APP NOTE-8/2019GCMS



Определение содержания парабенов в косметической продукции методом газовой хромато-масс-спектрометрии с помощью системы **«Маэстро-αMS»**.

Колунтаев Д. А. *к. б. н., научный сотрудник отдела исследований и разработок,* ***ООО Интерлаб****, Россия, Москва*

Ключевые слова

Газовая хромато-масс-спектрометрия, парабены, косметические средства гигены, iDwell®Time, SIM Wizard®, SIM

Резюме

Продемонстрированы возможности хромато-масс-спектрометрической системы Маэстро-αMC на примере определения парабенов в косметической продукции и средствах гигиены, в качестве примера использовали гель для душа и зубная паста.

Введение

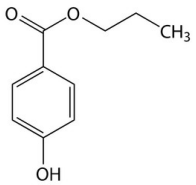
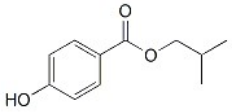
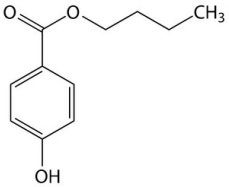
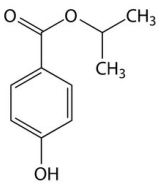
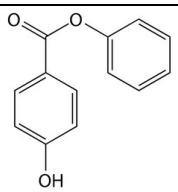
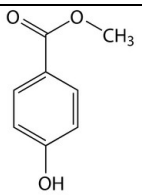
Парабены представляют собой сложные эфиры пара-гидроксибензойной кислоты, которые благодаря их бактерицидному и фунгицидному действию наиболее часто используются в качестве консервантов для производства большого спектра лекарственных препаратов и продуктов для гигиены, косметики, продуктов питания и детских товаров. Наиболее распространенными из них в производстве являются бутилпарабен, метилпарабен и пропилпарабен.

По данным Американского управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (США) количество использования парабенов в производстве косметических средств за последнее время в мире выросло в 1,7 раза по сравнению с 1981 годом. И сегодня парабены можно найти примерно в 80% продукции личной гигиены [1].

Несмотря на то, что парабены до сих пор считаются безопасными, в различных независимых исследованиях были получены данные об их способности нарушать функцию эндокринной системы при воздействии высоких доз [2]. Тем не менее, причинно-следственная связь между использованием парабенов и их возможными канцерогенными свойствами остается спорной [3, 4]. Известно, что парабены могут вызывать аллергические реакции, включая раздражение кожи и контактный дерматит на чувствительной и поврежденной коже [5]. При этом уровни парабенов в пробах биологических материалов человека зависят от частоты использования потребительских и косметических продуктов с их содержанием.

Парабены обладают эстрогенной активностью, то есть действуют подобно гормону. Причем, это действие возрастает с длиной органического радикала или цепи. В частности, у бутилпарабена эстрогенная активность будет выше по сравнению с пропилпарабеном, что представлено в таблице 1 [6].

Табл. 1. Общая информация о разновидностях парабенов.

Компонент	Формула	Класс опасности EWG SkinDeep (из 10 баллов)	**Компонент**	Формула	Класс опасности EWG SkinDeep (из 10 баллов)
Пропил-парабен *(или E216)*		5	Изобутил-парабен		7
Бутил-парабен		7	Изопропил-парабен		7
Бензил-парабен		2	Метил-парабен *(или E218)*		4

Как уже ранее было отмечено, нет прямого доказательства, что парабены представляют или не представляют опасности для человека. Однако, министерство здравоохранения США все же установили максимальную норму по ежедневному потреблению парабенов: 142,08 мг и 3,024 мг/кг (ppm) для взрослых и 37,8 мг для детей (примерно 2,368 мг/кг (ppm) массы тела) [7].

В Европейском союзе допустимое содержание парабенов в косметической продукции составляет 0,4% для отдельных видов парабенов и 0,8% для смесей всех парабенов [8]. В 2011 году датское правительство решило ввести ограничения на использование некоторых особо опасных парабенов (пропил-, изопропил-, бутил- и изобутиловый) в продуктах личной гигиены, предназначенных для детей младше 3 лет-кремов. С 2014 года Франция запретила использование изопропил-, изобутил-, пентил- и бензил- парабенов, так как их влияние на человека мало изучено. Но, несмотря на это, нет единого законодательства, регулирующего концентрации парабенов в косметике в любой из этих стран [9].

