

Определение этинилэстрадиола и норгестрела в воде методом твердофазной микроэкстракции

Алимжанова М.*, Адильбеков Е.,
Нуржанова Е., Батырбекова С.

Казахский национальный университет
им. аль-Фараби, Центр физико-химических
методов исследования и анализа,
Алматы, Казахстан
*E-mail: alimzhanova@cfhma.kz

В статье представлены результаты исследования качественного определения этинилэстрадиола и норгестрела в воде методом твердофазной микроэкстракции в сочетании с газовой хромато-масс-спектрометрией. Данные вещества представляют собой органические соединения, оказывающие негативное влияние на работу эндокринной системы живых организмов. Главной целью данного исследования является установление оптимальных параметров твердофазной микроэкстракции в режиме экстракции из газовой фазы над образцом с последующим определением на газовом хроматографе с масс-спектрометрическим детектированием. В результате проведенных исследований были оптимизированы основные параметры твердофазной микроэкстракции гормонов из газовой фазы над питьевой водой: экстракционное покрытие 65 мкм полидиметилсилоксан/дивинилбензол, температура экстракции 80°C, время экстракции 20 мин, масса NaCl – 1,5 г.

Ключевые слова: этинилэстрадиол; норгестрел; твердофазная микроэкстракция; газовая хроматография; масс-спектрометрия.

Этинилэстрадиол мен норгестрелды су үлгілерінен қатты фазалы микроэкстракция әдісімен талдау

Алимжанова М.*, Адильбеков Е.,
Нуржанова Е., Батырбекова С.

Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық
университеті, Физика-химиялық зерттеу
әдістері орталығы, Алматы, Қазақстан
*E-mail: alimzhanova@cfhma.kz

Берілген мақала ауыз су нысандарынан этинилэстрадиол мен норгестрелды қатты фазалы микроэкстракция мен газды хромато-масс-спектрометрияның үйлесімділігі нәтижесінде сапалық анықтау әдісін даярлауға арналған. Оңтайландыру органикалық ластағыштар – эндокринді деструкторлар тобының өкілі – этинилэстрадиол мен норгестрелмен ластанған ауыз су модельді үлгілеріне жүргізілді. Эндокринді деструкторлар тірі ағзалардың эндокринді жүйесінің жұмысына кері әсерін тигізетін органикалық қосылыстар болып саналады. Стероидтік гормондар, алкилфенолдар мен пестицидтер секілді эндокринді деструкторлар айрықша қауіп-қатер тудырады. Осы заттарды анықтауға қолданылатын әдістер үлгіні дайындаудың заманауи әдістерімен (қатты-фазалы экстракция, қатты-фазалы микроэкстракция және т.б.) үйлесімділік тапқан хроматографиялық талдауды негізделген. Зерттеу нәтижесінде қатты-фазалы микроэкстракцияның оңтайлы параметрлері анықталды: экстракция уақыты – 20 мин, экстракция температурасы – 80°C, NaCl массасы – 1,5 г, талшақтың полимерлік жабындысы – 65 мкм дивинилбензол/полидиметилсилоксан. Зерттеу нәтижесі, оңтайландырылған әдістеме ауыз суда этинилэстрадиол гормонын анықтауға болатынын көрсетті. Дайындалған әдістеме су нысандарындағы стероидты гормондар (этинилэстрадиол және норгестрел) өкілін анықтауда қолданылуы мүмкін.

Түйін сөздер: этинилэстрадиол; норгестрел; қатты фазалы микроэкстракция; газды хроматография; масс-спектрометрия.

Determination of ethinylestradiol and norgestrel in water using solid-phase microextraction

M. Alimzhanova*, Ye. Adilbekov,
Ye. Nurzhanova, S. Batyrbekova

Al-Farabi Kazakh National University, Center
of Physical Chemical Methods of Research
and Analysis, Almaty, Kazakhstan
*E-mail: alimzhanova@cfhma.kz

Endocrine disrupting compounds (EDCs) are exogenous substances that alter some function of the endocrine system and have adverse health effects on intact organisms, their off spring or (sub) populations. EDCs mimic or block the action of natural hormones, and hence biological functions in living organisms, thus leading to impaired reproduction, growth and development. The article focuses on the development of analytical method based on solid-phase microextraction and gas chromatography – mass spectrometry for detection of steroid hormones ethinylestradiol and norgestrel in water samples. In this work, studies were carried out on model water samples spiked with a mixture of ethinylestradiol and norgestrel. The following parameters of headspace solid-phase microextraction were optimized as a result of experiments: extraction temperature 80°C, extraction time 20 min, NaCl additive – 1.5 g, fiber coating – 65 µm PDMS/DVB.

Keywords: ethinylestradiol; water sample; gas-chromatography; mass-spectrometry; solid-phase microextraction.



Определение этинилэстрадиола и норгестрела в воде методом твердофазной микроэкстракции

Алимжанова М.* , Адильбеков Е., Нуржанова Е., Батырбекова С.

Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Центр физико-химических методов исследования и анализа, Алматы, Казахстан

*E-mail: alimzhanova@cfnma.kz

1. Введение

В настоящее время широкое применение и производство фармакологических препаратов, бытовой химии, пестицидов и других органических загрязнителей угрожает экологической обстановке во всем мире. Большой интерес вызывают эндокринные деструкторы, оказывающие негативное влияние на эндокринную систему живых организмов [1-3]. К данной группе загрязнителей относятся техногенные и природные гормоны, алкилфенолы, пестициды, триазолы и т.д. [4]. Однако, в настоящее время все больше внимания уделяется проблеме загрязнения окружающей среды стероидными гормонами. Попадая в окружающую среду через системы сточных вод, техногенные и природные гормоны – этинилэстрадиол, эстрадиол и др. демонстрируют способность нарушать эндокринную систему живых организмов [2-4]. Изучение более тысяч обитателей в 50 реках и озерах Европы показало, что не менее трети исследованных водных животных приобрели женские половые признаки. В 2004 году до 86% всех самцов рыб, выловленных в 51 городе Европы, также оказались гермафродитами. Основная причина таких мутаций – повышенное содержание в водах рек этинилэстрадиола, входящего в состав гормональных препаратов [5]. Исследования ООН [6] показали непосредственную связь между воздействием подобных химических веществ и проблемами со здоровьем у населения, включая потенциальное воздействие на развитие крипторхизма у мальчиков, рака молочной железы у женщин, рака предстательной железы, рака щитовидной железы и нарушения нервной системы.

Высокая опасность техногенных и природных гормонов по отношению к человеку вызвала необходимость усовершенствования аналитических методик определения их

следовых количеств в водных объектах, в частности, в питьевых водах.

