



УДК 543.544

## СОЧЕТАНИЕ МЕТОДА QuEChERS С ДИСПЕРСИОННОЙ ЖИДКОСТНО-ЖИДКОСТНОЙ МИКРОЭКСТРАКЦИЕЙ И ПОЛУЧЕНИЕМ ПРОИЗВОДНЫХ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ ДИЭТИЛСТИЛЬБЭСТРОЛА И БИСФЕНОЛА А В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ МЕТОДОМ ГАЗОЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ



В. Г. Амелин<sup>\*,\*\*</sup>, Д. С. Королев<sup>\*,\*\*</sup>, А. В. Третьяков<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Федеральный центр охраны здоровья животных, Владимир

<sup>\*\*</sup>Владимирский государственный университет им. А. Г. и Н. Г. Столетовых

E-mail: amelinvg@mail.ru

Разработана простая и экспрессная методика одновременного определения диэтилстильбэстрола (ДЭС) и бисфенола А (БФА) в консервированных продуктах (1–250 и 0,5–125 мкг/кг соответственно), питьевой воде, алкогольных и безалкогольных напитках (0,25–50 мкг/л и 0,1–25 мкг/л соответственно) методом газожидкостной хроматографии (ГХ) с детектором по захвату электронов. Диэтилстильбэстрол и бисфенол А из пищевых продуктов экстрагировали ацетонитрилом по методу QuEChERS. Дополнительную очистку экстракта, концентрирование и получение производных осуществляли дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракцией тетрачлорметаном. Продолжительность анализа составила 1–1,5 ч, относительное стандартное отклонение результатов анализа не превышает 0,1.

**Ключевые слова:** диэтилстильбэстрол, бисфенол А, газожидкостная хроматография, детектор по захвату электронов, трифтороацетатные производные, метод QuEChERS, дисперсионная жидкостно-жидкостная микроэкстракция.

V. G. Amelin, D. S. Korolev, A. V. Tretiyakov

### Combination of the QuEChERS with the Dispersive Liquid-liquid Microextraction and Derivatisation in the Determination Diethylstilbestrol and Bisphenol A in Products by Gas-liquid Chromatography

A simple and rapid procedure of simultaneous determination of diethylstilbestrol and bisphenol A in canned foods (1–250 and 0.5–125  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectively), drinking water, alcoholic and no alcoholic beverages (0.25–50  $\mu\text{g L}^{-1}$  and 0.1–25  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectively) by gas-liquid chromatography with a detector to capture electrons developed. Diethylstilbestrol and bisphenol A from food was extracted with acetonitrile by the method of QuEChERS. Further purification and concentration of the extract was carried dispersive liquid-liquid microextraction carbon tetrachloride. The duration of the analysis was 1–1.5 h, the relative standard deviation of the results of analysis does not exceed 0.1.

**Key words:** diethylstilbestrol, bisphenol A, gas-liquid chromatography, electron capture detection, trifluoroacetic derivatives, QuEChERS, dispersion liquid-liquid microextraction.

В настоящее время актуальна проблема загрязнения пищевых продуктов синтетическими

веществами, обладающими эстрогенным действием. В первую очередь это бисфенолы и нестероидные эстрогены – производные стильбена. Вопрос о мониторинге веществ, обладающих эстрогенным действием, особенно актуален ввиду того, что круг их применения на сегодняшний день необычайно широк (особенно это касается бисфенолов). Бисфенолы уже более 50 лет используют в производстве пластмасс для пищевой промышленности, либо они являются побочными продуктами при получении мономеров [1]. Бисфенол А является одним из ключевых мономеров в производстве эпоксидных смол и наиболее общей формой в поликарбонатном пластике. Из поликарбонатного пластика производится целый спектр продуктов, такие как: бутылки для воды и напитков, спортивный инвентарь, медицинские инструменты, зубные пломбы и герметики, линзы для очков, CD и DVD диски, а также бытовая техника. Эпоксидные смолы, содержащие БФА, используются в качестве покрытия на внутренней стороне почти всех банок для напитков и продуктов питания. Установлено, что БФА обладает свойствами эстрогенных гормонов и в малых дозах влияет на эндокринный статус человека [2]. Он опасен даже в очень маленьких количествах, установленное Европейской комиссией значение ограничения миграции в пищу – 0,6 мг/кг, ПДК для питьевой воды – 10 мкг/л.

