

Development and Validation Characteristics Description of Parabens Determination in Cosmetic Products by Micellar Thin-Layer Chromatography Technique

D.V. Yedamenko*, L.P. Loginova

V.N. Karazin Kharkov National University, Svoboda sq. 4, Kharkiv, 61077, Ukraine; *e-mail: dashyta.81@mail.ru

Received: January 16, 2015; Accepted: March 23, 2015

Characteristics of the parabens separation in TLC eluting with surfactant solutions as mobile phases in comparison to traditional mobile phases were evaluated. It was suggested to use the micellar solutions of Tween-80 as the mobile phase for separation of parabens by thin-layer chromatography on the normal-phase plates. On this basis, the method of detection and quantitative determination of methylparaben in cosmetics was developed. Analytical signal is the area of the chromatographic spots, which was estimated by image processing of the scanned chromatogram. Intralaboratory validation of identification and quantitative determination of methylparaben in cosmetic products technique was performed. Such analytical characteristics as specificity, linearity of calibration graph, limits of detection and determination, intermediate precision, trueness, robustness were identified. Limits of detection and quantification are corresponded to mass of methylparaben in a spot 0.63 and 0.94 µg, respectively.

Keywords: parabens, thin-layer chromatography, micellar mobile phase, Tween-80, validation

Разработка и описание валидационных характеристик методики определения парабенов в косметической продукции методом мицеллярной тонкослойной хроматографии

Д.В. Едаменко*, Л.П. Логинова

Кафедра химической метрологии, Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, пл.Свободы 4, Харьков 61077, Украина, *e-mail: dashyta.81@mail.ru

Получена: 16 января 2015; Принята: 23 марта 2015 г

Оценены особенности разделения парабенов в ТСХ при восходящем элюировании с подвижными фазами на основе растворов ПАВ по сравнению с традиционными подвижными фазами. Мицеллярные растворы Твин-80 предложено использовать как подвижные фазы для разделения парабенов методом тонкослойной хроматографии на нормально-фазовых пластинках. На этой основе создана методика обнаружения и количественного определения метилпарабена в косметической продукции. Аналитическим сигналом является площадь хроматографического пятна, найденная при обработке изображения сканированной хроматограммы. Описаны валидационные характеристики при внутрилабораторной валидации методики обнаружения и количественного определения метилпарабена в косметических продуктах. Определены следующие аналитические характеристики: специфичность, линейность градуировочного графика, пределы обнаружения и определения, прецизионность (промежуточная), правильность и робастность. Пределам обнаружения и количественного определения соответствуют массы метилпарабена в пятне 0.63 и 0.94 мкг соответственно.

Ключевые слова: парабены, тонкослойная хроматография, мицеллярная подвижная фаза, Твин-80, валидация

Термин «парабены» происходит от названия пара-гидроксibenзойной (4-гидроксibenзойной) кислоты (4-ГБК) и обозначает ряд сложных эфиров этой кислоты, отличающихся алкильными радикалами эфирной группы R (рис. 1).

Парабены уже около 80 лет широко используются в качестве консервантов косметической,

фармацевтической и пищевой продукции. Среди преимуществ, объясняющих популярность парабенов как консервантов, обычно указывают широкий спектр противомикробной активности, устойчивость, отсутствие цвета и запаха, низкую стоимость, нетоксичность и сохранение эффективности в широком диапазоне кислотности

[1]. Однако нетоксичность парабенов подверглась сомнениям и стала предметом широкой дискуссии после публикации статьи Darbre et al. [2], в которой сообщалось, что парабены (главным образом, метилпарабен) обнаружены и определены в тканях опухолей молочной железы в 18 случаях из 20.

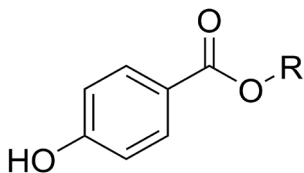


Рис. 1. Графические формулы 4-ГБК и парабенов R: H – 4-ГБК; CH₃ – метилпарабен; CH₂-CH₃ – этилпарабен; CH₂-CH₂-CH₃ – пропилпарабен; CH₂-CH₂-CH₂-CH₃ – бутилпарабен.

