

УДК 543.544

СОЧЕТАНИЕ ПРОБОПОДГОТОВКИ QuEChERS И ДИСПЕРСИОННОЙ ЖИДКОСТНО-ЖИДКОСТНОЙ МИКРОЭКСТРАКЦИИ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ ЭСТРОГЕННОГО ХАРАКТЕРА МЕТОДОМ ГАЗОЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Д.С. Королёв, В.Г. Амелин, А.В. Третьяков

(Федеральный центр охраны здоровья животных, Владимирский государственный университет им. А.Г. и Н.Г. Столетовых; e-mail: amelinvg@mail.ru)

Разработан экспрессный способ одновременного определения бисфенола А, диэтилстильбэстрола, гексэстрола и диенэстрола в консервированных пищевых продуктах, питьевой воде, алкогольных и безалкогольных напитках, в морепродуктах садкового разведения методом газожидкостной хроматографии с электроннозахватным и масс-спектрометрическим детекторами. Целевые соединения из пищевых продуктов экстрагировали ацетонитрилом по методу QuEChERS. Дополнительную очистку и концентрирование экстракта осуществляли дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракцией тетрахлорметаном. Перевод указанных соединений в летучие производные осуществляли трифторуксусным ангидридом. Диапазон определяемого содержания составил 0,5–100 мкг/кг. Идентификацию производных стильбена проводили по их масс-спектрам. Продолжительность анализа составляет 1,0–1,5 ч, относительное стандартное отклонение результатов анализа не превышает 0,1.

Ключевые слова: диэтилстильбэстрол, бисфенол А, гексэстрол, диенэстрол, пищевые продукты, газожидкостная хроматография, метод QuEChERS, дисперсионная жидкостно-жидкостная микроэкстракция.

В настоящее время очень актуальна проблема загрязнения пищевых продуктов синтетическими веществами, обладающими эстрогенным действием. К таким веществам относятся бисфенолы и нестероидные эстрогены, производные стильбена – диэтилстильбэстрол (ДЭС), гексэстрол (ГЭС) и диенэстрол (ДИЭС). Мониторинг веществ, обладающих эстрогенным действием, особенно важен потому, что круг их применения необычайно широк (особенно это касается бисфенолов). Бисфенолы уже более 50 лет используют при производстве пластмасс для пищевой промышленности, они также являются побочными продуктами при получении мономеров [1]. Установлено, что бисфенол А (БФА) обладает свойствами эстрогенных гормонов и влияет на эндокринный статус человека [2]. Он опасен даже в очень малом количестве. Европейской комиссией установлено значение ограничения миграции этого вещества в пищу (0,6 мг/кг), Предельно допустимая концентрация для питьевой воды составляет 10 мкг/л. В животноводстве в качестве анаболитических препаратов могут

применяться нестероидные эстрогены – производные стильбена (ДЭС, ГЭС, ДИЭС), следовые количества которых могут быть обнаружены в пищевых продуктах. Все препараты данного типа запрещены к использованию, их присутствие в продуктах животноводства даже в остаточном количестве не допускается [3].

Для одновременного определения подобных загрязнителей чаще всего используют методы ВЭЖХ–МС/МС и ГХ–МС с дериватизацией определяемых веществ ангидридами органических кислот. В качестве основного метода пробоподготовки применяют жидкостную экстракцию с последующей очисткой экстракта твердофазной экстракцией на картриджах или 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). Это дешевый и простой метод пробоподготовки, позволяющий су-

щественно снизить объемы растворителей, время и трудозатраты на анализ [6–8]. Однако ДЖЖМЭ применяют в основном для анализа жидких проб.

В данной работе показана возможность сочетания ускоренной, безопасной и упрощенной пробоподготовки QuEChERS с ДЖЖМЭ при определении загрязнителей эстрогенного характера в пищевых продуктах методами газожидкостной хроматографии.

Экспериментальная часть

Аппаратура

Использовали газовый хроматограф «Clarus-600» с детектором по захвату электронов (ДЗЭ) («Perkin-Elmer», США). Разделение проводили на кварцевой капиллярной колонке «Optima[®]-5-Accent» («Merck», Германия) длиной 30 м и внутренним диаметром 0,32 мм (толщина пленки неподвижной фазы 0,25 мкм). Температура колонки 120–310°C (скорость нагрева 15 град/мин), температура испарителя 240°C, температура детектора 300°C. Газ-носитель – азот, расход 2 мл/мин. В хроматограф вводили 1 мкл пробы без деления потока с использованием автоматического дозатора.