В животноводстве в качестве анаболических препаратов часто применяются нестероидные эстрогены – производные стильбена (диэтилстильбэстрол, гексэстрол, диенэстрол), следовые количества которых могут быть обнаружены в продуктах животноводства. Использование анаболических стимуляторов в животноводстве обусловлено экономическими факторами, но главная



опасность заключается в риске воздействия на здоровье человека остаточных количеств этих веществ в животноводческой продукции. За последние 30 лет описано более 10000 случаев аномального полового развития у детей, вызванного присутствием в продовольствии остаточных количеств анаболических веществ [3]. Все препараты данного типа запрещены к использованию и не допускаются в продуктах животноводства.

Основным методом количественного определения ДЭС и БФА в пищевых продуктах является хромато-масс-спектрометрия [4, 5], что в большинстве случаев недоступно для рядовых лабораторий.

Для одновременного определения БФА и ДЭС чаще всего используют методы ВЭЖХ – МС/МС и ГХ – МС с дериватизацией определяемых веществ ангидридами органических кислот (ацилирование по гидроксильной группе с получением сложных эфиров, которые являются летучими, что делает возможным их определения методом газовой хроматографии). Основным методом пробоподготовки для этих методов является жидкостная экстракция с последующей очисткой экстракта твердофазной экстракцией на различных картриджах, либо колонках [4,5]. Данный процесс является достаточно длительным и трудоемким, а также требует большого расхода токсичных органических растворителей. В последнее время все чаще встречаются работы, посвященные дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции (ДЖЖМЭ), дешевому и простому методу пробоподготовки, который позволяет существенно снизить объемы растворителей, время и трудозатраты на анализ [6, 7]. Метод ГХ – МС ДЖЖМЭ позволяет также проводить дериватизацию одновременно с экстракцией [8], что максимально упрощает пробоподготовку и сводит время анализа к минимуму. Однако на сегодняшний день данный метод применим только для жидких проб, в основном для воды.

В связи с этим цель настоящей работы заключалась в упрощении и удешевлении методики одновременного определения БФА и ДЭС в различных продуктах питания методом газожидкостной хроматографии с детектором по захвату электронов, а также применении и расширении возможностей новых методов пробоподготовки для анализа данных соединений.

### Экспериментальная часть

**Аппаратура.** Использовали газовый хроматограф Clarus-600 с детектором по захвату электронов (ДЗЭ) (Perkin-Elmer, США). Раз-

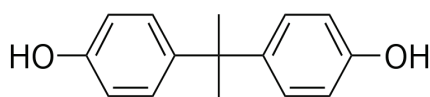
деление проводили на кварцевой капиллярной колонке ОПТИМА®-5-Accent (Macherey-Nagel, Германия) длиной 30 м и внутренним диаметром 0,25 мм (толщина пленки неподвижной фазы 0,25 мкм). Температура колонки 120–310 °С (скорость нагрева 15 град/мин), температура испарителя 240 °С, температура детектора 300 °С. Газ-носитель – азот, расход 2 мл/мин. В хроматограф вводили 1 мкл пробы без деления потока с использованием автоматического дозатора.

**Реактивы.** Использовали бисфенол А (Aldrich, США), диэтилстильбэстрол (Dr. Ehrenstorfer, Германия), ацетонитрил для хроматографии (Merck, Германия), бензол, дихлорметан, тетрахлорметан, сульфат магния х.ч., хлорид натрия х.ч., натрий лимоннокислый тризамещенный двойной гидрат х.ч., натрий лимоннокислый двузамещенный полуторный гидрат х.ч., сорбент Bondesil-PSA (Varian, США).