Анализ на наличие соединений с гормональной активностью в пробах воды, в том числе сточных, подземных и поверхностных водах, обычно осуществляется хроматографическими методами - газовая хроматография (ГХ) и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Эти методы разделения являются высокоэффективными и селективными в сочетании с высокочувствительными детекторами, такими, как масс-спектрометр (МС), tandemный масс-спектрометр (МС/МС) и диодно-матричный детектор (ДАД). Бесспорно, наиболее используемым, гибким и эффективным детектором является масс-спектрометр в различных режимах работы. Основная проблема определения эндокринных деструкторов - это концентрации ниже нг/л, различные химические структуры и физико-химические характеристики анализируемых соединений. Среди наиболее надежных и чувствительных методов анализа стероидных гормонов в водных образцах являются ГХ-МС, ВЭЖХ-МС и ВЭЖХ-МС-МС, которые признаны как лучшие аналитические инструменты в изучении объектов окружающей среды. Хроматографические методы дают возможность одновременного скрининга стероидов и их конъюгатов, и не ограничиваются такими факторами, как нелетучесть и высокая молекулярная масса аналитов [7-8].

Метод газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией был первым хроматографическим методом, используемым для определения стероидных гормонов, и является широко применяемым методом для определения эстрогена и прогестина в экстрактах сточных вод. Во многих исследованиях разделение с помощью газовой хроматографии проводили с помощью различных капиллярных колонок (таблица 1). Объем вводимой пробы составлял 1-4 мкл в режиме без деления

потока, с использованием гелия в качестве газа-носителя. Программа термостата колонки варьировалась от 45 до 300°C. Существующие различные методы ионизации ЭИ (электронная ионизация) и ХИ (химическая ионизация) делают метод ГХ-МС наиболее часто используемым при анализе гормонов. Анализы на обычном МС [9-14] и с помощью МС/МС (ионная ловушка) [15-17] были проведены после дериватизации образца при 70 эВ и в режиме SIM. С точки зрения чувствительности ВЭЖХ-МС и ГХ-МС-МС сопоставимы, последний показывает немного более высокое значение, а по точности и воспроизводимости оба метода являются удовлетворительными, хотя шаг

дериватизации, обычно необходимый для последующего анализа ГХ-МС и ГХ-МС-МС, занимает много времени и может быть источником погрешности [9]. Преимуществом ГХ-МС, по сравнению с ВЭЖХ-МС, является доступность крупной библиотеки масс-спектров, полезный для идентификации неизвестных пиков гормонов [9, 11].

Таким образом, из таблицы 1 видно, что существующие на сегодняшний день методы определения этинилэстрадиола в воде основываются на газохроматографических методах анализа с различными видами пробоподготовки и детектирования. В целях увеличения чувствительности применяют такие методы

Таблица 1 – Определение эндокринных деструкторов методом газовой хроматографии

Аналиты	Матрица	Пробоподготовка	Метод анализа	Лит.
17α - Эстрадиол, Норэтистерон	Сточные воды	ЖЖЭ	ГХ-МС	[9]
Диэтилстильбэстрол	Сточные воды	ТФЭ	ГХ-МС	[13]
Местранол	Сточные воды	ТФЭ	ГХ-МС	[14]
Этинилэстрадиол	Притоки	ТФЭ	ГХ-МС	[18]
Эстрон, эстрадиол, эстриол, этинилэстрадиол и другие гормоны	Речная вода, станция водоочистки	Фильтрация, ТФЭ, дериватизация (МСТФА)	ГХ-ЭСИ-МС	[19]
Эстрон, 17β - эстрадиол, эстриол, 17α-этинил-эстрадиол и их дериваты	Сточные воды, станция водоочистки	Фильтрация, ТФЭ, дериватизация (БСТФА)	ГХ-ЭСИ-МС-МС	[20]
Эстрон, 17β - эстрадиол, эстриол, 17α-этинил-эстрадиол и их дериваты	Речная вода, сточные воды, станция водоочистки	Фильтрация, экстракционные диски, дериватизация (БПФБ)	ГХ-квадруполь-МС	[21]
17α-этинилэстрадиол, алкилфенолы	Сточные воды	ТФМЭ	ГХ-МС	[22]
17α - Эстрадиол, 17β - эстрадиол, эстрон, 17α-этинилэстрадиол	Ультрочистая вода	ТФЭ, дериватизация	ГХ-МС-МС	[23]
17α-этинилэстрадиол, 17β - эстрадиол, нонилфенол, бисфенол	Поверхностные воды	ТФЭ и ЖЖЭ с дериватизацией	ГХ-МС-ЭИ	[24]
17α - Эстрадиол, 17β - эстрадиол, 17α-этинилэстрадиол, эстриол и алкилфенолы	Речная вода, сточные воды и питьевая вода	ТФЭ, дериватизация	ГХ-МС	[25]
Эстрон, 17β - эстрадиол, местранол, эстриол и конъюгаты эстрогенов	Сточные воды	ТФЭ, дериватизация	ГХ-МС-ЭИ	[26]
Стероидные эстрогены и нонилфенолы	Подземные воды	ТФЭ, дериватизация	ГХ-МС	[27]
17α - Эстрадиол, 17β - эстрадиол, эстрон, 17α-этинилэстрадиол, эстриол, нонилфенол, фталаты	Сточные воды	ТФЭ, дериватизация	ГХ-МС	[28]
Эстрон, 17β - эстрадиол, фталаты, алкилфенолы	Сточные воды	Магнитно-вращающая сорбционная экстракция (stir bar sorptive extraction)	ГХ-МС	[29]
Эстрон, эстрадиол и алкилфенолы	Поверхностные воды	ТФЭ, дериватизация	ГХ-МС	[30]

ЭСИ - электрораспылительная ионизация, ТФЭ - твердофазная экстракция, ЖЖЭ - жидкость - жидкостная экстракция, ТФМЭ - твердофазная микроэкстракция, МСТФА - N-метил-N-(триметилсилил) трифторацетамид, БСТФА - N, O-бис(триметилсилил) трифторацетамид, БПФБ - бромид пентафторбензоил.

пробоподготовки, как твердофазная экстракция (ТФЭ), жидкость – жидкостная экстракция (ЖЖЭ) и твердофазная микроэкстракция (ТФМЭ), которые включают в себя экстракцию и стадию концентрирования определяемых веществ. В связи с применением большого количества дорогостоящих материалов и вредных органических растворителей в методах твердофазной экстракции и ЖЖ-экстракции, они являются более дорогими и менее безопасными для окружающей среды.