В России существует Технический регламент Таможенного союза «О безопасности парфюмерно-косметической продукции» [10]. Но в перечне веществ, запрещенных к использованию в парфюмерно-косметической продукции, парабенов нет, а это означает, что их использование официально разрешено в нашей стране и странах таможенного союза. Существует только норма допустимого их содержания в косметической продукции, которая, как и в Европе составляет 0,4% (для смеси эфиров — 0,8%).

Общественные организации, которые способствуют осведомленности о косметических ингредиентах, полагают, что дальнейшие исследования необходимы, чтобы определить безопасность парабенов [12]. При этом беспокойство в обществе, порожденное данными о возможной опасности использования парабенов, привело потребителей и компании к поиску альтернатив [13].

Экспериментальная часть

Материалы и методы

Все используемые в эксперименте реагенты имели классификацию, как особо чистые или HPLC grade. Стандарты действующих веществ парабенов имели чистоту не менее 99,5%.

В качестве объекта исследования были выбраны образцы зубной пасты, а также образец шампуня, приобретённые в местном супермаркете. Для построения градуировочной зависимости использовали следующие точки концентраций: 1, 5, 10, 50, 100 ppb.

Табл. 2. *Параметры инструментального метода.*

Оборудование	
ГХ-МС система	Interlab «Маэстро-αMS»
Испаритель	Split/Splitless (liner: Restek 4 mm x 6,3 x 78,5)
Хроматографическая колонка	Rtx-5MS (30m x 0,25mm; 250um)
Параметры хроматографического разделения	
Объём пробы	1,0 мкл
Режим испарителя	Splitless; Purge 75 мл/мин после 1,2 мин
T° испарителя	250°C
Режим работы испарителя	Режим Constant Flow
Градиент t° печи	75°C в течение 1,2 мин;

	12,0°C/мин до 220°C, удержание 2,0 мин;
Скорость газа-носителя	(He) 1,0 мл/мин
T° интерфейса МС	250°C
Параметры детектирования	
Источник ионизации	*ЭИ (EI)*
T° источника	230°C
Задержка растворителя	4,0 мин
Режимы сканирования	SIM (параметры указаны ниже)
Параметр Dwell Time	Принцип расчёта согласно методу iDwell® Time

Общая схема метода



1 грамм исследуемого объекта (зубная паста или шампунь) помещают в мерную колбу объемом 10 мл, после чего добавляют 4 мл 5% раствора метанола в воде и перемешивают на магнитной мешалке в течение 10 мин (рис. 1). После чего экстракт фильтруют через фильтр с размером пор 3-5 мкм. Далее проводят процедуру твёрдофазной экстракции на патронах компании LiChrolut®RP-18 *((40-63 µm) 500 mg 6ml standard PP-tubes)*, согласно схеме ниже.

Рис. 1. Экстракция образца зубной пасты.

Схема твёрдо-фазной экстракции

- *Промывка неподвижной фазы* - 4 мл метанола.
- *Кондиционирование фазы* – 4 мл раствора 5% метанол/95% вода*.

**Важным условием успешного выполнения стадии, является условие, что фаза в картридже не должна высохнуть после данного этапа кондиционирования.*

- *Загрузка образца* – 4 мл отфильтрованного экстракта пробы.
- *Промывка неподвижной фазы* - 4 мл раствора (5% метанол / 95% вода).
- Просушивание фазы картриджа под вакуумом.
- *Элюирование* – заключительный этап элюирования искомых соединений выполняют 1,5 мл 100% метанола.



Рис. 2. Процедура твёрдо-фазной экстракции.

