

АНАЛИЗ закономерностей ДЕСТРУКЦИИ ПАРАБЕНОВ И АРОМАТИЧЕСКИХ карбоновых кислот В ВОДНО-ОРГАНИЧЕСКИХ МОДЕЛЬНЫХ МАТРИЦАХ¹

Исследованы кинетические закономерности деструкции ряда ароматических карбоновых кислот (бензойной, 2-гидроксибензойной, 4-гидроксибензойной, ацетилсалициловой) и парабенов (метилового и этилового эфира 4-гидроксибензойной кислоты) в модельных водно-органических средах. Метод измерения – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография с детектированием в УФ-области спектра.

Введение

Постоянно растущие потребности человечества обуславливают увеличение темпов создания и потребления пищевых продуктов, фармацевтических препаратов, изделий косметической промышленности. Это обуславливает необходимость использования в подобном производстве широкий спектр химических добавок, обеспечивающих длительную сохранность этих товаров, и приводит к увеличению их содержания в окружающей среде, что вызвано сбросами и утилизацией отходов

А.С. Лебедев*,
аспирант,
ФГБОУ ВПО
Ярославский го-
сударственный
университет им.
П.Г. Демидова

производств, а также уничтожением просроченной и некачественной продукции. Попадая в водоемы, они распространяются на значительные расстояния, что приводит к расширению зоны химического загрязнения. Многие вышеуказанные добавки по своей химической природе являются карбоароматическими соединениями. Сферы их использования и механизмы консервирующего действия подробно описаны в литературе [1-10]. Как правило, они характеризуются сравнительно невысокой растворимостью в воде и водных системах [1], что обеспечивает пролонгированный процесс их эмиссии в гидросферу. Аккумуляция в природных средах оказывает влияние на качественный и количественный видовой состав экосистем. Наиболее уязвимыми оказываются гидробионты, особенно небольших водоемов, т.к. в этом случае загрязнитель может находиться в достаточно высокой концентрации и распространяется в водной толще относительно равномерно. Постепенное накопление загрязняющих веществ за счет антропогенных источников, а также продуктов разложения погибших гидробионтов, ведет к стимулированию развития цианобактерий, вызывающих цветение воды. Цианобактерии, в свою очередь, продуцируют цианотоксины и являются источником вторичного загрязнения. Широкое применение, а также возможное попадание в окружающую среду ароматических карбоновых кислот и их производных ставит необходимой задачу изучения закономерностей их деструкции.

Цель данной работы – анализ закономерностей деструкции парабенов (метилового – **МП** и этилового эфиров – **ЭП** 4-гидроксибензойной кислоты), а также ряда

*Адрес для корреспонденции: logos2012@yandex.ru

¹Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, соглашение 14.132.21.1452 от 01.10.2012

ароматических карбоновых кислот (4-гидроксибензойной — **4-ГБК**, 2-гидроксибензойной — **2-ГБК**, ацетилсалициловой — **АцСал**, бензойной — **БК**) в модельных водно-органических средах с использованием метода обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (**ВЭЖХ**).

Материалы и методы исследования

Реактивы. Анализируемые вещества приобретали в фирмах «Вектон», «Акрос». Использовали также ацетонитрил «осч», 1 сорт (НПК «Криохром»), ортофосфорную кислоту «чда» (Китай), ледяную уксусную кислоту «хч» (ЗАО «База № 1 Химреактивов»), аммоний уксуснокислый «чда» («Ленреактив»), таурин имп. («Вектон»), азид натрия 99 % («Ranreas»), стандарт-титры для приготовления буферных растворов рабочих эталонов рН третьего разряда (ЗАО НПИП «УралХимИнвест»).

Оборудование. Хроматографический анализ проводили на хроматографической системе UltiMate-3000 фирмы «Dionex», укомплектованной вакуумным дегазатором, градиентным насосом с возможностью смешивания до трех компонентов подвижной фазы, автоматическим пробоотборником с диапазоном ввода образца от 0,1 до 100 мкл, термостатом колонок, спектрофотометрическим детектором, позволяющим регистрировать аналитические сигналы на четырех длинах волн одновременно, и хроматографической рабочей станцией Chromeleon 6.80. УФ-спектры анализируемых соединений получали на спектрофотометре UNICO 2802РС. рН водного компонента подвижной фазы контролировали на потенциометре И-160М. Модельные образцы термостатировали в термостате Sanyo MIR-254.

