

## Preconcentration of Aliphatic Aldehydes $C_1$ – $C_5$ as *o*-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamine Derivatives by Dispersive Liquid–Phase Microextraction

I.B. Zakharkiv, M.F. Zui\*, V.M. Zaitsev

Taras Shevchenko National University of Kyiv, 01033, Kyiv, L'va Tolstogo Str., 12;

\*e-mail: marynazui3@gmail.com

Received: July 23, 2015; Accepted: September 24, 2015

*A simple and efficient method for dispersive liquid–phase microextraction of  $C_1$ – $C_5$  aliphatic aldehydes in form of *o*-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamine derivatives has been developed for their gas chromatographic determination in water samples with flame ionization detector. Various experimental conditions, influencing on the derivatization efficiency of aldehydes and subsequent microextraction efficiency of derivatives (types of extraction and disperser solvents, its volumes, content of salting-out agent) were investigated and optimized. It was found, that for dispersive liquid–phase microextraction of aldehyde derivatives the better is to perform without adding of salting-out agent). Under optimal microextraction conditions (250  $\mu$ L of isopropanol and 80  $\mu$ L of chloroform in for 8.0 mL aqueous sample, pH = 4.0), the enrichment factors of aldehyde derivatives range from 320 to 370-fold with the extraction recovery 87–100 %. After microextraction, a small volume of extraction phase is formed (21  $\mu$ L), and it enable to reach high values of enrichment factors at high extraction recoveries. The detection limit was in the range of 2.4–3.5  $\mu$ g·L<sup>-1</sup> (S/N = 3). The proposed method was successfully utilized for the analysis of tap water with good precision and reproducibility (RSD < 7.4 %).*

**Keywords:** aldehyde determination, pentafluorobenzylhydroxylamine, gas chromatography, preconcentration, dispersive liquid-phase microextraction

## Дисперсійна мікроекстракція для концентрування аліфатичних альдегідів $C_1$ – $C_5$ у формі похідних *o*-(2,3,4,5,6-пентафторбензил)гідроксиламіну

I.Б. Захарків, М.Ф. Зуй\*, В.М. Зайцев

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, 01601, Київ, вул. Льва Толстого, 12;

\*e-mail: marynazui3@gmail.com

Надійшла: 02 юля 2015 г; Прийнята до друку: 12 сентября 2015 г

*Розроблено просту та ефективну методику визначення аліфатичних  $C_1$ – $C_5$  альдегідів у водних розчинах, шляхом їх дисперсійно рідинної мікроекстракції у формі похідних з *o*-(2,3,4,5,6-пентафторбензил)-гідроксиламіном і подальшим газохроматографічним визначенням з полуменево-іонізаційним детектором. Досліджено та оптимізовано параметри, що впливають на ефективність проведення дериватизації альдегідів та наступного мікроекстракційного вилучення утворених дериватів (рН водної проби, тип екстракційного і дериватизуючого розчинників, їх об'єми, вміст висолювача). Встановлено, що дисперсійну рідинну мікроекстракцію похідних альдегідів краще проводити без додавання висолювача. В оптимальних умовах проведення дисперсійної мікроекстракції (250 мкл ізопропанолу і 80 мкл хлороформу для об'єму водної проби 8.0 см<sup>3</sup>, рН = 4.0) коефіцієнти концентрування дериватів альдегідів склали 320–370 при їх ступенях вилучення 87–100%. Після проведення мікроекстракції утворюється екстракційна фаза малого об'єму (21 мкл), що при високих ступенях вилучення дозволяє досягти високих значень коефіцієнтів концентрування. Межі виявлення альдегідів, розраховані за 3s-критерієм, склали 2.4–3.5 мкг/дм<sup>3</sup>. Запропонована методика була успішно застосована для аналізу водопровідної води, і характеризується хорошою точністю та відтворюваністю (Sr < 7.4%).*

**Ключові слова:** визначення альдегідів, пентафторбензилгідроксиламін, газова хроматографія, концентрування, дисперсійна рідинна мікроекстракція

Знезараження водопровідної води перед використанням є важливою частиною підготовки води. У результаті дезінфекції питної води можуть утворюватися токсичні побічні продукти. Прикладом таких сполук є низькомолекулярні альдегіди, які утворюються з гумусових речовин у процесі хлорування та озонування води [1]. Так, після обробки модельних розчинів гумінової кислоти і проб природної води з річок Дніпра і Десни озonom і озonom спільно з УФ-випромінюванням, методом хромато-мас-спектрометрії ідентифіковано 9 альдегідів. Серед них виявлено 5 аліфатичних альдегідів: формальдегід, ацетальдегід, пропаналь, бутаналь і пентаналь [2–3].