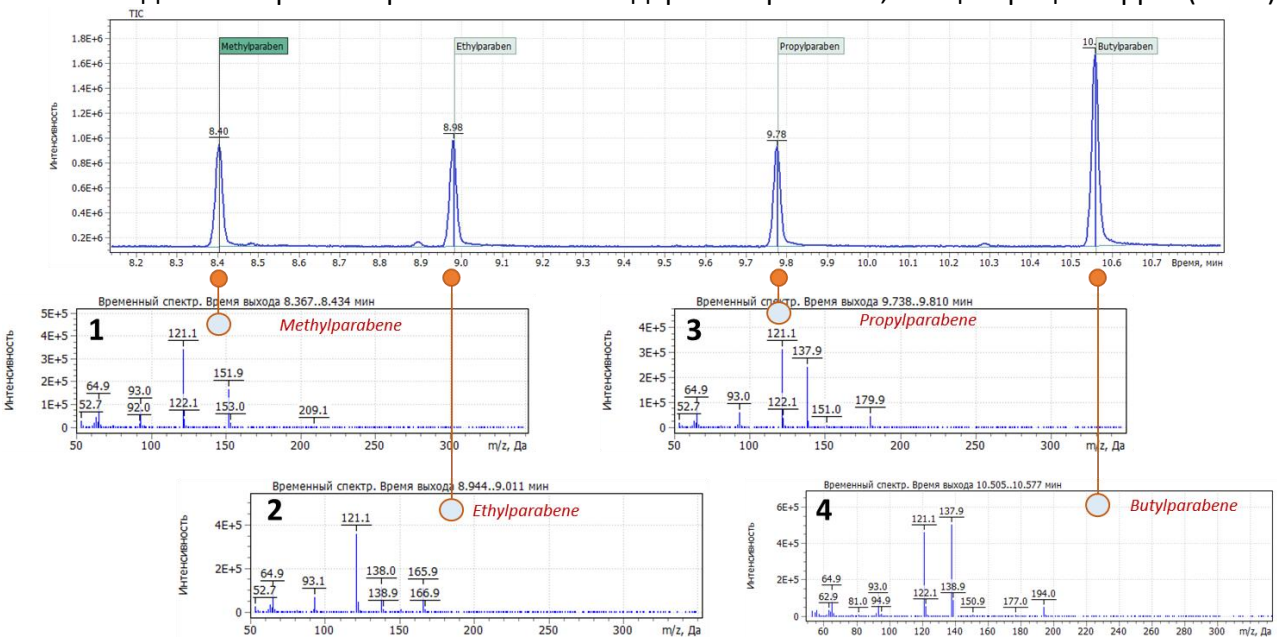
Полученную аликвоту центрифугируют (Eppendorf, centrifuge 5415) со скоростью 14000 об/мин, в течение 6 мин. В завершение подготовки пробы экстракт анализируют с помощью хромато-масс-спектрометра «Маэстро-αМС».

Перечень целевых соединений и параметры их детектирования представлены в таблице 3.

Табл. 3. Времена элюирования искомых пиков целевых ионов и параметры их сканирования.

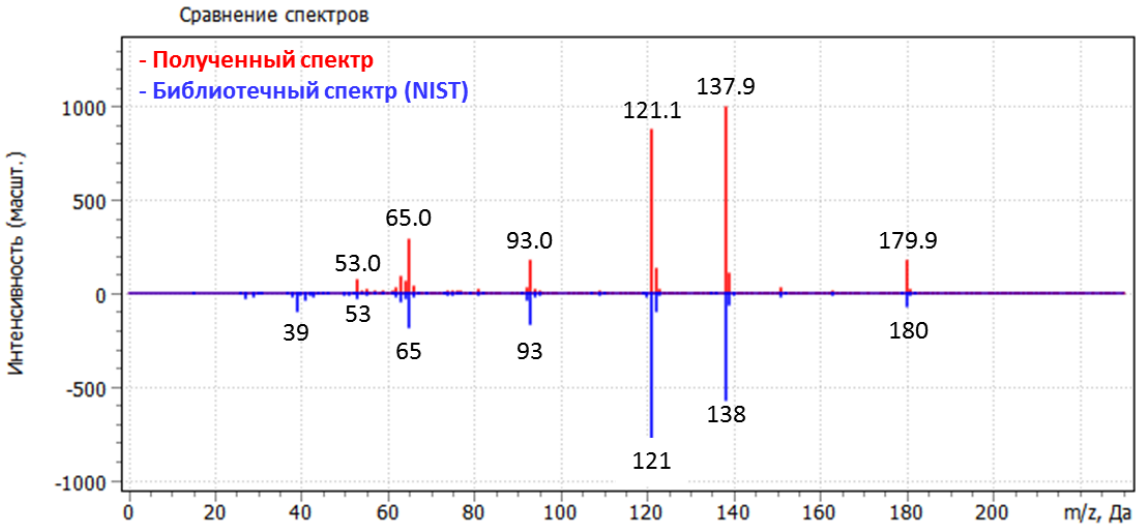
№	Действующее вещество	*Главный ион (Quant)*	Подтверждающий ион (Qual-1)	Подтверждающий ион (Qual-2)	Время элюирования
1	Methylparaben	121,1	93,0	151,9	8,39 мин
2	Ethylparaben	121,1	137,9	165,9	8,97 мин
3	Propylparaben	121,1	137,9	179,9	9,77 мин
4	Butylparaben	137,9	121,1	194,0	10,55 мин