Подготовка образцов. Анализ деструкции карбоароамитических соединений осуществляли на основании данных кинетических исследований. Для этого готовили модельный раствор, содержащий 100 мг/дм³ анализируемого вещества, 1000 мг/дм³ таурина, стартовую суспензию микроорганизмов в фосфатном буфере. В мерную колбу вместимостью 250 см³ количественно переносили 0,025 г. аналита, 0,250 г. таурина, 20 мкл суспензии хемоорганогетеротрофных микроорганизмов (**СХМ**), объем доводили до метки фосфатным буферным раствором (0,025 М Na₂HPO₄; 0,025 М KH₂PO₄; рН ~ 6,86). В качестве контрольного раствора использовали модельную среду идентичного

В.Ю. Орлов,
доктор химических наук,
профессор,
заведующий кафедрой органической и биологической химии,
ФГБОУ ВПО Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова

состава с внесением 0,125 г. азид натрия в качестве ингибитора микробиологического роста. Модельные образцы хранились в термостате при 25 °С без доступа света. СХМ выращивали на мясной воде: в коническую колбу на 300 см³ помещали 25 г. говяжьего фарша, заливали его 125 см³ водопроводной воды, полученный экстракт фильтровали через бумажный обеззоленный фильтр «красная лента» и помещали в термостат при 25 °С на 7 сут без доступа света.

Измерение концентрации анализируемых соединений производили методом ВЭЖХ на обращенно-фазовом сорбенте с детектированием в УФ-области спектра. Перед проведением хроматографических измерений модельный раствор разводили десятикратно в мерной колбе вместимостью 10 см³ подвижной фазой и фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,20 мкм.

Условия хроматографического анализа: предколонка (10 x 2,1 мм) Acclaim 120 (С18-фаза, 5 мкм, 120 Å); колонка (150 x 2,1 мм) Acclaim 120 (С18-фаза, 3 мкм, 120 Å); расход подвижной фазы 0,2 см³/мин; температура термостата колонок 30 °С; объем вводимой пробы 10 мкл; длина волны детектора 230 и 254 нм.

При анализе БК, 4-ГБК, 2-ГБК, АцСал в качестве подвижной фазы применяли смесь растворителей ацетонитрил — ацетатный буферный раствор (рН ~ 4,1) в объемном соотношении 20:80. При анализе МП и ЭП ацетонитрил — ортофосфорная кислота (рН ~ 3,1) в соотношении 30:70 по объему. Для всех соединений режим элюирования изократический. Данные хроматографического анализа указаны в *табл. 1*.

Калибровку проводили методом внешнего стандарта в диапазоне концентраций 1-20 мг/дм³ по шести калибровочным уровням. Из основного раствора аналита в подвижной фазе концентрацией 200 мг/дм³ готовили рабочий стандартный раствор концентрацией 20 мг/дм³. Рабочие калибровочные растворы с концентрациями 1,0; 2,0; 6,0; 10,0; 14,0 мг/дм³ получали разведением определенных объемов рабочего стандартного раствора в мерных колбах вместимостью 10 см³ подвижной фазой. Калибровочные растворы, а также рабочий стандартный раствор хроматографировали в тех же условиях, что и модельные образцы анализируемых соединений. Для построения калибровочного графика использовали две серии калибровочных растворов, всего 12 точек.

Таблица 1

Данные хроматографического анализа

Вещество	Время удерживания, мин	Длина волны, нм
БК	7,23	230
2-ГБК	3,67	230
4-ГБК	3,59	254
АцСал	4,47	230
МП	6,95	254
ЭП	11,86	254

Для получения УФ-спектра анализируемого соединения из основного раствора аналита с концентрацией 200 мг/дм³ готовили раствор для спектроскопии с концентрацией 4 мг/дм³, растворитель и раствор сравнения – подвижная фаза. Диапазон сканирования от 380 до 190 нм, шаг сканирования 1 нм, длина оптического пути 10 мм.