Использовали газовый хроматограф «Clarus-680» с масс-спектрометрическим детектором («Perkin-Elmer», США). Разделение проводили на колонке «RTX[®]-5MS» («RESTEK», США) длиной 30 м, внутренним диаметром 0,25 мм (толщина неподвижной фазы 0,25 мкм). Температура колонки 40°C в течение одной минуты, затем 40–310°C (скорость нагрева 15 град/мин), температура испарителя 250°C. Измерения проводили в режиме положительной ионизации, температура источника 250°C. Газ-носитель – гелий, давление на входе 0,1 МПа, скорость потока 1 мл/мин. В хроматограф вводили 1 мкл пробы без деления потока с использованием автоматического дозатора. Масс-спектры регистрировали при ионизации электронным ударом с энергией 70 эВ, скорость сканирования 0,09 с, диапазон сканирования 40–450 а.е.м.

Реактивы

Использовали бисфенол А («Aldrich», США), диэтилстильбэстрол, гексэстрол, диенэстрол («Dr. Ehrenstorfer GmbH», Германия), ацетонитрил для хроматографии («Merck», Германия), толуол, триэтиламин (ТЭА), дихлорметан, сульфат магния «х.ч.», хлорид натрия «х.ч.», натрий лимоннокислый трехзамещенный двойной гидрат «х.ч.», натрий лимоннокислый двухзамещенный полуторный гидрат «х.ч.», сорбенты Bondesil-PSA («Varian», США),

С18 («Supelco», США). Растворы БФА, ДЭС, ГЭС, ДИЭС 1 мг/мл готовили растворением соответствующих навесок в толуоле. При построении градуировочного графика использовали рабочие растворы с концентрацией 1 мкг/мл: в микрофлакон помещали 50 мкл рабочего раствора, выпаривали досуха, сухой остаток растворяли в 500 мкл смеси толуола, ТФА и 10%-го толуольного раствора ТЭА (70:10:1), плотно закрывали и оставляли в сушильном шкафу на 15 мин при 60°C. Из полученного раствора с концентрацией трифторацильных производных 10 мкг/мл готовили растворы с концентрацией 0,005–5 мкг/мл путем последовательного разбавления толуолом.

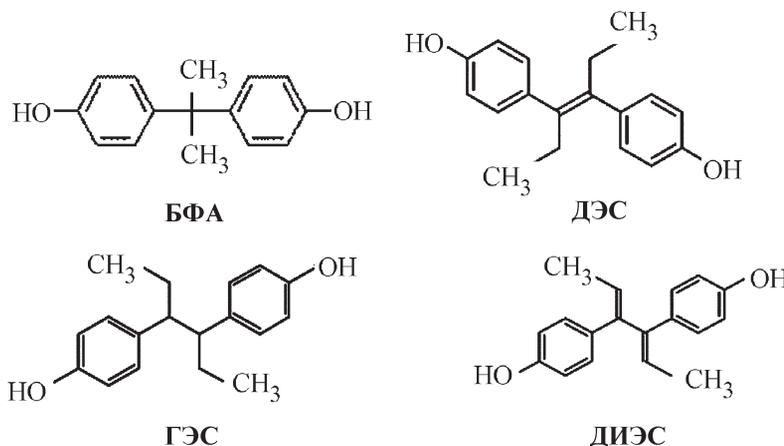
Пробоподготовка

Экстракцию аналитов из твердых продуктов и очистку экстрактов осуществляли по методу QuEChERS [9]. В центрифужную пробирку емкостью 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 трехзамещенного двойного гидрата и 0,5 г натрия лимоннокислого двухзамещенного (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 емкостью 15 мл, которая содержала смесь сульфата магния (0,9 г), сорбентов Bondesil-PSA (0,15 г) и С18 (0,15 г). Пробирку энергично встряхивали в течение 30 с и центрифугировали в течение 5 мин при 3000 об/мин. Отбирали 2,0 мл экстракта, добавляли к нему 200 мкл тетрахлорметана и впрыскивали полученную смесь с помощью шприца в 5 мл бидистиллированной воды, затем воздействовали ультразвуком в течение 4 мин и центрифугировали 7 мин при 3000 об/мин. Нижний слой экстракта переносили в микрофлакон и упаривали досуха в токе азота. Полученный сухой остаток растворяли в 50 мкл толуола, содержащего ТФА и ТЭА (70:10:1), выдерживали в течение 15 мин при 60°C, затем охлаждали и хроматографировали.

Результаты и их обсуждение

БФА и ДЭС, ГЭС, ДИЭС имеют в своей структуре гидроксигруппы и легко ацилируются трифторуксусным ангидридом (схема).

С х е м а



Выбор оптимальных условий получения производных

При выборе оптимальных условий получения производных учитывали объем добавляемого ТФА (25, 50, 100 мкл), температуру (20, 40, 60°C), количество внесенного ТЭА и продолжительность реакции (5, 10, 15, 20 мин). Выбор оптимальных условий проводили по наибольшей площади хроматографического пика целевых компонентов. Оптимальный объем ТФА, введенный в 300 мкл раствора определяемых соединений, составил 50 мкл, а температура – 60°C. Один из наиболее важных параметров, влияющих

на величину площади пиков, – количество введенного катализатора ТЭА. Установлено, что оптимальное количество введенного ТЭА составляет 50 мкл (объем стандартного раствора, содержащего 50 мкл ТФА, составляет 350 мкл), что соответствует смеси толуол:ТФА:ТЭА = 70:10:1.

