

УДК: 547.413.5:543.544:543.51

## ПЕРХЛОРИРОВАНИЕ – СКРИНИНГОВЫЙ МЕТОД ОБНАРУЖЕНИЯ ДИОКСИНОВ И РОДСТВЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ

Н.А.Клюев, Д.Б.Фешин, В.С.Сойфер

Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н.Северцова РАН  
117017, Москва, Ленинский пр., 33

Поступила в редакцию 2 февраля 2001 г.

На примере дибензо-*p*-диоксина (и его конгенеров) и дибензофурана проведено исследование реакции перхлорирования модифицированным реагентом ВМС с целью создания экспресс-методики обнаружения конгенеров упомянутой группы в реальных образцах. В найденных условиях проведено перхлорирование экстрактов образцов воды и воздуха. Показано, что в реальных матрицах можно обнаруживать диоксины в виде их октахлорпроизводных на уровне менее 1 нг в пробе при помощи метода ГЖХ с детектором электронного захвата.

**Клюев Николай Алексеевич** – заведующий лабораторией аналитической экотоксикологии Института проблем экологии и эволюции им. А.Н.Северцова Российской академии наук.

Область научных интересов: теоретическая органическая химия, молекулярная масс-спектрометрия, хромато-масс-спектрометрия, аналитические измерения в экологических исследованиях.

Автор более 450 публикаций в отечественных и международных изданиях и около 30 изобретений.

**Фешин Денис Борисович** – научный сотрудник лаборатории аналитической экотоксикологии Института проблем экологии и

евolution им. А.Н.Северцова Российской академии наук.

Область научных интересов: органический синтез, экотоксикология, проблемы анализа стойких органических загрязнителей.

Автор 3 научных статей и 4 тезисов докладов.

**Сойфер Владимир Соломонович** – главный химик лаборатории аналитической экотоксикологии Института проблем экологии и эволюции им. А.Н.Северцова Российской академии наук.

Область научных интересов: выделение, концентрирование и очистка биологически активных соединений.

Автор 35 научных статей и 20 тезисов докладов.

На современном уровне общественного сознания все явления в мире можно оценить с двух крайних позиций - их пользы для человечества в настоящем и будущем или их вреда. Общий подъем индустриализации, агрехимический прогресс в сельском хозяйстве суммарно приводят к общей "химизации" среды обитания и, как следствие, к повышению роли экологического контроля (ЭАК) при решении проблем взаимодействия живого организма с окружающим миром. В этом случае происходит непривычное расширение номенклатуры как объектов исследования, так и числа антропогенных

ксенобиотиков. Среди них следует выделить загрязнители, воздействующие на среду обитания на чрезвычайно низком уровне (нижний предел обнаружения -  $10^{-8}$  -  $10^{-11}$  %) [1]. Именно к таким техногенным ксенобиотикам относятся диоксины, получившие название суперэкотоксикантов (СЭТ) из-за ряда специфических признаков [2]. Под термином "диоксины" объединяется большая группа органических соединений, в которую входят сами полигалоидированные (полихлорированные) дибензо-*p*-диоксины (ПХДД), дибензофураны (ПХДФ) и планарные и полупланарные бифенилы (ПХБ).

Проблемы оценки содержания СЭТ в окружающей среде, прежде всего, связаны с достижением высокой чувствительности при аналитических измерениях. Эта причина стимулирует развитие самостоятельного направления в органической аналитической химии - анализа "ультраследовых" количеств органических соединений, которое имеет свою методологию, качественные отличия в процедуре выделения и концентрирования СЭТ из различных природных матриц, свои особые приемы в очистке, во введении внутренних стандартов, а также свой достаточно узкий арсенал методов детектирования.

В настоящий момент лишь хромато-массспектрометрия (ХМС) низкого и высокого разрешения [и частично газожидкостная хроматография (ГЖХ) с электронозахватным детектором] способна достоверно обнаружить названные ксенобиотики [3]. Такое положение в анализе суперэкотоксикантов не позволяет проводить широкомасштабное изучение загрязненных территорий даже на стадиях исследования экологического состояния района, не говоря уже о мониторинге, в задачу которого входит периодическая оценка существующего состояния природных объектов, прогноза развития их состояния в длительном интервале времени при существующей или изменяющейся технологической нагрузке. Аналитические измерения диоксинов в окружающей среде и биоте стоят достаточно дорого (от 800 до 2000\$ в зависимости от статуса зарубежной лаборатории и вида анализируемой природной матрицы), что ограничивает проведение широкомасштабных исследований и мониторинга. Возникает вопрос, как упростить, ускорить и удешевить процедуру анализа диоксинов? Одним из вариантов является **снижение количества анализируемых проб** без ухудшения информационных показателей о степени загрязненности конкретного района (территориальный уровень). Отобранная проба (природная матрица) в этом случае должна быть представительной (или интегральной). Такая матрица должна быть липофильной, т.к. именно в таких пробах накапливаются диоксины. Это известное явление, называемое биоаккумуляцией, специфичное для СЭТ, автоматически снижает весовое количество и объем анализируемой пробы и, как следствие, приводит к уменьшению количества расходных материалов при пробоподготовке. Значение ПДК для таких матриц (молоко, мясо, масло и т.д.) всегда ниже, чем для гидрофильных проб (вода, воздух, снег и т.д.). Например, печень рыбы играет роль интегральной матрицы и позволяет

достоверно судить о наличии диоксинов в воде и почвенных отложениях. По биологическим признакам для той же рыбы можно определить её возраст, акваторию существования и тем самым сделать "привязку" к конкретной местности. Аналогичным образом в качестве интегральной матрицы, показывающей степень загрязненности почвы, воды и растений в районе отбора пробы, можно рассматривать и коровье молоко.

Уменьшить количество проб для проведения аналитических измерений диоксинов можно путем проведения **предварительного скрининга**, который должен произвести сортировку проб, определив в них наличие или отсутствие диоксинов.

В этом случае упрощение анализа может быть связано с использованием методов биоиндикации и биотестирования [4], биохимического определения (иммунохимический анализ) [5] и химико-аналитических методов с использованием упрощенных методик, например возникновение устойчивых комплексов "диоксинов" с металлами [6] с последующим определением металла в составе комплекса различными методами (атомно-абсорбционная спектроскопия, атомно-эмиссионная спектроскопия с индуктивно-связанной плазмой).

Вряд ли можно существенно упростить анализ за счет самих аналитических измерений (методы ГЖХ и ХМС), поскольку они детально изучены и апробированы для указанных целей (методы EPA US № 613, 1613, 8280, 8290 и др., а также отечественные методики, внесенные в Госреестр методик КХА: ПНДФ 14.1:2:4.124-97; 13.3.9-97; 13.3.10-97; 16.1.7-97).