Результаты и их обсуждение

Состав модельной среды определялся с учетом обеспечения возможности микробиологического роста. Для этого в модельную среду вносили таурин – источник углерода и энергии, а также азота, кислорода, водорода и серы. Для поддержания осмотического давления и рН модельной среды все компоненты растворялись в фосфатном буферном растворе, который

также выступал в качестве источника фосфора, натрия и калия. Выбор бактерицидного агента для контрольных вариантов модельных сред подбирался на основании ряда критериев: несорбируемость соединения на хроматографической колонке, хорошая растворимость в воде, химическая инертность по отношению к компонентам модельной среды. Наиболее полно вышеназванным требованиям удовлетворял азид натрия, который был использован как бактерицидный агент при исследовании закономерностей деструкции карбоароматических соединений.

Данные литературных источников [10-23] указывали на возможность протекания процессов трансформации исследуемых карбоароматических веществ в природных системах. Среди основных можно выделить окисление ферментными системами микроорганизмов, протекающее через ряд промежуточных соединений, ключевыми из которых являются пирокатехин и протокатеховая кислота [10-23], а также гидролиз, характерный для парабенатов и АцСал [9,10]. Нами была проведена оценка возможности и интенсивности протекания процесса биологического окисления и гидролиза. Для этого концентрация каждого аналита периодически измерялась на протяжении определенного промежутка времени в условиях отсутствия (рис. 1) и наличия (рис. 2) ингибитора микробиологической активности. Как показано на графике (рис. 1), концентрации всех аналитов в модельной среде без ингибирования микробиологической активности претерпевали значительное снижение за время экспонирования.

Наиболее быстрой деградации подвергалась 4-ГБК и уже на 8-е сут проведения эксперимента ее концентрация вышла за нижний предел диапазона количественного определения. Высокая степень биодоступности 4-ГБК объясняется наличием гидроксильной группы в *para*-положении, что облегчает процесс гидроксилирования субстрата до протокатеховой (3,4-дигидроксибензойной) кислоты, в то время как локализация у 2-ГБК гидроксильной группы в *ortho*-положении определяет наличие внутримолекулярной водородной связи с карбоксильной группой. Это, возможно, несколько затрудняет координационное взаимодействие каталитического центра фермента монооксигеназы с данным субстратом. Помимо этого, ключевым метаболитом при деструкции 2-ГБК является пирокатехин [12, 14, 21], следовательно, для ее

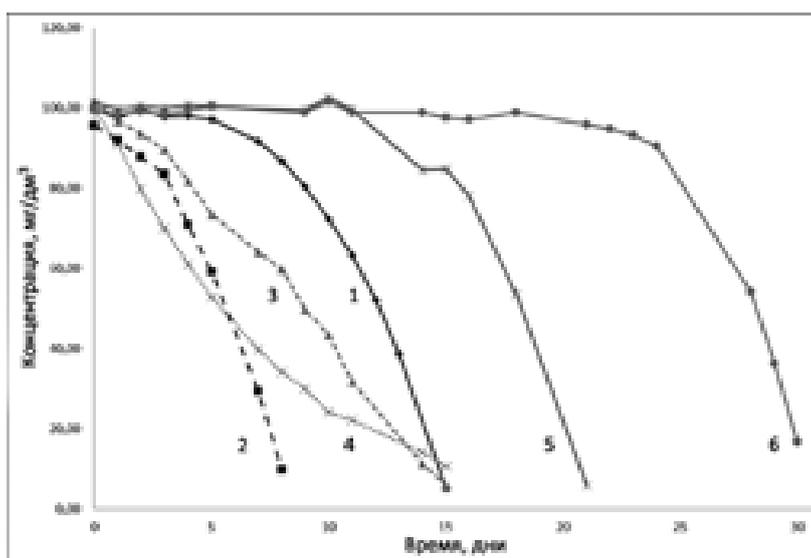


Рис. 1. Изменение концентрации БК (1), 4-ГБК (2), 2-ГБК (3), АцСал (4), МП (5) и ЭП (6) в модельной среде без ингибитора микробиологической активности – азид натрия.