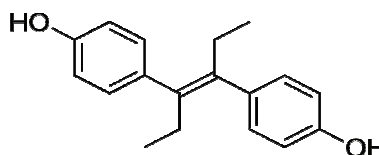
**Пробоподготовка.** Экстракцию БФА из твердых продуктов и очистку экстрактов осуществляли по методу QuEChERS [9]. В центрифужную пробирку вместимостью 50 мл вносили навеску измельченного и усредненного образца массой 10,0 г, добавляли 10,0 мл ацетонитрила, закрывали пробирку и энергично взбалтывали в течение одной минуты. Затем вносили смесь, состоящую из 4,0 г безводного сульфата магния, 1,0 г хлорида натрия, 1,0 г натрия лимоннокислого тризамещенного двойного гидрата и 0,5 г натрия лимоннокислого двузамещенного (полуторный гидрат). После внесения солей взбалтывали в течение одной минуты (во избежание образования комков) и центрифугировали в течение 5 мин при 3000 об/мин, отбирали 7,0 мл верхней части экстракта и переносили в центрифужную пробирку вместимостью 15 мл, которая содержала смесь сульфата магния (0,9 г) и сорбента Bondesil-PSA (0,15 г). Пробирку энергично встряхивали в течение 30 с и центрифугировали 5 мин при 3000 об/мин, при -18 °С. Отбирали 2,0 мл экстракта, добавляли к нему 200 мкл тетрахлорметана, 50 мкл ТФА, выдерживали 15 мин и затем впрыскивали с помощью шприца в 5 мл бидистиллированной воды, воздействовали ультразвуком в течение 4 мин, центрифугировали 7 мин при 3000 об/мин. Отделившийся нижний слой переносили в микрофлакон и упаривали досуха в токе азота. Полученный сухой остаток растворяли в 50 мкл бензола и хроматографировали.

### Результаты и их обсуждение

БФА и ДЭС имеют в своей структуре гидроксигруппы и легко ацилируются трифторуксусным ангидридом:



БФА



ДЭС

**Выбор оптимальных условий получения производных.** При выборе оптимальных условий получения производных учитывали объем добавляемого ТФА (25, 50, 100 мкл), температуру (20, 40, 60 °С) и продолжительность реакции (5, 10, 15, 20 мин). Выбор оптимальных условий проводили по наибольшей площади хроматографического пика целевых компонентов. В оптимальных условиях получение производных проводили

следующим образом: к 2 мл анализируемого ацетонитрильного раствора целевых компонентов добавляли 50 мкл ТФА при комнатной температуре. Через 15 мин добавляли 200 мкл тетрахлорметана и проводили микроэкстракцию.

Образующиеся трифторпроизводные летучи и детектируются ДЗЭ. Полученные производные достаточно хорошо разделяются на капиллярной колонке ОРТМА®-5-Accent (рис. 1).

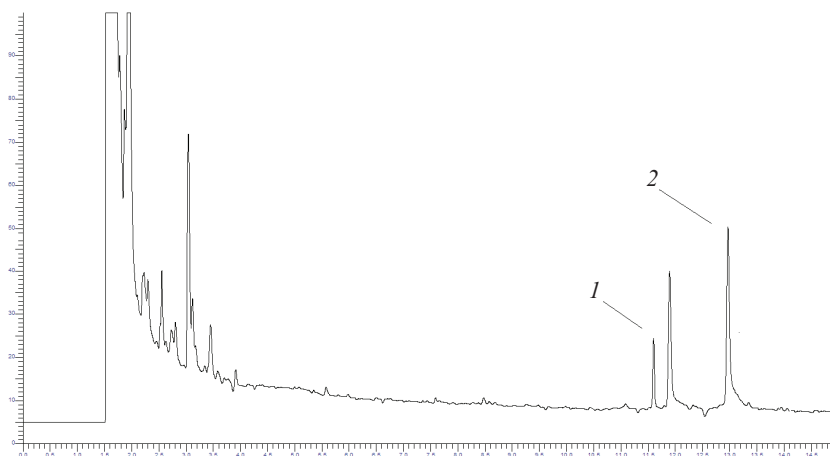


Рис. 1. Хроматограмма стандартного раствора производных БФА (1) и ДЭС (2) (5 мкг/мл)

**Оптимизация условий дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции.** *Выбор экстрагента.* В качестве экстрагента использовали бензол, трихлорметан, дихлорметан и тетрахлорметан (ТХМ), в которых растворимость изучаемых веществ выше, чем в ацетонитриле. Установлено, что наибольшие площади хроматографических пиков получены при использовании ТХМ.

