

УДК 543.544.5.068.7:543.51

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДА ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФТАЛАТОВ В ВОДЕ НА УРОВНЕ СЛЕДОВ В РЕЖИМЕ ОНЛАЙН

© 2024 г. Т. А. Григорьева^а, *, А. В. Кузьмин^а, А. Г. Горшков^а

^аЛимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук
ул. Улан-Баторская, 3, 664033 Россия, Иркутск

* E-mail: krom_07@mail.ru

Поступила в редакцию 19.04.2024 г.

После доработки 15.05.2024 г.

Принята к публикации 15.05.2024 г.

Валидирован метод определения фталатов в воде, включающий сорбцию гидрофобных компонентов пробы на колонке жидкостного хроматографа и разделение сконцентрированных аналитов методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в режиме онлайн: для количественного определения приоритетных фталатов (ПФ) в поверхностных водах на уровне следов; качественной оценки отношения стабильных изотопов углерода $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ в составе ПФ. Показано отсутствие вклада ПФ из лабораторного фона в результате измерений. Установлены пределы определения (0.15–0.22 мкг/л) и точность определения ($\pm\delta = 10\text{--}20\%$) при применении метода обращенно-фазовой ВЭЖХ онлайн и УФ-детектирования аналитов. Обоснованы пограничные значения отношения изотопов $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ для качественной оценки результатов измерения величины $\Delta^{13}\text{C}$ в структуре ди(2-этилгексил)фталата и обнаружено его поступление в воды озера Байкал из биогенных и абиогенных источников. Апробирована методика определения ПФ методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с УФ-детектированием онлайн в полевых условиях на портативном жидкостном хроматографе, оценены диапазоны концентраций ди-*n*-бутилфталата (от < 0.15 до 1.6 мкг/л) и ди(2-этилгексил)фталата (от < 0.22 до 1.6 мкг/л) в прибрежной зоне озера Байкал.

Ключевые слова: приоритетные фталаты, микроэкстракция и ВЭЖХ онлайн, УФ-детектирование, масс-спектрометрия высокого разрешения, озеро Байкал.

DOI: 10.31857/S0044450224100075, EDN: TFBSWK

Диэфиры *o*-фталевой кислоты (фталаты) широко используются в качестве пластификаторов при производстве полимерных материалов, добавок к различным изделиям, к которым относятся медицинское оборудование, краски, смазочные материалы, клеи, косметика. В структуре пластмасс фталаты химически не связаны с полимерной матрицей, что способствует их поступлению в окружающую среду не только в процессе производства, но и при эксплуатации и утилизации изделий из пластика. Объем производства пластмассы составил в 2021 г. 380 млн т [1], и их повсеместное использование привело к распространению фталатов в окружающей среде. Ксенобиотика этого класса обнаружены во льдах Арктики и Антарктики, в телах глубоководных медуз Атлантического океана и байкальской нерпы, в атмосферных осадках, в реках Китая, стран ЕС, России и Африки [2, 3]. Диэфиры *o*-фталевой кислоты отнесены к чис-

лу эндокринных разрушителей и включены в число стойких органических загрязнителей (СОЗ). Принимая во внимание их воздействие на биологические объекты, фталаты подлежат постоянному контролю в объектах окружающей среды. Шесть из них: диметилфталат (ДМФ), диэтилфталат (ДЭФ), ди-*n*-бутилфталат (ДнБФ), бензилбутилфталат (ББФ), ди(2-этилгексил)фталат (ДЭГФ) и диоктилфталат (ДОФ) отнесены к приоритетным фталатам (ПФ) [4]. Максимальные концентрации ПФ, обнаруженные в поверхностных водах, соотносятся между собой следующим образом (мкг/л): 197 (ДЭГФ) $\geq$ 122 (ДнБФ) $\gg$ ДЭФ (33) $\sim$ ДМФ (32) $>$ ДОФ (6.1) $\sim$ ББФ (4.4) [5]. В чистых фоновых районах, например в водах озера Байкал, концентрации доминирующих фталатов, ДнБФ и ДЭГФ, оценены статистически значимыми средними величинами, равными 0.55 и 0.30 мкг/л соответственно [6].

Широко применяемые на практике методики определения ПФ в воде включают жидкостно-жидкостную экстракцию (ЖЖЭ), твердофазную экстракцию (ТФЭ) на картриджах или дисках с обращенно-фазовым (ОФ) сорбентом, где аналиты экстрагируются и концентрируются совместно с сопутствующими и мешающими компонентами пробы. Для удаления последних необходимо введение в методику дополнительной стадии [7–13]. Подготовка проб данными методами требует значительных объемов органических растворителей (в том числе токсичных) и их последующую утилизацию. С целью уменьшения объемов органических растворителей, миниатюризации и автоматизации анализа разработаны методы микроэкстракции: твердофазная (ТФМЭ) и жидкостная микроэкстракция (ЖМЭ) [14, 15]. Методики с применением ТФМЭ и ЖМЭ на стадии подготовки проб и последующим анализом методами газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС) или высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) дают возможность определять фталаты в воде на уровне от 0.2 до 10 нг/л [16, 17].

Основная методическая проблема, возникающая при определении фталатов, связана с риском загрязнения проб фталатами из окружающей среды при их отборе, хранении и транспортировке, из лабораторного фона (из органических растворителей, воздуха лабораторий, пластиковых расходных материалов) при подготовке и анализе образцов. “Вторичное” загрязнение может приводить к ложной положительной идентификации, завышенным результатам определения [18] и становится критически значимым при определении фталатов на уровне следов, когда результат определения ПФ в воде может быть завышен на 0.005–0.49 мкг/л [19]. В связи с этим нижняя граница диапазона определяемых концентраций фталатов ограничена не чувствительностью используемого аналитического метода, а их содержанием в лабораторном фоне.

Концепция онлайн-методологии, основанная на объединении стадий концентрирования и последующего анализа, снижает вероятность загрязнения образцов фталатами из лабораторного фона, поскольку подготовка пробы и измерение аналитических сигналов проходят в замкнутом пространстве. За счет уменьшения риска потерь аналитов на стадии концентрирования (вместо аликвоты используется весь экстракт) и отсутствия вклада лабораторного фона в результат измерения возможно определение фталатов на более низком уровне концентраций.