Трифторацильные производные летучи, что позволяет проводить их анализ методом газожидкостной хроматографии. Предлагаемый метод не позволяет разделить производные стибена (ДЭС, ГЭС, ДИЭС), и они выходят двумя пиками на хроматограмме (рис. 1). Поэтому для идентификации и определения данных соединений использовали метод ГХ–МС.

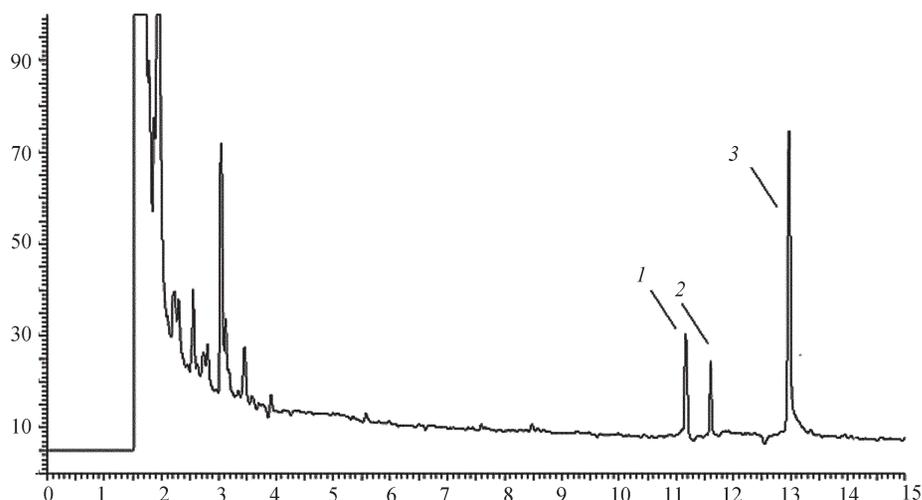


Рис. 1. Хроматограмма (ГХ–ДЭС) стандартного раствора (5 мкг/мл) трифторацильных производных БФА (1), ДЭС, ГЭС и ДИЭС (2, 3)

Идентификация синтетических эстрогенов (производных стибена) методом ГХ–МС

Возможность одновременного определения данных соединений была проверена на растворах трифтороацильных производных бисфенола А, диэтилстильбэстрола, гексэстрола и диенэстрола в толуоле, полученных описанным выше способом. Производные стибена на хроматограммах дают по два пика и практически не разделяются (рис. 2), поэтому их идентификацию проводили по масс-спектрам, соответствующим времени выхода данных соединений. Массы ионов в обоих пиках одного компонента совпадают (табл. 1), что связано, вероятно, с получением изомеров производных. Бисфенол А также имеет на хроматограмме два пика, причем их масс-спектры идентичны (рис. 3).

Как следует из табл. 1 (курсивом выделены характеристические ионы), возможны идентификация и определение ДЭС, ГЭС и ДИЭС при совместном присутствии в анализируемом объекте методом ГХ–МС по массе и интенсивности линий в масс-спектрах. Масс-спектр данных соединений при совместном присутствии и времени выхода на хроматограмме по общему ионному току при 14,11 мин показан на рис. 4.

Оптимизация условий дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции

Выбор оптимальных условий ДЖЖМЭ проводили по наибольшим площадям пиков, полученных методом ГХ–ДЭС.

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 величин 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 степень концентрирования аналита выше при большем объеме диспергатора. Объем диспергатора варьировали от 1 до 4 мл (на по-

следней 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 выделяется в верхнюю фазу, степень извлечения при этом резко падает. Оптимальным был выбран объем 2 мл, поскольку в этом случае наблюдается максимальная степень извлечения аналитов (> 90%). 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. Наибольшая степень извлечения была достигнута при нахождении эмульсии в ультразвуковой бане не менее четырех минут.

Определение БФА и ДЭС в пищевых продуктах

Для извлечения БФА и ДЭС из анализируемых объектов и очистки экстрактов впервые применен метод QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe – быстрый, легкий, дешевый, эффективный, надежный и безопасный), который в настоящее время стандартизован для определения остаточных количеств пестицидов в овощах и фруктах 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 кормов или C_{18} при анализе жиродержащих продуктов.