Среди источников воздействия парабенов на человека преобладают косметические продукты и средства личной гигиены. Метил- и этилпарабены, используемые чаще других парабенов, являются наиболее распространенными ингредиентами косметических препаратов, уступая по частоте использования лишь воде [1]. Косметические продукты и средства гигиены потребляются в массовых масштабах, воздействуют на человека непосредственно, ежедневно и в течение длительного времени, особенно так называемые средства пролонгированного контакта (leave-on products) [3].

Согласно нормам Европейского Союза, содержание парабенов в косметической продукции не должно превышать 0.4%, если присутствует один парабен, и 0.8% (в пересчете на свободную кислоту), если присутствует смесь парабенов [3]. Нормативы содержания парабенов в косметических продуктах периодически пересматриваются Европейским научным комитетом по безопасности потребителя (European Scientific Committee on Consumer Safety - SCCS) с учетом новых научных и статистических данных. В 2011 году SCCS рекомендовал [3] по отношению к метил- и этилпарабену сохранить прежние нормы максимально допустимой концентрации в косметических продуктах, и высказал озабоченность по поводу возможного воздействия на эндокринную систему парабенов с более длинным алкильным радикалом, включая пропилпарабен, бутилпарабен, родственные им изомеры и бензилпарабен. Использование пропилпарабена и бутилпарабена в качестве консервантов в готовых косметических продуктах SCCS считает безопасным для потребителя, пока сумма их индивидуальных концентраций не превышает 0.19% [3].

В связи с новыми взглядами на нормирование содержания парабенов в косметических товарах и средствах гигиены приобретают

особую актуальность аналитические методики, позволяющие идентифицировать и количественно определять каждый из парабенов. С другой стороны, требования к методикам продиктованы также массовостью анализа косметической продукции и исключительным многообразием его объектов – продукция такого рода включает десятки тысяч наименований. В этих условиях возрастает интерес к использованию новых методов тонкослойной хроматографии (ТСХ) [4]. ТСХ полезна как метод предварительных исследований и сортировки проб в массовом анализе, применяется для обнаружения и определения парабенов в косметических продуктах [5], является нормативным методом идентификации парабенов в фармацевтической продукции [6]. Именно ТСХ использовалась на начальном этапе исследований, описанных в резонансной публикации [2].

Нами ранее показано, что мицеллярные растворы неионогенного или катионного поверхностно-активного вещества (ПАВ), используемые как подвижные фазы (ПФ), обеспечивают эффективное разделение парабенов на нормально-фазовых пластинках для ТСХ, а также могут использоваться для извлечения парабенов в пробоподготовке косметических продуктов [7]. Описано количественное определение метилпарабена на основе визуального сопоставления интенсивности хроматографических зон пробы и шкалы сравнения [7]. Цель настоящей работы – определить аналитические характеристики методики обнаружения и количественного определения метилпарабена в косметических продуктах, в которой в качестве аналитического сигнала измеряется площадь хроматографической зоны.

Экспериментальная часть

Реактивы и оборудование. Растворители: хлороформ (фарм., Укрхимэкспо), 1-пропанол (ч.д.а., Макрохим); 1-бутанол (ч.д.а., Макрохим); 1-пентанол (РЕАХИМ, ч., дополнительно очищенный перегонкой; фракция, кипящая при 78.5 °С); петролейный эфир (Haltermann Products, Германия); ледяная уксусная кислота (Haltermann Products, Германия; х.ч).

Поверхностно-активные вещества: цетилпиридиний хлорид (ЦПХ, Merck, массовая доля основного вещества 99-101%); Твин-80 (AppliChem GmbH, плотность 1.074 г/см³).

Исследуемые вещества: 4-ГБК и парабены (метилвый, этиловый, n-пропиловый, n-бутиловый эфиры 4-ГБК) использовались в виде субстанций фармакопейной чистоты (Sigma).

Оборудование для хроматографии и проявления хроматограмм: пластины для тонкослойной хроматографии Sorbfil UV-254 (ЗАО «Сорбполимер», Россия, 10×10 см);

стеклянные камеры для хроматографирования; градуированные капилляры с ценой деления 1 мкл; УФ-лампа УФО-254 (УПМ-ФИМЕТ) с длиной волны излучения 254 нм.

Приготовление растворов. Растворы с известной концентрацией парабенов готовили по точно взвешенным навескам реагентов, используя дважды дистиллированную воду и мерную посуду.