Современные требования «зелёной» аналитической химии к разработке новых эффективных методик нацелены на снижение и полное исключение использования токсичных органических растворителей, негативно влияющих на окружающую среду и, следовательно, на здоровье персонала, проводящего анализ. В связи с этим, в настоящее время в разработке новых эффективных методик анализа все чаще используются современные подходы, не требующие использования токсичных органических растворителей и каких-либо реагентов для дериватизации определяемых веществ. Одним из таких подходов является метод твердофазной микроэкстракции (ТФМЭ).

Твердофазная микроэкстракция является одним из наиболее перспективных методов пробоподготовки при анализе объектов окружающей среды на содержание летучих и полуметаллических органических загрязнителей. Метод ТФМЭ основан на процессе извлечения исследуемых аналитов из образца на полимерное волокно. Исследования по определению эндокринных деструкторов в водных объектах с применением твердофазной микроэкстракции показали высокую эффективность данного метода в определении следовых количеств фталатов, пестицидов и алкилфенолов [31-32]. Метод ТФМЭ, в сочетании с методом ВЭЖХ-МС/МС [33], использовался для определения пяти эстрогенов: эстрон, 17 β-эстрадиол, эстриол, этинилэстрадиол и диэтилстильбестрол. Пределы обнаружения пяти эстрогенов находились в диапазоне от 2,7 до 11,7 пг/мл. Анализ методом ТФМЭ, как правило, требует проведение дериватизации, которая для большинства реагентов ограничена влиянием матрицы. При проведении исследований по определению алкилфенолов и бисфенола А (БФА) в пробах воды методом ГХ-МС перед анализом использовали экстракционные волокна, пропитанные дериватизационным агентом БСТФА (BSTFA) [34-35]. Пределы обнаружения находились в диапазоне от 0,07 до 2,34 нг/л, в то время как линейный диапазон был между 0,01 и 15 мкг/л.

Таким образом, определение стероидных гормонов в водных объектах методом твердофазной микроэкстракции без дериватизации остается малоизученным. На сегодняшний день опубликована статья по определению этинилэстрадиола методом ТФМЭ без дериватизации [22]. В работе проведены результаты оптимизации параметров ТФМЭ для определения нонилфенола, бисфенола и этинилэстрадиола. При выборе оптимального экстракционного покрытия (ПДМС 100 мкм, ПДМС/ДВБ 65

мкм, ПА 85 мкм), что является основным параметром при разработке методик с помощью метода ТФМЭ, построен график, на котором невозможно увидеть влияние двух первых волокон на ТФМЭ этинилэстрадиола. Нами была поставлена цель оптимизировать параметры твердофазной микроэкстракции для одновременного определения этинилэстрадиола и норгестрела в воде с применением ГХ-МС.

2. Эксперимент

2.1 Пробоподготовка и параметры хроматографии

Для оптимизации параметров твердофазной микроэкстракции использовали модельные водные образцы, загрязненные этинилэстрадиолом и норгестрелом. Данные соединения являются активными компонентами гормонального препарата «Ригевидон» (Gedeon Richter, Венгрия). Содержания этинилэстрадиола и норгестрела в одной таблетке равны 0,03 и 0,15 мг, соответственно. В качестве навески отбирали 2 таблетки данного лекарственного препарата, что соответствует 0,06 мг этинилэстрадиола и 0,30 мг. Химические свойства и структурные формулы гормонов представлены в таблице 2.

Для приготовления модельных образцов 2 таблетки препарата «Ригевидон» измельчали в фарфоровой ступке до однородной массы. Полученную массу перемещали в вialу объемом 20 мл, добавляли 2 мл питьевой воды (питьевая озонированная природная вода «Samal», ТОО «Керемет су СКЕ», Алматы, РК) и добавляли 0,7 г хлорида натрия (NaCl, х.ч., ГОСТ 4233-77, ТОО «Лаборфарма», Алматы, РК) для улучшения перехода анализируемых веществ в газовую фазу за счет «солевого эффекта». Концентрации этинилэстрадиола и норгестрела в водном образце составляла 15,0 мг/л и 75,0 мг/л, соответственно.

Анализ гормонов в воде проводили с использованием газового хроматографа Agilent 7890A (Agilent, США) с хроматографической колонкой DB-35MS (30м x 0,25мм x 0,25 мкм). Идентификацию гормонов совершали с помощью масс-спектрометрического детектора 5975C (Agilent, США). Экстракцию проводили с помощью автосамплера MPS (Gerstel, Германия). Параметры ввода, разделения и определения аналитов приведены в таблице 3.

Для управления системой газовой хроматографии, регистрации и обработки полученных результатов и данных использовали программное обеспечение Agilent MSD ChemStation (версия 1701EA). Обработка данных включала в себя определение времен удерживания, высот и площадей пиков, а также обработку спектральной информации, полученной с помощью масс-спектрометрического детектора. Для расшифровки полученных масс-спектров использовали библиотеки Wiley 7th edition и NIST'02 (общее количество спектров в библиотеках – более 550 тыс.).

Оптимизация твердофазной микроэкстракции гормонов из водных образцов включала в себя выборы

Таблица 2 – Химические свойства и структурные формулы анализов

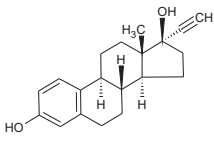
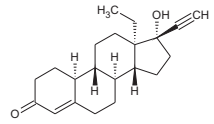
Название гормона	Структурная формула	Молекулярная масса	CAS-номер	$\log K_{ow}$	pK_a	m/z
Этинилэстрадиол		296	57-63-6	3,67	10,4	213 (99)
Норгестрел		312	6533-00-2	3,5	13,09	245 (99)

Таблица 3 – Параметры анализа гормонов в водных образцах методом ТФМЭ/ГХ/МС

Параметры	Значения
Температура устройства для ввода пробы	240°C
Режим ввода пробы	без деления потока
Скорость газа-носителя (гелий)	1 мл/мин (постоянный поток)
Температура хроматографирования	80°C (выдержка 1 мин), нагрев до 200°C со скоростью 40°C/мин, нагрев до 300°C со скоростью 12,5°C/мин (выдержка 10 мин)
Режим детектирования	SCAN, m/z 34–950
Время анализа, мин	22
Время задержки растворителя, мин	13,0
Время удерживания анализов, мин	Этинилэстрадиол - 15,0 ($\pm 0,05$) Норгестрел - 15,6 ($\pm 0,02$)

экстракционного покрытия, времени и температуры экстракции, и установление влияния добавления хлорида натрия. Все анализы проводили в двух параллелях.

2.2 Выбор оптимального экстракционного покрытия

В ходе проведения исследований по выбору оптимального экстракционного покрытия использовали следующие типы волокон:

- 100 мкм Полидиметилсилоксан (ПДМС);
- 50/30 мкм Дивинилбензол/Карбоксен/Полидиметилсилоксан (ДВБ/КАР/ПДМС);
- 65 мкм Полидиметилсилоксан/Дивинилбензол (ПДМС/ДВБ);
- 85 мкм Карбоксен/Полидиметилсилоксан (КАР/ПДМС), (Supelco, США).