Установлено, что степень извлечения добавок определяемых компонентов из анализируемых объектов по данной методике составляет >90% (табл. 2). При выбранных оптимальных условиях, диапазон определяемого содержания для аналитов с учетом коэффициента концентрирования (40) составил 0,5–100 мкг/кг. С использованием данной методики проанализированы консервированные овощи и мясо на содержание БФА (табл. 2), мидии, креветки, говядина и семга на содержание синтетических

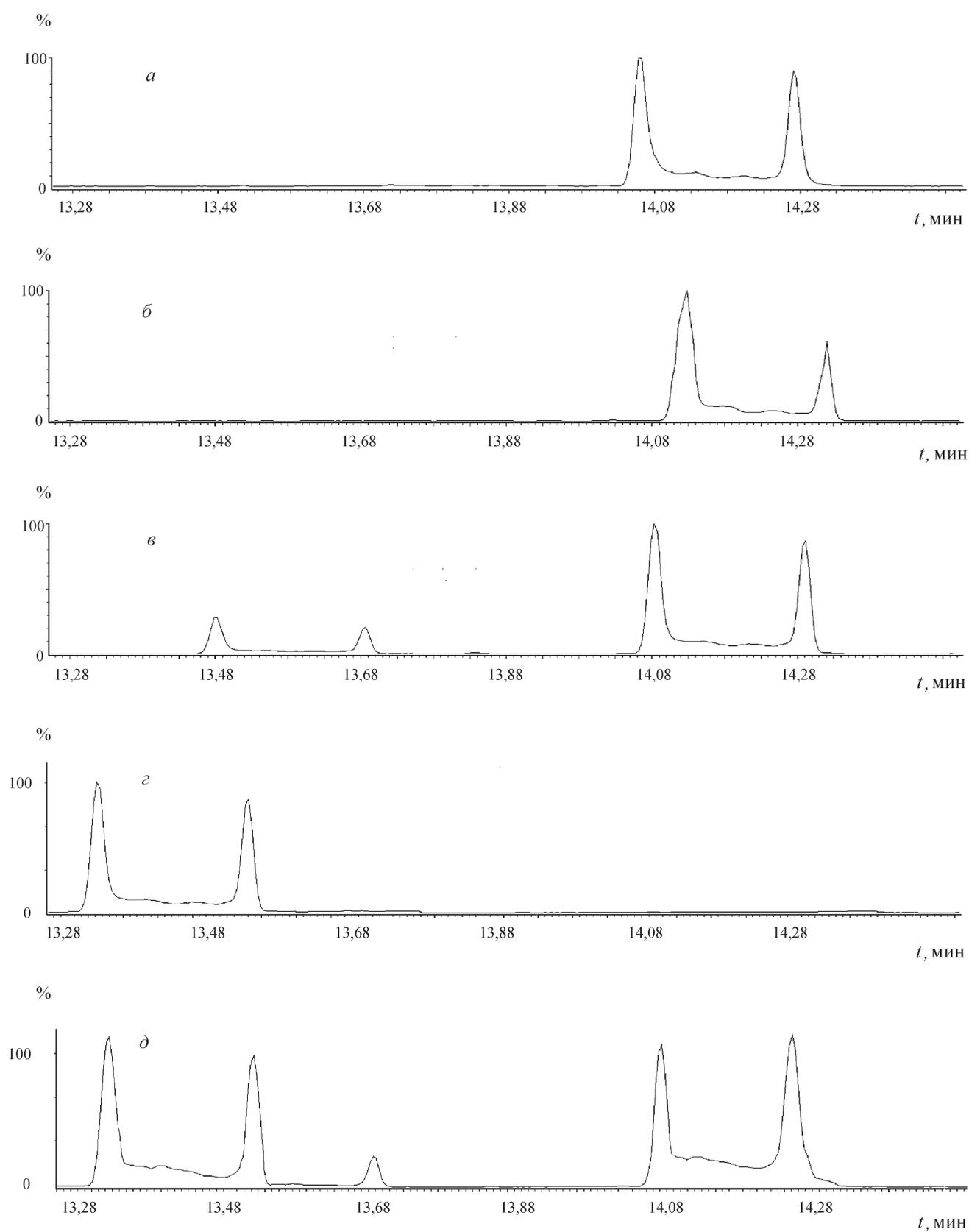


Рис. 2. Хроматограммы (ГХ–МС) по полному ионному току трифторацильных производных ДИЭС (*a*), ГЭС (*б*), ДЭС (*в*), БФА (*г*) и их смеси (*д*)

