

ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ ДЛЯ АНАЛИЗА ФТАЛАТОВ ПУТЕМ ИХ ПРЕОБРАЗОВАНИЯ ВО ФЛУОРЕСЦЕИН

О. С. Кулакович^{1*}, А. А. Романенко¹, Е. А. Лукьяненко², С. А. Фатыхова³,
П. С. Шабуня³, Т. А. Павич¹, В. П. Кулакович⁴

УДК 543.42;535.34;535.37

¹ Институт физики НАН Беларуси, Минск, Беларусь; e-mail: o.kulakovich@ifanbel.bas-net.by

² Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

³ Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

⁴ ОАО “Испытания и сертификация бытовой и промышленной продукции “БЕЛЛИС”, Минск, Беларусь

(Поступила 28 июля 2021)

Рассмотрена возможность применения реакции превращения фталатов во флуоресцеин путем предварительного гидролиза фталатов с последующей дегидратацией фталевой кислоты до фталевого ангидрида и его взаимодействием с резорцином в аналитической люминесцентной спектроскопии для детекции фталатов. Обнаружено формирование побочных люминесцирующих продуктов реакции автоконденсации молекул резорцина предположительно с собственными продуктами окисления и разложения. Спектр люминесценции смеси побочных продуктов преобразования резорцина перекрывается со спектром флуоресцеина, относительный квантовый выход люминесценции 25 %. Это затрудняет применение данной реакции в аналитических целях, поскольку требует особой подготовки и подбора условий проведения реакции для минимизации или исключения формирования побочных люминесцирующих продуктов.

Ключевые слова: фталат, люминесценция, резорцин, автоконденсация, флуоресцеин.

The possibility of using the conversion of phthalates to fluorescein by preliminary hydrolysis of phthalates to phthalic acid followed by its dehydration into phthalic anhydride and the interaction of latter with resorcinol in analytical luminescence spectroscopy for the phthalates detection was considered. The formation of luminescent by-products of the auto-condensation reaction of resorcinol molecules supposedly with own oxidation and decomposition products was revealed. The luminescence spectrum of a by-products mixture of resorcinol transformation is overlapped with the spectrum of fluorescein and the relative quantum yield of mixture luminescence was 25%. This fact obstructs the use of this reaction for analytical purposes, since it requires special care in the sample preparation procedure and selection of reaction conditions to minimize or eliminate the formation of luminescent by-products.

Keywords: phthalate, luminescence, resorcinol, auto-condensation, fluorescein.

Введение. Фталаты — химические вещества, которые широко используются в промышленности в качестве пластификаторов, придающих пластмассам из поливинилхлорида гибкость и долговечность [1]. Они могут присутствовать в высоких концентрациях в выполненных из полимеров изделиях, таких как изоляция кабелей, упаковка для пищевых продуктов, а также медицинские товары и товары для ухода за детьми. Другое промышленное направление применения фталатов — массовое производство косметики и парфюмерии [2, 3], где фталаты используют в качестве носителей отдушки, способствующих сохранению стойкости ароматических компонентов. Вместе с тем фталаты

POSSIBILITY OF USING LUMINESCENCE SPECTROSCOPY FOR THE ANALYSIS OF PHTHALATES BY CONVERTING THEM INTO FLUORESC EIN

O. S. Kulakovich^{1*}, A. A. Ramanenka¹, E. A. Lukyanenko², S. A. Fatychava³, P. S. Shabunya³,
T. A. Pavich¹, V. P. Kulakovich⁴ (¹ B. I. Stepanov Institute of Physics of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus; e-mail: o.kulakovich@ifanbel.bas-net.by; ² Belarusian State University, Minsk, Belarus; ³ Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus; ⁴ BELLIS Testing and Certification of Home Appliances and Industrial Products, JSC, Minsk, Belarus)

определены как потенциальные канцерогены, а также репродуктивные токсиканты для человека [4]. Известно, что токсичность фталатов в первую очередь нацелена на репродуктивную [5—7] и респираторную [8, 9] системы, они также могут участвовать в процессах канцерогенеза [10, 11] и, предположительно, в расстройствах аутистического спектра [12, 13].