Экстракцию гормонов проводили при 80°C в течение 20 мин, время преинкубации 10 мин. Время десорбции анализов в газовом хроматографе составило 10 мин.

2.3 Выбор оптимальной температуры экстракции

Эндокринные деструкторы обладают высокой температурой кипения, следовательно, для образования паровой фазы исследуемых анализов над образцом, необходимы температуры, значительно превышающие комнатную. В ходе оптимизации были опробованы следующие значения температур: 70, 80 и 90°C. Для проведения анализа использовали следующие параметры: экстракционное покрытие – 100 мкм ПДМС; время экстракции 20 мин; время преинкубации 10 мин; время десорбции 10 мин.

2.4 Выбор оптимального времени экстракции

Для установления оптимального времени экстракции гормонов из водного образца методом ТФМЭ были апробированы следующие времена: 5, 10, 15, 20 и 25 мин. Оптимизацию проводили при следующих параметрах: экстракционное покрытие – 100 мкм ПДМС; температура экстракции 80°C; время преинкубации 20 мин; время десорбции 10 мин.

2.5 Установление влияния добавки соли и pH раствора на ТФМЭ этинилэстрадиола и норгестрела из водных образцов

Добавление соли влияет на процесс экстракции органических соединений из водного образца. Солевой эффект основывается на действии сильного электролита, такого как NaCl, который повышает ионную силу раствора и способствует более интенсивному переходу органических соединений в газовую фазу. Для определения влияния добавки соли на процесс экстракции были взяты разные массы NaCl: 0,5; 1; 1,5 и 2 г. Экстракцию анализов проводили при следующих параметрах: экстракционное покрытие – 100 мкм ПДМС; температура экстракции 80 °С; время экстракции 20 мин; время десорбции 10 мин.

3. Результаты и обсуждения

3.1 Выбор оптимального экстракционного покрытия и температуры экстракции этинилэстрадиола и норгестрела

По результатам анализа водных образцов, загрязненных исследуемыми гормонами, установлено, что экстракционное покрытие на основе 100 мкм ПДМС обеспечивает наибольшую эффективность экстракции анализов из водного образца (рисунок 1 А).

Экстракционное покрытие на основе КАР/ПДМС является волокном адсорбционного типа и обеспечивает экстракцию биполярных соединений с молекулярными массами 30-225 [36]. Поскольку эндокринные деструкторы (этинилэстрадиол и норгестрел) – это соединения с довольно высокими молекулярными массами (296 и 312, соответственно), волокно на основе КАР/ПДМС не обеспечивает извлечение таких соединений.

Тройное волокно на основе ДВБ/КАР/ПДМС является адсорбционным волокном, которое позволяет в основном экстрагировать полярные летучие и полунлетучие

соединения с молекулярными массами от 40 до 275 и имеющие различные свойства (C_2-C_{20}) [36]. Данное волокно с тройным покрытием также оказалось менее эффективным для экстракции гормонов из газовой фазы, так как аналиты имеют большие молекулярные массы и являются неполярными соединениями.

По сравнению с волокнами на основе КАР/ПДМС и ДВБ/КАР/ПДМС, волокно на основе ПДМС/ДВБ показало значительно лучшую эффективность извлечения эндокринных деструкторов из газовой фазы, что обусловлено селективностью волокна к неполярным соединениям с большими молекулярными массами.

Экстракционное покрытие на основе ПДМС/ДВБ относится к адсорбционному типу волокон, обеспечивающих экстракцию средне полярных соединений с молекулярными массами 50-300 [36].

Наилучшую экстракционную способность гормонов показало волокно на основе ПДМС, что обусловлено составом полимерного покрытия ПДМС. Волокно на основе ПДМС является абсорбционным волокном и обеспечивает экстракцию летучих и полунлетучих аналитов с молекулярными массами 60-275 [36]. Данное волокно позволяет веществам с большими молекулярными массами легко проникать из газовой фазы в полимерное покрытие.

Таким образом, наиболее селективным экстракционным покрытием для анализа этинилэстрадиола и норгестрела в воде методом ТФМЭ над образцом является волокно на основе 100 мкм ПДМС.

Результаты эксперимента (рисунок 1 Б), представленные в виде графика зависимости площади пика аналитов от температуры экстракции, показали, что с повышением температуры экстракции с 70 до 90 градусов повышается степень извлечения исследуемых аналитов. Температура 90°С для этинилэстрадиола и норгестрела обеспечивает максимальное значение отклика и увеличивает отклик гормонов в 10 раз. Во избежание увеличения давления

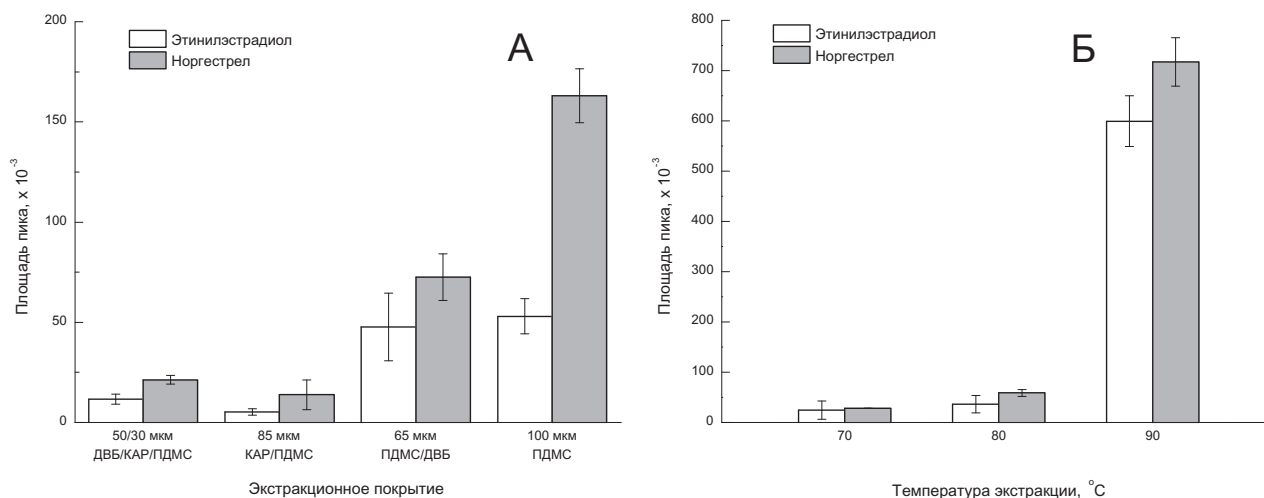


Рисунок 1 – Выбор оптимального экстракционного покрытия и температуры для ТФМЭ этинилэстрадиола и норгестрела из водных образцов

паров воды в виае при температуре 90°C необходимо уменьшить время экстракции, либо проводить ТФМЭ этинилэстрадиола и норгестрела из воды при температуре 80°C при времени экстракции 35 минут.