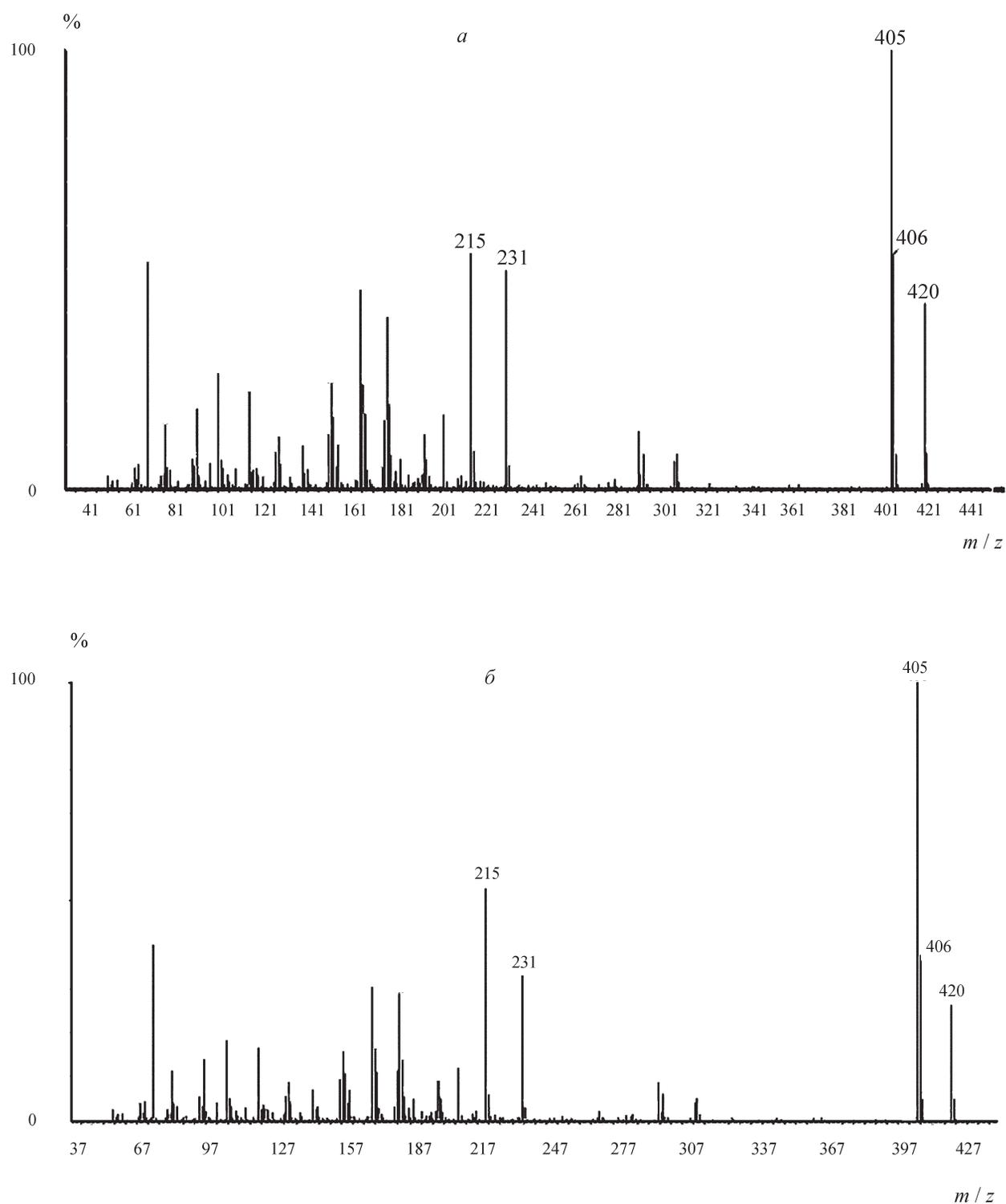


Рис. 3. Масс-спектры трифторацильного производного БФА, соответствующие времени выхода пика на хроматограмме по полному ионному току 13,55 мин (а) и 13,36 мин (б)