Регламент Европейского союза (ЕС) REACH, являющийся основным по регулированию химических веществ, которые используются во многих повседневных товарах и изделиях, установил ограничения 0.1 мас.% пластифицирующего материала в изделии для следующих фталатов: бутилбензилфталат (butyl benzyl phthalate, BBP), ди-(2-этилгексил)-фталат (bis(2-ethylhexyl) phthalate, DEHP), дибутилфталат (dibutyl phthalate, DBP) и диизобутилфталат (diisobutyl phthalate, DIBP). Наиболее строгие ограничения применялись только к игрушкам и товарам по уходу за детьми [14]. На сегодняшний день в список с ограничением 0.1 мас.% регламента REACH (Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals) для игрушек и товаров по уходу за детьми также добавлены следующие фталаты: диизононилфталат (DINP), диизодецилфталат (DIDP), ди-*n*-октилфталат (DNOP) [15]. С 2015 г. дополнение к директиве 2011/65/EU (RoHS) [16] ограничивает использование фталатов в компонентах электрической и электронной продукции. Согласно требованиям директивы RoHS, содержание DBP, BBP, DIBP, DEHP в электроизделиях должно быть ≤ 0.1 мас.%. Также ведется работа по внесению аналогичных ограничений содержания фталатов в технический регламент ТР ЕАЭС 037/2016, устанавливающий ограничения по химическим веществам в электроизделиях на территории Евразийского экономического союза. В перспективе не исключены полный запрет применения низкомолекулярных фталатов в качестве пластификаторов, а также расширение ограничений по применению высокомолекулярных.

Введение директив, ограничивающих применение фталатов, делает актуальной разработку новых высокочувствительных и селективных методик, в том числе экспрессных, для обнаружения этих веществ. Современные методы требуют высокого уровня навыков, дорогостоящего оборудования, длительной пробоподготовки и продолжительного по времени анализа. Традиционно фталаты анализируются методом газовой хроматографии с масс-спектрометрией (ГХ-МС) [17], где для улучшения хроматографического разделения часто требуются экстракция и длительная пробоподготовка. Быстрая предварительная оценка того, содержит образец высокую концентрацию сложных эфиров фталевой кислоты или нет, возможна путем предварительного скрининга сложных эфиров фталевой кислоты с помощью ИК-спектроскопии [18], но пределы обнаружения данным методом обычно значительно выше, чем нормативные критерии.

В работе [19] рассматривается колориметрический метод определения эфиров фталевой кислоты в полимерах по образованию флуоресцеина: фталаты гидролизуют гидроксидом натрия и дегидратируют с образованием фталевого ангидрида, который превращают в маркер, а именно флуоресцеин, путем реакции Фриделя—Крафтса с резорцином. В свою очередь люминесцентный анализ обладает более высокой чувствительностью, низкими пределами обнаружения по сравнению со спектрофотометрией и часто используется для обнаружения и количественного определения следовых количеств веществ в природных, промышленных и биологических объектах, что позволяет его применять вместо колориметрического анализа.

Цель настоящей работы — проверка возможности использования реакции преобразования фталатов во флуоресцеин и метода люминесцентной спектроскопии для обнаружения низких концентраций фталатов в полимерных материалах.

Эксперимент. Использованы следующие реагенты: стандартные растворы DEHP, BBP, DBP, DIBP в гексане с концентрацией 1000 мкг/мл, приготовленные по методике международного стандарта IEC 62321 (часть 8) [20]; резорцин ($\geq 99\%$, Carlroth) и резорцин ($\geq 99.7\%$, “Пять океанов”), флуоресцеин (Acros Organics), H_2SO_4 конц., HCl конц., NaOH , этанол.