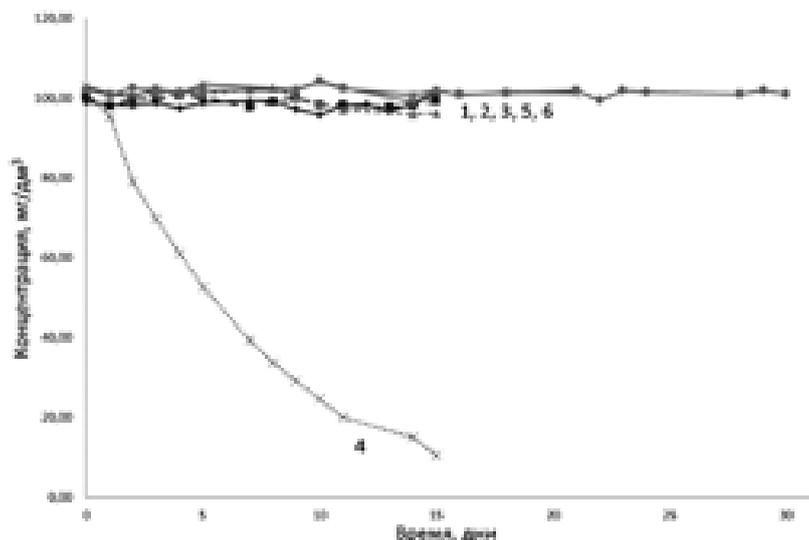


Рис. 2. Изменение концентрации БК (1), 4-ГБК (2), 2-ГБК (3), АцСал (4), МП (5) и ЭП (6) в модельной среде в присутствии ингибитора микробиологической активности — азида натрия.

преобразования необходима более длинная цепочка реакций, чем для 4-ГБК.

Деструкция БК проходила заметно медленнее, чем 4-ГБК, при этом концентрация БК оставалась относительно постоянной вплоть до 7-х сут наблюдений. Это вызвано более длительным циклом биологической трансформации и, следовательно, продолжительным периодом адаптации микроорганизмов к имеющемуся субстрату. Так, для утилизации БК микроорганизмами на начальных этапах трансформации субстрата требуется проведение реакций декарбоксилирования и двойного гидроксирования до пирокатехина, в то время как первичные стадии трансформации 4-ГБК требуют протекания только одной реакции гидроксирования.

В ходе ВЭЖХ анализа опытного и контрольного образцов АцСал на хроматограммах был обнаружен сигнал 2-ГБК (рис. 3), что достоверно указывает на автогидролиз, являющийся начальной стадией деградации. Концентрация АцСал снижалась как в опытном (рис. 2, 4), так и в контрольном варианте (рис. 4), при этом кинетические кривые АцСал (рис. 2-4) практически совпадали, следовательно, распад вещества происходил только за счет автогидролиза до 2-ГБК и уксусной кислоты. В свою очередь, деструкция 2-ГБК проходила уже при непосредственном участии микроорганизмов, т.к. в контрольном растворе концентрация 2-ГБК оставалась постоянной после полного гидролиза АцСал и снижалась в опытном

растворе (рис. 4). Следовательно, процесс деградации АцСал невозможен без предварительного гидролиза, в котором микроорганизмы-деструкторы участия не принимают.

Концентрация МП достоверно снижалась после 11-х сут измерений, а концентрация ЭП оставалась постоянной вплоть до 21-х сут, после чего также начала снижаться (рис. 1). Согласно анализу кривых деструкции парабенов (рис. 1, 2), самопроизвольного гидролиза до 4-ГБК не наблюдалось, тем не менее, выявлено протекание процесса биологического гидролиза в точках снижения концентрации парабенов. На это указывает различие в характере кривых деструкции в модельных образцах без ингибирования и с ингибированием микробиологической активности, а также увеличение концентрации 4-ГБК в опытном варианте.

