

А.В.Никифорова, В.М.Левчик, М.Ф.Зуй

СОЧЕТАНИЕ ЖИДКОСТНОГО МИКРОЭКСТРАКЦИОННОГО КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ И ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПАРАБЕНОВ В ФОРМЕ АЦЕТИЛПРОИЗВОДНЫХ

Разработан простой и надежный метод микроэкстракционного концентрирования ацетилпроизводных метил-, этил- и пропилпарабенов из водных растворов с последующим газохроматографическим определением. Коэффициенты концентрирования и степени извлечения находились в пределах 260—270 и 96—100 % соответственно. Пределы обнаружения составляли 0.016 для метилпарабена, 0.015 — для этилпарабена, 0.013 мг/л — для пропилпарабена. Воспроизводимость методики подтверждена значениями относительного стандартного отклонения, что не превышало 7.8 %.

ВВЕДЕНИЕ. Парабены, алкиловые эфиры пара-гидроксibenзойной кислоты, широко используются во всем мире в качестве консервантов фармацевтических препаратов и косметических продуктов благодаря широкому спектру антимикробной активности; безопасности малых концентраций; стабильности в большом диапазоне рН; достаточно высокой растворимости в воде, термической устойчивости до 250 °С [1, 2]. Наиболее распространенными являются метил-, этил- и пропилпарабены, концентрация которых в различной продукции не превышает 0.4 %, если присутствует один парабен, или 0.8 % при содержании двух и более парабенов.

В течение многих десятилетий парабены считались безопасными веществами и не вызывали никаких сомнений у специалистов при применении их в различных продуктах. В последние годы появилась информация об эндокринной токсичности парабенов. Установлено, что данные соединения обладают низкой эстрогенной активностью и могут инициировать гормональные изменения в организмах, вызывать рост опухолей и негативно влиять на репродуктивную систему [3]. Известно, что наиболее токсичными являются парабены с более длинной цепью алкильного заместителя, а именно пропил-, бутил- и бензилпарабены, менее токсичны метил- и этилпарабены. Необходимость контроля содержания парабенов в различной продукции, а также в биологических и экологических пробах не вызывает сомнения, поэтому актуальным является усовершенствование существующих и разработка новых, экспрессных, простых и надежных методов их

выделения, концентрирования и определения.

Традиционным методом определения парабенов в фармацевтических препаратах и косметических продуктах является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с ультрафиолетовым детектором, имеющая чувствительность 5—10 мг/л [4], которая позволяет определять содержание данных компонентов в фармацевтических и косметических продуктах. Однако в присутствии примесей парабенов в промышленных образцах, а также в биологических и экологических пробах данные соединения могут находиться в микро- и нанограммовых концентрациях. Для выделения и концентрирования таких количеств парабенов широко применяют современный метод пробоподготовки микроэкстракцию. Из литературы известны методы выделения и концентрирования парабенов, которые основаны на капельной жидкостной микроэкстракции и последующем силилировании веществ [5], дисперсионной микроэкстракции (ДМЭ) парабенов без [6] и с применением дериватизации уксусным ангидридом [7] с последующим хроматографическим определением. Несмотря на преимущества разработанных методик: простоту, экспрессность, использование малых количеств токсичных органических растворителей, широкий диапазон определяемых концентраций, к их недостаткам можно отнести невысокую устойчивость системы при применении капельной МЭ, низкий предел обнаружения по $3s$ -критерию метилпарабена при ДМЭ. Предложенная авторами [7] методика ДМЭ ацетилпроизводных парабенов неэффективна при

анализе растворов с повышенным содержанием неорганических солей (ионная сила раствора ≥ 0.5), хотя такие образцы распространены среди фармацевтических, биологических и экологических проб.

Цель работы — разработка высокоэффективной методики дисперсионного микроэкстракционного концентрирования метил-, этил- и пропилпарабенов совместно с их ацилированием уксусным ангидридом в присутствии невысокого и повышенного солевого фона (ионная сила ≥ 0.5) для выделения микроколичеств данных соединений из водного раствора и сочетание этой методики с их газохроматографическим определением.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ. Использовали метил-, этил- и пропилпарабены квалификации фарм., а также органические растворители: толуол, этилацетат, ацетон, ацетонитрил, метанол, этанол, хлороформ, дихлорметан, тетрахлорметан, 1,1,1-трихлорэтан х.ч. Требуемые значения рН водного раствора создавали 0.1 и 1.0 моль/л растворами HCl и KOH, K₂CO₃, а также ацетатными буферными растворами с рН 3–6. Кислотность растворов контролировали с помощью рН-метра “рН-150 ми” со стеклянным электродом.