Порядок проведения реакции соответствует методике [19] (рис. 1, а). В виалы на 2 мл отобрано 10 мкл экстрактов DEHP/BBP/DBP/DIBP в гексане с концентрацией 1000 мкг/мл. Концентрация фталатов 10 мкг/мл соответствует верхнему допустимому пределу (0.1 %) содержания в полимерном образце массой 0.1 г, экстрагированному в 10 мл органического растворителя. После упаривания гексана в виалы внесли 1 мл этанола. В полученный раствор добавили 150 мкл 1 М раствора NaOH и в течение 15 мин выдерживали в ультразвуковой ванне. Добавили 50 мкл концентрированной соляной кислоты для понижения pH до <1 . Провели дегидратацию при 125°C , затем внесли 1.5 мг резорцина и 50 мкг концентрированной серной кислоты. Для протекания реакции Фриделя—Крафтса систему нагревали при 125°C в течение 15 мин и оставили остывать до комнатной температуры. Образовав-

шие продукты растворили в 2 мл этанола или 0.1 М щелочи и отфильтровали от нерастворившегося осадка. Параллельно проводился контрольный опыт, в котором все стадии осуществлялись в отсутствие фталатов.

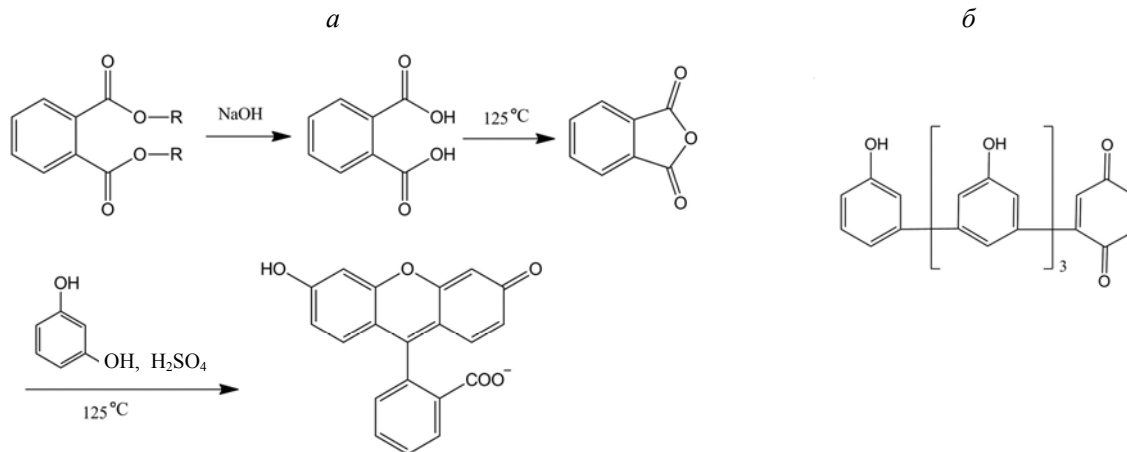


Рис. 1. Схема превращения фталатов во флуоресцеин [19] (а); предположительная структурная формула одного из продуктов автоконденсации резорцина [21] (б)

Спектры поглощения зарегистрированы на спектрофотометре UV-3600 Plus (Shimadzu, Япония). Спектры поглощения продуктов реакции получены в растворах в этаноле и 0.1 М NaOH в видимом диапазоне 300—600 нм. Спектры флуоресценции рабочих растворов зарегистрированы на спектрофлуориметре Fluorolog-3 (HORIBA Scientific, США) с источником возбуждения ксеноновой лампой мощностью 450 Вт. Спектры поглощения и люминесценции твердого продукта реакции получали, нанося его на предметное стекло в виде раствора в этаноле и оставив до полного высыхания.

Относительный квантовый выход люминесценции продукта реакции Φ_x рассчитан с использованием уравнения [22]:

$$\Phi_x = \Phi_{st} \frac{f_{st}}{f_x} \frac{F_x}{F_{st}} \frac{n_x^2}{n_{st}^2}, \quad (1)$$

где Φ_{st} — квантовый выход фотолюминесценции стандартного образца; F_x и F_{st} — интегральные интенсивности (площади) спектров флуоресценции исследуемого и стандартного образцов; f_x , f_{st} и n_x , n_{st} — коэффициенты поглощения и показатели преломления растворов исследуемого и стандартного образцов соответственно.