Методика получения и обработки хроматограмм. На стартовую линию пластинки для ТСХ с помощью микрошприца наносили по 10 мкл градуировочных растворов или раствора, полученного после пробоподготовки, расстояние между точками нанесения растворов не менее 1.5 см. Пластинки помещали в камеру для восходящего элюирования и закрывали крышкой. При использовании традиционных ПФ (смеси органических растворителей) камеру предварительно насыщали парами ПФ. При использовании мицеллярных растворов ПАВ в качестве ПФ, как показал опыт, насыщения камеры не требуется. Когда фронт ПФ достигал высоты около 8 см от линии старта, пластинку вынимали и сушили на воздухе.

Хроматографические зоны парабенов проявляли по тушению флуоресценции УФ-покрытия пластинки. При облучении пластинки УФ-светом с длиной волны 254 нм зоны парабенов выглядели как серые пятна на флуоресцирующем фоне; контуры пятна фиксировали карандашом. Значение фактора запаздывания (retardation factor) R_f рассчитывали общепринятым способом.

В качестве аналитического сигнала для количественного определения парабенов использовали площадь хроматографической зоны (пятна), выраженную в пикселях изображения. Для нахождения площади пятна пластину сканировали (планшетный сканер HP ScanJet 4050G Photo, разрешение 900 dpi) и обрабатывали изображения с помощью программы Adobe Photoshop CS 2. Количественное определение метилпарабена осуществляли по методу градуировочного графика. В статистической обработке данных использовали программы MS Excel 2003 и Origin 6.0.

Результаты и обсуждение

Особенности разделения парабенов в ТСХ при восходящем элюировании с подвижными фазами на основе растворов ПАВ. Как показано ранее [7], лучшие результаты разделения парабенов на пластинках с силикагелем достигаются при использовании мицеллярных ПФ состава: (а) раствор $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л ЦПХ, содержащий 6 % (v/v) 1-пропанола при pH 3 и (б) раствор $1.0 \cdot 10^{-2}$ моль/л Твин-80, содержащий 0.3% (v/v) 1-пентанола. На рис. 2 сопоставлены хроматограммы парабенов, полученные с этими ПФ, и с ПФ традиционного типа, состоящей из смеси органических растворителей

(петролейный эфир : хлороформ : уксусная кислота,) далее – ПФ (в).

При использовании ПФ (в) - смеси органических растворителей, хроматографические зоны парабенов размещены в последовательности, характерной для нормально-фазовой хроматографии – подвижность парабенов возрастает с ростом их гидрофобности. При переходе к подвижным фазам (а) и (б), содержащим ПАВ, последовательность зон парабенов обращается, что объясняется сорбцией ПАВ на поверхности силикагеля и гидрофобизацией последнего при контакте с ПФ.

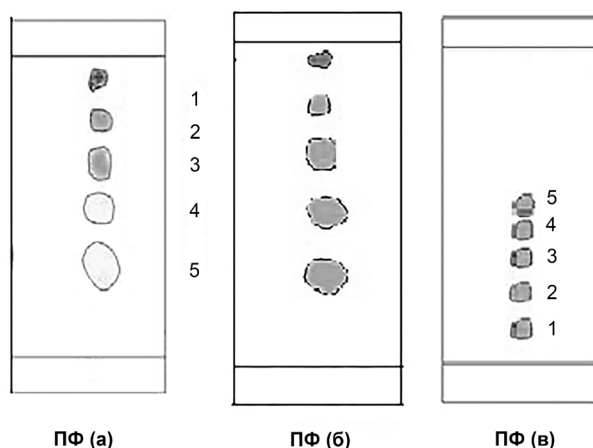


Рис. 2. Хроматограммы смеси 4-ГБК (1), метилового (2), этилового (3), н-пропилового (4), н-бутилового (5) эфиров 4-ГБК. Состав ПФ (а)-(в) см. в тексте.