В настоящей работе валидирован простой и эффективный метод, основанный на сорбции гидрофобных компонентов пробы на ОФ-сорбенте колонки жидкостного хроматографа и разделении сконцентрированных фталатов методом

ВЭЖХ в режиме онлайн (ОФ ВЭЖХ онлайн), с целью определения ПФ в поверхностных водах на уровне следов, измерении отношения стабильных изотопов углерода $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ в составе ПФ для идентификации их источников — биогенных и абиогенных.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и реагенты. Пробы воды в пелагиале озера Байкал отбирали в ходе экспедиционных работ весной и осенью 2018 г. кассетным пробоотборником SBE-32 (Carousel Water Sampler, Sea-Bird Electronics, США) с горизонта 5 м, в прибрежной зоне — поверхностную воду на расстоянии не более 50 м от побережья. На каждой станции отбирали две параллельные пробы в стеклянные бутылки объемом 1 л, добавляли 0.5 мл 1 М водного раствора азида натрия ос. ч. (MERCK, Германия) в качестве консерванта. Бутылки герметизировали крышками с прокладкой из алюминиевой фольги и хранили при температуре +5°C на борту научно-исследовательского судна (НИС) до анализа. Для анализа методами ГХ-МС и ВЭЖХ-масс-спектрометрии высокого разрешения (ВЭЖХ-МСВР) пробы доставляли в лабораторию ЛИН СО РАН. Образцы речной воды отбирали из р. Ангара в пределах городской территории на расстоянии 1–2 м от берега, пробы атмосферных осадков (снег, дождевая вода) — на южном побережье Байкала и территории ЛИН СО РАН. Для хроматографии использовали ацетонитрил сорт 1 (Криохром, Россия), метанол х. ч. (Вектон, Россия), стандарты фталатов (Mix 606 M, Supelco, Германия; ДнБФ и ДЭГФ, Sigma Aldrich, Германия). Для приготовления элюентов метанол перегоняли перед анализом, содержание фталатов в растворителе и воде контролировали методами ГХ-МС и ВЭЖХ соответственно.

Концентрирование пробы и хроматографический анализ. Пробы воды, отобранные на борту НИС, без предварительного фильтрования помещали в мерную колбу емк. 50 мл, добавляли 1.5 мл метанола, перемешивали и доводили пробой до метки. Пробы концентрировали на колонке (2 × 75 мм, сорбент Nucleosil 100-5 C18, Macherey-Nagel, Германия) жидкостного хроматографа Милихром А-02 (ЭкоНова, Россия), прокачивая через колонку образцы со скоростью 200 мкл/мин. Сконцентрированные гидрофобные компоненты элюировали смесью ацетонитрил–вода в градиентном или изократическом режиме при расходе элюента 150 мкл/мин с одновременным детектированием при длинах волн 200, 214, 226 и 280 нм и температуре колонки 50°C.

Определение ди-*n*-бутилфталата и ди(2-этилгексил)фталата в воде методом ОФ ВЭЖХ онлайн. Градуировочные зависимости для определения ПФ в воде устанавливали в диапазоне ожидаемых кон-

концентраций от 0.1 до 6.0 мкг/л. Градуировочные растворы готовили смешиванием соответствующих объемов бутилированной воды (бутыль из полиэтилентерефталата) и исходных растворов ДнБФ и ДЭГФ (200 мкг/мл в ацетонитриле) с добавкой к смеси 3% метанола. Каждый градуировочный раствор (0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 6.0 мкг/л) готовили дважды, фталаты концентрировали на колонке хроматографа и элюировали в режиме ВЭЖХ (эффективность колонки по пику пирена 4000–5000 т. т.). Интегрировали площади аналитических пиков на хроматограммах элюатов и строили градуировочные зависимости вида $S = kc$, где S – площадь пика фталата, отн. ед.; k – градуировочный коэффициент (коэффициент чувствительности); c – концентрация фталата в стандартном растворе, мкг/л. Концентрации ДнБФ и ДЭГФ в пробах воды рассчитывали по установленным градуировочным зависимостям.

Пределы обнаружения и определения ПФ оценивали по уровням их концентраций в воде, при которых аналитические пики на хроматограммах элюатов после концентрирования пробы регистрируются с соотношением сигнал/шум (S/N), равным трем и десяти соответственно. Вклад фталатов из лабораторного фона в результат определения оценивали путем регистрации хроматограмм без стадии концентрирования образцов воды на колонке хроматографа до и после проведения анализа и идентификации пиков ПФ.

Степень извлечения и правильность результатов определения ПФ оценивали методом добавок с применением проб речной воды и образцов сравнения для следующих диапазонов измерений, мкг/л: I – 0.2–1.0; II – 1.0–6.0 (табл. 1). В качестве

добавок использовали растворы ПФ с концентрацией 1.0 мкг/мл, приготовленные разбавлением исходных растворов ДнБФ и ДЭГФ ацетонитрилом. Введение добавок приводило к увеличению объема пробы по отношению к начальному не более чем на 1%.

Показатели повторяемости и внутрилабораторной прецизионности количественных измерений фталатов оценивали по рабочим пробам согласно рекомендациям РМГ 61-2010 и РМГ 76-2014 (табл. 2). Внутрилабораторную прецизионность оценивали с использованием алгоритма оценки стандартное отклонение (s) через относительные размахи результатов измерений, полученные в соответствии с рекомендациями РМГ 76-2014. Результат оценки показателя точности включает вклад от оценки показателя прецизионности измерений и вклад от оценки показателя правильности измерений, проведенных с применением метода добавок.

