

Chromatograficzne metody oznaczania parabenów w próbkach środowiskowych i kosmetykach (cz. I)

Aleksandra Kozarska, Iwona Krzyżewska

Wraz z rozwojem przemysłu kosmetycznego i farmaceutycznego, obserwowany jest również udział parabenów w produktach dostępnych na rynku. Parabeny są to pochodne kwasu 4-hydroksybenzoesowego i różnią się pomiędzy sobą długością i rozgałęzieniem łańcucha alkilowego. Występowanie parabenów w tak wielu produktach zwróciło uwagę na konieczność zbadania ich wpływu na organizmy żywe. Oznaczanie parabenów w próbkach środowiskowych i kosmetykach musi jednak zostać poprzedzone odpowiednim przygotowaniem próbki, mającym na celu poprawę jakości analizy. Najczęściej stosowane metody oznaczania parabenów w próbkach to: chromatografia gazowa, wysokosprawna chromatografia cieczowa, kapilarna elektroforeza, micelarna elektrokinetyczna chromatografia.

Wstęp

Przemysł kosmetyczny jest jednym z najbardziej rozwijających się przemysłów w ostatnich dekadach. Obecnie wprowadzane są na rynek światowy coraz nowsze i bardziej zaawansowane nowinki kosmetyczne, które mają na celu pielęgnację skóry oraz utrzymanie prawidłowej kondycji włosów, skóry i paznokci. Stosowane są kosmetyki:

- których stosowanie wiąże się z użyciem wody, w celu spłukania ich zawartości ze skóry, z włosów (żele pod prysznic, szampony i odżywki, płyny do kąpieli, mydła);
- których stosowanie nie wymaga użycia wody (kosmetyki kolorowe, balsamy, kremy, serum).

Podziałów kosmetyków jest wiele, bowiem można je zakwalifikować według części ciała na które są stosowane,

według płci, według funkcji, które spełniają oraz na ich charakter (np. środki czyszczące i myjące, środki pielęgnujące i ochronne, środki zapachowe oraz kosmetyki kolorowe) [10].

W ostatnich latach powszechne są również dermokosmetyki oraz preparaty farmaceutyczne, które dodatkowo w swoim składzie zawierają aktywne substancje biologiczne, dzięki którym działanie dermokosmetyków jest podobne do działania leków [1, 4].

W skład kosmetyków, oprócz substancji aktywnych, substancji pomocniczych i zapachowych, wchodzi również substancje konserwujące, zapobiegające rozwojowi mikroorganizmów bakteryjnych i grzybiczych. Tymi substancjami są parabeny, czyli estry kwasu 4-hydroksybenzoesowego, różniące się w swej strukturze

długością i rozgałęzieniem łańcucha alkilowego. Najbardziej powszechnymi parabenami są: metylparaben (MP), etylparaben (ET), propylparaben (PP), butylparaben (BP). Parabeny dzięki właściwościom przeciwdrobnoustrojowym oraz niskiej toksyczności, mogą być stosowane w produkcji kosmetyków, farmaceutyków, oraz niektórych produktów żywnościowych [1, 16].

Oznaczanie parabenów w próbkach kosmetyków wiąże się z wieloma ograniczeniami oraz dokładnym ich przygotowaniem, bowiem sama matryca próbki może zakłócać proces oznaczania tych substancji. Konieczne wydaje się zastosowanie w pierwszej kolejności metod ekstrakcji zarówno do kosmetyków jak i próbek środowiskowych, zawierających parabeny. Dopiero w późniejszym etapie

można przystąpić do oznaczania parabenów w próbkach metodami wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) oraz chromatografii gazowej (GC) [1, 2, 16].

Celem artykułu jest charakterystyka parabenów, przedstawienie ich właściwości i występowania, opis najważniejszych metod ekstrakcji oraz przedstawienie i porównanie metod chromatograficznego oznaczania parabenów w próbkach środowiskowych i kosmetykach.

