосистеме озера Байкал.

Список основных публикаций по теме диссертации.

1. Азарова И.Н., Барам Г.И., Горшков А.Г., Кирюхина Е.Д. Прямое определение диизооктилфталата – антропогенного химического трассера – в природных водах методом ВЭЖХ. //Тезисы Всероссийского симпозиума по теории и практике хроматографии и электрофореза. Москва. 1998. 13-17 апреля. С.113.
2. Азарова И.Н., Горшков А.Г., Верещагин А.Л., Барам Г.И. Твердофазная экстракция ПАУ из матриц снеговой воды. //Тезисы Всероссийского симпозиума по химии поверхности, адсорбции и хроматографии. Москва. 1999. 12-16 апреля. С.243.
3. Барам Г.И., Азарова И.Н., Горшков А.Г., Верещагин А.Л., Ланг Б., Кирюхина Е.Д. Определение бис-(2-этилгексил)фталата в воде методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с прямым концентрированием на хроматографической колонке. //Ж. аналит. химии. 2000. Т.55. №8. С.834-839.
4. Азарова И.Н., Барам Г.И., Горшков А.Г. Определение бис(2-этилгексил)фталата в водных пробах методом микроколоночной ВЭЖХ. //Тезисы VI Конференции "Аналитика Сибири и Дальнего Востока – 2000". Новосибирск. 2000. 21-24 ноября. С.179.
5. Goldberg E.L., Grachev M.A., Phedorin M.A., Kalugin I.A., Khlystov O.M., Mezentsev S.N., Azarova I.N., Vorobyeva S.S., Zheleznyakova T.O., Kulipanov G.N., Kondratyev V.I., Miginsky E.G., Tsukanov V.M., Zolotarev K.V., Trunova V.A., Kolmogorov Yu.P., Bobrov V.A. Application of synchrotron X-ray fluorescent analysis to studies of the records of paleoclimates of Eurasia stored in the sediments of Lake Baikal and Lake Teletskoye. //Nuclear Instruments and Methods in Physics Research. 2001. V. A 470, P.388-395.
6. Azarova I.N., Baram G.I., Vereshchagin A.L. HPLC *in situ*: fate of di-(2-ethylhexyl)phthalate in Lake Baikal ecological system. //Abstracts of 3rd International Symposium on Separations in BioSciences. Moscow. 2003. May, 13-18. P.160.
7. Азарова И.Н., Парфенова В.В., Барам Г.И., Теркина И.А., Павлова О.Н., Сулова М.Ю. Дегградация бис-(2-этилгексил)фталата микроорганизмами воды и донных осадков реки Селенги и озера Байкал в условиях модельного эксперимента. //Прикладная биохимия и микробиология. 2003. №5. В печати.

Подписано к печати 21.08.2003 г.

Объем 2.5 п.л. Тираж 120 экз. Заказ №

Издательство Института географии СО РАН

664033, г.Иркутск, ул. Улан-Баторская, 1