Коэффициенты поглощения f_i рассчитаны по формуле:

$$f_i = 1 - 10^{-A_i}, \quad (2)$$

где A_i — оптическая плотность раствора.

В качестве стандартного образца для определения относительного квантового выхода продукта использован раствор флуоресцеина в 0.1 М NaOH с квантовым выходом фотолюминесценции 89 % [22].

Хроматограмма и масс-спектры получены с помощью хромато-масс-спектрометра в составе хроматографа Agilent 1200 RRLC и масс-детектора Agilent 6410 Triple Quad LC/MS. В качестве подвижных фаз использованы раствор 0.05 % (об/об) муравьиной кислоты в воде и ацетонитрил. Хроматографическое разделение проведено на колонке Zorbax Eclipse XDB-C 18 4.6×150 мм в градиентном режиме с изменением состава подвижных фаз от 10 до 90 % ацетонитрила в течение 10 мин. Масс-спектры зарегистрированы в положительной полярности при ионизации электроспреем.

Результаты и их обсуждение. На рис. 2 представлены спектры поглощения и люминесценции продуктов реакции преобразования фталатов в этаноле, а также спектры флуоресцеина. Видно, что во всех случаях, включая образец сравнения, не содержащий фталатов, образуется окрашенный продукт, поглощающий в области 439—442 нм, отличный от флуоресцеина, характеризующегося двумя максимумами поглощения при 453 и 482 нм. Формы спектров люминесценции одинаковы для продуктов всех используемых фталатов и продукта контрольного опыта и близки к спектру флуоресце-

ина. Поскольку при проведении контрольного опыта обнаружено, что продукт, способный к зеленой флуоресценции, формируется и в отсутствие фталатов, сделаны следующие предположения: 1) возможно наличие примесей в реактивах, способствующих формированию побочного люминесцирующего продукта; 2) в реакционной системе протекает побочная реакция с участием основных реагентов с формированием люминесцирующего продукта без участия эфиров фталевой кислоты.

Для проверки первого предположения используемый в реакции резорцин предварительно очищался методом колоночной хроматографии и методом возгонки.

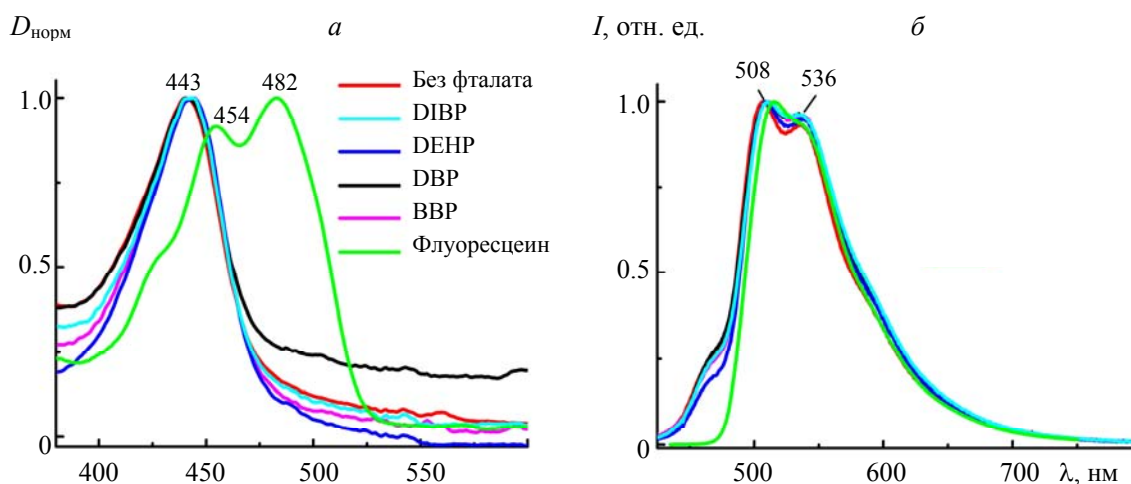


Рис. 2. Спектры поглощения (а) и люминесценции (б) продуктов реакции (без фталата, DIBP, DEHP, DBP, BBP) и флуоресцеина в этаноле; $\lambda_{\text{возб}} = 420$ нм