Рис. 2. Модельная хроматограмма смеси стандартов парабенов, концентрация 5 ppm (SCAN).



1. *Метилпарабен;* **2.** *Этилпарабен;* **3.** *Пропилпарабен;* **4.** *Бутилпарабен*.

Рис. 3. Сопоставление спектра, полученного в режиме сканирования смеси стандартов с библиотечным спектром (библиотека NIST17, ver. 2,3)

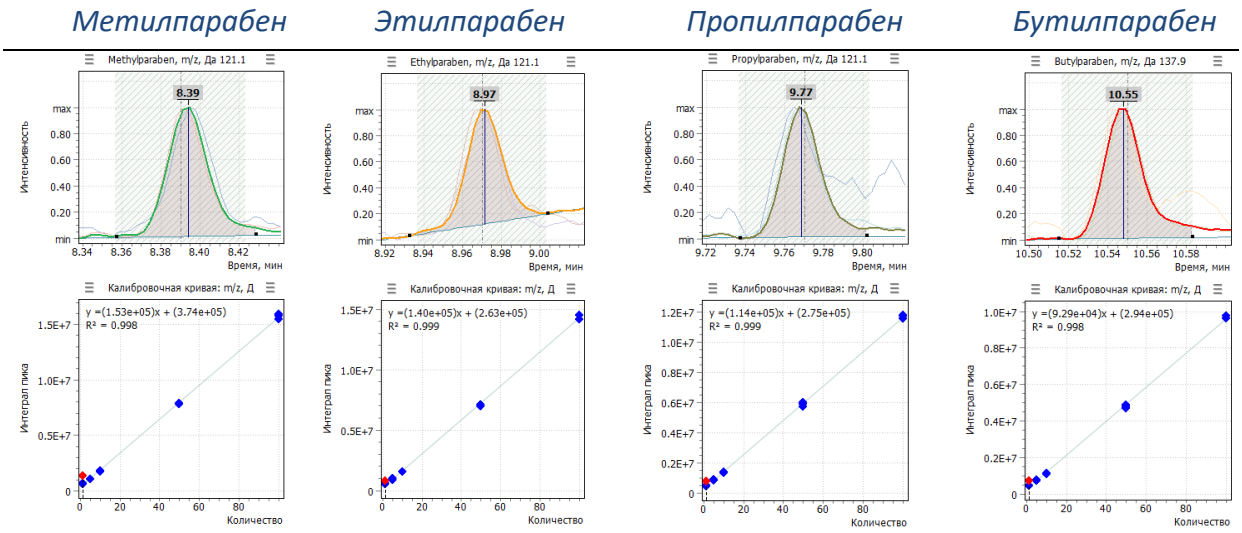


Результаты и обсуждение

Количественное определение парабенов проводили с использованием калибровки по внешнему стандарту. Для построения калибровочной зависимости использовали 5

калибровочных уровней. Коэффициенты корреляции для всех искомых соединений глицидиловых эфиров жирных кислот составили $R^2 \geq 0{,}998$ (рис. 4).

Рис. 4. Линейные зависимости и сигналы главных ионных токов искомых соединений.