Parabeny – właściwości i zastosowanie

Parabeny są estrami kwasu 4-hydroksybenzoesowego (para hydroksybenzoesowego) i różnią się między sobą długością i rozgałęzieniem łańcucha alkilowego w cząsteczce. Wraz ze zwiększającą się długością łańcucha



alkilowego wzrasta ich rozpuszczalność i aktywność antybakteryjna oraz przeciwgrzybicza [1, 4, 5, 12].

Parabeny charakteryzują się wysoką odpornością chemiczną, stabilnością w szerokim zakresie pH (4-8) [1, 2] a ponadto są bezbarwne i bez smaku [11]. W środowisku silnie zasadowym, parabeny ulegają hydrolizie. Równie łatwo ulegają biodegradacji w środowisku wodnym, w obecności mikroorganizmów. Biodegradacja zachodzi głównie w warunkach tlenowych i polega na hydrolizie wiązań estrowych, w późniejszym etapie do dekarboksylacji i powstawania fenolu. Ich okres półtrwania w środowisku wynosi od 9,5 do 20 godzin. Parabeny z rozgałęzionymi łańcuchami alkilowymi są degradowane wolniej niż te o budowie liniowej.

Mikroorganizmy są zdolne do biodegradacji parabenów do fenolu lub kwasu o-hydroksybenzoesowego, wykorzystując parabeny jako źródło węgla. W środowisku wodnym, parabeny mają zdolność do przylegania do elementów osadów rzecznych i zostają akumulowane lub transportowane wraz z tymi osadami na inne poziomy zbiorników wodnych [15, 16]. Tradycyjne oczyszczalnie nie są w stanie pod względem technologicznym do całkowitego usuwania parabenów ze ścieków, jednak stopień usunięcia jest wysoki i wynosi około 90% [13, 15, 18]. W celu całkowitego usunięcia parabenów i ich produktów rozkładu stosuje się zaawansowane metody utleniania (ang. Advance Oxigen Processes – AOP),

Tabela 1. Nazwy, wzory strukturalne i sumaryczne najbardziej powszechnych parabenów [1, 4, 16]

Nazwa substancji	Skrót	Wzór sumaryczny	Wzór strukturalny
Metylparaben	MP	C ₈ H ₈ O ₃	
Etylparaben	EP	C ₉ H ₁₀ O ₃	
Propylparaben	PP	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	
Butylparaben	BP	C ₁₁ H ₁₄ O ₃	

metody fotochemiczne oraz ozonowanie [15, 21]. W wodzie chlorowanej, najczęściej w wodach basenowych, jest obserwowany szybki rozkład tych substancji pod wpływem aktywnego chloru. Chlorowe pochodne parabenów lub ich produkty rozkładu, wykazują większą toksyczność niż ich pierwotne formy [16, 19].

Dzięki właściwościom antybakteryjnym i przeciwgrzybiczym, parabeny znajdują zastosowanie jako środki konserwujące w przemyśle kosmetycznym, żywnościowym i farmaceutycznym. Można je znaleźć w kosmetykach takich jak: pasta do zębów, kremy, balsamy, lakiery do włosów, toniki, mydła i żele do mycia

oraz kosmetyki kolorowe; farmaceutykach i lekach oraz suplementach diety; żywności i napojach [1, 2, 11, 13, 14]. Maksymalna ekspozycja dzienna dla dorosłego człowieka wynosi 76 mg, z czego 50 mg może pochodzić z kosmetyków, 25 mg z farmaceutyków oraz 1 mg z żywności [2]. Natomiast maksymalne stężenie parabenów w kosmetykach nie może przekroczyć 0,4%, a mieszaniny parabenów 0,8%. Maksymalne stężenie parabenów w lekach bez recepty może wynosić 1%, zaś w lekach dostępnych na receptę tylko 0,1%. Najczęściej parabeny występują w maściach i kremach aplikowanych bezpośrednio na skórę. W produktach żywnościowych

maksymalne stężenia parabenów oscylują pomiędzy 0,05 a 0,1% [1, 4].