Анализ проб проводили на газовом хроматографе Agilent Technologies 6890N. Параметры газохроматографического анализа следующие: капиллярная колонка HP-5 (30 м×0.32 мм×0.25 мкм). Скорость потока газа-носителя (He) 2.5 см³/мин; температура печи 130 °С (2 мин), 130–230 °С (10 °С/мин), 230 °С (2 мин); температура испарителя — 300 °С, режим без деления потока (Splitless). Детектор пламенно-ионизационный, температура — 300 °С. Применяли гелий газообразный (сжатый), чистоты 99.9995 %; водород газообразный технический, марки А, чистоты 99.99 %; компрессор воздуха OMA OL 2/25 (Италия).

Исходные растворы парабенов с концентрацией 1.0 г/дм³ готовили растворением 10.0 мг навески каждого парабена в 10 см³ метанола и сохраняли в холодильнике. Рабочие растворы смеси парабенов с концентрацией каждого парабена 100 мг/дм³ получали разбавлением исходных метанолом и оставляли в холодильнике; растворы смеси парабенов меньшей концентрации — разбавлением предыдущих растворов дистиллированной водой в день проведения исследований.

Ацилирование и дисперсионную микроэк-

стракцию парабенов проводили следующим образом. В вials объемом 10 см³ вносили смесь парабенов определенной концентрации, дистиллированную воду (4.0–5.5 мл), 1 мл 25 %-го раствора хлорида натрия, 1.5 мл 0.1 моль/л раствора K₂CO₃, 10 мкл уксусного ангидрида, раствор перемешивали, добавляли смесь хлороформа с ацетонитрилом (85:400 мкл) и снова перемешивали. После чего проводили центрифугирование в течение 3 мин. Из образовавшейся капли экстракта отбирали 1.0 мкл с помощью микрошприца и инжестировали в газовый хроматограф.

Для анализа природных вод исходные пробы фильтровали через нейлоновый фильтр Millipore (0.45 мкм). Аликвотную часть фильтрата 8.0 мл помещали в вial объемом 10 мл, добавляли 0.25 г NaCl, 0.20 г K₂CO₃, 10 мкл уксусного ангидрида, перемешивали, добавляли смесь хлороформа с ацетонитрилом (85:400 мкл) и снова перемешивали, после чего центрифугировали в течение 3 мин. Из образовавшейся капли экстракта отбирали 1.0 мкл с помощью микрошприца и инжестировали в газовый хроматограф. Содержание парабенов в образце определяли по градуировочным графикам для метил-, этил- и пропилпарабенов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ. Для разделения и концентрирования парабенов из водных растворов была применена дисперсионная микроэкстракция. ДМЭ основана на введении смеси двух органических растворителей разной природы в водный раствор анализируемых веществ [8]. Один растворитель является неполярным или слабополярным, он не смешивается с водой, второй — полярным, хорошо растворяющимся как в воде, так и в неполярном растворителе. Первый принято называть экстракционным, второй — диспергирующим или диспергатором. В результате добавления данной смеси растворителей к водному раствору образуется устойчивая мелкодисперсная эмульсия. Полное извлечение веществ в органический слой происходит в течение секунд или максимум нескольких минут вследствие большой площади контакта поверхности между тысячами микрокапелек растворителя и водным раствором. После экстракции раствор центрифугируют для быстрого разделения двух фаз. Чаще всего в качестве экстракционных используют растворители, удельная плотность которых больше 1 г/см³. Тогда капля экстракта собира-

ется внизу виалы и из нее легко отобрать аликвотную часть для инъектирования в хроматограф.