Альдегіди характеризуються широким спектром токсичної дії на організм людини. Вони володіють алергенною дією, можуть провокувати шкірні захворювання, негативно впливати на генетичний матеріал, репродуктивні органи, дихальні шляхи, печінку, шкірний покрив, а також на центральну нервову систему. Токсичність альдегідів зменшується при збільшенні їх молекулярної маси. Також відомим фактом є те, що насичені альдегіди більш токсичні, ніж ненасичені [4–5]. Вміст альдегідів лімітується державними нормативними документами (ДСанПіН 2.2.4-171-10), згідно з якими концентрація формальдегіду в питній воді не повинна перевищувати 0.05 мг/дм<sup>3</sup> [6].

Пряме хроматографічне визначення коротколанцюгових альдегідів є досить складною задачею через їх високу полярність, леткість і невеликий розмір молекул. Тому при пробопідготовці необхідне використання реакції дериватизації – переведення сполук у похідні з кращими аналітичними характеристиками: меншою полярністю, більшою хімічною та термостабільністю, більшою молекулярною масою. Для вилучення альдегідів перед їх хроматографічним визначенням використовують різні розроблені екстракційні методи з попередньою дериватизацією. Найбільш відомими з них є дериватизація з 2,4-дінитрофенілгідразіном з подальшою рідинною екстракцією дихлорметаном або твердофазною екстракцією і визначенням високоефективною рідинною хроматографією (ВЕРХ) [7], а також дериватизація з о-(2,3,4,5,6-пентафторбензил)гідроксиламіном (ПФБГА) з подальшою рідинною екстракцією гексаном і газохроматографічним (ГХ) визначенням [8–9]. Ці методи пробопідготовки альдегідів запропоновані Міністерством з охорони навколишнього середовища США (US EPA). Перевага застосування дериватизації для газохроматографічного визначення сполук з низькою молекулярною масою полягає в тому, що похідні володіють меншою гідрофільністю, а збільшення молекулярної маси дериватів сприяє підвищенню чутливості і селективності визначення [10]. Однак відомі методи рідинної або твердофазної екстракції альдегідів мають досить

високу собівартість і є екологічно небезпечними, оскільки використовують різні сорбенти, пристрої для сорбції та великі кількості органічних розчинників, а також мають низькі коефіцієнти концентрування.

Сучасними тенденціями пробопідготовки в аналітичній хімії є мініатюризація, спрощення і пришвидшення аналітичної процедури, мінімізація споживання реагентів і вартості аналізу, а також досягнення при цьому високих значень коефіцієнтів концентрування та ступенів вилучення аналітів. Одним з методів, що відповідає таким вимогам, є дисперсійна рідинна мікроекстракція (ДРМЕ), яка на сьогоднішній день знаходить широке застосування в аналітичній хімії і добре поєднується з методом ГХ [11].

Метою даної роботи є дослідження умов виділення і концентрування аліфатичних альдегідів  $C_1$ – $C_5$  у формі похідних ПФБГА з водних розчинів методом ДРМЕ з подальшим їх визначенням методом ГХ з полуменевіо-іонізаційним детектором (ПІД).

#### Методика експерименту

У роботі використовували формальдегід, ацетальдегід, пропаналь, бутаналь і пентаналь фірми «Sigma Aldrich», о-(2,3,4,5,6-пентафторбензил)гідроксиламін гідрохлорид (ПФБГА) фірми «Fluka». Органічні розчинники: ацетонітрил, ацетон, метанол, етанол, ізопропанол (в якості диспергуючих, кваліфікація «для ВЕРХ») тетрахлорметан, хлороформ, дихлорметан (в якості екстракційних, кваліфікація «х.ч.»). рН створювали за допомогою 0.1 М розчину НСІ, 0.01 М розчину КОН, ацетатних і фосфатних буферних розчинів.