Хроматограмма, полученная с ПФ (в), типична для камеры с предварительным насыщением, когда видимый фронт образован сорбированными парами растворителя, а действительный фронт занижен [8]. В результате сокращаются проходимые пятнами пути, и, следовательно, снижается разрешающая способность [8]: для соседних пятен в двух случаях разность ΔR_f меньше 0.1 [7]. Разделение улучшается при использовании ПФ (а) и (б): на хроматограммах увеличивается расстояние между центрами соседних пятен, хотя несколько увеличиваются и размеры пятен. Лучшие результаты получены с ПФ (б) – мицеллярные растворы Твин-80.

Описание валидационных характеристик методики количественного определения парабенов в косметической продукции методом ТСХ с мицеллярными ПФ. Мицеллярный раствор $1.0 \cdot 10^{-2}$ моль/л Твин-80 с объемной долей 1-пентанола 0.3% использован в качестве ПФ для ТСХ-обнаружения и количественного определения парабенов в косметических продуктах. Исследования по валидации выполнены для методики определения метилпарабена, чаще других используемого в косметических товарах и

средствах гигиены. В качестве объектов анализа использовались следующие продукты (в скобках приведены парабены, указанные в составе продукта): молочко-гель по уходу за телом (метилпарабен, этилпарабен, пропилпарабен, бутилпарабен); крем для тела (метилпарабен, пропилпарабен); бальзам для волос (метилпарабен).

Валидацию проводили в соответствии с рекомендациями [9], с учетом специфики методик ТСХ [4], определяя следующие аналитические характеристики: специфичность, линейность градуировочного графика, пределы обнаружения и определения, прецизионность (промежуточная), правильность и робастность.

Специфичность обнаружения и определения метилпарабена оценивали по отношению к другим парабенам (этилпарабен и пропилпарабен) как веществам наиболее близкой структуры, которые могут содержаться в объектах анализа наряду с метилпарабеном.

При оценке специфичности рассчитывали такие параметры как разрешение (R_s (*Resolution*)) двух хроматографических зон, которое определяется расстоянием между их центрами и шириной зон в соответствии с уравнением 1, и селективность разделения ($\alpha_{селект}$ (*Selectivity Factor*)), которая зависит от коэффициентов распределения веществ между компонентами ПФ в соответствии с уравнением 2 [10]:

$$R_s = \frac{\Delta l}{\left[\frac{(\omega_1 - \omega_2)}{2} \right]} \quad (1)$$

$$\alpha_{select} = \left(\frac{D_2}{D_1} \right) = \frac{\left(\frac{1}{R_{f1}} - 1 \right)}{\left(\frac{1}{R_{f2}} - 1 \right)} \quad (2)$$

Значения факторов запаздывания R_f разрешения двух хроматографических зон и селективности разделения приведены в табл. 1.

Градуировочный график в координатах площадь пятна (S , пиксели) – масса метилпарабена в пятне (m , мкг) строили с использованием шести растворов с известными концентрациями метилпарабена, приготовленных независимо весовым методом. На пластинку для ТСХ наносили одинаковые объемы (10 мкл) каждого градуировочного раствора в рандомизированной последовательности. Градуировочный график хорошо описывался линейной зависимостью, свободный член которой является статистическим нулем (рис. 3).

Таблица 1. Характеристики разрешения и селективности при определении метилпарабена в присутствии этил- и пропилпарабена.

Вещества	Метил-парабен (Me)	Этилпарабен (Et)	Пропилпарабен (Pr)
R_f	0.84	0.75	0.65
Ширина пятна, см	0.60	0.65	0.75
Разрешение	-	Me-Et: 1.2	Me-Pr: 2.3
Селективность	-	Me-Et: 1.7	Me-Pr: 2.8

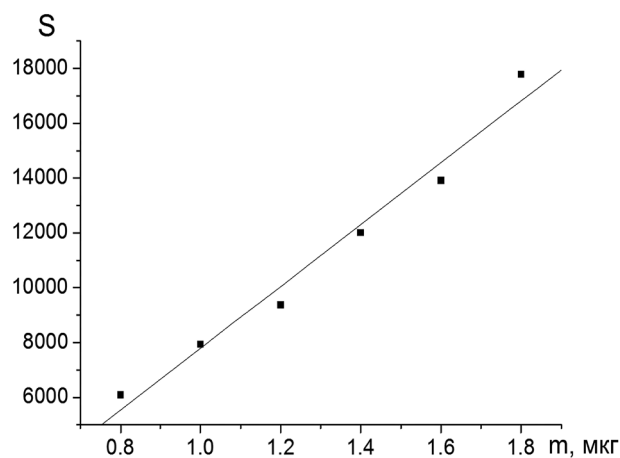


Рис. 3. Градуировочный график для определения метилпарабена; $S = (-2 \pm 4) \cdot 10^3 + (11 \pm 3) \cdot 10^3 \cdot m$; $R = 0.98$.

