

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Aleksandra Prichodko

**PARABENŲ MIKROEKSTRAKCIJA IR  
DUJŲ CHROMATOGRAFINIS NUSTATYMAS**

Daktaro disertacija  
Fiziniai mokslai, chemija (03 P)

Vilnius, 2012

Disertacija rengta 2008–2012 metais Vilniaus universitete

Mokslinis vadovas:

Prof. dr. Vida Vičkačkaitė (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai,  
chemija – 03 P)

## TURINYS

<b>SANTRUMPOS</b> .....	5
<b>ĮVADAS</b> .....	6
<b>1. LITERATŪROS APŽVALGA</b> .....	9
1.1. Parabenai.....	9
1.1.1. Parabenų savybės, taikymas ir poveikis žmonių sveikatai .....	9
1.1.2. Parabenų nustatymo metodų apžvalga.....	17
1.2. Skystafazės mikroekstrakcijos metodų apžvalga.....	25
1.2.1. Mikroekstrakcija tirpiklio lašu.....	26
1.2.2. Skystafazė mikroekstrakcija kapiliare .....	33
1.2.3. Dispersinė skysčių-skysčių mikroekstrakcija .....	39
<b>2. EKSPERIMENTO METODIKA</b> .....	43
2.1. Reagentai ir tirpalai.....	43
2.2. Aparatūra .....	44
2.3. Dujų chromatografinės sąlygos .....	45
2.4 Mikroekstrakcijos procedūros .....	47
2.4.1. Mikroekstrakcijos tirpiklio lašu procedūra.....	47
2.4.2. Skystafazės mikroekstrakcijos kapiliare procedūra.....	47
2.4.3. Dispersinės skysčių-skysčių mikroekstrakcijos procedūra.....	48
2.5 Derivatizacija prieš mikroekstrakcijos procedūras.....	49
2.6. Analizės rezultatų įvertinimas .....	49
2.7. Rezultatų apskaičiavimas priedų metodu .....	50
<b>3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS</b> .....	51
3.1. Parabenų mikroekstrakcija tirpiklio lašu .....	51
3.1.1. Nederivatizuotų parabenų mikroekstrakcija tirpiklio lašu.....	51
3.1.1.1 Ekstrakcijos sąlygų optimizavimas.....	51
3.1.1.2. Metodo analizinės charakteristikos.....	56
3.1.2. Derivatizuotų parabenų mikroekstrakcija tirpiklio lašu .....	57
3.1.2.1. Derivatizacijos sąlygų optimizavimas .....	57
3.1.2.2. Derivatizuotų parabenų tiesioginė mikroekstrakcija tirpiklio lašu.....	61

3.1.2.2.1. Ekstrakcijos sąlygų optimizavimas.....	61
3.1.2.2.2 Metodo analizinės charakteristikos.....	64
3.1.2.3 Derivatizuotų parabenu mikroekstrakcija tirpiklio lašu iš viršerdvės..	65
3.1.2.3.1. Ekstrakcijos sąlygų optimizavimas.....	65
3.1.2.3.2. Metodo analizinės charakteristikos.....	70
3.1.3. Parabenu mikroekstrakcijos tirpiklio lašu praktinis pritaikymas .....	71
3.2. Parabenu skystafazė mikroekstrakcija kapiliare.....	74
3.2.1. Nederivatizuotų parabenu skystafazė mikroekstrakcija kapiliare .....	74
3.2.1.1. Ekstrakcijos sąlygų optimizavimas.....	74
3.2.1.2. Metodo analizinės charakteristikos.....	79
3.2.1.3. Metodo praktinis pritaikymas .....	80
3.2.2. Derivatizuotų parabenu skystafazė mikroekstrakcija kapiliare .....	83
3.2.2.1. Ekstrakcijos sąlygų optimizavimas.....	83
3.2.2.2. Metodo analizinės charakteristikos.....	87
3.2.2.3. Metodo praktinis pritaikymas .....	88
3.3. Parabenu dispersinė skysčių-skysčių mikroekstrakcija.....	89
3.3.1. Nederivatizuotų parabenu dispersinė skysčių-skysčių mikroekstrakcija	90
3.3.1.1. Ekstrakcijos sąlygų optimizavimas.....	90
3.3.1.2. Metodo analizinės charakteristikos.....	97
3.3.1.3. Metodo praktinis pritaikymas .....	98
3.3.2. Derivatizuotų parabenu dispersinė skysčių-skysčių mikroekstrakcija ...	99
3.3.2.1. Ekstrakcijos sąlygų optimizavimas.....	99
3.3.2.2. Metodo analizinės charakteristikos.....	104
3.3.2.3. Metodo praktinis pritaikymas .....	105
3.4. Parabenu mikroekstrakcijos metodų palyginimas .....	106
<b>IŠVADOS</b> .....	113
<b>AUTORIAUS MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ, APIBENDRINTŲ</b>	
<b>DAKTARO DISERTACIJOJE, SĄRAŠAS</b> .....	115
<b>LITERATŪROS SĄRAŠAS</b> .....	116

## SANTRUMPOS

BSA – N,O-bis(trimetilsilil)acetamidas;  
DCh – dujų chromatografija;  
DCh-LJD – dujų chromatografija su liepsnos jonizaciniu detektoriumi;  
DCh-MS – dujų chromatografija su masių spektrometrija;  
DCh-MS/MS – dujų chromatografija su tandemine masių spektrometrija;  
DSSME – dispersinė skysčių-skysčių mikroekstrakcija;  
DVB/CAR/PDMS – divinilbenzenas/karboksenas/polidimetilsiloksanas;  
ESCh – efektyvioji skysčių chromatografija;  
IR spektroskopija – infraraudonoji spektroskopija;  
KECh – kapiliarinė elektrochromatografija;  
KFE – kietafazė ekstrakcija;  
KFME – kietafazė mikroekstrakcija;  
KZE – kapiliarinė zonų elektroforezė;  
MEEKCh – mikroemulsinė elektrokinetinė chromatografija;  
MEKCh – micelinė elektrokinetinė chromatografija;  
METL – mikroekstrakcija tirpiklio lašu;  
MS/MS – tandeminė masių spektrometrija;  
MSTFA – N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoracetamidas;  
PA – poliakrilatas;  
PDMS – polidimetilsiloksanas;  
PEEK – poli(eterio-eterio-ketono);  
SES – sorbcinė ekstrakcija strypeliu;  
SFME – skystafazė mikroekstrakcija;  
SFMEK – skystafazė mikroekstrakcija kapiliare.

## IVADAS

Parabenai yra *p*-hidroksibenzoinės rūgšties esteriai. Jie pasižymi antibakterinėmis ir priešgrybelinėmis savybėmis. Dėl savo savybių ir mažos kainos parabenai plačiai naudojami kosmetikos, maisto, farmacijos pramonėje kaip konservantai, apsaugantys produktus nuo ankstyvo gedimo ir prailginantys jų galiojimo laiką. Norint pasiekti stipriausią antimikrobinį poveikį, naudojamas skirtingų parabenų mišinys, todėl kosmetikos priemonių sudėties etiketėse dažniausiai aptiksime kelis skirtingus *p*-hidroksibenzoinės rūgšties esterius: metil-, etil-, propil- ir butilparabenus. Minėtų parabenų galima rasti tiek kremuose ir kitose asmeninės higienos priemonėse, tiek maisto produktuose, netgi baseino ar nutekamuosiuose vandenyse.

Ilgą laiką buvo manyta, kad parabenai nesukelia šalutinio poveikio ir yra netoksiški, tačiau pastaraisiais metais susidomėjimas parabenais išaugo dėl jų galimai sukeliama neigiamo poveikio žmogaus sveikatai. Padidėjus įtarimams, jog prasiskverbę per odą parabenai gali sukelti alergines reakcijas, veikti endokrininę sistemą, skatinti vėžinių ląstelių atsiradimą, buvo pradėta kontroliuoti jų kiekį aplinkoje, maisto bei kosmetikos produktuose. Europos Sąjunga leidžia parabenus naudoti kosmetikos produktuose, kai kiekvieno jų koncentracija yra iki 0,4 %, o bendra koncentracija yra iki 0,8 %.

Parabenų koncentracijos dažnai yra per mažos, o mėginiai per daug sudėtingi, kad juos būtų galima analizuoti nesukoncentravus ir neizoliavus nuo trukdančios matricos. Mėginio paruošimas dažnai tampa ilgiausia ir sudėtingiausia analizės stadija, kuri užima didžiausią bendros analizės trukmės dalį ir daro didžiausią įtaką analizės paklaidoms. Dėl šios priežasties viena iš pagrindinių pastarųjų metų analizinės chemijos vystymosi krypčių – naujų, efektyvių mėginio paruošimo metodų paieška, tyrimas ir taikymas siekiant pagreitinti, palengvinti ir atpiginti analizę.

Ruošiant mėginius analizei ypač populiarūs įvairūs ekstrakcijos metodai. Klasikiniai skystiems mėginiams ekstrahuoti naudojami ekstrakcijos metodai yra kietafazė ekstrakcija ir skysčių-skysčių ekstrakcija. Tai paprasti,

nerieikalaujantys sudėtingos aparatūros, tačiau daug laiko užimantys metodai, kuriuos taikant yra sunaudojami dideli brangių ir toksiškų organinių tirpiklių tūriai. Siekiant išvengti šių trūkumų, pasiūlyta klasikinius ekstrakcijos metodus miniatiūrizuoti. Ypač paplitęs miniatiūrizuotas kietafazės ekstrakcijos variantas – kietafazė mikroekstrakcija. Miniatiūrizuotų skysčių-skysčių ekstrakcijos variantų yra daugiau. Tai mikroekstrakcija tirpiklio lašu, skystafazė mikroekstrakcija kapiliare bei dispersinė skysčių-skysčių mikroekstrakcija. Visi šie metodai naudoja vos kelis – keliolika mikrolitrų ekstrahento, yra pigūs ir greiti.

Vienas iš plačiausiai naudojamų organinių junginių analizės metodų yra dujų chromatografija – analizės metodas, pasižymintis atrankumu, paprastumu, analizės atlikimo sparta.

**Šioje daktaro disertacijoje apibendrintų mokslinių tyrimų tikslas** – sukurti parabenų skysčių-skysčių mikroekstrakcijos metodus – mikroekstrakciją tirpiklio lašu, skystafazę mikroekstrakciją kapiliare ir dispersinę skysčių-skysčių mikroekstrakciją – bei pritaikyti juos parabenų nustatymui vandenyje bei kosmetikos produktuose.

#### **Disertacinio darbo uždaviniai:**

1. Sukurti nederivatizuotų ir derivatizuotų parabenų mikroekstrakcijos tirpiklio lašu metodus.
2. Sukurti nederivatizuotų ir derivatizuotų parabenų skystafazės mikroekstrakcijos kapiliare metodus.
3. Sukurti nederivatizuotų ir derivatizuotų parabenų dispersinės skysčių-skysčių mikroekstrakcijos metodus.
4. Palyginti paruoštus parabenų mikroekstrakcijos metodus ir įvertinti derivatizacijos įtaką mikroekstrakcijos metodų efektyvumui.
5. Paruoštus parabenų mikroekstrakcijos metodus pritaikyti realių mėginių analizei.

**Ginamieji disertacijos teiginiai:**

1. Siūlomi parabenų mikroekstrakcijos metodai yra efektyvūs, paprasti, greiti ir pigūs.
2. Parabenų derivatizacija prieš mikroekstrakcijos procedūras padidina parabenų nustatymo jautrį.
3. Siūlomi parabenų mikroekstrakcijos metodai tinkami realių objektų analizei.
4. Mikroekstrakcijos metodo pasirinkimą nulemia mėginio matrica.

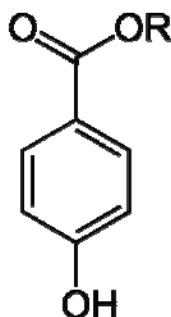


# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. Parabenai

### 1.1.1. Parabenų savybės, taikymas ir poveikis žmonių sveikatai

Parabenai – tai organiniai junginiai, *p*-hidroksibenzoinės rūgšties esteriai (1.1 pav.).



1.1 pav. Bendra parabenų formulė (R – alkilo grupė).

Parabenai sintetinami rūgštinėje terpėje esterifikuojant *p*-hidroksibenzoinę rūgštį atitinkamu alkoholiu [1].

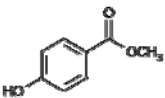
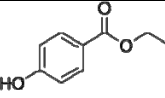
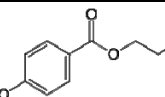
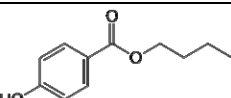
Parabenai yra bespalviai, bekvapiai, beskoniai kristalai ar milteliai. Jie pasižymi higroskopiškumu ir turi gana aukštus oktanolis/vanduo pasiskirstymo koeficientus. Parabenai yra stabilūs, nelinkę hidrolizuotis junginiai [2].

1924 m. T. Sabalitschka pirmą kartą pasiūlė naudoti parabenus kaip konservantus ir parodė jų antimikrobinį poveikį [2]. Parabenai atitinka idealiam konservantui keliamus reikalavimus: neturi kvapo, skonio, praktiškai neutralūs, nekeičia produktų, į kurių sudėtį įeina, spalvos, nesuteikia jiems kietumo, pasižymi plačiu antimikrobinio veikimo spektru, pakankamai saugūs naudoti (bent jau taip ilgą laiką buvo manoma), yra stabilūs palyginti plačioje pH srityje (4,5–7,5), pakankamai tirpūs vandenyje [3]. Dėl stabilumo aukštose temperatūrose parabenai nepraranda antimikrobinų savybių produktus turinčius parabenų sterilizuojant [2]. Antimikrobinės parabenų savybės gerėja ilgėjant alkilo grandinei molekulėje, tačiau tokiu atveju jų tirpumas vandenyje

mažėja. Taigi maisto produktuose dažniau vartojami žemesnieji esteriai (metil- ir propil-) [4]. Norint pasiekti stipriausią antimikrobinį poveikį, naudojamas skirtingų parabenų mišinys, todėl kosmetikos priemonių sudėties etiketėse dažniausiai aptinkami keli skirtingi esteriai: metil-, etil-, propil- ir butilparabenai (1.1 lentelė) [5]. 1987 m. JAV propilparabeno sunaudojimas apytikriai buvo 6947 kg, metilparabeno – 424 kg, o bendrai parabenų pagaminta 7727 kg per metus [2]. Metilparabenas ir propilparabenas dažniausiai naudojami kartu dėl sinergetinio efekto. Taip yra todėl, kad propilparabenas turi didesnę antimikrobinę poveikį, bet metilparabenas yra tirpesnis. Kadangi šie du parabenai mažiau lipofiliniai, jie nėra tokie toksiški, kaip ilgesnės grandinės parabenai, pvz. benzilparabenas [6, 7]. Dėl šių savybių ir mažos kainos parabenai plačiai naudojami kosmetikos, maisto, farmacijos pramonėje kaip konservantai, apsaugantys produktą nuo ankstyvo gedimo ir prailginantys jų galiojimo laiką.

**1.1 lentelė**

Populiariausi parabenai

<b>Pavadinimas</b>	<b>IUPAC pavadinimas</b>	<b>Formulė</b>	<b>E numeris</b>
Metilparabenas	Metil-4-hidroksibenzoatas		E218
Etilparabenas	Etil-4-hidroksibenzoatas		E214
Propilparabenas	Propil-4-hidroksibenzoatas		E216
Butilparabenas	Butil-4-hidroksibenzoatas		

Kartu ar pavieniui parabenai naudojami daugiau nei 13200 kosmetikos priemonių [8]. 1995 m. ištyrus 215 kosmetinių priemonių 77 % nuplaunamų priemonių (šampūnai, kūno prausikliai, makiažo valikliai, muilai ir t.t.) ir 99 % nenuplaunamų priemonių (kremai veidui ir rankoms, kūno losjonai, kremai nuo saulės, dekoratyvinė kosmetika ir t.t.) sudėtyje buvo rastas vienas ar daugiau parabenų. Iš visų parabenų turinčių priemonių 98 % savo sudėtyje turėjo metilparabeno, 32 % – etilparabeno, 38 % – propilparabeno, 16 % – butilparabeno ir 16 % – benzilparabeno. Parabenų turinčių priemonių sudėtyje bendras parabenų kiekis buvo 0,01–0,87 % [5].

Europos Sąjungos kosmetikos priemonių direktyva (European Union Cosmetics Directive 76/768/EEC) nustatė naudojamų konservantų ribas kosmetikoje. Didžiausia leistina kiekvieno parabeno koncentracija yra iki 0,4 %, o bendra koncentracija (išreikšta kaip *p*-hidroksibenzoinė rūgštis) neturi viršyti 0,8 % [9]. Parabenų turintys kosmetiniai produktai, kontaktuojantys su oda, plaukais, galvos oda, lūpomis, gleivine, pažastimis bei nagais tiek retkarčiais, tiek kasdieną, gali būti naudojami nuolat net kelis dešimtmečius [8]. Galimas pavojus sveikatai didėja kosmetiką naudojant dideliais kiekiais [10]. Nenuplaunami produktai, tokie kaip dekoratyvinė kosmetika ir kūno losjonai, pavojingesni sveikatai, nes ilgai išlieka odos paviršiuje ir gali per odą prasiskverbti į kraują [11].

Pirmiausiai parabenai kaip konservantai buvo panaudoti vaistų pramonėje. Jų yra daugybės tablečių, sirupų, injekcinių vaistų ir žvakučių sudėtyje. Propilparabenas yra vienas efektyviausių konservantų, naudojamų priešgrybelinių preparatų gamyboje. Metilparabenas ir propilparabenas kaip konservantai naudojami įvairiuose nereceptiniuose vaistuose. Juose parabenų koncentracija skiriasi priklausomai nuo produkto, bet retai viršija 1 %. Vis dėlto JAV Maisto ir vaistų valdyba (Food and Drug Administration) nustatė, kad jie dirgina akis ir kaip konservantai yra netinkami naudoti joms skirtuose vaistuose [2].

Parabenai nedideliais kiekiais naudojami ir maisto produktuose bei gėrimuose, kad apsaugotų juos nuo ankstyvo gedimo, pelėsių bei bakterijų.

Dažniausiai parabenai naudojami tokiuose maisto produktuose kaip tortai, pyragaičiai, glajus, įdaras, nealkoholiniai gėrimai, džemas, želė, marinatai ir sirupai [2]. Didžiausia leistina parabenų koncentracija maisto produktuose yra 0,1 %. Buvo nustatyta, kad į žmogaus organizmą per dieną patenka apie 76 mg parabenų arba 1,3 mg vienam kūno svorio kilogramui, iš jų su maistu apytiksliai 1 mg, su kosmetiniais ir asmeninės higienos produktais 50 mg, ir su vaistais 25 mg [10]. Daugybė organizacijų (Food and Drug Administration, the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, the Flavor and Extract Manufacturer's Association ir kt.) ir įvairios pasaulio šalys (Kanada, Japonija, Norvegija, Švedija ir kt.) nedraudžia dėti parabenų į maisto produktus [1]. Europos Sąjunga leidžia (Direktyva 95/2/EC) metil-, etil-, propilparabenus naudoti tokiuose maisto produktuose kaip mėsos drebučiai (maksimalus leidžiamas kiekis 1g/kg), konditerijos gaminiai (išskyrus šokoladą) (0,3g/kg) ir skystuose maisto papilduose (2 g/kg). Metilparabenų ir etilparabenų bei jų natrio druskų priimtinas dienos suvartojimas yra 0–10 mg vienam kūno svorio kilogramui [12].

Parabenai nėra vien tik sintetiniai junginiai, gaunami chemijos laboratorijose, jų randama ir augalinės kilmės produktuose, pvz.: mėlynėse, tekšėse, pasifloros vaisių sultyse, baltajame vyne. Tekšėse nustatytas metilparabeno kiekis yra apie 0,15 ppm. M. Goodwin su bendraautoriais nustatė, kad metilparabeno yra šuns išskiriamuose skysčiuose rujos metu. Šio tyrimo autoriai teigia, kad metilparabenas yra šunų lytinis feromonas [1].

Dėl plataus vartojimo parabenų randama nutekamuosiuose vandenyse [13]. Nors parabenai iš jų šalinami, maži jų kiekiai (ng/L eilės) vis dėlto patenka į gamtinius vandenis [14]. Deja informacijos apie galimą parabenų įtaką vandens organizmams beveik nėra [7].

Parabenai į žmogaus organizmą patenka įvairiais keliais. Vienas iš jų – per odą, pvz.: saulėtą dieną tepantis apsauginiu kremu, kuriame yra parabenų. Taip pat parabenai gali atkeliauti į organizmą su maistu, gaiviaisiais gėrimais. Kadangi daugelis žmonių su šiais junginiais susiduria nuolat, labai svarbu įvertinti jų poveikį žmogaus organizmui.

Ilgą laiką buvo manyta, kad parabenai, kurie absorbuojasi per odą iš kūno priežiūros priemonių jau po pirmo kontakto [15], metabolizmo reakcijų metu yra iš jo pašalinami [16] arba blogiausiu atveju gali sukelti alergines reakcijas ar sudirginti odą [17]. Pirmą kartą šių medžiagų nekenksmingumu suabejota, kai 1940 m. buvo užfiksuotas etilparabeno sukeltas kontaktinio dermatito atvejis. Vis dėlto parabenų sukulto alerginio kontaktinio dermatito atvejų užfiksuota nedaug. H.A. Krob ir bendraautoriai parodė, kad parabenai yra silpni alergenai, sukeliantys alergines reakcijas tik 0,5 % ištirtų pacientų. Kontaktinio dermatito atvejai dažniausiai pasitaiko, kai parabenus turintys produktai tepami tiesiai ant pažeistos odos. Parabenai gali sukelti ir staigią alerginę reakciją (pvz. kontaktinę dilgėlinę) [18]. A. Katsarou ir bendraautoriai ištyrė parabenų poveikį 664 pacientams. Daliai jų (4,5 %) alerginė reakcija į parabenus pasireiškė po 30 minučių [19]. Siekiant ištirti parabenų turinčių produktų efektą akims, buvo atlikti keli tyrimai su triušiais. Dauguma parabenų nesukėlė akies dirginimo reakcijų, kiti akis dirgino nežymiai [2].

1973 m. A. Fischer paskelbė, kad kai kuriais atvejais vietinio naudojimo terapiniuose preparatuose esantys parabenai gali sukelti alergines reakcijas, tačiau esantys kosmetikos priemonėse – ne. Šis akivaizdus prieštaravimas buvo pavadintas „parabenų paradoksu“. Buvo teigiama, kad parabenais papildyta kosmetika gerai toleruojama, jei naudojama ant normalios, nepažeistos odos [17].

1998 m. E. J. Routledge ir bendraautoriai nustatė, kad parabenai turi tam tikrą estrogeninį aktyvumą [20], t.y. mėgdžioja natūralų hormoną estrogeną ir sukelia nepageidaujamą poveikį endokrininei sistemai [21, 22]. Estrogenai – 17- $\beta$ -estradioliai – pagrindiniai lytiniai hormonai, kurie skatina antrinių moteriškųjų lytinių požymių vystymąsi, medžiagų apykaitą ir ruošia moters organizmą apvaisinimui, vaisiaus išnešiojimui, gimdymui ir maitinimui. Jie turi pastebimą įtaką odos būklei, nes epidermyje esančių estrogenų funkcija – pagreitinti žaizdų gijimą bei išsaugoti kolageną, reikalingą palaikyti odos elastingumui. Manoma, kad padidėję estrogeno kiekiai padidina krūties vėžio susirgimo riziką [23]. Tai nustačius buvo atlikta daug toksikologinių tyrimų su

laboratoriniais gyvūnais (*in vivo* metodai) bei ląstelių kultūromis (*in vitro* metodai). Gauti rezultatai parodė, kad parabenai mėgdžioja estrogenų veiklą, silpnai sąveikaudami su estrogenų atpažįstančiais receptoriais, taip pat didina estrogeno koncentraciją organizme, blokuodami fermentų sulfotransferazių, skaldančių estrogeną, bei jo pirmtaką – estroną (iš kurio organizme sintetinamas estrogenas) veiklą. Šie fermentai – sulfotransferazės – yra pasiskirstę odoje, jų funkcija – mažinti aktyvaus estrogeno kiekius. Tuo tarpu parabenai inhibuoja šio fermento veiklą ir šio veikimo stiprumas labai priklauso nuo parabeno struktūros. Tyrimais įrodyta, kad ilgėjant šoninės alkilo grupės atšakai parabeno esterinėje grupėje, stiprėja junginio estrogeninės savybės. Dėl šios priežasties, iš kosmetikoje naudojamų parabenų, butilparabenas pasižymi stipriausiomis estrogeninėmis savybėmis ir efektyviausiai blokuoja odos sulfotransferazių veikimą [9].

Taip pat atlikta keletas tyrimų, kurie kartu su estrogeniniu aktyvumu įvertina ir parabenų antispermatogeninį poveikį. S. Oishi parodė, kad paveikus žiurkių ir pelių patinus butilparabenu ar propilparabenu (bet ne metilparabenu ar etilparabenu), tai neigiamai paveikia testosterono sekreciją ir patinų reprodukcinės sistemos funkciją [24].

Susidomėjimas toksiniu parabenų poveikiu ypač išaugo, kai jų pėdsakų buvo rasta krūties auglio mėginyje [16]. Šiame tyrime parabenų pėdsakų buvo rasta 18 iš 20 krūties auglio audinio mėginių. Iš audinio mėginio ekstrahavus parabenus, buvo nustatytos ir suskaičiuotos jų molekulės, o gauti rezultatai palyginti su kontroliniu mėginiu, paimtu iš nenavikinio krūties audinio. Nustatytas bendras parabenų kiekis buvo vidutiniškai 20,6 ng viename grame krūties auglio audinio. Daugiausiai rasta metilparabeno ( $12,8 \pm 2,2$  ng/g audinio), t.y. 62 % bendro parabenų kiekio, benzilparabenas nerastas. Krūties auglio audinio mėginyje buvo aptiktos didesnės parabenų koncentracijos, nei kontroliniuose mėginiuose, bet ir pastarieji turėjo žymias parabenų koncentracijas. Nors statistiškai analizė ir nebuvo labai įtikinama, tačiau informacija buvo pakankama, kad būtų suabejota parabenų naudojimu kosmetikos priemonėse. Žiniasklaida pasinaudojo šia tema ir per televizijos

reportažus, spausdintus bei internetinius straipsnius išgąsdino pirkėjus. Šie P. D. Darbre tyrimai susilaukė kitų autorių [24] kritikos, nes tyrimas paremtas mažu mėginių kiekiu, kontroliniai mėginiai buvo užteršti parabenais, kurių šaltinis nežinomas. Parabenai, rasti krūties auglio audinio mėginyje, į jį galėjo patekti dėl išorinio užteršimo, o ne iš krūties auglio. Taip pat abejotinas faktas, kad krūties auglio audinio mėginyje nebuvo rastas benzilparabenas, kuris turi sąlyginai stiprų estrogeninį aktyvumą, o metilparabeno buvo gausiausiai, nepaisant to, kad jo estrogeninis aktyvumas silpniausias. Dauguma mokslininkų sutarė, kad nėra įrodyto ryšio tarp parabenų ir krūties auglio, o tuo labiau tarp parabenų turinčių kosmetikos priemonių naudojimo ir krūties auglio. Tačiau pritarta, kad būtina tęsti tyrimus dėl parabenų ir krūties auglio audinio sąsajų prieš pateikiant galutines išvadas.

Mokslinių bandymų metu paaiškėjo, kad vis didėjantis sergančių melanoma jaunų žmonių skaičius susijęs su augančiu kūno priežiūros priemonių ir kremų, apsaugančių nuo saulės neigiamo poveikio, kuriuose yra parabenų, naudojimu [2, 25]. Taip pat nustatyta, kad ant odos esantis metilparabenas, sąveikaudamas su UV spinduliais, greitina odos senėjimą bei sukelia DNR mutacijas [26, 27].

Nustatyta, kad didelės propilparabeno ir butilparabeno koncentracijos yra genotoksiškos [28].

P. Canosa paskelbtame straipsnyje yra teigiama, kad metil- ir propilparabenai yra toksiški, tačiau ypatingai pavojingi yra jų chlorinti produktai. Chlorinimo reakcija gali įvykti plaukimo baseino ar vandentiekio vandenyje esančioms chloro turinčioms medžiagoms (šių medžiagų pridedama į vandenį norint užtikrinti vandens bakteriologinę kokybę) sureagavus su parabenais žmogaus odoje [14, 29].

Galima daryti išvadą, kad parabenų poveikis labai priklauso nuo to, koku būdu jis patenka į žmogaus organizmą. Jei parabenai į organizmą patenka per burną su maistu ar vandeniu, jie lengvai absorbuojami virškinamojo trakto, hidrolizuojami iki *p*-hidroksibenzoinės rūgšties ir išskiriami kartu su šlapimu be pastebimo polinkio kauptis žmogaus organizme [5, 9]. Kraujyje ir šlapime

aptiktas tik hidrolizės produktas – *p*-hidroksibenzoinė rūgštis, kuri nepasižymi estrogeniškumu. Kai parabenai yra absorbuojami per odą, jie ilgiau išlieka laisvi, nepaveikti juos skaidančių fermentų esterazių, nes odoje šių fermentų yra daug mažiau, nei kepenyse. Poodiniuose riebaluose esančios esterazės aktyviau skaido parabenus su trumpa grandine, tuo tarpu esterazės esančios keratinocituose aktyviau skaido parabenus su ilgesnėmis grandinėmis [30]. Tyrimai parodė, jog žmogaus odoje metilparabenai persiesterifikuoja į butilparabeną, kurio estrogeninis efektyvumas yra didesnis nei kitų parabenų [31]. H. Nakazawa ir bendraautoriai nustatė, kad žmogaus kraujyje ir piene nėra parabenų, bet jų pagrindinis metabolizmo produktas – *p*-hidroksibenzoinė rūgštis buvo rasta visų pacientų kraujo ir pieno mėginiuose. S. Oishi pademonstravo, kad dalis parabenų gali būti absorbuota ir likti žmogaus kūno audiniuose nehidrolizuoti [24]. Taigi kasdienis kremų, losjonų ar kitų higienos priemonių naudojimas papildo odoje susikaupusias parabenų atsargas. Yra nustatyta, kad lengviausiai per odą absorbuojasi metilparabenai, nepaisant to, kad jo lipofiliškumas mažiausias iš visų parabenų, o butilparabenai į odą prasiskverbia sunkiau. Taigi ekologinių prekių atstovai, teigiantys, kad parabenai linkę įsiskverbti į giliausius odos sluoksnius bei juose kauptis, yra teisūs [10].

Viena vertus galime džiaugtis, kad estrogeno kiekiai odoje auga dėl parabenų poveikio, o dėl to gerėja odos elastingumas, drėkinimas bei geriau gyja žaizdos. Kita vertus, parabenų estrogeninis aktyvumas ir faktas, kad krūties vėžiniame audinyje randama susikaupusių laisvų parabenų, verčia sunerimti. Tačiau, kad krūties vėžiniuose audiniuose buvo rasta nemodifikuotų parabenų dar nereiškia, kad jie ir yra šio susirgimo priežastis. Tai tik įrodo, kad parabenai lengvai difunduoja pro odos apsauginį sluoksnį, įsiskverbia į gilesnius odos sluoksnius ir yra linkę kauptis juose. Mokslininkai neskuba daryti išvadų, kad parabenai gali turėti kancerogeninių savybių, teigdami, jog reikia išsamesnių tyrimų, įvertinant ir tai, kad žmogus susiduria ne vien tik su parabenais, bet ir kitais aplinkoje egzistuojančiais teršalais bei junginiais, pasižyminčiais estrogeninėmis savybėmis. Taip pat svarbu atkreipti dėmesį į



tai, kad informacijos apie parabenus yra daugiau nei apie daugelį kitų konservantų. Alternatyvos parabenams yra ribotos, labai dažnai mažiau efektyvios, nelabai toleruojamos paviršiniam naudojimui, be to joms neatlikti išsamūs tyrimai.

### **1.1.2. Parabenų nustatymo metodų apžvalga**

Dažnai reikia nustatyti mažus parabenų kiekius sudėtingose matricose, todėl nustatymo metodai turi būti jautrūs. Be to, reikia naudoti ekstrakcijos metodus, kurie leistų ne tik sukcentruoti analites, bet ir izoliuotų jas nuo trukdančios matricos [11]. Sukurta daug analizės metodų parabenams nustatyti. Jų pasirinkimas priklauso nuo to, kokios kilmės mėginius analizuosime. Dažniausiai parabenai nustatinėjami maisto produktuose, kosmetikos priemonėse, farmacijos pramonės gaminiuose, taip pat nutekamuosiuose, baseino bei upių vandenyse. Kadangi yra tiriamas parabenų poveikis žmogaus organizmui, reikia jautrių ir atrankių analizės metodų, kuriuos galima būtų panaudoti nustatant parabenus žmogaus kraujo serume, odoje, šlapime.

#### ***Parabenų paruošimo analizei metodai***

Prieš analizę parabenų turintys mėginiai dažniausiai ekstrahuojami. Naudojami įvairūs ekstrakcijos metodai.

Kietafazė ekstrakcija (KFE) – sukcentravimo ir atskyrimo nuo matricos būdas, pagrįstas analičių adsorbcija kieto sorbento paviršiuje. Analitės gali būti ekstrahuojamos iš skystų ir dujinių matricų. KFE taikoma teisminėje ekspertizėje, aplinkos, maisto ir farmacijos pramonės gaminiams analizuoti. Naudojant KFE galima išvengti ar bent sumažinti skysčių-skysčių ekstrakcijos trūkumų: didelio organinių tirpiklių sunaudojimo, nepilno fazių atskyrimo, dūžtančios aparatūros naudojimo. KFE metodu pasiekiami didesni sukcentravimo laipsniai. Tai efektyvus, paprastas, greitas, lengvai automatizuojamas metodas. F. Han ir bendraautorai C<sub>8</sub>-silikagelio sorbentą naudojo kaip mėginio valymo ir sukcentravimo metodą tam, kad, prieš nustatant parabenus, pašalintų aliejinę matricą iš aliejaus pagrindu pagamintų

losjonų ir kremų [32]. X. Ye ir bendraautoriai C<sub>18</sub>-silikagelio sorbentą naudojo parabenams išekstrahuoti iš žmogaus šlapimo. Jie pastebėjo, kad KFE išgava gerėja ilgėjant parabenų alkilo grandinės ilgiui (nuo 80 % metilparabenui iki 96 % butilparabenui). Taip yra todėl, kad trumpos alkilo grandinės parabenai sorbento yra silpniau sulaikomi [33]. I. Marquez-Sillero ir bendraautoriai parabenų ekstrakcijai iš kosmetikos produktų panaudojo daugiasienius anglies nanovamzdelius [34].

Kietafazės mikroekstrakcijos metodą (KFME) 1989 m. pasiūlė J. Pawliszyn ir bendraautoriai [35]. Tai efektyvus, paprastas, greitas, gana pigus, lengvai automatizuojamas metodas. Apjungus su dujų chromatografiniu nustatymu, KFME visai nenaudoja dujų chromatografinę kolonėlę galinčių perkrauti tirpiklių, nes analitės chromatografo garintuve desorbuojamos termiškai. Be to, kadangi chromatogramoje nėra tirpiklio smailės, palengvėja analičių smailių chromatografinis atskyrimas [11, 36].

J. K. Lokhnauth ir H. Snow pirmieji pasiūlė KFME naudoti parabenų ekstrakcijai iš farmacijos pramonės gaminių. Jie ištyrė penkias komercines KFME dangas, iš kurių tinkamiausia parabenų ekstrakcijai pasirodė divinilbenzenas/karboksenas/polidimetilsiloksanas (DVB/CAR/PDMS) [11]. Kiek kitokius rezultatus gavo P. Canosa ir bendraautoriai. Jų tyrimų rezultatai parodė, kad parabenų ekstrakcijai tinkamiausia KFME sistema su poliakrilato (PA) danga [13]. Siekiant sumažinti KFME kainą ir nenaudoti gana brangiai kainuojančių komercinių KFME sistemų, buvo pasiūlyta sistema, sudaryta iš nerūdijančio plieno strypelio, elektrocheminiu būdu padengto polianilino-polipirolo danga [3]. Atlikus bandymus su standartiniais parabenų tirpalais ir optimizavus chromatografines sąlygas, strypelis buvo pritaikytas parabenų nustatymui kosmetikoje. Paskelbta daug publikacijų apie KFME panaudojimą parabenų nustatymui farmacijos pramonės gaminiuose, kosmetikos priemonėse [37], vandens mėginiuose [35, 38].