Najczęściej spotykanymi parabenami są: metylparaben (MP), etylparaben (EP), propylparaben (PP) oraz butylparaben (BP). Struktury tych i innych parabenów przedstawione zostały w tabeli 1. Spośród wymienionych parabenów, najbardziej powszechny jest metylparaben oraz mieszanina metylparaben i propylparaben ze względu na ich synergizm [4]. Metylparaben posiada również najmniejszą masę cząsteczkową i najkrótszy łańcuch alkilowy, co skutkuje łatwością w przenikaniu przez błony komórkowe mikroorganizmów oraz szybkie tempo hydrolizy.

Rodzaje ekstrakcji próbek zawierających paraben

W artykule zostały omówione tylko najważniejsze i najbardziej popularne metody ekstrakcji parabenów jako przygotowanie próbek kosmetyków i roztworów wodnych zawierających paraben do oznaczania takimi metodami jak: HPLC lub GC.

Mikroekstrakcja do fazy stałej (ang. solid phase microextraction, SPME)

Mikroekstrakcja do fazy stałej jest zminiaturyzowanym procesem tradycyjnej metody ekstrakcji do fazy stałej. Najważniejszymi zaletami są: zużycie mikroilości rozpuszczalników organicznych, prostota w użyciu, krótki czas ekstrakcji, przechowywanie ekstraktu. Aparatura do tej metody zawiera włókno kwarcowe, pokryte cienką warstwą medium ekstrakcyjnego, znajdującego się w igle umieszczonej w konstrukcji przypominającej strzykawkę. Włókno może być położone wewnątrz lub na zewnątrz rurki stalowej. Ekstrakcja może odbywać się z fazy ciekłej poprzez zanurzenie (ang. direct immersion, DI-SPME) lub pobieranie próbki z fazy nadpowierzchniowej (ang. head space, HS-SPME). Najpowszechniej stosowaną grupą faz stacjonarnych są fazy silikonowe, oznaczające się dużą stabilnością termiczną i chemiczną, łatwo ulegają one modyfikacji chemicznej [1, 3, 7, 8, 17].

W celu przygotowania próbki do oznaczenia w kosmetykach takich parabenów jak: Metylparaben (MP), etylparaben (EP), propylparaben (PP) i butylparaben (BP), zastoso-

wano metodę mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME). W metodzie tej użyto włókno modyfikowane pirolem, aniliną oraz poli(styreno sulfonianem) sodu (PSS). Charakteryzuje się ono większą adsorpcją hydrofobowych związków aromatycznych. Odzysk w tej metodzie wynosił około 93% [1].

W innym przypadku powierzchnia włókna użytego do SPME w celu ekstrakcji parabenów (MP, EP, PP, BP) z roztworów wodnych została modyfikowana za pomocą diakrylanu poli(glikolu etylowego) (PEG-DA). Odzysk w tej metodzie wynosił pomiędzy 90,2 a 97,7% [1].

Dyspersyjna mikroekstrakcja w układzie ciecz-ciecz (ang. Dispersive liquid-liquid microextraction DLLME)

Do próbki wstrzykiwana jest mieszanina rozpuszczalników, złożona z rozpuszczalnika ekstrakcyjnego (chloroform, tetrachloroetylen, chlorobenzen) i dyspersyjnego (aceton, acetonitryl, etanol, metanol). Dzięki tej technice możliwe jest zwiększenie powierzchni kontaktu pomiędzy ekstrahentem a próbką wody, poprzez wytworzenie kropli rozpuszczalnika ekstrahującego w całej objętości badanej próbki. W pierwszym etapie ekstrakcji, mieszanina dwóch rozpuszczalników zostaje wstrzyknięta do fazy wodnej, w drugim natomiast następuje odwirowanie mętnego roztworu. Metodę tę cechuje prostota w wykonaniu, krótki czas trwania, precyzja i wysoki stopień odzysku. W celu polepszenia efektywności tej metody stosuje się dodatek środków po-

wierzchniowo czynnych, ultradźwięki, zastosowanie cieczy jonowych [1, 3, 6, 7].