*Объем экстрагента.* Объем вводимого ТХМ варьировали от 100 до 300 мкл. Микроэкстракцию проводили при постоянном объеме диспергатора (2 мл ацетонитрила). Исходя из полученных площадей пиков производных БФА и ДЭС установлено, что оптимальный объем экстрагента составляет 200 мкл.

*Объем диспергатора.* В данной работе ДЖЖМЭ сочетали с методом QuEChERS, поэтому в качестве диспергатора использовали только ацетонитрил. Необходимо было использовать как можно больший объем ацетонитрила, так как сте-

пень концентрирования аналита выше при большем объеме диспергатора. Объем диспергатора варьировали от 1 до 4 мл (на последней стадии пробоподготовки по методу QuEChERS можно отобрать только 4 мл ацетонитрильного экстракта). Установлено, что площади пиков возрастают с увеличением объема диспергатора до 3,5 мл, после этого экстрагент насыщается ацетонитрилом и уходит в верхнюю фазу, степень извлечения при этом резко падает. Оптимальным был выбран объем 2 мл, поскольку в этом случае наблюдается максимальная степень извлечения (около 100%). Важно также соотношение вносимого диспергатора в воду. Изучали следующие соотношения добавляемого диспергатора (ацетонитрила) к воде 2 : 5, 3 : 5, 4 : 5, 3 : 7 и 2 : 8. Установлено, что с увеличением объема воды при одинаковом объеме ацетонитрила (2 мл) площади хроматографических пиков аналитов уменьшаются, поэтому оптимальным вариантом является применение 5 мл воды и 2 мл ацетонитрила.



**Влияние ультразвука.** Обработка пробы ультразвуком способствует большему диспергированию экстрагента. На рис. 2 представлена зависимость площади хроматографических

пиков от продолжительности обработки ультразвуком. Как следует из рис. 2, оптимальным является обработка пробы ультразвуком в течение 4 мин.

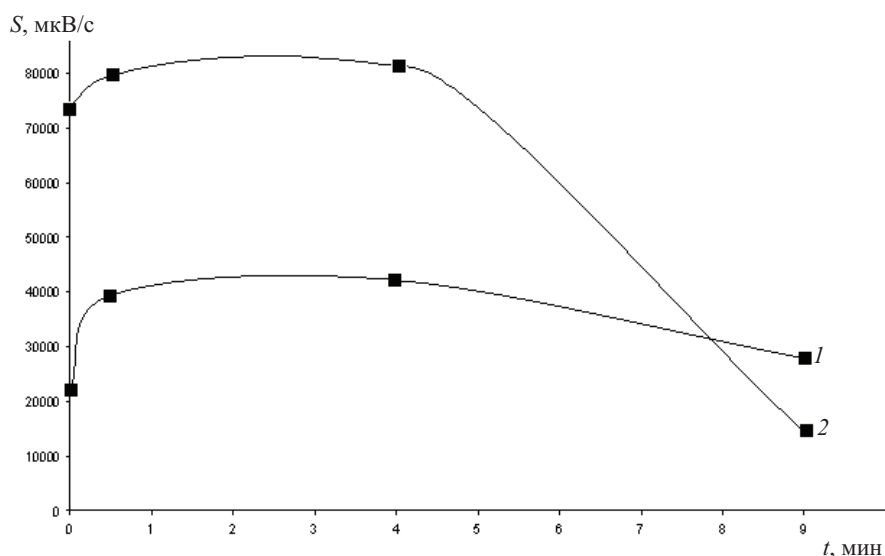


Рис. 2. Зависимость площадей пиков БФА (1) и ДЭС (2) от времени обработки ультразвуком

**Определение БФА и ДЭС в мясе и консервированных овощах.** Для извлечения БФА и ДЭС из анализируемых объектов и очистки экстрактов нами применен метод QuEChERS (сокращение от всех достоинств метода: Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe), который в настоящее время стандартизован для определения остаточных количеств пестицидов нормативным документом EN 15662-2007 [9]. Для извлечения органических веществ в данном методе используется ацетонитрил в присутствии высаливателей и буферизирующих смесей. Очистку экстракта от органических кислот, сахаров, липидов, жиров, белков проводят внесением сорбентов Bondesil-

PSA (смесь первичных и вторичных аминов) при анализе зерна и кормов или сорбентом  $C_{18}$  при анализе жиросодержащих продуктов.