Официально признанных скрининговых методов детектирования два: иммунохимический (EPA Dioxin RIS'TEST - ENSYS INC. n70700(US) и реакция перхлорирования (EPA n 508.A (1989)). Последний метод разработан для анализа проб воды и воздуха на содержание ПХБ и связан с переводом всех изомеров в декахлорбифенил (ДХБ). В обоих случаях значительно упрощается и удешевляется способ детектирования. Попытки использовать этот метод для скрининга диоксинов предпринимались неоднократно (фирма "Экрос" С-Петербург, лаб. аналитической экотоксикологии ИПЭЭ им. А.Н. Северцова РАН, объект "Шиханы"), но до сих пор в РФ не существует аттестованных методик по перхлорированию [7 - 10]. Предлагаемые методики EPA-US трудоемки и по-прежнему дороги, к тому же скрининговый отбор проб решает в большей степени только вопрос

присутствия диоксинов, и повторный анализ по предложенной схеме все равно является необходимым дополнением. Поэтому целесообразно использовать двухстадийную схему анализа, когда на первой стадии применяется более дешевая и производительная скрининговая методика, позволяющая отсеивать пробы с низким содержанием диоксинов и отбирать пробы, в которых подозреваются высокие концентрации диоксинонподобных соединений для последующего анализа методами ХМС.

Существующие методы скрининг-контроля, такие как биотестирование, в том числе весьма чувствительный иммуноферментный метод, недостаточно селективны и специфичны. По времени и стоимости анализа ПХДД, ПХДФ и ПХБ они сравнимы с методом ХМС высокого разрешения. Метод перхлорирования, когда каждый класс детектируемых соединений - ПХДД, ПХДФ, ПХБ и др. - регистрируется в виде одного сигнала, фактически неотработан.

Такая методика неспецифична, т.е. она не позволяет отдельно детектировать наиболее токсичные конгнегеры диоксинов и родственных соединений, но она вполне пригодна для целей скрининга - отсеивания проб с малым содержанием диоксинов. Пробы, обнаружившиеся на стадии скрининга относительно высокое содержание диоксинов и родственных соединений, могут далее анализироваться традиционными методами.

### **Выбор перхлорирующего агента**

Поставленная задача подразумевает использование только прямого галогенирования незамещенного или малогалогенированного предшественника того или иного СЭТ, что моделировало бы нахождение ПХДД, ПХДФ и ПХБ в природных матрицах. Проблема состоит в том, что известные методы прямого галогенирования не дают высоких выходов полностью хлорированных производных диоксина и приводят к образованию труднопразделимой смеси различных не полностью хлорированных конгнегеров [7, 8]. Очевидно, что одной из причин получения такой смеси является сложность замещения последнего атома водорода в ароматическом цикле, в связи со стерическими факторами, связанными с размерами атома хлора [11]. В этом случае преодоление стерических препятствий происходит через деформацию молекулы с потерей планарной структуры и формированием энергетически более выгодной креслообразной формы [12, 13]. В структуре октахлордибензо-*p*-диоксина (ОХДД) наблюдаются отклонения от планарности, так пары ато-

мов хлора в положениях 1,4 и 2,3 оказываются по разные стороны плоскости углеродного скелета молекулы [14].

Однако нам представляется возможным получить перхлорированные соединения, т.к. в реальном процессе диоксины в матрице (почва, аэроль и т. д.) находятся на уровне нг/г - пг/г, а хлорирующий агент будет присутствовать в колоссальном избытке. Несмотря на большое количество литературы, посвященной методам введения атома галогена в ароматическое кольцо, избыточно галогенированные продукты не часто являются целевыми соединениями органического синтеза. Нами упоминалось об использовании  $SbCl_5$  в присутствии железного катализатора в качестве перхлорирующего агента, используемого для скрининга ПХБ (методика EPA 508a) и смеси  $AlCl_3; S_2Cl_2$  и  $SO_2Cl_2$  в соотношении 1:2:1000 [9] для перхлорирования диоксинов. Однако при применении  $SbCl_5$  необходимо соблюдать меры взрывобезопасности как на стадии проведения реакции (термостатирование при 270°C), так и на стадии разложения реакционной смеси. Использование методики [9] также связано с рядом неудобств, в частности, из-за применения криогенной техники (количественное и качественное определение продукта перхлорирования проводится при температуре жидкого азота).

Нами обнаружено, что только один реагент ВМС на основе хлористого сульфирила,  $AlCl_3$  и  $S_2Cl_2$ , позволяет целевым образом получать пергалогенированные ароматические соединения [15].

В начале 20-х годов XX века Osvald Silbergard, проводя исследования по поиску хлорирующих систем на основе хлористого сульфирила (с добавками  $I$ ,  $S$ ,  $S_2Cl_2$ ,  $AlCl_3$ ,  $FeCl_3$  и др.), впервые описал чрезвычайно мощный реагент, образующийся при смешивании  $AlCl_3$ ,  $SO_2Cl_2$  и  $S_2Cl_2$ , позволяющий селективно хлорировать ароматическое ядро [16, 17]. В этом случае, например, 70% выход гексахлорбензола достигался реакцией 0,8 моля (314 г) хлорирующего агента и 1 моля  $C_6H_2Cl_4$ . Сорока годами позже метод был усовершенствован [15], а сам реагент получил в название аббревиатуру ВМС, по заглавным буквам фамилий людей, исследовавших его, - Ballester, Molinet, Castaner [18, 19]. Этот реагент представляет собой смесь  $AlCl_3; S_2Cl_2$  в соотношении 1:2 в хлористом сульфириле в качестве растворителя. К сожалению, строение и настоящий состав комплексного катализатора ВМС неизвестен, так как исходные компоненты ( $AlCl_3$  и  $S_2Cl_2$ ) претерпевают глубокие изменения во время процесса приготовления [15].

В результате многочисленных исследований были разработаны и другие способы получения полихлорированных соединений [20], которые были использованы для синтеза 55 новых (до 1966 года) высокочлорированных соединений, включающих 4 перхлоркетона, 4 перхлоркислоты, 4 перхлорэфира, 31 хлороуглерод. Среди этих веществ - производные толуола, ксиола и *n*-ксиола [19], стирола, дифенилэтана, бифенила, антрацена, фенантрена, флюорена, бензола и бифениловых полимерных хлороуглеродов (см. обзоры [15, 21, 22]). Взаимодействием ВМС с трифенилметаном был получен (и исследованы его свойства) перхлортрифенилметиловый радикал [15, 23, 24], который является самым стабильным из всех известных на сегодняшний день.