W celu oznaczania parabenów (MP, PP, EP) w roztworach wodnych użyto metody ekstrakcji DLLME z zastosowaniem oktanolu jako rozpuszczalnika ekstrakcyjnego oraz acetonu jako rozpuszczalnika dyspersyjnego. Odzysk badanych substancji w tej metodzie wynosił 25-72% [1]. W oznaczaniu tych samych parabenów w roztworach wodnych, zaś przy zastosowaniu chloroformu jako rozpuszczalnika ekstrakcyjnego oraz etanolu jako rozpuszczalnika dyspersyjnego, uzyskano odzysk na poziomie 59-116% [1].

Mikroekstrakcja do pojedynczej kropli (ang. single-drop microextraction – SDME)

To metoda ekstrakcji w której składniki badanej próbki są rozpuszczone w kropli cieczy zawieszanej na końcu igły strzykawki. Igła strzykawki zostaje zanurzona w próbce a substancje badane charakteryzują się większą rozpuszczalnością w rozpuszczalniku ekstrahującym niż w próbce. Kropla cieczy po ekstrakcji jest zasysana do strzykawki i przenoszona do dozownika chromatografu, gdzie może zostać oznaczana. Rozpuszczalnik ekstrahujący (m.in. oktanol, węglowodory, alkohol benzylovowy lub cieczy jonowe) w metodzie SDME nie ulega mieszanemu z próbką lub miesza się z nią w niewielkim stopniu. Metoda SDME służy do przygotowania próbek gazowych i ciekłych. Istnieje również dynamiczna wersja tej metody, w której badana

próbka wprowadzona zostaje do mikrostrzykawki, a po kilku sekundach kontaktu próbki z rozpuszczalnikiem, operacja jest powtarzana (dodawane są nowe porcje próbki). W czasie ekstrakcji następuje rozpuszczenie badanych substancji w rozpuszczalniku ekstrahującym [1, 7].

W celu przygotowania próbek kosmetyków do oznaczania parabenów (MP, EP, IPP, BP) metodą SDME użyto octanu heksylu jako rozpuszczalnika ekstrahującego. Odzysk badanych parabenów wynosił pomiędzy 23 a 150% [1].

Mikroekstrakcja do fazy ciekłej z użyciem membrany (ang. hollow fibre liquid phase microextraction – HF-LPME)

Ekstrakcja ta odbywa się w układzie ciecz-ciecz i polega na unieruchmieniu cieczy ekstrahującej w drenie (porowate włókno). Włókno porowate zamocowane jest na końcach igieł dwóch mikrostrzykawek. Dzięki takiemu rozwiązaniu z włókna porowatego możliwe jest zasysanie ekstraktu ze strzykawki. Metodę tę wykorzystuje się w oznaczeniach leków, estrogenów i amin aromatycznych. Dużą zaletą jest możliwość doboru materiału porowatego i cieczy ekstrahującej w zależności od badanych substancji.