Измерение отношения стабильных изотопов углерода $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ в составе фталатов. Отношение $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ в составе фталатов измеряли на хромато-масс-спектрометре Agilent 1200/6210 (Agilent, США) по методике [14], включающей стадию концентрирования пробы на колонке хроматографа (2 × 75 мм, Nucleosil 100-5 C18). Сконцентрированные фталаты элюировали в следующих условиях: элюент А – 0.1%-ная муравьиная кислота в воде; элюент В – 0.1%-ная муравьиная кислота в ацетонитриле; градиент элюента В от 30 до 100% за 20 мин, затем 100% в течение 15 мин. Фталаты детектировали в режиме ионизации электрораспылением (ИЭР+), диапазон m/z от 60 до 600. Для измерения отношения $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ интегрировали пики

Таблица 1. Оценка правильности результатов определения ди-*n*-бутилфталата и ди(2-этилгексил)фталата в речной воде методом введено–найдено ($n = 3$, $P = 0.95$)

ПФ	Концентрация ПФ в пробе воды, мкг/л	Введено, мкг		Найдено, мкг/л		Добавка, мкг	
		I	II	I	II	I	II
ДнБФ	0.51 ± 0.08	0.29	2.6	0.78 ± 0.12	3.3 ± 0.3	0.27 ± 0.04	2.8 ± 0.3
ДЭГФ	0.38 ± 0.06	0.29	2.6	0.63 ± 0.09	3.1 ± 0.3	0.25 ± 0.04	2.7 ± 0.3

Таблица 2. Показатели повторяемости, внутрилабораторной прецизионности и точности определения фталатов

Фталат	Диапазон концентраций фталата, мкг/л	Показатель повторяемости, s_r , %	Показатель внутрилабораторной прецизионности, $s_{\text{Рлаб}}$, % ($n = 2$)	Показатель точности, ±δ, % ($n = 2$, $P = 0.95$)
			$n = 2$	
ДнБФ	0.15–1.0	14	14	15
	1.0–6.0	3.0	4.0	10
ДЭГФ	0.15–1.0	16	20	20
	1.0–6.0	5.0	8.0	12

на хроматограммах при m/z 279.16 ± 0.05 для ДнБФ и 391.28 ± 0.05 для ДЭГФ (молекулярные ионы $[M+H]^+$). Отношение изотопов углерода $^{13}C/^{12}C$ ($\Delta^{13}C$, ‰) рассчитывали по уравнению:

$$\Delta^{13}C, \text{‰} = \left(\frac{(^{13}C/^{12}C)_{\text{ПФ}}}{(^{13}C/^{12}C)_{\text{СТ}}} - 1 \right),$$

где $(^{13}C/^{12}C)_{\text{ПФ}}$ — отношение стабильных изотопов углерода в составе аналита; $(^{13}C/^{12}C)_{\text{СТ}}$ — отношение стабильных изотопов углерода в составе коммерческих стандартов ДнБФ и ДЭГФ. Масс-спектрометр калибровали по стандарту ESI-L Tuning Mix (Agilent, США).

УФ-спектры приоритетных фталатов регистрировали на спектрофотометре UV-Vis Perkin Elmer Lambda 35, кювета 1 см. Использовали растворы ПФ в ацетонитриле с концентрацией 10 мкг/мл, раствор сравнения — ацетонитрил.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Концентрирование и хроматография приоритетных фталатов. Валидируемый метод ОФ ВЭЖХ-УФ онлайн основан на концентрировании гидрофобных компонентов пробы воды на колонке жидкостного хроматографа, упакованной ОФ-сорбентом, и разделении сконцентрированных веществ методом ВЭЖХ [20]. Концентрирование и разделение ПФ проводили в режиме онлайн, учитывая концентрацию аналитов на уровне следов и риск загрязнения образцов фталатами из лабораторного фона. Результат анализа оценивали по площади пиков фталатов на хроматограмме, получаемой

при элюировании гидрофобных веществ с колонки.

Для определения ПФ в воде на уровне концентрации 0.2 мкг/л методом ВЭЖХ-УФ требуется концентрирование пробы (не менее 4 мл) со степенью $k \geq 2000$. Размеры (2×75 мм, 200 мг сорбента) и температура колонки позволяют проводить анализ пробы за относительно короткий период времени ~ 40 мин, включающий концентрирование образца и последующий ВЭЖХ-анализ на колонке с эффективностью не менее 3000 т. т.

Значения коэффициентов распределения ПФ в системе октанол—вода ($\log K_{ow}$) меняются в широком диапазоне от 1.6 до 8.1 [3], т. е. хроматография фталатов на колонках с ОФ-сорбентом имеет характеристики, индивидуальные для каждого соединения. На короткой колонке в градиентном режиме элюирования разделение смеси шести ПФ достигается за 20 мин хроматографического цикла (рис. 1б), фталаты регистрируются в широком диапазоне времен удерживания тремя парами соединений, имеющих близкие значения коэффициента K_{ow} . При разделении в изократическом режиме элюирования для регистрации аналитических пиков с коэффициентами емкости k' в диапазоне от 1.5 до 1.8 необходимо отдельно подбирать состав подвижной фазы: для ДнБФ это вода—ацетонитрил (20 : 80, по объему), для ДЭГФ вода—ацетонитрил (5 : 95, по объему).

Пики ПФ на хроматограмме элюатов (рис. 1а) отличаются большим временем удерживания и регистрируются с высоким разрешением для пар ББФ и ДнБФ, ДЭГФ и ДОФ. Эффективность (N