Анализ литературных данных показывает, что существует три метода введения хлора в ароматическое (гетероароматическое) ядро:

1. Взаимодействие с хлором в присутствии кислот Льюиса ( $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{SbCl}_3$ ,  $\text{ZrCl}_4$  и т.д.) или протонных кислот, таких как ледяная уксусная или трифтормуксусная. Данная реакция протекает по электрофильтному механизму. Установлено, что степень хлорирования возрастает при использовании в качестве катализатора  $\text{AlCl}_3$  и при увеличении избытка  $\text{Cl}_2$  [25].

2. Использование хлористого сульфурила в качестве хлорирующего агента при повышенных температурах (70–90°C). Эта реакция протекает по электрофильтному механизму [18, 26].

3. Применение реагента ВМС – смеси  $\text{SO}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{AlCl}_3$  и  $\text{S}_2\text{Cl}_2$  (структура комплекса неизвестна) [15].

Во всех названных случаях перхлорирование субстрата достигало не более 90%. Из трех способов хлорирования, на наш взгляд, перспективным является использование реагента ВМС, дающего наиболее высокие выходы перхлорированных продуктов.

## Экспериментальная часть

### Приборы и материалы

В работе использовали газожидкостной хроматограф Hewlett-Packard модели A-5890, управляемый микропроцессором на базе компьютера HP серия 300, импульсный ЭЗД ( $^{63}\text{Ni}$ , ионизация  $\beta$ -частицами), газ – азот, объемная скорость подачи газа на детектор 25 мл/мин.

### Режим хроматографирования №1

Капиллярная колонка длиной 25 м, диаметр – 0,32 мм, нанесенная фаза – HP-5, толщина пленки 0,52 мкм, газ-носитель – азот, объемная скорость подачи газа – 2 мл/мин. Температурный режим колонки: 120°C – 1 минута (изотерма), на-

гревание со скоростью 20°C/мин до 220°C, нагревание со скоростью 5°C/мин до 280°C, задержка при 280°C в изотерме 18 мин. Температура инжектора 240°C, температура детектора 280°C.

### Режим хроматографирования №2

Капиллярная колонка длиной 5 м, диаметр – 0,32 мм, нанесенная фаза – HP-5, толщина пленки 0,52 мкм, газ-носитель – азот, объемная скорость подачи газа – 2 мл/мин. Температурный режим колонки: 120°C – 1 минута (изотерма), нагревание со скоростью 20°C/мин до 220°C, нагревание со скоростью 5°C/мин до 280°C, задержка при 280°C в изотерме 1 мин. Температура инжектора 240°C, температура детектора 280°C.

Хромато-масс-спектры регистрировались на приборе марки HP-5972-H (хроматограф HP-6840) с масс-спектрометрическим детектором типа "ионная ловушка" (Finnigan-MAT-ITD-700). В хроматографе стояла капиллярная колонка длиной 30 м, диаметром 0,25 мм, нанесенная фаза DB-5-MS, толщина пленки 0,25 мкм, газ-носитель – гелий, объемная скорость подачи газа – 1 мл/мин с постоянным регулированием, не зависящим от температуры. Ионизация электронным ударом 70 эВ, скорость сканирования – 1 масс-спектр в секунду, диапазон масс – 650 а.е.м., разрешающая способность – единичная. Условия хроматографического анализа реакционной смеси: 120°C – 1 минута (изотерма), нагревание со скоростью 20°C/мин до 220°C, нагревание со скоростью 5°C/мин до 280°C, задержка при 280°C в изотерме 10 мин, температура инжектора 240°C, температура соединительной линии (интерфейса) 240°C. Инжектирование проводилось в режиме "splitless" с задержкой продувки 0,5 мин.

Органические фракции после экстракций упаривали в пробирках с коническим дном на нагревательном столике Multi-Blok Heater Lab-Line с продувкой воздухом, а также в колбах на ротационном испарителе.

В работе использовались обычные имеющиеся в продаже реагенты марки х.ч. и ч.д.а.

### Очистка реагентов

Хлористый сульфур и очищали перегонкой ( $T_{\text{пп}} = 68 - 70^\circ\text{C}$ ). Моноглористую серу очищали перегонкой ( $T_{\text{пп}} = 138^\circ\text{C}$ ). Безводный хлорид алюминия очищали возгонкой и хранили в запаянных ампулах.

### Приготовление растворов

#### Приготовление исходного раствора дibenzo-*p*-диоксина (ДД)

В мерную колбу емкостью 50 мл добавляли 2,63 мг дibenzo-*p*-диоксина и растворяли в ука-

занном объеме  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  марки ос.ч., затем 0.47 мл приготовленного раствора помещали в другую мерную колбу объемом 50 мл и разбавляли  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  до метки. Получили раствор с концентрацией 500 нг/мл.

#### Приготовление калибровочных растворов декахлорбифенила (ДХБ)

Для получения раствора декахлорбифенила с концентрацией 1 мкг/мл 80 мкл стандартного раствора ДХБ в гексане концентрацией 50 мкг/мл переносили микрошприцем в отдельный флакон, отгоняли растворитель в вакууме и растворяли остаток в 4 мл  $\text{CCl}_4$  или толуола. Далее последовательным разбавлением получали растворы ДХБ в толуоле с концентрациями 500 нг/мл, 100 нг/мл, 10 нг/мл, 1 нг/мл.

#### Приготовление калибровочных растворов октахлордibenzo-*p*-диоксина (ОХДД) и октахлордibenзофурана (ОХДФ)

Для получения раствора октахлордibenzo-*p*-диоксина с концентрацией 1 мкг/мл 80 мкл стандартного раствора ОХДД в ацетоне концентрацией 50 мкг/мл переносили микрошприцем в отдельный флакон, отгоняли растворитель в вакууме и растворяли остаток в 4 мл толуола. Далее последовательным разбавлением были получены растворы ОХДД в толуоле с концентрациями 500 нг/мл, 100 нг/мл, 10 нг/мл, 1 нг/мл.

Аналогичным образом готовили исходный и калибровочные растворы ОХДФ.

**Определение линейной зависимости для ОХДД, ОХДФ и ДХБ в области концентраций 1 нг/мл - 1 мкг/мл в методе ГЖХ с ЭЗД**

Для построения калибровочного графика калибровочные растворы ОХДД, ОХДФ и ДХБ и хроматографировали в режиме №1. Объем вводимой в хроматограф аликвоты - 2 мкл. Результаты анализа представлены на рис. 1.