Parabenai gali būti ekstrahuojami skysčių-skysčių ekstrakcijos metodu. Pavyzdžiui, nustatant parabenų koncentraciją ant odos po 1–8 valandų nuo kremo užtepimo, mėginiai buvo paimami atliekant ekstrakciją heksanu.

Tam heksanas buvo įpilamas į indelį, indelio anga prispaudžiama prie kremu pateptos vietos ant rankos ir ekstrahuojama 1 minutę. Palyginamasis mėginys imamas taip pat, tik nuo kremu nepaveiktos vietos [39]. Parabenu nustatymui kosmetikos priemonėse buvo panaudota ekstrakcija acetonu [5] ir etanoliu [17]. Vis dėlto šis metodas reikalauja daug darbo sąnaudų, sunaudojama daug brangių ir toksiškų organinių tirpiklių.

Sorbcinės ekstrakcijos strypeliu (SES) metodą 1999 m. pasiūlė E. Baltussen ir bendraautorai [40]. Analitės ekstrahuojamos polidimetilsiloksanu (PDMS) padengtu magnetinės maišyklės strypeliu, panardintu į skystą mėginį, maišant tam tikrą laiką. Po ekstrakcijos analitės desorbuojamos termiškai arba išekstrahuojamos tirpikliais ir toliau analizuojamos chromatografiniais metodais. Šis metodas lengvai atliekamas, jautrus, atrankus, bet ekstrakcija reikalauja daug laiko. Metodas buvo pritaikytas parabenu nustatymui kosmetikos priemonėse [41], gėrimuose [42] ir vandens mėginiuose [43, 44].

Skystafazė mikroekstrakcija (SFME) buvo pasiūlyta kaip miniatiūrizuotas skysčių-skysčių ekstrakcijos variantas. SFME metodai detaliau aprašyti 1.2 skyriuje. Yra vos keletas darbų apie parabenu skystafazė mikroekstrakciją [45]. Parabenams ekstrahuoti buvo pasiūlyta mikroekstrakcija tirpiklio lašu, skystafazė mikroekstrakcija kapiliare ir dispersinė skysčių-skysčių mikroekstrakcija.

M. Saraji ir bendra autorių darbe aprašyta parabenu, esančių kosmetikos priemonėse ir vandeniniuose tirpaluose mikroekstrakcija tirpiklio lašu (METL). Ekstrahuojančiais tirpikliais buvo išbandyti toluenas, heksilacetatas, *n*-dekanas ir 1,2,4-trimetilbenzenas. Geriausiomis ekstrakcinėmis savybėmis pasižymėjo heksilacetatas. Buvo pasirinkta 2 min ekstrakcijos trukmė. Po ekstrakcijos, ekstraktas mikrošvirkštu įleistas į dujų chromatografą analizei [36]. Y. C. Fiamegos ir bendra autorai METL pritaikė endokrininę sistemą veikiančių medžiagų (tarp jų ir parabenu) nustatymui vandens mėginiuose [46].

Literatūros apie parabenu skystafazė mikroekstrakciją kapiliare (SFMEK) neaptikau.

Parabenai iš vandeninių tirpalų gali būti eksahuojami dispersinės skysčių-skysčių mikroekstrakcijos (DSSME) metodu. DSSME buvo pritaikyta parabenų nustatymui gėrimuose (geriamasis vanduo, gazuotas gėrimas, žalios arbatos gėrimas ir arbatžolės) [47]. Ekstahentu buvo pasirinktas chlorbenzenas, disperguojančiu tirpikliu – acetonas. M. A. Farajzadeh ir bendraautorių darbe naudojamas ne tradicinis DSSME variantas, kai tirpiklis yra sunkesnis už vandenį, o modifikuotas – naudojant lengvesnį už vandenį tirpiklį. Organinis tirpiklis oktanolis po centrifugavimo suformuoja lašą virš vandeninės fazės. Lašas paimamas specialiu kapiliaru, o iš jo – mikrošvirkštu ir analizuojamas dujų chromatografijos pagalba [48].

#### ***Parabenų nustatymo metodai***

Vienas iš senesnių parabenų nustatymo būdų yra infraraudonoji spektroskopija. I. Fischmeister ir bendraautoriai IR spektroskopiją naudojo užteptų ant odos kosmetinių kremų veikliosioms ir išamosioms medžiagoms nustatyti. Parabenus ir kitas veikliąsias medžiagas buvo galima nustatyti po 1 valandos nuo užtepimo ant odos, bet po 8 valandų jų nebeaptikdavo. Autoriai padarė išvadą, kad veikliąsias medžiagas šiuo metodu galima nustatyti tik jei jų koncentracijos yra pakankamai didelės [49].

Šiuo metu parabenams nustatyti dažniau naudojami kiti metodai – dujų chromatografija, efektyvioji skysčių chromatografija, kapiliarinė elektroforezė [36].

Dujų chromatografija (DCh) yra vienas iš plačiausiai naudojamų chromatografinių metodų dėl didelės skiriamosios gebos, greito atskyrimo, mažų kainų, jautrių ir antrankių detektorių [11, 36]. Dujų chromatografijoje ypač populiarūs liepsnos jonizacinis, šilumos laidumo, masių spektrometrinis ir elektronų gaudymo detektoriai.

Dujų chromatografinis metodas su liepsnos jonizaciniu detektoriumi buvo panaudotas parabenams nustatyti burnos skalavimo skystyje (asmeninės higienos produktas), Diclofenac gelyje bei lidokaino hidrochlorido tirpale (farmacijos preparatai), padažuose ir pomidorų pastoje (maisto gaminiuose). Prieš chromatografinę analizę parabenai buvo išekstrahuoti DSSME

metodu [48]. Parabenų nustatymas maisto produktuose, panaudojant DCh metodą su liepsnos jonizaciniu detektoriumi (DCh-LJD), aprašomas ir kitose publikacijose. Prieš DCh analizę parabenai buvo išekstrahuoti KFE metodu [50].

Labai dažnai parabenų nustatymui taikomas dujų chromatografijos metodas su masių spektrometriniu detektoriumi. DCh-MS metodas buvo pritaikytas parabenų nustatymui gėrimuose. Prieš analizę parabenai buvo ekstrahuoti DSSME metodu [47].

Parabenai – poliniai junginiai. Nustatinėjant parabenus dujų chromatografijos metodu, tarp polinių grupių ir nejudrios fazės pasireiškia stipri tarpmolekulinė sąveika, todėl šių junginių smailės chromatogramoje būna asimetriškos. Dėl to nukenčia perskyrimo efektyvumas, o taip pat ir nustatymo jautris. Prieš atliekant dujų chromatografinę analizę parabenai gali būti paverčiami mažiau poliniais junginiais juos derivatizuojant. Derivatizacija – tai cheminis junginių modifikavimas, kurio metu gaunami junginiai, tinkami dujų chromatografiniai analizei. Vienas iš labiausiai naudojamų parabenų derivatizacijos būdų yra silanizavimas. Derivatizuojančiu reagentu naudojamas N,O-bis(trimetilsilil)acetamidas (BSA) [36] arba N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoracetamidas (MSTFA) [8, 13]. Kitas populiarus parabenų derivatizacijos būdas yra acetilinimas [38]. Acetilinimas atliekamas į parabenų tirpalą pridėjus acto rūgšties anhidrido arba pentafluoropropioninės rūgšties anhidrido tirpalo. Parabenų hidroksigrupė (*para* padėtyje) veikia kaip nukleofilinis molekulinis centras, kuris reaguoja su elektrofiliniu acto rūgšties anhidrido anglies atomu.

Derivatizuotų parabenų nustatymas aprašytas eilėje publikacijų. DCh-MS metodas pritaikytas vandens ir kosmetikos mėginių analizei. Prieš analizę parabenai buvo ekstrahuojami METL metodu. Autorių pasiūlytas metodas buvo palygintas su kitais publikuotais parabenų nustatymo metodais ir parodė labai žemas nustatymo ribas, pakankamai gerą tikslumą, trumpą derivatizacijos laiką, bei mažas tirpiklių, mėginio ir reagentų sąnaudas [36]. Parabenų nustatymui žmogaus krūties auglio audinyje buvo panaudotas DCh-MS

metodas. Prieš analizę buvo atliekama parabenų ekstrakcija acetono:*n*-heksano mišiniu, ekstraktas valomas praleidžiant jį pro silikagelį, parabenai derivatizuojami. Autoriai parabenų nustatymui šį metodą siūlo ir kosmetikos priemonių bei maisto analizei [8]. P. Canosa ir bendraautorai parabenų nustatymui paviršinio ir nutekamojo vandens mėginiuose panaudojo dujų chromatografiją su MS/MS detektavimu. Prieš analizę parabenai buvo ekstrahuoti KFME metodu ir derivatizuoti. Pasiūlytas metodas leido nustatyti parabenus, kai jų koncentracijos siekė vos kelis ng/L [13]. Derivatizacija kartu su KFME buvo panaudota parabenų, triklozano ir susijusių chlorfenolių nustatymui vandenyje [38]

Efektvioji skysčių chromatografija (ESCh) – tai vienas iš universaliausių ir plačiausiai naudojamų analizės metodų. Priklausomai nuo stacionarios ir judrios fazės poliškumo bei atskyrimo mechanizmo yra įvairių šio metodo variantų. Metodas taikomas įvairiausiems junginiams įvairiose matricose nustatyti. Dažnai naudojami efektyviosios skysčių chromatografijos detektoriai yra UV, fluorimetrinis, elektrocheminis, chemoluminiscentinis ir masių spektrometrinis [16].

E. Sottofattori ir bendra autorių darbo tikslas buvo panaudojant atvirkščių fazių ESCh ir UV detekciją nustatyti sudėtingame mišinyje esančius skirtingos prigimties komponentus. Be parabenų mišinyje buvo labai polinių ir labai nepolinių junginių. Metodas buvo praktiškai pritaikytas kosmetinių kremų analizei [51]. M. Borremans ir bendraautorai naudojo atvirkščių fazių C<sub>18</sub> kolonėlę, judri fazė buvo vanduo-acetonitrilas-metanolis-tetrahidrofuranas (60:25:10:5). Buvo tiriamas šampūnas ir kūno pienelis. Jų sudėtyje buvo nurodyti keturi parabenai [17]. L. Labat ir bendraautorai taip pat naudojo atvirkščių fazių C<sub>18</sub> kolonėlę su UV detektoriumi parabenams kosmetikos priemonėse nustatyti. Norint pasiekti pilną analičių atskyrimą, buvo naudojamas gradientinis eliuavimas. Judria faze pasirinktas metanolio ir vandens-acto rūgšties (1 %) mišinys. Analizės trukmė 21 minutė [52].

Patikimą ir jautrų atvirkščių fazių ESCh metodą naudojant C<sub>18</sub> kolonėlę ir fluorimetrinį detektorių pasiūlė G. Burini. Prieš analizę parabenai buvo

derivatizuojami 4-brommetil-6,7-dimetoksikumarinu ir išekstrahuoti acetonitrilu. Metodas praktiškai pritaikytas parabenų nustatymui majonezo mėginyje [53].

Q. Zhang ir bendra autoriai pristatė atrankų ir jautrų chemoluminescentinį detektavimą, naudojant cerio (IV)–rodamino 6G sistemą sieros rūgšties terpėje. Metodas buvo sėkmingai pritaikytas parabenų nustatymui kosmetikos priemonėse ir maisto produktuose [10].

X. Ye ir bendra autoriai naudojo KFE ir ESCh-MS/MS analizinę sistemą tam, kad nustatytų parabenus motinos piene. Autoriai atsižvelgė ir į tai, kad dalis patekusių į pieną parabenų galėjo prieš tai organizme metabolizuotis veikiami fermentų, todėl ieškojo ne tik laisvų parabenų, bet ir konjuguotų jų formų. Tyrimui buvo pasirinkti keturių žindančių moterų pieno mėginiai. Kai kuriuose iš šių mėginių buvo aptikta metilparabeno bei propilparabeno, pvz.: viename iš pieno mėginių buvo rasta 3 ng/mL metilparabeno bei 0,33 ng/mL propilparabeno. Tai, kad net kūdikiai gauna parabenų su maistu parodo, kad toksikologinio parabenų poveikio tyrimai yra tikrai reikalingi [54].

Kapiliarinė zonų elektroforezė (KZE) – plačiausiai naudojamas kapiliarinės elektroforezės metodas. Atskyrimas vyksta ploname kapiliare, pripildytame buferio. Ištirpusių anijoninių ir katijoninių dalelių atskyrimas vyksta dėl elektroosmosinio srauto. Metodas taikomas amino rūgščių, baltymų, peptidų ir kitų joninių medžiagų analizei [55]. Paskutiniu metu auga KZE naudojimas analizuojant įvairius farmacinės pramonės ir maisto produktus. Parabenai KZE metodu buvo nustatyti sojos padažo mėginyje [56] ir kosmetikos priemonėse [57]. L. Labat ir kolegės lygino šį metodą su ESCh. Keturi parabenai buvo nustatyti kosmetikos priemonėse, buferiu naudojant natrio tetraboratą (pH 9,2). Kadangi parabenų  $pK_a$  vertės panašios, migracijos greičiai labiausiai priklausė nuo jų molekulinės masės. Mažiausią molekulinę masę turintis metilparabenas buvo sulaikomas stipriausiai, o vienodą molekulinę masę turinčių butilparabeno ir isobutilparabeno migracijos trukmė buvo vienoda. Nors šio metodo analizinės charakteristikos geros, o metodas yra greitas ir tikslus, juo negalima atskirti izomerų [52].

Kitas plačiai naudojamas elektroforezės metodas – micelinė elektrokinetinė chromatografija (MEKCh) yra elektroforezės ir skysčių chromatografijos hibridas. Jo pagrindinis pranašumas tas, kad galima atskirti ne tik turinčias krūvį, bet ir neutralias daleles. Atskyrimas atliekamas į elektrolito tirpalą pridodant paviršiaus aktyvių medžiagų, kurių koncentracija didesnė, nei micelės kritinė koncentracija. Taip suformuojama pseudostacionari micelinė fazė. Hidrofobiškesnės analitės stipriau sąveikauja su micelėmis ir migruoja lėčiau, t.y. išeina vėliau. Metodas naudojamas įkrautoms ir neįkrautoms analitėms ir daugybei hidrofiliųjų bei hidrofobinių medžiagų analizuoti, taikomas amino rūgščių, vitaminų, aromatinių angliavandenilių, farmacijos pramonės junginių analizei [55]. F. Han ir bendraautoriai sėkmingai nustatė trijų rūšių parabenus vandens ir aliejaus pagrindu pagamintose kosmetikos priemonėse. Buferiu naudojo natrio tetraboratą (pH 9,3) su natrio dodecil-sulfatu. Prieš analizę mėginiai buvo ekstrahuoti KFE metodu [32]. Kituose darbuose autoriai taip pat sėkmingai nustatė parabenus kosmetikos [58] bei farmacijos pramonės priemonėse [59, 60] naudojant MEKCh metodą.

Mikroemulsinėje elektrokinetinėje chromatografijoje (MEEKCh) analitės atskyrimas panašiu būdu kaip ir MEKCh. Su vandeniu nesimaišantis skystis (heptanas, oktanas ar etilacetatas), vandeniniame buferyje suformuoja stabilius kelių nanometrų skersmens lašelius. Siekiant sumažinti paviršiaus įtampą tarp organinių lašiukų ir vandens, bei taip sudaryti stabilią mikroemulsiją, naudojamos paviršiaus aktyvios medžiagos. Paviršiaus aktyviomis medžiagomis padengti lašeliai yra pseudostacionari fazė. Analitės gali lengvai prasiskverbti į lašelių vidų. Metodas tinka įvairių analizių nustatymui, taip pat sėkmingai pritaikytas parabenų analizei [61]. P. E. Mahuzeir ir bendraautoriai MEEKCh metodu nustatinėjo parabenus esant mažam pH (pH 2,1). Mažiausiai tirpus parabenas iš kapiliaro buvo išplautas pirmas. Buferiu buvo pasirinktas natrio tetraboratas. Metodas pritaikytas parabenams digokseno sirupe nustatyti [62]. Kituose darbuose naudojant MEEKCh parabenai nustatyti kosmetikos [61] ir farmacijos pramonės priemonėse [63].



Kapiliarinė elektrochromatografija (KECh) yra dar vienas elektroforezės ir chromatografijos metodų hibridas. Dėl šių metodų privalumų – didelio kapiliarinės elektroforezės atskyrimo efektyvumo ir ESCh atrankumo – KECh turi unikalias charakteristikas, tinkamas medžiagoms sudėtingose matricose nustatyti. KECh atliekama kapiliare, pripildytame stacionaria faze. Analitės juda dėl elektroosmotinio srauto bei atskiriamos dėl chromatografinio pasiskirstymo ir elektroforezinės migracijos. Todėl metodas gali būti taikomas tiek įkrautoms tiek neutralioms analitėms. Apie parabenų nustatymą maiste, kosmetikos ir farmacijos priemonių matricose KECh metodu yra keletas publikacijų [64-67].

Parabenai gali būti nustatomi ir kitais metodais (plonasluoksne chromatografija [68], chemoluminiscensija [69], UV spektroskopija [70]), bet šie metodai nėra labai paplitę.

Apžvelgus literatūrą galima teigti, kad chromatografiniai nustatymo metodai yra populiariausi atliekant kiekybinę ir kokybinę parabenų analizę. Jie lengvai apjungiami su įvairiais parabenų paruošimo analizei metodais (pvz.: kietafaze ekstrakcija, ekstrakcija skysčiais), pasižymi atrankumu ir jautrumu, rezultatai gerai atsikartoja.

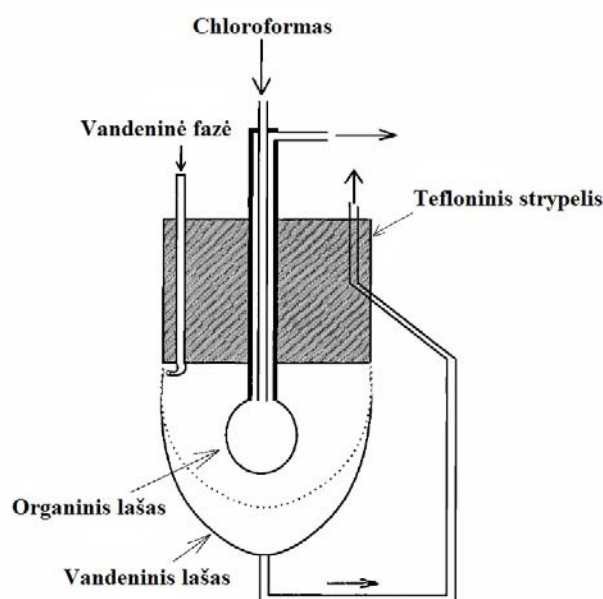
## **1.2. Skystafazės mikroekstakcijos metodų apžvalga**

Šiuolaikinėje analizėje didžioji dalis darbo ir finansinių sąnaudų tenka mėginio paruošimo procedūroms, todėl viena iš pagrindinių pastarųjų metų analizinės chemijos vystymosi krypčių – naujų, efektyvių mėginio paruošimo analizei metodų paieška, tyrimas ir taikymas siekiant pagreitinti, palengvinti ir atpiginti analizę. Populiariausias išskyrimo ir koncentravimo metodas yra ekstrakcija. Analičių išskyrimas iš matricos yra pagrįstas nevienodu jų pasiskirstymu tarp dviejų fazių. Tačiau įprastiniai ekstrakcijos metodai reikalauja daug laiko bei darbo sąnaudų, sunaudojama daug brangių, toksiškų organinių tirpiklių. Šiuos trūkumus pašalinti ar bent jau sumažinti galima miniatiūrizuojant metodą.

Skystafazė mikroekstrakcija buvo išplėtota kaip miniatiūrizuota skysčių-skysčių ekstrakcijos versija, kai analitės iš vandeninės fazės pereina į nesimaišantį su vandeniu organinį tirpiklį [71]. Išskiriami trys miniatiūrizuotos ekstrakcijos skysčiais variantai: mikroekstrakcija tirpiklio lašu, mikroekstrakcija naudojant nesimaišančias skystas plėveles (skystafazė mikroekstrakcija kapiliare) bei dispersinė skysčių-skysčių mikroekstrakcija. Šiuos metodus trumpai aptarsiu.

### 1.2.1. Mikroekstrakcija tirpiklio lašu

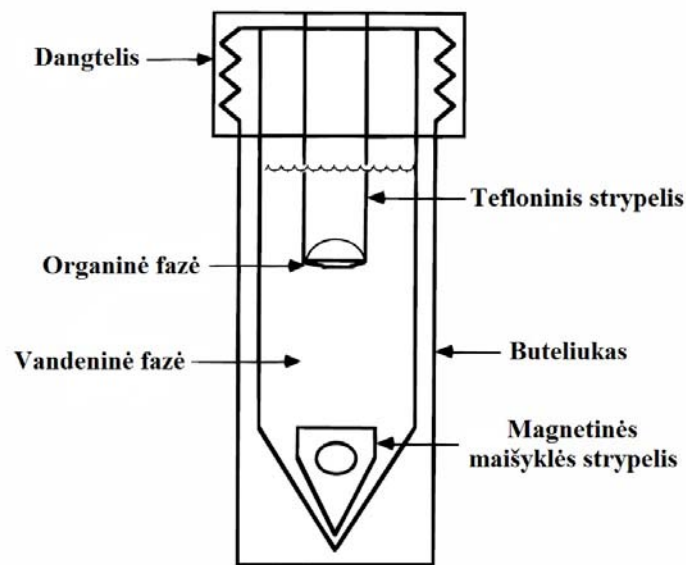
Miniatiūrizuota skysčių-skysčių ekstrakcija, panaudojant tik lašą tirpiklio, pirmą kartą buvo atlikta 1996 metais. Mikroekstrakcijos tirpiklio lašu (METL) pradininkai yra H. Liu ir P. Dasgupta [72]. Jie patalpino organinio tirpiklio (chloroformo) lašą (~1,3  $\mu\text{L}$ ) didesniame vandeninio mėginio laše (1.3 pav.). Mėginio fazė ekstrakcijos metu buvo nuolatos atnaujinama. Pasiūlyta mikroekstrakcijos sistema yra paprasta, ją galima automatizuoti, sunaudojamas minimalus organinio tirpiklio kiekis, ekstraktą galima analizuoti įvairiomis analizinėmis sistemomis.



1.3 pav. Lašo laše mikroekstrakcinės sistemos schematinė diagrama [72].

Tais pačiais metais M. A. Jeannot ir F. F. Cantwell [73] pasiūlė kitokią mikroekstrakcijos tirpiklio lašu sistemą. Ekstrahentu buvo tefloninio strypelio gale esančiame įdubime patalpintas organinio tirpiklio lašas (8  $\mu$ L). Strypelis su lašu panardintas į maišomą vandeninį mėginį (1.4 pav.). Įvykus ekstrakcijai, strypelis ištrauktas iš tirpalo, organinė fazė paimta mikrošvirkštu ir suleista į dujų chromatografo garintuvą.

Mikroekstrakcijos metodas naudojant tefloninį strypelį buvo nepatogus, tad vėliau tie patys autoriai pasiūlė mikroekstrakciją atlikti tiesiog išstūmus organinio tirpiklio lašą iš mikrošvirkšto adatos, mikrošvirkštą įtvirtinus virš analizuojamo tirpalo. Atlikus ekstrakciją, mikrolašas įtraukiamas atgal į mikrošvirkštą ir įvedamas į dujų chromatografo garintuvą [74].



**1.4 pav.** Mikroekstrakcijos tirpiklio lašu sistema [73].

Y. He ir H. K. Lee [75] išskyrė du tiesioginės mikroekstrakcijos tirpiklio lašu būdus: statinį ir dinaminį. Statine mikroekstrakcija tirpiklio lašu autoriai pavadino ekstrakciją, atliekamą į lašą, pakibusį mikrošvirkšto gale. Kitame metode, pavadintame dinamine skystafaze mikroekstrakcija, mikrošvirkštas buvo naudojamas kaip dalomasis piltuvas ir ekstrakcijos metu vandeninis tirpalas buvo įtraukiamas į mikrošvirkštą, kuriame jau buvo 1  $\mu$ L tolueno.

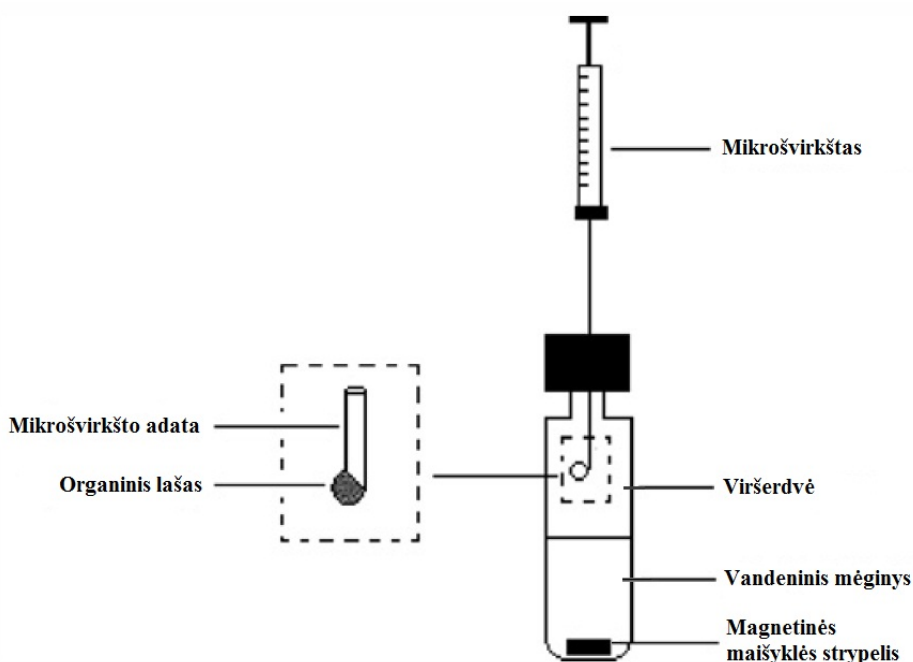
Vandeninis tirpalas buvo išstumiamas iš mikrošvirkšto ir procesas kartojamas keletą kartų. Proceso pabaigoje tolueno likutis buvo įvedamas į dujų chromatografo garintuvą. Autorių teigimu, ekstrakcija dinaminės SFME būdu vyko ploname tirpiklio sluoksnyje mikrošvirkšto cilindro ir adatos viduje. Palyginus sąlyčio paviršiaus plotus buvo nustatyta, kad analičių kiekis, tiesiogiai perneštas iš vandeninės fazės į organinę fazę, buvo labai mažas, lyginant su netiesioginiu pernešimu per organinę plėvelę. Statinės skystafazės mikroekstrakcijos atveju analitės buvo sukonzentruojamos 12 kartų, atliekant ekstrakciją iš nemišomo vandeninio tirpalo 15 min. Dinaminės skystafazės mikroekstrakcijos atveju analitės buvo sukonzentruojamos dar labiau (~27 kartus), ekstrahuojant daug trumpiau (3 min), tačiau dinaminės SFME metode rezultatų atsikartojamumas yra blogesnis (9,7 % statinei ir 12,8 % dinaminei).

M. Ma ir F. F. Cantwell [76] pasiūlė trifazę (skysčių-skysčių-skysčių mikroekstrakcija) ekstrakcinę sistemą. Organinės fazės skysta membrana buvo formuojama ant tefloninio žiedo, kuris po to pamerktas į vandeninį mėginį. Organinės fazės membranoje mikrošvirkštu suformuotas 0,5–1  $\mu\text{L}$  vandeninis lašas (akceptorinė fazė). Analčių ekstrakcija ir sukonzentravimas vyko keičiant mėginio ir vandeninio lašo pH.

W. Liu ir H. K. Lee [77] pasiūlė nepertraukiamo srauto mikroekstrakciją. Poli(eterio-eterio-ketono) (PEEK) vamzdeliu sujungtu su ekstrakcijos kamera siurbliu buvo pumpuojamas vandeninis mėginys. Kai kamera užsipildydavo mėginio tirpalu, į PEEK vamzdelį švirkštu buvo įleidžiamas organinio tirpiklio lašas, kuris kartu su tirpikliu buvo nešamas link ekstrakcijos kameros. Tirpikliui pasiekus PEEK vamzdelio galą, jame susiformuodavo organinio tirpiklio lašas ir likdavo ten pakibęs, o mėginio tirpalas nepertraukiamai tekėdavo pro lašą. Tokiu būdu vyko dinaminė ekstrakcija. Po ekstrakcijos mikrolašas būdavo paimamas mikrošvirkštu ir įleidžiamas į dujų chromatografo garintuvą.

Tiesioginė mikroekstrakcija tirpiklio lašu reikalauja nesimaišančio su vandeniu ekstrahuojančio tirpiklio ir tinka tik labiau organiniame tirpiklyje, nei vandenyje tirpioms analitėms. Esant aukštesnei temperatūrai ar didesniai maišymo greičiui ekstrahento lašas yra nestabilus, ypač jei mėginyje yra kietų dalelių [71].

Mikroekstrakcijos tirpiklio lašu iš viršerdvės būdas aprašytas 2001 metais [78-80]. Naudojant šį metodą organinio tirpiklio lašas laikomas virš mėginio (1.5 pav.). Ekstrahento lašas išlieka stabilus net naudojant didelius mėginio maišymo greičius. Be to, pašalinama įvairių nelakių medžiagų įtaka. Metodas tinkamas tik lakioms ir vidutiniškai lakioms analitėms nustatyti [81].



**1.5 pav.** Mikroekstrakcijos tirpiklio lašu iš viršerdvės schema [81].

Mikroekstrakcija tirpiklio lašu iš viršerdvės yra trijų fazių (mėginio, viršerdvės ir ekstrahento lašo) sistema. Masių pernaša viršerdvėje vyksta greitai dėl didelių difuzijos koeficientų dujinėje fazėje (maždaug  $10^4$  didesni nei skystoje fazėje). Bendras masių pernašos greitis priklauso nuo mėginio maišymo greičio ir analičių difuzijos koeficientų ekstrahuojančiame tirpiklyje [82].

G. Shen ir H. K. Lee [83] pasiūlė dinaminį mikroekstrakcijos tirpiklio lašu iš viršerdvės būdą. Ekstrakcija atliekama panašiai kaip dinaminiam tiesioginės mikroekstrakcijos tirpiklio lašu metode. Organinio tirpiklio lašas įtraukiamas į mikrošvirkštą. Švirkštas įtaisomas taip, kad adatos galas atsiduria virš mėginio. Dujinė fazė greitai įtraukiama į mikrošvirkštą ir po kelių sekundžių išstumama atgal. Ciklas pakartojamas kelis kartus. Ant vidinių mikrošvirkšto sienelių susiformuoja plonas organinio tirpiklio sluoksnis. Analitės pasiskirsto tarp šio sluoksnio ir dujinės fazės. Dėl didelio mėginio ir organinio tirpiklio sąlyčio paviršiaus ploto ekstrakcija yra efektyvi ir greita, tačiau atsikartojamumas blogesnis.

Mikroekstrakcijos tirpiklio lašu iš viršerdvės metode beveik nėra jokių apribojimų naudojamam ekstrahuojančiam tirpikliui (netinka tik labai lakūs). Norint šiuo metodu ekstrahuoti mažai lakius junginius, prieš ekstrakciją juos reikia derivatizuoti paverčiant lakiais junginiais.

***Mikroekstrakcijos tirpiklio lašu metodo efektyvumą įtakojantys parametrai [84-86]:***

***Analitės prigimtis.*** Nuo analitės prigimties (lakumas, poliškumas, rūgštinės-bazinės savybės) priklauso mikroekstrakcijos būdo pasirinkimas. Mikroekstrakcija iš viršerdvės labiau tinka poliniams ir nepoliniams, mažos molekulinės masės, lakiems ir vidutiniškai lakiems junginiams. Tiesioginė mikroekstrakcija tinka nepoliniams ar vidutiniškai poliniams, didesnės molekulinės masės, vidutiniškai lakiems junginiams. Labai polinius junginius prieš ekstrakciją reikia derivatizuoti tam, kad sumažėtų jų tirpumas vandeniniame mėginyje.

***Ekstrahuojančio tirpiklio prigimtis.*** Parenkant ekstrahuojantį tirpiklį, reikia atkreipti dėmesį į keletą apribojimų. Ekstrahuojant iš vandeninių mėginių, tirpiklis turi netirpti vandenyje. Ekstrahuojant iš viršerdvės, tirpiklio virimo temperatūra turėtų būti pakankamai aukšta, kad ekstrakcijos metu tirpiklis neišgaruotų. Tirpiklis turi būti tinkamas chromatografinėi sistemai. Tirpiklio klampa turi būti pakankamai didelė, kad jo lašas tvirtai laikytųsi ant

švirškšto adatos galiuko, tačiau ne per didelė, nes gali sulėtėti analičių difuzijos greitis į lašą, dėl ko pusiausvyrai pasiekti reikės žymiai daugiau laiko. Itin svarbus yra tirpiklio grynumas, ypač kai analizuojami labai maži analičių kiekiai.

Dažniausiai tirpiklis parenkamas pagal principą „panašus tinka panašiam“. Tinkamiausias tirpiklis pasirenkamas atsižvelgiant į ekstrakcijos efektyvumą, išgavą, atrankumą, lašo stabilumą, tirpumą, tirpiklio toksiškumą.

Ekstrakcijos metu tarp tirpiklio ir analitės svarbiausi sąveikos tipai yra Van der Valso jėgos, dipolio-dipolio sąveika ir vandenilinis ryšys. 1-oktanolis yra populiariausias METL tirpiklis, kadangi gali sąveikauti visais paminėtais sąveikų tipais. Be to jis turi pakankamai aukštą virimo temperatūrą, yra vidutiniškai klampus ir mažai tirpus vandenyje.

**Lašo tūris.** Esant dideliame organinės fazės lašui, išekstrahuojamas didesnis analitės kiekis. Kita vertus, su dideliais lašais sunkiau dirbti, jie lengviau nukrenta nuo mikrošvirškšto adatos galo. Be to, įleidus į dujų chromatografą didelį kiekį tirpiklio, gaunama plati tirpiklio smailė, perkraunama chromatografinė kolonėlė. Dėl šių priežasčių dažniausiai naudojamas 1–2  $\mu\text{L}$  tūrio lašas.

**Mėginio maišymas.** Maišymas pagreitina ekstrakciją. Mėginys dažniausiai maišomas magnetine maišykle. Atliekant tiesioginę mikroekstrakciją lašu iš tirpalo, dažniausiai naudojamas maišymo greitis yra 300–600 aps/min, o mikroekstrakcijoje iš viršerdvės 500–1000 aps/min. Maišant greičiau, lašas gali atsikabinti nuo mikrošvirškšto adatos galo.

**Tirpalo joninė jėga.** Į vandeninį tirpalą pridėjus druskos, padidėja tirpalo joninė jėga. Tai dažniausiai padidina ekstrakcijos efektyvumą (ypač vidutiniškai polinių, lakių ir mažos molekulinės masės analičių), nes pasireiškia išsūdymo efektas. Aplink disocijavusios druskos jonus susidaro hidratinė sfera. Ši susidariusi sfera sumažina vandeninės fazės, kurioje tirpsta analitės, koncentraciją, todėl analitės lengviau pereina į ekstrahentą.

Didelė joninė jėga taip pat gali sumažinti ekstrahuojančio tirpiklio tirpumą vandenyje. Vis dėlto kai kuriais atvejais druskos pridėjimas sumažina ekstrakcijos efektyvumą, pvz. ekstrahuojant chlorbenzenus [87]. Tai galima paaiškinti tuo, kad druskos pridėjimas ne tik sukelia išsūdrymo efektą, bet ir pakeičia ekstrahuojančio tirpiklio paviršiaus plėvelės savybes ir dėl to sumažėja difuzijos iš vandeninio tirpalo į organinį lašą greitis. Abu šie efektai konkuruoja tarpusavyje, bet pastarasis chlorobenzenų atveju nugalė, todėl ekstrakcijos išgava pridėjus druskos sumažėja.

**Tirpalo pH.** Jei analizė pasižymi rūgštinėmis ar bazinėmis savybėmis, ekstrakcijos efektyvumas priklauso nuo pH. Parinkus tokį pH, kuriame analizė yra neutralioje formoje, ekstrakcijos efektyvumas padidėja. Taigi, geram rezultatų atsikartojamumui užtikrinti turi būti naudojamas atitinkamas buferis.