3.2 Выбор оптимального времени экстракции

Согласно полученным результатам (рисунок 2), увеличение времени экстракции приводит к возрастанию отклика гормонов. Максимальный отклик исследуемых гормонов достигается при 35 минутах экстракции. Однако при анализе реальных водных образцов следует учитывать влияние различных факторов, таких как эффект матрицы и присутствие других веществ в образце, которые могут быть летучими соединениями, ухудшающими извлечение целевых гормонов при длительной экстракции. В связи с этим при анализе гормонов принято проводить экстракцию при 35 мин, для максимального извлечения эндокринных деструкторов.

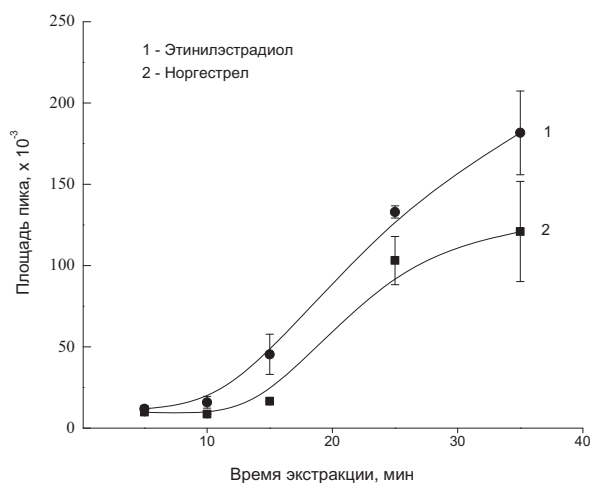


Рисунок 2 – Зависимость площадей пиков эндокринных деструкторов от времени экстракции

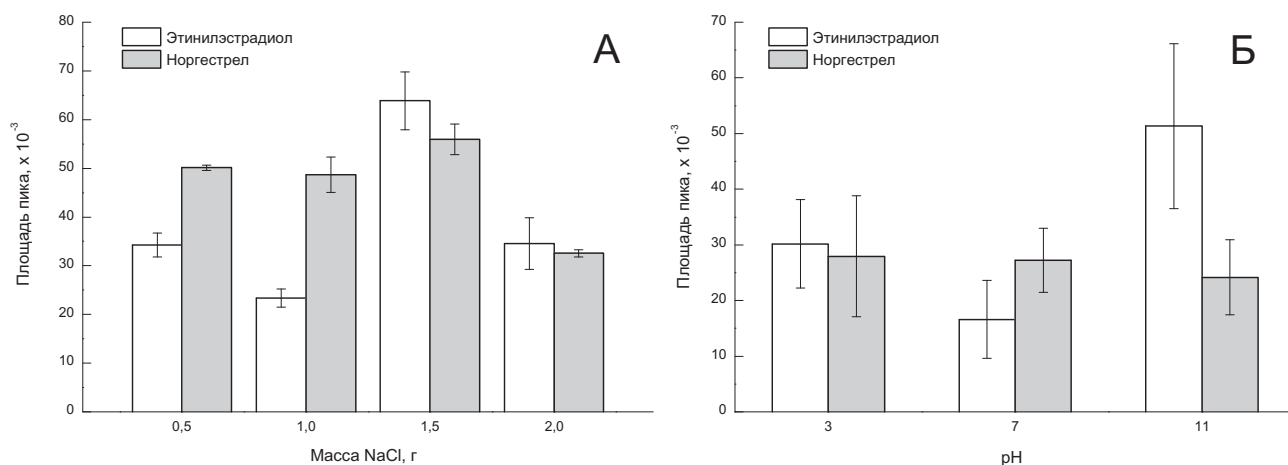


Рисунок 3 – Влияние добавки соли и pH раствора на ТФМЭ этинилэстрадиола и норгестрела

3.3 Изучение влияния добавки соли и pH воды на ТФМЭ этинилэстрадиола и норгестрела

Добавление соли значительно улучшает и ускоряет процесс перехода исследуемых гормонов в газовую фазу. Однако добавление 2 г соли к исследуемым растворам привело к спаду отклика аналитов на 25%, что можно объяснить ограниченной растворимостью хлорида натрия в воде (около 31,0 г в 100 мл при температуре экстракции в 80°C). При превышении значения растворимости хлорида натрия в образце образуется твердая фаза соли, которая может задерживать на своей поверхности молекулы анализируемого вещества, не давая им перейти в газовую фазу. Добавление 2 г соли к образцу значительно превышает растворимость хлорида натрия в воде, тем самым ухудшая процесс извлечения исследуемых гормонов (рисунок 3 А).

При изучении влияния pH водного раствора на ТФМЭ гормонов было показано, что pH раствора не оказывает особого влияния на процесс твердофазной микроэкстракции этинилэстрадиола и норгестрела (рисунок 3 Б).

При добавлении 1,5 г соли к образцу воды образуется насыщенный раствор соли, позволяющий наиболее полно извлечь целевые аналиты. В связи с этим, принято добавлять 1,5 г соли при анализе водных образцов на содержание гормонов, не контролируя pH раствора.

На рисунке 4 представлена хроматограмма этинилэстрадиола и норгестрела в режиме сканирования (SCAN) в диапазоне масс от 34 до 950 а.е.м. Пределы обнаружения (сигнал/шум=3) для этинилэстрадиола и норгестрела составляют 0,56 и 2,14 мг/л, соответственно.