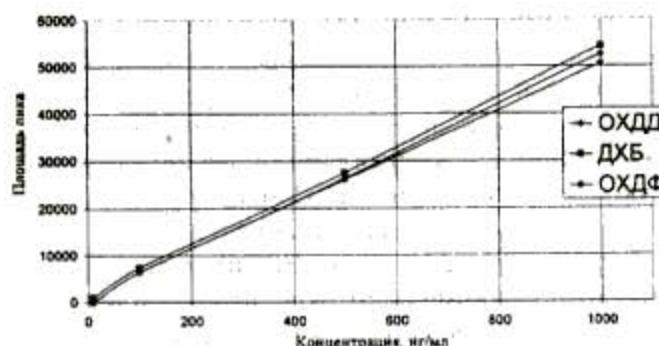


Рис. 1. График области линейной зависимости для ОХДД, ОХДФ и ДХБ

*Определение фактора отклика для ОХДД*

В отдельном флааконе смешивали 100 мкл раствора ДХБ и 100 мкл раствора ОХДД с концентрацией 1 мкг/мл. Получали раствор, содержащий ОХДД и ДХБ в соотношении 1:1. Для определения фактора отклика для ОХДД хроматографировали аликвоту полученного раствора объемом 2 мкл. Фактор отклика устанавливали по формуле:

$$\frac{S_2}{S_0} = K \cdot \frac{m_2}{m_0}$$

где  $S_0$  и  $S_2$  - площади пиков ОХДД и ДХБ, определяемые компьютерным интегрированием;  $K$  - фактор отклика;  $m_0$  и  $m_2$  - массы ОХДД и ДХБ. Величина  $K$  составила 0.35.

Выход ОХДД в реакциях определяли по следующей формуле:

$$\text{Выход (\%)} = \frac{S_{\text{пик}}}{S_{\text{стандарт}}} \cdot \frac{m^{\text{ДХБ}}}{m^{\text{ОХДД}}} \cdot K \cdot 100$$

Здесь  $S_{\text{пик}}$  и  $S_{\text{стандарт}}$  - определенные из хроматограмм машинным интегрированием площади пиков продукта и стандарта соответственно;  $m^{\text{ДХБ}}$  - известное количество добавленного стандарта;  $K$  - фактор отклика;  $m^{\text{ОХДД}}$  - теоретически рассчитанная по известному количеству исходного вещества масса продукта, соответствующая 100 % выходу.

#### *Препартивное перхлорирование диоксинов реагентом ВМС (методика №1)*

К кипящему раствору 25-30 мг  $\text{AlCl}_3$  в 7-8 мл  $\text{SO}_2\text{Cl}_2$ , помещенному в колбу, снабженную обратным холодильником и подогреваемую на масляной бане, из капельной воронки медленно (~20 мин) добавляли раствор субстрата в 2-3 мл  $\text{SO}_2\text{Cl}_2$  и 30 мкл  $\text{S}_2\text{Cl}_2$ . Затем убирали холодильник и упаривали раствор примерно до половины, после чего продолжали кипятить с обратным холодильником в течение 4-5 часов, время от времени добавляя свежий  $\text{SO}_2\text{Cl}_2$  для поддержания постоянного объема.

По истечении необходимого времени упаривали  $\text{SO}_2\text{Cl}_2$ , добавляли 15% раствор поташа до прекращения выделения газов. Содержимое колбы переносили в плоскодонную колбу (сама колба многократно промывалась с озвучиванием в ультразвуковой бане), добавляли органический растворитель (бензол или хлористый метилен) и воду, а затем "озвучивали" в ультразвуковой бане 10 минут. Органический слой отделяли от водного на делительной воронке и сушили над безводным сульфатом натрия. Экстракт пропускали через колонку, заполненную послойно (снизу вверх) 2 г  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 1 г  $\text{K}_2\text{SiO}_3$ , 2 г  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 3 г  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{SiO}_2$  40/60.

2 г  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 3 г  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{SiO}_2$ , 2 г  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 3 г  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{SiO}_2$ , 2 г  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . затем промывали колонку хлористым метиленом в объеме, равном трем объемам колонки. Органический слой пропускали через колонку с высокоактивным силикагелем (колонка промывалась тройным объемом растворителя) и упаривали. Часть сухого остатка растворяли в толуоле и исследовали на хромато-масс-спектрометре:

а) 100 мг дibenzo-*p*-диоксина хлорировали реагентом ВМС в течение 5 часов. Было получено 105 мг смеси ПХДД. Содержание ОХДД составило 88.4 %. Содержание производных дibenzo-*p*-диоксина с меньшей степенью хлорирования (от 4 до 7) составило 11.6 %;

б) 100 мг дibenzo-*p*-диоксина хлорировали реагентом ВМС в течение 4 часов. Получено 232 мг ОХДД (выход 93 %). Чистота полученного ОХДД составила более 99.5 %.  $T_{\text{нт}} = 332^\circ\text{C}$ . Данные ХМС-анализа: время удерживания - 29.50 мин, масс-спектр -  $M^+ M/Z=456$ ,  $(M+2)^+ M/Z=458$ .

#### Препартивное перхлорирование дibenзофурана

Перхлорирование дibenзофурана проводили по методике №1. 24.8 мг дibenзофурана хлорировали реагентом ВМС в течение 3.5 часов. Получено 62 мг октахлордibenзофурана (ОХДФ) (выход 94 %). Чистота полученного ОХДФ составила более 99.9 %.  $T_{\text{нт}} = 260^\circ\text{C}$ . Данные ХМС-анализа: время удерживания - 24.38 мин, масс-спектр -  $M^+ M/Z=440$ ,  $(M+2)^+ M/Z=442$ .

#### Приготовление реагента ВМС для экспериментов в ампулах

В мерную колбу с длинным узким горлом объемом 25 мл с кипящим  $\text{SO}_2\text{Cl}_2$  (около 2 мл) добавляли ~10 мг  $\text{AlCl}_3$ , а затем прикалывали ~10 мкл  $\text{S}_2\text{Cl}_2$ . Выпавшие из раствора игловидные кристаллы растворяли добавлением свежего  $\text{SO}_2\text{Cl}_2$  (3-5 мл). Полученный горячий раствор пипеткой переносили в ампулы с субстратом.

#### Эксперименты в ампулах (методика №2)

В ампулу объемом около 1 мл помещали 100 мкл раствора ДД в хлористом метилене концентрацией 500 нг/мл (50 нг вещества), отгоняли растворитель в вакууме, затем продували аргоном, после чего добавляли реагент ВМС объемом около 200 мкл. Ампулы запаивали и термостатировали.