Микробиологический рост визуально был отмечен во всех вариантах модельных сред, не содержащих азид натрия, в то же время явление микробиологического роста не было зафиксировано ни в одном из модельных растворов, содержащих ингибитор. Размножение прокариот можно объяснить недостаточной консервирующей активностью исследуемых соединений при данных величинах концентрации (100 мг/дм^3). Низкая консервирующая активность ароматических карбоновых кислот (БК, 2-ГБК, 4-ГБК, АцСал) вызвана также относительно высоким значением pH, близким к нейтральному, вследствие чего большая часть молекул ароматических карбоновых кислот

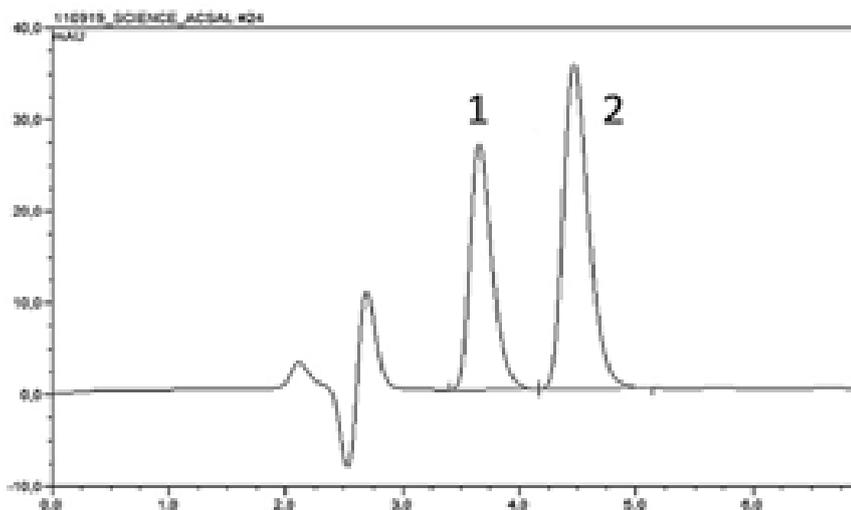


Рис. 3. Хроматограмма модельного раствора АцСал после трехсуточной экспозиции: 1 — салициловая кислота ($t_r = 3,66$), 2 — ацетилсалициловая ($t_r = 4,47$).

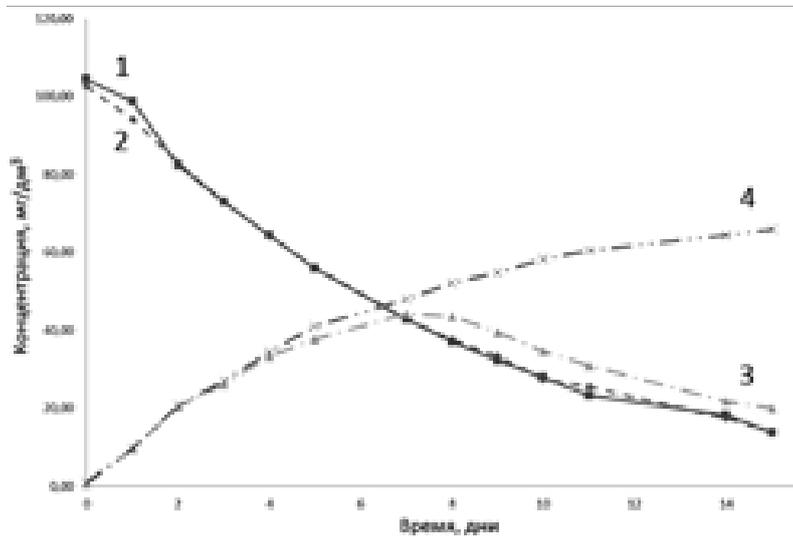


Рис. 4. Кинетические кривые: 1, 2 — изменение концентрации АцСал в условиях отсутствия (1) и наличия (2) ингибитора микробиологического роста; 3, 4 — изменение концентрации 2-ГБК в условиях отсутствия (3) и наличия (4) ингибитора микробиологического роста.

находилась в диссоциированной форме, которая труднее проникает через билипидный слой мембраны в цитоплазму, что опосредует низкое бактерио- и фунгистатическое воздействие БК, 2-ГБК, 4-ГБК и АцСал на микроорганизмы.

Заключение

Таким образом, в условиях отсутствия бактерицидного агента концентрация всех анализов неуклонно снижалась вследствие их гидролиза, биодеградации и биотрансформации.