3.4 Анализ образцов питьевой воды с применением оптимизированных параметров твердофазной микроэкстракции

Для анализа образцов питьевой воды на содержание эндокринных деструкторов применяли оптимизированные

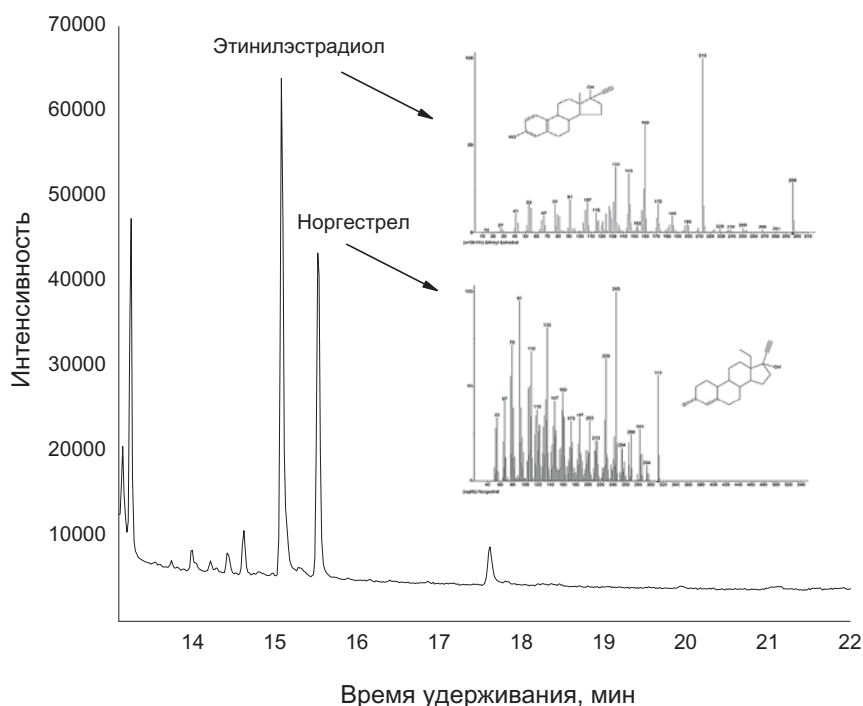


Рисунок 4 – ГХ-МС хроматограмма полученная при анализе водного образца с содержанием 1,5 г NaCl

параметры твердофазной микроэкстракции: экстракционное покрытие на основе 100 мкм полидиметилсилоксана, время преинкубации – 10 мин, время экстракции – 35 мин, температура экстракции 90°C, время десорбции – 10 мин.

Согласно стандартам качества, в питьевой воде содержание хлорид-ионов не должно превышать 350 мг/л. Даже при максимально допустимом показателе содержание хлорид-ионов в образцах питьевой воды остается недостаточным для получения эффективного «солевого эффекта» при твердофазной микроэкстракции эндокринных деструкторов. Результаты определения хлорид-ионов анализируемых образцах питьевой воды, отобранных в городах Алматы и Тараз, методом титрования азотной кислотой ртутью в присутствии индикатора дивинилкарбазона показали наличие хлоридов в количестве 20-50 мг/л. В связи с этим, к образцам питьевой воды перед анализом методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием добавляли 1,5 г соли.

Результаты анализа образцов питьевой воды, отобранных в городах Алматы и Тараз, показали отсутствие эндокринных деструкторов в данных образцах. Однако следует учитывать тот факт, что данные образцы представляют собой пробы питьевой воды, подвергающейся нескольким стадиям очистки от всевозможных загрязнителей.

4. Заключение

Результаты исследования показали, что метод ТФМЭ позволяет определить синтетические стероидные гормоны – этинилэстрадиол и норгестрел, в модельных

водных образцах. Оптимальные параметры твердофазной микроэкстракции этинилэстрадиола и норгестрела из газовой фазы над образцом питьевой воды: экстракционное покрытие – 65 мкм ДВБ/ПДМС, температура экстракции – 80°C, время экстракции – 20 мин, масса добавленной соли – 1,5 г.

При апробации метода на образцах питьевой воды этинилэстрадиол и норгестрел обнаружены не были, что может быть связано с проведением очистки питьевой воды.

В связи с тем, что в настоящее время спрос на лекарства со стероидными гормонами возрастает, существует риск фальсификации, т.е. замены дорогих компонентов более дешевыми или снижение содержания необходимого компонента лекарства. С помощью оптимизированных параметров твердофазной микроэкстракции гормонов и масс-спектрометрического детектора можно проводить качественный анализ лекарственных препаратов на основе этинилэстрадиол и норгестрел для установления их подлинности.

Благодарности

Данное исследование проведено в рамках проекта 5155/ГФ4 «Разработка методической базы для выявления эндокринных деструкторов в водных ресурсах Республики Казахстан» при поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан.