После истечения времени реакции ампулы охлаждали, вскрывали, добавляли в каждую ампулу 50 или 100 мкл раствора внутреннего стандарта (раствор декахлорбифенила с концентра-

цией 1 мкг/мл) в  $\text{CCl}_4$  (50 или 100 нг), затем растворители отгоняли в вакууме, добавляли около 200 мкл 15 % водного раствора поташа, дважды экстрагировали бензолом по ~200 мкл. Органическую фракцию отбирали пипеткой, помещали в пробирку с коническим дном и упаривали досуха на нагревательном столике с продувкой воздухом, добавляли от 10 до 30 мкл толуола и хроматографировали в режиме № 2.

Идентификацию и количественное определение продукта ОХДД проводили по пику со временем удерживания 13.1 мин.

Результаты представлены в таблице.

Выходы ОХДД при перхлорировании дibenzo-*p*-диоксина реагентом ВМС в ампулах

T, °C	Время, час	Выход, %
70	2	0
70	4	0
60	20	11
110	22	4
150	24	8

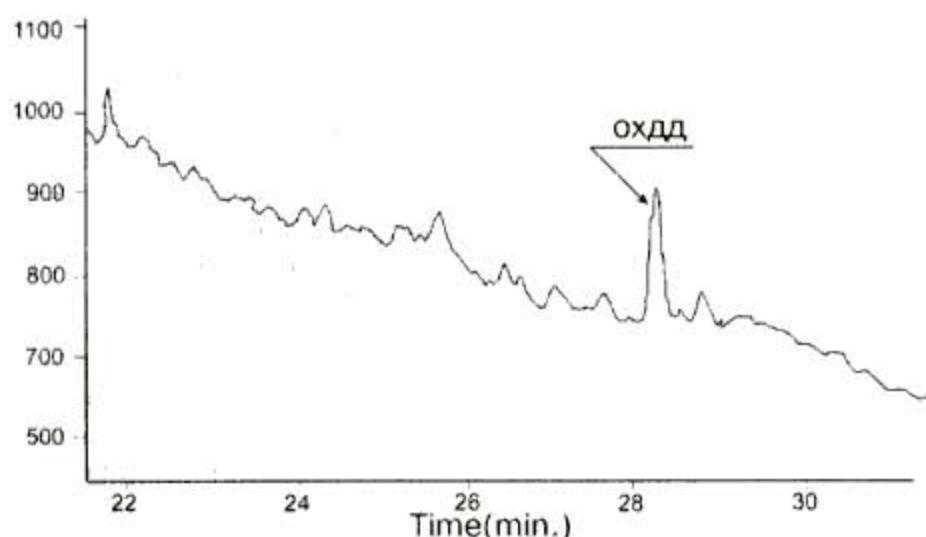
#### Проведение реакции перхлорирования с реагентом ВМС *in situ* (методика №3)

Надфиль (N.0 или N.1) обезжиривали органическим растворителем, сушили. Этим надфилем опиливали кусок дюралюминия (марки Д16 или Д18) для получения опилок. Опилки хранили в закрытом стеклянном сосуде. Затем раствор образца в 0.2-0.3 см<sup>3</sup> органического растворителя (хлористый метилен, толуол, ацетон) помещали во флакон с завинчивающейся крышкой с тефлонированной прокладкой вместимостью 1.5 см<sup>3</sup>. Раствор упаривали при температуре около 40°C в слабом токе азота. Затем во флакон помещали 30 мг дюралюминиевых опилок, 3-4 мг порошкообразной серы и 300 мкл хлористого сульфурила  $\text{SO}_2\text{Cl}_2$ . Флакон закрывали и помещали в термостат с температурой 70°C. Термостатировали 4 часа при 70°C, затем вынимали и охлаждали до комнатной температуры. Флакон с реакционной смесью открывали и переносили раствор во флакон с коническим дном с помощью пипетки с оттянутым носиком (пипетка Мора) так, чтобы весь катализатор остался в первом флаконе. Флакон с  $\text{SO}_2\text{Cl}_2$  помещали в вакуумный экскатор, на дно которого помещали щелочь (NaOH или KOH); экскатор присоединяли к водоструйному насосу и откачивали до полного испарения  $\text{SO}_2\text{Cl}_2$ , флакон вынимали, прибавляли 200-300 мкл толуола, обмывая стенки сосуда; раствор упаривали до 5-10 мкл в слабом токе азота.

**Перхлорирование незамещенного дibenзо-*p*-диоксина**

Перхлорирование проводили в соответствии с методикой №3. Для реакции брали 10 нг дibenзо-

п-диоксина. Продукт реакции растворяли в 20 мкл толуола и хроматографировали в режиме №1. Идентификацию ОХДД осуществляли по пику с временем выхода 28,1 мин. (см.рис.2).

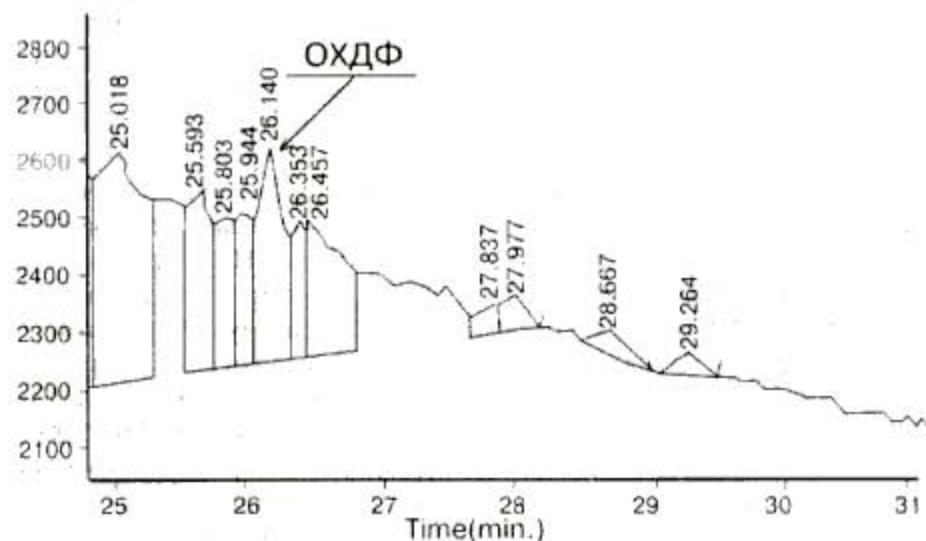


**Рис.2.** Фрагмент хроматограммы продуктов реакции перхлорирования дibenзо-*p*-диоксина реагентом ВМС по методике №3. По оси абсцисс отложено время выхода, по оси ординат - интенсивность сигнала с детектора электронного захвата

**Перхлорирование незамещенного дibenзофурана**

Перхлорирование проводили в соответствии с методикой №3 с 10 нг дibenзофурана. Продукт

реакции растворяли в 20 мкл толуола и хроматографировали в режиме №1. Идентификацию ОХДФ осуществляли по пику с временем выхода 26,1 мин. (см.рис.3).