Азид натрия с концентрацией в модельном растворе 500 мг/дм³ показал высокую бактерицидную активность. Во всех контрольных образцах визуально заметный микробный рост отсутствовал. В присутствии бактерицидного агента концентрации БК, 2-ГБК, 4-ГБК, МП и ЭП оставались относительно постоянными (рис. 2), что фактически исключает возможность самопроизвольного протекания реакций деградации и трансформации для данных соединений, т.е. процесс невозможен без участия ферментов микроорганизмов. Среди исследуемых карбоароматических соединений парабены (МП и ЭП) показали наибольшую устойчивость к биологической деструкции, не подвергаясь при этом самопроизвольно-

му гидролизу до 4-ГБК и соответствующего одноатомного спирта.

Концентрация АцСал снижалась как в опытном, так и в контрольном варианте модельных сред, что свидетельствует о самопроизвольном гидролизе данного соединения. Более того, практически тождественный характер кинетических кривых указывает на протекание деструкции в отношении продуктов гидролиза, но не исходного соединения.

Ароматические карбоновые кислоты проявляли слабую антимикробную активность в опытном модельном растворе, что связано с высоким содержанием депротонированных форм при значении pH, близком к нейтральному.

Литература

- Oliveira A.C. Solubility of Benzoic Acid in Mixed Solvents / Oliveira A.C., Coelho M.G., Pires R.F., Franco M.R. // J. Chem. Eng. 2007. V. 52. P. 298-300.
- Хейфиц Л.А. Душистые вещества и другие продукты для парфюмерии. Справ. Изд. / Хейфиц Л.А., Дашунин В.М. М.: Химия, 1994. 256 с.
- Люк Э. Консерванты в пищевой промышленности: Пер. с нем. / Люк Э., Ягер М. СПб: ГИОРД, 1998. 256 с.
- Гратцфилд-Хьюзген А. Анализ пищевых продуктов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии: Пер. с англ. / Гратцфилд-Хьюзген А., Шустер Р. Agilent Technologies, 2001. 136 с.
- Benzoic acid and sodium benzoate. Concise International Chemical Assessment Document 26. World Health Organization, Geneva, 2000. 48 p.
- Kamaraju K. The membrane lateral pressure-perturbing capacity of parabens and their effects on the mechanosensitive channel directly correlate with hydrophobicity / Kamaraju K., Sukharev S. // Biochem. 2008. V. 47. P. 10540-10550/
- Сычев С.Н. Высокоэффективная жидкостная хроматография как метод определения фальсификации и безопасности продукции / Сычев С.Н., Гаврилина В.А., Музалевская Р. М.: «ДеЛи принт», 2005. 148 с.
- Bertsova Yu.V. NADH Oxidation by Mitochondria from the Thermogenic Plant *Arum orientale* / Bertsova Yu.V., Popov V.N., Bogachev A.V. // Biochem. 2004. V. 69. № 5. P. 712-718.
- Darbre P.D. Paraben esters: review of recent studies of endocrinotoxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks / Darbre P. D., Harvey P. W. // J. Appl. Toxicol. 2008. V. 28. № 5. P. 561-578.