Визначення проводили на газоматричному хроматографі Agilent Technologies 6890N в таких умовах: капілярна колонка HP-5, 30 м x 0.32 мм x 0.25 мкм; швидкість потоку газу-носія гелію 2.5 мл/хв.; температурна програма печі 50 °С (1 хв.), 50–150 °С (10 °С/хв.), 150–300 °С (20 °С/хв.), 300 °С (5 хв.); температура випарника 250 °С; режим без ділення потоку (splitless), температура детектора 300 °С.

Вихідні стандартні розчини альдегідів з концентрацією 1 г/дм<sup>3</sup> готували послідовним розчиненням формальдегіду ( $C_1$ ), ацетальдегіду ( $C_2$ ), пропаналю ( $C_3$ ), бутаналю ( $C_4$ ) і пентаналю ( $C_5$ ) в метанолі, зберігали в холодильнику. Стандартний розчин суміші альдегідів з концентрацією 0.1 ммоль/дм<sup>3</sup> готували безпосередньо в день проведення досліджень шляхом розбавлення вихідних стандартних розчинів бідистильованою водою. Для розробки методики використовували водний розчин з концентрацією кожного альдегіду 1.0 мкмоль/дм<sup>3</sup>. Стандартний розчин ПФБГА з концентрацією 1.0 г/дм<sup>3</sup> готували розчиненням 5.0 мг наважки реагенту в 5.0 см<sup>3</sup> бідистильованої

води.

ДРМЕ проводили таким чином: у віалу з водним розчином альдегідів додавали ацетатний буферний розчин з рН 4.0, стандартний розчин ПФБГА, залишали на 30 хв. Загальний об'єм водної проби складав 8.0 см<sup>3</sup>. Потім до розчину додавали суміш диспергуючого і екстракційного розчинників, струшували вручну розчин впродовж 2 хв, після чого утворену емульсію центрифугували 5 хв при швидкості 4000 об/хв. Утворену в результаті центрифугування каплю екстракту використовували для ГХ аналізу.

### Результати та їх обговорення

Для переведення альдегідів у зручну для екстракційного вилучення та хроматографічного визначення аналітичну форму була застосована їх попередня дериватизація за допомогою ПФБГА. Можливість застосування ДРМЕ для концентрування аліфатичних альдегідів з водних розчинів після їх попередньої дериватизації вивчали на модельних розчинах, що містили 5 досліджуваних альдегідів. Для кількісного та ефективного проведення дериватизації було досліджено вплив таких умов: рН проби, концентрація дериватизуючого реагенту, час, температура. Хроматограма суміші альдегідів з концентрацією кожного 1 мкмоль/дм<sup>3</sup> після їх дериватизації наведена на рис. 1. Деривату формальдегіду на хроматограмі відповідає один пік, а деривати всіх інших альдегідів виходять у вигляді двох піків, оскільки в процесі дериватизації утворюються два геометричні ізомери оксимів.

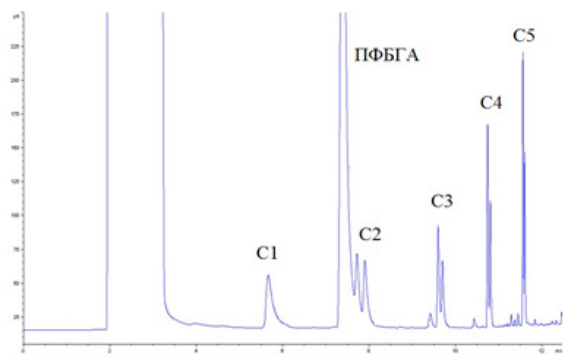


Рис. 1. Хроматограма стандартної суміші альдегідів після їх дериватизації ПФБГА.

Оскільки дериватизуючий агент і утворені оксими володіють кислотно-основними властивостями, маючи аміно- та оксимну групу, відповідно, то ефективність ДРМЕ продуктів дериватизації залежить від рН. Дослідження показали, що вилучення дериватів найкраще проходить у діапазоні рН 4.0–8.0. Оптимальним було обрано рН 4.0, оскільки зі збільшенням рН доля молекулярної форми ПФБГА ( $pK_a = 3.75$ ) збільшується і відповідно стає вищим хроматографічний пік реагенту, а це призводить до

часткового перекривання піків ПФБГА та деривату ацетальдегіду.