**Рис.3.** Фрагмент хроматограммы продуктов реакции перхлорирования дibenзофурана реагентом ВМС по методике №3. По оси абсцисс отложено время выхода, по оси ординат - интенсивность сигнала с детектора электронного захвата

**Перхлорирование 1,2,3,4-тетрахлордibenzo-*p*-диоксина**

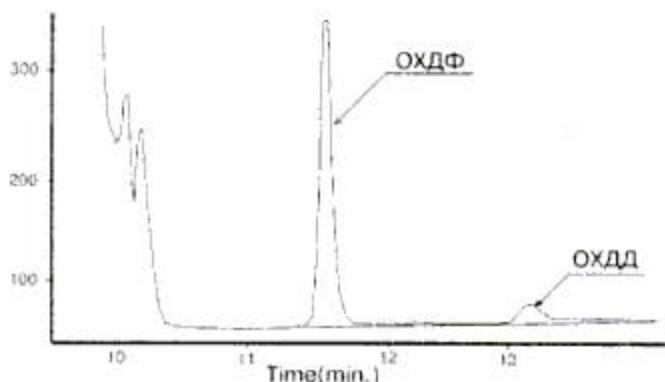
Перхлорирование 5 нг 1,2,3,4-тетрахлордibenzo-*p*-диоксина проводили в соответствии с методикой №3. Продукт реакции растворяли в 25 мкл толуола и хроматографировали в режиме №1. Идентификацию ОХДД осуществляли по пику с

временем выхода 28,1 мин.

**Перхлорирование экстрактов воды (три независимых образца)**

В соответствии с методикой №3 проводили перхлорирование экстракта, полученного из реальной пробы воды по стандартной сертифици-

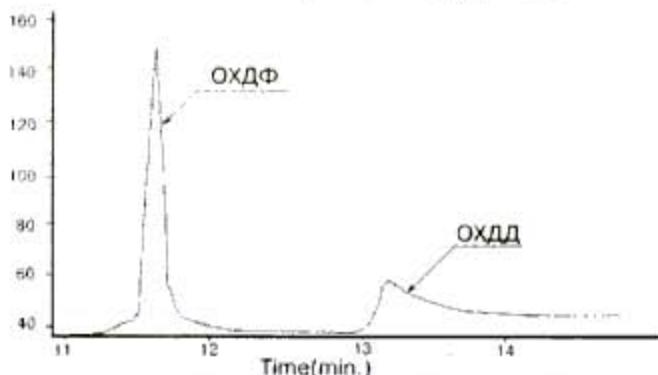
рованной методике. Анализ проб, проведенный перед перхлорированием методом МСВР на приборе "Вариан H-SQ-30", показал содержание 17 конгенеров ПХДД и ПХДФ в количестве 0.5 нг в пробе. Продукт реакции растворяли в 25 мкл толуола и хроматографировали в режиме №2. Результат представлен на рис.4. Стрелками отмечены пики, соответствующие ОХДД/ОХДФ.



**Рис.4.** Фрагмент хроматограммы продуктов реакции перхлорирования экстракта пробы воды реагентом ВМС по методике №3: по оси абсцисс отложено время выхода, по оси ординат - интенсивность сигнала с детектора электронного захвата

#### Перхлорирование экстрактов воздуха (три независимых пробы)

Перхлорированию в соответствии с методикой №3 подвергали экстракты газовых проб, полученных при горении пластмасс. Пылевая фракция, содержащая ОХДД и ОХДФ, была отделена перед экстракцией. Остальная часть фильтра обрабатывалась по стандартной сертифицированной методике (ПНДФ 13.3.10-97). Анализ методом МСВР показал содержание конгенеров ПХДД и ПХДФ (без ОХДД и ОХДФ) в количестве 0.5 нг на пробу. Продукт реакции растворяли в 25 мкл толуола и хроматографировали в режиме №2. Результат представлен на рис.5. Стрелками отмечены пики, соответствующие ОХДД/ОХДФ.



**Рис.5.** Фрагмент хроматограммы продуктов реакции перхлорирования экстрактов газовых проб реагентом ВМС по методике №3: по оси абсцисс отложено время выхода, по оси ординат - интенсивность сигнала с детектора электронного захвата

#### Обсуждение результатов

Сама по себе идея создания скрининговой методики подразумевает решение нескольких основных задач, направленных на сокращение времени между началом анализа и получением результата для конкретного образца. При проведении типичного анализа какого бы то ни было образца (вода, воздух, почва, биота и т.д.) необходимо пройти через стадии пробоотбора и пробоподготовки, прежде чем направить образец на анализ. При этом, в зависимости от типа образца, применяются различные методы пробоподготовки, различающиеся по трудоёмкости манипуляций. Сам же анализ подразумевает точное определение конгенерного состава образца, что достигается посредством использования ХМС с длинными колонками (30-40 м) для наиболее полного разделения компонентов. При этом само время анализа одного единственного образца может достигать часа. Прибавьте к этому время на пробоподготовку и получится, что затраты времени на получение результата могут составлять несколько суток.

Предлагаемая нами идея скрининговой методики определения СЭТдиоксиновой группы предполагает, во-первых, минимализацию пробоподготовки (или полный отказ от неё), во-вторых, химическое превращение ПХДД, ПХДФ и ПХБ в перхлорированные производные и их определение, в-третьих, минимализацию обработки реакционной смеси образец/хлорирующий агент перед проведением анализа (или полный отказ от неё). В итоге можно упростить методику анализа ПХДД, ПХДФ и ПХБ за счет проведения реакции перхлорирования непосредственно на природной матрице. Проводя стадию экстракции суперэкотоксикантов из анализируемой пробы (почва, вода, воздух, биота, пища и т.д.), возможно затем провести перхлорирование органической части до образования трех детектируемых компонентов - ОХДД, ОХДФ и ДХБ. Детектирование предлагается проводить методом ГЖХ с электроннозахватным детектором, измеряя названные выше компоненты смеси. В этом случае чувствительность метода полностью удовлетворяет требуемую степень обнаружения, а фон от мешающих компонентов других ксенобиотиков как бы исчезает из-за очень больших времен выхода с колонки определяемых ОХДД, ОХДФ и ДХБ. Поскольку зачастую содержание анализируемых соединений в образцах не превышает максимум десятков нанограмм, то использование значительного избытка хлорирующего агента способно, на наш взгляд, перевести их в перхлорпроиз-

водные, несмотря на присутствие большого количества балластных веществ.