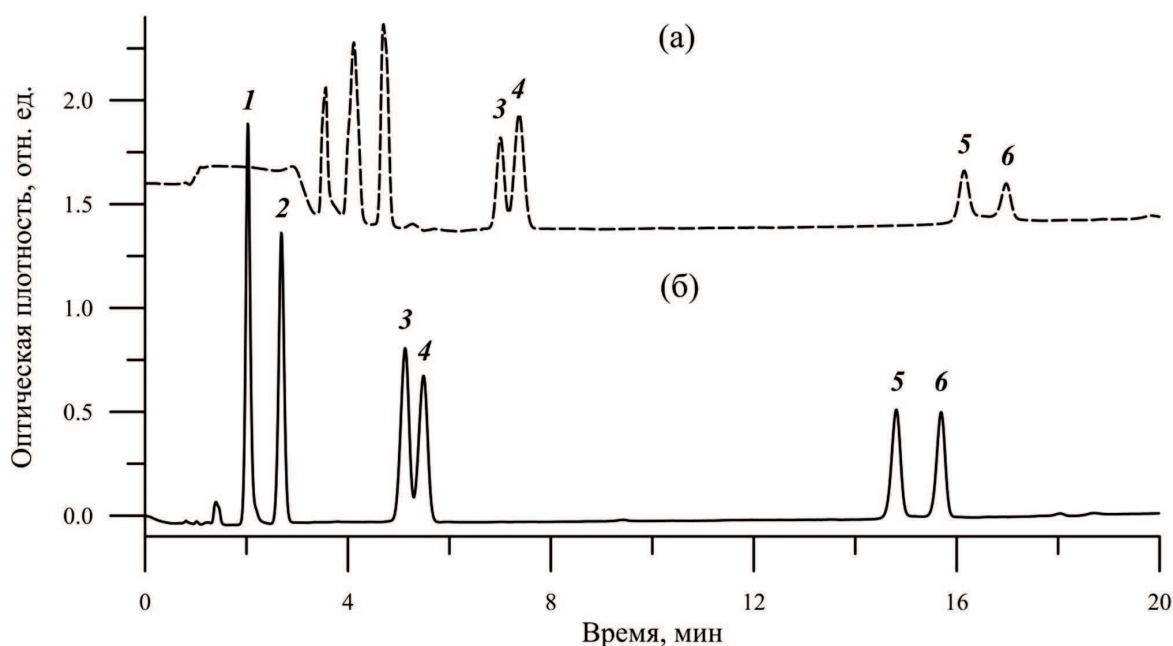


Рис. 1. Хроматограммы смеси приоритетных фталатов (ПФ). Детектирование при $\lambda = 200$ нм; элюенты: А — вода, В — ацетонитрил; градиент В от 60 до 100% за 20 мин, скорость потока 150 мкл/мин. Образцы: (а) раствор ПФ в бутилированной воде, концентрация 0.5 нг/мл каждого, объем сконцентрированного образца 4 мл; (б) 2 мкл раствора ПФ в ацетонитриле, концентрация 1 нг/мкл каждого. Пики: 1 — ДМФ, 2 — ДЭФ, 3 — ББФ, 4 — ДнБФ, 5 — ДЭГФ, 6 — ДОФ.

3000–4000 т. т.) короткой колонки обеспечивает регистрацию гомогенных аналитических пиков с соотношением $S/N \geq 10$. Пики ДМФ и ДЭФ ($\log K_{ow}$ 1.60 и 2.47 соответственно) перекрываются пиками сопутствующих гидрофобных компонентов воды. Учитывая минимальное содержание ДМФ и ДЭФ в поверхностных водах, в байкальской воде в диапазоне концентрации от 0.01 до 0.09 мкг/л [6] их идентификация путем УФ-детектирования затруднена.

Определение приоритетных фталатов в воде на уровне следов с применением метода ОФ ВЭЖХ онлайн. При мониторинге СОЗ в водах озера Байкал опробована методика определения двух доминирующих фталатов – ДнБФ и ДЭГФ (рис. 2) на уровне концентраций от 0.15 до 6.0 мкг/л. Градуировочные зависимости площадей пиков фталатов на хроматограммах элюатов от концентрации ПФ в образцах воды характеризуются коэффициентами корреляции $R^2 \geq 0.99$, коэффициенты k в градуировочных уравнениях составили 0.74 (ДнБФ) и 0.59 (ДЭГФ), константы b – 0.12 и 0.07 соответственно.

Все фталаты содержат в своей структуре единственную хромофорную группу – фрагмент

о-фталевой кислоты, их УФ-спектры характеризуются максимумами поглощения при λ_{max} 200, 226, 274 и 280 нм. Детектирование при $\lambda = 200$ нм обеспечивает максимальную чувствительность, тогда как одновременное детектирование при 200, 214 и 226 нм (табл. 3) – контроль правильности идентификации и гомогенности аналитических пиков путем оценки интегральных спектральных отношений [21]. Надежность идентификация пиков ДнБФ и ДЭГФ при анализе воды обеспечивается двумя критериями – временем удерживания (t_R , $\delta \pm 1.0\%$) и интегральным спектральным отношением (R , $\delta \pm 5.6\%$).

Пределы обнаружения/определения ДнБФ и ДЭГФ (объем пробы 4 мл) оценили значениями, равными 0.05/0.15 и 0.07/0.22 мкг/л соответственно. Снижение нижней границы определяемых содержаний путем увеличения объема концентрируемой пробы реализовать не удалось вследствие размывания аналитических пиков, снижения эффективности колонки и уменьшения интенсивности аналитического сигнала.

Хроматограммы холостых опытов свидетельствуют об отсутствии вклада фталатов лабораторного фона в результат определения ПФ в воде

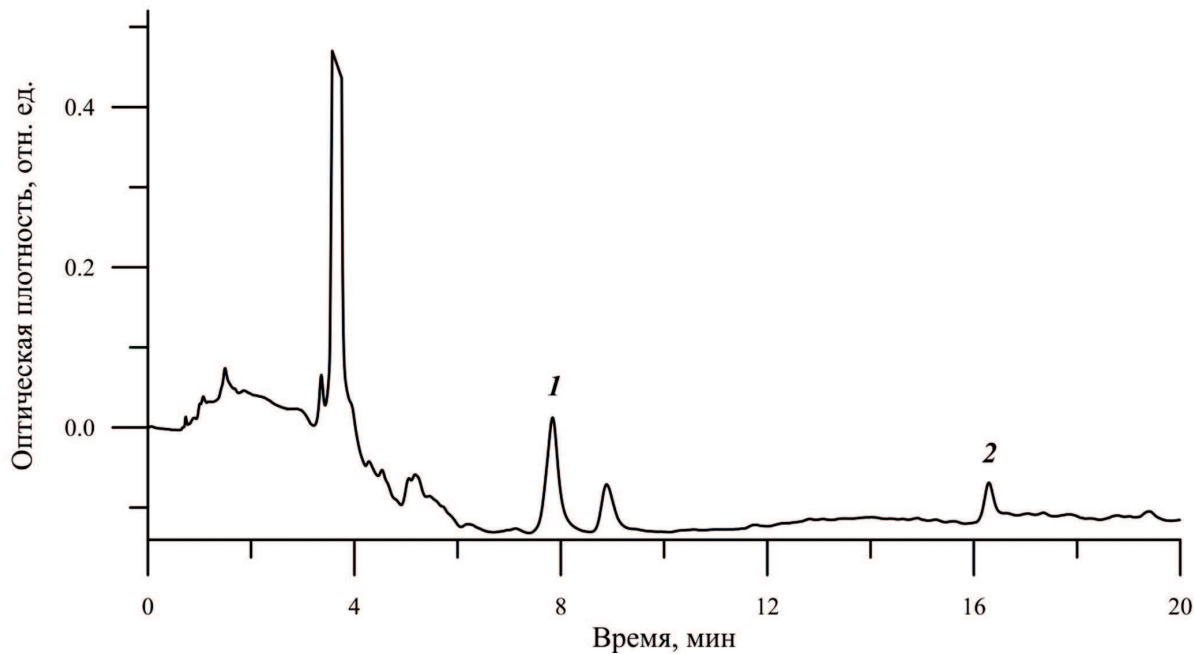


Рис. 2. Хроматограмма элюата гидрофобных веществ байкальской воды, сконцентрированных на колонке. Объем образца 4 мл; пики: 1 – ДнБФ, 2 – ДЭГФ. Колонка 2 × 75 мм, NucleoSil 100-5 C-18, температура колонки 50°C; детектирование при $\lambda = 200$ нм. Элюенты: А – вода, В – ацетонитрил; градиент В от 60 до 100% за 20 мин, скорость потока 150 мкл/мин.

