



УДК 543.544

## Газожидкостная хроматография и дисперсионная жидкостно-жидкостная микроэкстракция при определении бисфенола А и диэтилстильбэстрола в воде и напитках

Королёв Д.С.<sup>1</sup>, Амелин В.Г.<sup>1</sup>, Третьяков А.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Владимирский государственный университет, Владимир

<sup>2</sup>Федеральный центр охраны здоровья животных (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), Владимир

Поступила в редакцию 18.07.2012 г.

### Аннотация

Предложена простая и экспрессная методика одновременного определения бисфенола А (БФА) и диэтилстильбэстрола (ДЭС) в питьевой воде, алкогольных и безалкогольных напитках в диапазонах 0,05-7 мкг/л для БФА и 0,025-1,2 мкг/л для ДЭС, соответственно, методом газожидкостной хроматографии с детектором по захвату электронов. Извлечение и концентрирование БФА и ДЭС осуществляли дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракцией тетрахлорметаном. Степень извлечения составила 96-100 %, коэффициент концентрирования - 96-100. Продолжительность анализа – 1-1,5 ч, относительное стандартное отклонение результатов анализа не превышает 0,1.

**Ключевые слова:** Диэтилстильбэстрол, бисфенол А, газожидкостная хроматография, детектор по захвату электронов, дисперсионная жидкостно-жидкостная микроэкстракция.

It is suggested a simple and rapid procedure of simultaneous determination of bisphenol A (BPA) and diethylstilbestrol (DES) in drinking water, alcoholic and soft drinks in the range of 0.05-7 mkg/L and 0.025-1.2 mkg /L respectively, by gas-liquid chromatography detector electron capture. Extraction and concentration of BPA and DES are performed by dispersive liquid-liquid microextraction by carbon tetrachloride. The degree of recovery was 96-100 % and the concentration factor - 96-100. The time of analysis was about 1 - 1.5 h, the relative standard deviation of the results of the analysis did not exceed 0.1.

**Keywords:** diethylstilbestrol, bisphenol A, gas-liquid chromatography, electron capture detector, dispersive liquid-liquid microextraction

### Введение

Бисфенолы уже более 50 лет используют в производстве пластмасс для пищевой промышленности [1]. Из них 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: бутылки для воды и напитков, спортивный инвентарь, медицинские инструменты, зубные пломбы и герметики, линзы для очков, CD и DVD диски. 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, 3]. Он опасен даже в очень малых количествах. Установленное Европейской комиссией значение ПДК для питьевой воды – 10 мкг/л.

При производстве морепродуктов в качестве анаболических препаратов часто применяют нестероидные эстрогены - производные стилибена (диэтилстильбэстрол, гексэстрол, диенэстрол), следовые количества которых могут быть обнаружены и в воде. Все препараты данного типа запрещены к использованию и не допускаются в пищевых продуктах.

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 аналитов ангидридами органических кислот (ацилирование по гидроксильной группе с получением летучих сложных эфиров). Основным методом пробоподготовки является жидкостная экстракция с последующей очисткой экстракта твердофазной экстракцией [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, простому и безопасному способу пробоподготовки, который позволяет существенно снизить объемы растворителей, время и трудозатраты на анализ [6-8].

Цель настоящей работы заключалась в упрощении и удешевлении методики одновременного определения БФА и ДЭС в воде и напитках методом газожидкостной хроматографии, а также в расширении возможностей новых способов пробоподготовки при определении данных соединений.

## Эксперимент

Оборудование и реактивы. Использовали газовый хроматограф Clarus-600 с детектором по захвату электронов (ДЗЭ) (Perkin-Elmer, США). Разделение проводили на капиллярной колонке ОПТИМА® - 5 - Accent (Marcherey-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.

Использовали бисфенол А (Aldrich, США), диэтилстильбэстрол (dr. Ehrenstorfer GmbH, Германия), ацетонитрил для хроматографии (Merck, Германия), триэтиламин (ТЭА), бензол, дихлорметан, трихлорметан, тетрахлорметан для хроматографии (Merck, Германия).

Методика. В пробирку емкостью 15 мл, содержащую 5,0 мл анализируемой пробы, с помощью шприца впрыскивали смесь 2,0 мл ацетонитрила с 0,2 мл тетрахлорметана, 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 толуола, содержащего трифторуксусный ангидрид (ТФА) и ТЭА (70:10:1) и выдерживали 15 мин при 60°С, охлаждали и хроматографировали.