Установлено, что степень извлечения добавок БФА и ДЭС из анализируемых объектов по данной методике составляет  $> 90\%$ . При выбранных оптимальных условиях диапазоны определяемых содержаний для анализируемых объектов с учетом коэффициента концентрирования равным 40 составили 1–250 и 0,5–125 мкг/кг для БФА и ДЭС соответственно. С использованием данной методики проанализированы консервированные овощи и мясо на содержание БФА. Результаты анализа представлены в таблице.

Результаты определения БФА в пищевых продуктах ( $n = 3, P = 0.95$ )

Продукт	Страна изготовитель	Срок хранения, мес.	Степень извлечения, %	Найдено мг/кг, мг/л	$s_r$
Зеленый горошек «Bonduelle»	Франция	3	90	$0,29 \pm 0,03$	0,08
Оливки	Испания	17	96	$0,040 \pm 0,006$	0,11
Кукуруза сладкая «GreenRay»	Сербия	20	92	–*	
Детское мясное пюре «Тёма»	Россия	7	99	–	
Персики	Греция	14	100	$0,11 \pm 0,01$	0,09
Оливки фаршированные креветками	Испания	14	94	–	
Красная фасоль с кукурузой	Венгрия	6 лет	97	$0,14 \pm 0,03$	0,09
Свинина тушеная	Россия	3	91	$0,012 \pm 0,002$	0,12
Зеленый горошек	Россия	4	92	$0,77 \pm 0,06$	0,06
Вода, выдержанная в поликарбонатной бутылочке для детей	Китай	2 недели	100	$0,0012 \pm 0,0002$	0,12



Окончание таблицы

Продукт	Страна изготовитель	Срок хранения, мес.	Степень извлечения, %	Найдено мг/кг, мг/л	$s_r$
Pepsi-cola	Россия	5	96	$0,0051 \pm 0,0006$	0,09
Coca-cola	Россия	5	97	$0,046 \pm 0,006$	0,10
Пиво «Балтика» №7 в банке	Россия	6	97	–	
Ярпиво «Янтарное»	Россия	3	97	$0,0011 \pm 0,0002$	0,11
Энергетический напиток «Red Devil»	Россия	4	100	$0,043 \pm 0,005$	0,08

Примечание. \* – не обнаружено.

На рис. 3 представлены хроматограммы экстрактов из некоторых анализируемых объектов без добавок и с добавками целевых соединений. Анализ проб мидий и говядины на

ДЭС дал отрицательный результат, хроматограммы экстрактов данных продуктов с добавкой и без добавки БФА и ДЭС представлены на рис. 4.