При фіксованому часі проведення дериватизації (2 год.) досліджено вплив концентрації ПФБГА на ефективність проведення дериватизації, далі при фіксованій оптимальній концентрації дериватизуючого реагенту (25 мкмоль/л) досліджено вплив часу на повноту утворення дериватів. Для повного завершення процесу дериватизації достатньо 30 хв.

Далі досліджено вплив основних параметрів ДРМЕ на ефективність вилучення аналітів: природа екстракційного і диспергуючого розчинників, їх об'єми, і вміст висолювача. Принцип ДРМЕ полягає в тому, що до водного розчину додається суміш диспергуючого і екстракційного розчинників, при цьому утворюється емульсія, яку далі центрифугують. У результаті цього утворюється капля екстракту, яку використовують для аналізу. Особливістю ДРМЕ є різке збільшення поверхні масообміну при диспергуванні екстракційного розчинника на мікрочастинки за рахунок диспергатора, в результаті чого міжфазна рівновага встановлюється доволі швидко [12].

Вибір оптимального екстракційного розчинника є основним параметром у ДРМЕ. Для використання у даному методі вилучення він повинен задовольняти ряд вимог: мати більшу густину, ніж густина води, низьку розчинність у воді, а також утворювати дрібнодисперсну емульсію в присутності диспергуючого розчинника. Цим вимогам відповідають хлорвмісні органічні розчинники: тетрахлорметан, хлороформ і дихлорметан. Оскільки ці розчинники мають різну розчинність у воді, то для отримання екстракційної фази після проведення ДРМЕ були використані різні об'єми кожного з них: 40 мкл тетрахлорметану, 80 мкл хлороформу і 160 мкл дихлорметан. Об'єм ацетонітрилу (диспергатор) становив 350 мкл. Як видно з рис. 2, оптимальним екстракційним розчинником є хлороформ, оскільки він найкраще вилучає ( $R > 80\%$ ) усі досліджувані оксими альдегідів при однаковому об'ємі утворених краплин.

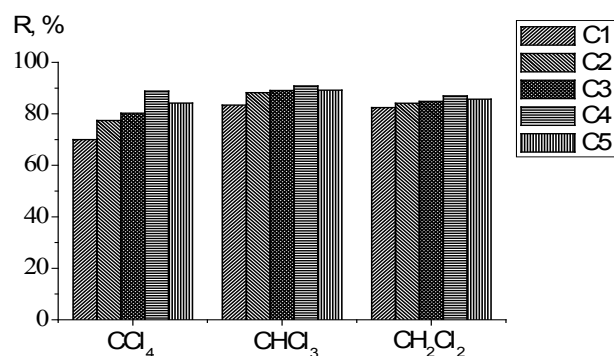
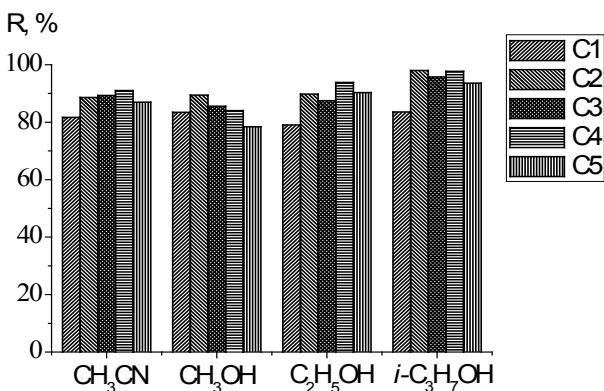


Рис. 2. Залежність ступенів вилучення похідних альдегідів від характеру природи екстракційного розчинника, V (ацетонітрилу) = 350 мкл.



Загалом, для всіх досліджуваних екстракційних розчинників ступені вилучення похідних зростають (крім похідного пентаналу) при збільшенні їх гідрофобності.