Для характеристики эффективности процесса пробоподготовки большое значение имеет коэффициент концентрирования ( $K$ ) и степень извлечения ( $R$ ), рассчитываемые по формулам (1) и (2) соответственно:

$$K = \frac{c_k}{c_o}; \quad (1)$$

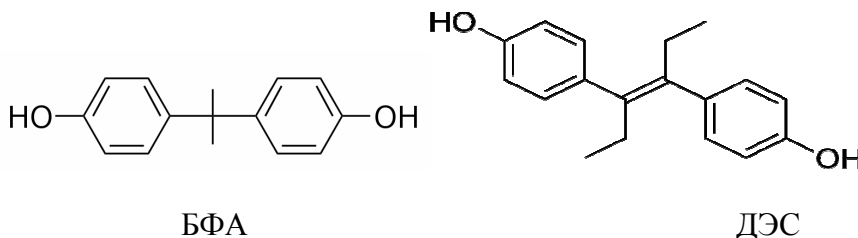
где  $c_k$  и  $c_o$  – концентрация аналита в конечном анализируемом растворе и начальная концентрация аналита в исходной пробе воды.

$$R, \% = \frac{c_k V_k}{c_o V_o} \cdot 100; \quad (2)$$

где  $V_x$  и  $V_o$  – объем конечного анализируемого раствора-концентрата и объем пробы.

### Обсуждение результатов

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



Выбор оптимальных условий получения производных. При выборе оптимальных условий получения производных учитывали объем добавляемого ТФА (25, 50, 100 мкл), температуру (20, 40, 60 °С), количество внесенного ТЭА и продолжительность реакции (5, 10, 15, 20 мин). Выбор оптимальных условий проводили по наибольшей площади хроматографического пика целевых компонентов. Одним из наиболее важных параметров, влияющих на площади пика, оказалось количество введенного катализатора ТЭА. Для изучения влияния данного фактора готовили смеси толуола, ТФА и ТЭА с различным содержанием последнего. Полученная зависимость представлена на рис 1.

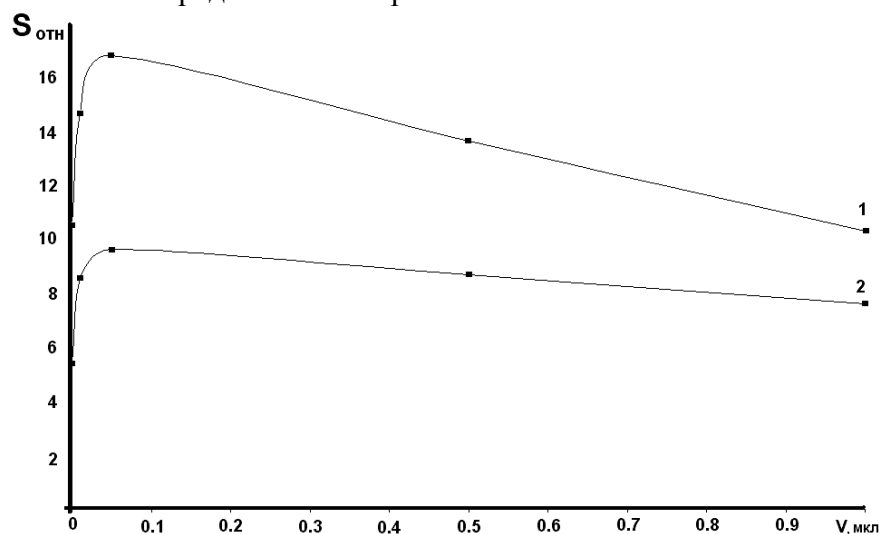


Рис. 1. Зависимость площадей хроматографических пиков производных ДЭС (1) и БФА (2) от введенного количества ТЭА

Оптимальные условия получения производных следующие: сухой остаток, содержащий БФА и ДЭС растворяли в 50 мкл смеси (к 350 мкл толуола добавляли 50 мкл ТФА и 5 мкл 1 % - ного гексанового раствора ТЭА (70:10:1)), выдерживали 15 минут в сушильном шкафу при температуре 60°C, охлаждали и хроматографировали.