10. Bach R.D. Role of the somersault rearrangement in the oxidation step for flavin monooxygenases (FMO). A comparison between FMO and conventional xenobiotic oxidation with hydroperoxides // *J. Phys. Chem. A*. 2011. V. 115. P. 11087-11100.
11. Reiner A.M. Metabolism of benzoic acid by bacteria. Accumulation of 3,5-cyclohexadiene-1,2-diol-1-carboxylic acid by a mutant strain of *Alcaligenes eutrophus* / Reiner A.M., Hegeman G.D. // *Biochem.* 1971. V. 10. № 13. P. 2530-2536.
12. Wolfe M.D. Benzoate 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas putida*: single turnover kinetics and regulation of two-compound rieske dioxygenase / Wolfe M.D., Altier D., Stubna A., Popescu C.V., Munck E., Lipscomb J.D. // *Biochem.* 2002. V. 41. P. 9611-9626/
13. Tarasev M. Rates of the phthalate dioxygenase reaction with oxygen are dramatically increased by interactions with phthalate and phthalate oxygenase reductase / Tarasev M., Rhames F., Ballow D.P. // *Biochem.* 2004. V. 43. P. 12799-12808/
14. Yang T.C. Substrate binding to NO-Ferro-Naphthalene 1,2-dioxygenase studied by high-resolution Q-band pulsed 2H-ENDOR spectroscopy / Yang T.C., Wolfe M.D., Neibergall M.B., Mekmouche Y., Lipscomb J.D., Hoffman B.M. // *J. Am. Chem. Soc.* 2003. V. 125. P. 7056-7066/
15. Mendel S. Acid – base catalysis in the extradiol catechol dioxygenase reaction mechanism: site-directed mutagenesis of his-115 and his-179 in *Escherichia coli* 2,3-dihydroxyphenylpropionate 1,2-dioxygenase (MhpB) / Mendel S., Arndt A., Bugg T.D.H. // *Biochem.* 2004. V. 43. P. 13390-13396.
16. Horsman G. P. Spectroscopic studies of the anaerobic enzyme – substrate complex of catechol 1,2-dioxygenase / Horsman G.P., Jirasek A., Vaillancourt F.H., Barbosa C.J., Jarzecki A.A., Xu C., Mekmouche Y. et al // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. V. 127. P. 16882-16891.
- Ключевые слова:** кинетические закономерности, парабены, ароматические карбоновые кислоты, деструкция, высокоэффективная жидкостная хроматография
17. Kovaleva E.G. Finding the intermediates in the O_2 activation pathways of non-heme iron oxygenases / Kovaleva E.G., Neibergall M.B., Chakrabarty S., Lipscomb J.D. // *Acc. Chem. Res.* 2007. V. 40. P. 475-478.
18. Broderick J.B. Overproduction, purification, and characterization of chlorocatechol dioxygenase, a non-heme iron dioxygenase with broad substrate tolerance Broderick J. B., O'Halloran T. V. // *Biochem.* 1991. V. 30. P. 7349-7358.
19. Jouanneau Y. Characterization of a naphthalene dioxygenase endowed with an exceptionally broad substrate specificity toward polycyclic aromatic hydrocarbons Jouanneau Y., Meyer C., Jakoncic J., Stojanoff V., Gaillard J. // *Biochem.* 2006. V. 45. P. 12380-12391.
20. Mbughuni M.M. Oxy intermediates of homoprotocatechuate 2,3-dioxygenase: facile electron transfer between substrates / Mbughuni M.M., Chakrabarti M., Hayden J.A., K. Meier K.K., Dalluge J.J., Hendrich M.P., Munck E., Lipscomb J.D. // *Biochem.* 2011. V. 50. P. 10262–10274.
21. Nakatani N. Theoretical study of dioxygen binding process in iron(III) catechol dioxygenase: «Oxygen activation» vs «Substrate activation» / Nakatani N., Nakao Y., Sato H., Sakaki Sh. // *J. Phys. Chem. B*. 2009. V. 113. P. 4826-4836.
22. Abu-Omar M.M. Reaction mechanisms of mononuclear non-heme iron oxygenases / Abu-Omar M. M., Loaiza A., Hontzas N. // *Chem. Rev.* 2005. V. 105, № 6. P. 2227-2252.
23. Orville A.M. Structures of competitive inhibitor complexes of protocatechuate 3,4-dioxygenase: multiple exogenous ligand binding orientations within the active site / Orville A.M., Elango N., Lipscomb J.D., Ohlendorf D.H. // *Biochem.* 1997. V. 36. P. 10039-10051.

A.S. Lebedev, V.Yu. Orlov

ANALYSIS OF DEGRADATION REGULARITIES OF PARABENS AND AROMATIC CARBOXYLIC ACIDS IN MODEL WATER-ORGANIC MATRIXES

Degradation kinetic regularities of various aromatic carboxylic acids (benzoic, 2-hydroxybenzoic, 4-hydroxybenzoic, acetosalicylic) and parabens (methyl and ethyl ethers of 4-hydroxybenzoic acid) in model water-organic matrixes were investigated by high-performance liquid chromatography method with detection in ultraviolet wavelength range.

Key words: kinetic regularities, parabens, aromatic carboxylic acids, degradation, high-performance liquid chromatography