Практическая оценка применимости метода

Данный метод апробирован на различных косметических образцах, в частности на образцах зубной пасты (*2 образца*) и геля для душа. На рисунке 5 представлена хроматограмма зубной пасты (*образец #1*), где наблюдается детектирование 3 парабенов.

Рис. 5. Хроматограмма TIC (SIM) образца зубной пасты (#1).

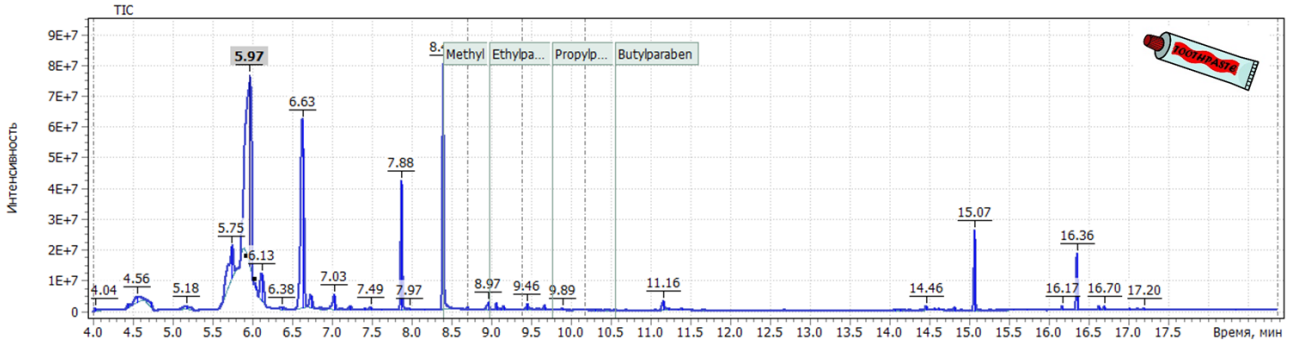
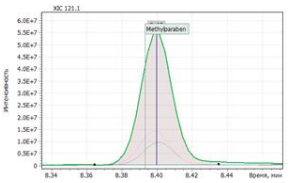
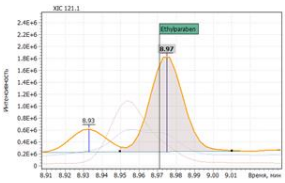
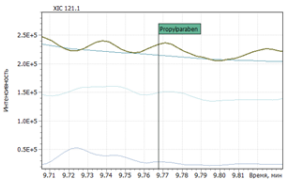
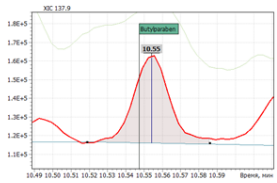
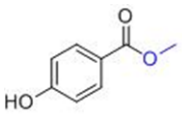
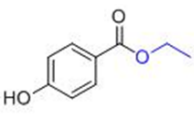
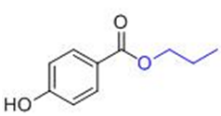
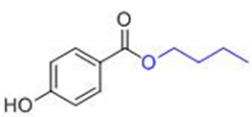
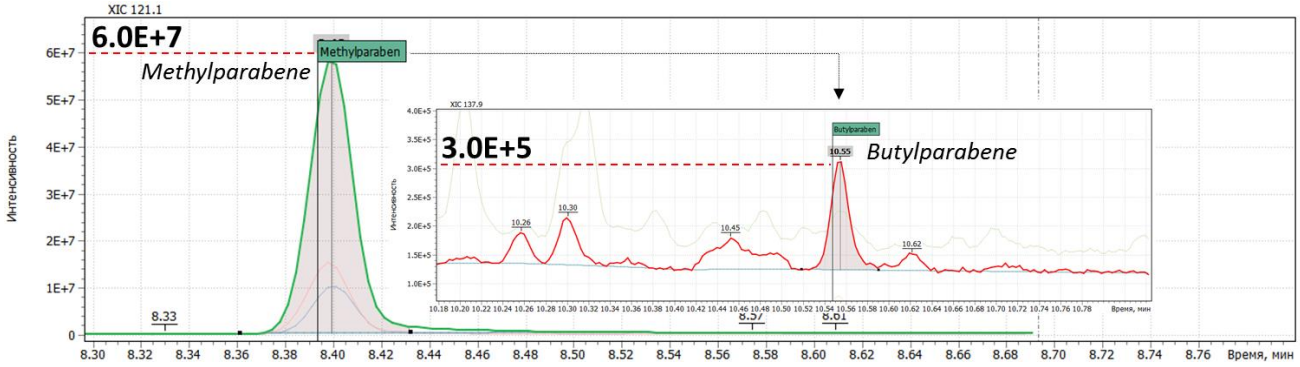


Табл. 4. Результаты анализа образца зубной пасты (#1).