Таблица 3. Спектральные характеристики приоритетных фталатов

ПФ	Молярный коэффициент поглощения, ϵ , л/(моль·см)				Спектральное отношение, R	
	200 нм	226 нм	274 нм	280 нм	$\lambda_{214}/\lambda_{200}$	$\lambda_{226}/\lambda_{200}$
ББФ	4.1×10^4	9.4×10^3	1.5×10^3	1.2×10^3	0.35 ± 0.01	0.20 ± 0.01
ДнБФ	3.6×10^4	8.1×10^3	1.1×10^3	1.0×10^3	0.23 ± 0.01	0.22 ± 0.01

при анализе в режиме онлайн (на хроматограммах холостых опытов пики для содержаний ПФ выше предела обнаружения не зарегистрированы). Оценка правильности результатов определения методом добавок подтверждает отсутствие систематической погрешности при определении ПФ по предложенной методике (табл. 1). Величины констант b в градуировочных уравнениях (вклад фоновых фталатов из растворителей и хроматографического оборудования на стадии градуировки) минимальны, не превышают уровня 0.07–0.12 мкг/л и учитываются при обработке результатов определения.

Природные образцы воды содержат фталаты как в водной, так и в твердой фазах [7], поэтому исключение стадии фильтрования при подготовке проб позволяет определять суммарное содержание ПФ и устранить один из факторов влияния лабораторного фона фталатов на результат анализа. При апробации методики при анализе проб байкальской воды отсутствие стадии фильтрования не затрудняло проведение концентрирования (фильтры хроматографической колонки меняли не реже, чем после анализа 100 образцов), поскольку вода Байкала отличается минимальным содержанием взвешенных веществ (от 0.50 до 1.0 мг/л) [22].

Методики, включающие ЖЖЭ на стадии концентрирования, характеризуются значительным вкладом лабораторного фона в результат определения ПФ при их концентрации в воде на уровне следов. Несмотря на высокую чувствительность метода ГХ-МС, нижняя граница диапазона определяемых концентраций ПФ (0.14 и 0.17 мкг/л

для ДнБФ и ДЭГФ соответственно [23]) сопоставима с пределом определения, установленным методом ОФ ВЭЖХ-УФ онлайн. Результаты апробации методики в полевых условиях представлены в табл. 4.

Детектирование приоритетных фталатов методом масс-спектрометрии высокого разрешения. Фталаты, обнаруженные в поверхностных водах на уровне следов, могут поступать как из антропогенных, так и из биогенных источников. Фталаты биогенного генезиса отличаются более низким содержанием стабильного изотопа углерода ^{13}C в своем составе [24, 25], и отношение $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ($\Delta^{13}\text{C}$) таким образом позволяет выдвинуть предположение о доминировании природного или антропогенного источника. Для измерения отношения $\Delta^{13}\text{C}$ в составе фталатов предложен способ, включающий детектирование пиков фталатов методом масс-спектрометрии высокого разрешения после их концентрирования на колонке хроматографа и разделения в режиме ВЭЖХ-МС онлайн [26].

Применение метода масс-спектрометрии высокого разрешения с ионизацией электрораспылением характеризуется высокой селективностью и надежностью идентификации аналитических пиков. Отношение стабильных изотопов углерода $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ в составе фталатов оценивают по отношению площадей пиков моноизотопных молекулярных ионов $[\text{M}+\text{H}]^+$ и $[\text{M}+1+\text{H}]^+$, соответствующих содержанию стабильных изотопов углерода ^{12}C и ^{13}C соответственно (рис. 3). Метод ОФ ВЭЖХ онлайн устраняет неопределенность результа-

Таблица 4. Концентрации (мкг/л) ди-*n*-бутилфталата и ди(2-этилгексил)фталата в прибрежной зоне озера Байкал (верхний водный слой толщиной 5 м, мониторинг в 2018 г. Приведены результаты определения приоритетных фталатов в одних и тех же пробах на борту НИС и в лаборатории ЛИН СО РАН)

Район отбора проб	Сезон	ПФ	Методика	
			ОФ ВЭЖХ-УФ	ГХ-МС-МВИ ¹
Южный Байкал	Весна	ДнБФ	< 0.15–1.6	< 0.14–1.3
	Осень		0.24–1.0	0.15–0.8
	Весна	ДЭГФ	< 0.22–0.8	< 0.17–0.9
	Осень		< 0.22–0.52	< 0.17–0.8
Средний Байкал	Весна	ДнБФ	0.20–0.8	0.15–1.5
	Осень		0.15–0.5	< 0.14–0.4
	Весна	ДЭГФ	< 0.22–1.5	0.15–1.6
	Осень		0.22–1.6	< 0.14–2.2
Северный Байкал	Весна	ДнБФ	< 0.15–1.6	0.16–1.3
	Осень		0.23–1.0	0.15–0.8
	Весна	ДЭГФ	< 0.22–0.8	< 0.17–0.9
	Осень		< 0.22–0.6	0.20–1.1

¹Определение ПФ в лаборатории ЛИН СО РАН в рамках комплексного мониторинга СОЗ в байкальских водах. Методика включает отбор проб воды объемом 1 л, ЖЖЭ фталатов *n*-гексаном и прямой анализ экстрактов методом ГХ-МС [6].