**Ekstrakcijos trukmė.** Ekstrakcijos tirpiklio lašu metu neišekstrahuojama visa vandeniniame tirpale esanti analizė. Maksimalus ekstrakcijos efektyvumas pasiekiamas tada, kai pasiekama pusiausvyra. Tačiau kartais tai trunka per ilgai, todėl padidėja lašo tūrio sumažėjimo arba jo praradimo tikimybė. Tais atvejais nebūtina pasiekti pusiausvyros, bet kai pusiausvyra nepasiekama, labai svarbu palaikyti griežtai vienodas ekstrakcijos sąlygas.

**Temperatūra.** Temperatūros kontrolė yra ypač svarbi ekstrahuojant iš viršerdvės, kai reikia pagreitinti analičių perėjimą į dujinę fazę. Didėjant temperatūrai, didėja analizės difuzijos koeficientai, taigi sumažėja ekstrakcijos trukmė. Taip pat padidėja analičių koncentracija viršerdvėje, o tuo pačiu ir ekstrakcijos efektyvumas. Tačiau aukštesnėje temperatūroje sumažėja analičių pasiskirstymo koeficientai tarp ekstrahento ir viršerdvės, dėl ko ekstrakcijos efektyvumas gali pablogėti. Taigi būtina parinkti optimalią ekstrakcijos temperatūrą.

Mikroekstrakcija tirpiklio lašu yra paprastas, greitas, pigus, mažai tirpiklių reikalaujantis mėginio paruošimo būdas. Metodas ypač gerai suderinamas su dujų chromatografija, nes visas gautas ekstraktas suleidžiamas į dujų chromatografą. Ekstrakcija atliekama mikrošvirkštu, naudojamu



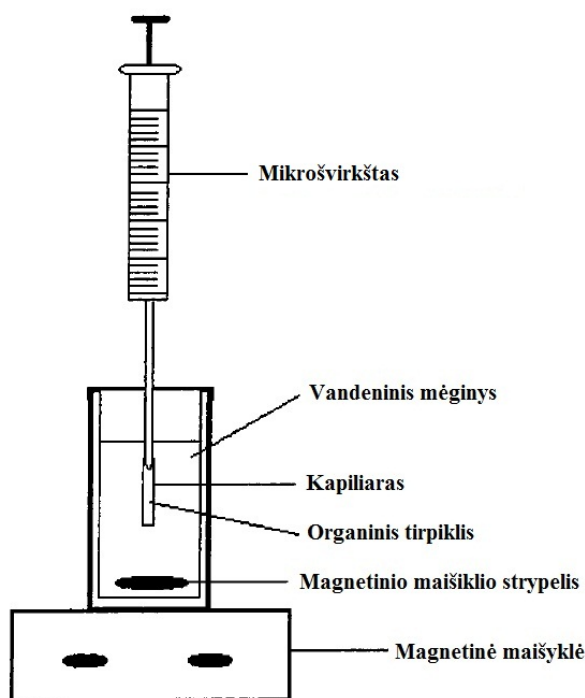
kiekvienoje dujų chromatografijos laboratorijoje. Tinkamai pasirinkus ekstrahentą, pasiekiamas didelis ekstrakcijos atrankumas, o analitės smarkiai sukonzentruojamos. Tačiau šį metodą sunku automatizuoti, darbas su mikrolašu reikalauja didelio kruopštumo [88]. Metodo pritaikymas yra labai platus. Dažniausiai taikomas nemetalams, organometalams ir metaloidams [71, 89] bei lakiems organiniams junginiams [90-92] nustatyti.

### **1.2.2. Skystafazė mikroekstrakcija kapiliare**

1999 m. S. Pedersen-Bjergaard ir K. E. Rasmussen [93] pasiūlė naują skystafazės mikroekstrakcijos metodą, kuriame naudojamos nesimaišančios skystos plėvelės. Kai skystas fazes skiria kapiliaro sienelės, ekstrakcija vadinama skystafaze mikroekstrakcija kapiliare (SFMEK). Ekstrakcija atliekama hidrofobiniame kapiliare su porėtomis sienelėmis. Prieš ekstrakciją kapiliaras yra kelioms sekundėms panardinamas į su vandeniu nesimaišantį organinį tirpiklį, kuris greitai užpildo kapiliaro poras. Kapiliaro vidus pripildomas keliais mikrolitrais akceptorinio tirpalo ir kapiliaras įmerkiamas į mėginį. Analitės ekstrahuojamos iš vandeninio mėginio tirpalo per porose esančią skystą organinio tirpiklio plėvelę ir sukonzentruojamos akceptoriniame (vandeniniame arba organiniame) tirpale. Atlikus ekstrakciją, akceptorinis tirpalas yra pašalinamas iš kapiliaro slėgio arba mikrošvirkšto pagalba ir toliau analizuojamas dujų chromatografijos, efektyvosios skysčių chromatografijos, kapiliarinės elektroforezės, masių spektrometrijos ar kitu analizės metodu [94-96]. Skystafazės mikroekstrakcijos kapiliare metodas iliustruojamas 1.6 pav.

Populiariausi yra polipropileno kapiliarai, kurie yra chemiškai atsparūs, nebrangiai kainuoja. Kapiliaro ilgis paprastai yra nuo 1,5 iki 10 cm, vidinis skersmuo – 600 μm, sienelių storis apie 200 μm. Sienelės užtikrina gerą mechaninį akceptorinės fazės stabilumą. Į kapiliarą telpa keli mikrolitrai akceptorinio tirpalo. Poros, kurių vidutinis skersmuo 0,2 μm, praleidžia tik nedideles molekules, o didelės molekulės lieka donoriniame tirpale ir mėginys

tokiu būdu yra išvalomas. Kapiliarai naudojami tik vieną kartą, todėl nereikia jų regeneruoti [95-97].



**1.6 pav.** Skystafazės mikroekstrakcijos kapiliare metodo schema [98].

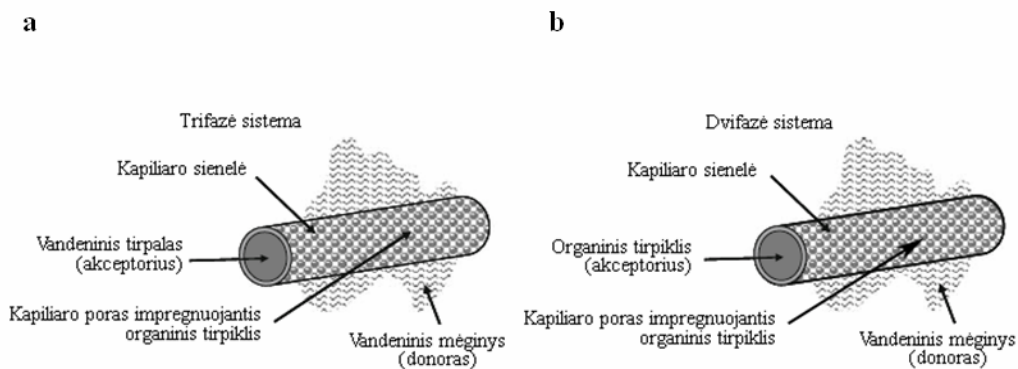
Skystafazės mikroekstrakcijos kapiliare metode naudojamos kelios kapiliarų konfigūracijos, kurios gali būti taikomos tiek dvifazėms, tiek trifazėms sistemoms (1.7 pav.). Konfigūracijoje (a) naudojamos dvi medicininio švirkšto adatos, sujungtos su kapiliaro galais. Vienas iš švirkštų naudojamas įvesti akceptorinį tirpalą, o kitas – akceptorinio tirpalo surinkimui. Konfigūracijoje (b) tikrai vienas kapiliaro galas yra atviras ir naudojamas akceptorinės fazės įvedimui/surinkimui, o kitas yra užlydytas. Šiuo atveju kapiliaras įtvirtinamas ant mikrošvirkšto adatos. Mikrošvirkštas yra reikalingas kapiliaro įtvirtinimui, akceptorinės fazės įvedimui/surinkimui ir jau paruošto mėginio įvedimui į chromatografą [93, 95].



**1.7 pav.** Skystafazės mikroekstrakcijos kapiliare sistemų konfigūracijos [88].

SFMEK metode mėginio tūris gali būti nuo 50  $\mu\text{L}$  iki 1 L, tuo tarpu akceptorinės fazės tūris dažniausiai būna 2–30  $\mu\text{L}$ . Dėl didelio mėginio ir akceptorinės fazės tūrių santykio pasiekiamas geras analičių sukonzentravimo laipsnis [96].

Išskiriami du skystafazės mikroekstrakcijos kapiliare būdai – dviejų fazių ir trijų fazių (1.8 pav.).



**1.8 pav.** Trijų fazių skystafazės mikroekstrakcijos kapiliare (a) ir dviejų fazių mikroekstrakcijos kapiliare (b) būdų schemos [99].

**Dviejų fazių** SFMEK variante analizė yra ekstrahuojama iš vandeninio mėginio (donorinės fazės) per vandenyje netirpų tirpiklį, imobilizuotą tuščiavidurio kapiliaro sienelių porose, į tokį patį organinį tirpiklį (akceptorinę fazę), esantį kapiliaro viduje [96].

Tam, kad ekstrakcijos išgava būtų kuo didesnė, būtinas didelis analitės pasiskirstymo tarp organinio tirpiklio ir vandens koeficientas. Skystafazės mikroekstrakcijos kapiliare dviejų fazių sistemoje vykstantį procesą galima pavaizduoti tokia lygtimi:

$$A_{\text{mėginys}} \leftrightarrow A_{\text{akceptorius}} \quad (1.1)$$

kur,  $A$  yra nustatoma analizė.

Analitės  $A$  pasiskirstymo koeficientas tarp dviejų fazių išreiškiamas:

$$K_{\text{akceptorius/mėginys}} = \frac{C_{\text{pus. akceptorius}}}{C_{\text{pus. mėginys}}} \quad (1.2)$$

kur,

$C_{\text{pus. akceptorius}}$  – analitės  $A$  pusiausvyrinė koncentracija akceptoriniame tirpale (organinėje fazėje);

$C_{\text{pus. mėginys}}$  – analitės  $A$  pusiausvyrinė koncentracija mėginyje (vandeniniame tirpale).

Remiantys (2X) lygtimi ir dviejų fazių SFMEK sistemos masių balansu, analitės  $A$  ekstrakcijos išgava ( $R$ ) esant pusiausvyrai apskaičiuojama taip:

$$R = \frac{K_{\text{akceptorius/mėginys}} V_{\text{org}}}{K_{\text{akceptorius/mėginys}} V_{\text{org}} + V_{\text{mėginys}}} \times 100\% \quad (1.3)$$

kur,

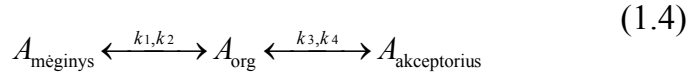
$V_{\text{org}}$  – bendras organinės fazės tūris sistemoje (organinio tirpiklio, esančio kapiliaro sienelių porose ir kapiliaro viduje, tūrių suma);

$V_{\text{mėginys}}$  – mėginio tūris.

Iš (1.3) lygties matyti, kad dviejų fazių SFMEK sistemos ekstrakcijos išgava priklauso nuo pasiskirstymo koeficiento, organinio tirpiklio ir mėginio tūrių. Didelė išgava gaunama, kai analičių pasiskirstymo koeficientai yra dideli. Tai galima pasiekti parinkus tinkamą organinį tirpiklį, reikiamą mėginio pH (analitėms su rūgštinėmis/bazinėmis savybėmis) ir kai kuriais atvejais pridedant į mėginį druskos (joninei jėgai padidinti).

**Trijų fazių** SFMEK variante analizė yra ekstrahuojama iš vandeninio mėginio (donorinės fazės) per organinį tirpiklį (organinę fazę), imobilizuotą

kapiliaro sienelių porose, į kitą vandeninį tirpalą (akceptorinę fazę), esantį kapiliaro viduje. Šiuo atveju organinė fazė reikalinga, kad nesusimaišytų dvi vandeninės (donorinė ir akceptorinė) fazės [96]. Trijų fazių sistemoje vykstantį procesą galima pavaizduoti tokia lygtimi:



kur,  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$  ir  $k_4$  yra pirmo laipsnio reakcijos ekstrakcijos greičio konstantos.

Pasiskirstymo koeficientai tarp organinės fazės ir mėginio bei tarp akceptorinės fazės ir organinės fazės išreiškiami tokiomis lygtimis:

$$K_{\text{org/mėginys}} = \frac{C_{\text{pus.org}}}{C_{\text{pus.mėginys}}} \quad (1.5)$$

$$K_{\text{akceptorius/org}} = \frac{C_{\text{pus.akceptorius}}}{C_{\text{pus.org}}} \quad (1.6)$$

Remiantis (1.5) ir (1.6) lygtimis ir trijų fazių SFMEK sistemos bendru masių balansu, ekstrakcijos išgavą galima išreikšti taip:

$$R = \frac{K_{\text{org/mėginys}} K_{\text{akceptorius/org}} V_{\text{akceptorius}}}{K_{\text{org/mėginys}} K_{\text{akceptorius/org}} V_{\text{akceptorius}} + K_{\text{org/mėginys}} V_{\text{org}} + V_{\text{mėginys}}} \times 100\% \quad (1.7)$$

kur,

$V_{\text{akceptorius}}$  – vandeninio akceptorinio tirpalo tūris;

$V_{\text{org}}$  – organinio tirpiklio, imobilizuoto kapiliaro porose, tūris.

Iš (1.7) lygties matyti, kad trijų fazių SFMEK sistemos ekstrakcijos išgava priklauso nuo dviejų nepriklausomų pasiskirstymo koeficientų bei mėginio, organinės fazės ir akceptorinės fazės tūrių. Dideli pasiskirstymo koeficientai gaunami tinkamai parinkus organinį tirpiklį ir vandeninių tirpalų pH vertes.

***Skystafazės mikroekstrakcijos kapiliare metodo efektyvumą įtakojantys parametrai [97]:***

***Organinis tirpiklis.*** Tiek dvifazėse, tiek trifazėse sistemose naudojami tirpikliai turi būti lengvai imobilizuojami į polipropileno kapiliaro sienelės. Atsižvelgiama ir į tirpiklio tirpumą vandenyje ir lakumą. Pageidautina, kad tiek

tirpiklio tirpumas vandenyje, tiek tirpiklio lakumas būtų kuo mažesni. Dvifazėse sistemose organinis tirpiklis turi labai gerai tirpinti analites, tikti dujų chromatografijai (jei ekstraktas analizuojamas dujų chromatografijos metodu). Trifazėse sistemose sienelės impregnuojantis tirpiklis turi būti toks, kad jo  $K_{\text{org/mėginys}}$  ir  $K_{\text{akceptorius/org}}$  būtų dideli.

Dažniausiai naudojami organiniai tirpikliai yra 1-oktanolis, diheksilo eteris, heksanas, oktanas, nonanas, dichlormetanas, butilo acetatas, 2-oktanonas ir diamilo eteris [95].

**Maišymas.** Maišymas greitina ekstrakciją. Atliekant mikroekstrakciją kapiliare, galimi dideli maišymo greičiai, nes organinis tirpiklis yra imobilizuotas. Maišymui galima naudoti magnetinius maišiklius, vibraciją. Kai naudojamas magnetinis maišiklis, svarbu, kad nesusidarytų oro burbulai, kurie kimba prie kapiliaro sienelių. Dėl prikibusių oro burbulų lengviau nugaruoja sienelėse impregnuotas organinis tirpiklis.

**Tirpalo joninė jėga.** Priklausomai nuo analitės prigimties druskos pridėjimas į mėginį gali tiek padidinti, tiek sumažinti ekstrakcijos efektyvumą, arba visai neturėti įtakos.

**Donorinio ir akceptorinio tirpalo tūriai.** Nustatymo jautris didėja, mažinant akceptoriaus/donoro tūrių santykį. Tačiau akceptorinio tirpalo tūris turi būti tinkamas tolimesnei analizei naudojamam metodui.

**Tirpalo pH.** Donoro ir akceptoriaus pH ypač svarbus trifazėse sistemose. Pavyzdžiui, analizuojant rūgštines analites, donoro tirpalas turėtų būti rūgštinis, tada analitės būtų dejonizuotos ir lengvai pereitų į organinę fazę. Akceptoriaus tirpalas turėtų būti bazinis, tada analitės iš kapiliaro sienelėse esančios organinės fazės lengvai pereitų į akceptorijų. Bazinėms analitėms – atvirkščiai.

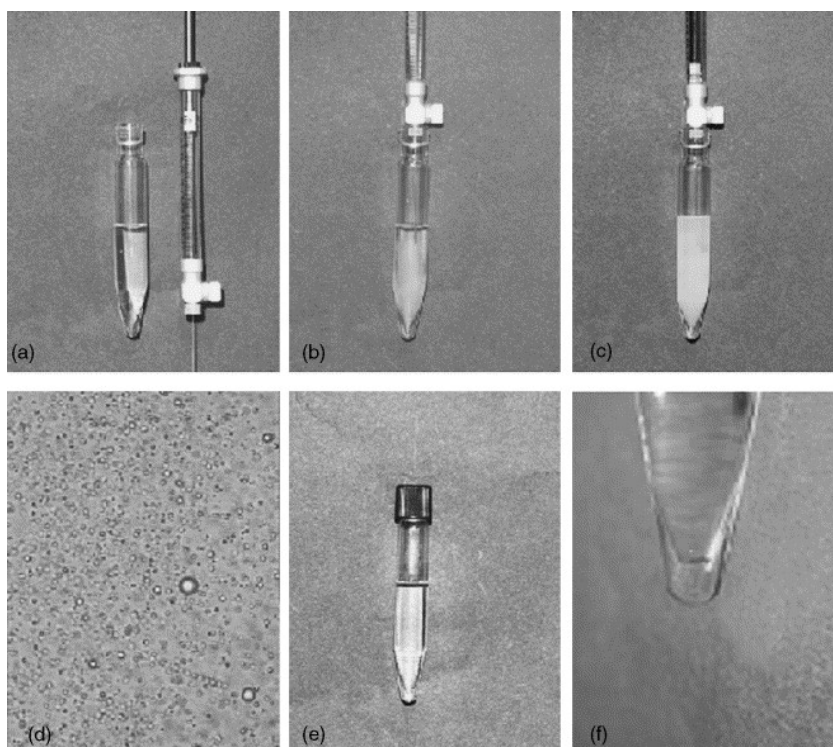
**Ekstrakcijos trukmė.** Nors ilgėjant ekstrakcijos trukmei paprastai didėja ir ekstrakcijos efektyvumas, tai nevisada pasiteisina. Vis dėlto, jei analizės trukmė trumpesnė, nei reikia nusistovėti analitės pusiausvyrai tarp fazių,

kiekvienam mėginiui ji turi būti griežtai vienoda, tik taip pasiekiamas geras analizės tikslumas.

Skystafazė mikroekstrakcija kapiliare – paprastas, greitas, jautrus, pigus ir užtikrinantis geras išgavas ekstrakcijos metodas. Sunaudojami itin maži organinių tirpiklių kiekiai. Tai labai efektyvus būdas mėginių išvalymui. Juo galima atrankiai ekstrahuoti analites iš sudėtingų matricų, tinkamai parinkus kapiliaro sienelės impregnuojantį tirpiklį. Dviejų fazių SFMEK tiesiogiai suderinama su dujų chromatografijos metodu, o trijų fazių SFMEK suderinama su efektyviosios skysčių chromatografijos ir kapiliarinės elektroforezės metodais [96]. Šiuo metodu galima ekstrahuoti mažiau polines analizes, atskiriant jas nuo polinių junginių [94]. Metodas sėkmingai pritaikytas analizuojant biomedicininis, aplinkos ir maisto mėginius [97, 100-103].

### **1.2.3. Dispersinė skysčių-skysčių mikroekstrakcija**

2006 m. Y. Assadi ir bendraautoriai pirmą kartą pasiūlė dispersinės skysčių-skysčių mikroekstrakcijos (DSSME) metodą [104]. Šis ekstrakcijos metodas remiasi trikomponente tirpiklių sistema. Naudojamas didesnio už vandenį tankio ekstrahentas ir tiek su vandeniu, tiek su ekstrahentu besimaišantis disperguojantis tirpiklis. Jų mišinys švirkštu greitai įšvirkščiamas į vandeninį tirpalą su analitėmis. Tokiu būdu ekstrahuojantis tirpiklis smulkių lašelių pavidalu pasiskirsto visame vandeninio tirpalo tūryje, taigi ekstrahuojančio tirpiklio ir analizuojamo tirpalo sąlyčio plotas yra labai didelis, todėl ekstrakcija vyksta labai greitai. Po ekstrakcijos mišinys centrifuguojamas ir organinis tirpiklis su analitėmis nusėda ekstrakcinio indo dugne (1.9 pav.). Ekstraktas paimamas mikrošvirkštu ir įleidžiamas į dujų chromatografo garintuvą.



**1.9 pav.** DSSME atlikimo etapų nuotraukos [104]: (a) prieš įleidžiant į vandeninį mėginį disperguojančio tirpiklio ir ekstrahuojančio tirpiklio mišinį, (b) įleidimo pradžia, (c) įleidimo pabaiga, (d) 1000 kartų padidintas emulsijos vaizdas, (e) po centrifugavimo, (f) nusėdusi fazė.

Ekstrakcijos efektyvumas apibūdinamas sukonzentravimo laipsniu bei išgava. Sukonzentravimo laipsnis ( $EF$ ) aprašomas tokia lygtimi [104]:

$$EF = \frac{C_{sed}}{C_0} \quad (1.8)$$

kur,

$C_{sed}$  – analitės koncentracija nusėdusioje fazėje;

$C_0$  – pradinė analitės koncentracija.

Išgava (%) aprašoma tokia lygtimi:

$$ER = \frac{n_{sed}}{n_0} \times 100 = \frac{C_{sed} \times V_{sed}}{C_0 \times V_{mėginys}} \times 100 = \frac{V_{sed}}{V_{mėginys}} EF \times 100 \quad (1.9)$$

kur,

$n_0$  – visas analitės kiekis;

$n_{sed}$  – išekstrahuotas analitės kiekis;

$V_{sed}$  ir  $V_{mėginys}$  yra atitinkamai nusėdusios fazės ir mėginio tūriai.



***Dispersinės skysčių-skysčių mikroekstrakcijos metodo efektyvumą įtakojantys parametrai [105]:***

***Ekstrahuojančio tirpiklio prigimtis.*** Ekstrahuojantis tirpiklis turi tenkinti šiuos reikalavimus:

- tirpiklio tankis turi būti didesnis už vandens tankį;
- turi gerai ekstrahuoti analites;
- turi mažai tirpti vandenyje;
- turi gerai tirpti disperguojančiame tirpiklyje ir suformuoti stabilią dviejų fazių sistemą, kai mišinys išvirkščiamas į vandeninį tirpalą;

Dauguma halogenintų angliavandenilių, tokių kaip chlorbenzenas, chloroformas, anglies tetrachloridas ar tetrachloretilenas, atitinka tokius reikalavimus ir paprastai naudojami kaip ekstrahentai.

***Disperguojančio tirpiklio prigimtis.*** Disperguojantis tirpiklis turi gerai maišytis su ekstrahuojančiu tirpikliu ir vandenine faze. Kadangi tik nedaugelis medžiagų maišosi tiek su organine faze, tiek su vandeniu, disperguojančio tirpiklio pasirinkimas nėra platus. Dažniausiai naudojami disperguojantys tirpikliai yra metanolis, etanolis, acetonitrilas, acetonas ir tetrahidrofuranas.

***Ekstrahuojančio ir disperguojančio tirpiklių tūriai.*** Nuo ekstrahuojančio ir disperguojančio tirpiklių tūrių priklauso susidariusios emulsijos stabilumas ir lašelių dydis. Kuo smulkesni lašeliai, tuo didesnis fazių sąlyčio paviršiaus plotas, tuo greitesni masių mainai ir tuo mažesnė mikroekstrakcijos trukmė. Didėjant ekstrahento tūriui, didėja ir sedimentacinės fazės (po centrifugavimo nusėdusio ekstrakto) tūris, dėl to mažėja analičių koncentracija joje. Nors išgava lieka beveik tokia pati, tačiau sukonzentravimo laipsnis mažėja, tad mažėja ir nustatymo jautrumas. Taigi optimalus ekstrahuojančio tirpiklio tūris turi būti toks, kad ir sukonzentravimo laipsnis būtų didelis, ir sedimentacinės fazės tūrio po centrifugavimo užtektų tolimesniam nustatymui.

***Ekstrakcijos trukmė*** – tai trukmė nuo disperguojančio tirpiklio ir ekstrahuojančio tirpiklio mišinio įleidimo į vandeninį analizuojamąjį tirpalą iki centrifugavimo. Ekstrakcijos trukmė neturi reikšmingos įtakos ekstrakcijos efektyvumui. Taip yra todėl, kad paviršiaus plotas tarp organinės ir vandeninės

fazės yra labai didelis, tad ekstrakcija vyksta labai greitai. Trumpa ekstrakcijos trukmė yra pagrindinis DSSME privalumas.

***Tirpalo joninė jėga.*** Priklausomai nuo analitės prigimties druskos pridėjimas į mėginį gali tiek padidinti, tiek sumažinti ekstrakcijos efektyvumą, arba visai neturėti įtakos.

Kaip buvo minėta, tradiciniame DSSME variante naudojami sunkesni už vandenį ekstrahentai. Be aprašyto tradicinio DSSME varianto buvo pasiūlyta keletas būdų, leidžiančių dispersinėje skysčių-skysčių mikroekstrakcijoje panaudoti lengvesnius už vandenį tirpiklius. Taikant vieną iš būdų, ekstrakcija atlikama ne centrifuginiame mėgintuvėlyje, bet siaurakaklėje matavimo kolboje [106]. Šiuo atveju susidariusi emulsija suardoma ne centrifuguojant, bet po ekstrakcijos išvirkščiant porciją tirpiklio, suardančio emulsiją. Viršutinį sluoksnį sudarantis ekstraktas paimamas kapiliaru. Antrasis DSSME variantas naudojant lengvesnius už vandenį tirpiklius remiasi tirpiklių užšaldymu [107, 108]. Šiuo atveju naudojami tirpikliai, kurių lydymosi temperatūra 10–30 °C. Po ekstrakcijos tirpalas centrifuguojamas ir porai minučių dedamas į ledo vonelę. Viršutinį sluoksnį sudarantis ekstraktas užšąla. Išimtas iš ekstrakcinio indo užšalęs ekstrakto lašas kambario temperatūroje išsilydo ir yra analizuojamas.

Dispersinė skysčių-skysčių mikroekstrakcija – tai paprastas, greitas, mažai kainuojantis, geras išgavas duodantis mikroekstrakcijos metodas [105].

Nors šis būdas yra pakankamai naujas, jis jau sėkmingai derinamas su tokiais analizės metodais kaip dujų chromatografija, efektyvioji skysčių chromatografija ar atominės absorbcijos spektrometrija. DSSME sėkmingai taikoma organinių junginių ir sunkiųjų metalų nustatymui [104, 109-111]. Vis dėlto metodas nelabai tinkamas sudėtingų matricių analizei.

## 2. EKSPERIMENTO METODIKA

### 2.1. Reagentai ir tirpalai

Pradiniam standartiniam tirpalams ruošti naudoti reagentai: metil-4-hidroksibenzoatas (metilparabenas) (99,0 %), etil-4-hidroksibenzoatas (etilparabenas) (99,0 %), propil-4-hidroksibenzoatas (propilparabenas) (99,0 %), butil-4-hidroksibenzoatas (butilparabenas) (99,0 %) ir acetonas ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ) ( $\geq 99,9$  %) pirkti iš Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, JAV).

Ekstrakcijai naudoti reagentai: anglies tetrachloridas ( $\text{CCl}_4$ ) ( $\geq 99,5$  %), amilacetatas ( $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{O}_2$ ) (98,0 %), brombenzenas ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Br}$ ) ( $\geq 99,0$  %), chlorbenzenas ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}$ ) ( $\geq 99,0$  %), chloroformas ( $\text{CHCl}_3$ ) ( $\geq 99,0$  %), 1,2-dichlorbenzenas ( $\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_2$ ) ( $\geq 99,0$  %), dibutilftalatas ( $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_4$ ), dioktilftalatas ( $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_4$ ) ( $\geq 99,0$  %), etilbenzoatas ( $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_2$ ) ( $\geq 99,0$  %), *o*-ksilenas ( $\text{C}_6\text{H}_4(\text{CH}_3)_2$ ) (99,0 %), *n*-oktanas ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$ ) (98,0 %), 1-oktanolis ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{OH}$ ) (99,0 %) ir toluenas ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ ) (99,0 %) pirkti iš Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, JAV).

Parabenu derivatizacijai naudotas acto rūgšties anhidridas ( $\geq 99,0$  %) pirktas iš Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, JAV), dikalio-vandenilio fosfatas ( $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ ) ( $\geq 99$  %) pirktas iš Carl Roth GmbH+ Co. (Vokietija).

Vidiniais standartais naudoti reagentai: *n*-heksadekanas ( $\text{C}_{16}\text{H}_{34}$ ) (99,0 %), *n*-nonadekanas ( $\text{C}_{19}\text{H}_{40}$ ) (99,0 %) ir *n*-tetradekanas ( $\text{C}_{14}\text{H}_{30}$ ) (99,0 %) pirkti iš Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, JAV).

Tirpalų ir mėginių joninei jėgai padidinti buvo pridedamas reikiamas natrio chlorido ( $\text{NaCl}$ ) (grynas analizei) kiekis (Reachim, Ukraina).

Pradiniai standartiniai 10 mg/mL parabenu tirpalai gaminami tirpinant atskirai kiekvieną *p*-hidroksibenzoinės rūgšties esterį acetone. Jungtinis pradinis standartinis parabenu tirpalas ruošiamas paimant kiekvieno pradinio standartinio parabeno tirpalo ir skiedžiant acetonu. Paruošti pradiniai standartiniai tirpalai laikomi šaldytuve  $+4$  °C temperatūroje.

Darbinis standartinis parabenų tirpalas buvo ruošiamas prieš pat darbą, skiedžiant jungtinį pradinį standartinį parabenų tirpalą distiliuotu vandeniu iki reikiamos koncentracijos.

Parabenų derivatizacijai atlikti į vandeninį parabenų tirpalą buvo dedama 0,02 g/mL  $K_2HPO_4 \times 3H_2O$  ir 10  $\mu$ L acto rūgšties anhidrido. Tirpalo pH reguliavimui buvo naudojami 0,1 mol/L KOH tirpalas ir 0,1 mol/L HCl tirpalas.

## 2.2. Aparatūra

Dujų chromatografinė analizė buvo atliekama dujų chromatografu Varian 3400 (Palo Alto, CA, JAV) su liepsnos jonizaciniu detektoriumi. Chromatografas sujungtas su integratoriumi SP4290 (Spectra-Physics San Jose, CA, JAV).

Chromatografiniam medžiagų perskyrimui naudota kvarcinė kapiliarinė kolonėlė Equity<sup>TM</sup>-5 (30 m ilgio, 0,53 mm vidinio skersmens, nejudri fazė fenilmetilsiloksanas, turintis 5 % fenilo grupių, nejudrios fazės sluoksnio storis 1,5  $\mu$ m) pirktą iš Supelco (Bellefonte, PA, JAV).

Mėginio įleidimas buvo atliekamas naudojant 10  $\mu$ L talpos mikrošvirkštą pirktą iš Hamilton (Reno, NV, JAV).

Medžiagų svėrimui buvo naudojamos analizinės svarstyklės Scaltec SAS 51 (Vokietija).

Tirpalai buvo maišomi magnetine maišykle MLW RH3 pirktą iš Prüfgeräte-Werk (Vokietija).

pH vertė, tiriant jos įtaką parabenų derivatizacijai, buvo matuojama pH matuokliu „EV-74“ (Rusija).

Atliekant mikroekstrakciją tirpiklio lašu buvo naudojamas 10  $\mu$ L mikrošvirkštas (Hamilton) ir 12 mL tūrio ekstrakcijos indeliai su teflonine tarpine, analizuojamųjų tirpalų temperatūra buvo palaikoma termostatu MLW UH (Vokietija).

Skystafazė mikroekstrakcija kapiliare buvo atliekama 12 mL tūrio stikliniuose indeliuose, užsandarintuose teflonine tarpine. Mikroekstrakcijai kapiliare atlikti buvo naudojami polipropileno kapiliarai Accurel® PP Q3/2 (Membrana GmbH, Vupertalis, Vokietija). Kapiliaro vidinis skersmuo 600 µm, sienelių storis 200 µm, porų skersmuo 0,2 µm.

Dispersinės skysčių-skysčių mikroekstrakcijos procedūrai buvo naudojama „LaboChema“ (Lietuva) centrifuga, 12 mL tūrio kūginiai mėgintuvėliai.

### **2.3. Dujų chromatografinės sąlygos**

Atliekant dujų chromatografinę analizę buvo naudojami tokie dujų srautai: nešančių dujų (azoto) greitis 10 mL/min, oro greitis 300 mL/min, vandenilio greitis 30 mL/min, pagalbinių dujų (azoto) greitis 20 mL/min.

Naudojami temperatūriniai režimai:

#### ***Parabenuų mikroekstrakcijos tirpiklio lašu metodas***

##### ***Nederivatizuotų parabenuų tiesioginė mikroekstrakcija tirpiklio lašu***

Chromatografo garintuvo ir detektoriaus temperatūra buvo 280 °C. Kolonėlės temperatūra buvo programuojama taip: iš pradžių buvo nustatyta 100 °C temperatūra (laikoma 2 min), toliau temperatūra keliama 2 °C/min greičiu iki 120 °C, tada 5 °C/min greičiu iki 230 °C temperatūros.

##### ***Derivatizuotų parabenuų tiesioginė mikroekstrakcija tirpiklio lašu***

Chromatografo garintuvo ir detektoriaus temperatūra buvo 290 °C. Kolonėlės temperatūra buvo programuojama taip: iš pradžių buvo nustatyta 120 °C temperatūra (laikoma 2 min), toliau temperatūra keliama 2 °C/min greičiu iki 176 °C, tada 50 °C/min greičiu iki 290 °C temperatūros (laikoma 2 min).

##### ***Derivatizuotų parabenuų mikroekstrakcija tirpiklio lašu iš viršedrvės***

Chromatografo garintuvo ir detektoriaus temperatūra buvo 290 °C. Kolonėlės temperatūra buvo programuojama taip: iš pradžių buvo nustatyta 120 °C temperatūra (laikoma 2 min), toliau temperatūra keliama 2 °C/min

greičiu, iki 176 °C, tada 50 °C/min greičiu iki 290 °C temperatūros (laikoma 15 min).

***Parabenu skystafazės mikroekstrakcijos kapiliare metodas***

***Nederivatizuotų parabenu skystafazė mikroekstrakcija kapiliare***

Chromatografo garintuvo temperatūra buvo 280 °C, detektoriaus temperatūra – 260 °C. Kolonėlės temperatūra buvo programuojama taip: iš pradžių buvo nustatyta 90 °C temperatūra (laikoma 5 min), toliau temperatūra keliama 2 °C/min greičiu iki 120 °C, tada 6 °C/min greičiu iki 200 °C temperatūros (laikoma 5 min).

***Derivatizuotų parabenu skystafazė mikroekstrakcija kapiliare***

Chromatografo garintuvo ir detektoriaus temperatūra buvo 280 °C. Kolonėlės temperatūra buvo programuojama taip: iš pradžių buvo nustatyta 120 °C temperatūra (laikoma 2 min), toliau temperatūra keliama 2 °C/min greičiu iki 176 °C, tada 50 °C/min greičiu iki 280 °C temperatūros (laikoma 1 min).

***Parabenu dispersinės skysčių-skysčių mikroekstrakcijos metodas***

***Nederivatizuotų parabenu dispersinė skysčių-skysčių mikroekstrakcija***

Chromatografo garintuvo temperatūra buvo 280 °C, detektoriaus temperatūra – 260 °C. Kolonėlės temperatūra buvo programuojama taip: iš pradžių buvo nustatyta 100 °C temperatūra (laikoma 2 min), toliau temperatūra keliama 2 °C/min greičiu iki 120 °C, tada 5 °C/min greičiu iki 230 °C temperatūros (laikoma 1 min).

***Derivatizuotų parabenu dispersinė skysčių-skysčių mikroekstrakcija***

Chromatografo garintuvo ir detektoriaus temperatūra buvo 280 °C. Kolonėlės temperatūra buvo programuojama taip: iš pradžių buvo nustatyta 120 °C temperatūra (laikoma 2 min), toliau temperatūra keliama 2 °C/min greičiu iki 176 °C, tada 50 °C/min greičiu iki 280 °C temperatūros (laikoma 1 min).

## **2.4 Mikroekstrakcijos procedūros**

### **2.4.1. Mikroekstrakcijos tirpiklio lašu procedūra**

Mikroekstrakcija tirpiklio lašu buvo atliekama dviem būdais: tiesiogiai iš tiriamojo tirpalo ir iš viršerdvės.