Улучшение хроматографических характеристик парабе́нов достигали ацилированием с помощью уксусного ангидрида. Ацилирование и дисперсионную микроэкстракцию осуществляли в одном растворе последовательно: вначале проводили реакцию образования ацилпроизводных, которые выделяли в органическую фазу микроэкстракцией. Выбор оптимальных условий ацилирования парабе́нов начинали с подбора мольных соотношений парабе́н—уксусный ангидрид и рН среды. Из литературы известно, что реакции ацилирования обычно проводят в щелочной среде в неводных растворителях [9], в нашем исследовании — в водном растворе при добавлении большого избытка ацилирующего агента. Влияние рН водного раствора изучали в интервале от 3.6 до 12.0. Данные рис. 1 показывают, что образование ацилпроизводных парабе́нов является наиболее полным в интервале рН 8.5–9.3. В ки-

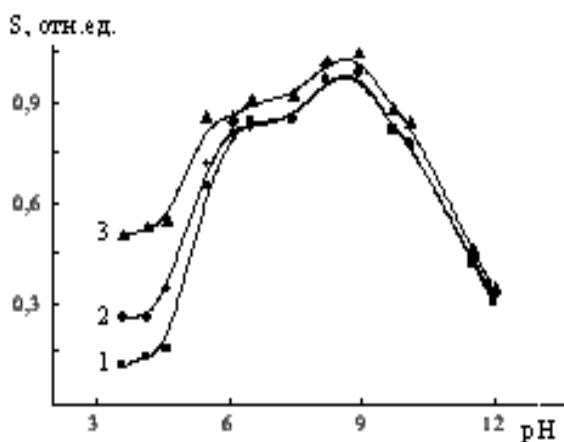


Рис. 1. Влияние рН водного раствора на площади пиков ацилпроизводных метил- (1), этил- (2), пропил- (3) парабе́нов. $C(\text{МП,ЭП,ПП}) = 1.0 \text{ мг/л}$; $V_{\text{водн}} = 8 \text{ мл}$; $V_{\text{уксусн.ангидр.}} = 10 \text{ мкл}$; $V_{\text{ацетонитрила}} = 300$; $V_{\text{хлороформа}} = 100 \text{ мкл}$; здесь и на рис. 2, 3 $C(\text{NaCl}) = 31 \text{ мг/мл}$.

слых, нейтральных и сильнощелочных средах площади хроматографических пиков ацилпарабе́нов уменьшаются, что может быть обусловлено гидролизом сложных эфиров пара-гидроксибензойной кислоты. Для дальнейших исследований был выбран интервал рН 8.5–9.3.

Изучено влияние содержания уксусного ангидрида на полноту выхода ацилированных веществ. Установлено, что для полного (100 %-го)

ацилирования парабе́нов (пики исходных парабе́нов на хроматограмме отсутствовали) достаточно 70–80-кратного мольного избытка уксусного ангидрида. В дальнейшем использовали 100-кратный мольный избыток уксусного ангидрида.

При оптимизации дисперсионной микроэкстракции парабе́нов исследовали различные экстракционные и диспергирующие растворители. Известно [8], что экстракционный растворитель должен быть малолетучим, слаборастворимым в воде и хорошо экстрагировать целевые компоненты. Растворители выбирали из органических жидкостей с плотностью больше, чем вода: тетрахлорметан, хлороформ, метиленхлорид, 1,1,1-трихлорэтан, а также толуол, который является лучшим в капиллярной микроэкстракции. В качестве диспергирующего растворителя использовали ацетонитрил.

Поскольку растворимость метиленхлорида и хлороформа в воде достаточно высока (17.5 и 8.09 г/л соответственно [10]), подбирали такие количества экстракционного растворителя, чтобы объем полученного экстракта был относительно постоянным и составлял $70 \pm 5 \text{ мкл}$. Как показано на рис. 2, а, наиболее эффективными оказались хлороформ и метиленхлорид, 1,1,1-трихлорэтан извлекал парабе́ны менее полно, четыреххлористый углерод и толуол проявили еще меньшую экстракционную способность. Поскольку для образования 70 мкл капли экстракта необходимо добавить меньшее количество хлороформа, чем метиленхлорида, для дальнейшего исследования был выбран хлороформ.

Диспергирующий растворитель должен хорошо смешиваться и с водой, и с экстракционным растворителем, а также способствовать формированию устойчивой мелкодисперсной эмульсии [8]. В качестве диспергатора были исследованы следующие растворители: метанол, ацетон, ацетонитрил, этанол, изопропанол, тетрагидрофуран. По результатам (рис. 2, б) сделан вывод о высокой диспергирующей способности ацетонитрила, метанола и этанола, что объясняется их хорошей диэлектрической проницаемостью и значительными дипольными моментами [10]. Для микроэкстракции парабе́нов можно использовать любой из данных растворителей, нами выбран ацетонитрил, поскольку его параметры полярности самые высокие [10].