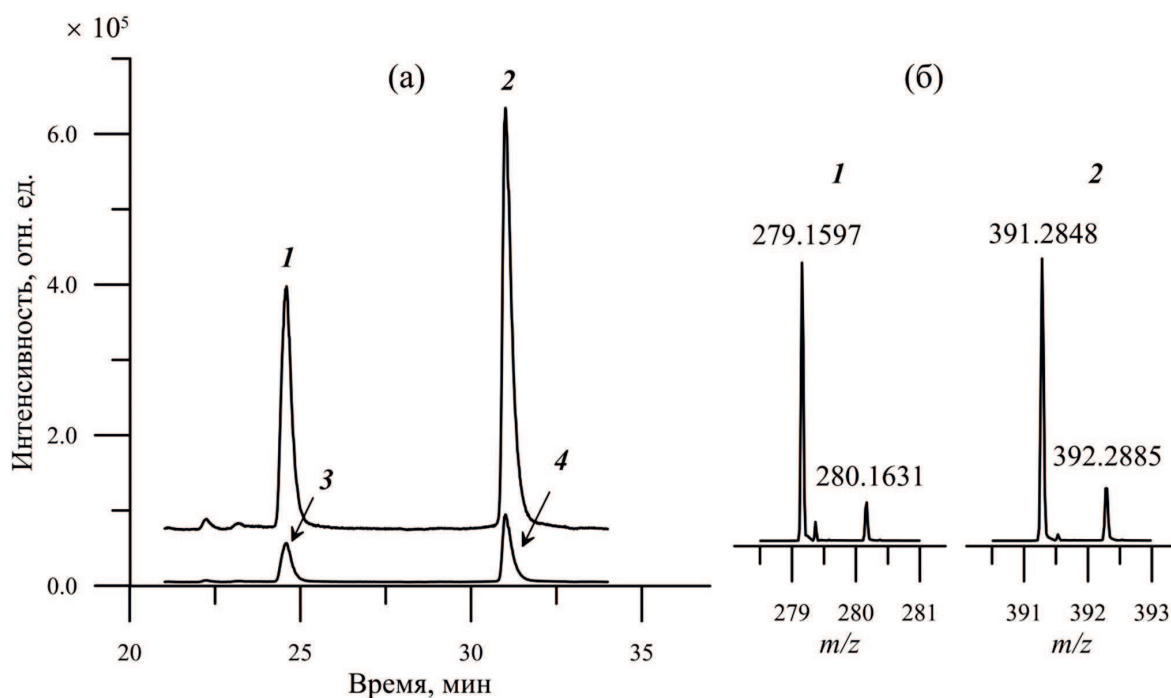


Рис. 3. (а) Хроматограммы по заданному ионному току, пики: 1 — ДнБФ- ^{12}C , 2 — ДЭГФ- ^{12}C , 3 — ДнБФ- ^{13}C , 4 — ДЭГФ- ^{13}C . Колонка 2×75 мм, Nucleosil 100-5-C18. Элюенты: А — 0.1%-ная муравьиная кислота в воде; В — 0.1%-ная муравьиная кислота в ацетонитриле, градиент элюента В от 30% до 100% за 20 мин, затем 100% в течение 15 мин, скорость потока 200 мкл/мин. Объем образца 10 мл, проба байкальской воды, собранной из-под льда, март 2023 г. (б) Масс-спектры: 1 — ДнБФ, 2 — ДЭГФ.

тов измерений величины $\Delta^{13}\text{C}$ и ее идентификации, поскольку вклад фталатов лабораторного фона на стадии подготовки проб (главным образом антропогенного генезиса) минимален. Пики фталатов из лабораторного фона, регистрируемые в холстых опытах, рассматривают в качестве систематической погрешности и вычитают из соответствующих пиков при обработке хроматограмм. Добавление муравьиной кислоты в элюенты для протонирования аналитов (регистрируются в форме $[\text{M}+\text{H}]^+$) не оказывает негативного влияния на форму пиков, однако незначительно снижает время их удерживания. Показано, что при концентрации фталатов в пробе воды в диапазоне от 0.2 до 2.0 мкг/л стандартное отклонение значений $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ не превышает ± 0.32 и $\pm 0.68\%$ для ДнБФ и ДЭГФ соответственно в одной серии экспериментов.

Значение $\Delta^{13}\text{C}$ рассчитывают относительно отношения $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ в коммерческих фталатах ДнБФ и ДЭГФ в качестве стандартов. Принимая во внимание природное содержание изотопа ^{13}C (1.09%) и расчетные отношения $^{13}\text{C}/^{12}\text{C} \sim 17$ и 26% для ДнБФ и ДЭГФ соответственно, измеренные средние значения отношений $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ в коммерческих стандартах ДнБФ и ДЭГФ характеризуются заниженными значениями $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$: 14.01 ± 0.47 и $21.33 \pm 0.55\%$. В результате значения $\Delta^{13}\text{C}$ не соответствуют величинам $\delta^{13}\text{C}$, которые могут быть рассчитаны с использованием международного стандарта изотопного состава

углерода (VPDB) и поэтому дают качественную оценку происхождения обнаруженных фталатов (биогенных/абиогенных).

Биогенные фталаты идентифицировали по величине $\Delta^{13}\text{C}$ на примере ДЭГФ, который отнесен к числу потенциальных канцерогенов [27] и в ряду ПФ отличается низким уровнем ПДК (8.0 мкг/л в питьевой воде). Для качественной оценки результатов измерения отношения изотопов углерода $\Delta^{13}\text{C}$ в структуре ДЭГФ установлены следующие пограничные значения:

- отношение изотопов $\Delta^{13}\text{C}$ в структуре ДЭГФ, обнаруженного в очищенных сточных водах, в свежеснежавшем снеге на городской территории, принято за условный антропогенный уровень и фталат с таким отношением отнесен к антропогенному фталату ($\Delta^{13}\text{C} = 5.7\%$);
- отношение изотопов $\Delta^{13}\text{C}$ ДЭГФ, обнаруженного в фитопланктоне, в клетках биомассы *Aconitum baicalense* [28], принято за условный биогенный уровень и фталат с таким отношением отнесен к биогенному фталату ($\Delta^{13}\text{C} = -50.16\%$);
- фталаты, для которых получены промежуточные значения $\Delta^{13}\text{C}$, идентифицированы как сумма фталатов, поступивших как из биогенных, так и абиогенных источников.