Į 12 mL ekstrakcijos indą įpilama 10 mL vandeninio parabenų tirpalo. Į 10  $\mu$ L mikrošvirkštą įtraukiama apie 1  $\mu$ L ekstrahuojančio tirpiklio. Mikrošvirkšto adata praduriama ekstrakcinio indo dangtelyje esanti tarpinė. Išstūmus tirpiklį ant adatos galo yra suformuojamas jo lašas. Lašas lieka pakibęs ant mikrošvirkšto adatos galiuko, atliekama ekstrakcija. Ekstrahuojant tiesiogiai iš tirpalo, mikrošvirkšto adatos galiukas panardinamas (apie 1 cm) į vandeninį parabenų tirpalą, ekstrahuojant iš viršerdvės, mikrošvirkšto adatos galiukas laikomas virš tirpalo (apie 0,5 cm). Tirpalas maišomas magnetine maišykle 200 aps/min greičiu (ekstrahuojant iš tirpalo) arba 800 aps/min greičiu (ekstrahuojant iš viršerdvės). Esant reikalui, mėginio temperatūra palaikoma termostatu.

Po ekstrakcijos tirpiklio lašas įtraukiamas atgal į mikrošvirkštą, suleidžiamas į dujų chromatografo garintuvą ir analizuojamas.

### **2.4.2. Skystafazės mikroekstrakcijos kapiliare procedūra**

Parabenų skystafazei mikroekstrakcijai kapiliare atlikti imami 8 mL (derivatizuotų parabenų atveju 10 mL) vandeninio parabenų tirpalo ir suleidžiama į 12 mL ekstrakcinį indelį, įdedamas magnetinio maišiklio strypelis.

Darbe naudojami 1,8 cm ilgio polipropileno kapiliarai, kurių vienas galas užlydomas lituokliu. Į tokį užlydytą kapiliarą telpa apie 5  $\mu$ L ekstrahuojančio tirpiklio. Prieš naudojimą kapiliarai 10 min pamerkami į acetoną. Po to išimami ir išdžiovinami kambario temperatūroje. Kiekvienas kapiliaras buvo naudojamas vieną kartą.

Neužlituotas kapiliaro galas sujungiamas su medicininio švirkšto 0,7 cm skersmens adata, kuri yra perdurta per tefloninę dangtelio tarpinę. Tada kapiliaras merkiamas į paruoštą ekstrahuojantį tirpiklį ir paliekamas kelioms minutėms, kad užsipildytų.

Kai per sieneles ekstrahentas pilnai užpildo kapiliarą, kapiliaras atsargiai išimamas, nuplaunamas distiliuotu vandeniu ir merkiamas į analizuojamąjį tirpalą. Indelis su tirpalu užsukamas, dedamas ant magnetinės maišyklės ir ekstrahuojama.

Pasibaigus ekstrakcijai, 10  $\mu$ L mikrošvirkštu iš kapiliaro paimamas 1  $\mu$ L ekstrakto ir suleidžiamas į dujų chromatografo garintuvą analizei.

### **2.4.3. Dispersinės skysčių-skysčių mikroekstrakcijos procedūra**

Dispersinėje skysčių-skysčių mikroekstrakcijoje naudojamas dvikomponentis tirpiklių mišinys: didesnio už vandenį tankio ekstrahentas, ir tiek su vandeniu, tiek su ekstrahentu besimaišantis disperguojantis tirpiklis.

Į 12 mL kūginį mėgintuvėlį įpilama 8 mL vandeninio parabenų tirpalo. Tada 1 mL švirkštu į tirpalą greitai suleidžiama ekstrahuojančio ir disperguojančio tirpiklių mišinio. Kai ekstrahuojančio ir disperguojančio tirpiklių mišinys greitai iššvirkščiamas į mėginį, jis susidrumsčia, susidaro emulsija iš mažų ekstrahento lašelių, disperguotų vandens mėginyje. Susidaręs drumstas tirpalas 2 minutes centrifuguojamas 5000 aps/min greičiu.

Ekstrahentas su analitėmis nusėda ekstrakcinio indo dugne. 10  $\mu$ L mikrošvirkštu paimama 1  $\mu$ L ekstrakto ir suleidžiama į dujų chromatografo garintuvą analizei.



## 2.5 Derivatizacija prieš mikroekstrakcijos procedūras

### *Parabenu derivatizacija prieš mikroekstrakciją tirpiklio lašu ir prieš skystafazę mikroekstrakciją kapiliare*

Parabenu derivatizacijai atlikti į 10 mL vandeninio parabenu tirpalo (10 µg/mL) buvo dedama 0,02 g/mL K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×3H<sub>2</sub>O ir 10 µL acto rūgšties anhidrido. Gauto tirpalo pH buvo 9.

### *Parabenu derivatizacija prieš dispersinę skysčių-skysčių mikroekstrakciją*

Parabenu derivatizacijai atlikti į 8 mL vandeninio parabenu tirpalo (10 µg/mL) buvo dedama 0,02 g/mL K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×3H<sub>2</sub>O ir 8 µL acto rūgšties anhidrido. Gauto tirpalo pH buvo 9.

## 2.6. Analizės rezultatų įvertinimas

Analizės rezultatų įvertinimui panaudota matematinės statistikos skaičiavimai [112].

Aritmetinis vidurkis  $\bar{x}$  yra n matavimų rezultatų vidutinė vertė ir apskaičiuojama pagal formulę:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (2.1)$$

kur:

$\bar{x}$  – matavimų rezultatų vidutinė vertė;

$x_i$  – i-ojo matavimo vertė;

n – matavimų skaičius.

Matavimų serijos standartinis nuokrypis  $s$  charakterizuoja atskirų matavimo verčių išsibarstymą nuo jų aritmetinio vidurkio ir išreiškiamas lygtimi:

$$s = \left( \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1} \right)^{1/2} \quad (2.2)$$

kur:

$s$  – standartinis nuokrypis;

$\bar{x}$  – matavimų rezultatų vidutinė vertė;

$x_i$  –  $i$ -ojo matavimo vertė;

$n$  – matavimų skaičius.

Santykinis standartinis nuokrypis  $s_r$  išreiškiamas lygtimi:

$$s_r = \frac{s}{\bar{x}} \quad (2.3)$$

kur:

$s_r$  – santykinis standartinis nuokrypis;

$s$  – standartinis nuokrypis;

$\bar{x}$  – matavimų rezultatų vidutinė vertė.

## 2.7. Rezultatų apskaičiavimas priedų metodu

Atliekant dujų chromatografinę analizę priedų metodu, pirmiausiai gaunama mėginio be priedo chromatograma, po to į mėginį įdedamas žinomas analitės priedo kiekis ir vėl gaunama chromatograma. Analitės kiekis mėginyje apskaičiuojamas pagal lygtį [113]:

$$Q_x = Q_{st} \frac{A_x}{A_{x+st} - A_x} \quad (2.4)$$

kur:

$Q_x$  – nežinomas analitės kiekis mėginyje;

$Q_{st}$  – į mėginį įvesto analitės priedo kiekis;

$A_x$  – analitės be priedo smailės plotas;

$A_{x+st}$  – analitės su priedu smailės plotas.

### **3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS**

#### **3.1. Parabenu mikroekstrakcija tirpiklio lašu**

Mikroekstrakcija tirpiklio lašu yra ypač paprastas ir pigus miniatiūrizuotos ekstrakcijos skysčiais variantas, todėl šį mikroekstrakcijos metodą pirmiausiai ir pabande pritaikyti nederivatizuotiems ir derivatizuotiems parabenams iš vandeninių tirpalų ekstrahuoti. Mikroekstrakciją tirpiklio lašu galima atlikti tiek tiesiogiai iš tirpalo, tiek iš viršerdvės virš tirpalo.

##### **3.1.1. Nederivatizuotų parabenu mikroekstrakcija tirpiklio lašu**

Kadangi nederivatizuotų parabenu lakumas nedidelis, nemėginome jų ekstrahuoti iš viršerdvės, bet pasirinkome tiesioginę mikroekstrakciją iš tirpalo.

Tiesioginė mikroekstrakcija tirpiklio lašu atliekama išstūmus organinio tirpiklio lašą iš mikrošvirkšto adatos tiesiogiai į tirpalą. Lašo dydis įprastai svyruoja nuo 1 iki 3  $\mu\text{L}$ . Lašas turi laikytis pakibęs ant mikrošvirkšto adatos galiuko. Po ekstrakcijos lašas įtraukiamas atgal į švirkštą ir įleidžiamas į dujų chromatografo garintuvą. Didžiausią įtaką tiesioginės mikroekstrakcijos tirpiklio lašu efektyvumui turi ekstrahuojančio tirpiklio prigimtis, lašo tūris, ekstrakcijos trukmė bei druskų koncentracija tirpale.

##### **3.1.1.1 Ekstrakcijos sąlygų optimizavimas**

###### ***Ekstrahuojančio tirpiklio prigimtis***

Vienas iš svarbiausių etapų optimizuojant ekstrakcijos tirpiklio lašu sąlygas yra ekstrahuojančio tirpiklio parinkimas. Tinkamai jį parinkus, pasiekiamas didelis ekstrakcijos atrankumas bei analitės smarkiai sukonzentruojamos. Ekstrakcijai naudojamas tirpiklis turi būti netirpus mėginyje, o tiriamos medžiagos (mūsų atveju parabenai) turi geriau tirpti organinėje fazėje, negu mėginio fazėje. Ekstraktą analizuojant dujų

chromatografijos metodu, tirpiklis turi nekenkti chromatografinėi kolonėlei, tirpiklio smailė turi būti gerai atskiriama nuo analičių smailių.

Parabenu ekstrahavimui buvo išbandyti penki tirpikliai: anglies tetrachloridas, amilo acetatas, 1-oktanolis, *n*-oktanas ir toluenas. Fizikinės pasirinktų organinių tirpiklių savybės yra pateiktos 3.1 lentelėje.

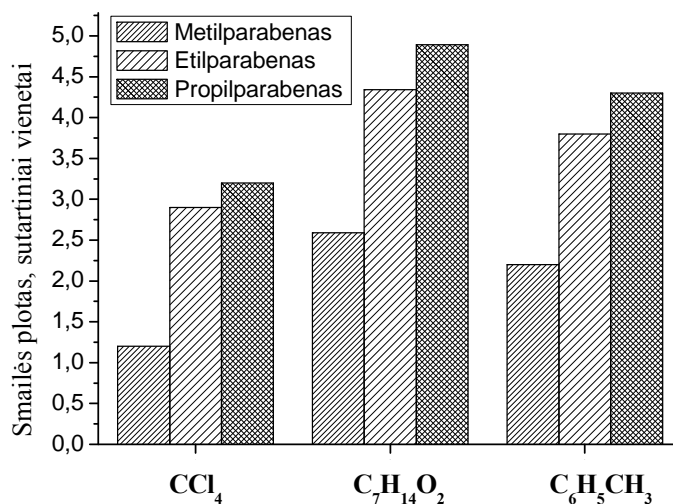
**3.1 lentelė**

Ekstrahuojančiųjų tirpiklių fizikinės savybės

Tirpiklis	Virimo temperatūra, °C	Tirpumas vandenyje, g/L
Anglies tetrachloridas	76,5	0,8
Amilo acetatas	145,5	10
1-Oktanolis	196	0,0003
<i>n</i> -Oktanas	126	0,007
Toluenas	110,5	0,4
<i>o</i> -Ksilenas	144	0,18
Dibutilftalatas	340	0,013
Dioktilftalatas	384	0,000041

Siekiant pasirinkti tinkamą ekstrahuojantį tirpiklį, 10 mL vandeninio mėginio, turinčio po 10 µg/mL parabenu, ekstrahuojame 1 µL ekstrahuojančio tirpiklio, 10 min, tirpalą maišėme 200 aps/min greičiu.

Tyrimai parodė, kad *n*-oktanas ir 1-oktanolis netinkami ekstrahavimui, nes jų lašai nesilaiko pakibę švirkšto adatos gale. Jie atitrūksta ir pakyla į ekstrahuojamo tirpalo paviršių. Iš likusių trijų ekstrahentų geriausiu ekstrahavimo efektyvumu pasižymėjo amilo acetatas (3.1 pav.). Jį ir pasirinkome tolimesniam darbui kaip parabenu ekstrahentą.



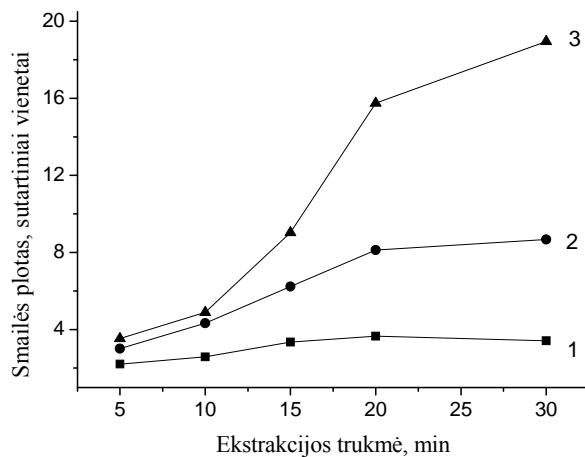
**3.1 pav.** Parabenų chromatografinių smailių plotų priklausomybė nuo ekstrahuojančiojo tirpiklio prigimties. METL sąlygos: mėginio tūris 10 mL parabenų koncentracija 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , ekstrahento tūris 1  $\mu\text{L}$ , ekstrakcijos trukmė 10 min, tirpalo maišymo greitis 200 aps/min. Chromatografinės sąlygos pateiktos skyriuje „eksperimento metodika“.

#### ***Lašo tūris***

Išbandžius įvairius amilo acetato lašo tūrius (1–5  $\mu\text{L}$ ), buvo pasirinktas 1  $\mu\text{L}$  tūrio lašas, nes būtent tokio tūrio lašas dar išsilaiko ant adatos galo ir yra optimalus, į chromatografą leisti tinkamas tūris.

#### ***Ekstrakcijos trukmė***

Siekiant optimizuoti ekstrakcijos trukmę, buvo tirta 5–30 min parabenų ekstrakcijos iš vandeninių tirpalų trukmė. Iš 3.2 pav. pateiktų rezultatų matyti, kad didinant ekstrakcijos trukmę iki 20 minučių visų tirtų parabenų smailių plotai didėja. Didinant ekstrakcijos trukmę nuo 20 iki 30 min etilparabeno ir propilparabeno smailių plotai toliau šiek tiek didėja, o metilparabeno smailės plotas nebekinta. Nežiūrint to, kad 20 min nepakanka etilparabeno ir propilparabeno pusiausvyrai tarp vandeninės ir organinės fazių nusistovėti, tolimesniam darbui vis dėlto pasirinkome 20 min ekstrakcijos trukmę. Tai šiek tiek sumažino ekstrakcijos efektyvumą, tačiau labai palengvino ekstrakcijos atlikimą, kadangi 20 min lašas visada likdavo pakibęs ant adatos galiuko.



**3.2 pav.** Parabenų chromatografinių smailių plotų priklausomybė nuo ekstrakcijos trukmės: 1 – metilparabenas, 2 – etilparabenas, 3 – propilparabenas. METL sąlygos: mėginio tūris 10 mL, parabenų koncentracija 10 µg/mL, ekstrahento (amilo acetato) tūris 1 µL, tirpalo maišymo greitis 200 aps/min. Chromatografinės sąlygos pateiktos skyriuje „eksperimento metodika“.

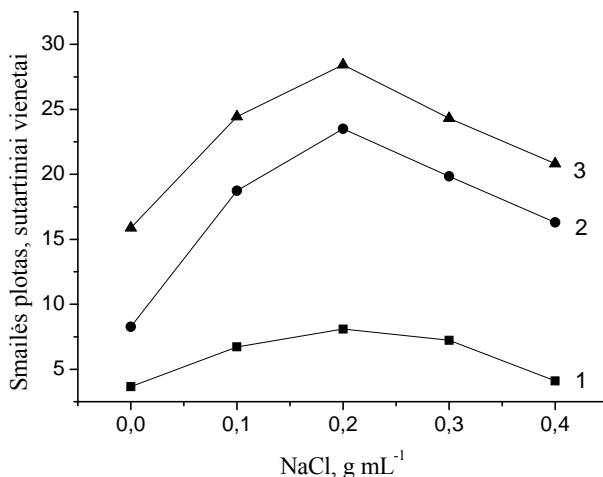
### *Druskų koncentracija tirpale*

Siekiant tinkamai parinkti mikroekstrakcijos sąlygas, viena iš svarbiausių charakteristikų yra druskų koncentracija tirpale. Būtent šis parametras daro didžiausią įtaką vandeninių tirpalų joninei jėgai ir gali nulemti organinių junginių tirpumą vandenyje, o tuo pačiu ir pasiskirstymo koeficientus bei ekstrakcijos išgavą. Druskų įtaką galima paaiškinti hidratinės sferos susidarymu aplink disociavusios druskos jonus. Susidariusi sfera sumažina vandeninės fazės, kurioje tirpsta analitės, koncentraciją, dėl to analitės lengviau pereina į ekstrahentą. Šis efektas ypač ryškus polinėms analitėms. Joninei jėgai padidinti dažniausiai yra pridedama NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> arba MgSO<sub>4</sub>.

Druskų efekto įtakai patikrinti pasirinkome dažniausiai mikroekstrakcijos metuose naudojamą NaCl. Į 10 mL 10 µg/mL koncentracijos parabenų tirpalą buvo dedama 0,1–0,4 g/mL NaCl. Iš gautų rezultatų (3.3 pav.) matyti, kad didinant druskos kiekį tirpale iki 0,2 g/mL analičių smailių plotai didėjo. Didinant NaCl koncentraciją nuo 0,2 g/mL iki 0,4 g/mL, analičių smailių plotai pradeda mažėti. Tai greičiausiai galima paaiškinti tuo, kad disocijavusi

NaCl druska pakeičia Nernsto difuzinio sluoksnio, supančio tirpiklio lašą, fizikines savybes ir dėl to apsunkinama analičių difuzija į tirpiklį.

Tolimesniam darbui į parabenų vandeninį tirpalą buvo dedama 0,2 g/mL NaCl.



**3.3 pav.** Parabenų chromatografinių smailių plotų priklausomybė nuo NaCl kiekio: 1 – metilparabenas, 2 – etilparabenas, 3 – propilparabenas. METL sąlygos: mėginio tūris 10 mL, parabenų koncentracija 10 µg/mL, ekstrahento (amilo acetato) tūris 1 µL, ekstrakcijos trukmė 20 min, tirpalo maišymo greitis 200 aps/min. Chromatografinės sąlygos pateiktos skyriuje „eksperimento metodika“.

Optimalios parabenų mikroekstrakcijos tirpiklio lašu sąlygos pateiktos 3.2 lentelėje.

**3.2 lentelė**

Parabenų tiesioginės METL optimalios sąlygos

Parametras	Vertė
Ekstrahuojantis tirpiklis	Amilo acetatas
Ekstrahuojančio tirpiklio tūris, µL	1
Tirpalo maišymo greitis, aps/min	200
Ekstrakcijos trukmė, min	20
NaCl kiekis, g/mL	0,2

### 3.1.1.2. Metodo analizinės charakteristikos

Optimizavus parabenų tiesioginės mikroekstrakcijos tirpiklio lašu sąlygas, nustatėme paruošto metodo pagrindines analizines charakteristikas: aptikimo ribas, tiesinius koncentracijų intervalus, rezultatų pasikartojamumą.

Aptikimo riba yra labai svarbi analizinė charakteristika, nes ji įvertina metodo jautrumą. Aptikimo riba laikyta tokia analitės koncentracija, kuriai esant analitės smailės aukštis chromatogramoje yra tris kartus didesnis už nulinės linijos storį. Aptikimo ribos pateiktos 3.3 lentelėje.

Siekiant panaikinti paklaidą, atsirandančią dėl paimto nevienodo ekstrakto tūrio, į ekstrahentą patartina dėti vidinio standarto. Vidiniu standartu naudojama medžiaga turi būti inertiška analizuojamiems komponentams bei nejudriai fazei, jos sulaikymo trukmė turi būti artima nustatomų komponentų sulaikymo trukmėms, jos smailė chromatogramoje turi pilnai atsiskirti nuo kitų analizuojamų mėginio komponentų smailių, jos neturi būti analizuojamame mėginyje. Be to pageidautina, kad vidinio standarto smailė chromatogramoje būtų tarp nustatomų junginių smailių. Remiantis šiais reikalavimais, vidiniu standartu pasirinkome *n*-nonadekaną. Į ekstrahuojantį tirpiklį (amilo acetatą) dėjome 5 µg/mL vidinio standarto. Rezultatų pasikartojamumas buvo įvertintas dvejoms analičių koncentracijoms (1 ir 10 µg/mL). Mikroekstrakcija tirpiklio lašu buvo atliekama 5 kartus. Analičių nustatymo rezultatų santykinų standartinių nuokrypių  $s_r$  vertės artimos ir neviršija 12,6 % (3.3 lentelė).

Tiesiniam koncentracijų intervalui nustatyti buvo ruošiama serija 10 skirtingų koncentracijų standartinių parabenų tirpalų, praskiedžiant distiliuotu vandeniu pradinį standartinį tirpalą. Santykinų smailių plotų (parabeno smailės ploto ir vidinio standarto smailės ploto santykis) priklausomybė nuo parabenų koncentracijos buvo tiesinė iki 10 µg/mL. Kalibracinių kreivių koreliacijos koeficientų vertės buvo 0,995–0,997 ( $n=5$ ).



### 3.3 lentelė

Parabenu aptikimo ribos ir rezultatų pasikartojamumas, atlikus tiesioginę METL

Analitė	Aptikimo riba, µg/L	s <sub>r</sub> , % (n = 5)	
		c = 1 µg/mL	c = 10 µg/mL
Metilparabenas	102	12,4	11,9
Etilparabenas	80	11,8	11,2
Propilparabenas	60	12,6	12,1

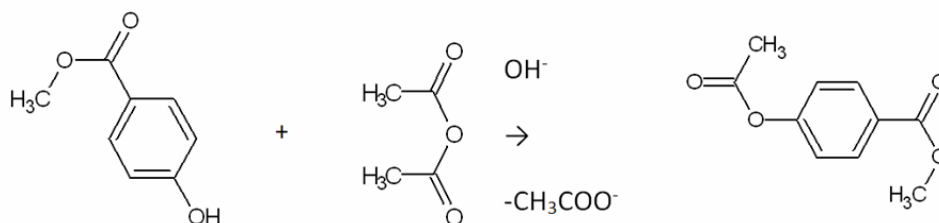
#### 3.1.2. Derivatizuotų parabenu mikroekstrakcija tirpiklio lašu

Siekiant padidinti parabenu ekstrakcijos efektyvumą ir nustatymo jautri, parabenus derivatizavome.

##### 3.1.2.1. Derivatizacijos sąlygų optimizavimas

###### *Derivatizacijos reagentas*

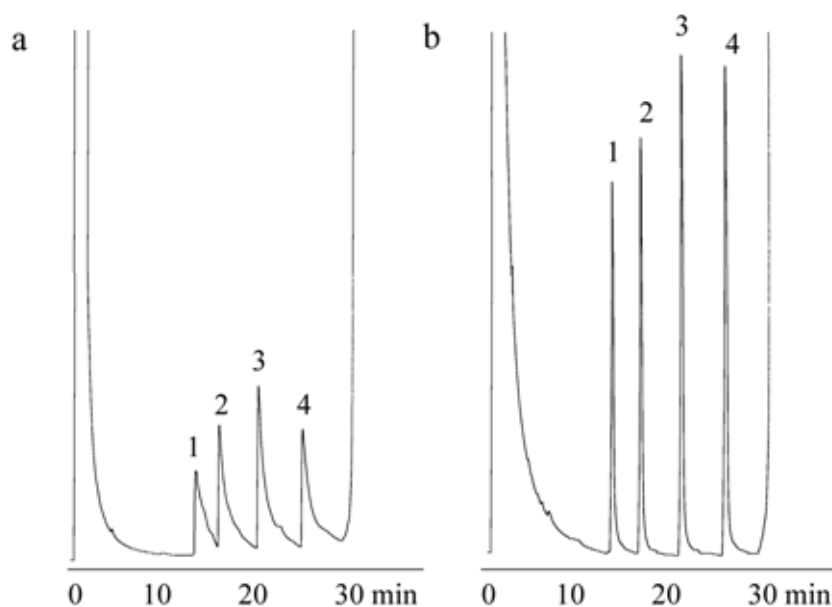
Remiantis literatūros apžvalga, acetilinimas acto rūgšties anhidridu yra ypatingai paprastas ir greitas parabenu derivatizacijos būdas, tad derivatizacijos reagentu pasirinkome acto rūgšties anhidridą. Parabenu molekulėje *para* padėtyje esanti hidroksigrupė veikia kaip nukleofilinis molekulės centras, kuris reaguoja su elektrofiliniu acto rūgšties anhidrido anglies atomu. Šios reakcijos metu atsiskiria acetato grupė. Metilparabeno derivatizacijos acto rūgšties anhidridu reakcija pavaizduota 3.4 pav.



3.4 pav. Metilparabeno derivatizacija acto rūgšties anhidridu.

Acetilinimas acto rūgšties anhidridu paprastai atliekamas esant vandenilio karbonatui ar piridinui [43]. Vis dėlto remiantis literatūra [114], naudojant vandenilio fosfatą pasiekiamas didesnis ekstrakcijos efektyvumas negu naudojant vandenilio karbonatą. Šiame darbe dikalio-vandenilio fosfatas buvo naudojamas kaip bazinis katalizatorius.

Pirmiausiai buvo nustatytos optimalios parabenų acetilinimo sąlygos: į 10 mL 10 mg/mL parabenų tirpalo dėta 0,5 g  $K_2HPO_4 \times 3H_2O$  ir 100  $\mu$ L acto rūgšties anhidrido. Palyginus šiomis sąlygomis derivatizuotų ir nederivatizuotų parabenų tirpalo chromatogramas (3.5 pav.) matyti, kad derivatizuotų parabenų smailės žymiai simetriškesnės, jos yra aukštesnės ir siauresnės. Dėl šiek tiek didesnės derivatizacijos produktų molekulinės masės derivatizuotų parabenų smailių sulaikymo trukmės šiek tiek didesnės. Nederivatizuotų parabenų smailės asimetriškos ir plačios dėl hidroksilo grupių sąveikos su chromatografine sistema.



**3.5 pav.** Nederivatizuotų (a) ir derivatizuotų acto rūgšties anhidridu (b) parabenų tirpalų chromatogramos: 1 – metilparabenas, 2 – etilparabenas, 3 – propilparabenas, 4 – butilparabenas. Chromatografinės sąlygos pateiktos skyriuje „eksperimento metodika“.

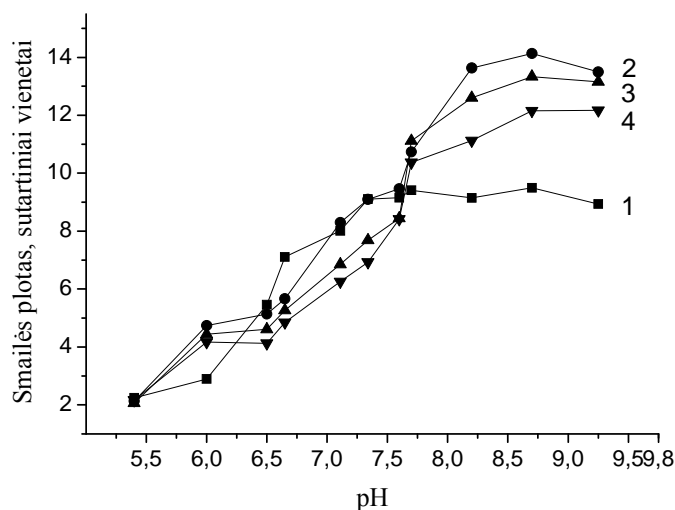
### *pH įtaka parabenų derivatizacijai*

pH įtaka parabenų derivatizacijai buvo tiriama gaminant skirtingos pH vertės derivatizuotų parabenų tirpalus. Tirpalo pH vertės tyrimo metu buvo keičiamos nuo 5,4 iki 9,25.

Į standartinį 10 mg/L parabenų tirpalą buvo dedamas 0,02 g/mL  $K_2HPO_4 \times H_2O$ . Tirpalo pH buvo 9. Didesnių pH verčių tirpalai buvo gaminami šarminant tirpalą 0,1 mol/L KOH tirpalu, žemesnių pH verčių – rūgštinant 0,1 mol/L HCl tirpalu.

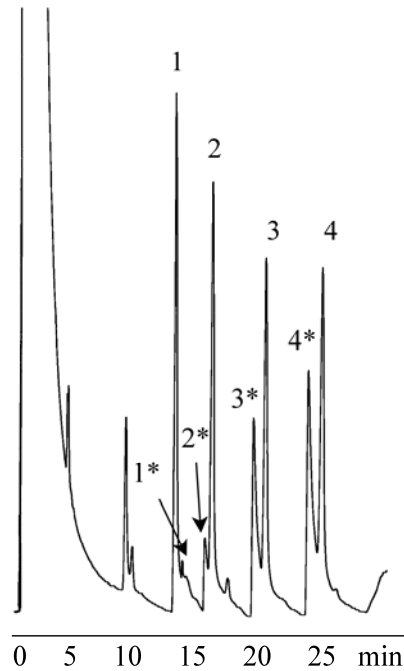
Po derivatizacijos analitės buvo ekstrahuojamos heksanu. Į 25 mL analizuojamo tirpalo buvo pilama 0,5 mL heksano ir purtoma 5 min.

Iš 3.6 pav. pateiktų duomenų matyti, kad didinant terpės pH iki 7,5–8 auga derivatizuotų parabenų smailių plotai. Taip yra dėl to, kad  $OH^-$  jonai deprotonuoja hidroksigrupę ir padidėja jos nukleofiliškumas. Tai reiškia, kad kuo baziškesnė terpė, tuo geriau vyksta derivatizacija. Kai  $pH > 8$  parabenų derivatizacijos produktų smailių plotai nebekinta arba kinta nežymiai.



**3.6 pav.** Derivatizuotų parabenų chromatografinių smailių plotų priklausomybė nuo pH: 1 – metilparabenas, 2 – etilparabenas, 3 – propilparabenas, 4 – butilparabenas. Chromatografinės sąlygos pateiktos skyriuje „eksperimento metodika“.

Kai  $pH < 7,5$  chromatogramose stebimos derivatizuotų ir nederivatizuotų parabenų smailės (3.7 pav.).



**3.7 pav.** Parabenu tirpalo (pH = 6,1) ekstrakto chromatograma: 1 – metilparabenas, 2 – etilparabenas, 3 – propilparabenas, 4 – butilparabenas. Žvaigždutėmis (\*) pažymėtos nederivatizuotų parabenu smailės, be žvaigždutėių – derivatizuotų. Chromatografinės sąlygos pateiktos skyriuje „eksperimento metodika“.

pH įtaką chromatografinėms smailėms galima paaiškinti tuo, kad dalis parabenu molekulių derivatizavosi, o dalis molekulių liko chemiškai nemodifikuotos. Taigi esant silpnai rūgštinei terpei derivatizacija nevyksta, t.y. tirpale po derivatizacijos egzistuoja dvi parabenu formos. Optimalia tirpalo pH verte buvo pasirinktas koncentracijų intervalas 8,5–9,5, nes šiame pH intervale derivatizuotų parabenu smailių plotai nekinta arba kinta labai nežymiai.

Kadangi į vandeninį parabenu tirpalą pridėjus 0,02 g/mL  $K_2HPO_4 \times 3H_2O$  tirpalo pH buvo 9, tirpalo nereikėjo nei papildomai šarminti, nei rūgštinti. Toks tirpalas buvo naudojamas tolimesniems tyrimams.

Derivatizuotiems parabenams ekstrahuoti pasirinkome ir tyrėme abu (tiesiogiai iš tirpalo, tiek iš viršerdvės virš tirpalo) mikroekstrakcijos tirpiklio lašu būdus.

### 3.1.2.2. Derivatizuotų parabenų tiesioginė mikroekstrakcija tirpiklio lašu

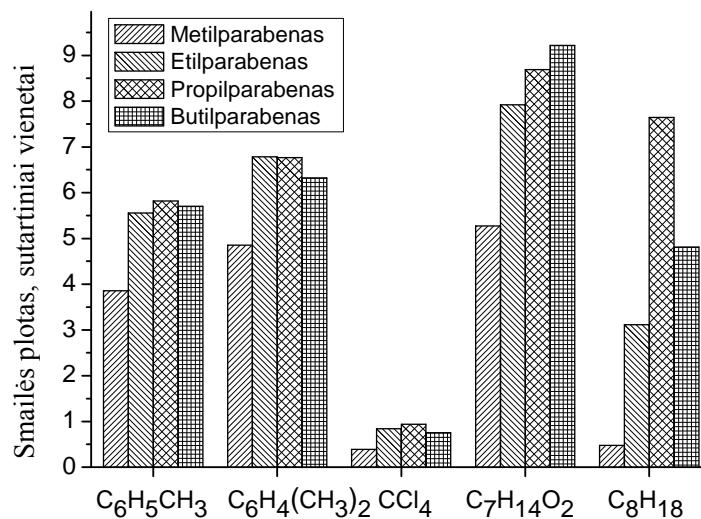
#### 3.1.2.2.1. Ekstrakcijos sąlygų optimizavimas

##### *Ekstrahuojančio tirpiklio prigimtis*

Derivatizuotų parabenų ekstrakcijai buvo išbandyti šeši tirpikliai: anglies tetrachloridas, amilo acetatas, 1-oktanolis, *n*-oktanas, toluenas ir *o*-ksilenas. Fizikinės pasirinktų organinių tirpiklių savybės yra pateiktos 3.1 lentelėje.

Tyrimams ėmėme 10 mL vandens parabenų tirpalo (10 µg/mL), į jį dėjome 0,2 g  $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ , 10 µL acto rūgšties anhidrido. Ekstrahavome 1 µL ekstrahuojančio tirpiklio 20 min, tirpalą maišėme 200 aps/min greičiu.

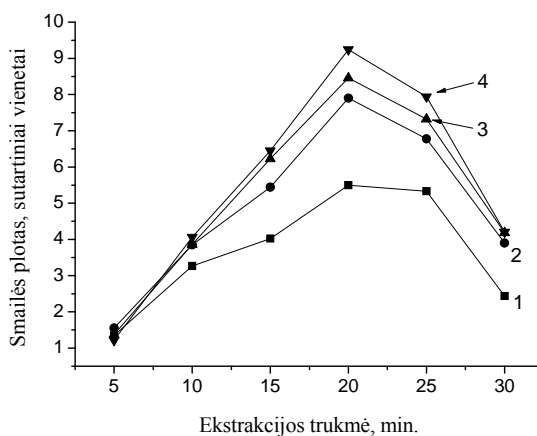
Tyrimai parodė, kad 1-oktanolis netinkamas ekstrakcijai, nes nesilaiko pakibęs švirkšto adatos gale, bet atitrūksta ir pakyla į ekstrahuojamo tirpalo paviršių. Iš likusių ekstrahentų geriausiu ekstrakcijos efektyvumu pasižymėjo amilo acetatas (3.8 pav.). Tolimesniems tyrimams pasirinktas 1 µL tūrio amilo acetato lašas.



**3.8 pav.** Derivatizuotų parabenų chromatografinių smailių plotų priklausomybė nuo ekstrahuojančiojo tirpiklio prigimties. METL sąlygos: mėginio tūris 10 mL parabenų koncentracija 10 µg/mL,  $K_2HPO_4 \times 3H_2O$  koncentracija 0,02 g/mL, acto rūgšties anhidrido tūris 10 µL, ekstrahento tūris 1 µL, ekstrakcijos trukmė 20 min, tirpalo maišymo greitis 200 aps/min. Chromatografinės sąlygos pateiktos skyriuje „eksperimento metodika“.

### *Ekstrakcijos trukmė*

Siekiant optimizuoti ekstrakcijos trukmę, buvo tirta 5–30 min parabenų ekstrakcijos iš vandeninių tirpalų trukmė. Iš 3.9 pav. pateiktų rezultatų matyti, kad didinant ekstrakcijos trukmę iki 20 min visų tirtų parabenų smailių plotai didėja, o toliau didinant ekstrakcijos trukmę mažėja. Mažėjimą greičiausiai galima paaiškinti tuo, kad, ilgai ekstrahuojant, ekstrahento lašas dalinai tirpsta, sumažėja jo tūris, o kartu sumažėja ir išekstrahuotas analičių kiekis. Remdamiesi gautais rezultatais, tolimesniam darbui pasirinkome 20 min ekstrakcijos trukmę.