Пределы обнаружения и определения метилпарабена. Поскольку измерению площади пятна предшествует его визуальное обнаружение и локализация, для оценки предела обнаружения (PrO) использован вероятностный подход, применяемый в визуальном качественном анализе [11]. На основе изучения частот обнаружения аналитического эффекта при концентрациях аналита, близких к пределу обнаружения, PrO оценивали как массу аналита на пятно, обнаруживаемое с заданной доверительной вероятностью [11]. Эмпирическое распределение частот обнаружения, как показал графический анализ (рис. 4), близко к функции распределения Вейбулла в линеаризованной форме

$$\ln \ln \frac{1}{1 - P} = -k \ln b + k \ln m ,$$

где P – вероятность обнаружения аналита, m – масса аналита в пятне, k и b – параметры. При доверительной вероятности 0.95 $PrO = 0.63$ мкг на пятно.

Предел количественного определения (ПрКО) находили по зависимости относительного стандартного отклонения результата анализа от массы аналита в пятне (рис. 5). Значению $s_r = 0.10$ соответствует ПрКО = 0.94 мкг на пятно.

Прецизионность – степень близости друг к другу независимых результатов измерений, обычно выражают в терминах стандартных отклонений. Прецизионность количественного определения метилпарабена оценивали в условиях промежуточной прецизионности (intermediate precision), используя результаты, полученные для одного и того же объекта анализа в одной и той же лаборатории, но в разные дни, с использованием разного оборудования и двумя разными операторами (табл. 2).

Правильность определения метилпарабена оценивали, анализируя один и тот же образец косметического средства до и после введения в него известной добавки метилпарабена. Для

проб с добавкой и без добавки одинаково выполнялись все аналитические операции, включая пробоподготовку. Как видно из табл. 2, степень извлечения добавки во всех случаях характеризуется доверительным интервалом, включающим 100%, что подтверждает правильность определения.

Робастность (robustness - устойчивость) методики - мера ее способности оставаться без изменений при небольших, но неслучайных изменениях в параметрах методики, которая показывает пригодность и надежность методики при нормальном использовании [9]. Исследована робастность методики при изменении массы навески пробы. Результаты анализа не изменяются, если масса навески изменена не более чем на 10 % по сравнению с массой 1 г, предусмотренной в проекте методики. При дальнейшем увеличении навески возникает перегрузка хроматограммы.

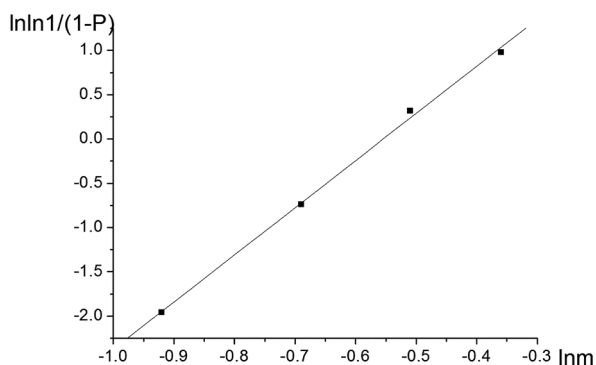


Рис. 4. Проверка согласия эмпирических частот обнаружения метилпарабена с линейаризованной функцией Вейбулла.

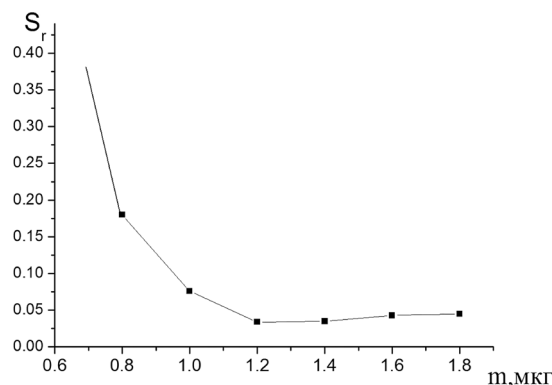


Рис. 5. Зависимость относительного стандартного отклонения результата определения от массы метилпарабена в пятне.