После прохождения резорцина через колонку с силикагелем собраны 11 фракций резорцина. Для каждой фракции проверена возможность формирования люминесцирующего вещества. Для этого из каждой фракции отобрано 50 мкл раствора резорцина и упарено до сухого остатка, к которому добавлено 10 мкл концентрированной серной кислоты. Все полученные растворы нагревались в течение 15 мин при температуре 125 °С. Сформировавшийся твердый продукт растворен в 1 М растворе NaOH. Продукт из каждой фракции показал зеленую флуоресценцию. Предварительная очистка резорцина методом возгонки показала аналогичный результат. Из этих данных следует вывод об отсутствии влияния примесей в реактиве и собственной способности резорцина формировать люминесцирующие соединения в условиях проведения реакции.

Согласно второму предположению, резорцин способен при протекании реакции формировать побочный продукт, обладающий собственной флуоресценцией. Данное предположение подтверждается тем, что резорцин, вводимый в реакцию в отсутствие фталатов, формирует флуоресцирующий продукт. Способность резорцина формировать собственные флуоресцирующие продукты упоминается в [21, 23], однако точный состав таких продуктов не выяснен. Согласно [21], резорцин подвергается автоконденсации/конденсации с собственными продуктами окисления при нагревании с дегидратирующими агентами. Продукт, полученный в результате подобной реакции, имеет ярко выраженную зеленую флуоресценцию, похожую на флуоресценцию флуоресцеина. Исходя из возможного протекания процесса автоконденсации, авторы [21] предположили структуру одного из возможных продуктов, изображенную на рис. 1, б. Подобная способность резорцина создает серьезные затруднения для использования реакции, описанной в [19], для осуществления не только флуоресцентного анализа фталатов, но и спектрофотометрического. Соотношение количеств флуоресцеина и побочных продуктов зависит от соотношения исходных реагентов — фталатов и резорцина.

Поскольку автоконденсация резорцина до настоящего времени практически не изучена, в данной работе продукты преобразования резорцина исследованы методом жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией, а также более детально изучены их спектрально-люминесцентные свойства. Побочный продукт получен отдельно путем нагревания резорцина в присутствии каталитических количеств концентрированной серной кислоты, очищен от избытка резорцина промыванием водой. Сразу после получения продукт представлял собой вязкую темно-красную смолянистую массу, которая по мере остывания затвердевала. Установлено, что данный продукт хорошо растворим в таких

полярных органических растворителях, как ацетон, этанол, тетрагидрофуран (ТГФ), диметилсульфоксид (ДМСО), частично растворим в воде. При этом он не растворим в неполярных гексане и хлороформе. Для исследования спектральных характеристик продукта измерены спектры поглощения и люминесценции в ряде растворителей и твердом виде и рассчитан относительный квантовый выход люминесценции.

Спектры поглощения и люминесцентные свойства продукта. На рис. 3, а представлены спектры поглощения продукта в растворах и твердого продукта, нанесенного на предметное стекло в виде тонкой пленки. Продукт характеризуется двумя выраженными максимумами, положения и соотношение которых зависят от растворителя: в спирте 460 и 499 нм, в 0.1 М NaOH 484 и 539 нм, в воде 467 и 508 нм, максимумы оптической плотности твердого вещества наиболее коротковолновые (452 и 493 нм).