Образующиеся трифторпроизводные летучи и определяются ДЗЭ. Полученные производные хорошо разделяются на капиллярной колонке ОПТИМА® - 5 - Accent (рис. 2).

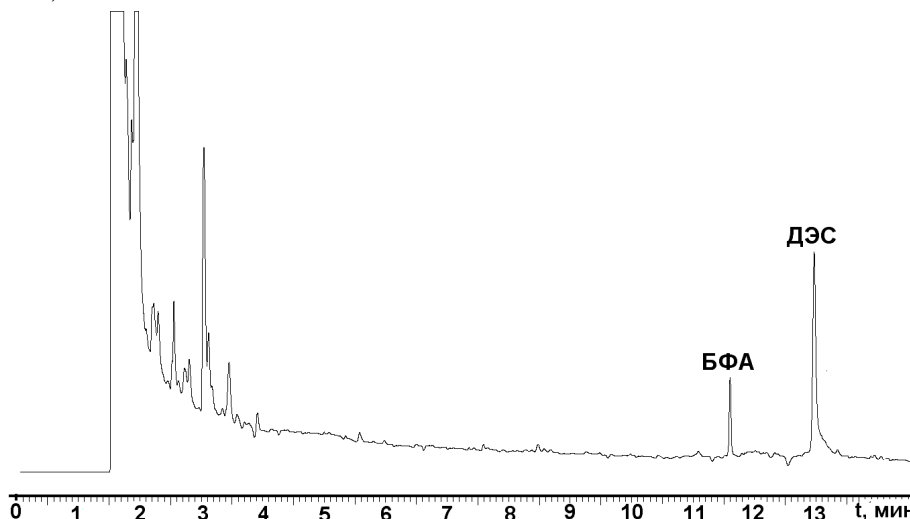


Рис. 2. Хроматограмма стандартного раствора производных БФА и ДЭС (5 мкг/мл).

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.* Объем диспергатора варьировали от 1 до 4 мл. Установлено, что площади пиков возрастают с увеличением объема диспергатора до 3,5 мл, после этого экстрагент насыщается ацетонитрилом и выделяется в верхней фазе, степень извлечения при этом резко падает. Оптимальным был выбран объем 2 мл, поскольку в этом случае наблюдается максимальная степень извлечения (близка к 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. 3 представлена зависимость площади хроматографических пиков от продолжительности обработки ультразвуком. Как следует из рисунка, оптимальным является обработка пробы ультразвуком в течение 4 мин.

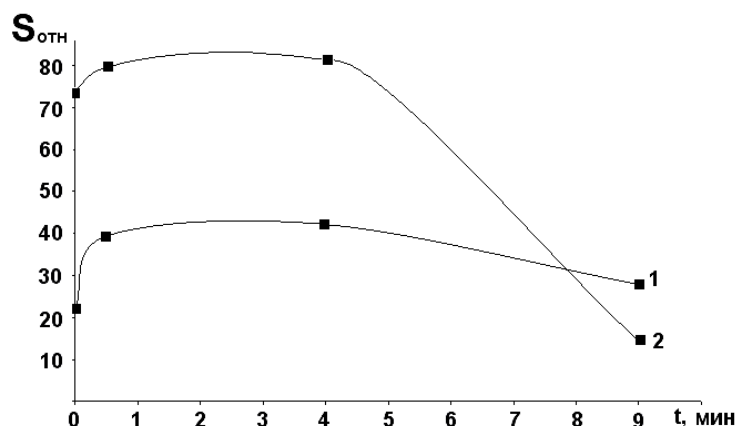


Рис. 3. Зависимость площадей пиков БФА (1) и ДЭС (2) от продолжительности обработки ультразвуком

*Метрологические характеристики методики.* При выбранных оптимальных условиях степени извлечения для БФА и ДЭС составили 96 и 100 % соответственно, коэффициенты концентрирования – 96-100. Диапазоны линейности градуировочных графиков – 0,005-0,7 мкг/мл ( $y = 10699,01x + 11,33$ ) для БФА, 0,0025-0,12 мкг/мл ( $y = 35515x - 31,97$ ) для ДЭС. Пределы обнаружения (соотношение сигнал/шум = 3) аналитов в жидких средах с учетом коэффициента концентрирования (96-100) составили 0,018 мкг/л и 0,008 мкг/л для БФА и ДЭС соответственно, а пределы определения (соотношение сигнал/шум = 10) – 0,05 и 0,025 мкг/л для БФА и ДЭС.