Zastosowano metodę ekstrakcji HF-LMPE w oznaczaniu parabenów (MP, EP, PP) w próbkach kosmetyków. Jako rozpuszczalnik niemieszający się z wodą użyto mieszaninę toluenu i etery diheksylowego na włóknie porowatym. Odzysk parabenów w tej metodzie wynosił od 17,6 do około 45% [1]



Ekstrakcja za pomocą ruchomego elementu sorpcyjnego (ang. stir bar sorptive extraction – SBSE)

Metoda, która minimalizuje zużycie rozpuszczalników organicznych oraz zmniejsza ilość badanej próbki. Fazą sorpcyjną często jest polidimetylosiloksan (PDMS) dzięki jego właściwościom takim jak: stabilność termiczna i chemiczna oraz duża lepkość. W tej metodzie ekstrakcji wykorzystuje się mieszadło magnetyczne, czyli pręt magnetyczny w szklanej osłonie, pokrytej sorbentem. Mieszadło jest zanurzone w roztworze próbki lub w fazie gazowej nad powierzchnią próbki. Bardzo istotną kwestią jest dobór odpowiednich warunków do osiągnięcia stanu równowagi (np. odpowiednia temperatura, pH, dodatek soli obojętnej lub organicznego modyfikatora) [1, 3, 7, 17].

W oznaczaniu parabenów (MP, EP, PP, BP) metodami

chromatograficznymi zastosowano ekstrakcję SBSE w celu przygotowania próbek kosmetyków zawierających parabeny. Odzysk parabenów w tej metodzie ekstrakcji wynosił nawet 99% przy zastosowaniu PDMS jako fazy sorpcyjnej [1].

Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika z próbki zmieszanej z wypełniaczem (ang. matrix solid-phase dispersion – MSPD)

Metoda ta polega na wymyśnianiu substancji badanej z próbki stałej, która zmieszana jest z sorbentem. W tej metodzie zastosowane sorbenty mogą być polarne, i należą do nich m.in.: żel krzemionkowy, tlenek glinu, lub niepolarne – modyfikowana krzemionka. Na początku należy rozdrobnić i wymieszać próbkę stałą z sorbentem, następnie umieścić tak przygotowaną próbę w kolumnie. Na wierzchu kolumny stosuje się filtr bibułowy i całość jest delikatnie ugniatana.

Przy użyciu wody lub buforu przemywa się kolumnę w celu wymycia wszystkich zanieczyszczeń, które mogłyby zakłócić proces oznaczania. Sorbent w kolumnie musi zostać osuszony przed dodaniem rozpuszczalnika niepolarnego. Ostatnim krokiem w tej metodzie jest elucja złoża rozpuszczalnikami ze stałą szybkością, w ilości 250 µl/100 mg złoża. Metoda ekstrakcji za pomocą rozpuszczalnika z próbki zmieszanej z wypełniaczem jest stosowana do oznaczania takich związków jak: pestycydy, parabeny, polichlorowane bifenyle (PCB), oraz lekach i farmaceutykach [1, 7, 17]. Odzysk parabenów w próbkach kosmetyków wynosił 78% z zastosowaniem metody ekstrakcji MSPD, w której użyto Florisilu (krzemian magnezu) jako sorbentu, mieszaninę rozpuszczalników: heksan-aceton oraz Na₂SO₄ jako środek osuszający [1].

Ekstrakcja płynem w stanie nadkrytycznym (ang. supercritical fluid extraction – SFE)

W metodzie tej próbka mieszana jest w płynie w stanie nadkrytycznym, tzn. znajdującym się w warunkach powyżej warunków punktu krytycznego (powyżej ciśnienia krytycznego oraz powyżej temperatury krytycznej), wówczas jego właściwości są pośrednie pomiędzy gazem a cieczą. Najczęściej stosowanym płynem jest CO₂ z uwagi na niepalność, brak toksyczności, niską wartość ciśnienia krytycznego oraz niepolarność. Po ekstrakcji badany analit trafia do odbieralnika. Dynamiczna wersja tej metody ekstrakcji polega na wielokrotnej recyrkulacji ekstrahentu do próbki. Metoda ma wiele zalet, m.in. jest prosta w zastosowaniu, tania, można ją zintegrować z innymi technikami oznaczania [1, 3, 7, 17].



ZOSTAŃ CZŁONKIEM

Klubu

Polskich Laboratoriów
Badawczych

www.pollab.pl