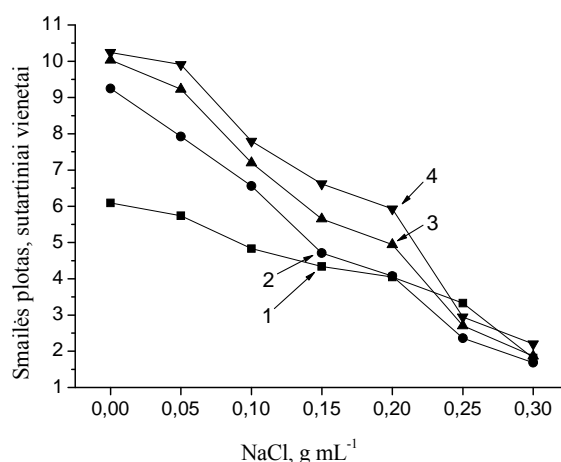


**3.9 pav.** Derivatizuotų parabenų chromatografinių smailių plotų priklausomybė nuo ekstrakcijos trukmės: 1 – metilparabenas, 2 – etilparabenas, 3 – propilparabenas, 4 – butilparabenas. METL sąlygos: mėginio tūris 10 mL, parabenų koncentracija 10  $\mu\text{g/mL}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$  koncentracija 0,02 g/mL, acto rūgšties anhidrido tūris 10  $\mu\text{L}$ , ekstrahento (amilo acetato) tūris 1  $\mu\text{L}$ , tirpalo maišymo greitis 200 aps/min. Chromatografinės sąlygos pateiktos skyriuje „eksperimento metodika“.

### *Druskų koncentracija tirpale*

Druskų efekto įtakai patikrinti naudojome 0,1–0,3 g/mL NaCl. Iš gautų rezultatų (3.10 pav.) matyti, kad, priešingai negu buvo tikėtasi, didinant druskos kiekį tirpale, analičių smailių plotai mažėjo. Greičiausiai tai galima paaiškinti tuo, kad druskos pridėjimas ne tik sukelia išsūdrymo efektą, bet ir pakeičia ekstrahuojančio tirpiklio paviršiaus plėvelės savybes ir dėl to sumažėja difuzijos iš vandeninio tirpalo į organinį lašą greitis.

Dėl tokių rezultatų, atliekant tolimesnius tyrimus į parabenu vandeninį tirpalą NaCl nedėjome.



**3.10 pav.** Derivatizuotų parabenu chromatografinių smailių plotų priklausomybė nuo NaCl kiekio: 1 – metilparabenas, 2 – etilparabenas, 3 – propilparabenas, 4 – butilparabenas. METL sąlygos: mėginio tūris 10 mL, parabenu koncentracija 10 µg/mL, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×3H<sub>2</sub>O koncentracija 0,02 g/mL, acto rūgšties anhidrido tūris 10 µL, ekstrahento (amilo acetato) tūris 1 µL, ekstrakcijos trukmė 20 min, tirpalo maišymo greitis 200 aps/min. Chromatografinės sąlygos pateiktos skyriuje „eksperimento metodika“.

Optimalios derivatizuotų parabenu tiesioginės mikroekstrakcijos tirpiklio lašu sąlygos pateiktos 3.4 lentelėje.

**3.4 lentelė**

Derivatizuotų parabenu tiesioginės METL optimalios sąlygos

Parametras	Vertė
Ekstrahuojantis tirpiklis	Amilo acetatas
Ekstrahuojančio tirpiklio tūris, µL	1
Tirpalo maišymo greitis, aps/min	200
Ekstrakcijos trukmė, min	20
NaCl kiekis, g/mL	Nėra

### 3.1.2.2.2 Metodo analizinės charakteristikos

Optimizavus derivatizuotų parabenų tiesioginės mikroekstrakcijos tirpiklio lašu sąlygas, nustatėme paruošto metodo pagrindines analizes charakteristikas: aptikimo ribas, tiesinius koncentracijų intervalus, rezultatų pasikartojamumą.

Aptikimo ribos pateiktos 3.5 lentelėje.

Norėdami gauti kuo geriau pasikartojančius rezultatus, naudojome vidinį standartą. Vidiniu standartu pasirinkome *n*-heksadekaną, jo koncentracija amilo acetate buvo 0,5 µg/mL. Rezultatų pasikartojamumas buvo įvertintas dvejoms analizių koncentracijoms (1 ir 10 µg/mL). Mikroekstrakcija tirpiklio lašu buvo atliekama 5 kartus. Analizių nustatymo rezultatų santykinų standartinių nuokrypių  $s_r$  vertės artimos ir neviršija 10,7 % (3.5 lentelė).

Tiesiniam koncentracijų intervalui nustatyti buvo ruošiama serija 7 skirtingų koncentracijų standartinių parabenų tirpalų, praskiedžiant distiliuotu vandeniu pradinį standartinį tirpalą. Smailių plotų priklausomybė nuo parabenų koncentracijos buvo tiesinė iki 10 µg/mL. Kalibracinių kreivių koreliacijos koeficientų vertės buvo 0,997–0,998 (n=5).

### 3.5 lentelė

Derivatizuotų parabenų aptikimo ribos ir rezultatų pasikartojamumas, atlikus tiesioginę METL

Analitė	Aptikimo riba, µg/L	$s_r$ , % (n = 5)	
		c = 1 µg/mL	c = 10 µg/mL
Metilparabenas	30	10,0	6,9
Etilparabenas	14	8,8	5,2
Propilparabenas	18	8,3	5,6
Butilparabenas	27	10,7	5,1



### **3.1.2.3 Derivatizuotų parabenų mikroekstrakcija tirpiklio lašu iš viršerdvės**

Mikroekstrakcija tirpiklio lašu iš viršerdvės atliekama išstūmus organinio tirpiklio lašą iš mikrošvirkšto adatos virš analizuojamo tirpalo. Mikrošvirkštas tvirtinamas laikikliu virš buteliuko su analizuojamu tirpalu taip, kad mikrošvirkšto adatos galas pradurtų tarpinę ir būtų 0,5 cm aukštyje virš analizuojamo tirpalo. Ant mikrošvirkšto adatos galo kabančiame ekstrahento laše atliekama ekstrakcija. Po ekstrakcijos lašas įtraukiamas atgal į švirkštą ir įleidžiamas į dujų chromatografo garintuvą. Didžiausią įtaką mikroekstrakcijos iš viršerdvės efektyvumui turi ekstrahuojantis tirpiklis, ekstrakcijos temperatūra, ekstrakcijos trukmė bei druskų koncentracija tirpale.

#### **3.1.2.3.1. Ekstrakcijos sąlygų optimizavimas**

##### ***Ekstrahuojančio tirpiklio prigimtis***

Ekstrahuojant tirpiklio lašu iš viršerdvės, tirpiklis, kaip ir tiesioginės ekstrakcijos iš tirpalo atveju, turi kuo geriau tirpinti analites. Tačiau kiti tirpikliui keliami reikalavimai šiek tiek skiriasi. Ekstrakcijos iš viršerdvės atveju tirpiklis gali būti labiau tirpus vandenyje. Antra vertus, tirpiklio lakumas turi būti mažesnis, antraip tirpiklis viršerdvėje išgaruos. Taigi tiriant derivatizuotų parabenų ekstrakciją iš viršerdvės, teko iš naujo parinkti ekstrahuojantį tirpiklį.

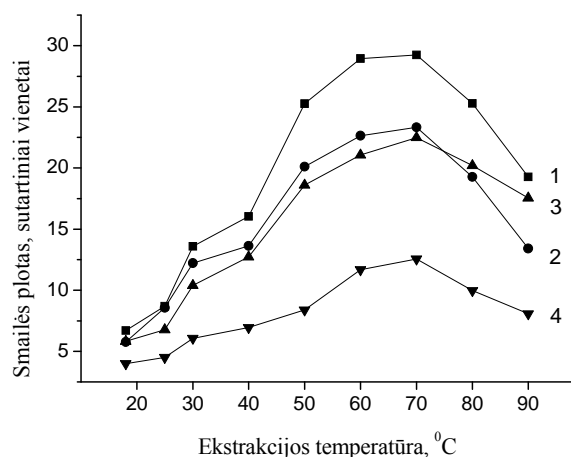
Pirmiausiai išbandėme tiesioginėje mikroekstrakcijoje tirpiklio lašu naudotus ekstrahentus – anglies tetrachloridą, amilo acetatą, *n*-oktaną, tolueną ir *o*-ksileną. Tam parabenus pirmiausiai derivatizavome, po to į mikrošvirkštą pritraukėme 1 µL ekstrahento ir laikėme jį viršerdvėje virš derivatizuotų parabenų tirpalo 10 min. Deja, ekstrahuojant iš viršerdvės kambario temperatūroje, ekstraktuose neaptikome parabenų smailių. Greičiausiai analičių lakumas kambario temperatūroje per mažas ir tik nežymi jų dalis pereina į viršerdvę.

Tuomet tuos pačius ekstrahentus išbandėme ekstrahuodami 50 °C temperatūroje. Deja, po 7–10 min ekstrahentų lašai buvo išgaravę. Akivaizdu, kad reikėjo parinkti aukštesnę virimo temperatūrą turintį ekstrahentą. Taigi išbandėme dibutilftalatą ( $T_{\text{vir}} = 340$  °C) ir dioktilftalatą ( $T_{\text{vir}} = 384$  °C). Fizikinės šių organinių tirpiklių savybės yra pateiktos 3.1 lentelėje.

Dibutilftalatas netiko, kadangi jo smailė chromatogramoje užklojo propilparabeno ir butilparabeno smailes. Dioktilftalato sulaikymo trukmė buvo didesnė, negu analičių sulaikymo trukmės. Tolimesniems tyrimams pasirinktas 1  $\mu\text{L}$  tūrio dioktilftalato lašas.

### ***Ekstrakcijos temperatūra***

Atlikdami ekstrahuojančio tirpiklio parinkimo tyrimus, pastebėjome, kad ekstrahuojant iš viršerdvės kambario temperatūroje, ekstraktų chromatogramose nebuvo parabenų smailių. Akivaizdu, kad analičių lakumas kambario temperatūroje per mažas. Todėl toliau tyrėme ekstrakcijos iš viršerdvės efektyvumą priklausomybę nuo ekstrakcijos temperatūros. Derivatizuotą 10  $\mu\text{g/mL}$  parabenų tirpalą 10 min ekstrahavome 20–90 °C temperatūroje.

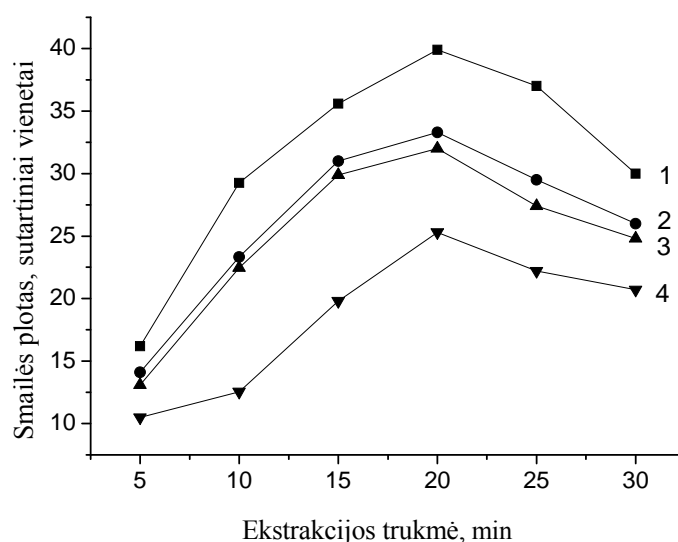


**3.11 pav.** Parabenų chromatografinių smailių plotų priklausomybė nuo ekstrakcijos temperatūros: 1 – metilparabenas, 2 – etilparabenas, 3 – propilparabenas, 4 – butilparabenas. METL sąlygos: mėginio tūris 10 mL, parabenų koncentracija 10  $\mu\text{g/mL}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$  koncentracija 0,02 g/mL, acto rūgšties anhidrido tūris 10  $\mu\text{L}$ , ekstrahento (dioktilftalato) tūris 1  $\mu\text{L}$ , tirpalo maišymo greitis 800 aps/min. Chromatografinės sąlygos pateiktos skyriuje „eksperimento metodika“.

Iš 3.11 pav. pateiktų rezultatų matyti, kad didinant ekstrakcijos temperatūrą iki 70 °C, didėja ir išekstrahuojamų analičių kiekis. Toliau keliant temperatūrą iki 90 °C, ekstrakcijos efektyvumas mažėja. Greičiausiai tai galima paaiškinti tuo, kad kylant temperatūrai ne tik didėja analičių kiekis viršerdvėje, bet ir vis labiau garuoja ekstrahentas. Virš 70 °C ekstrahento lašas pastebimai sumažėja, taigi sumažėja ir absoliutus išekstrahuotas analičių kiekis, o tuo pačiu ir jų smailės chromatogramoje. Tolimesniam darbui pasirinkome 70 °C ekstrakcijos temperatūrą.

### *Ekstrakcijos trukmė*

Siekiant optimizuoti ekstrakcijos trukmę, 10 µg/mL vandeninį derivatizuotą parabenų tirpalą ekstrahavome 70 °C temperatūroje 5–30 min.

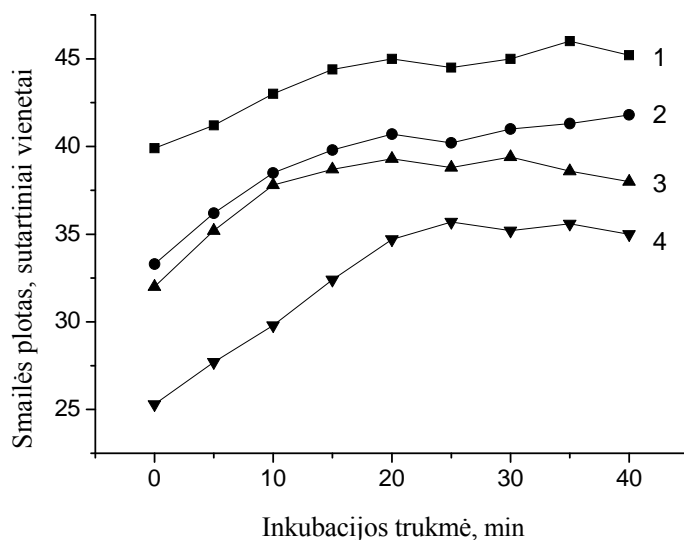


**3.12 pav.** Parabenų chromatografinių smailių plotų priklausomybė nuo ekstrakcijos trukmės: 1 – metilparabenas, 2 – etilparabenas, 3 – propilparabenas, 4 – butilparabenas. METL sąlygos: mėginio tūris 10 mL, parabenų koncentracija 10 µg/mL, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×3H<sub>2</sub>O koncentracija 0,02 g/mL, acto rūgšties anhidrido tūris 10 µL, ekstrahento (dioktilftalato) tūris 1 µL, tirpalo maišymo greitis 800 aps/min. Chromatografinės sąlygos pateiktos skyriuje „eksperimento metodika“.

Iš 3.12 pav. pateiktų rezultatų matyti, kad ekstrahuojant iki 20 min, smailių plotai didėja, o vėliau – mažėja. Greičiausiai taip yra, todėl, kad

ekstrahentas po truputį garuoja, sumažėja ekstrahento tūris, ir dėl to išekstrahuojama mažiau analičių.

Siekiant padidinti ekstrakcijos išgavą, pabandėme prieš ekstrakciją vandeninį derivatizuotų parabenų tirpalą palaikyti 70 °C temperatūroje be ekstrahento, tik maišant. Tai palengvintų analičių perėjimą į dujinę fazę, antra vertus, ekstrahentas neturėtų galimybės nugaruoti. Parabenų tirpalą inkubavome 70 °C temperatūroje iki 40 min, o po to toje pačioje temperatūroje ekstrahavome 20 min. Inkubacijos trukmės įtaka ekstrakcijos efektyvumui parodyta 3.13 pav.

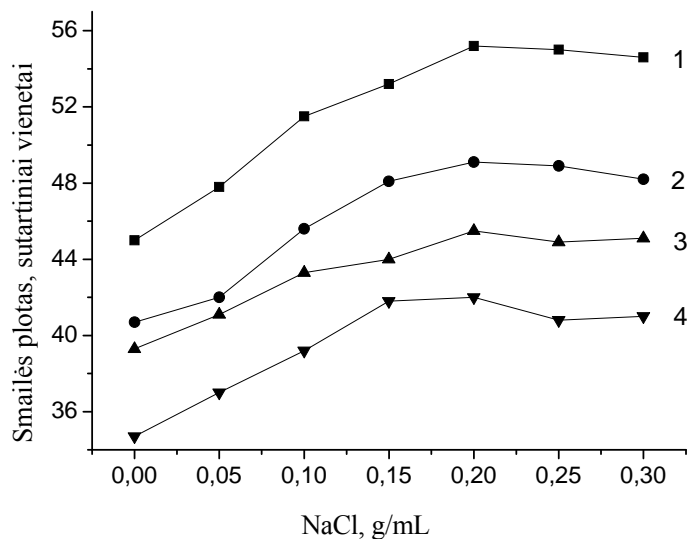


**3.13 pav.** Parabenų chromatografinių smailių plotų priklausomybė nuo inkubacijos trukmės: 1 – metilparabenas, 2 – etilparabenas, 3 – propilparabenas, 4 – butilparabenas. METL sąlygos: mėginio tūris 10 mL, parabenų koncentracija 10 µg/mL,  $K_2HPO_4 \times 3H_2O$  koncentracija 0,02 g/mL, acto rūgšties anhidrido tūris 10 µL, ekstrahento (dioktilftalato) tūris 1 µL, ekstrakcijos temperatūra 70 °C, tirpalo maišymo greitis 800 aps/min. Chromatografinės sąlygos pateiktos skyriuje „eksperimento metodika“.

Akivaizdu, kad ekstrakcijos efektyvumas didėja, ilgėjant inkubacijos trukmei iki 20 min, po to beveik nekinta. Tai galima paaiškinti tuo, kad per 20 minučių nusistovi analičių pusiausvyra tarp tirpalo ir viršerdvės. Tolimesniems tyrimams pasirinkome 20 minučių inkubacijos trukmę.

### *Druskų koncentracija tirpale*

Druskų efekto įtakai patikrinti mikroekstrakcijai tirpiklio lašu iš viršerdvės, kaip ir tiesioginės mikroekstracijos atveju, naudojome NaCl. Į analizuojamą tirpalą buvo pridėdama iki 0,3 g/mL NaCl.



**3.14 pav.** Parabenų chromatografinių smailių plotų priklausomybė nuo NaCl kiekio: 1 – metilparabenas, 2 – etilparabenas, 3 – propilparabenas, 4 – butilparabenas. METL sąlygos: mėginio tūris 10 mL, parabenų koncentracija 10 µg/mL, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×3H<sub>2</sub>O koncentracija 0,02 g/mL, acto rūgšties anhidrido tūris 10 µL, ekstrakto (dioktilftalato) tūris 1 µL, ekstrakcijos trukmė 20 min, inkubacijos trukmė 20 min, ekstrakcijos temperatūra 70 °C, tirpalo maišymo greitis 800 aps/min. Chromatografinės sąlygos pateiktos skyriuje „eksperimento metodika“.

Iš 3.14 pav. pateiktų rezultatų matyti, kad didinant NaCl koncentraciją, išekstrahuotų analičių kiekis didėja. Kai NaCl kiekis buvo padidintas iki 0,2 g/mL, analičių smailių plotai nustojo didėti. Taigi pasirinktas optimalus NaCl kiekis buvo 0,2 g/mL.

Optimalios derivatizuotų parabenų mikroekstrakcijos tirpiklio lašu iš viršerdvės sąlygos pateiktos 3.6 lentelėje.

### 3.6 lentelė

Derivatizuotų parabenų METL iš viršerdvės optimalios sąlygos

Parametras	Vertė
Ekstrahuojantis tirpiklis	Dioktilftalatas
Ekstrahuojančio tirpiklio tūris, $\mu\text{L}$	1
Ekstrakcijos temperatūra, $^{\circ}\text{C}$	70
Tirpalo maišymo greitis, aps/min	800
Ekstrakcijos trukmė, min	20
Inkubacijos trukmė, min	20
NaCl kiekis, g/mL	0,2

#### 3.1.2.3.2. Metodo analizinės charakteristikos

Optimizavus derivatizuotų parabenų mikroekstrakcijos tirpiklio lašu iš viršerdvės sąlygas, nustatėme paruošto metodo pagrindines analizines charakteristikas: aptikimo ribas, tiesinius koncentracijų intervalus, rezultatų pasikartojamumą.

Aptikimo ribos pateiktos 3.7 lentelėje.

Norėdami gauti kuo geriau pasikartojančius rezultatus, naudojome vidinį standartą ( $n$ -heksadekaną). Rezultatų pasikartojamumas buvo įvertintas dvejoms analičių koncentracijoms (1 ir 10  $\mu\text{g/mL}$ ). Mikroekstrakcija tirpiklio lašu buvo atliekama 5 kartus. Gautos santykinų standartinių nuokrypių  $s_r$  vertės siekia net iki 32,2 % (metilparabeno) (3.7 lentelė), o tai rodo, kad rezultatų pasikartojamumas nėra geras.

Tiesiniam koncentracijų intervalui nustatyti buvo ruošiama serija 7 skirtingų koncentracijų standartinių parabenų tirpalų, praskiedžiant distiliuotu vandeniu pradinį standartinį tirpalą. Smailių plotų priklausomybė nuo parabenų koncentracijos buvo tiesinė iki 10  $\mu\text{g/mL}$ . Kalibracinių kreivių koreliacijos koeficientų vertės buvo 0,996–0,997 ( $n=5$ ).

### 3.7 lentelė

Derivatizuotų parabenų aptikimo ribos ir rezultatų pasikartojamumas, atlikus METL iš viršerdvės

Analitė	Aptikimo riba, µg/L	s <sub>r</sub> , % (n = 5)	
		c = 1 µg/mL	c = 10 µg/mL
Metilparabenas	260	32,2	23,8
Etilparabenas	380	24,8	15,3
Propilparabenas	450	23,8	18,6
Butilparabenas	580	25,1	18,6

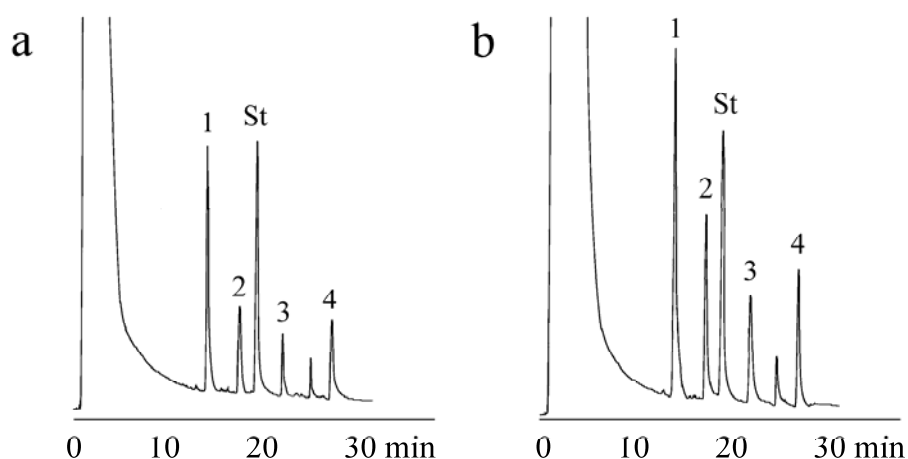
#### 3.1.3. Parabenų mikroekstrakcijos tirpiklio lašu praktinis pritaikymas

Palyginus tiesioginę derivatizuotų ir nederivatizuotų parabenų mikroekstrakciją tirpiklio lašu matyti (3.3 ir 3.5 lentelės), kad mažesnės aptikimo ribos gaunamos prieš ekstrakciją parabenus derivatizavus. Todėl realių mėginių analizei naudojome derivatizuotų parabenų mikroekstrakciją tirpiklio lašu.

Paruoštas derivatizuotų parabenų tiesioginės mikroekstrakcijos tirpiklio lašu metodas buvo pritaikytas veido toniko „Matt Touch“ (gamintojas Lumene, Suomija) analizei. Gamintojai nurodė, kad į šio toniko sudėtį įeina visi mūsų tirti parabenai (metilparabenas, etilparabenas, propilparabenas, butilparabenas) ir dar izobutilparabenas.

Neskiesto toniko išanalizuoti nepavyko, nes išstumtas iš mikrošvirkšto ekstrakto lašas nesilaikydavo pakibęs ant mikrošvirkšto adatos galiuko. Greičiausiai tai nulemdavo tonike esantis didelis etanolio kiekis. Todėl toniką skiedėme 100 kartų. Į 10 mL praskiesto toniko dėjome 0,2 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×3H<sub>2</sub>O, 10 µL acto rūgšties anhidrido ir 20 min ekstrahavome amilo acetatu (1 µL), turinčiu 0,5 µg/mL *n*-heksadekano. Ekstraktą leidome į dujų chromatografą analizei.

Paveiksle 3.15 (a) pateikta 100 kartų praskiesto toniko ekstrakto chromatograma. Joje gerai atsiskiria parabenų smailės. Norint įsitikinti, kad tai tikrai parabenų smailės, pakartojome ekstrakciją į 100 kartų praskiestą toniką įdėjus 5  $\mu\text{L}$  1 mg/mL standartinio parabenų tirpalo. Chromatogramoje, pateiktoje 3.15 (b) pav. matyti, kad naujų smailių neatsirado, tik padidėjo tiriamų parabenų smailės.



**3.15 pav.** Toniko (a) ir toniko su parabenų priedu (10  $\mu\text{g/mL}$ ) (b) chromatogramos: 1 – metilparabenas, 2 – etilparabenas, 3 – propilparabenas, 4 – butilparabenas, St – vidinis standartas (*n*-heksadekanas). Ekstrakcijos sąlygos: mėginio tūris 10 mL, parabenų koncentracija 1 mg/mL,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$  koncentracija 0,02 g/mL, acto rūgšties anhidrido tūris 10  $\mu\text{L}$ , ekstrahentas amilo acetatas, ekstrakcijos trukmė 20 min, tirpalo maišymo greitis 200 aps/min. Chromatografinės sąlygos pateiktos skyriuje „eksperimento metodika“.

Smailė, išeinanti chromatogramoje tarp propilparabeno ir butilparabeno smailių, greičiausiai yra izobutilparabeno, kadangi šakotieji izomerai, dažniausiai, chromatogramoje išeina anksčiau negu normalieji. Deja, neturėdami izobutilparabeno standarto, negalėjome jos identifikuoti.

Parabenų koncentracijos nustatytos priedų metodu. Apskaičiuota, kad tonike buvo 180 mg/L metilparabeno, 70 mg/L etilparabeno, 38 mg/L propilparabeno ir 60 mg/L butilparabeno.

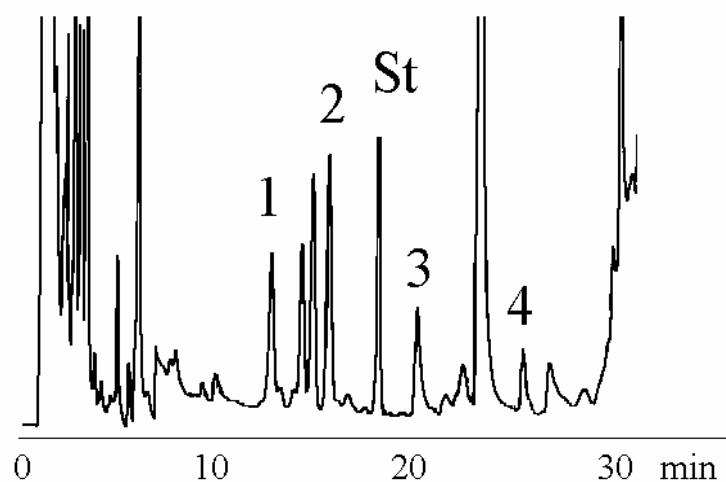
Kaip matyti iš aukščiau pateiktų rezultatų, tiesioginė mikroekstrakcija tirpiklio lašu puikiai tinka parabenams veido tonike nustatyti. Tačiau kai



mėginys nėra skystas, tiesioginė ekstrakcija tirpiklio lašu negalima. Todėl nustatinėjant parabenus kremuose teko panaudoti mažiau jautrų, bet atrankesnę mikroekstrakcijos tirpiklio lašu iš viršerdvės metodą.

Paruoštas derivatizuotų parabenų mikroekstrakcijos tirpiklio lašu iš viršerdvės metodas buvo pritaikytas rankų kremo su šaltalankių aliejumi „Margarita“ (gamintojas Biok, Lietuva) analizei. Gamintojai nurodė, kad į šio kremo sudėtį įeina visi mūsų tirti parabenai (metilparabenas, etilparabenas, propilparabenas, butilparabenas) ir dar izobutilparabenas.

Į ekstrakcinį indą buvo atsverta 1 g kremo, pripilta 10 mL distiliuoto vandens, suberta 2 g NaCl ir 0,2 g  $K_2HPO_4 \times 3H_2O$  bei sulašinta 10  $\mu L$  acto rūgšties anhidrido. Ekstrakcijai ėmėme 1  $\mu L$  ekstrahuojančio tirpiklio dioktilftalato su vidiniu standartu *n*-heksadekanu (0,5  $\mu g/mL$ ). Inkubavome 70 °C temperatūroje 20 min, ekstrahavome 70 °C temperatūroje 20 min, tirpalą maišėme 800 aps/min greičiu. Ekstrakto chromatograma pateikta 3.16 pav.



**3.16 pav.** Kremo „Margarita“ ekstrakto chromatograma: 1 – metilparabenas, 2 – etilparabenas, 3 – propilparabenas, 4 – butilparabenas, St – vidinis standartas (*n*-heksadekanas, 0,5  $\mu g/mL$ ). Ekstrakcijos sąlygos: mėginio kiekis 1 g,  $K_2HPO_4 \times 3H_2O$  koncentracija 0,02 g/mL, acto rūgšties anhidrido tūris 10  $\mu L$ , ekstrahentas dioktilftalatas, ekstrakcijos trukmė 20 min, inkubacijos trukmė 20 min, ekstrakcijos temperatūra 70 °C, tirpalo maišymo greitis 800 aps/min. Chromatografinės sąlygos pateiktos skyriuje „eksperimento metodika“.

Parabenu koncentracija nustatyta priedų metodu. Tam į ekstracini indą su kita porcija kremo įpilta 5 µL 1 mg/mL standartinio parabenu tirpalo ir ekstrahuota, kaip aprašyta aukščiau. Apskaičiuota, kad kreme buvo 284 µg/g metilparabeno, 320 µg/g etilparabeno, 213 µg/g propilparabeno ir 185 µg/g butilparabeno.

### **3.2. Parabenu skystafazė mikroekstrakcija kapiliare**

Parabenu ekstrakcijai nusprendėme pritaikyti ekologišką, mažai ekstrahento naudojančią skystafazės mikroekstrakcijos kapiliare metodą. Be to, šis metodas atrankus, nes ekstrahentą nuo mėginio skiria polipropileno kapiliaro sienelė, per sienelės poras į ekstraktą patenka tik palyginti mažos molekulės, o stambiamolekuliniai matricos komponentai ar kietos dalelės nepatenka į kapiliaro vidų.

Mūsų tyrimuose buvo naudojamas dviejų fazių skystafazės mikroekstrakcijos kapiliare būdas.

Tyrėme ekstrahuojančio tirpiklio prigimties, tirpalo maišymo greičio, ekstrakcijos trukmės bei druskų efekto įtaką parabenu skystafazės mikroekstrakcijos kapiliare efektyvumui.

#### **3.2.1. Nederivatizuotų parabenu skystafazė mikroekstrakcija kapiliare**

##### **3.2.1.1. Ekstrakcijos sąlygų optimizavimas**

###### ***Ekstrahuojančio tirpiklio prigimtis***

Pirmas žingsnis optimizuojant parabenu skystafaze mikroekstraciją kapiliare yra ekstrahuojančio tirpiklio parinkimas. Tinkamai parinkus ekstrahuojantį tirpiklį, pasiekiamas didelis ekstrakcijos atrankumas bei analitės smarkiai sukonzentruojamos. Ekstrahuojantis tirpiklis turi atitikti šiuos reikalavimus: gerai ekstrahuoti analites, netirpti vandenyje, pilnai užpildyti kapiliaro poras ir kapiliaro vidų, tirpiklio smailė chromatogramoje turi gerai

atsiskirti nuo analičių smailių ir būti suderinamas su dujų chromatografijos kolonėle.

Taip pat labai svarbios tirpiklio optinės savybės. Kai tirpiklio lūžio rodiklis artimas polipropileno lūžio rodikliui (1,49), tirpiklis gerai matomas kapiliare, taigi galima stebėti, ar kapiliaras gerai užpildytas. Kai tirpiklio lūžio rodiklis smarkiai skiriasi nuo polipropileno lūžio rodiklio, kapiliaras atrodo neskaidrus ir todėl sunku įvertinti, ar kapiliaras tirpikliu užsipildė tolygiai, ar nėra oro tarpų. Mūsų tikslas buvo parinkti tirpiklį, ne tik pasižymintį geromis ekstrahacinėmis savybėmis, bet ir gerai matomą kapiliare.

Parabenu ekstrahacijai išbandėme penkis skirtingus tirpiklius: anglies tetrachloridą, *n*-oktaną, amilo acetatą, tolueną ir chlorbenzeną. Fizikinės pasirinktų organinių tirpiklių savybės yra pateiktos 3.8 lentelėje.

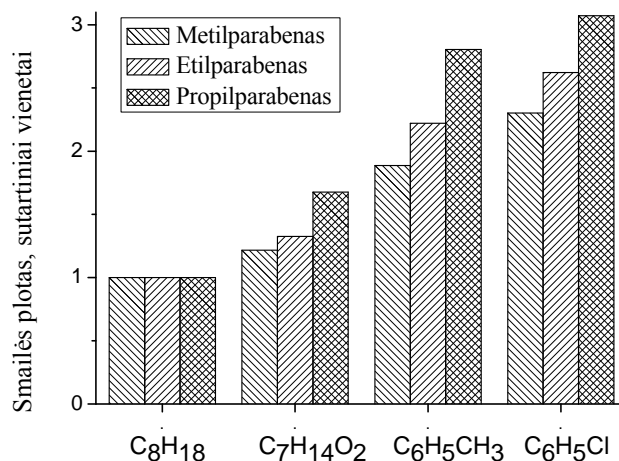
**3.8 lentelė**

Ekstrahuojančiųjų tirpiklių fizikinės savybės

<b>Tirpiklis</b>	<b>Virimo temperatūra, °C</b>	<b>Lūžio rodiklis</b>	<b>Tirpumas vandenyje, g/L</b>
Anglies tetrachloridas	76,5	1,460	0,8
<i>n</i> -Oktanas	126	1,398	0,007
Amilo acetatas	145,5	1,402	10
Toluenas	110,5	1,496	0,4
Chlorbenzenas	132	1,525	0,5
<i>o</i> -Ksilenas	144	1,505	0,18
1-Oktanolis	196	1,428	0,0003
Brombenzenas	156	1,559	0,4

Tyrimai parodė, kad anglies tetrachloridas netiko mikroekstrahacijai kapiliare. Po 15 min ekstrahacijos liko mažiau nei 1 µL tirpiklio. Greičiausiai jis yra per daug lakus (jo virimo temperatūra 76,5 °C) ir todėl gana greitai

išgaruoja pro atvirą kapiliaro galą. Ekstrakcijos efektyvumas ekstrahuojant kitais tirpikliais parodytas 3.17 pav.



**3.17 pav.** Parabenų chromatografinių smailių plotų priklausomybė nuo ekstrahuojančiojo tirpiklio prigimties. SFMEK sąlygos: mėginio tūris 8 mL, parabenų koncentracija 5 µg/mL, ekstrakcijos trukmė 15 min, tirpalo maišymo greitis 1500 aps/min. Chromatografinės sąlygos pateiktos skyriuje „eksperimento metodika“.

Naudojant *n*-oktaną ir amilo acetatą, ekstrakcijos efektyvumas buvo mažiausias. Be to, naudojant šiuos tirpiklius, buvo sunku užpildyti kapiliarą, nes jų lūžio rodikliai skiriasi nuo polipropileno lūžio rodiklio (1,49) ir kapiliaras atrodo neskaidrus. Priešingai, tirpikliais naudojant tolueną ar chlorbenzeną, kapiliaras tirpikliu pildėsi lengvai, užpildymo procesą buvo paprasta stebėti. Kadangi naudojant chlorbenzeną buvo pasiektas geriausias ekstrakcijos efektyvumas, jis buvo pasirinktas tolimesniam darbui kaip parabenų ekstrahentas.