Список литературы

- 1 Singh B., Kumar A., Malik A. K. Recent advances in sample preparation methods for analysis of endocrine disruptors from various matrices // *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. – 2014. – Vol. 44(3). – P. 255-269.
- 2 Azzouz A., Ballesteros E. Trace analysis of endocrine disrupting compounds in environmental water samples by use of solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometry detection // *Journal of Chromatography A*. – 2014. – Vol. 1360. – P. 248-257.
- 3 Mansilha C., Melo A., Rebelo H., Ferreira I.M.P.L.V.O, Pinho O., Domingues V., Pinho C., Gameiro P. Quantification of endocrine disruptors and pesticides in water by gas chromatography–tandem mass spectrometry. Method validation using weighted linear regression schemes // *Journal of Chromatography A*. – 2010. – Vol. 1217. – P. 6681–6691.
- 4 Tan B.L.L., Hawker D.W., Muller J. F., Tremblay L.A., Chapman H. F. Stir bar sorptive extraction and trace analysis of selected endocrine disruptors in water, biosolids and sludge samples by thermal desorption with gas chromatography–mass spectrometry // *Water Research*. – 2008. – Vol.42. - P. 404-412.
- 5 Gilbert N. Drug-pollution law all washed up // *Nature*. – 2012. – Vol. 491, Is. 7425. – P. 503-504. Web-page: <http://www.nature.com/news/drug-pollution-law-all-washed-up-1.11854>
- 6 В важном докладе ООН изучены последствия воздействия на людей химических веществ, разрушающих гормоны // Центр СМИ Всемирной организации здравоохранения. – 2013. http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2013/hormone_disrupting_20130219/ru/
- 7 Huang C., Sedlak D. Analysis of estrogenic hormones in municipal wastewater effluent and surface water using enzyme-linked immunosorbent assay and gas chromatography/tandem-mass spectrometry // *Environmental Toxicology and Chemistry*. – 2001. – Vol. 20(1). – P. 133-139.
- 8 Li Z., Wang S., Alice Lee N., Allan R. D., Kennedy I.R. Development of a solid-phase extraction–enzyme-linked immunosorbent assay method for the determination of estrone in water // *Analytica Chimica Acta*. – 2004. – Vol. 503(2). – P. 171-177.
- 9 Desbrow C., Routledge E. J., Brighty G. C., Sumpter J. P., Waldock M. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening // *Environmental Science and Technology*. – 1998. – Vol. 32(11). – P. 1549-1558.
- 10 Larsson D.G.J., Adolfsson-Erici M., Parkkonen J., Pettersson M., Berg A.H., Olsson P.E., Förlin L. Ethinyloestradiol - An undesired fish contraceptive? // *Aquatic Toxicology*. – 1999. – Vol. 45(2-3). – P. 91-97.
- 11 Rodgers-Gray T.P., Jobling S., Morris S., Kelly C., Kirby S., Janbakhsh A., Harries J.E., Waldock M.J., Sumpter J.P., Tyler C.R. Long-term temporal changes in the estrogenic composition of treated sewage effluent and its biological effects on fish // *Environmental Science and Technology*. – 2000. – Vol. 34(8). – P. 1521-1528.
- 12 Barber L.B., Brown G.K., Zaugg S.D. Potential endocrine disrupting organic chemicals in treated municipal wastewater and river water // *ACS Symposium Series*. – 1999. – Vol. 747. – P. 97-123.
- 13 Siegener R., Chen R.F. Detection of pharmaceuticals entering Boston Harbor // *ACS Symposium Series*. – 2000. – Vol. 747. – P. 125-132.
- 14 Kuch H. M., Ballschmiter K. Determination of endogenous and exogenous estrogens in effluents from sewage treatment plants at the ng/L-level // *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. – 2000. – Vol. 366(4). – P. 392-395.
- 15 Johnson C., Belfroid A., Di Corcia A. Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent // *Science of the Total Environment*. – 2000. – Vol. 256(2-3). – P. 163-173.
- 16 Jones-Lepp T.L., Alvarez D.A., Petty J.D., Huckins J.N. Polar organic chemical integrative sampling and liquid chromatography-electrospray/ion-trap mass spectrometry for assessing selected prescription and illicit drugs in treated sewage effluents // *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. – 2004. – Vol. 47(4). – P. 427-439.
- 17 Ternes T.A., Stumpf M., Mueller J., Haberer K., Wilken R.D., Servos M. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil // *Science of the Total Environment*. – 1999. – Vol. 225(1-2). – P. 81-90.
- 18 Voulvoulis N. Methods for the determination of endocrine disrupters. In: *Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Processes*. CRC Press LLC, NY. – 2003. – Ch. 3. – P. 59-101.
- 19 Labadie P., Budzinski H. Development of an analytical procedure for determination of selected estrogens and progestagens in water samples // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2005. – Vol. 381(6). – P. 1199-1205.
- 20 Jeannot R., Sabik H., Sauvard E., Dagnac T., Dohrendorf K. Determination of endocrine-disrupting compounds in environmental samples using gas and liquid chromatography with mass spectrometry // *Journal of Chromatography A*. – 2002. – Vol. 974(1-2). – P. 143-159.
- 21 Xiao X.Y., McCalley D.V., McEvoy J. Analysis of estrogens in river water and effluents using solid-phase extraction and gas chromatography-negative chemical ionisation mass spectrometry of the pentafluorobenzoyl derivatives // *Journal of Chromatography A*. – 2001. – Vol. 923(1–2). – P. 195-204.

- 22 Braun P., Moeder M., Schrader S., Popp P., Kuschik P., Engewald W. Trace analysis of technical nonylphenol, bisphenol A and 17[alpha]-ethinylestradiol in wastewater using solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry // *Journal of Chromatography A*. – 2003. – Vol. 988(1). – P. 41-51.
- 23 Noppe H. et al. Occurrence of estrogens in the Scheldt estuary: A 2-year survey // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2007. – Vol. 66(1). – P. 1-8.
- 24 Mol H. G., Sunarto S., Steijger O. M. Determination of endocrine disruptors in water after derivatization with N-methyl-N-(tert-butyl)dimethyltrifluoroacetamide) using gas chromatography with mass spectrometric detection // *Journal of Chromatography A*. – 2000. – Vol. 879 (1). – P. 97-112.
- 25 Labadie P., Budzinski H. Determination of steroidal hormone profiles along the Jalle d'Eysines River (near Bordeaux, France) // *Environmental Science and Technology*. – 2005. – Vol. 39(14). – P. 5113-5120.
- 26 Stanford B. D., Weinberg H. S. Isotope dilution for quantitation of steroid estrogens and nonylphenols by gas chromatography with tandem mass spectrometry in septic, soil, and groundwater matrices // *Journal of Chromatography A*. – 2007. – Vol. 1176(1-2). – P. 26-36.
- 27 Florez Menendez J. C., Fernandez Sanchez M. L., Sanchez Uria J. E., Fernandez Martenez E., Sanz-Medel A. Static headspace, solid-phase microextraction and headspace solid-phase microextraction for BTEX determination in aqueous samples by gas chromatography // *Analytica Chimica Acta*. – 2000. – Vol. 415(1-2). – P. 9–20.
- 28 Fernandez M. P., Ikononou M. G., Buchanan I. An assessment of estrogenic organic contaminants in Canadian wastewaters // *Science of the Total Environment*. – 2007. – Vol. 373(1). – P. 250-269.
- 29 Farahani H., Ganjali M. R., Dinarvand R., Norouzi P. Screening method for phthalate esters in water using liquid-phase microextraction based on the solidification of a floating organic microdrop combined with gas chromatography-mass spectrometry // *Talanta*. – 2008. – Vol. 76(4). – P. 718-723.
- 30 Zhao J.L., Ying G.G., Wang L., Yang J.F., Yang X.B., Yang L.H., Li X. Determination of phenolic endocrine disrupting chemicals and acidic pharmaceuticals in surface water of the Pearl Rivers in South China by gas chromatography-negative chemical ionization-mass spectrometry // *Science of the Total Environment*. – 2009. – Vol. 407(2). – P. 962-974.
- 31 Martinez C., Ramirez N., Gomez V., Pocurull E., Borrull F. et al. Simultaneous determination of 76 micropollutants in water samples by headspace solid phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry // *Talanta* – 2013. – Vol. 116. – P. 937-945.
- 32 Mousa A., Basheer C., Al-Arfaj AR et al. Application of electro-enhanced solid-phase microextraction for determination of phthalate esters and bisphenol A in blood and seawater samples // *Talanta* – 2013. – Vol. 115. – P. 308-313.
- 33 Boitsov S., Meier S., Klungsoyr J., Svardal A. Gas chromatography–mass spectrometry analysis of alkylphenols in produced water from offshore oil installations as pentafluorobenzoate derivatives // *Journal of Chromatography A*. – 2004. – Vol. 1059. – P. 131-141.
- 34 Cantero M., Rubio S., Pérez-Bendito D. Determination of alkylphenols and alkylphenol carboxylates in wastewater and river samples by hemimicelle-based extraction and liquid chromatography–ion trap mass spectrometry // *Journal of Chromatography A*. – 2006. – Vol. 1120. – P. 260-267.
- 35 Shan X. M., Shen D. H., Wang B. S., Lu B. B., Huang F. Y. Simultaneous determination of bisphenols and alkylphenols in water by solid phase extraction and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *Biomedical and Environmental Sciences* – 2014. – Vol. 27. – P. 471-474.
- 36 Risticvic S., Lord H., Górecki T., Arthur C. L., Pawliszyn J. Protocol for solid-phase microextraction method development // *Nature Protocols*. – 2010. – Vol. 5. – P. 122-139.