*Определение БФА и ДЭС в воде и напитках.* Проанализированы напитки и воды на содержание в них бисфенола А и диэтилстильбэстрола. Результаты анализа представлены в табл. 1, рис 4.

Таблица 1. Результаты определения БФА в напитках ( $n = 3, P = 0,95$ )

Матрица	Изготовитель	Срок хранения, мес.	Степень извлечения, %	Найдено БФА, мкг/л	Найдено ДЭС, мкг/л	$s_r$
Вода, выдержанная в поликарбонатной бутылке	Китай	2 недели	100	$1.2 \pm 0.2$	-	0.12
«Pepsi-Cola»	Россия	5	96	$5.1 \pm 0.6$	-	0.09
«Coca-Cola»	Россия	5	97	$4.6 \pm 0.6$	-	0.10
Пиво «Балтика № 7» в банке	Россия	6	97	-	$0.053 \pm 0.004^*$	0.09
Ярпиво «Янтарное» в банке	Россия	3	97	$1.1 \pm 0.2$	-	0.11
Энергетический напиток «Red Devil» в банке	Россия	4	100	$4.3 \pm 0.5$	-	0.08

Примечание \* - введено 0,05 мкг/л ДЭС

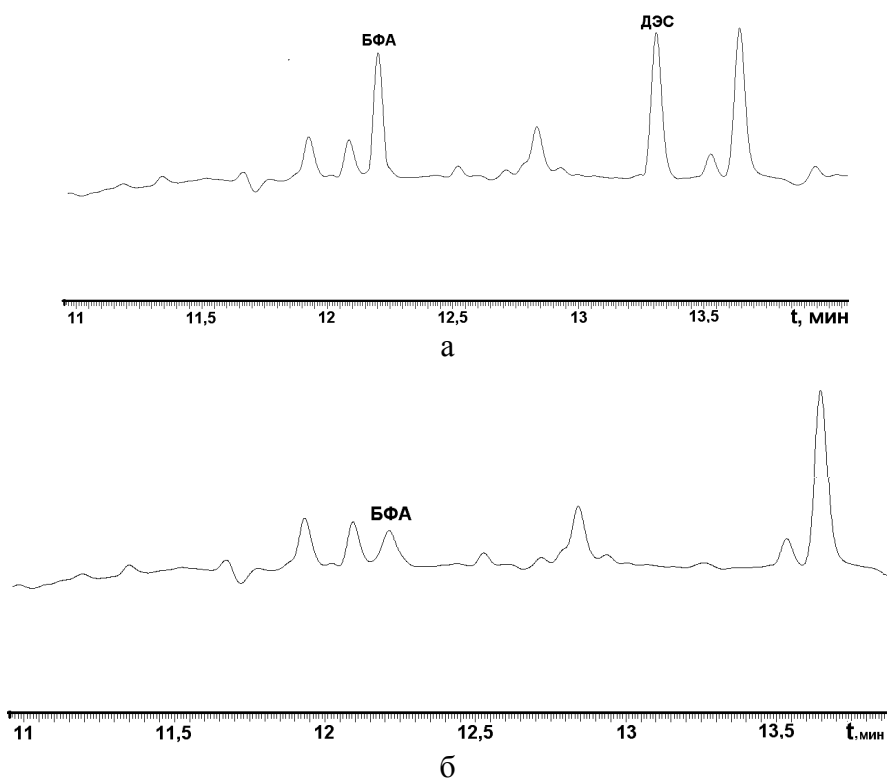


Рис. 4. Хроматограммы экстрактов из воды, выдержанной в поликарбонатной бутылке: а – с введенным БФА и ДЭС в количестве 0,10 и 0,05 мкг/мл соответственно, б – без добавки