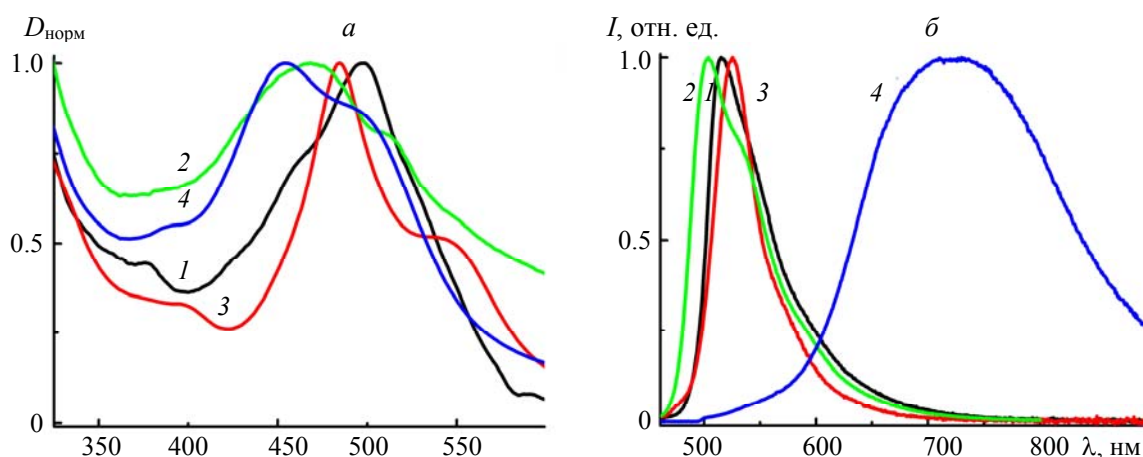


Рис. 3. Спектры поглощения (а) и люминесценции (б) продукта автоконденсации резорцина в растворах в этаноле (1), воде (2), 0.1 М NaOH (3) и в твердом виде (4); $\lambda_{\text{возб}} = 455$ нм

Как видно из рис. 3, б, максимум спектров люминесценции смещается в длинноволновую область при переходе от водного раствора (502 нм) к раствору в этаноле (515 нм) и имеет наибольшее значение в 0.1 М NaOH (525 нм). В твердом виде продукт имеет широкий спектр флуоресценции, максимум которого смещен в красную область видимого диапазона (720 нм), что, вероятно, связано с формированием в пленке молекулярных агрегатов [24, 25]. По сравнению с изолированными хромофорами в растворах именно Н-агрегаты, формирующиеся по принципу π – π -укладки, вызывают синее смещение спектра поглощения и красное смещение спектра флуоресценции [26].

Сравнение спектров люминесценции продукта в этаноле (рис. 2, б и рис. 3, б) при $\lambda_{\text{возб}} = 420$ и 455 нм показывает, что длина волны возбуждения не оказывает значительного влияния на спектр продукта. Рассчитанный относительный квантовый выход продукта автоконденсации резорцина в этаноле 25 %.

Анализ продукта методом жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии. Продукты, которые формирует резорцин в условиях реакции, проанализированы методом жидкостной хроматографии с масс-селективным и диодно-матричным детекторами. На рис. 4, а представлена хроматограмма, зарегистрированная при $\lambda_{\text{рег}} = 400$ нм. В условиях реакции резорцин формирует смесь продуктов, которые имеют молекулярные массы (ММ) от 174 до 362 Да, поглощают в диапазоне 350–500 нм и люминесцируют в зеленой области спектра (табл. 1). На рис. 4, б–д представлены спектры поглощения для четырех основных продуктов (пики 1, 5, 6, 7 из табл. 1) с ММ = 174, 362, 320 и 302 Да соответственно. Поскольку для резорцина ММ = 110.1 г/моль, можно предположить, что основные продукты представляют собой результат автоконденсации с собственными продуктами окисления и разложения.