Метилпарабен	*Этилпарабен*	*Пропилпарабен*	*Бутилпарабен*
			
			
2290,0 ppb	70,8 ppb	*Не обнаружено*	< 1,0 ppb

Стоит обратить внимание, что масс-спектрометрический детектор «Маэстро-αМС» позволяет детектировать целевые сигналы в широких динамических диапазонах концентрации. В частности, в образце зубной пасты (*#1*) можно заметить детектирование метилпарабена на уровне 2290 ppb и бутилпарабена на уровне приблизительно 0,2 ppb. Разница в детектируемых сигналах составила кратность в 10000 раз, что составляет 4 порядка динамического диапазона работы системы с матричными образцами.

Рис. 6. Детектирование компонентов, отличных концентраций в пробе зубной пасты (#1).



На рисунках 7 и 8 также представлены хроматограммы образцов геля для душа и зубной пасты (*образец #2*). В образце геля для душа детектированы этилпарабен на уровне 2,0 ppb, а также высокая концентрация бутилпарабена – 1140 ppb (1,14 нг/мкл). В образце зубной пасты (*образец #2*) детектирован метилпарабен в концентрации 229 ppb (0,23 нг/мкл) и следовые количества этилпарабена на уровне 5,6 ppb.

Рис. 7. Хроматограмма TIC (SIM) образца геля для душа.

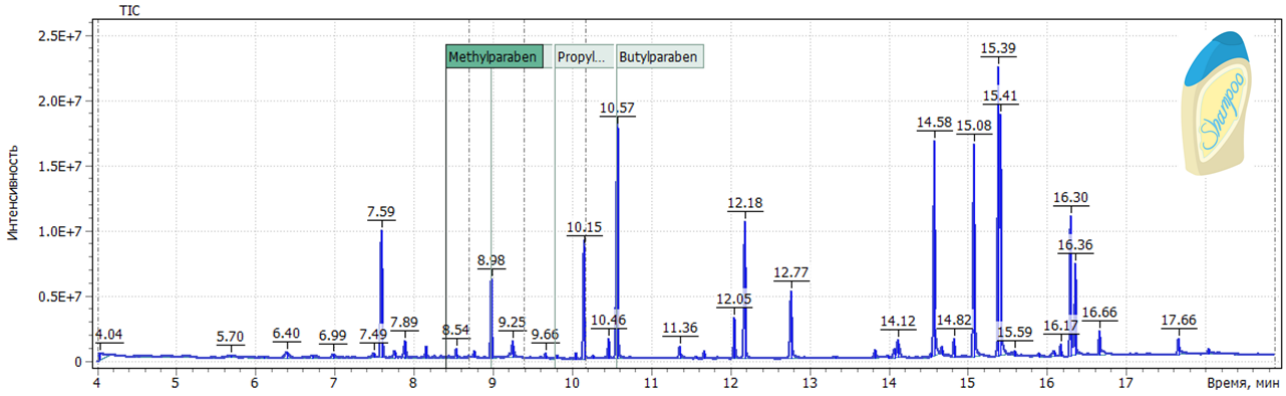
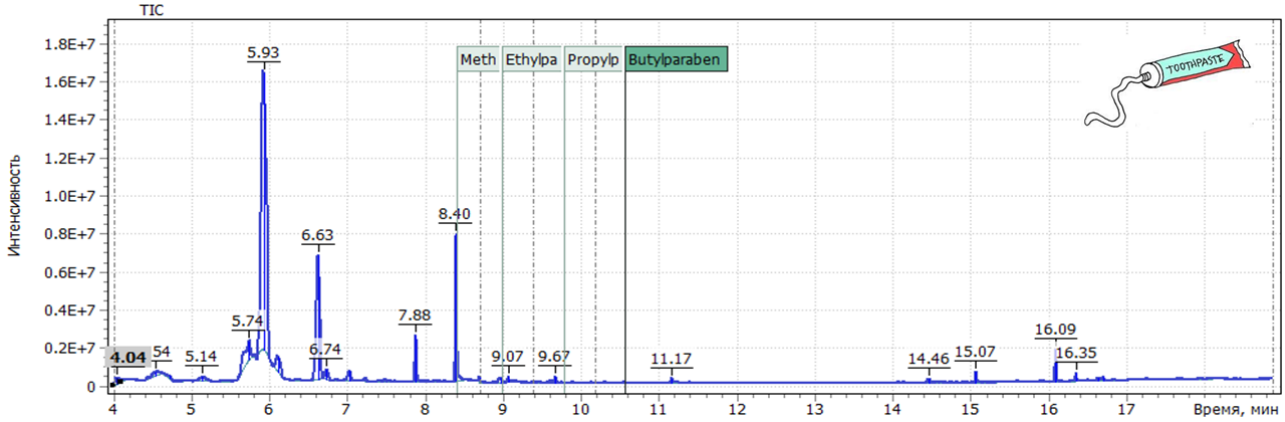