Измерение отношения $\Delta^{13}\text{C}$ в составе ДЭГФ подтверждает его биогенные и абиогенные источники в водной экосистеме озера Байкал. Например, в южной и северной котловинах озера ДЭГФ обнаружен на сопоставимом уровне концентраций

0.21 мкг/л, но отношение $\Delta^{13}\text{C}$ указывает на более существенный вклад биогенных источников в северной (–30‰) котловине по сравнению с южной (–15‰). В воде притоков южной котловины озера — р. Солзан и р. Снежная — концентрация ДЭГФ зафиксирована на уровне 0.25–0.34 мкг/л. Измерение изотопного состава показало наличие значимого вклада ДЭГФ в воды р. Солзан из биогенных источников ($\Delta^{13}\text{C} = -20\text{‰}$) и доминирование антропогенных источников ДЭГФ ($\Delta^{13}\text{C} = +5.6\text{‰}$) в р. Снежная. Экстремальные концентрации ДЭГФ (1.7–5.8 мкг/л, $\Delta^{13}\text{C} = -24\text{‰}$) в пробах, отобранных весной из-под льда, связаны, очевидно, с вкладом биогенных источников — цветением диатомовых водорослей в этот период года.

* * *

Таким образом, метод ОФ ВЭЖХ онлайн устраняет главную проблему, связанную с влиянием лабораторного фона на результат определения фталатов. Метод валидирован: для количественного определения ДнБФ и ДЭГФ — доминирующих фталатов в поверхностных водах — в диапазоне концентраций от 0.15 до 6.0 мкг/л с точностью ± 8 10–20%; для качественной оценки отношения стабильных изотопов углерода $\Delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ в составе ДнБФ и ДЭГФ при их концентрации в пробе ≥ 0.2 мкг/л с величиной s , равной 0.68%. Методика определения ПФ методом ОФ ВЭЖХ онлайн опробована в полевых условиях с применением портативного жидкостного хроматографа, оценены диапазоны концентраций ДнБФ (от < 0.15 до 1.6 мкг/л) и ДЭГФ (от < 0.22 до 1.6 мкг/л) в прибрежной зоне озера Байкал. Установлены пограничные значения отношения изотопов $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ для качественной оценки результатов измерения величины $\Delta^{13}\text{C}$ в структуре ДЭГФ и доказано его поступление в воды озера Байкал из биогенных и абиогенных источников. Метод ОФ ВЭЖХ онлайн открывает новые перспективы исследования СОЗ данного класса в природных объектах. В частности, в снежном покрове южного побережья Байкала обнаружен ДЭГФ в интервале концентрации от < 0.07 до 0.44 мкг/л, в дождевой воде, собранной на городской территории, — в интервале концентраций от 0.64 до 2.5 мкг/л.

Авторы благодарны с. н. с., к. х. н. Г. А. Федоровой за помощь и консультации в проведении ВЭЖХ анализа.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено в рамках госзадания Министерства науки и высшего образования РФ, проект № 0279–2021–0005 (№ гос.регистрации 121032300224–8) на оборудовании приборного центра коллективного пользования физико-химического ультрамикрoанализа Лимнологиче-

ского института СО РАН (ЦКП “Ультрамикрoанализ”).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Annual production of plastics worldwide. <https://www.statista.com/statistics/282732/global-production-of-plastics-since-1950> (21.10.2023).
2. Karim A.V., Krishnan S., Sethulekshmi S., Shriwastav A. Phthalate esters in the environment: An overview on the occurrence, toxicity, detection, and treatment options / New Trends in Emerging Environmental Contaminants / Eds. S.P. Singh, A.K. Agarwal, T. Gupta, S.M. Maliyekkal Singapore: Springer, 2022. P. 131. https://doi.org/10.1007/978-981-16-8367-1_7
3. Benjamin S., Pradeep S., Josh M.S., Kumar S. A monograph on the remediation of hazardous phthalates // J. Hazard. Mater. 2015. V. 298. P. 58. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.05.004>
4. Priority Pollutant List EPA USA. 2015. <http://www.epa.gov/sites/default/files/2015-09/documents/priority-pollutant-list-epa.pdf> (21.10.2023).
5. Mondal T., Mondal S., Ghosh S.-K., Pal P., Soren T., Pandey S., Maiti T.-K. Phthalates — A family of plasticizers, their health risks, phytotoxic effects, and microbial bioaugmentation approaches // Environ. Res. 2022. V. 214 (Pt 3). Article 114059. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114059>
6. Gorshkov A., Grigoryeva T., Bukin Y., Kuzmin A. Case study of diesters of *o*-phthalic acids in surface waters with background level of pollution // Toxics. 2023. V. 11. № 10. P. 869. <https://doi.org/10.3390/toxics11100869>
7. Net S., Delmont A., Sempere R., Paluselli A., Oudane B. Reliable quantification of phthalates in environmental matrices (air, water, sludge, sediment and soil): A review // Sci. Total Environ. 2015. V. 515–516. P. 162. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.02.013>
8. US EPA Method 8270D. Semivolatile organic compounds by gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS).
9. Методические указания 4.1. Методы контроля. Химические факторы. Хромато-масс-спектрометрическое определение фталатов и органических кислот в воде. МУК 4.1.738–99.
10. МВИ массовых концентраций фталатов в пробах питьевых, природных и сточных вод. Метод хромато-масс-спектрометрии. ЦВ 3.26.60–2005. ФР.1.31.2006.02150.