Таблица 2. Характеристики правильности и промежуточной прецизионности результатов определения метилпарабена в косметических продуктах (s_r – относительное стандартное отклонение, n – число определений, ω – массовая доля метилпарабена в пересчете на 4-ГБК).

Объект анализа	s_r	Найдено, $\omega, \%$ ($n = 6$)	Введено добавки $\omega, \%$ ($n = 3$)	Найдено с добавкой, $\omega, \%$	Степень извлечения добавки, %
крем для тела	0.02	0.084 ± 0.005	0.081	0.16 ± 0.02	97 ± 19
молочко-гель	0.04	0.098 ± 0.009	0.068	0.15 ± 0.02	91 ± 17
бальзам для волос	0.03	0.061 ± 0.006	0.063	0.13 ± 0.01	96 ± 9

Выводы

Мицеллярные растворы Твин-80, содержащие 0.3% (v/v) 1-пентанола, применяемые в качестве ПФ для ТСХ, обеспечивают эффективное разделение 4 парабенов на нормальнофазовых пластинках. Количественное определение парабенов методом ТСХ с мицеллярной ПФ основано на сканировании хроматограмм, обработке сканированного изображения и вычислении площади

хроматографических зон в качестве аналитического сигнала. Описаны аналитические характеристики при внутрилабораторной валидации методики обнаружения и количественного определения метилпарабена в косметических продуктах; аналитические характеристики методики свидетельствуют о правильности определений и необходимой для количественного анализа селективности и прецизионности.

Литература

1. Cashman A., Warshaw E. Parabens. A Review of Epidemiology, Structure, Allergenicity, and Hormonal Properties. *Dermatitis*, 2005, 16(2), 57-66.
2. Darbre P.D., Aljarrah A., Miller W.R., Coldham N.G., Sauer M.J., Pope G.S. Concentrations of Parabens in Human Breast Tumours. *J. Appl. Toxicol.* 2004, 24, 5–13.
3. SCCS/1348/10. Opinion on parabens (Electronic resource) / Scientific Committee on Consumer Safety. - 14 December 2010, revision of 22 March 2011. - 2011. - Mode of access: http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_041.pdf
4. Planar Chromatography. A retrospective view for the third millennium / Editor Sz. Nyiredy. — Budapest, Hungary: Springer, 2001, 614.
5. Kruijf N., Rijk M., Pranato-Soetardhi L., Schouten A. Determination of preservatives in cosmetic products I: Thin-layer chromatographic procedure for the identification of preservatives in cosmetic products. *J. Chromatogr.* 1987, 410, 395-411.
6. Kalász H., Báthori M. Pharmaceutical Applications of TLC (Electronic resource). *LC-GC Europe*. 2001, 1-8. - Mode of access: <http://www.chromatographyonline.com/lcgc/data/articlestandard//lcgeurope/182002/18098/article.pdf>
7. Логинова Л.П., Едаменко Д.В., Куликов А.Ю., Лавренко А.Н. Контроль содержания п-гидроксibenзойной кислоты и парабенов в косметических средствах методом мицеллярной тонкослойной хроматографии. *Вісн. Харк. нац. ун-ту*. 2006, 731, Хімія, 14(37), 127-134.
8. Гейсс Ф. Основы тонкослойной хроматографии (планарная хроматография): Пер. с англ./ под. ред. Березкина В.Г. — М.: Мир, 1988. — Т. 1, 348 с., Т. 2, 402 с.
9. Validation of analytical procedures: text and methodology, Q2(R1). ICH harmonised tripartite guideline / International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. – 2005, 17.
10. Analytical chemistry division commission on chromatography and the analytical separation commission on analytical nomenclature. (IUPAC recommendation) / Pure and Applied Chemistry.–1993.– Vol. 65, № 4. – P.819-872.
11. Холин Ю.В., Никитина Н.А., Пантелеймонов А.В., Решетняк Е.А., Бугаевский А.А., Логинова Л.П. Метрологические характеристики методик обнаружения с бинарным откликом.— Х.: Тимченко, 2008, С.128.