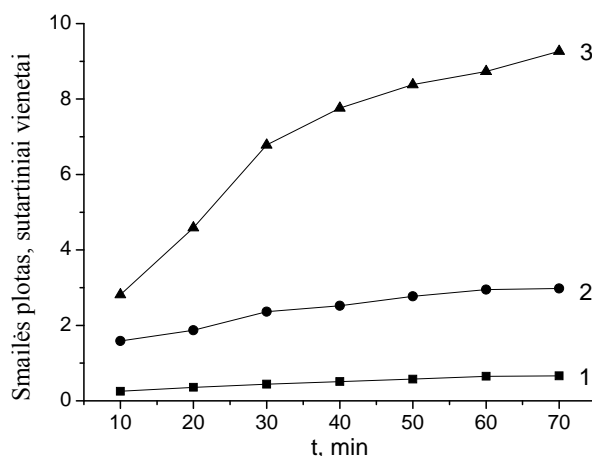
#### ***Tirpalo maišymo greitis***

Kaip jau buvo minėta literatūros apžvalgoje, kuo greičiau maišosi tirpalas, tuo greičiau nusistovi pusiausvyra tarp tiriamo vandeninio tirpalo ir kapiliare esančio ekstrahuojančio tirpiklio. Kadangi tirpiklis yra apsaugotas kapiliaro sienelių, tai galime naudoti greitesnę maišymą nebijodami,

kad prarasime tirpiklį. Parabenų nustatymui buvo naudotas didžiausias mūsų turima magnetine maišykle pasiekiamas maišymosi greitis – 1500 aps/min.

### ***Ekstrakcijos trukmė***

Maksimalus ekstrakcijos efektyvumas pasiekiamas, kai nusistovi pusiausvyra tarp ekstrahuojančio tirpiklio ir mėginio. Siekiant optimizuoti ekstrakcijos trukmę, ekstrakcija buvo atliekama nuo 10 iki 70 min. Tačiau kaip matyti iš 3.18 pav., net po 70 min ekstrakcijos, pusiausvyros nepavyko pasiekti. Kadangi galima dirbi nepusiausvyrinėmis sąlygomis, bet išlaikant pastovią ekstrakcijos trukmę, tolimesniam darbui pasirinkome 40 min ekstrakcijos trukmę, kurios pakako dideliame ekstrakcijos efektyvumui pasiekti.



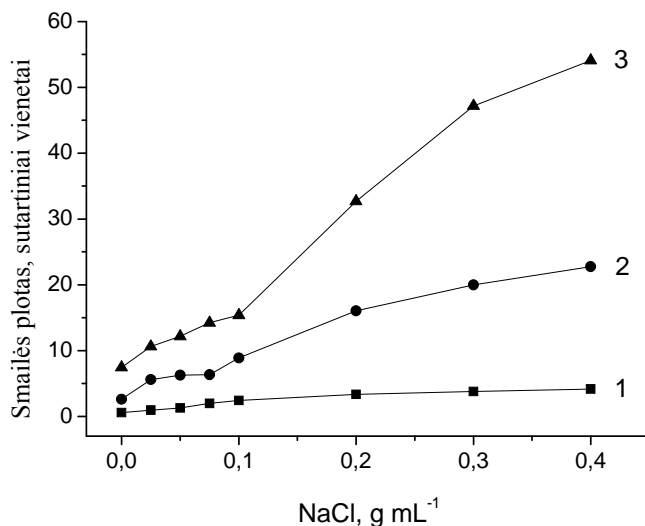
**3.18 pav.** Parabenų chromatografinių smailių plotų priklausomybė nuo ekstrakcijos trukmės: 1 – metilparabenas, 2 – etilparabenas, 3 – propilparabenas. SFMEK sąlygos: mėginio tūris 8 mL, parabenų koncentracija 5 µg/mL, ekstrahentas chlorbenzenas, tirpalo maišymo greitis 1500 aps/min. Chromatografinės sąlygos pateiktos skyriuje „eksperimento metodika“.

### ***Druskų koncentracija tirpale***

Druskų pridėjimas į vandeninį tirpalą gali įtakoti organinių junginių tirpumą vandenyje, o tuo pačiu ir ekstrakcijos efektyvumą. Druskų efekto įtakai patikrinti į tirpalą dėjome 0,1–0,4 g/mL NaCl. Pridėjus 0,4 g/mL NaCl gaunamas sotus tirpalas, dalis druskos lieka neištirpusi. Tačiau tai netrukde ekstrakcijai, nes ekstrahentą nuo tirpalo skyrė polipropileno kapiliaro sienelės,

NaCl kristaliukai į ekstrahentą nepateko ir nekilo pavojus, kad kliudys dujų chromatografinėi analizei.

Iš gautų rezultatų, pateiktų 3.19 pav., matyti, kad, didėjant tirpale NaCl kiekiui, analičių smaيليų plotai taip pat didėja, o didžiausias signalas pasiekiamas, kai tirpalas prisotintas NaCl. Todėl tolimesniam darbui į tirpalą buvo dedama 0,4 g/mL NaCl.



**3.19 pav.** Parabenu chromatografinių smaيليų plotų priklausomybė nuo NaCl kiekio: 1 – metilparabenas, 2 – etilparabenas, 3 – propilparabenas. SFMEK sąlygos: mėginio tūris 8 mL, parabenu koncentracija 5 μg/mL, ekstrahentas chlorbenzenas, ekstrakcijos trukmė 40 min, tirpalo maišymo greitis 1500 aps/min. Chromatografinės sąlygos pateiktos skyriuje „eksperimento metodika“.

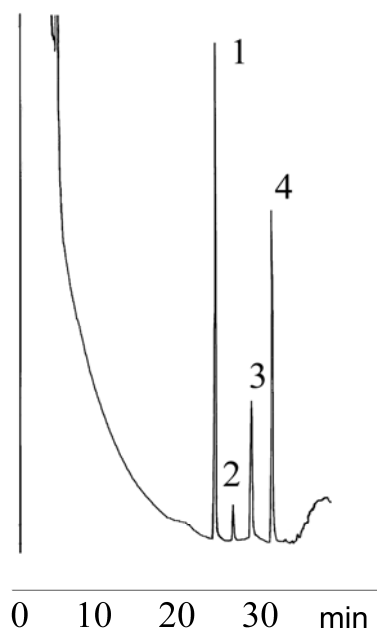
Optimalios parabenu skystafazės mikroekstrakcijos kapiliare sąlygos pateiktos 3.9 lentelėje.

**3.9 lentelė**

Parabenu SFMEK optimalios sąlygos

Parametras	Vertė
Ekstrahuojantis tirpiklis	Chlorbenzenas
Tirpalo maišymo greitis, aps/min	1500
Ekstrakcijos trukmė, min	40
NaCl kiekis, g/mL	0,4

Optimaliomis sąlygomis gauta standartinio parabenų mišinio chromatograma pateikta 3.20 pav.



**3.20 pav.** Standartinio parabenų tirpalo ekstrakto chromatograma: 1 – vidinis standartas (*n*-tetradekanas, 50 µg/mL), 2 – metilparabenas, 3 – etilparabenas, 4 – propilparabenas. SFMEK sąlygos: mėginio tūris 8 mL, parabenų koncentracija 5 µg/mL, ekstrahentas chlorbenzenas, ekstrakcijos trukmė 40 min, NaCl koncentracija 0,4 g/mL, tirpalo maišymo greitis 1500 aps/min. Chromatografinės sąlygos pateiktos skyriuje „eksperimento metodika“.

### 3.2.1.2. Metodo analizinės charakteristikos

Optimizavus parabenų skystafazės mikroekstrakcijos kapiliare sąlygas, nustatėme paruošto metodo pagrindines analizines charakteristikas: aptikimo ribas, tiesinius koncentracijų intervalus, rezultatų pasikartojamumą.

Aptikimo ribos pateiktos 3.10 lentelėje. Iš pateiktų rezultatų matyti, kad didžiausia aptikimo riba yra geriausiai vandenyje tirpaus metilparabeno, o mažiausia – propilparabeno.

Norėdami gauti kuo geriau pasikartojančius rezultatus, naudojome vidinį standartą. Vidiniu standartu pasirinkome *n*-tetradekaną, jo koncentracija chlorbenzene buvo 50 µg/mL. Rezultatų pasikartojamumas buvo įvertintas

dvejoms analičių koncentracijoms (1 ir 10 µg/mL). Skystafazė mikroekstrakcija kapiliare buvo atliekama 5 kartus. Analčių nustatymo rezultatų santykinų standartinių nuokrypių  $s_r$  vertės artimos ir neviršija 11,7 % (3.10 lentelė).

Tiesiniam koncentracijų intervalui nustatyti buvo ruošiama serija 7 skirtingų koncentracijų standartinių parabenų tirpalų, praskiedžiant distiliuotu vandeniu pradinį standartinį tirpalą. Smailių plotų priklausomybė nuo parabenų koncentracijos buvo tiesinė iki 30 mg/L. Kalibracinių kreivių koreliacijos koeficientų vertės buvo 0,996–0,998 (n=7).

### 3.10 lentelė

Parabenų aptikimo ribos ir rezultatų pasikartojamumas, atlikus SFMEK

Analitė	Aptikimo riba, µg/L	$s_r$ , % (n = 5)	
		c = 1 µg/mL	c = 10 µg/mL
Metilparabenas	200	11,7	8,1
Etilparabenas	30	9,0	6,5
Propilparabenas	10	7,6	9,4

#### 3.2.1.3. Metodo praktinis pritaikymas

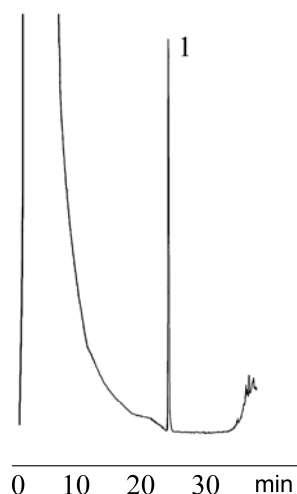
Paruoštas parabenų skystafazės mikroekstrakcijos kapiliare metodas buvo pritaikytas vandens iš laboratorijos čiaupo ir šlapimo analizei.

Vandentiekio vanduo buvo analizuojamas tuoj pat po paėmimo, be jokio papildomo paruošimo. Analizės rezultatai parodė, kad vandenyje nėra parabenų arba jų koncentracijos mažesnės už aptikimo ribas (3.21 pav).

Vandentiekio vandens matricos efektui įvertinti į 8 mL vandens buvo pridėta po 0,1, 1 ir 2 µg/mL parabenų. Po ekstrakcijos parabenų koncentracijos buvo rastos naudojant distiliuotame vandenyje pagamintų parabenų tirpalų kalibracines kreives. Palyginimui buvo ekstrahuojami tokių pačių koncentracijų parabenų tirpalai distiliuotame vandenyje. Ekstrakcijos išgavos



buvo apskaičiuojamos kaip santykis parabenų koncentracijų čiaupo vandenyje su parabenų koncentracijomis distiliuotame vandenyje. Iš 3.11 lentelėje pateiktų duomenų matyti, kad vandentiekio vandens matrica neturi įtakos ekstrakcijos išgavai. Rezultatų pasikartojamumas artimas gautam ekstrahuojant distiliuotame vandenyje gamintus parabenų tirpalus (3.10 lentelė).



**3.21 pav.** Vandentiekio vandens ekstrakto chromatograma: 1 – vidinis standartas (*n*-tetradekanas, 50 µg/mL). SFMEK sąlygos: mėginio tūris 8 mL, ekstrahentas chlorbenzenas, ekstrakcijos trukmė 40 min, NaCl koncentracija 0,4 g/mL, tirpalo maišymo greitis 1500 aps/min. Chromatografinės sąlygos pateiktos skyriuje „eksperimento metodika“.

**3.11 lentelė**

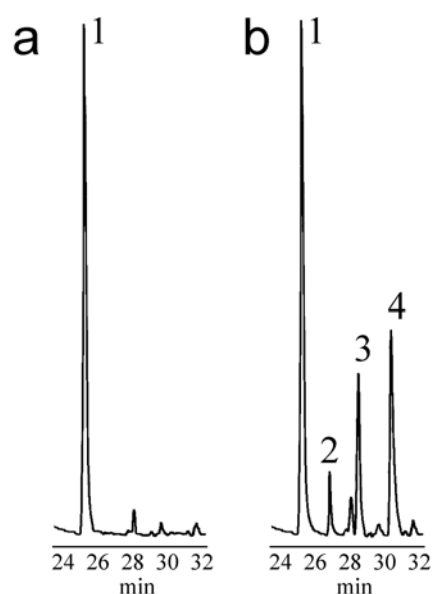
Parabenų ekstrakcijos iš vandentiekio vandens išgavos

Analitė	Priedo kiekis, µg/mL	Išgava, %	s <sub>r</sub> , % (n = 5)
Metilparabenas	1	95,9	9,1
	2	98,3	10,0
Etilparabenas	0,1	96,2	13,1
	1	100,8	8,4
	2	104,1	6,8
Propilparabenas	0,1	96,3	11,1
	1	96,6	8,1
	2	102,7	6,9

Parabenai linkę sorbuotis į žmogaus odą iš įvairių kosmetinių priemonių ir yra nustatyti žmogaus šlapime [9]. Tačiau šlapimas yra daug sudėtingesnė matrica nei vanduo ir paprastai šlapimo mėginio paruošimas analizei reikalauja daugiau procedūrų. Mes tikėjomės, kad mūsų siūlomas skystafazės mikroekstrakcijos kapiliare metodas leis analizuoti šlapimą be papildomo mėginio paruošimo.

Preliminarūs tyrimai parodė, kad ekstraktas yra bespalvis ir skaidrus, o parabenų smailių chromatogramoje nėra (3.22 (a) pav.).

Matricos efekto įvertinimui buvo analizuojamas šlapimas su 0,1, 1 ir 2  $\mu\text{g/mL}$  parabenų priedu. Po ekstrakcijos parabenų koncentracijos buvo apskaičiuotos iš kalibracinės kreivės, gautos naudojant parabenų tirpalus distiliuotame vandenyje. Iš 3.12 lentelėje pateiktų duomenų matyti, kad iš šlapimo parabenai išekstrahuojami žymiai blogiau, negu iš vandens. Santykinės išgavos siekia vos 55,9–67,7 %.



**3.22 pav.** Šlapimo ekstrakto (a) ir šlapimo su 1  $\mu\text{g/mL}$  parabenų priedu ekstrakto (b) chromatogramos: 1 – vidinis standartas (*n*-tetradekanas, 50  $\mu\text{g/mL}$ ) 2 – metilparabenas, 3 – etilparabenas, 4 – propilparabenas. SFMEK sąlygos: mėginio tūris 8 mL, ekstrahentas chlorbenzenas, ekstrakcijos trukmė 40 min, NaCl koncentracija 0,4 g/mL, tirpalo maišymo greitis 1500 aps/min. Chromatografinės sąlygos pateiktos skyriuje „eksperimento metodika“.

Siekiant panaikinti trukdantį šlapimo matricos efektą, parabenus nustatinėjome standartinių priedų metodu. Į šlapimą dar kartą buvo pridedama 0,1, 1 ir 2 µg/mL parabenų. Standartinių priedų metodu gautos ekstrakcijos išgavos siekė 96,6–104,1 % (3.12 lentelė), taigi buvo artimos parabenų ekstrakcijos iš vandentiekio vandens išgavoms.

**3.12 lentelė**

Parabenų ekstrakcijos iš šlapimo išgavos

Analitė	Priedo kiekis, µg/mL	Kalibracinės kreivės metodas		Standartinių priedų metodas	
		Išgava, %	s <sub>r</sub> , % (n = 5)	Išgava, %	s <sub>r</sub> , % (n = 5)
Metilparabenas	1	55,9	9,1	101,8	13,0
	2	58,3	10,0	97,0	12,2
Etilparabenas	0,1	57,5	11,2	96,9	12,5
	1	60,8	8,4	96,6	10,2
	2	64,1	6,8	100,5	8,8
Propilparabenas	0,1	58,6	9,8	102,9	9,5
	1	65,6	8,1	104,1	8,2
	2	67,7	6,9	99,2	9,6

### 3.2.2. Derivatizuotų parabenų skystafazė mikroekstrakcija kapiliare

#### 3.2.2.1. Ekstrakcijos sąlygų optimizavimas

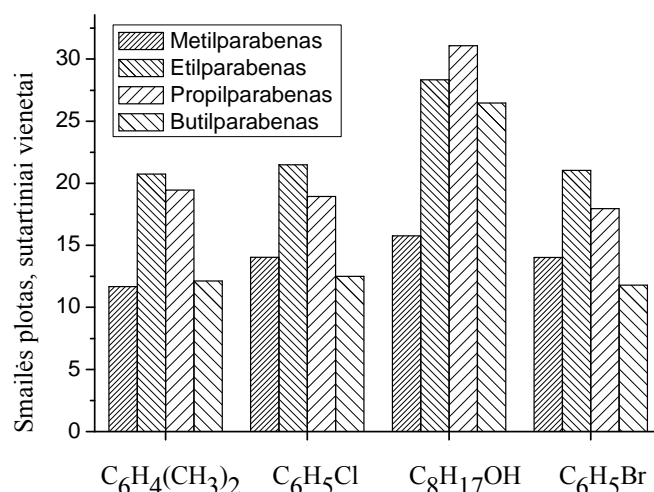
Siekiant padidinti parabenų ekstrakcijos efektyvumą ir nustatymo jautrį parabenus derivatizavome. Derivatizacijos sąlygų optimizavimas ir pH įtaka parabenų derivatizacijai pateikti 3.1.2.1. skyriuje.

#### *Ekstrahuojančio tirpiklio prigimtis*

Derivatizuotų parabenų ekstrakcijai išbandėme keturis tirpiklius, kurie atitinka SFMEK metodo reikalavimus ekstrahuojantiems tirpikiams.

Tai *o*-ksilenas, chlorbenzenas, 1-oktanolis ir brombenzenas. Fizikinės pasirinktų organinių tirpiklių savybės yra pateiktos 3.8 lentelėje.

Atliekant pradinius tyrimus ekstrahavome 20 min. Kaip matyti iš 3.23 pav. pateiktų rezultatų, geriausiai parabenus ekstrahavo 1-oktanolis. Tačiau šis tirpiklis buvo beveik nematomas kapiliare, o tai gana didelis trūkumas, ribojantis jo panaudojimą ekstrahuojančiu tirpikliu. 1-Oktanolio lūžio rodiklis yra 1,428, taigi smarkiai skiriasi nuo polipropileno lūžio rodiklio (1,49). Todėl tolimesniam darbui nusprendėme 1-oktanolio nesirinkti.



**3.23 pav.** Parabenu chromatografinių smailių plotų priklausomybė nuo ekstrahuojančiojo tirpiklio prigimties. SFMEK sąlygos: mėginio tūris 10 mL, parabenu koncentracija 10 mg/L,  $K_2HPO_4 \times 3H_2O$  koncentracija 0,02 g/mL, acto rūgšties anhidrido tūris 10  $\mu$ L, ekstrakcijos trukmė 20 min, tirpalo maišymo greitis 800 aps/min. Chromatografinės sąlygos pateiktos skyriuje „eksperimento metodika“.

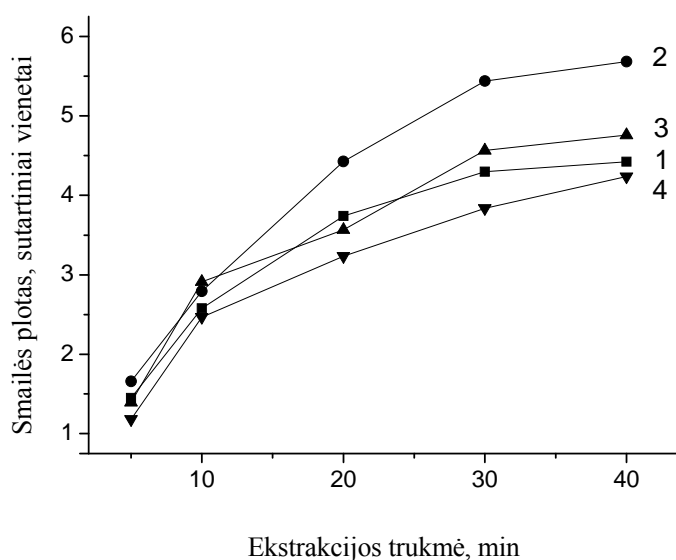
*o*-Ksilenas, chlorbenzenas ir brombenzenas kapiliare buvo gerai matomi. Parabenus jie ekstrahavo panašiai. Tolimesniam darbui ekstrahentu nusprendėme pasirinkti chlorbenzeną. Jo virimo temperatūra mažesnė negu brombenzeno bei *o*-ksileno, todėl smailė išeina greičiau ir todėl geriau atsiskiria nuo parabenu smailių. Antra vertus, chlorbenzeno lakumas ir tirpumas vandenyje pakankamai maži, kad chlorbenzenas liktų kapiliare ekstrakcijai reikalingą laiką.

### ***Tirpalo maišymo greitis***

Parabenu nustatymui buvo pasirinktas 800 aps/min maišymo greitis.

### ***Ekstrakcijos trukmė***

Siekiant optimizuoti ekstrakcijos trukmę, ekstrakcija buvo atliekama nuo 5 iki 40 min. Kaip matyti iš 3.24 pav., po 30 min ekstrakcijos analičių smailių plotai keičiasi nedaug. Todėl tolimesniam darbui pasirinkome 30 min ekstrakcijos trukmę, kurios pakako pasiekti maksimalų ekstrakcijos efektyvumą be analizės laiko pailginimo.

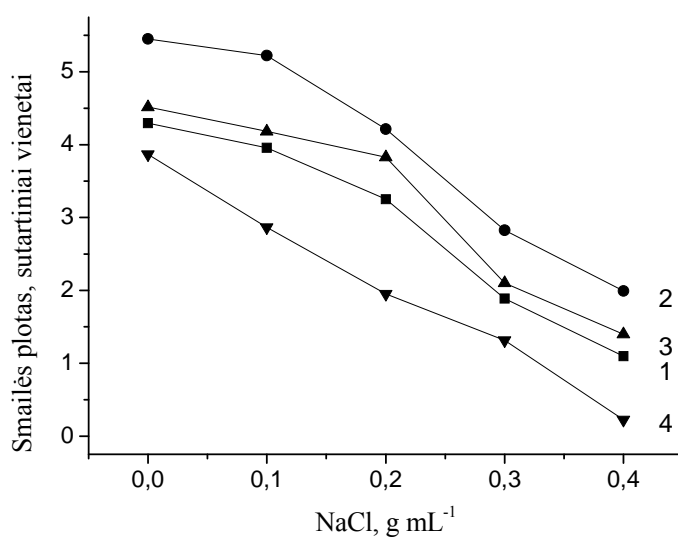


**3.24 pav.** Parabenu chromatografinių smailių plotų priklausomybė nuo ekstrakcijos trukmės: 1 – metilparabenas, 2 – etilparabenas, 3 – propilparabenas, 4 – butilparabenas. SFMEK sąlygos: mėginio tūris 10 mL, parabenu koncentracija 10 mg/L,  $K_2HPO_4 \times 3H_2O$  koncentracija 0,02 g/mL, acto rūgšties anhidrido tūris 10  $\mu$ L, ekstrahentas chlorbenzenas, tirpalo maišymo greitis 800 aps/min. Chromatografinės sąlygos pateiktos skyriuje „eksperimento metodika“.

### ***Druskų koncentracija tirpale***

Druskų efekto įtakai patikrinti naudojome 0–0,4 g/mL NaCl. Kaip matyti iš 3.25 pav. pateiktų rezultatų, didžiausi smailių plotai gaunami nepridėjus NaCl. Dedant druską ekstrakcijos efektyvumas sumažėja greičiausiai todėl, kad

sumažėja analičių difuzija dėl pakitusių sąlyčio paviršiaus tarp organinės fazės ir vandeninės fazės savybių. Tolimesniame darbe į mėginius NaCl nedėjome.



**3.25 pav.** Parabenų chromatografinių smailių plotų priklausomybė nuo NaCl kiekio: 1 – metilparabenas, 2 – etilparabenas, 3 – propilparabenas, 4 – butilparabenas. SFMEK sąlygos: mėginio tūris 10 mL, parabenų koncentracija 10 mg/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×3H<sub>2</sub>O koncentracija 0,02 g/mL, acto rūgšties anhidrido tūris 10 μL, ekstrahentas chlorbenzenas, ekstrakcijos trukmė 30 min, tirpalo maišymo greitis 800 aps/min. Chromatografinės sąlygos pateiktos skyriuje „eksperimento metodika“.

Optimalios derivatizuotų parabenų skystafazės mikroekstrakcijos kapiliare sąlygos pateiktos 3.13 lentelėje.

**3.13 lentelė**

Derivatizuotų parabenų SFMEK optimalios sąlygos

Parametras	Vertė
Ekstrahuojantis tirpiklis	Chlorbenzenas
Tirpalo maišymo greitis, aps/min	800
Ekstrakcijos trukmė, min	30
NaCl kiekis, g/mL	Nėra

### 3.2.2.2. Metodo analizinės charakteristikos

Optimizavus derivatizuotų parabenų skystafazės mikroekstrakcijos kapiliare sąlygas, nustatėme paruošto metodo pagrindines analizes charakteristikas: aptikimo ribas, tiesinius koncentracijų intervalus, rezultatų pasikartojamumą.

Metodo aptikimo ribos (3.14 lentelė) visoms analitėms yra artimos 5,1–18  $\mu\text{g/L}$ . Tačiau jos yra žemesnės nei gautos naudojant nederivatizuotų parabenų SFMEK metoda.

Vidiniu standartu pasirinkome *n*-heksadekaną, jo koncentracija chlorbenzene buvo 10  $\mu\text{g/mL}$ . Rezultatų pasikartojamumas buvo įvertintas dvejoms analičių koncentracijoms (0,1 ir 1  $\mu\text{g/mL}$ ). Skystafazė mikroekstrakcija kapiliare buvo atliekama 5 kartus. Analičių nustatymo rezultatų santykinų standartinių nuokrypių  $s_r$ , vertės pateiktos 3.14 lentelėje. Kaip matyti iš lentelėje pateiktų duomenų, rezultatai geriau pasikartoja ir neviršija 5,6 %, kai analičių koncentracijos didesnės. Kai analičių koncentracijos 0,1  $\mu\text{g/mL}$ , santykinis standartinis nuokrypis siekia iki 9,2 %.

#### 3.14 lentelė

Derivatizuotų parabenų aptikimo ribos ir rezultatų pasikartojamumas, atlikus SFMEK

Analitė	Aptikimo riba, $\mu\text{g/L}$	$s_r$ , % ( $n = 5$ )	
		$c = 0,1 \mu\text{g/mL}$	$c = 1 \mu\text{g/mL}$
Metilparabenas	18	8,9	5,2
Etilparabenas	9,1	4,5	5,3
Propilparabenas	6,4	7,7	5,6
Butilparabenas	5,1	9,2	5,5

Tiesiniam koncentracijų intervalui nustatyti buvo ruošiama serija 7 skirtingų koncentracijų standartinių parabenu tirpalų, praskiedžiant distiliuotu vandeniu pradinį standartinį tirpalą. Smailių plotų priklausomybė nuo parabenu koncentracijos buvo tiesinė nuo 30, 15, 11 ir 9  $\mu\text{g/L}$  iki 10  $\text{mg/L}$  atitinkamai metilparabenui, etilparabenui, propilparabenui ir butilparabenui. Kalibracinių kreivių koreliacijos koeficientų vertės buvo 0,997–0,999 ( $n=5$ ).

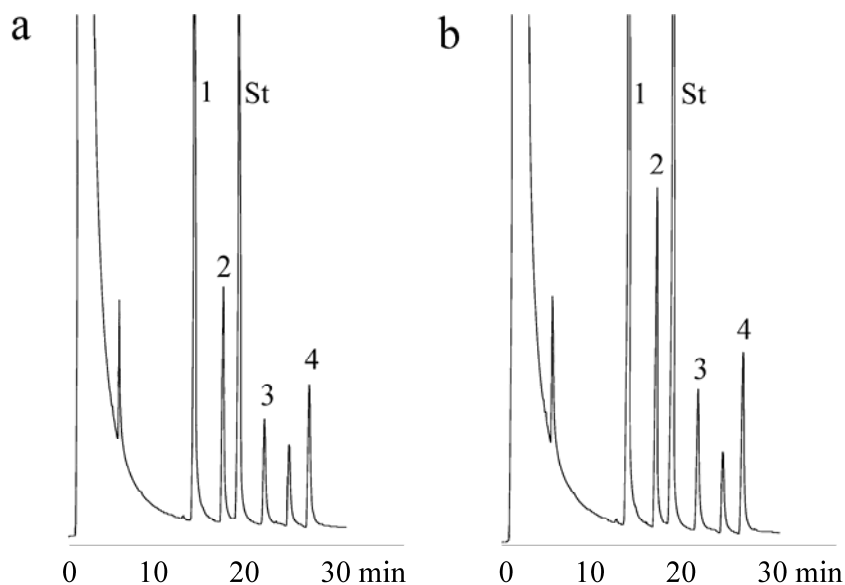
### 3.2.2.3. Metodo praktinis pritaikymas

Paruoštas derivatizuotų parabenu skystafazės mikroekstrakcijos kapiliare metodas buvo pritaikytas veido toniko „Matt Touch“ (gamintojas Lumene, Suomija) analizei. Gamintojai nurodė, kad į šio toniko sudėtį įeina visi mūsų tirti parabenai (metilparabenas, etilparabenas, propilparabenas, butilparabenas) ir dar izobutilparabenas.

Pirmiausiai, analizavome toniką be jokio papildomo paruošimo. Tam į 10 mL toniko dėjome 0,2 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$  bei 10  $\mu\text{L}$  acto rūgšties anhidrido ir 30 min ekstrahavome skystafazės mikroekstrakcijos kapiliare metodu, ekstrahentu naudojant chlorbenzeną, turintį 10  $\mu\text{g/mL}$  *n*-heksadekano. Vieną  $\mu\text{L}$  ekstrakto leidome į dujų chromatografą analizei.

Chromatografinė analizė parodė, kad toniko ekstrakto parabenu koncentracijos tokios didelės, jog nepateko į tiesinę kalibracinės kreivės sritį. Be to, chromatogramoje buvo daug mažesnių kitų medžiagų smailių, išeinančių greta parabenu smailių. Taigi toniką teko skiesti. Paveiksle 3.26 (a) pateikta 100 kartų praskiesto toniko ekstrakto chromatograma. Joje gerai atsiskiria parabenu smailės. Norint įsitikinti, kad tai tikrai parabenu smailės, pakartojome ekstrakciją į 100 kartų praskiestą toniką įdėjus standartinio parabenu tirpalo. Chromatogramoje, pateiktoje 3.26 (b) pav. matyti, kad naujų smailių neatsirado, tik padidėjo tiriamų parabenu smailės.





**3.26 pav.** Toniko (a) ir toniko su parabenų priedu (0,5 mg/L) (b) chromatogramos: 1 – metilparabenas, 2 – etilparabenas, 3 – propilparabenas, 4 – butilparabenas, St – vidinis standartas (*n*-heksadekanas). SFMEK sąlygos: mėginio tūris 10 mL,  $K_2HPO_4 \times 3H_2O$  koncentracija 0,02 g/mL, acto rūgšties anhidrido tūris 10  $\mu$ L, ekstrahentas chlorbenzenas, ekstrakcijos trukmė 30 min, tirpalo maišymo greitis 800 aps/min. Chromatografinės sąlygos pateiktos skyriuje „eksperimento metodika“.

Kalibracinės kreivės metodu buvo apskaičiuotos parabenų koncentracijos. Pasirodė kad tonike buvo: 168 mg/L metilparabeno, 59 mg/L etilparabeno, 33 mg/L propilparabeno ir 53 mg/L butilparabeno.

### 3.3. Parabenų dispersinė skysčių-skysčių mikroekstrakcija

Literatūros apžvalga parodė, kad dispersinė skysčių-skysčių mikroekstrakcija yra paprastas, greitas, pigus ir mažai organinių tirpiklių reikalaujantis ekstrakcijos metodas. Tolimesnių mūsų tyrimų tikslas buvo ištirti parabenų DSSME galimybes. Tyrėme ekstrahuojančio tirpiklio prigimties ir kiekio, disperguojančio tirpiklio kiekio, ekstrakcijos trukmės bei druskų efekto įtaką parabenų dispersinės skysčių-skysčių mikroekstrakcijos efektyvumui. DSSME atliekama iš vandeninių tirpalų.

### 3.3.1. Nederivatizuotų parabenų dispersinė skysčių-skysčių mikroekstrakcija

#### 3.3.1.1. Ekstrakcijos sąlygų optimizavimas

##### *Ekstrahuojančio tirpiklio prigimtis*

Kaip jau buvo minėta literatūros apžvalgoje, dispersinėje skysčių-skysčių mikroekstrakcijoje naudojamo ekstrahuojančio tirpiklio tankis turi būti didesnis negu vandens, tirpiklis turi gerai ekstrahuoti analites ir blogai tirpti vandenyje bei nekenkti chromatografinėi kolonėlei. Šiuos reikalavimus atitinka dauguma halogenintų tirpiklių, todėl parabenų ekstrakcijai buvo išbandyti chloroformas, anglies tetrachloridas, chlorbenzenas, brombenzenas ir 1,2-dichlorbenzenas. Fizikinės pasirinktų organinių tirpiklių savybės yra pateiktos 3.15 lentelėje.

3.15 lentelė

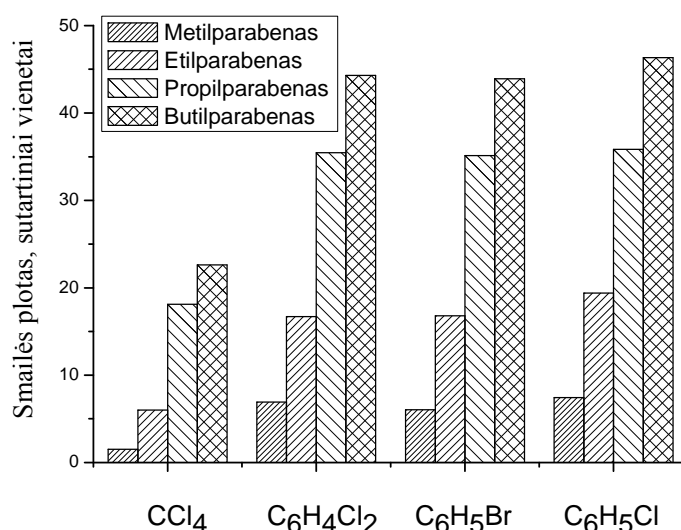
Ekstrahuojančiųjų tirpiklių fizikinės savybės

<b>Tirpiklis</b>	<b>Virimo temperatūra, °C</b>	<b>Tankis, g/mL</b>	<b>Tirpumas vandenyje, g/L</b>
Chloroformas	61	1,48	8
Anglies tetrachloridas	76,5	1,594	0,8
Chlorbenzenas	132	1,106	0,5
Brombenzenas	156	1,491	0,4
1,2-Dichlorbenzenas	179	1,306	0,15
Etilbenzotas	212	1,045	0,72

Siekiant pasirinkti tinkamą ekstrahuojantį tirpiklį, į 8 mL vandeninio mėginio, turinčio po 10 mg/L parabenų, buvo greitai suleistas mišinys, susidedantis iš 0,5 mL acetono (disperguojantis tirpiklis) ir 40 µL ekstrahuojančiojo tirpiklio. Susidariusi emulsija centrifuguojama ir po to 1 µL kūginio mėgintuvėlio dugne nusėdusios organinės fazės buvo paimamas

mikrošvirkštu ir suleidžiamas į dujų chromatografo garintuvą. Po centrifugavimo paaiškėjo, kad chloroformas yra netinkamas parabenų ekstrakcijai, nes šis tirpiklis yra gana tirpus vandenyje (8 g/L) ir dėl to po centrifugavimo nesusiformavo organinės fazės sluoksnis.

Kaip matyti iš 3.27 pav., ekstrakcijos efektyvumas naudojant  $\text{CCl}_4$  buvo žymiai mažesnis, negu naudojant halogenintus aromatinius tirpiklius ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}$ ,  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Br}$  ir  $\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_2$ ). Tai gerai atitinka principą „panašus tirpina panašų“, kadangi parabenai taip pat turi aromatinį žiedą. Brombenzeno ir 1,2-dichlorbenzeno sulaikymo trukmės yra labai artimos metilparabeno sulaikymo trukmei, dėl to šių tirpiklių smailės chromatogramoje uždengia metilparabeno smailę.