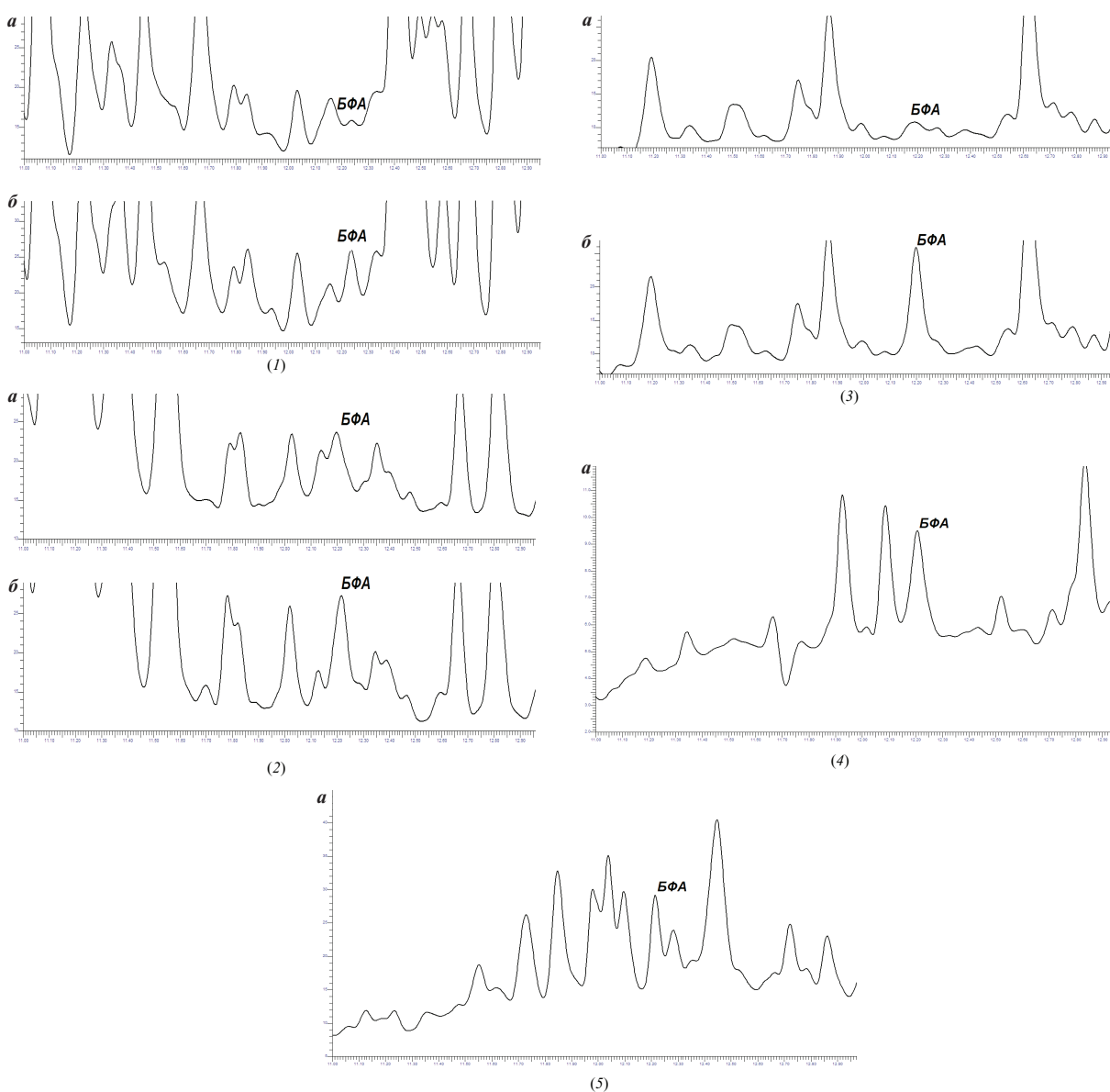


Рис. 3. Примеры хроматограмм производных БФА экстрактов из консервированного зеленого горошка (1); оливок (2); персиков (3); воды, настоянной в бутылке из поликарбоната (4); напитке пепси-кола (5) – без добавки (а) и с добавкой БФА(б)