11. МВИ массовой концентрации эфиров фталевой кислоты в питьевых и природных водах методом хромато-масс-спектрометрии. МП УВК 1.89-2014. ФР.1.31.2015.20196.
12. *Andrade-Eiroa A., Canle M., Leroy-Cancellieri V., Cerdà V.* Solid phase extraction of organic compounds: a critical review. Part I // *Trends Anal. Chem.* 2016. V. 80. P. 641.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.08.015>
13. *Andrade-Eiroa A., Canle M., Leroy-Cancellieri V., Cerdà V.* Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review. Part II // *Trends Anal. Chem.* 2016. V. 80. P. 655.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.08.014>
14. *Зайцев В.Н., Зуй М.Ф.* Твердофазное микроэкстракционное концентрирование // *Журн. аналит. химии.* 2014. Т. 69. № 8. С. 1. (*Zaitsev V.N., Zui M.F.* Solid-phase microextraction concentration // *J. Anal. Chem.* 2014. V. 69. № 8. P. 715.)
<https://doi.org/10.1134/S1061934814080139>
15. *Крылов В.А., Крылов А.В., Мосягин П.В., Маткивская Ю.О.* Жидкофазное микроэкстракционное концентрирование примесей // *Журн. аналит. химии.* 2011. Т. 66. № 4. С. 341. (*Krylov V.A., Krylov A.V., Mosyagin P.V., Matkivskaya Yu.O.* Liquid-phase microextraction concentration of impurities // *J. Anal. Chem.* 2011. V. 66. № 4. P. 331.)
<https://doi.org/10.1134/S1061934811040101>
16. *Lee M.-R., Lai F.-Y., Dou J., Lin K.-L., Chung L.-W.* Determination of trace leaching phthalate esters in water and urine from plastic containers by solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry // *Anal. Lett.* 2011. V. 44. № 4. P. 676.
<https://doi.org/10.1080/00032711003783077>
17. *Крылов В.А., Волкова В.В.* Определение *o*-фталатов в воде с хромато-масс-спектрометрическим детектированием и концентрированием с ультразвуковым диспергированием экстрагента // *Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского.* 2014. № 1(1). С. 119.
18. *Зенкевич И.Г., Ротару К.И., Селиванов С.И., Костиков Р.Р.* Дискуссионные моменты определения диалкилфталатов в различных объектах // *Вестник СПбГУ.* 2015. Т. 2. № 60. С. 386.
19. *Prokupkova G., Holadova K., Poustka J., Hajšlova J.* Development of a solid-phase microextraction method for the determination of phthalic acid esters in water // *Anal. Chim. Acta.* 2002. V. 457. P. 211.
20. *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 // *Журн. аналит. химии.* 2000. Т. 55. № 8. С. 834. (*Baram G.I., Azarova I.N., Gorshkov A.G., Vereshchagin A.L., Lang B., Kiryukhina E.D.* Determination of bis-(2-ethylhexyl) phthalate in water by high-performance liquid chromatography with direct on-column pre-concentration // *J. Anal. Chem.* 2000. V. 55. № 8. P. 750.)
21. *Горшков А.Г., Маринайте И.И., Барам Г.И., Соков И.А.* Применение высокоэффективной жидкостной хроматографии на коротких колонках малого диаметра для определения приоритетных полициклических ароматических углеводородов в объектах окружающей среды // *Журн. аналит. химии.* 2003. Т. 58. № 8. С. 861. (*Gorshkov A.G., Marinaite I.I., Baram G.I., Sokov I.A.* Application of high-performance liquid chromatography on short small-diameter column to the determination of priority aromatic hydrocarbons in environmental samples preconcentration // *J. Anal. Chem.* 2003. V. 58. № 8. P. 768.)
22. Атлас "Байкал". Омск: Омская картографическая фабрика, 1993. С. 90.
23. *Горшков А.Г., Бабенко Т.А., Кустова О.В., Изосимова О.Н., Шишлянников С.М.* Приоритетные фталаты в пелагиали и прибрежной зоне озера Байкал // *Химия в интересах устойчивого развития.* 2017. Т. 25. № 4. С. 375.
<https://doi.org/10.15372/KhUR20170403>
24. *Fiedziukiewicz M., Hanley Q.* Compound specific isotope analysis (CSIA) of phthalates and non-targeted isotope analysis (NTIA) of SPE-extractable organic carbon in dilute aquatic environments // *Environ. Adv.* 2021. V. 4. Article 100050.
<https://doi.org/10.1016/j.envadv.2021.100050>
25. *Blessing M., Baran N.* A review on environmental isotope analysis of aquatic micropollutants: recent advances, pitfalls and perspectives // *Trends Anal. Chem.* 2022. V. 157. № 9. Article 116730.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116730>
26. *Kuzmin A., Grigorieva T., Gorshkov A.* Assessment of stable carbon isotopes $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio in phthalates from surface waters using HPLC-HRMS-TOF approach // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2023. V. 30. P. 87734.
<https://doi.org/10.1007/s11356-023-28494-w>
27. IARC. Agents Classified by the IARC Monographs. Geneva, Switzerland: IARC Monographs, 2011. V. 1–102.
28. *Еникеев А.Г., Семенов А.А., Пермяков А.В., Соколова Н.А., Гамбург К.З., Дударева Л.В.* Биосинтез диалкиловых эфиров орто-фталевой кислоты в растениях и в культурах клеток // *Прикладная биохимия и микробиология.* 2019. Т. 55. № 3. С. 282. (*Enikeev A.G., Semenov A.A., Permyakov A.V., Sokolova N.A., Gamburg K.Z., Dudareva L.V.* Biosynthesis of ortho-phthalic acid esters in plant and cell cultures // *Appl. Biochem. Microb.* 2019. V. 55. № 3. P. 294.)

VALIDATION OF THE HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD FOR THE DETERMINATION OF PHTHALATES IN WATER AT THE TRACE LEVEL ONLINE

T. A. Grigorieva^{a, *}, A. V. Kuzmin^a, A. G. Gorshkov^a

^a *Limnological Institute, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
3 Ulan-Batorskaya Str., 664033 Irkutsk, Russia*

^{*} *E-mail: krom_07@mail.ru*

Abstract. A method for determining phthalates in water has been validated, including sorption of hydrophobic components of the sample on a liquid chromatograph column and separation of concentrated analytes by reverse-phase HPLC online: for quantitative determination of priority phthalates (**PPs**) in surface waters at the trace level; qualitative assessment of the ratio of stable carbon isotopes $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ in PP composition. The absence of the contribution of PP from the laboratory background to the measurement results is shown. The limits of determination (0.15–0.22 µg/l) and the accuracy of determination ($\pm\delta = 10\text{--}20\%$) were established when using the method of reverse-phase HPLC online and UV detection of analytes. The boundary values of the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratio are substantiated for a qualitative assessment of the results of measuring the value of $\Delta^{13}\text{C}$ in the structure of di(2-ethylhexyl)phthalate and its entry into the waters of Lake Baikal from biogenic and abiogenic sources is detected. The method of determining PP by reverse-phase HPLC with UV detection online in the field on a portable liquid chromatograph was tested, the concentration ranges of di-n-butyl phthalate (from 0.15 to 1.6 µg/l) and di(2-ethylhexyl)phthalate (from 0.22 to 1.6 µg/l) in the coastal zone of Lake Baikal were estimated.

Keywords: priority phthalates, microextraction and HPLC online, UV detection, high-resolution mass spectrometry, Lake Baikal.