Получаемый результат будет являться некой суммой вкладов от каждого конгенира. Точно так же, как при проведении типичного анализа результат представляется суммарно в единицах токсичности относительно 2,3,7,8-ТХДД. Проведённое в работе [27] рассмотрение статистики анализа проб различных образцов показывает, что качественный состав конгениров и их процентное соотношение в анализируемых образцах фактически постоянно. Поэтому мы полагаем, что возможно проведение достаточно надежной корреляции между результатом, полученным при проведении реакции перхлорирования, и реальным составом не измененного химически образца.

При обосновании выбора хлорирующего агента мы выделили в качестве наиболее перспективного реагент ВМС. В настоящее время известен только один случай применения реакции перхлорирования реагентом ВМС для гетероарильных соединений с простой эфирной связью, к каковым относятся ксенобиотики ПХДД и ПХДФ [9]. Однако нет никаких количественных данных о протекании этого процесса.

Нами использован реагент ВМС для хлорирования незамещенного дibenzo-p-диоксина и дibenзофурана, которые были выбраны в качестве модельных соединений. Хлорирование проводили с варьированием температуры (70 – 90°C) и соотношения  $\text{AlCl}_3$  и  $\text{S}_2\text{Cl}_2$  (от 1:2 до 2:1) (см. экспериментальную часть).

Проведенный ХМС-анализ выделенной смеси с использованием образцов известного состава показал, что основное соединение представляет собой октахлордibenzo-p-диоксин (ОХДД): время удерживания 29.219 мин, молекулярный ион -  $\text{M}^+$  ( $M/Z=456$ ), соотношение интенсивностей пиков ( $\text{M}+2$ )<sup>+</sup> и  $\text{M}^+$  - 2.53 (расчетное значение 2.6). Выход ОХДД составлял от 42 до 93 %, а чистота - от 92 до >99.5%. При анализе всегда наблюдалась в незначительных количествах промежуточные продукты с меньшей степенью хлорирования.

Было найдено, что процесс протекает с большими выходами при температуре кипения хлористого сульфурила (68 – 70°C) и при соотношениях  $\text{AlCl}_3$  и  $\text{S}_2\text{Cl}_2$  1:1 и 2:1. При проведении хлорирования при больших температурах и при соотношении  $\text{AlCl}_3$  и  $\text{S}_2\text{Cl}_2$  1:2 выход снижается.

Низкий выход (42 %) мы связали с гидролизом  $\text{AlCl}_3$  (наблюдалось выпадение осадка), потому что перед внесением в реакционную смесь он слишком долго (~10 мин) контактировал с воздухом.

хом после вскрытия запаянной ампулы. Во всех последующих экспериментах  $\text{AlCl}_3$  вносили в реакционную смесь сразу же после вскрытия ампулы. Проведенный с учетом влияния всех выше-перечисленных факторов эксперимент привел к получению ОХДД, выход и чистота которого составили 93 и 99.6 % соответственно.

Этот опыт перхлорирования был использован и для других гетероароматических трициклических соединений. Так, взаимодействие дibenзофурана с реагентом ВМС при 70°C приводит к образованию также практически одного соединения - октахлордibenзофурана (ОХДФ), который был выделен с выходом 94 %. ХМС-анализ реакционной смеси не показал наличия продуктов промежуточного хлорирования (моно-, ди-, три-, тетра- и др.), образуется только ОХДФ: время удерживания 24.38 мин, молекулярный ион -  $\text{M}^+$  ( $M/Z=440$ ), соотношение интенсивностей пиков ( $\text{M}+2$ )<sup>+</sup> и  $\text{M}^+$  равно - 2.5 (расчетное значение 2.6).

Таким образом, исследование реакции перхлорирования гетероароматических соединений реагентом ВМС показало принципиальную возможность использования данной реакции для перхлорирования производных дibenzo-p-диоксина и дibenзофурана, среди которых находятся наиболее опасные ксенобиотики.

На основе этой реакции возможна разработка методики качественного скрининга ксенобиотиков диоксинового ряда, однако необходимость обнаружения ультраследовых количеств (в лучшем случае нанограммы и десятки нанограмм) требовала проведения специального исследования протекания этой реакции на ультраследовом уровне. Поскольку в природных матрицах чаще всего приходится анализировать полихлорированные диоксины, дальнейшие эксперименты проводились с дibenzo-p-диоксином.

Эксперименты проводили в запаянных ампулах для предохранения от воздействия влаги воздуха и для удобства работы с ультраследовыми количествами СЭТ. Реагент ВМС готовился отдельно в колбе с длинным узким горлом и вносился в ампулу в свежем виде перед запаиванием. Аналитический контроль осуществляли методом ГЖХ с электронозахватным детектором по методу внутреннего стандарта. В качестве внутреннего стандарта был выбран декахлорбифенил.

Проведение хлорирования при 60-70°C показало, что реакция с ультрамалыми количествами субстрата отличается от препаративных и протекает с пониженным выходом – около 10 %. Варирование температуры до 150°C также не

привело к существенному увеличению выхода перхлорированного диоксина. В ампулах наблюдалось выпадение хлопьевидного осадка, свидетельствовавшего о гидролизе катализатора еще в процессе термостатирования, появление которого не зависело ни от тщательности приготовления хлорирующего агента, ни от сокращения времени между внесением реагента в ампулу и ее запаиванием, ни от дополнительного осушивания ампул в сушильном шкафу.

Очевидно, что при проведении экспериментов с ультраследовыми количествами диоксина высокая чувствительность реагента ВМС к влаге воздуха приводит к его гибели, и не спасает даже громадный избыток (более чем десятитысячекратный) реагента по отношению к дibenzo-p-диоксину.

В этой связи было предложено проводить реакцию с образованием реагента ВМС *in situ* в процессе самой реакции. С этой целью в реакционную смесь, содержащую ПХДД или ПХДФ вводят алюминиевый порошок. При нагревании с  $\text{SO}_2\text{Cl}_2$  на поверхности порошка образуется  $\text{AlCl}_3$  и сера или хлорид серы.

Серия опытов, проведенная в этих условиях, дала невысокие выходы (контроль осуществлялся методом ГЖХ с ЭЗД), однако результаты были чрезвычайно стабильны (выходы ОХДД и ОХДФ составляли порядка 40%).

Лучшие результаты по перхлорированию смесей, содержащих диоксины, были получены при замене чистого алюминия на дюралюминий (вероятнее всего, из-за меньшей коррозийной стойкости и больших скоростей реакции).