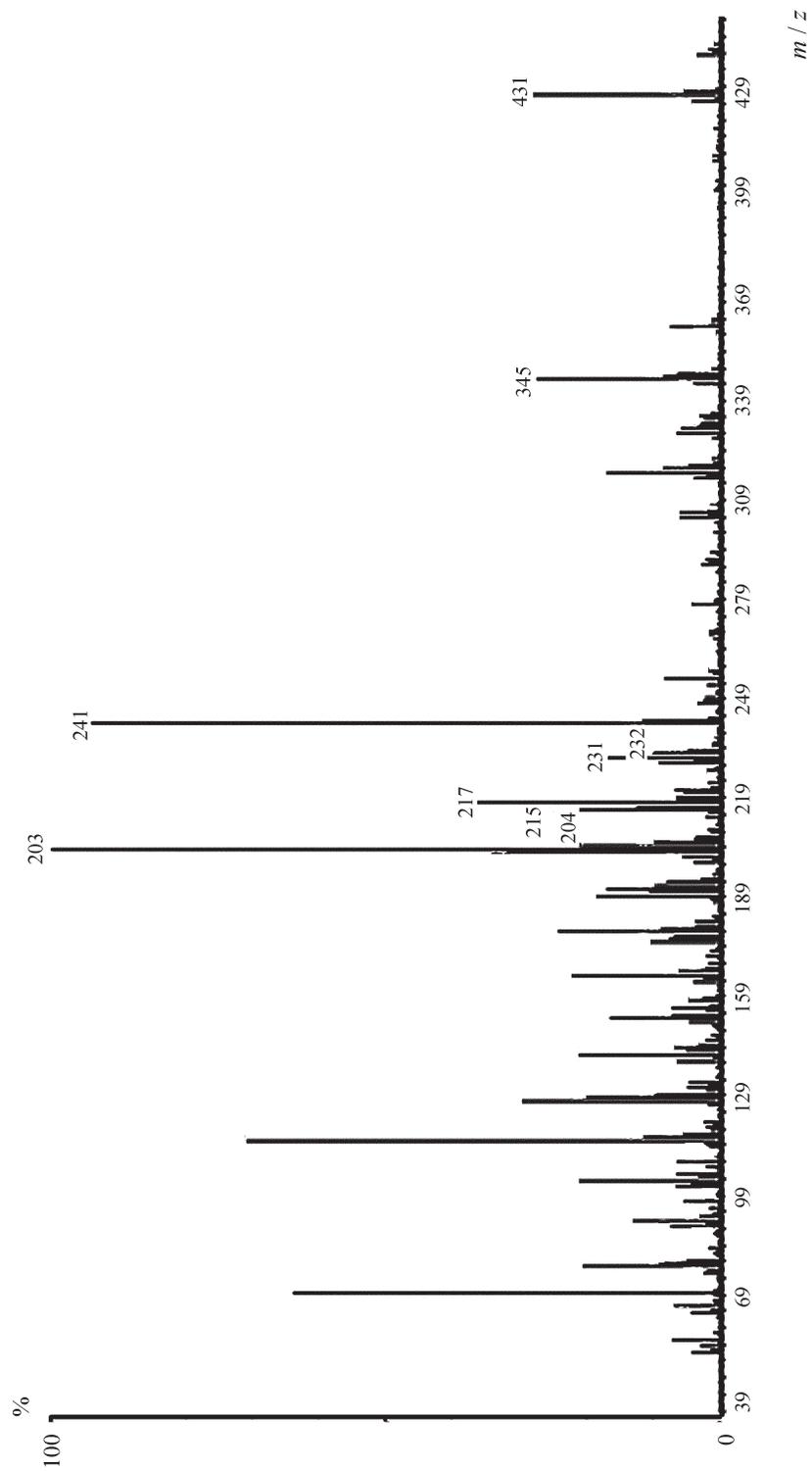


Рис. 4. Масс-спектр производных ДЭС, ГЭС и ДИЭС, соответствующий времени выхода общего пика на хромаатограмме по полному ионному току (14,11 мин)

Т а б л и ц а 1

Масса ионов трифторацильных производных бисфенола А и синтетических эстрогенов – производных стибена

Производное	Время удерживания, мин	Массы ионов, <i>m/z</i>
Диэтилстильбэстрол–ТФА	14,09; 14,30	241 , 203, 431
Гексэстрол –ТФА	14,13; 14,32	230 , 204 , 231, 231 , 203
Диенэстрол–ТФА	14,06; 14,27	345 , 215 , 203, 217
Бисфенол А–ТФА	13, 36; 13,55	405 , 215, 406 , 231, 420

Т а б л и ц а 2

Результаты определения бисфенола А в пищевых продуктах (*n* = 3, *P* = 0,95)

Продукт	Страна-изготовитель	Срок хранения мес	Степень извлечения, %	Найдено мг/кг, мг/л	<i>s_r</i>
Зеленый горошек «Bonduelle»	Франция	3 мес	90	0,29 ± 0,03	0,08
Оливки	Испания	17 мес	96	0,040±0,006	0,11
Кукуруза сладкая «GreenRay»	Сербия	20 мес	92	–*	–
Детское мясное пюре «Тёма»	Россия	7 мес	99	–	–
Персики	Греция	14 мес	100	0,11±0,01	0,09
Оливки фаршированные креветками	Испания	14 мес	94	–	–
Красная фасоль с кукурузой	Венгрия	6 лет	97	0,14±0,03	0,09
Свинина тушеная	Россия	3 мес	91	0,012±0,002	0,12
Зеленый горошек	Россия	4 мес	92	0,77±0,06	0,06
Вода, выдержанная в поликарбонатной бутылке	Китай	2 недели	100	0,0012±0,0002	0,12
«Pepsi-Cola»	Россия	5 мес	96	0,0051±0,0006	0,09
«Coca-cola»	Россия	5 мес	97	0,046±0,006	0,10
Пиво «Балтика №7» в банке	Россия	6 мес	97	–	–
Пиво «Янтарное» в банке	Россия	3 мес	97	0,0011±0,0002	0,11
Энергетический напиток «Red devil»	Россия	4 мес	100	0,043±0,005	0,08

*Не обнаружено.

эстрогенов. В норвежской семге обнаружен синтетический эстроген ДЭС в количестве $0,50 \pm 0,03$ мкг/кг ($n = 3, P = 0,95$).