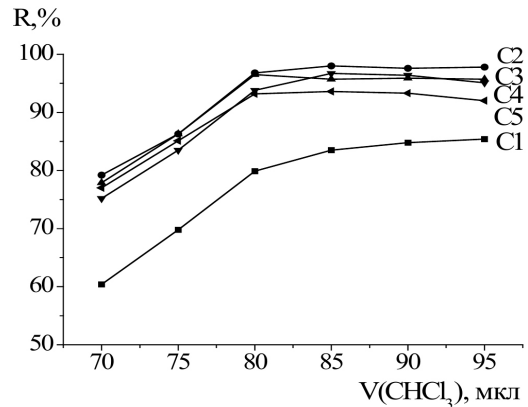
Основним критерієм при виборі диспергуючого розчинника є його змішуваність як з водою, так і з екстракційним розчинником. Ця властивість сприяє зниженню міжфазного поверхневого натягу між двома фазами та подрібненню крапель екстракційного розчинника у водній фазі. В якості диспергуючого розчинника були досліджені наступні розчинники: ацетонітрил, метанол, етанол та ізопропанол. Ацетон не використовували, оскільки він швидко реагує з надлишком ПФБГА, і пік продукту цієї реакції повністю перекриває пік деривату ацетальдегіду. Для отримання екстракційних фаз приблизно однакового об'єму використовували різні об'єми хлороформу для різних диспергаторів: ацетонітрил (об'єм хлороформу 80 мкл), метанол (об'єм 95 мкл), етанол (об'єм 90 мкл), ізопропанол (об'єм 85 мкл). Найвищі ступені вилучення дериватів спостерігалися при використанні ізопропанолу, тому його і було обрано як оптимальний дисперсійний розчинник (рис. 3).



**Рис. 3.** Залежність ступенів вилучення похідних альдегідів від характеру природи диспергуючого розчинника,  $V$  (диспергуючих розчинників) = 350 мкл.

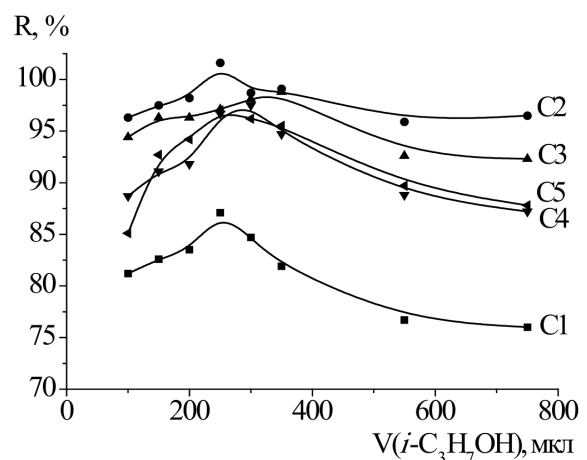
Досліджено залежність ступенів вилучення похідних альдегідів від об'єму екстракційного розчинника (рис. 4). При цьому об'єм диспергуючого розчинника залишали постійним (350 мкл), зменшуючи об'єм екстракційного розчинника від 95 до 70 мкл. Об'єм утвореної при цьому екстракційної фази лінійно зменшувався від 41 до 10 мкл. Зі зменшенням об'єму хлороформу хроматографічний сигнал дериватів збільшується, оскільки аналіти концентруються в меншому об'ємі екстракційного розчинника. Але при використанні об'ємів його менше 80 мкл спостерігається різке зменшення ступенів вилучення, а також погіршення відтворюваності результатів аналізу. У діапазоні об'ємів 80–95 мкл ступені вилучення для всіх похідних альдегідів залишаються практично однаковими. Тому оптимальним було обрано об'єм

хлороформу 80 мкл.



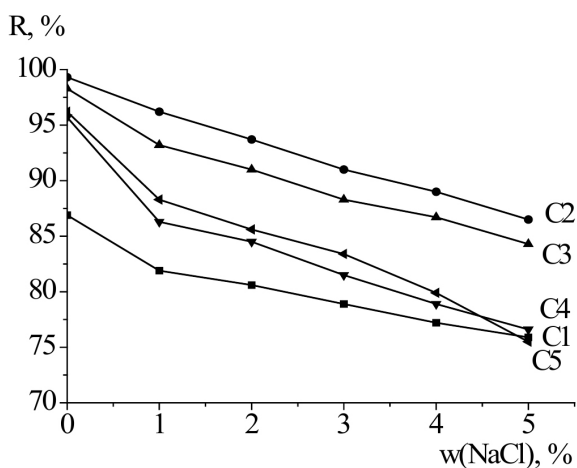
**Рис. 4.** Залежність ступенів вилучення похідних альдегідів від об'єму екстракційного розчинника (хлороформу),  $V$  (ізопропанолу) = 350 мкл.