Большое значение для ДМЭ имеют объемы

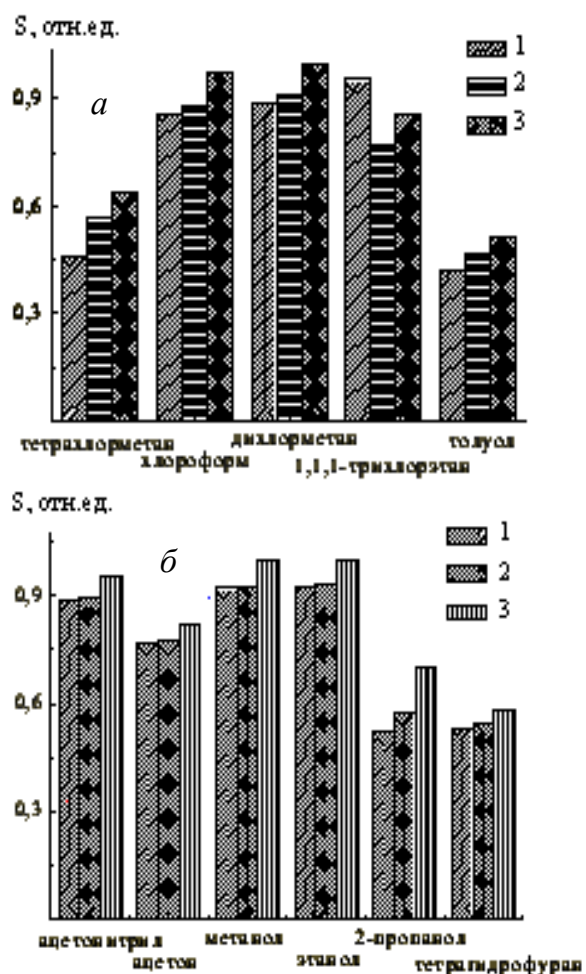


Рис. 2. Влияние экстракционного (а) и диспергирующего (б) растворителей на площади пиков ацетилпроизводных метил- (1), этил- (2), пропил- (3) парабеов. $V_{\text{ацетонитрила}}=300$ (а), $V_{\text{хлороформа}}=100$ мкл (б). Здесь и на рис. 3, 4 $C(\text{МП,ЭП,ПП})=1.0$ мг/л; $V_{\text{водн}}=8$ мл; $V_{\text{уксусн.ангидр.}}=10$ мкл.

экстракционного и диспергирующего растворителей. В работе [8] отмечается, что объем экстракционного растворителя должен быть минимальным, при котором можно отобрать пробу и получить воспроизводимые результаты. Из рис. 3,а видно, что наибольшие площади пиков ацилированных парабеов получены при минимальном объеме добавленного хлороформа — 70 мкл. Нами показано, что объем капли экстракта существенно меньше по сравнению с количеством добавленного хлороформа, что обусловлено частичной растворимостью хлороформа в воде [10]. Так, при добавлении смеси 85 мкл хлороформа и

300 мкл ацетонитрила к 8 мл воды объем образующейся капли хлороформа после центрифугирования составляет 25—30 мкл. В последующих экспериментах объем хлороформа равнялся 85 мкл, а уменьшение его количества приводило к снижению воспроизводимости результатов ($S_r > 10\%$).

Количество диспергатора, при котором достигается наименьшее разбавление водного раствора и образуется однородная мелкодисперсная эмульсия, также должно быть минимальным. Как