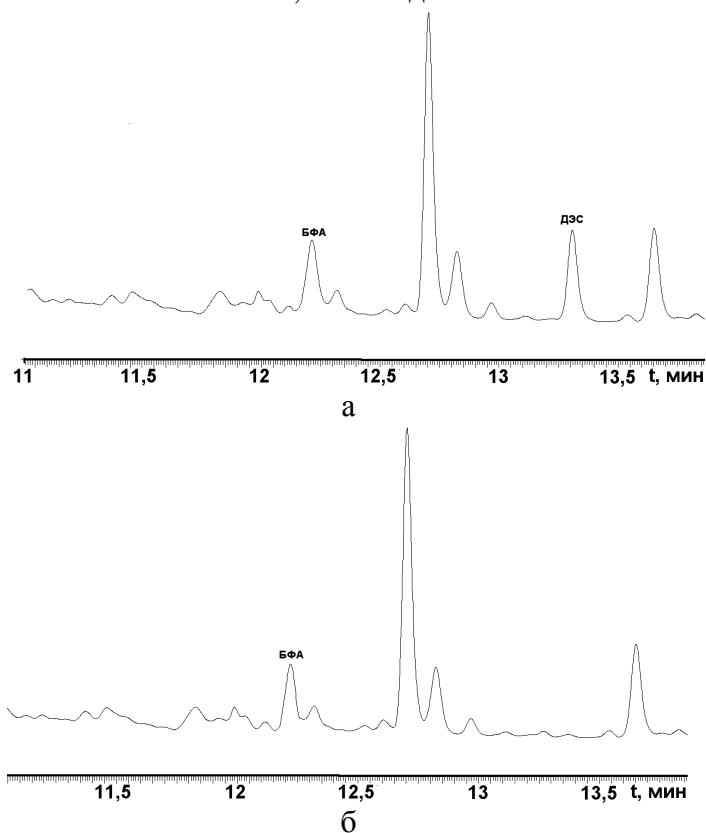


Рис. 5. Хроматограммы экстрактов из энергетического коктейля «Red Devil»: а – с введенным БФА и ДЭС в количестве 0,10 и 0,05 мкг/мл соответственно, б – без добавки

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 0,1.

### Список литературы

1. Верховская З.Н. Дифенилолпропан. М.: Химия, 1971. 196 с.
2. Krishnan A.V., Stathis P., Permuth S.F., Tokes L, Feldman D. Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. // *Endocrinology*. 1993. № 132. P. 2279-2282.
3. Комаров А.А. Система обеспечения безопасности продукции животноводства при использовании анаболических стероидов, производных стибена и  $\beta$ -адреностимуляторов. Дис. д-ра биол. наук. М: 2006. 452 с.
4. Rykowska I., Wasiak W. Vesicular coacervative extraction of bisphenols and their diglycidyl ethers from sewage and river water. // *Acta Chromatogr*. 2006. № 16. P. 7-13.
5. Ballesteros-Gomez A., Rubio S., Perez-Bendito D. Analytical methods for the determination of bisphenol A in food.// *J. Chromatogr. A*. 2009. V. 12. № 16. P. 449-469.
6. Hadjmohammadi M. R., Ghoreishi S.S. Determination of estrogens in water samples using dispersive liquid-liquid microextraction and high performance liquid chromatography. *Acta Chim. Slov*. 2011. V. 58. P. 765-780.
7. Cunha S.C., Almeida C., Mendes E., Fernandes J.O. Simultaneous determination of bisphenol A and bisphenol B in beverages and powdered infant formula by dispersive liquid – liquid microextraction and heartcutting multidimensional gas chromatography - mass spectrometry. // *Food Add. Contam*. 2011. V. 28. № 4. P. 513-519.
8. Wang X, Diao C.-P., Zhao R.-S. Rapid determination of bisphenol A in drinking water using dispersive liquid-phase microextraction with *in situ* derivatization prior to GC-MS.// *J. Sep. Sci*. 2009. V. 32. № 1. P. 154-159.

---

**Королев Дмитрий Сергеевич** - аспирант кафедры химии Владимирского государственного университета, Владимир

**Амелин Василий Григорьевич** - д.х.н., проф. кафедры химии Владимирского государственного университета, Владимир

**Третьяков Алексей Викторович** - к.х.н., зав. лабораторией Федерального центра охраны здоровья животных (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), Владимир

**Korolev Dmitry S.** – Post-graduate student of chemistry department, Vladimir state university, Vladimir

**Amelin Vasily G.** – Dr. Sc. Chem. Professor of chemistry department, Vladimir state university, Vladimir, e-mail: [amelinvg@mail.ru](mailto:amelinvg@mail.ru)

**Tretiyakov Alexey V.** – Cand. Sc. Chem. Head of laboratory, Federal Centre for Animal Health (FGBI «ARRIAH»), Vladimir