Оптимізацію об'єму диспергуючого розчинника проводили при постійному об'ємі екстрагенту (80 мкл), розчиняючи його у різних об'ємах ізопропанолу в діапазоні 100–750 мкл. В цих умовах об'єм утвореної акцепторної фази зменшувався від 24 до 18 мкл, що пов'язано зі збільшенням розчинності хлороформу у водно-ізопропанольному середовищі, яке не перекривається збільшенням вмісту диспергатора в акцепторній фазі. Слід зазначити, що при збільшенні кількості доданого ізопропанолу від 100 до 750 мкл його вміст у екстракційній фазі зростає лінійно від 0.5 до 5.2%. Оптимальним було обрано об'єм 250 мкл, оскільки при цьому спостерігаються максимальні ступені вилучення дериватів (рис. 5). При зменшенні кількості диспергуючого розчинника погіршується ефективність диспергування екстракційного розчинника на мікротроплянці, а при збільшенні спостерігається збільшення розчинності аналітичних форм у водно-ізопропанольній фазі.



**Рис. 5.** Залежність ступенів вилучення похідних альдегідів від об'єму диспергуючого розчинника (ізопропанолу),  $V$  (хлороформу) = 80 мкл.

При оптимальних об'ємах органічних розчинників вивчено вплив вмісту висолювача на ефективність ДРМЕ похідних альдегідів. Додавання неорганічних солей може як покращувати (за рахунок зменшення розчинності аналітів у воді) так і погіршувати ефективність ДРМЕ (за рахунок зменшення коефіцієнтів дифузії аналітів). Постановка даного експерименту була наступною: при збільшенні кількості доданого хлориду натрію від 0 до 5% об'єм доданого хлороформу зменшували від 80 до 65 мкл для досягнення сталого об'єму утвореної екстракційної фази (це пов'язано з тим, що за рахунок ефекту висолювання розчинність хлороформу у воді зменшується). На рис. 6 можна побачити, що зі збільшенням вмісту хлориду натрію ступені вилучення падають. Тому ДРМЕ похідних альдегідів краще проводити без додавання висолювача.



**Рис. 6.** Залежність ступенів вилучення похідних альдегідів від концентрації хлориду натрію,  $V$  (ізопропанолу) = 250 мкл,  $V$  (хлороформу) = 80–65 мкл.

Також встановлено, що зі збільшенням вмісту хлориду натрію до 5% об'ємна частка ізопропанолу лінійно зростає від 1.3 до 1.9%. Невелика зміна у складі екстракційної фази не може сильно вплинути на її екстрагуючу здатність. Тому причиною зменшення ступенів вилучення похідних альдегідів може бути погіршення масопереносу аналітів за рахунок зменшення коефіцієнтів дифузії, а також погіршення диспергування хлороформу ізопропанолом через збільшення міжфазного поверхневого натягу. В оптимальних умовах проведення ДРМЕ об'єм краплини екстракційної фази після центрифугування складає 21 мкл.

В оптимальних умовах проведення ДРМЕ розраховано її кількісні характеристики. Коефіцієнти концентрування ( $K_{ald}$ ) і ступені вилучення ( $R, \%$ ) для різних похідних альдегідів варіюються в діапазоні 320–370 і 87–100 %, відповідно. Це дозволило при обраному методі детектування досягти меж виявлення (МВ) для окремих альдегідів, розрахованих за 3 $\sigma$ -критерієм, в діапазоні 2.4–3.5 мкг/дм<sup>3</sup> (табл. 1), що у 15–20 разів нижче рівня ГДК найбільш токсичного формальдегіду.

**Таблиця 1.** Характеристики ДРМЕ і ГХ-ПІД визначення альдегідів.

Компонент	$K_{ald}$	$R, \%$	МВ, мкг/дм <sup>3</sup>
формальдегід	320	87	2.5
ацетальдегід	370	100	2.5
пропаналь	360	98	3.2
бутаналь	360	100	2.4
пентаналь	340	94	3.5

Розроблена методика була апробована при аналізі водопровідної води, взятої в нашій лабораторії, методом «введено-знайдено». Отримані дані (табл. 2) підтверджують точність і відтворюваність даної методики.