References

- 1 Singh B, Kumar A, Malik AK (2014) *Crit Rev Anal Chem* 44:255-269. <http://dx.doi.org/10.1080/10408347.2013.859981>
- 2 Azzouz A, Ballesteros E (2014) *J Chromatogr A* 1360:248-257. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.07.059>
- 3 Mansilha C, Melo A, Rebelo H, Ferreira IMPLVO, Pinho O, Domingues V, Pinho C, Gameiro P (2010) *J Chromatogr A* 1217:6681-6691. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.05.005>
- 4 Tan BLL, Hawker DW, Muller JF, Tremblay LA, Chapman HF (2008) *Water Research* 42:404-412. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2007.07.032>
- 5 Gilbert N (2012) *Nature* 491:503-504. <http://www.nature.com/news/drug-pollution-law-all-washed-up-1.11854>
- 6 Media centre of 'World Health Organization', 19 Feb. (2013) Effects of human exposure to hormone-disrupting chemicals examined in landmark UN report. http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2013/hormone_disrupting_20130219/en/
- 7 Huang C, Sedlak D (2001) *Environ Toxicol Chem* 20:133-139. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.5620200114>
- 8 Li Z, Wang S, Alice Lee N, Allan RD, Kennedy IR (2004) *Anal Chim Acta* 503:171-177. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2003.10.026>
- 9 Desbrow C, Routledge EJ, Brighty GC, Sumpter JP, Waldock M (1998) *Environmental Science and Technology* 32:1549-1558. <http://dx.doi.org/10.1021/es9707973>

- 10 Larsson DGJ, Adolfsson-Erici M, Parkkonen J, Pettersson M, Berg AH, Olsson PE, Förlin L (1999) *Aquat Toxicol* 45:91-97. [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X\(98\)00112-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X(98)00112-X)
- 11 Rodgers-Gray TP, Jobling S, Morris S, Kelly C, Kirby S, Janbakhsh A, Harries JE, Waldock MJ, Sumpter JP, Tyler CR (2000) *Environmental Science and Technology* 34:1521-1528. <http://dx.doi.org/10.1021/es991059c>
- 12 Barber LB, Brown GK, Zaugg SD (1999) *ACS Symp Ser* 747:97-123. <http://dx.doi.org/10.1021/bk-2000-0747.ch007>
- 13 Siegener R, Chen RF (2000) *ACS ACS Symp Ser* 747:125-132. <http://dx.doi.org/10.1021/bk-2000-0747.ch008>
- 14 Kuch HM, Ballschmiter K (2000) *Fresen J Anal Chem* 366:392-395. <http://dx.doi.org/10.1007/s002160050080>
- 15 Johnson C, Belfroid A, Di Corcia A (2000) *Sci Total Environ* 256:163-173. [http://dx.doi.org/10.1016/S0048-9697\(00\)00481-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0048-9697(00)00481-2)
- 16 Jones-Lepp TL, Alvarez DA, Petty JD, Huckins JN (2004) *Arch Environ Con Tox* 47:427-439. <http://dx.doi.org/10.1007/s00244-004-3146-6>
- 17 Ternes TA, Stumpf M, Mueller J, Haberer K, Wilken RD, Servos M (1999) *Sci Total Environ* 225:81-90. [http://dx.doi.org/10.1016/S0048-9697\(98\)00334-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0048-9697(98)00334-9)
- 18 Voulvoulis N (2003) *Methods for the determination of endocrine disrupters*. In: *Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment processes*. CRC Press LLC, NY, USA.
- 19 Labadie P, Budzinski H (2005) *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 381:1199-1205. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-005-3055-1>
- 20 Jeannot R, Sabik H, Sauvard E, Dagnac T, Dohrendorf K (2002) *J Chromatogr A* 974:143-159. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01240-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01240-2)
- 21 Xiao XY, McCalley DV, McEvoy J (2001) *J Chromatogr A* 923:195-204. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00955-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00955-4)
- 22 Braun P, Moeder M, Schrader S, Popp P, Kusch P, Engewald W (2003) *J Chromatogr A* 988:41-51. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)02052-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(02)02052-6)
- 23 Noppe H, Verslycke T, De Wulf E, Verheyden K, Monteyne E, Van Caeter P, Janssen CR, De brabander HF (2007) *Ecotox Environ Safe* 66:1-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.04.005>
- 24 Mol HG, Sunarto S, Steijger OM (2000) *J Chromatogr A* 879:97-112. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00124-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00124-2)
- 25 Labadie P, Budzinski H (2005) *Environmental Science and Technology* 39:5113-5120. <http://dx.doi.org/10.1021/es048443g>
- 26 Stanford BD, Weinberg HS (2007) *J Chromatogr A* 1176:26-36. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2007.10.085>
- 27 Florez Menendez JC, Fernandez Sanchez ML, Sanchez Uria JE, Fernandez Martinez E, Sanz-Medel A (2000) *Anal Chim Acta* 415:9-20. [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)00862-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670(00)00862-X)
- 28 Fernandez MP, Ikonomou MG, Buchanan I (2007) *Sci Total Environ* 373:250-269. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.11.018>
- 29 Farahani H, Ganjali MR, Dinarvand R, Norouzi P (2008) *Talanta* 76:718-723. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2008.03.002>
- 30 Zhao JL, Ying GG, Wang L, Yang JF, Yang XB, Yang LH, Li X (2009) *Sci Total Environ* 407:962-974. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.09.048>
- 31 Martinez C, Ramirez N, Gomez V, Pocerull E, Borrull F et al (2013) *Talanta* 116:937-945. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2013.07.055>
- 32 Mousa A, Basheer C, Al-Arfaj AR et al (2013) *Talanta* 115:308-313. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2013.05.011>
- 33 Boitsov S, Meier S, Klungsoyr J, Svardal A (2004) *J Chromatogr A* 1059:131-141. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2004.09.084>
- 34 Cantero M, Rubio S, Pérez-Bendito D (2006) *J Chromatogr A* 1120:260-267. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2005.12.048>
- 35 Shan XM, Shen DH, Wang BS, Lu BB, Huang FY (2014) *Biomed Environ Sci* 27:471-474. <http://dx.doi.org/10.3967/bes2014.076>
- 36 Risticevic S, Lord H, Górecki T, Arthur CL, Pawliszyn J (2010) *Nature Protocols* 5:122-139. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2009.179>