На рис. 5–7 представлены хроматограммы экстрактов из некоторых анализируемых объектов без добавок и с добавками целевых соединений. ТФА яв-

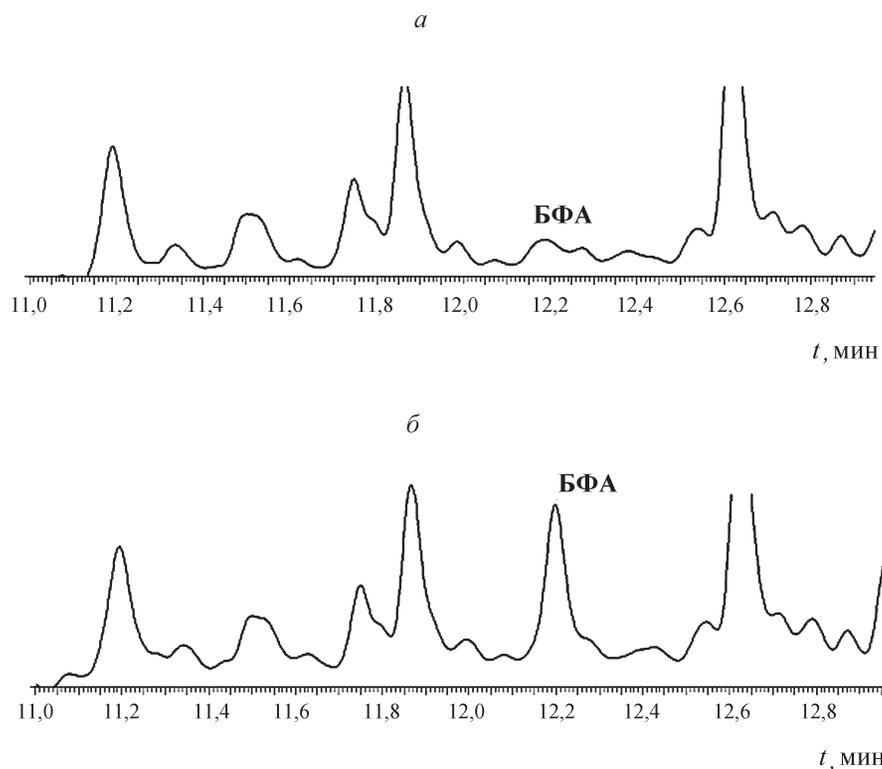


Рис. 5. Хроматограммы (ГХ–ДЭЭ) экстрактов из консервированных персиков без добавки (а) и с добавкой БФА (б)

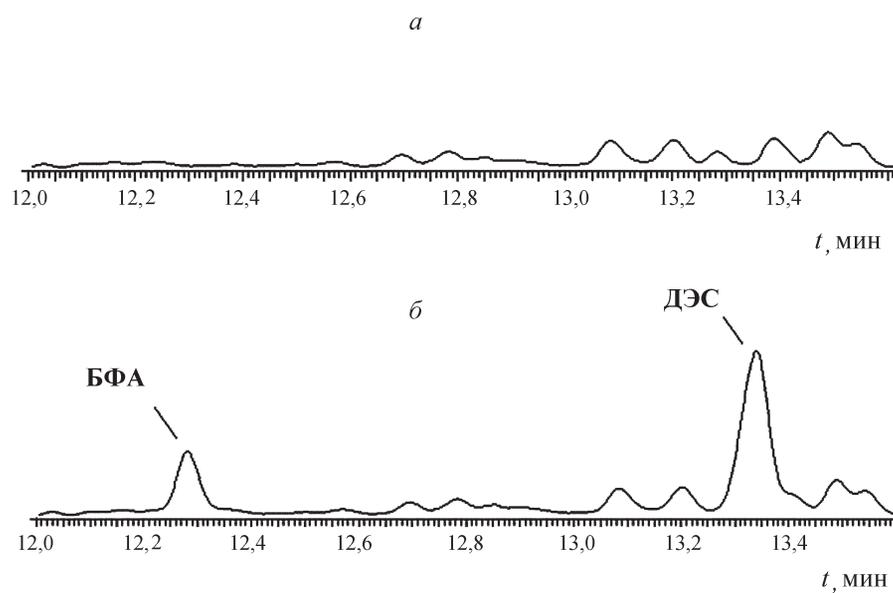


Рис. 6. Примеры хроматограмм (ГХ–ДЭЭ) дериватов экстрактов из говядины без добавки (а) и с добавкой БФА и ДЭС (б)

ляется 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, использова-

ние ДЖЖМЭ для концентрирования обеспечивает дополнительную очистку экстрактов. Продолжительность анализа составляет 0,5–1,0 ч, относительное стандартное отклонение результатов анализа не превышает 0,1.