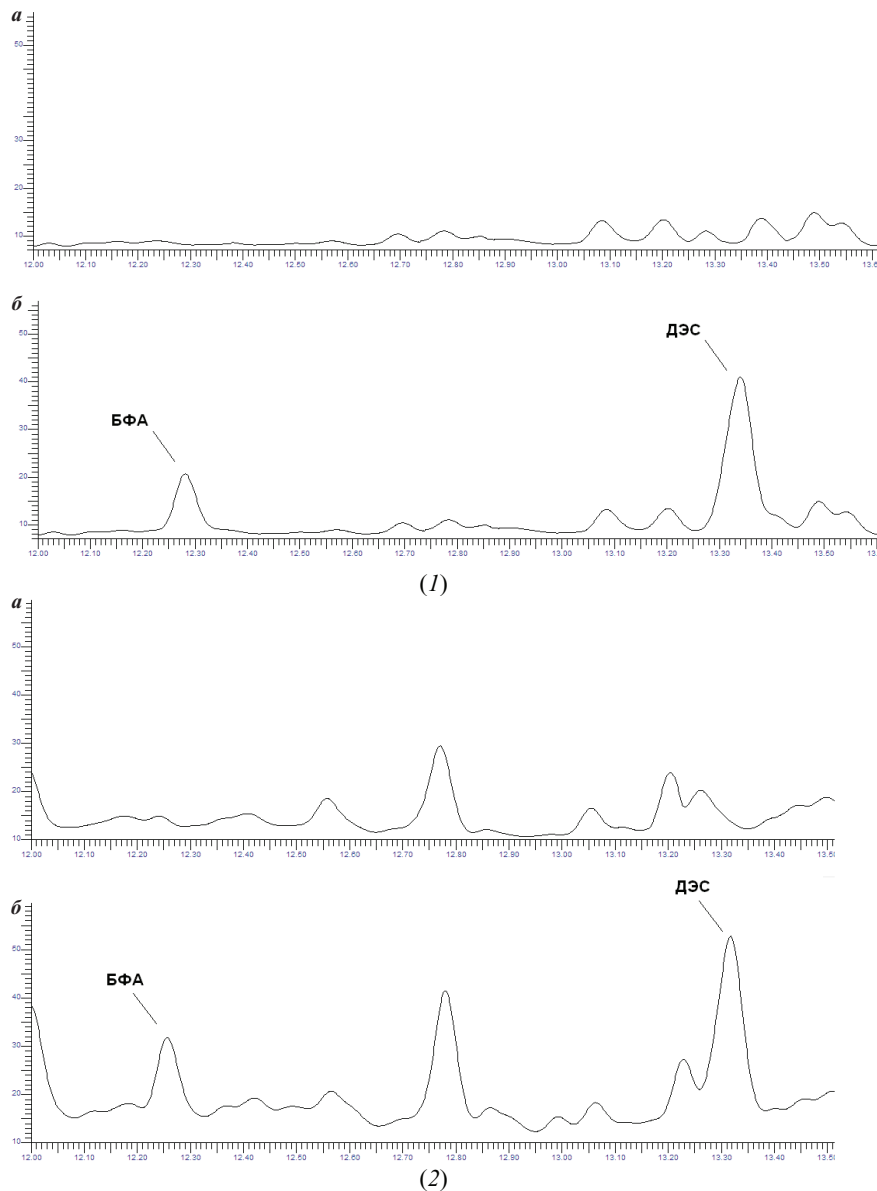


Рис. 4. Примеры хроматограмм производных экстрактов из говядины (1); мидий (2) – без добавки (а) и с добавкой БФА и ДЭС (б)

Трифторуксусный ангидрид является сильным ацилирующим агентом и взаимодействует со многими соединениями, поэтому на хроматограммах наблюдается большое количество пиков, однако пики БФА и ДЭС хорошо отделяются от пиков посторонних примесей, кроме того, использование ДЖЖМЭ для концентрирования обеспечивает дополнительную очистку экстрактов. Продолжительность анализа 0,5–1 ч, относительное стандартное отклонение результатов анализа не превышает 5%.

#### Список литературы

1. Верховская З. Н. Дифенилпропан. М.: Химия, 1971. 196 с.
2. Krishnan A. V., Stathis P., Permeth S. F. et al. // *Endocrinology*. 1993. Vol. 132. P. 2279.
3. Комаров А. А. Система обеспечения безопасности продукции животноводства при использовании анаболических стероидов, производных стильбена и  $\beta$ -адреностимуляторов: дис.... д-ра биол. наук. М., 2006. 452 с.
4. Rykowska I., Wasiak W. // *Acta Chromatogr.* 2006. № 16. P. 7.
5. Ballesteros-Gomez A., Rubio S., Perez-Bendito D. // *J. Chromatogr. A.* 2009. Vol. 12, № 16. P. 449.
6. Hadjmohammadi M. R., Ghoreishi S. S. // *Acta Chim. Slov.* 2011. Vol. 58. P. 765.
7. Cunha S.C., Almeida C., Mendes E., Fernandes J. O. // *Food Add. Contam.* 2011. Vol. 28, № 4. P. 513.
8. Wang X., Diao C.-P., Zhao R.-S. // *J. Sep. Sci.* 2009. Vol. 32, № 1. P. 154.
9. Anastassiades M., Stajnbaher D., Schenck F.J. // *J. AOAC Intern.* 2003. Vol. 86. P. 412.