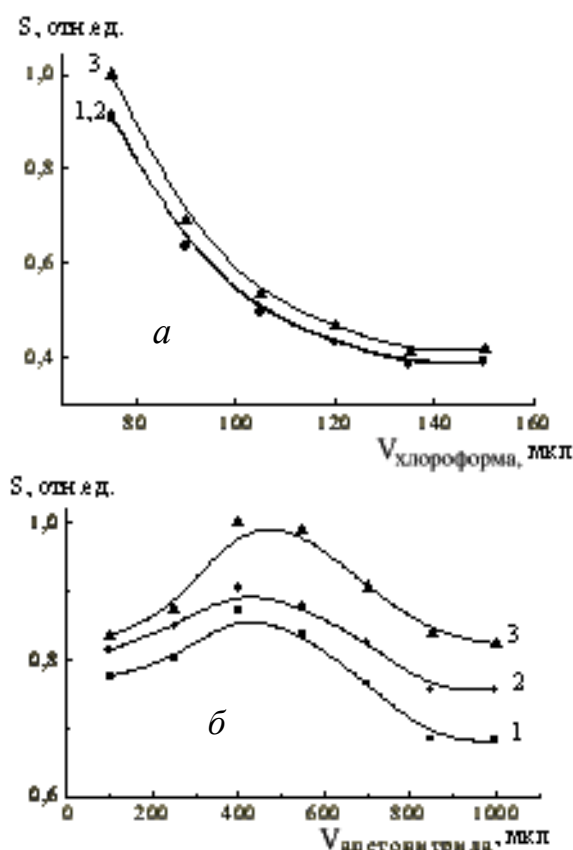


Рис. 3. Влияние объема хлороформа (а) и ацетонитрила (б) на площади пиков ацетилпроизводных метил- (1), этил- (2), пропил- (3) парабеов. $V_{\text{ацетонитрила}}=300$ (а); $V_{\text{хлороформа}}=85$ мкл (б).

показано на рис. 3,б, наиболее полно производные парабеов извлекаются при 400—500 мкл ацетонитрила. При уменьшении его количества площади пиков ацилпарабеов немного понижаются, что, вероятно, обусловлено недостаточным диспергирующим действием растворителя. Менее эффективное извлечение производных парабеов при добавлении 500 мкл и более ацетонитрила, во-

зможно, связано с большим разбавлением раствора и ухудшением экстракции веществ. Кроме того, при добавлении значительных количеств (более 700 мкл) диспергатора могут образовываться крупные капли экстракта, которые делятся на несколько, что приводит к невоспроизводимым результатам.

Добавки сильных электролитов, например, NaCl, неоднозначно влияют на извлечение органических соединений из водной в органическую фазу [8]. С одной стороны, они могут повышать полноту выделения соединений вследствие солевого эффекта, а с другой — солевые добавки приводят к образованию в водном растворе больших гидратированных ионов соли, что может вызывать уменьшение коэффициентов диффузии и скорости диффузии больших малополярных органических молекул из-за пространственных затруднений и, соответственно, приводит к уменьшению полноты извлечения соединений.

Данные рис. 4 указывают на негативное влияние добавок NaCl на дисперсионную микроэкстракцию ацилпарабенов, что объясняется уменьшением скорости диффузии соединений из водной в органическую фазу при увеличении количества гидратированных ионов натрия и хлора. В дальнейшем исследовании содержание NaCl в

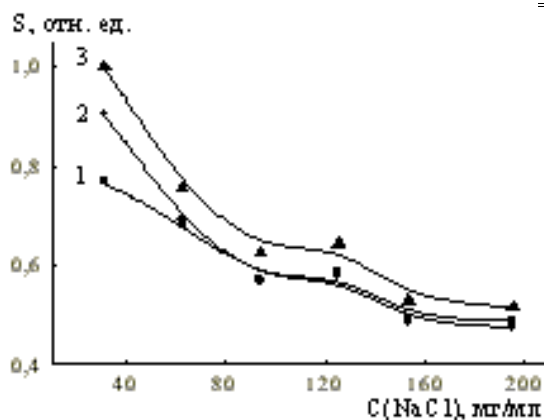


Рис. 4. Влияние концентрации NaCl на площади пиков ацилпроизводных метил- (1), этил- (2), пропил- (3) парабенов. $V_{\text{хлороформа}} = 85$, $V_{\text{ацетонитрила}} = 400$ мкл.

Т а б л и ц а 1

Некоторые количественные характеристики дисперсионной микроэкстракции и ГХ/ПИД-определения ацетилпарабенов

Соединение	Предел обнаружения *	Предел количественного определения **	K	R, %
	мг/л			
Ацетилметилпарабен	0.016	0.054	262	96
Ацетилэтилпарабен	0.015	0.050	257	100
Ацетилпропилпарабен	0.013	0.042	272	100

* По $3s$ -критерию, ** по $10s$ -критерию; K — коэффициент концентрирования; R — степень извлечения.