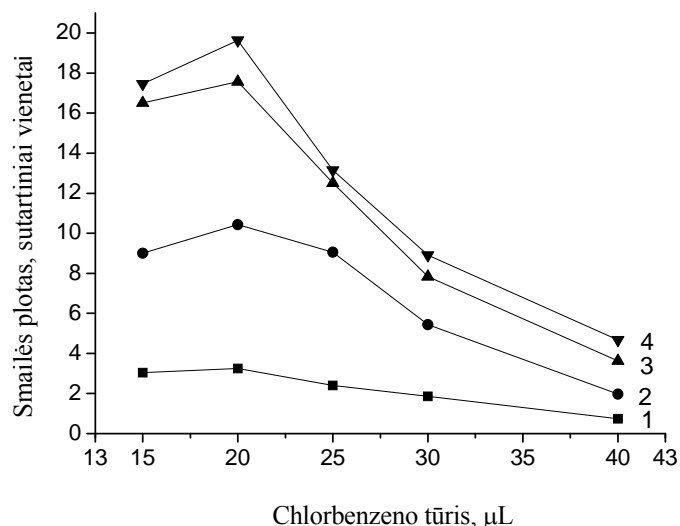
**3.27 pav.** Parabenų chromatografinių smailių plotų priklausomybė nuo ekstrahuojančiojo tirpiklio prigimties. DSSME sąlygos: mėginio tūris 8 mL, parabenų koncentracija 10 mg/L, acetono tūris 0,5 mL, ekstrahento tūris 40  $\mu\text{L}$ . Centrifuguota 2 min 5000 aps/min greičiu. Chromatografinės sąlygos pateiktos skyriuje „eksperimento metodika“.

Dėl geriausio chromatografinio perskyrimo ir gero ekstrakcijos efektyvumo tolimesniam darbiui ekstrahuojančiu tirpikliu buvo pasirinktas chlorbenzenas.

### *Ekstrahuojančio tirpiklio kiekis*

Pasirinkę tinkamiausią ekstrahuojantį tirpiklį, optimizavome jo kiekį. Tam į 8 mL vandeninio mėginio, turinčio po 10 mg/L parabenų, buvo greitai suleistas fiksuoto tūrio disperguojančio tirpiklio (0,5 mL acetono) ir įvairių chlorbenzeno tūrių (10–40  $\mu$ L) mišinys. Susidariusi emulsija centrifuguojama.

Analizei imamas ne visas ekstraktas, o tik 1  $\mu$ L, todėl kuo didesnis bendras ekstrakto tūris, tuo mažesnę dalį išekstrahuotų analičių paimame analizei. Iš gautų rezultatų (3.28 pav.) matyti, kad didinant ekstrahuojančio tirpiklio tūrį, didėjo ir smailių plotai. Didžiausi smailių plotai buvo gauti, kai chlorbenzeno tūris buvo 20  $\mu$ L.



**3.28 pav.** Parabenų chromatografinių smailių plotų priklausomybė nuo chlorbenzeno tūrio: 1 – metilparabenas, 2 – etilparabenas, 3 – propilparabenas, 4 – butilparabenas. DSSME sąlygos: mėginio tūris 8 mL, parabenų koncentracija 10 mg/L, acetono tūris 0,5 mL. Centrifuguota 2 min 5000 aps/min greičiu. Chromatografinės sąlygos pateiktos skyriuje „eksperimento metodika“.

Paveiksle nepateikti duomenys, gauti naudojant 10  $\mu$ L chlorbenzeno tūrį. Taip yra dėl to, kad sedimentacinės fazės tūris buvo labai mažas ir analizei nepavyko paimti net 1  $\mu$ L ekstrakto. Naudojant 15  $\mu$ L chlorbenzeno, smailių plotai buvo mažesni greičiausiai todėl, kad dalis ekstrahento nusėdo ant mėgintuvėlio sienelių. Dėl šios priežasties mėgintuvėlio dugne susikaupusios

organinės fazės tūris buvo mažas ir į mikrošvirkštą drauge su organine faze patekdavo šiek tiek vandeninės fazės. Taigi realus organinės fazės tūris buvo mažesnis nei 1  $\mu\text{L}$ . Antra vertus, kai chlorbenzeno tūris buvo didesnis nei 20  $\mu\text{L}$ , mažėjo analičių koncentracija organinėje fazėje ir mažėjo analičių smailių plotai. Norint gauti žemas aptikimo ribas, tolimesniam darbui buvo pasirinktas 20  $\mu\text{L}$  chlorbenzeno tūris.

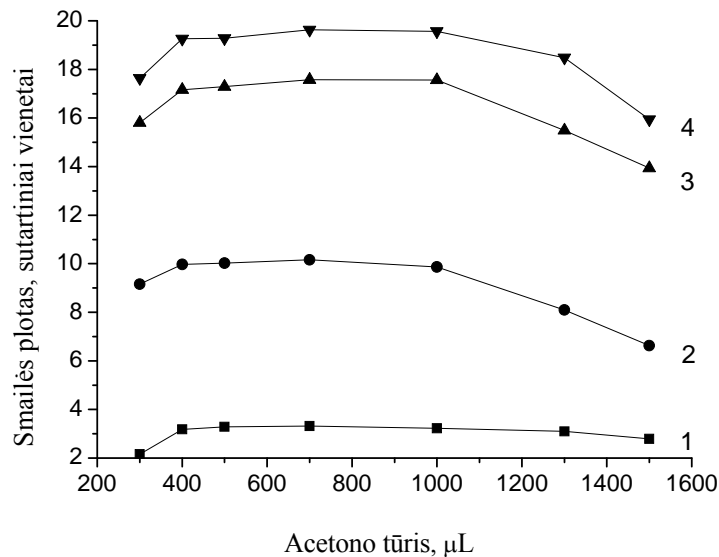
### ***Disperguojantis tirpiklis***

Svarbiausias kriterijus pasirenkant disperguojantį tirpiklį – jis turi gerai maišytis su ekstrahuojančiu tirpikliu ir vandeningoje faze. Kadangi tik nedaugelis medžiagų maišosi tiek su organine faze, tiek su vandeniu, disperguojančio tirpiklio pasirinkimas nėra platus. Daugumoje publikacijų DSSME tema disperguojančiais tirpikliais siūlomi acetonas, acetonitrilas ir metanolis [47]. Pagal publikacijose pateiktus rezultatus naudojant šiuos disperguojančius tirpiklius ekstrakcijos išgavos ir rezultatų pasikartojamumai mažai skiriasi. Remiantis šiais duomenimis ir atsižvelgiant į mažą tirpiklio kainą bei toksiškumą, disperguojančiu tirpikliu buvo pasirinktas acetonas.

Labai svarbu nustatyti optimalų acetono tūrį, reikalingą dispersinei sistemai gauti. Kuo smulkesni lašeliai, tuo didesnis fazių sąlyčio paviršiaus plotas, tuo greitesni masių mainai ir tuo mažesnė mikroekstrakcijos trukmė. Tyrėme ekstrakcijos efektyvumo priklausomybę nuo disperguojančio tirpiklio tūrio. Naudojome 0,2–1,5 mL acetono, išlaikant pastovų ekstrahuojančio tirpiklio (chlorbenzeno) tūrį (20  $\mu\text{L}$ ).

Kaip matyti iš 3.29 pav., pradžioje didėjant acetono tūriui, smailių plotai didėja. Tai, greičiausiai, galima paaiškinti tuo, kad esant mažam acetono kiekiui emulsija nestabili ir ekstrakcija vykta nepilnai. Antra vertus, kai acetono kiekis didesnis nei 1,0 mL, analičių smailių plotai sumažėjo. Tai būtų galima paaiškinti tuo, kad dėl vandeninėje fazėje ištirpusio didelio acetono kiekio sumažėjo analičių pasiskirstymo tarp organinės ir vandeninės fazių koeficientai. Todėl optimalus acetono tūris yra 0,4–1,0 mL. Tolimesniam

darbui naudojome mišinį, sudarytą iš 480  $\mu\text{L}$  acetono ir 20  $\mu\text{L}$  chlorbenzeno. Tokį acetono kiekį pasirinkome tam, kad į mėginį būtų leidžiamas 500  $\mu\text{L}$  mišinio tūris. Medicininis švirkštas sugraduotas kas 100  $\mu\text{L}$ , todėl 500  $\mu\text{L}$  galima paimti tiksliau, negu pvz. 520  $\mu\text{L}$  (toks mišinio tūris būtų jei optimaliu acetono tūriu pasirinktume 500  $\mu\text{L}$ ).



**3.29 pav.** Parabenu chromatografinių smailių plotų priklausomybė nuo disperguojančio tirpiklio (acetono) tūrio: 1 – metilparabenas, 2 – etilparabenas, 3 – propilparabenas, 4 – butilparabenas. DSSME sąlygos: mėginio tūris 8 mL, parabenu koncentracija 10 mg/L, ekstrahento (chlorbenzeno) tūris 20  $\mu\text{L}$ . Centrifuguota 2 min 5000 aps/min greičiu. Chromatografinės sąlygos pateiktos skyriuje „eksperimento metodika“.

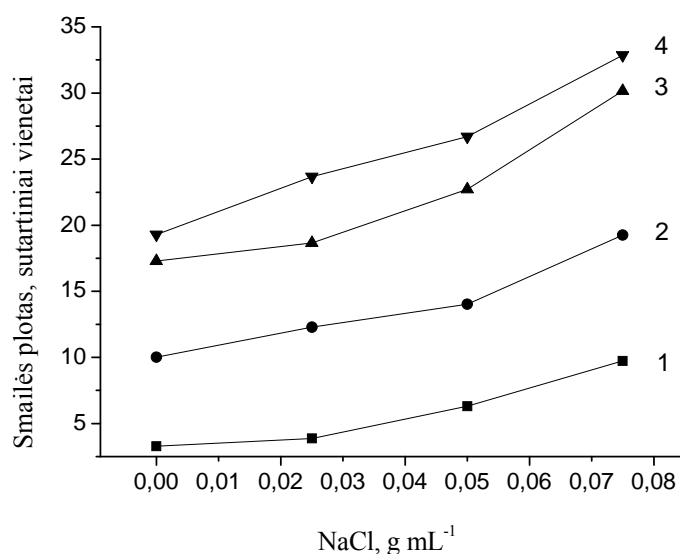
### ***Ekstrakcijos trukmė***

Dispersinės skysčių-skysčių mikroekstrakcijos trukmė – tai trukmė nuo disperguojančio ir ekstrahuojančio tirpiklių mišinio įleidimo į analizuojamąjį tirpalą iki centrifugavimo. Buvo iširta DSSME ekstrakcijos trukmė iki 20 min. Smailių plotų pakitimų esant skirtingoms ekstrakcijos trukmėms nebuvo pastebėta. Todėl galime teigti, kad smailių plotai nuo ekstrakcijos trukmės nepriklauso. Taip greičiausiai yra todėl, kad organinės ir vandeninės fazių sąlyčio paviršiaus plotas yra didelis, todėl 20–30 sekundžių (tiek užtrunkama

nuo mišinio įleidimo iki centrifugavimo pradžios) pakanka ekstrakcijos procesui įvykti.

### ***Druskų koncentracija tirpale***

Dar vienas svarbus DSSME efektyvumą įtakojantis parametras yra druskų koncentracija tirpale. Druskų efekto įtakai patikrinti mes pasirinkome dažniausiai mikroekstrakcijos metuose naudojamą NaCl.



**3.30 pav.** Parabenu chromatografinių smailių plotų priklausomybė nuo NaCl kiekio. 1 – metilparabenas, 2 – etilparabenas, 3 – propilparabenas, 4 – butilparabenas. DSSME sąlygos: mėginio tūris 8 mL, parabenu koncentracija 10 mg/L, ekstrahento (chlorbenzeno) tūris 20 μL, acetono tūris 0,48 mL. Centrifuguota 2 min 5000 aps/min greičiu. Chromatografinės sąlygos pateiktos skyriuje „eksperimento metodika“.

Iš pradžių didinant NaCl koncentraciją, kaip ir buvo tikėtasi, analičių smailių plotai didėjo (3.30 pav.). Tačiau kai NaCl koncentracija tirpale viršijo 0,075 g/mL, vandeninės fazės tankis tapo didesnis už organinio tirpiklio tankį ir dėl to po centrifugavimo organinė fazė nebensėdavo centrifuginio mėgintuvėlio dugne, bet sudarydavo plonytę plėvelę virš vandeninio tirpalo. Dėl šios priežasties organinės fazės nebebuvo galima paimti mikrošvirktu tolimesnei analizei. Siekiant to išvengti, tolimesniame darbe į mėginius NaCl nedėjome.

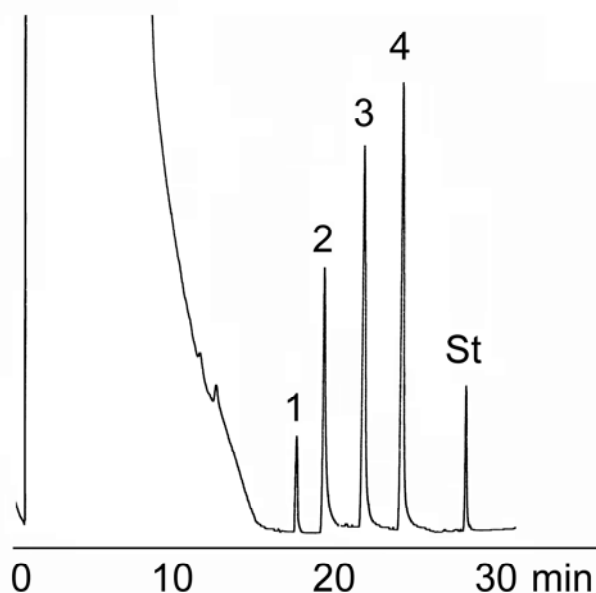
Optimalios parabenų dispersinės skysčių-skysčių mikroekstrakcijos sąlygos pateiktos 3.16 lentelėje.

**3.16 lentelė**

Parabenų DSSME optimalios sąlygos

Parametras	Vertė
Ekstrahuojantis tirpiklis	Chlorbenzenas
Ekstrahuojančio tirpiklio tūris, $\mu\text{L}$	20
Disperguojantis tirpiklis	Acetonas
Disperguojančio tirpiklio tūris, $\mu\text{L}$	480
Ekstrakcijos trukmė, s	20–30
NaCl kiekis, g/mL	Nėra

Optimaliomis sąlygomis gauta standartinio parabenų mišinio chromatograma pateikta 3.31 pav.



**3.31 pav.** Parabenų standartinio mišinio chromatograma: 1 – metilparabenas, 2 – etilparabenas, 3 – propilparabenas, 4 – butilparabenas, St – vidinis standartas (*n*-nonadekanas). DSSME sąlygos: mėginio tūris 8 mL, parabenų koncentracija 10 mg/L, ekstrahento (chlorbenzeno) tūris 20  $\mu\text{L}$ , acetono tūris 0,48 mL. Centrifuguota 2 min 5000 aps/min greičiu. Chromatografinės sąlygos pateiktos skyriuje „eksperimento metodika“.



### 3.3.1.2. Metodo analizinės charakteristikos

Optimizavus parabenų dispersinės skysčių-skysčių mikroekstrakcijos sąlygas, nustatėme paruošto metodo pagrindines analizines charakteristikas: aptikimo ribas, tiesinius koncentracijų intervalus, rezultatų pasikartojamumą.

Aptikimo ribos pateiktos 3.17 lentelėje.

Vidiniu standartu pasirinkome *n*-nonadekaną, jo koncentracija chlorbenzene buvo 5 µg/mL. Rezultatų pasikartojamumas buvo įvertintas dvejoms analičių koncentracijoms (1 ir 10 µg/mL). Dispersinė skysčių-skysčių mikroekstrakcija buvo atliekama 5 kartus. Analčių nustatymo rezultatų santykinų standartinių nuokrypių  $s_r$  vertės artimos ir neviršija 11,2 % (3.17 lentelė).

Tiesiniam koncentracijų intervalui nustatyti buvo ruošiama serija 7 skirtingų koncentracijų standartinių parabenų tirpalų, praskiedžiant distiliuotu vandeniu pradinį standartinį tirpalą. Smalių plotų priklausomybė nuo parabenų koncentracijos buvo tiesinė nuo 350, 35, 25 ir 14 µg/L iki 10 µg/mL atitinkamai metilparabenai, etilparabenai, propilparabenai ir butilparabenai. Kalibracinių kreivių koreliacijos koeficientų vertės buvo 0,997–0,999.

#### 3.17 lentelė

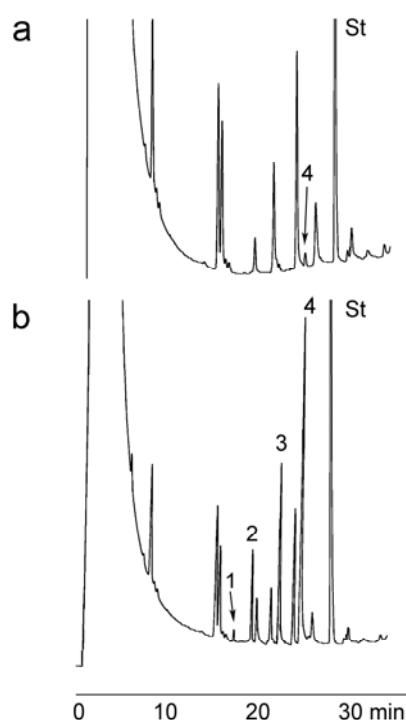
Parabenų aptikimo ribos ir rezultatų pasikartojamumas, atlikus DSSME

Analitė	Aptikimo riba, µg/L	$s_r$ , % (n = 5)	
		c = 1 µg/mL	c = 10 µg/mL
Metilparabenas	210	11,2	10,6
Etilparabenas	23	10,3	9,8
Propilparabenas	15	9,7	6,8
Butilparabenas	8	7,8	6,5

### 3.3.1.3. Metodo praktinis pritaikymas

Paruoštas dispersinės skysčių-skysčių mikroekstrakcijos metodas ypač tinkamas nustatant mažas parabenų koncentracijas nesudėtingose matricose. Analizavome laboratorijos čiaupo vandens ir baseino vandens („Impuls“, L. Asanavičiūtės g. 15, Vilnius) mėginius. Čiaupo vanduo buvo analizuojamas iš karto paėmus mėginį, baseino vanduo – per 4 val nuo mėginio paėmimo. Prieš ekstrakciją mėginiai nebuvo kaip nors ruošiami. Mėginius analizavome po 3 kartus priedų metodu.

Analizės rezultatai parodė, kad čiaupo vandenyje parabenų nėra arba jų koncentracijos mažesnės už aptikimo ribas. Baseino vandenyje aptikome butilparabeno ( $28 \mu\text{g/L}$ ;  $s_r = 9,8 \%$ ,  $n=3$ ). Baseino vandens (be parabenų priedo ir su priedu) chromatogramos pateiktos 3.32 pav.



**3.32 pav.** Baseino vandens (a) ir baseino vandens su parabenų priedu ( $1 \text{ mg/L}$ ) (b) chromatogramos: 1 – metilparabenas, 2 – etilparabenas, 3 – propilparabenas, 4 – butilparabenas, St – vidinis standartas (*n*-nonadekanas). DSSME sąlygos: mėginio tūris  $8 \text{ mL}$ , ekstrahento (chlorbenzeno) tūris  $20 \mu\text{L}$ , acetono tūris  $0,48 \text{ mL}$ . Centrifuguota  $2 \text{ min}$   $5000 \text{ aps/min}$  greičiu. Chromatografinės sąlygos pateiktos skyriuje „eksperimento metodika“.

Greičiausiai butilparabenas į baseino vandenį pateko iš baseino lankytojų naudojamos kūno priežiūros kosmetikos.

Čiaupo ir baseino vandens matricos efektui įvertinti į vandenį buvo pridėta po 1 ir 10 µg/mL parabenų. Parabenų koncentracijos buvo rastos naudojant distiliuotame vandenyje pagamintų parabenų tirpalų kalibracines kreives. Palyginimui buvo ekstrahuojami tokių pačių koncentracijų parabenų tirpalai distiliuotame vandenyje. Ekstrakcijos išgavos buvo apskaičiuojamos kaip santykis parabenų koncentracijų čiaupo ar baseino vandenyje su parabenų koncentracijomis distiliuotame vandenyje. Analizės rezultatai parodė, kad ekstrakcijos išgavos artimos 100 %, taigi čiaupo ar baseino vandens matrica neturi įtakos parabenų ekstrakcijai.

### **3.3.2. Derivatizuotų parabenų dispersinė skysčių-skysčių mikroekstrakcija**

#### **3.3.2.1. Ekstrakcijos sąlygų optimizavimas**

Siekiant padidinti parabenų ekstrakcijos efektyvumą ir nustatymo jautrį parabenus derivatizavome. Derivatizacijos sąlygų optimizavimas ir pH įtaka parabenų derivatizacijai pateikti 3.1.2.1. poskyryje.

#### ***Ekstrahuojančio tirpiklio prigimtis***

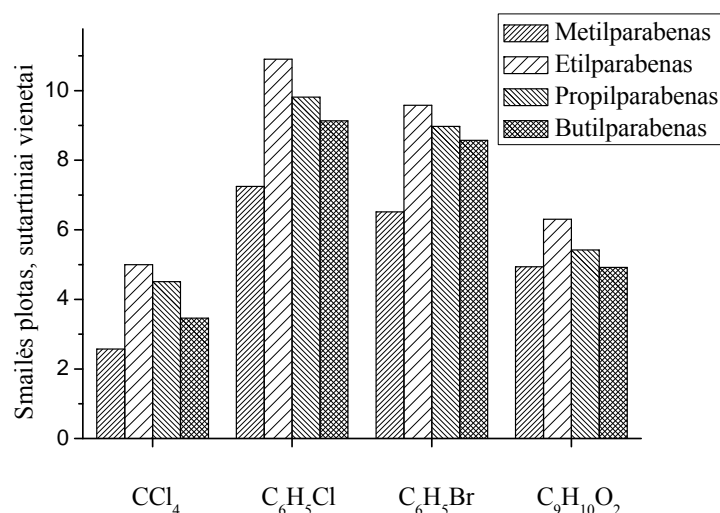
Derivatizuotų parabenų ekstrakcijai buvo išbandyti keturi tirpikliai, kurie netirpsta vandenyje ir yra sunkesni už vandenį. Tai anglies tetrachloridas, chlorbenzenas, brombenzenas, etilbenzoatas. Fizikinės pasirinktų organinių tirpiklių savybės yra pateiktos 3.15 lentelėje.

Siekiant pasirinkti tinkamą ekstrahuojantį tirpiklį, į 8 mL vandeninio mėginio, turinčio po 10 µg/mL parabenų ir 0,02 g/mL  $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ , buvo pridėti 8 µL acto rūgšties anhidrido, tada greitai suleistas mišinys, susidedantis iš 0,5 mL acetono (disperguojantis tirpiklis) ir 40 µL ekstrahuojančiojo tirpiklio. Susidariusi emulsija centrifuguojama ir po to 1 µL kūginio

mėgintuvėlio dugne nusėdusios organinės fazės buvo paimamas mikrošvirkštu ir suleidžiamas į dujų chromatografo garintuvą.

Kaip matyti iš 3.33 pav., ekstrakcijos efektyvumas naudojant  $\text{CCl}_4$  buvo žymiai mažesnis, negu naudojant aromatinį žiedą turinčius tirpiklius ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}$ ,  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Br}$  ir  $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_2$ ). Tai gerai atitinka principą „panašus tirpina panašų“, kadangi parabenai taip pat turi aromatinį žiedą. Chlorbenzeno ir brombenzeno sulaikymo trukmės yra artimos ir didesnės už etilbenzoato sulaikymo trukmes.

Siekiant geresnio analičių chromatografinio atskyrimo, ekstrahuojančiu tirpikliu pasirinkome žemesnę virimo temperatūrą turintį tirpiklį – chlorbenzeną.



**3.33 pav.** Parabenų chromatografinių smailių plotų priklausomybė nuo ekstrahuojančiojo tirpiklio prigimties. DSSME sąlygos: mėginio tūris 8 mL, parabenų koncentracija 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$  koncentracija 0,02 g/mL, acto rūgšties anhidrido tūris 8  $\mu\text{L}$ , ekstrahento tūris 40  $\mu\text{L}$ , acetono tūris 0,5 mL. Centrifuguota 2 min 5000 aps/min greičiu. Chromatografinės sąlygos pateiktos skyriuje „eksperimento metodika“.

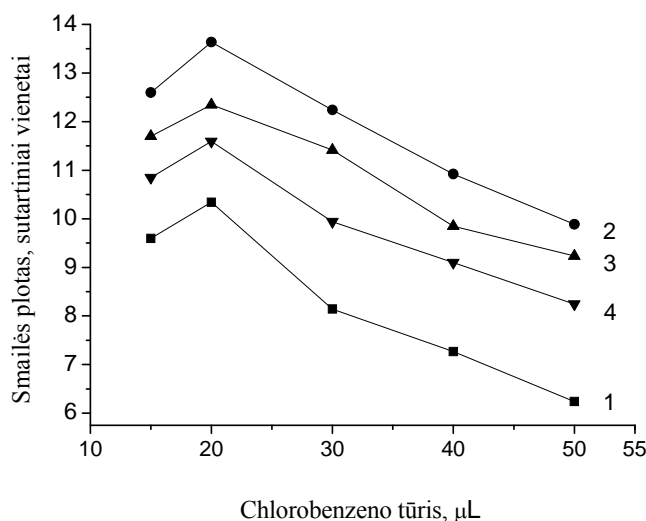
### ***Ekstrahuojančio tirpiklio kiekis***

Pasirinkę tinkamiausią ekstrahuojantį tirpiklį, optimizavome jo kiekį. Tam į 8 mL vandeninio mėginio, turinčio po 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  parabenų ir 0,02 g/mL  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ , buvo pridėti 8  $\mu\text{L}$  acto rūgšties anhidrido, tada greitai

suleistas fiksuoto tūrio disperguojančio tirpiklio (0,5 mL acetono) ir įvairių chlorbenzeno tūrių (10–50 µL) mišinys. Susidariusi emulsija centrifuguojama.

Iš gautų rezultatų (3.34 pav.) matyti, kad didinant ekstrahento kiekį mikroekstrakcijos mišinyje analičių smailių plotai iš pradžių didėja ir pasiekia maksimumą esant 20 µL chlorbenzeno. Kai chlorbenzeno tūris buvo didesnis nei 20 µL, mažėjo analičių koncentracija organinėje fazėje ir mažėjo analičių smailių plotai.

Remiantis gautais rezultatais, tolimesniam darbui buvo pasirinktas 20 µL chlorbenzeno tūris.



**3.34 pav.** Parabenų chromatografinių smailių plotų priklausomybė nuo chlorbenzeno tūrio: 1 – metilparabenas, 2 – etilparabenas, 3 – propilparabenas, 4 – butilparabenas. DSSME sąlygos: mėginio tūris 8 mL, parabenų koncentracija 10 µg/mL, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×3H<sub>2</sub>O koncentracija 0,02 g/mL, acto rūgšties anhidrido tūris 8 µL, acetono tūris 0,5 mL. Centrifuguota 2 min 5000 aps/min greičiu. Chromatografinės sąlygos pateiktos skyriuje „eksperimento metodika“.

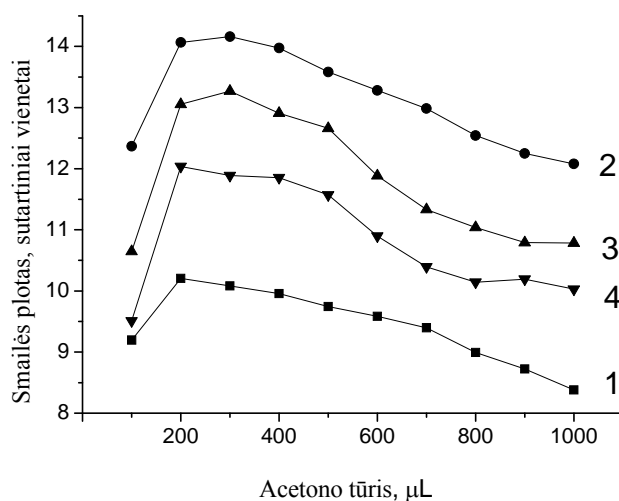
### ***Disperguojantis tirpiklis***

Kaip ir nederivatizuotų parabenų atveju, disperguojančiu tirpikliu pasirinkome acetoną.

Ekstrakcijos efektyvumo priklausomybei nuo disperguojančio tirpiklio tūrio tyrimams naudojome ekstrakcijos mišinį, kuriame buvo

20  $\mu\text{L}$  ekstrahuojančio tirpiklio (chlorbenzeno) ir skirtingi acetono tūriai (100–1000  $\mu\text{L}$ ).

Mažų acetono tūrių nepakanka ekstrahentui vandeninėje fazėje disperguoti, emulsija nesusidaro. Tuo tarpu esant pakankamai dideliems acetono tūriams sumažėja ekstrakcijos efektyvumas. Kaip matyti iš 3.35 pav., kai acetone tūris 200–400  $\mu\text{L}$ , gaunamas geriausias ekstrakcijos efektyvumas. Dėl tolimesnio darbo patogumo buvo pasirinkta išvirkšti 300  $\mu\text{L}$  acetono-chlorbenzeno mišinio, kuriame chlorbenzeno tūris 20  $\mu\text{L}$ , taigi acetono tūris 280  $\mu\text{L}$ .



**3.35 pav.** Parabenu chromatografinių smailių plotų priklausomybė nuo disperguojančio tirpiklio (acetono) tūrio: 1 – metilparabenas, 2 – etilparabenas, 3 – propilparabenas, 4 – butilparabenas. DSSME sąlygos: mėginio tūris 8 mL, parabenu koncentracija 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$  koncentracija 0,02 g/mL, acto rūgšties anhidrido tūris 8  $\mu\text{L}$ , ekstrahento (chlorbenzeno) tūris 20  $\mu\text{L}$ . Centrifuguota 2 min 5000 aps/min greičiu. Chromatografinės sąlygos pateiktos skyriuje „eksperimento metodika“.

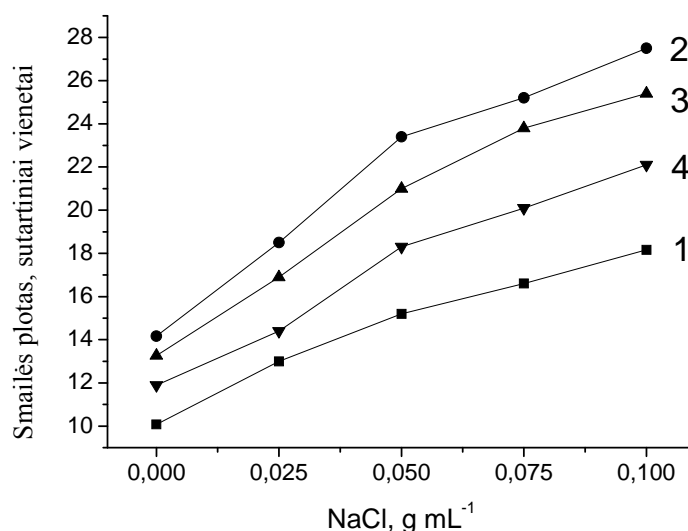
### *Ekstrakcijos trukmė*

Kaip jau buvo minėta poskyryje 3.3.1.1., 20–30 sekundžių (tiek užtrunkama nuo mišinio įleidimo iki centrifugavimo pradžios) pakanka ekstrakcijos procesui įvykti.

### ***Druskų koncentracija tirpale***

Druskų efekto įtakai patikrinti pasirinkome dažniausiai mikroekstrakcijos metuose naudojamą NaCl.

Kaip ir nederivatizuotų parabenų atveju, iš pradžių didinant NaCl koncentraciją, analizių smailių plotai didėjo (3.36 pav.). Tačiau kai NaCl koncentracija tirpale viršijo 0,1 g/mL, vandeninės fazės tankis tapo didesnis už organinio tirpiklio tankį ir dėl to po centrifugavimo organinė fazė nebensėdavo centrifuginio mėgintuvėlio dugne, bet sudarydavo plonytę plėvelę virš vandeninio tirpalo. Dėl šios priežasties organinės fazės nebebuvo galima paimti mikrošvirkštu tolimesnei analizei. Siekiant to išvengti, tolimesniame darbe į mėginius NaCl nedėjome.



**3.36 pav.** Parabenu chromatografinių smailių plotų priklausomybė nuo NaCl kiekio: 1 – metilparabenas, 2 – etilparabenas, 3 – propilparabenas, 4 – butilparabenas. DSSME sąlygos: mėginio tūris 8 mL, parabenų koncentracija 10 μg/mL, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×3H<sub>2</sub>O koncentracija 0,02 g/mL, acto rūgšties anhidrido tūris 8 μL, ekstrahento (chlorbenzeno) tūris 20 μL, acetono tūris 280 μL. Centrifuguota 2 min 5000 aps/min greičiu. Chromatografinės sąlygos pateiktos skyriuje „eksperimento metodika“.

Optimalios derivatizuotų parabenų dispersinės skysčių-skysčių mikroekstrakcijos sąlygos pateiktos 3.18 lentelėje.

### 3.18 lentelė

Derivatizuotų parabenų DSSME optimalios sąlygos

Parametras	Vertė
Ekstrahuojantis tirpiklis	Chlorbenzenas
Ekstrahuojančio tirpiklio tūris, $\mu\text{L}$	20
Disperguojantis tirpiklis	Acetonas
Disperguojančio tirpiklio tūris, $\mu\text{L}$	280
Ekstrakcijos trukmė, s	20–30
NaCl kiekis, g/mL	Nėra

#### 3.3.2.2. Metodo analizinės charakteristikos

Optimizavus derivatizuotų parabenų dispersinės skysčių-skysčių mikroekstrakcijos sąlygas, nustatėme paruošto metodo pagrindines analizes charakteristikas: aptikimo ribas, tiesinius koncentracijų intervalus, rezultatų pasikartojamumą.

Metodo aptikimo ribos yra pateiktos 3.19 lentelėje ir jos yra žemesnės nei gautos naudojant nederivatizuotų parabenų DSSME metodą.

Vidiniu standartu pasirinkome *n*-heksadekaną, jo koncentracija chlorbenzene buvo 10  $\mu\text{g/mL}$ . Rezultatų pasikartojamumas buvo įvertintas dvejoms analičių koncentracijoms (0,1 ir 1  $\mu\text{g/mL}$ ). Dispersinė skysčių-skysčių mikroekstrakcija buvo atliekama 5 kartus. Analičių nustatymo rezultatų santykinų standartinių nuokrypių  $s_r$  vertės artimos ir neviršija 11,0 % (3.19 lentelė).

Tiesiniam koncentracijų intervalui nustatyti buvo ruošiama serija 7 skirtingų koncentracijų standartinių parabenų tirpalų, praskiedžiant distiliuotu vandeniu pradinį standartinį tirpalą. Smalių plotų priklausomybė nuo parabenų koncentracijos buvo tiesinė iki 10  $\mu\text{g/mL}$ . Kalibracinių kreivių koreliacijos koeficientų vertės buvo 0,997–0,999 ( $n=5$ ).



### 3.19 lentelė

Derivatizuotų parabenų aptikimo ribos ir rezultatų pasikartojamumas, atlikus DSSME

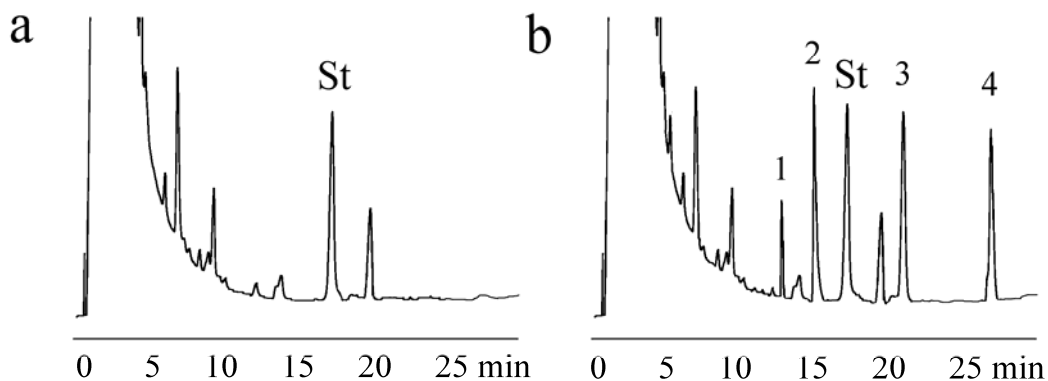
Analitė	Aptikimo riba, µg/L	s <sub>r</sub> , % (n = 5)	
		c = 0,1 µg/mL	c = 1 µg/mL
Metilparabenas	22	11,0	5,9
Etilparabenas	4,2	9,3	6,4
Propilparabenas	3,3	8,3	6,8
Butilparabenas	2,5	9,3	7,4

#### 3.3.2.3. Metodo praktinis pritaikymas

Paruoštas derivatizuotų parabenų dispersinės skysčių-skysčių mikroekstrakcijos metodas pritaikytas vandens iš laboratorijos čiaupo ir Neries upės vandens analizei. Čiaupo vanduo buvo analizuojamas iš karto paėmus mėginį, upės vanduo – per 4 val nuo mėginio paėmimo. Prieš ekstrakciją mėginiai buvo filtruojami per 0,45 µm membraninį filtrą.