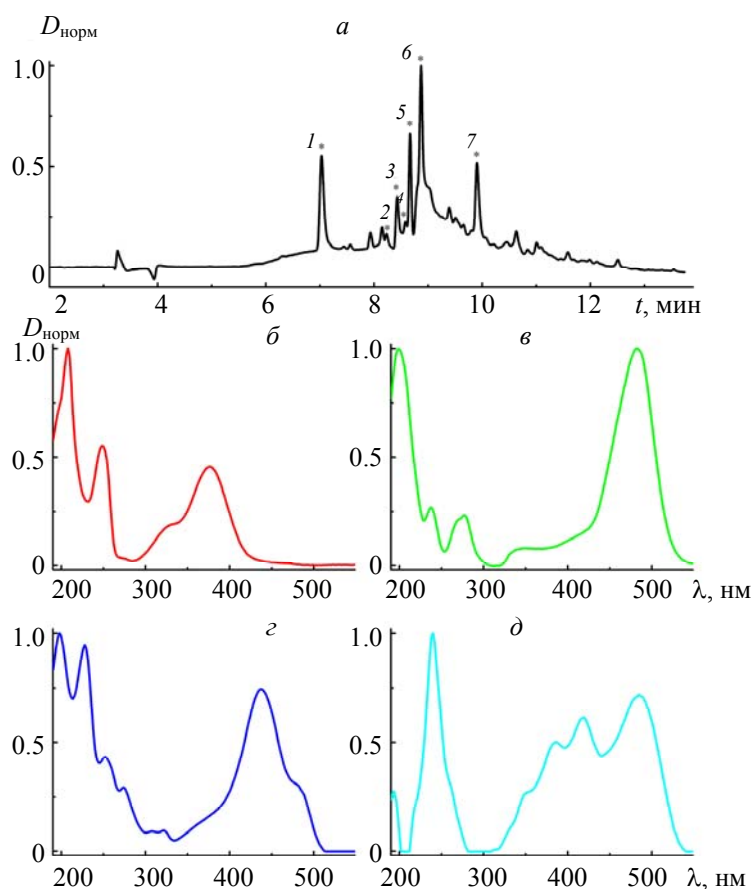


Рис. 4. Хроматограмма смеси продуктов автоконденсации резорцина (а) и спектры поглощения продуктов автоконденсации резорцина (б—д) (в табл. 1 пики 1, 5, 6, 7 соответственно)

Т а б л и ц а 1. Хроматографические пики продуктов автоконденсации резорцина

Пик	RT, мин	$\lambda_{\text{погл}}$, нм	ММ, Да	$[M+H]^+$, m/z
1	7.028	330, 375	174	175
2	8.234	475	254	255
3	8.428	463	268	269
4	8.581	376	250	251
5	8.668	482	362	363
6	8.874	438, 480	320	321
7	9.908	350, 386, 418, 485	302	303

П р и м е ч а н и е. RT — время удерживания, $\lambda_{\text{погл}}$ — максимум спектра поглощения, ММ — молекулярная масса.

Заключение. Применение качественного и количественного флуоресцентного и колориметрического анализа фталатов, основанного на формировании ими флуоресцеина, исходя из полученных данных, затруднено. Установлено, что при реакции превращения фталатов во флуоресцеин протекает побочный процесс, который, вероятно, представляет собой автоконденсацию молекул резорцина с собственными продуктами окисления и разложения. Образующийся побочный продукт состоит как минимум из четырех основных компонентов, характеризующихся собственной зеленой флуоресценцией в полярных растворителях (воде, этаноле, ацетоне, ТГФ, ДМСО), спектр которой полностью перекрывается со спектром флуоресцеина. Относительный квантовый выход флуоресценции для смеси продуктов автоконденсации резорцина в этаноле составил 25 % относительно раствора флуоресцеина в 0.1 М NaOH. В твердом состоянии смесь продуктов флуоресцирует в красной области спектра.

Таким образом, при разработке аналитических методик, основанных на данной реакции, необходимо тщательно подбирать условия пробоподготовки и проведения реакции, чтобы минимизировать или исключить формирование побочных люминесцирующих продуктов. Выяснение природы протекания побочного процесса и установление структуры соответствующих флуоресцирующих продуктов требует дальнейшего изучения.

Авторы выражают благодарность д-ру хим. наук А. В. Барановскому за ценные замечания при обсуждении результатов.