Реакцию перхлорирования с указанной выше смесью  $[\text{SO}_2\text{Cl}_2 + \text{Al}(\text{Si}, \text{Cu}, \text{Mn}, \text{Fe}) + \text{S}]$  проводили при температуре  $\sim 70^\circ \text{C}$  (около т. кип.  $\text{SO}_2\text{Cl}_2$ ). Наибольший выход продуктов перхлорирования наблюдался при проведении реакции в течение 4 часов. Дальнейшее нагревание с данной хлорирующей смесью приводило в разложению ОХДД и ОХДФ, которое осуществляется с разрывом эфирных связей в диоксиновом или дibenзофuranовом фрагменте молекулы. Полное разложение ОХДД и ОХДФ наблюдается при проведении реакции перхлорирования в вышеуказанных условиях в течение 7 часов.

Подбор условий реакции осуществлялся на примере незамещенного дibenzo-p-диоксина, дibenзофурана, тетрахлорзамещенных дibenzo-p-диоксинов и выделенных из реальных матриц (воздух, вода) очищенных экстрактов, содержащих ПХДД и ПХДФ. Выход продуктов перхлорирования в этих случаях достигал 70% и стабиль-

но воспроизводился от опыта к опыту.

По отработанной методике мы провели эксперименты по перхлорированию экстрактов воды и экстрактов воздуха. В частности, перхлорированию подвергались экстракты газовых проб, полученных при горении пластмасс, и экстракты, полученные из реальной пробы воды по стандартной сертифицированной методике. При этом мы показали, что использование этого метода позволяет обнаруживать ПХДД/ПХДФ в виде ОХДД/ОХДФ на уровне не менее 1 нг в пробе.

Для сокращения времени хроматографического анализа образца мы применили укороченную колонку – 5 метров (см. экспериментальную часть – режим хроматографирования №2). Это позволило сократить время анализа с 40 до 15 минут при сохранении качественной картины хроматограммы. При этом ГЖХ-анализу подвергались экстракты реакционных смесей без предварительной очистки.

К недостаткам разработанной нами методики следует отнести то, что при анализе неочищенных реакционных смесей достаточно быстро выходит из строя хроматографическая колонка. Также нами было отмечено падение чувствительности детектора, что, по-видимому, происходит из-за химического воздействия на элементы колонки и детектора не до конца нейтрализованных компонентов применяемого реагента. Это делает необходимым введение дополнительной стадии очистки экстрактов реакционных смесей.

### Выводы

1. В модельных экспериментах подобраны оптимальные условия проведения реакции перхлорирования с помощью реагента ВМС в модифицированных условиях на нанограммовых количествах ПХДД и ПХДФ.

2. Разработан модифицированный способ перхлорирования нативной ПХДД и ПХДФ, выделенной из реальных проб воды и воздуха.

3. Показано, что в реальных матрицах можно обнаруживать диоксины в виде их октахлорпроизводных (ОХДД и ОХДФ) на уровне менее 1 нг в пробе при помощи метода ГЖХ (с использованием укороченных колонок) с детектором электронного захвата.

4. На основании проведенных исследований и полученных результатов разработана методика обнаружения полихлорированных дibenzo-p-диоксинов и полихлорированных дibenзофуранов в пробах водных и воздушных сред методом ГЖХ с детектором электронного захвата.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Байерман К. Определение следовых количеств органических веществ. М.: Мир, 1987. 460 с.
2. Кунцевич А.Д. // Успехи химии. 1991. Т.60, №3. С.530-535.
3. Клюев Н.А. // ЖАХ. 1996. Т.5, № 2. С.163-172.
4. Biological mechanism of dioxin action / Ed. A. Poland, R.D. Kimbrough R.D. Intersc. 1984. P.500.
5. Dioxin risc. test. rapid detection kit user's Guide, ENSYS Immun. EPA/530-SW-87-025/.
6. Кунцевич А.Д., Кучинский Е.В., Поляков И.Т., Головков В.Ф., Оружинин А.А., Сюткин В.Н. // ДАН. 1994. Т.335, № 3. С.326-329.
7. Hummeli T. // Chemosphere. 1986. V.15, № 9/12. P.2003-2006.
8. Chatkittikunwong W., Creaser C. S. // Chemosphere. 1994. V.28, №1. P.11-21.
9. Пат. 2070319 РФ. Способ определения в пробе групповой концентрации дibenзо-п-диоксинов и групповой концентрации дibenзофуранов / А.А. Крашенинников, А.А.Строганов, О.В.Арапов, Е.В.Елисеенков. Опубл. 10.12.96. Бюл. №34.
10. Operative control of dioxin xenobiotics (perchlorination reaction) / V.S.Soyer, D.B.Feshin, N.A.Klyuev, E.Ya.Mir-Kadyrova, N.V. Mourenets // 17th International Symposium on Chlorinated Dioxins and Related compounds "Dioxin-98". Indianapolis. Indiana USA. 1997. V.31. P.1.
11. Gold V. Advances in Physical Organic Chemistry. Academic Press. 1963. P.233.
12. Brown H. C., Gintis D., Domash L.// J. Amer. Chem. Soc. 1956. V.78. P.5387.
13. Ballester M., Castaner J.// J. Amer. Chem. Soc. 1960. V.82. P.4259.
14. Newman M.A., North P.P., Boer F.P. // Acta Crystallogr. Sect. B. Struct. Crystallogr. 1972. V.28. P.2313.
15. Ballester M.// Bull. Soc.Chim. France. 1966. P.7-15.
16. Silberrad O. // J. Chem. Soc. 1921. V. 119. P. 2029-2036.
17. Silberrad O.//J.Chem. Soc. 1922. V.121. P.1015-1022.
18. Физер Л., Физер М. Реагенты для органического синтеза. М.: Наука, 1973.
19. Ballester M., Molinet C., Castaner J. // J. Amer. Chem. Soc. 1960. V.82. P.4254.
20. Ballester M., Rosa J. // Tetrahedron. 1960. V.9. P.156-162.
21. Ballester M. // AD 609569. Avail. CFSTI. 1964. P.33.
22. Ballester M. // U. S. Govt. Res. Develop. Rept. 1965. V.40, № 4. P. 14.
23. Ballester M., Riera // J. Amer. Chem. Soc. 1964. V.86. P.4505.
24. Ballester M., Riera J., Castaner J., Carreras C., Ubiera J., Badia C., Miavitless C., Molins E. // J. Org. Chem. 1989. V.54, № 19. P.4611-4615.
25. Марч Дж. Органическая химия. М.: Мир, 1987.
26. Cum G., de la Mare P. B. D. // J. Chem. Soc. 1967. P.1590.
27. Yufit S.S. On the mechanism of formation of PCDD/PCDFs in thermal sources. The role of electronic factors // 19<sup>th</sup> International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs "Dioxin-99". 1999. Venice. Italy. V.41. P.315.

\* \* \* \*