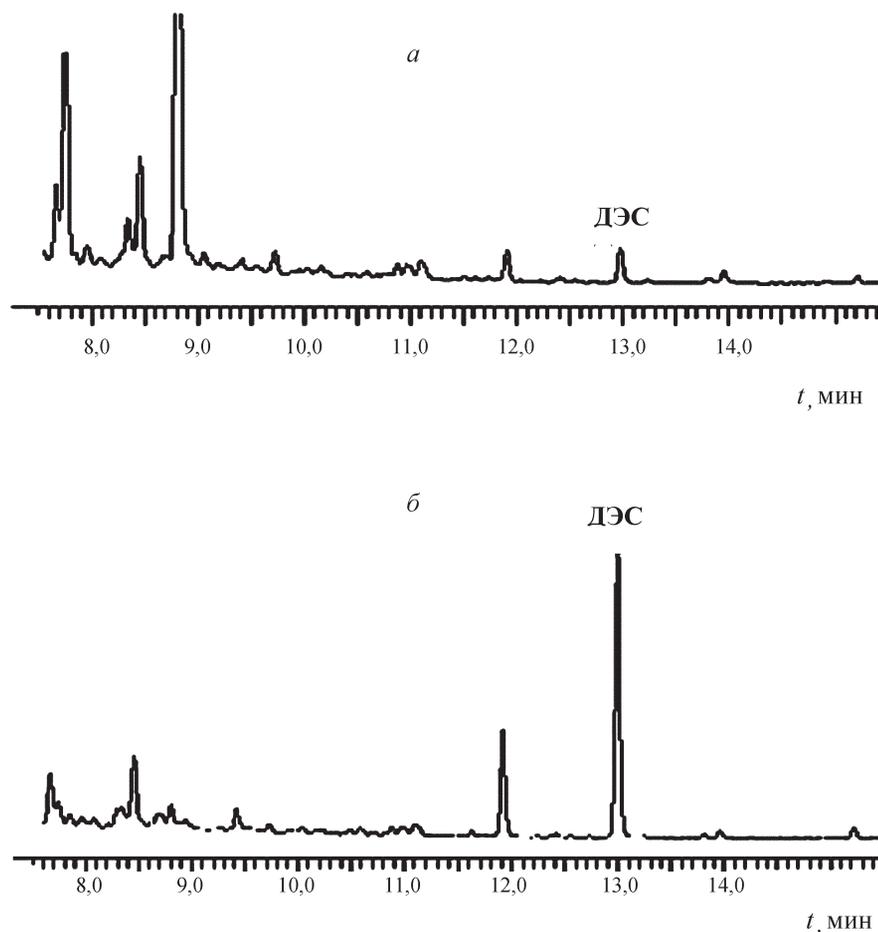


Рис. 7. Примеры хроматограмм (ГХ–ДЭС) дериватов из норвежской семги без добавки (а) и с добавкой БФА и ДЭС (б)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Верховская З.Н. Дифенилпропан. М., 1971.
2. Krishnan A.V., Stathis P., Permuth S.F. et al. // *Endocrinology*. 1993. **132**. P. 2279.
3. Комаров А.А. Дис. ... докт. биол. наук. М., 2006.
4. Rykowska I., Wasiak W. // *Acta Chromatogr.* 2006. N 16. P. 7.
5. Ballesteros-Gomez A., Rubio S., Perez-Bendito D. // *J. Chromatogr. A*. 2009. **12**. N 16. P. 449.
6. Hadjmohammadi M. R., Ghoreishi S.S. // *Acta Chim. Slov.* 2011. **58**. P. 765.
7. Cunha S.C., Almeida C., Mendes E., Fernandes J.O. // *Food Add. Contam.* 2011. **28**. N 4. P. 513.
8. Wang X, Diao C.-P., Zhao R.-S. // *J. Sep. Sci.* 2009. **32**. N 1. P. 154.
9. Anastassiades M., Stajnbaher D., Schenck F.J. // *J. AOAC Int.* 2003. **86**. P. 412.

COMBINATION QUECHERS SAMPLE PREPARATION AND DISPERSIVE LIQUID-LIQUID MICROEXTRACTION FOR DETERMINATION IN FOOD PRODUCTS POLLUTANTS ESTROGEN CHARACTER BY GAS-LIQUID CHROMATOGRAPHY

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

A simple and an express method of simultaneous determination of bisphenol A, diethylstilbestrol, and hexestrol, dienestrol in canned foods, drinking water, alcoholic and non-alcoholic beverages by gas-liquid chromatography with ECD and mass spectrometry detectors. Target compounds from foods extracted with acetonitrile method QuEChERS. Additional purification and concentration of the extract was carried out dispersion liquid-liquid microextraction in carbon tetrachloride. Translation of these compounds in the volatile derivatives carried trifluoroacetic anhydride. Concentration range 0.5–100 mkg / kg. Duration analysis of 1–1.5 hours, the relative standard deviation of the analysis does not exceed 0.1.

Key words: bisphenol A, diethylstilbestrol, hexestrol, dienestrol, gas-liquid chromatography, QuEChERS, dispersive liquid-liquid microextraction.

Сведения об авторах: *Королев Дмитрий Сергеевич* – аспирант кафедры химии Владимирского государственного университета, сотр. Федерального центра охраны здоровья животных; *Амелин Василий Григорьевич* – профессор кафедры химии Владимирского государственного университета, докт. хим. наук, вед. науч. сотр. Федерального центра охраны здоровья животных(amelinvg@mail.ru); *Третьяков Алексей Викторович* – зав. химической лабораторией Федерального центра охраны здоровья животных, канд. хим. наук.