Т а б л и ц а 2

Результаты ГХ/ПИД-анализа природных вод на содержание парабенов после ДМЭ-концентрирования ($P=0.95$; $n=3$)

Объект	Компонент	Введено	Найдено	S_r , %	
		мг/л			
Озеро, Оболонская набережная	Метилпарабен	—	0.05 ± 0.01	12.0	
		0.05	0.12 ± 0.03	3.0	
		0.10	0.15 ± 0.01	6.0	
Озеро Белое	Этилпарабен	0.05	0.05 ± 0.03	2.0	
		Пропилпарабен	0.05	0.05 ± 0.02	4.0
			Метилпарабен	—	0.48 ± 0.01
0.05	0.13 ± 0.02	6.0			
0.10	0.15 ± 0.01	5.0			
Озеро Белое	Этилпарабен	0.05	0.05 ± 0.01	3.2	
		Пропилпарабен	0.05	0.05 ± 0.04	1.8

водном растворе было постоянным и составляло 30 мг/мл. Тем не менее из рисунка следует, что применение микроэкстракционного концентрирования при солевом содержании 50 мг/мл и более возможно, несмотря на уменьшение площадей пиков ацилпарабенов примерно на треть. Для нивелирования влияния солевой матрицы анализ проб с повышенным содержанием NaCl необходимо проводить методом добавок при постоянных параметрах ДМЭ — объемах экстракционного и диспергирующего растворителя, pH, времени центрифугирования.

Рассчитаны некоторые количественные характеристики дисперсионной микроэкстракции ацетилпарабенов и их ГХ/ПИД-определения. Как

видно из табл. 1, разработанная методика ацилирования и микроэкстракционного концентрирования парабенов позволяет достичь практически 100 %-х степеней извлечения и высоких коэффициентов концентрирования (260—270), а также низких пределов обнаружения.

Разработанная гибридная методика ацилирования и дисперсионной микроэкстракции парабенов была применена для выделения и концентрирования метил-, этил- и пропилпарабенов с последующим ГХ/ПВД-определением в пробах природных вод (табл. 2). Полученные результаты свидетельствуют, что разработанная методика микроэкстракционного концентрирования ацилированных парабенов совместно с ГХ/ПВД-определением характеризуется достаточно высокой точностью и воспроизводимостью ($S_r, \% = 1.4\text{—}7.8$).

РЕЗЮМЕ. Розроблено просту і надійну методику мікроекстракційного концентрування ацетилпохідних метил-, етил- та пропілпарабенів з водних розчинів з наступним газохроматографічним визначенням. Коефіцієнти концентрування та ступені вилучення знаходилися в межах 260—270 та 96—100 % відповідно. Межі виявлення становили 0.016 для метилпарабену, 0.015 — для етилпарабену, 0.013 мг/л — для пропілпарабену. Відтворюваність методики підтверджена значеннями відносного стандартного відхилення, що становило не більше 7.8 %.

Киевский национальный университет
им. Тараса Шевченко

SUMMARY. A simple and reliable method of microextraction preconcentration from water solutions and following gas chromatographic determination of acetyl-derivatives of methyl-, ethyl-, propylparabens has been developed. The enrichment factors and extraction recoveries were obtained in the range of 260—270 and 96—100 % respectively. Limit of detection for methylparaben was 0.016, for ethylparaben was 0.015, for propylparaben was 0.013 mg/l. Reproducibility was acceptable with relative standard deviation up to 7.8 %.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ocana-Gonzalez J.A., Villar-Navarro M., Ramos-Payan M. et al.* // *Analyt. Chim. Acta.* -2015. -**858**. -P. 1—15.
2. *Baranowska I., Wojciechowska I.* // *Pol. J. Environ. Study.* -2013. -**22**, № 6. -P. 1609—1625.
3. *Scientific Committee on consumer safety (SCCS).* Opinion on parabens // COLIPA n° P82. SCCS/1348/10. -Rev. 22 March 2011. -P. 1—38.
4. *Zimmerman D.C., Rossi H.F., Keating D.W. et al.* // *Agilent Technologies, Inc.* -2013. -Printed in the USA, July 11, 2013. -5991 – 2735EN.
5. *Saraji M., Mirmahdieh S.* // *J. Sep. Sci.* -2009. -**32**. -P. 988—995.
6. *Prichodko A., Sakociute V., Vickackaite V.* // *Chemija.* -2010. -**21**, № 2—4. -P. 112—117.
7. *Prichodko A., Janenaite E., Smitiene V. et al.* // *Acta Chromatographica.* -2012. -**24**, № 4. -P. 589—601.
8. *Крылов В.А., Крылов А.В., Мосягин П.В., Маткивская Ю.О.* // *Журн. аналит. химии.* -2011. -**66**, № 4. -С. 341—360.
9. *Беккер Х.* *Органикум.* -М.: Мир, 2008. -Т. 1.
10. *Гороновский И.Т., Назаренко Ю.П., Некряч Е.Ф.* *Краткий справочник по химии.* -Киев: Наук. думка, 1974.

Поступила 16.04.2015