Табл. 5. Результаты анализа образцов геля для душа и зубной пасты (*#2*).

Метилпарабен	*Этилпарабен*	*Пропилпарабен*	*Бутилпарабен*
Концентрации искомых парабенов в образце ***геля для душа***			
Не обнаружено	2,02 ppb	Не обнаружено	1140,0 ppb
Концентрации искомых парабенов в образце ***зубной пасты (#2)***			
229,0 ppb	5,65 ppb	Не обнаружено	Не обнаружено

Рис. 8. Хроматограмма TIC (SIM) образца зубной пасты (*#2*).



Выводы

Результаты эксперимента доказывают возможность применения хромато-масс-спектрометрической системы для анализа целевых ингредиентов в косметической продукции, для выполнения исследований по контролю содержания парабенов и их влияния на окружающую среду и человека.

Хромато-масс-спектрометрическая система «Маэстро-αMC» (ООО «Интерлаб», Россия) позволяет детектировать сложные эфиры пара-гидроксибензойной кислоты в широком диапазоне концентраций. Это позволяет надёжно контролировать не только физическое присутствие парабенов в образцах, но и определять их количества и следовые концентрации на фоне высокоинтенсивных компонентов матрицы и других парабенов.

Литература

1. *Pouillot A.* J. Med Esthet Chir Dermatol 2006; v. 33, p. 187-90.
2. *Harvey P. W., Everett D. J.* Significance of the detection of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens) in human breast tumors // Journal of Applied Toxicology journal. - 2004. - January (vol. 24, no. 1). - P. 1 - 4. - DOI: 10.1002/jat.957. - PMID 14745840.
3. *Monica Giulivo et al.* Human exposure to endocrine disrupting compounds: Their role in reproductive systems, metabolic syndrome and breast cancer. A review
4. *Golden R., Gandy J., Vollmer G.* A review of the endocrine activity of parabens and implications for potential risks to human health // Critical Reviews in Toxicology: journal. — 2005. — Vol. 35, no. 5. — P. 435—458. — DOI: 10.1080/10408440490920104. — PMID 16097138.
5. *Kirchhof, M.G. & de Gannes, G.C.* (2013) The health controversies of parabens. Skin Therapy Letter, 18(2), 5-7. PubMed PMID: 23508773.
6. *Cashman A.L,* Parabens: a review of epidemiology, structure, allergenicity, and hormonal properties. Dermatitis, v.16 (2), p. 57–66
7. CIR, 2008
8. Официальный журнал Европейского Союза, 2009
9. *Kirchhof M.G,* Skin Therapy Lett 2013; 18, 5–7
10. ТР ТС — 009 / 2011
11. The truth about antiperspirants and breast cancer. *Unilever.*
12. *Rita Arditti.* Cosmetics, parabens, and breast cancer. Organic Consumers Association.
13. *Lebovits S.C.* Cosmetic's firms heed calls for organics. The Boston Globe.