- [1] **R. Navarro, M. P. Perrino, M. G. Tardajos, H. Reinecke.** *Macromolecules*, **43**, N 5 (2010) 2377—2381
- [2] **H. J. Koo, B. M. Lee.** *J. Toxicol. Environ. Health*, **67**, N 24 (2004) 1901—1914
- [3] **R. Kavlock, D. Barr, K. Boekelheide, W. Breslin, P. Breyse, R. Chapin, K. Gaido, E. Hodgson, M. Marcus, K. Shea, P. Williams.** *Reproductive Toxicol.*, **22**, N 3 (2006) 291—399
- [4] **P. Ventrice.** *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **36**, N 1 (2013) 88—96
- [5] **G. Lottrup, A. M. Andersson, H. Leffers, G. K. Mortensen, J. Toppari, N. E. Skakkebaek, K. M. Main.** *Int. J. Andrology*, **29**, N 1 (2006) 172—180
- [6] **L. Na, L. Te, Z. Liting, H. Jun, Y. Lin.** *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **34**, N 3 (2012) 869—875
- [7] **T. Lovekamp-Swan, B. J. Davis.** *Environ. Health Perspectives*, **111**, N 2 (2003) 139—145
- [8] **J. J. Jaakkola, T. L. Knight.** *Environ. Health Perspectives*, **116**, N 7 (2008) 845—853
- [9] **C. Bornehag, E. Nanberg.** *Int. J. Andrology*, **33**, N 2 (2010) 333—345
- [10] **S. Selenskas, M. J. Teta, J. N. Vitale.** *J. Industr. Med.*, **28**, N 3 (1995) 385—398
- [11] **L. López-Carrillo, R. U. Hernández-Ramírez, A. M. Calafat, L. Torres-Sánchez, M. Galván-Portillo, L. L. Needham, R. Ruiz-Ramos, M. E. Cebrián.** *Environ. Health Perspectives*, **118**, N 4 (2009) 539—544
- [12] **K. B. Nelson.** *Pediatrics*, **81**, N 5 (1991) 761—766
- [13] **C. Testa.** *ASN Neuro*, **4**, N 4 (2012) 223—229
- [14] REACH, Plasticizers information center, <https://www.plasticisers.org/regulation/reach/#>
- [15] <https://www.sgs.com/en/news/2019/04/accessing-the-market-european-union-phthalate-regulations>
- [16] Restriction of Hazardous Substances in Electrical and Electronic Equipment (RoHS), European Commission, https://ec.europa.eu/environment/topics/waste-and-recycling/rohs-directive_en
- [17] **M. K. Stanley, K. A. Robillard, C. A. Staples.** *The Handbook of Environmental Chemistry: Phthalate Esters*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, **3**, Pt Q (2003) 12—32
- [18] Enhanced Sensitivity to Detect Phthalates by FT-IR Analysis [Electronic resource], Spectroscopy, <https://www.spectroscopyonline.com/view/enhanced-sensitivity-detect-phthalates-ft-ir-analysis>
- [19] **Y. Hiroyuki, F. Shigehiko.** *Analyt. Sci.*, **35** (2019) 1215—1219
- [20] Determination of certain substances in electrotechnical products. Pt 8: Phthalates in polymers by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), gas chromatography-mass spectrometry using a pyrolyzer/thermal desorption accessory (Py/TD-GC-MS): IEC 62321-8. International Electrotechnical Commission (2017) 14—15
- [21] **A. Banerjee, P. K. Sanyal.** *Indian J. Technol.*, **15**, N 12 (1977) 540
- [22] **C. Würth, M. Grabolle, J. Pauli, M. Spieles, U. Resch-Genger.** *Nature Protocols*, **8**, N 8 (2013) 1535—1550
- [23] **R. E. Flikkema.** Masters Theses: Some Condensation Products of Resorcinol and their Relation to the Phenomenon of Fluorescence, University of Massachusetts Amherst (1923) 13—16
- [24] **M. Kasha, H. R. Rawls, M. A. El-Bayoumi.** *Pure Appl. Chem.*, **11** (1965) 371—392
- [25] **U. Rösch, S. Yao, R. Wortmann, F. Würthner.** *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, N 42 (2006) 7026—7030
- [26] **Y. Deng, W. Yuan, Z. Jia, G. Liu.** *J. Phys. Chem. B*, **118**, N 49 (2014) 14536—14545