Analizės rezultatai parodė, kad nei vandentiekio, nei Neries upės vandenyje tirtų parabenų nėra arba jų koncentracijos mažesnės už aptikimo ribas.

Čiaupo ir Neries upės vandens matricos efektui įvertinti į vandenį buvo pridėta 0,1 µg/mL parabenų. Upės vandens (be parabenų priedo ir su priedu) chromatogramos pateiktos 3.37 pav. Chromatogramoje atsirado smailės, nesutampančios su vandenyje be priedo buvusiomis smailėmis.



**3.37 pav.** Neries upės vandens ekstrakto (a) ir Neries upės vandens ekstrakto su parabenų priedu (b) chromatogramos: 1 – metilparabenas, 2 – etilparabenas, 3 – propilparabenas, 4 – butilparabenas, St – vidinis standartas (*n*-heksadekanas). DSSME sąlygos: mėginio tūris 8 mL,  $K_2HPO_4 \times 3H_2O$  koncentracija 0,02 g/mL, acto rūgšties anhidrido tūris 8  $\mu$ L, ekstrahento (chlorbenzeno) tūris 20  $\mu$ L, acetono tūris 280  $\mu$ L. Centrifuguota 2 min 5000 aps/min greičiu. Chromatografinės sąlygos pateiktos skyriuje „eksperimento metodika“.

Parabenų koncentracijos buvo rastos naudojant distiliuotame vandenyje pagamintų parabenų tirpalų kalibracines kreives. Palyginimui buvo ekstrahuojami tokių pačių koncentracijų parabenų tirpalai distiliuotame vandenyje. Ekstrakcijos išgavos buvo apskaičiuojamos kaip santykis parabenų koncentracijų realiuose vandens mėginiuose su parabenų koncentracijomis distiliuotame vandenyje, pridėjus tokią pačią analičių koncentraciją. Analizės rezultatai parodė nedidelį matricos efektą dispersinei skysčių-skysčių mikroekstrakcijai ir, kad ekstrakcijos išgavos artimos 100 %.

### 3.4. Parabenų mikroekstrakcijos metodų palyginimas

Šiame skyriuje palyginsime sukurtus nederivatizuotų ir derivatizuotų parabenų mikroekstrakcijos metodus (METL, SFMEK, DSSME) bei aptarsime kiekvieno metodo privalumus ir trūkumus.

### ***Ekstrahuojantis tirpiklis ir jo kiekis***

Vienas iš skystafazės mikroekstrakcijos metodų privalumų yra tas, kad juose naudojami labai maži organinių tirpiklių kiekiai. Tai svarbu ne tik ekonominiu, bet ir ekologiniu požiūriu. Mūsų tirtuose mikroekstrakcijos metuose pasirinkti ekstrahentai ir jų kiekiai pateikti lentelėje 3.20.

### **3.20 lentelė**

Parabenu ekstrahcijai naudojami ekstrahentai ir jų kiekiai

<b>Mikroekstrakcijos metodas</b>	<b>Ekstrahentas</b>	<b>Ekstrahento tūris, mL</b>
Tiesioginė METL (nederivatizuoti)	Amilo acetatas	1
Tiesioginė METL (derivatizuoti)	Amilo acetatas	1
METL iš viršerdvės (derivatizuoti)	Dioktilftalatas	1
SFMEK (nederivatizuoti)	Chlorbenzenas	5
SFMEK (derivatizuoti)	Chlorbenzenas	5
DSSME (nederivatizuoti)	Chlorbenzenas	20
DSSME (derivatizuoti)	Chlorbenzenas	20

Daugiausiai ekstrahento (20  $\mu$ L) naudojama DSSME metode, tačiau šis DSSME metodo trūkumas yra neesminis, nes ir 20  $\mu$ L ekstrahento kiekis yra labai mažas.

Chromatografinės analizės trukmę įtakoja ekstrahento prigimtis. Paprastai ekstrahcijai naudojami lakūs ekstrahentai. Iš mūsų naudotų ekstrahentų tokie buvo amilo acetatas ir chlorbenzenas. Jų smailės chromatogramoje išėjo prieš analičių smailes. Deja, lakūs ekstrahentai netiko METL iš viršerdvės metodui, nes mažas lakaus ekstrahento tūris labai greitai išgaruodavo. Teko naudoti aukštos virimo temperatūros dioktilftalata. Tai prailgino dujų chromatografinę analizę, nes dioktilftalato sulaikymo trukmė didelė. Pvz., išekstrahavus derivatizuotus parabenus tiesioginės METL metodu (ekstrahentas amilo acetatas), dujų chromatografinė analizė truko 34 min, o išekstrahavus juos METL iš viršerdvės metodu – net 47 min.

### *Ekstrakcijos trukmė*

Bendrai analizės trukmei labai svarbi ekstrakcijos trukmė. Tirtų mikroekstrakcijos metodų trukmės pateiktos 3.21 lentelėje.

### 3.21 lentelė

Parabenu ekstrakcijos trukmė

<b>Mikroekstrakcijos metodas</b>	<b>Ekstrakcijos trukmė, min</b>
Tiesioginė METL (nederivatizuoti)	20
Tiesioginė METL (derivatizuoti)	20
METL iš viršerdvės (derivatizuoti)	20 (inkubacija) + 20
SFMEK (nederivatizuoti)	40
SFMEK (derivatizuoti)	30
DSSME (nederivatizuoti)	2 (centrifugavimo trukmė)
DSSME (derivatizuoti)	2 (centrifugavimo trukmė)

Greičiausiai atliekama dispersinė skysčių-skysčių mikroekstrakcija, kadangi dėl didžiulio vandeninės ir organinės fazių sąlyčio paviršiaus ploto analitės iš vandeninės į organinę fazę pereina beveik akimirksniu, nurodytas lentelėje dvi minutes trunka tirpalo centrifugavimas.

Kiti mikroekstrakcijos metodai žymiai ilgesni, pvz., atliekant SFMEK analičių pusiausvyra tarp vandeninės ir organinės fazių nebuvo pasiekta net po 70 min ekstrakcijos. Teko dirbti nepusiausvyrinėmis sąlygomis, bet net ir tada ekstrakcija truko 40 min.

Parabenu mikroekstrakcija tirpiklio lašu iš viršerdvės užtruko dvigubai ilgiau, nei tiesioginė mikroekstrakcija tirpiklio lašu, kadangi, norint analites pervesti į dujinę fazę, mėginį prieš ekstrakciją reikėjo kaitinti.

### *Aptikimo ribos*

Parabenu aptikimo ribos pateiktos 3.22 lentelėje.

### 3.22 lentelė

Parabenu aptikimo ribos, µg/L

<b>Mikroekstrakcijos metodas</b>	<b>MP*</b>	<b>EP*</b>	<b>PP*</b>	<b>BP*</b>
Tiesioginė METL (nederivatizuoti)	120	80	60	-
Tiesioginė METL (derivatizuoti)	30	14	18	27
METL iš viršerdvės (derivatizuoti)	260	380	450	580
SFMEK (nederivatizuoti)	200	30	10	-
SFMEK (derivatizuoti)	18	9,1	6,4	5,1
DSSME (nederivatizuoti)	210	23	15	8
DSSME (derivatizuoti)	22	4,2	3,3	2,5

\* MP – metilparabenas, EP – etilparabenas, PP – propilparabenas, BP – butilparabenas

Iš pateiktų rezultatų matome, kad, ekstrahuojant tuo pačiu metodu, derivatizuotų parabenų aptikimo ribos žymiai mažesnės. Taip yra greičiausiai todėl, kad derivatizuoti parabenai yra mažiau poliniai, dėl to labiau hidrofobiniai ir pilniau išekstrahuojami iš vandeninių tirpalų. Mažiausios aptikimo ribos gaunamos ekstrahuojant derivatizuotus parabenus SFMEK ir DSSME metodais. Ekstrahuojant tirpiklio lašu iš viršerdvės, parabenai iš pradžių turi pereiti į dujinę fazę. Kadangi net ir derivatizuotų parabenų lakumas nėra didelis, gaunamos žymiai didesnės aptikimo ribos negu ekstrahuojant tiesiogiai iš vandeninių tirpalų. Antra vertus, ekstrahuojant iš viršerdvės, į ekstraktą nepatenka nelakūs, dujų chromatografinę sistemą galintys užteršti junginiai. Tai didelis METL iš viršerdvės privalumas. Akivaizdu, kad šį metodą galima taikyti, kai tiriamų parabenų koncentracijos pakankamai didelės.

### *Rezultatų pasikartojamumas*

Lentelėje 3.23 pateikti parabenų nustatymo rezultatų santykiniai standartiniai nuokrypiai kai parabenų koncentracijai 1 µg/mL.

### **3.23 lentelė**

Parabenų rezultatų pasikartojamumas ( $c = 1 \mu\text{g/mL}$ ),  $s_r$ , %

<b>Mikroekstrakcijos metodas</b>	<b>MP*</b>	<b>EP*</b>	<b>PP*</b>	<b>BP*</b>
Tiesioginė METL (nederivatizuoti)	12,4	11,8	12,6	-
Tiesioginė METL (derivatizuoti)	10,0	8,8	8,3	10,7
METL iš viršerdvės (derivatizuoti)	32,2	24,8	23,8	25,1
SFMEK (nederivatizuoti)	11,7	9,0	7,6	-
SFMEK (derivatizuoti)	5,2	5,3	5,6	5,5
DSSME (nederivatizuoti)	11,2	10,3	9,7	7,8
DSSME (derivatizuoti)	5,9	6,4	6,8	7,4

\* MP – metilparabenas, EP – etilparabenas, PP – propilparabenas, BP – butilparabenas

Kaip matyti iš 3.23 lentelėje pateiktų duomenų, prasčiausias rezultatų pasikartojamumas gautas ekstrahuojant tirpiklio lašu iš viršerdvės. Taip yra todėl, kad parabenai pirmiausiai turi išgaruoti iš tirpalo, o tik tada iš viršerdvės patenka į ekstrahentą. Kadangi net ir derivatizuoti parabenai nėra labai lakūs, jų pervedimui į viršerdvę reikalinga padidinta temperatūra. Tiksliai palaikyti pastovią padidintą temperatūrą sunku net ir naudojant termostatą. Net ir maži temperatūros svyravimai turi didelės įtakos išekstrahuotam parabenų kiekiui taigi ir rezultatų pasikartojamumui.

Kitais ekstrakcijos metodais išekstrahuotų parabenų rezultatų pasikartojamumas panašus.

Apibendrinant galima pasakyti, kad visi tirti parabenu mikroekstrakcijos metodai yra pigūs, paprasti, nereikalaujantys sudėtingos aparatūros. Ekstrakcijai naudojami labai maži tirpiklio kiekiai. Antra vertus, kiekvienas iš metodų turi savų privalumų ir trūkumų:

Tiesioginei mikroekstrakcijai tirpiklio lašu atlikti nereikia nei specialių polipropileno kapiliarų, nei centrifugos, pakanka chromatografinio švirkšto ir magnetinės maišyklės. Antra vertus, šis metodas reikalauja didelio atidumo, būtina labai kruopščiai parinkti mikrošvirkšto adatos padėtį ekstrahuojamame mėginyje. Netinkamai ją parinkus ar per stipriai maišant mėginį, tirpiklio lašas atitrūksta nuo adatos galiuko ir ekstrakciją reikia kartoti iš naujos mėginio porcijos.

Ekstrahuojant tirpiklio lašu iš viršerdvės reikalinga sudėtingesnė įranga, nes reikalingas termostatas pastoviai aukštesnei temperatūrai palaikyti, be to parabenu mikroekstrakcija iš viršerdvės trunka dvigubai ilgiau, nei tiesioginė mikroekstrakcija, kadangi, norint analites pervesti į dujinę fazę, mėginys papildomai kaitinamas prieš ekstrakciją. Tačiau mikroekstrakcija iš viršerdvės turi ir privalumų. Nors ekstrahento pasirinkimą riboja jo lakumas, bet, antra vertus, nebūtina, kad ekstrahentas būtų visai netirpus vandenyje, kadangi į vandeninį tirpalą jis netalpinamas. Ekstrahuojant iš viršerdvės, lengviau manipuluoti ekstrahento lašu, jis geriau laikosi pakibęs ant adatos galo, jį lengviau įtraukti atgal į mikrošvirkštą po ekstrakcijos. Kadangi vandeninis tirpalas tiesiogiai nekontaktuoja su lašu, tirpalą maišyti galima žymiai greičiau, dėl to pagreitėja analičių pusiausvyros tarp vandeninio tirpalo ir ekstrahento nusistovėjimas. Galima atrankiai išekstrahuoti lakius junginius.

Pagrindinis skystafazės mikroekstrakcijos kapiliare privalumas – ekstrakcijos atrankumas. Pro kapiliaro sienelės į kapiliaro vidų nepatenka stambios molekulės ar kietos dalelės, dėl to prieš ekstrakciją mėginio nereikia filtruoti.

Dispersinė skysčių-skysčių mikroekstrakcijos skiriamasis bruožas – greitis. Be to metodas techniškai labai paprastai atliekamas,

nerikalauja specialaus įgudimo ir ypatingo kruopštumo. Metodas netinkamas sudėtingoms matricoms, tačiau puikiai tinka mažiems parabenų kiekiams nustatyti vandenyje.

Kaip buvo parodyta ankstesniuose skyriuose, visi šiame darbe tirti mikroekstrakcijos metodai gali būti sėkmingai taikomi realių mėginių analizei.



## IŠVADOS

1. Ištirtos tiesioginės mikroekstrakcijos tirpiklio lašu metodo galimybės ekstrahuoti nederivatizuotus parabenus iš vandeninių tirpalų. Optimizuotos ekstrakcijos sąlygos: ekstrahuojantis tirpiklis – amilo acetatas, vidinis standartas – *n*-nonadekanas, ekstrakcijos trukmė 20 min, NaCl kiekis 0,2 g/mL.

2. Parinktas parabenų derivatizacijos reagentas acto rūgšties anhidridas, optimizuotos parabenų derivatizacijos sąlygos. Nustatyta, kad derivatizuotų acto rūgšties anhidridu parabenų dujų chromatografinio nustatymo efektyvumas didesnis, negu nederivatizuotų parabenų.

3. Ištirtos tiesioginės mikroekstrakcijos tirpiklio lašu metodo ir mikroekstrakcijos tirpiklio lašu iš viršerdvės metodo galimybės ekstrahuoti derivatizuotus parabenus. Optimizuotos ekstrakcijos sąlygos: ekstrahuojantis tirpiklis – amilo acetatas (tiesioginė mikroekstrakcija) arba dioktilftalatas (mikroekstrakcija iš viršerdvės), vidinis standartas – *n*-heksadekanas, ekstrakcijos trukmė 20 min, inkubacijos trukmė (ekstrahuojant iš viršerdvės) 20 min, tiesioginė mikroekstrakcija atliekama kambario temperatūroje, mikroekstrakcija iš viršerdvės 70 °C temperatūroje. Ekstrahuojant iš viršerdvės, NaCl nedėta, ekstrahuojant iš tirpalo, į tirpalą dedama 0,2 g/mL NaCl.

4. Ištirtos skystafazės mikroekstrakcijos kapiliare metodo galimybės ekstrahuoti nederivatizuotus ir derivatizuotus parabenus iš vandeninių tirpalų. Optimizuotos ekstrakcijos sąlygos: abiem atvejais ekstrahuojantis tirpiklis – chlorbenzenas, vidinis standartas – *n*-tetradekanas (nederivatizuotiems parabenams) arba *n*-heksadekanas (derivatizuotiems parabenams), ekstrakcijos trukmė 40 min (nederivatizuotų parabenų) arba 30 min (derivatizuotų parabenų). Ekstrahuojant nederivatizuotus parabenus, į tirpalą dedama 0,4 g/mL NaCl, ekstrahuojant derivatizuotus parabenus NaCl nedėta.

5. Iširtos dispersinės skysčių-skysčių mikroekstrakcijos metodo galimybės ekstrahuoti nederivatizuotus ir derivatizuotus parabenus iš vandeninių tirpalų. Optimizuotos ekstrakcijos sąlygos: abiem atvejais ekstrahuojantis tirpiklis – chlorbenzenas, vidinis standartas – *n*-nonadekanas (nederivatizuotiems parabenams) arba *n*-heksadekanas (derivatizuotiems parabenams), disperguojantis tirpiklis – acetonas, ekstrakcijos trukmė kelios sekundės.

6. Nustatytos paruoštų skystafazės mikroekstrakcijos metodų analizinės charakteristikos: aptikimo ribos, tiesiniai kalibracinių kreivių intervalai, rezultatų pasikartojamumas. Sukurti parabenų mikroekstrakcijos metodai pritaikyti nustatyti parabenus vendentiekio, upės, baseino vandenyje, šlapime, rankų kreme, veido tonike.

7. Palyginus paruoštus parabenų skystafazės mikroekstrakcijos metodus nustatyta, kad visiems metodams užtenka labai mažų ekstrahento tūrių (1–20 µL). Greičiausiai atliekamas dispersinės skysčių-skysčių mikroekstrakcijos metodas, o ilgiausiai užtrunka mikroekstrakcija tirpiklio lašu iš viršerdvės. Ekstrahuojant tuo pačiu metodu, derivatizuotų parabenų aptikimo ribos mažesnės, negu nederivatizuotų. Didžiausios aptikimo ribos ir prasčiausias rezultatų pasikartojamumas ekstrahuojant tirpiklio lašu iš viršerdvės. Kitų metodų rezultatų pasikartojamumas artimas. Švarių vandeninių mėginių analizei tinka visi paruošti metodai, užterštiems ar sudėtingos matricos mėginiams geriau tinka mikroekstrakcija tirpiklio lašu iš viršerdvės arba skystafazė mikroekstrakcija kapiliare.

**AUTORIAUS MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ, APIBENDRINTŲ DAKTARO  
DISERTACIJOJE, SARAŠAS**

**Moksliniai straipsniai:**

1. **A. Prichodko**, K. Jonušaitė, V. Vičkačkaitė. Hollow fibre liquid phase microextraction of parabens. *Central European Journal of Chemistry*, **7**(3) (2009) 285–290.
2. **A. Prichodko**, V. Šakočiūtė, V. Vičkačkaitė. Dispersive liquid-liquid microextraction of parabens. *Chemija*, **21**(2–3) (2010) 112–117.
3. **A. Prichodko**, M. Mockūnaitė, V. Šmitienė, V. Vičkačkaitė. Hollow fibre liquid phase microextraction of derivatized parabens. *Chemija*, **22**(3) (2011) 155–161.
4. **A. Prichodko**, E. Janėnaitė, V. Šmitienė, V. Vičkačkaitė. Gas chromatographic determination of parabens after in-situ derivatization and dispersive liquid-liquid microextraction. *Acta Chromatographica*, (2012) 1–13 (online).

**Mokslinių konferencijų tezės:**

1. **A. Prichodko**, V. Vičkačkaitė. Dispersive liquid-liquid microextraction for parabens gas chromatographic determination in water samples. 5<sup>th</sup> Conference on Separation and Related Techniques by Nordic Separation Science Society, Tallinn, 2009, p. 127.
2. **A. Prichodko**, V. Šakočiūtė, V. Vičkačkaitė. Parabenu dujų chromatografinis nustatymas panaudojus mikroekstrakciją tirpiklio lašu. 9<sup>th</sup> National Lithuanian Conference „Chemija 2009“, Vilnius, 2009, p. 39.
3. **A. Prichodko**, E. Janėnaitė, V. Vičkačkaitė. Dispersive liquid-liquid microextraction for derivatized parabens. 10<sup>th</sup> International Conference of Lithuanian chemists „Chemistry 2011“, Vilnius, 2011, p. 88.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Soni, M.G., S.L. Taylor, N.A. Greenberg, and G.A. Burdock, *Food and Chemical Toxicology*, **40**(10) (2002) 1335-1373.
2. Soni, M.G., I.G. Carabin, and G.A. Burdock, *Food and Chemical Toxicology*, **43**(7) (2005) 985-1015.
3. Tavares, R.S., F.C. Martins, P.J. Oliveira, J. Ramalho-Santos, and F.P. Peixoto, *Reproductive Toxicology*, **27**(1) (2009) 1-7.
4. Kuo, K.L. and Y.Z. Hsieh, *Journal of Chromatography A*, **768**(2) (1997) 334-341.
5. Rastogi S. C., S.A., Kruijf N., Weijland J. W. , *Contact Dermatitis*, **32**(1) (1995) 28-30.
6. Peck, A.M., *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **386**(4) (2006) 907-939.
7. Dobbins, L.L., S. Usenko, R.A. Brain, and B.W. Brooks, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **28**(12) (2009) 2744-2753.
8. Shanmugam, G., B.R. Ramaswamy, V. Radhakrishnan, and H. Tao, *Microchemical Journal*, **96**(2) (2010) 391-396.
9. Darbre, P.D. and P.W. Harvey, *Journal of Applied Toxicology*, **28**(5) (2008) 561-578.
10. Zhang, Q.L., M. Lian, L.J. Liu, and H. Cui, *Analytica Chimica Acta*, **537**(1-2) (2005) 31-39.
11. Lokhnauth, J.K. and N.H. Snow, *Analytical Chemistry*, **77**(18) (2005) 5938-5946.
12. <http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/afc040929.htm>
13. Canosa, P., I. Rodriguez, E. Rubi, M.H. Bollain, and R. Cela, *Journal of Chromatography A*, **1124**(1-2) (2006) 3-10.
14. Canosa, P., I. Rodriguez, E. Rubi, N. Negreira, and R. Cela, *Analytica Chimica Acta*, **575**(1) (2006) 106-113.

15. Janjua, N.R., G.K. Mortensen, A.M. Andersson, B. Kongshoj, N.E. Skakkebaek, and H.C. Wulf, *Environmental Science & Technology*, **41**(15) (2007) 5564-5570.
16. Darbre, P.D., A. Aljarrah, W.R. Miller, N.G. Coldham, M.J. Sauer, and G.S. Pope, *Journal of Applied Toxicology*, **24**(1) (2004) 5-13.
17. Borremans, M., J. Van Loco, P. Roos, and L. Goeyens, *Chromatographia*, **59**(1-2) (2004) 47-53.
18. Krob, H.A., A.B. Fleischer, R. D'Agostino, C.L. Haverstock, and S. Feldman, *Journal of the American Academy of Dermatology*, **51**(3) (2004) 349-353.
19. Katsarou, A., M. Armenaka, I. Ale, V. Koufou, and D. Kalogeromitros, *Contact Dermatitis*, **41**(5) (1999) 276-279.
20. Routledge, E.J., J. Parker, J. Odum, J. Ashby, and J.P. Sumpter, *Toxicology and Applied Pharmacology*, **153**(1) (1998) 12-19.
21. Harvey, P.W. and D.J. Everett, *Journal of Applied Toxicology*, **24**(1) (2004) 1-4.
22. Harvey, P.W. and D.J. Everett, *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, **20**(1) (2006) 145-165.
23. Darbre, P.D., *Journal of Applied Toxicology*, **23**(2) (2003) 89-95.
24. Cashman, A.L. and E.M. Warshaw, *Dermatitis*, **16**(2) (2005) 57-66.
25. Strouse, J.J., T.R. Fears, M.A. Tucker, and A.S. Wayne, *Journal of Clinical Oncology*, **23**(21) (2005) 4735-4741.
26. Handa, O., S. Kokura, S. Adachi, T. Takagi, Y. Naito, T. Tanigawa, N. Yoshida, and T. Yoshikawa, *Toxicology*, **227**(1-2) (2006) 62-72.
27. Okamoto, Y., T. Hayashi, S. Matsunami, K. Ueda, and N. Kojima, *Chemical Research in Toxicology*, **21**(8) (2008) 1594-1599.
28. Tayama, S., Y. Nakagawa, and K. Tayama, *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **649**(1-2) (2008) 114-125.
29. Terasaki, M. and M. Makino, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, **88**(13) (2008) 911-922.

30. Lobemeier, C., C. Tschoetschel, S. Westie, and E. Heymann, *Biological Chemistry*, **377**(10) (1996) 647-651.
31. Oh, S.Y., M. Fujii, Y. Takeda, K. Yoda, N. Utoguchi, M. Matsumoto, and Y. Watanabe, *International Journal of Pharmaceutics*, **240**(1-2) (2002) 115-115.
32. Han, F., Y.Z. He, and C.Z. Yu, *Talanta*, **74**(5) (2008) 1371-1377.
33. Ye, X.Y., Z. Kuklennyik, A.M. Bishop, L.L. Needham, and A.M. Calafat, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **844**(1) (2006) 53-59.
34. Marquez-Sillero, I., E. Aguilera-Herrador, S. Cardenas, and M. Valcarcel, *Journal of Chromatography A*, **1217**(1) (2010) 1-6.
35. Lopez-Darias, J., V. Pino, Y.J. Meng, J.L. Anderson, and A.M. Afonso, *Journal of Chromatography A*, **1217**(46) (2010) 7189-7197.
36. Saraji, M. and S. Mirmahdieh, *Journal of Separation Science*, **32**(7) (2009) 988-995.
37. Tsai, T.F. and M.R. Lee, *Chromatographia*, **67**(5-6) (2008) 425-431.
38. Regueiro, J., E. Becerril, C. Garcia-Jares, and M. Llompart, *Journal of Chromatography A*, **1216**(23) (2009) 4693-4702.
39. Fischmeister I., H.L., Vincent J., *Arch. Derm. Res.*, **253**(1975) 63-69.
40. Baltussen, E., P. Sandra, F. David, and C. Cramers, *Journal of Microcolumn Separations*, **11**(10) (1999) 737-747.
41. Melo, L.P. and M.E.C. Queiroz, *Journal of Separation Science*, **33**(12) (2010) 1849-1855.
42. Ochiai, N., K. Sasamoto, M. Takino, S. Yamashita, S. Daishima, A.C. Heiden, and A. Hoffmann, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **373**(1-2) (2002) 56-63.
43. Ferreira, A.M.C., M. Moder, and M.E.F. Laespada, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **399**(2) (2011) 945-953.
44. Ramirez, N., F. Borrull, and R.M. Marce, *Journal of Separation Science*, **35**(4) (2012) 580-588.

45. Msagati, T.A.M., Barri, T., Larsson, N.; Jönsson, J. Å., *International Journal of Cosmetic Science*, **30**(2008) 297–307.
46. Fiamegos, Y.C. and C.D. Stalikas, *Analytica Chimica Acta*, **597**(1) (2007) 32-40.
47. Han, Y., X.Y. Jia, X.L. Liu, T.C. Duan, and H.T. Chen, *Chromatographia*, **72**(3-4) (2010) 351-355.
48. Farajzadeh, M.A., D. Djozan, and R.F. Bakhtiyari, *Talanta*, **81**(4-5) (2010) 1360-1367.
49. Fischmeister I., H.L., Vincent J., *Archives of Dermatological Research*, **253**(1) (1975) 63-69.
50. Gonzalez, M., M. Gallego, and M. Valcarcel, *Journal of Chromatography A*, **823**(1-2) (1998) 321-329.
51. Sotofattori, E., M. Anzaldi, A. Balbi, and G. Tonello, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **18**(1-2) (1998) 213-217.
52. Labat, L., E. Kummer, P. Dallet, and J.P. Dubost, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **23**(4) (2000) 763-769.
53. Burini, G., *Journal of Chromatography A*, **664**(2) (1994) 213-219.
54. Ye, X.Y., A.M. Bishop, L.L. Needham, and A.M. Calafat, *Analytica Chimica Acta*, **622**(1-2) (2008) 150-156.
55. Watanabe, T. and S. Terabe, *Journal of Chromatography A*, **880**(1-2) (2000) 311-322.
56. Chu, Q.C., J.Y. Wang, D.L. Zhang, and J.N. Ye, *European Food Research and Technology*, **231**(6) (2010) 891-897.
57. Wang, S.P. and C.L. Chang, *Analytica Chimica Acta*, **377**(1) (1998) 85-93.
58. He, S.L., Y.F. Zhao, Z.W. Zhu, H.W. Liu, M.X. Li, Y.H. Shao, and Q.K. Zhuang, *Talanta*, **69**(1) (2006) 166-171.
59. Driouich, R., T. Takayanagi, M. Oshima, and S. Motomizu, *Journal of Chromatography A*, **903**(1-2) (2000) 271-278.
60. Baalbaki, B., M.D. Blanchin, and H. Fabre, *Analytica Chimica Acta*, **463**(1) (2002) 15-20.

61. Huang, H.Y., Y.C. Lai, C.W. Chiu, and J.M. Yeh, *Journal of Chromatography A*, **993**(1-2) (2003) 153-164.
62. Mahuzier, P.E., K.D. Altria, and B.J. Clark, *Journal of Chromatography A*, **924**(1-2) (2001) 465-470.
63. Miola, M.F., M.J. Snowden, and K.D. Altria, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **18**(4-5) (1998) 785-797.
64. De Rossi, A. and C. Desiderio, *Electrophoresis*, **23**(19) (2002) 3410-3417.
65. Bottoli, C.B.G., M.D.S. Gutierrez-Ponce, V.S. Aguiar, and W.M. de Aquino, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **47**(4) (2011) 779-785.
66. Jinno, K., H. Watanabe, Y. Saito, and T. Takeichi, *Electrophoresis*, **22**(16) (2001) 3371-3376.
67. Huang, H.Y., C.W. Chiu, I.Y. Huang, and J.M. Yeh, *Electrophoresis*, **25**(18-19) (2004) 3237-3246.
68. Krzek, J., M. Starek, A. Kwiecien, and W. Rzeszutko, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **24**(4) (2001) 629-636.
69. Myint, A., Q.L.O. Zhang, L.J. Liu, and H. Cui, *Analytica Chimica Acta*, **517**(1-2) (2004) 119-124.
70. Popovic, G., M. Cakar, and D. Agbaba, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **33**(1) (2003) 131-136.
71. Pena-Pereira, F., I. Lavilla, and C. Bendicho, *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, **64**(1) (2009) 1-15.
72. Liu, H.H. and P.K. Dasgupta, *Analytical Chemistry*, **68**(11) (1996) 1817-1821.
73. Jeannot, M.A. and F.F. Cantwell, *Analytical Chemistry*, **68**(13) (1996) 2236-2240.
74. Jeannot, M.A. and F.F. Cantwell, *Analytical Chemistry*, **69**(15) (1997) 2935-2940.
75. He, Y. and H.K. Lee, *Analytical Chemistry*, **69**(22) (1997) 4634-4640.



76. Ma, M.H. and F.F. Cantwell, *Analytical Chemistry*, **71**(2) (1999) 388-393.
77. Liu, W.P. and H.K. Lee, *Analytical Chemistry*, **72**(18) (2000) 4462-4467.
78. Przyjazny, A. and J.M. Kokosa, *Journal of Chromatography A*, **977**(2) (2002) 143-153.
79. Tankeviciute, A., R. Kazlauskas, and V. Vickackaite, *Analyst*, **126**(10) (2001) 1674-1677.
80. Theis, A.L., A.J. Waldack, S.M. Hansen, and M.A. Jeannot, *Analytical Chemistry*, **73**(23) (2001) 5651-5654.
81. Xu, L., C. Basheer, and H.K. Lee, *Journal of Chromatography A*, **1152**(1-2) (2007) 184-192.
82. Jain, A. and K.K. Verma, *Analytica Chimica Acta*, **706**(1) (2011) 37-65.
83. Shen, G. and H.K. Lee, *Analytical Chemistry*, **75**(1) (2003) 98-103.
84. Jeannot, M.A., A. Przyjazny, and J.M. Kokosa, *Journal of Chromatography A*, **1217**(16) (2010) 2326-2336.
85. Psillakis, E. and N. Kalogerakis, *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, **21**(1) (2002) 53-63.
86. Hyotylainen, T. and M.L. Riekkola, *Analytica Chimica Acta*, **614**(1) (2008) 27-37.
87. Wang, Y., Y.C. Kwok, Y. He, and H.K. Lee, *Analytical Chemistry*, **70**(21) (1998) 4610-4614.
88. Vičkačkaitė, V., *Ekstrakciniai mėginio paruošimo dujų chromatografiniai analizei metodai*, 2008: Vilnius.
89. Liu, J.F., Y.G. Chi, and G.B. Jiang, *Journal of Separation Science*, **28**(1) (2005) 87-91.
90. Zhang, T.Z., X.M. Chen, Y.L. Li, and P. Liang, *Chromatographia*, **63**(11-12) (2006) 633-637.
91. Deng, C.H., Y. Mao, F.L. Hu, and X.M. Zhang, *Journal of Chromatography A*, **1152**(1-2) (2007) 193-198.

92. Sun, S.H., H.P. Xie, F.W. Xie, and Y.L. Zong, *Journal of Chromatography A*, **1179**(2) (2008) 89-95.
93. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Analytical Chemistry*, **71**(14) (1999) 2650-2656.
94. Rasmussen, K.E., S. Pedersen-Bjergaard, M. Krogh, H.G. Uglund, and T. Gronhaug, *Journal of Chromatography A*, **873**(1) (2000) 3-11.
95. Rasmussen, K.E. and S. Pedersen-Bjergaard, *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, **23**(1) (2004) 1-10.
96. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Journal of Chromatography A*, **1184**(1-2) (2008) 132-142.
97. Psillakis, E. and N. Kalogerakis, *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, **22**(10) (2003) 565-574.
98. Zhao, L.M. and H.K. Lee, *Analytical Chemistry*, **74**(11) (2002) 2486-2492.
99. Nerin, C., J. Salafranca, M. Aznar, and R. Batlle, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **393**(3) (2009) 809-833.
100. Jonsson, J.A., M. Andersson, C. Melander, J. Norberg, E. Thordarson, and L. Mathiasson, *Journal of Chromatography A*, **870**(1-2) (2000) 151-157.
101. Ndungu, K. and L. Mathiasson, *Analytica Chimica Acta*, **404**(2) (2000) 319-328.
102. Carabias-Martinez, R., E. Rodriguez-Gonzalo, P.H. Paniagua-Marcos, and J. Hernandez-Mendez, *Journal of Chromatography A*, **869**(1-2) (2000) 427-439.
103. Luque, M., E. Luque-Perez, A. Rios, and M. Valcarcel, *Analytica Chimica Acta*, **410**(1-2) (2000) 127-134.
104. Rezaee, M., Y. Assadi, M.R.M. Hosseinia, E. Aghaee, F. Ahmadi, and S. Berijani, *Journal of Chromatography A*, **1116**(1-2) (2006) 1-9.
105. Zang, X.H., Q.H. Wu, M.Y. Zhang, G.H. Xi, and Z. Wang, *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, **37**(2) (2009) 161-168.

106. Chen, H., R.W. Chen, and S.Q. Li, *Journal of Chromatography A*, **1217**(8) (2010) 1244-1248.
107. Farahani, H., Y. Yamini, S. Shariati, M.R. Khalili-Zanjani, and S. Mansour-Baghahi, *Analytica Chimica Acta*, **626**(2) (2008) 166-173.
108. Vickackaite, V. and E. Pusvaskiene, *Journal of Separation Science*, **32**(20) (2009) 3512-3520.
109. Farina, L., E. Boido, F. Carrau, and E. Dellacassa, *Journal of Chromatography A*, **1157**(1-2) (2007) 46-50.
110. Fattahi, N., S. Samadi, Y. Assadi, and M.R.M. Hosseini, *Journal of Chromatography A*, **1169**(1-2) (2007) 63-69.
111. Zhao, E.C., W.T. Zhao, L.J. Han, S.R. Jiang, and Z.Q. Zhou, *Journal of Chromatography A*, **1175**(1) (2007) 137-140.
112. *Matematičeskij enciklopedičeskij slovar* 1988, Moskva: Sovetskaja enciklopedija.
113. Skoog D. A., W.D.M., Holler F. J., *Fundamentals of Analytical Chemistry*. Vol. 7th edition. 1998.
114. Villaverde-de-Saa, E., I. Gonzalez-Marino, J.B. Quintana, R. Rodil, I. Rodriguez, and R. Cela, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **397**(6) (2010) 2559-2568.