**Таблиця 2.** Результати ГХ-ПІД аналізу водопровідної води після ДРМЕ з методом добавок ( $n=3$ ,  $P=0.95$ ).

Компонент	Знайдено, мкг/дм <sup>3</sup>	Введено 10 мкг/дм <sup>3</sup>		Введено 50 мкг/дм <sup>3</sup>	
		Знайдено, мкг/дм <sup>3</sup>	$S_r, \%$	Знайдено, мкг/дм <sup>3</sup>	$S_r, \%$
формальдегід	~ 4	14 ± 3	7.3	50 ± 4	2.9
ацетальдегід	–	11 ± 2	6.0	49 ± 2	1.9
пропаналь	–	10 ± 2	6.9	46 ± 4	3.7
бутаналь	–	9 ± 2	7.4	43 ± 4	4.2
пентаналь	–	11 ± 1	4.3	52 ± 4	2.8

## Висновки

Розроблено просту, швидко і ефективну методику вилучення і концентрування альдегідів у формі їх похідних ПФБГА з водних зразків із застосуванням ДРМЕ з наступним визначенням методом ГХ-ПІД. Показано, що природа, кількість екстракційного та дисперсійного розчинників, концентрація хлориду натрію відіграють визначальну роль у ефективності ДРМЕ. В

оптимальних умовах досягнуті досить високі значення коефіцієнтів концентрування та ступенів вилучення аналітів. Межі виявлення альдегідів при цьому методі детектування, розраховані за 3 $\sigma$ -критерієм, знаходяться на рівні декількох мкг/дм<sup>3</sup>. Запропонована методика характеризується хорошою точністю та відтворюваністю, і була успішно застосована для аналізу водопровідної води.

### Література

1. Hebert A., Forestier D., Lenés D. Innovative method for prioritizing emerging disinfection by-products (DBPs) in drinking water on the basis of their potential impact on public health. *Water Research*. 2010, 44, 3147–3165.
2. Миліюкін М.В., Вакуленко В.Ф., Гончарук В.В. Исследование карбонильных продуктов окисления гуминовой кислоты озоном и совместно озоном и УФ-излучением. *Укр. хим. журн.* 2006, 72(11–12), 102–107.
3. Миліюкін М.В., Вакуленко В.Ф., Гончарук В.В. Состав карбонильных соединений при озонировании и ОЗ/УФ-обработке воды. *Укр. хим. журн.* 2007, 73(3–4), 48–55.
4. Richardson S., Plewa M., Wagner E. Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: a review and roadmap for research. *Mutation Research*. 2007, 636, 178–242.
5. O'Brien P., Siraki A., Shangari N. Aldehyde Sources, Metabolism, Molecular Toxicity Mechanisms, and Possible Effects on Human Health. *Critical Reviews in Toxicology*. 2005, 35, 609–662.
6. Закон України «Про питну воду та питне водопостачання» від 10.01.2002, № 2918-III.
7. U.S. Environmental Protection Agency (EPA), Method 8315A: determination of carbonyl compounds by high performance liquid chromatography (HPLC), Revision 1, December 1996.
8. U.S. Environmental Protection Agency (EPA), Method 556: determination of carbonyl compounds in drinking water by pentafluorobenzylhydroxylamine derivatization and capillary gas chromatography with electron capture detection Revision 1.0, June 1998.
9. Gabrio T., Bertsch A. Determination of carbonyl compounds in pool water with O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamine hydrochloride and gas chromatographic–tandem mass spectrometric analysis. *J. Chromatogr. A*. 2004, 1046, 293–296.
10. Neng N., Nogueira J. Determination of Short Chain Carbonyl Compounds in Drinking Water Matrices by Bar Adsorptive Micro-Extraction with In-Situ Derivatization. *Anal. Bioanal. Chem.* 2010, 398, 3155–3163.
11. Zgoła-Grzeskowiak A., Grzeskowiak T. Dispersive liquid-liquid microextraction. *Trends in Anal. Chem.* 2011, 30, 1382–1389.
12. Крылов В.А., Крылов А.В., Мосягин П.В., Маткивская Ю.О. Жидкофазное микроэкстракционное концентрирование примесей. *Журн. аналит. химии.* 2011, 66(4), 341–360.