

## МЕТОДИ І МЕТОДИКИ

© М.В. Григор'єва

УДК 543.544:542.63:547.562.1

*М.В. Григор'єва*

## ЗАСТОСУВАННЯ ТВЕРДОФАЗНОЇ ЕКСТРАКЦІЇ ТА МЕТОДУ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ МІКРОКІЛЬКОСТЕЙ ФЕНОЛУ У ВОДНИХ РОЗЧИНАХ

Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (м. Київ)

Робота виконана у рамках науково-дослідної теми (№ державної реєстрації 0109U001588).

**Вступ.** Необхідність пошуку нових полімерних матеріалів медичного призначення зумовлена їхньою потребою в різних областях фармакології, медицини, біотехнології [7].

Відомо, що полімерні матеріали та вироби на їхній основі з часом старіють. Це призводить до зміни властивостей полімерів. Вони стають менш міцними, еластичними, твердими та таке інше. У більшості випадків для захисту полімерів від старіння застосовують ефективні синтетичні інгібітори старіння, які переважно є антиоксидантами. До них відносять ароматичні аміни (дифеніламін, *p*-амінофенол), феноли, продукти конденсації альдегідів та кетонів з ароматичними амінами [8]. Всі ці сполуки є гепатотоксичними, тобто вони спричинюють структурно-функціональні порушення печінки, тому при розробці полімерних композицій, а у подальшому і виробів з них, важливо проводити оцінку щодо вивільнення з них токсичних домішок [2].

Одним із шляхів моніторингу полімерів медичного призначення може бути розробка адекватних методів, що дозволяють оцінювати вивільнення із полімерів токсичних сполук та кількісно визначати ступінь їхньої міграції в оточуюче середовище.

**Мета роботи** – розробити чутливу і надійну методику визначення мікрокількості фенолу у водному розчині з використанням твердофазної екстракції (ТФЕ) та обернено-фазової вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).

**Об'єкт і методи дослідження.** Реагенти та стандарти: Amberlite XAD-2, XAD-4, XAD-7 (Supelco, США); фенол, метанол (Supelco, США); ацетон (Хімлаборреактив, Україна). Об'єкти дослідження. Твердофазні екстрагенти – Amberlity, розчини фенолів, зразки з заданим вмістом фенолів. Обладнання: аналітичні ваги, іономер, хроматограф, Методи дослідження: обернено-фазова ВЕРХ з УФ-детектором.

Процедура твердофазної екстракції (ТФЕ). До першого їхнього використання, сухі сорбенти XAD-2, XAD-4 та XAD-7 вносили у бюретки на 20 мл до позначки 10 мл. Потім додавали ацетон, перемішували і залишали на 24 години для набування. Після досягнення рівноважного стану промивали

дистильованою водою до зникнення запаху ацетону, наносили на сорбент водні зразки фенолу (10 мл) і через 10 хвилин проводили десорбцію фенолу ацетоном. Елюент збирали та упарювали на водоструминному насосі. До осаду, що утворився, додавали 0,5 мл мобільної фази, фільтрували та аналізували на вискоєфективному рідинному хроматографі (LKB, Швеція) з УФ-детектором.

Стандартні розчини фенолу з різними концентраціями готували з основного розчину з масовою концентрацією 2,0 мг/мл відповідним розведенням, так щоб охопити передбачуваний діапазон дії методики.

Хроматографічний аналіз. Концентрацію фенолу вимірювали, використовуючи колонку Supelcosil LC-8 (15 см x 4,6 мм, 5 мкм) та мобільну фазу, що містила суміш метанолу і води ( $v/v = 40:60$ ). Швидкість потоку елюенту становила 1,0 мл/хв, довжина хвилі – 254 нм, температура вимірювання – 20о С. Концентрацію фенолу розраховували методом зовнішнього стандарту [3]. Кожний розчин інjektували 2-3 рази. За кінцевий результат вимірювань приймали середнє арифметичне значення результатів двох паралельних визначень, допустиме відносне розходження між котрими не перевищувало  $\pm 2s$  [6].

**Результати досліджень та їх обговорення.** Як відомо [5], розробка методу аналізу складається з низки стадій: відбору проби, зберігання зразка, виділенню аналіту з матриці, очищенню та ідентифікації проби, вимірюванню її кількості. Виділення фенолу з полімерної матриці, у даному дослідженні було змодельоване, тобто вимірювали стандартні водні розчини з різними концентраціями фенолу. При вимірюванні цих розчинів фенолу встановили, що лінійний відгук детектора знаходиться у діапазоні концентрацій від 0,1 до 5,0 мг/мл, а межа виявлення фенолу – 0,02 мг/мл. Збіжність і відтворюваність методу між днями вимірювань, розраховані по відносному стандартному відхиленню ( $n=5$ ) при концентрації фенолу 0,1 мг/мл, дорівнювали 13,5 та 20,8% відповідно. Одержані результати показали, що чутливість методу недостатня для визначення мікрокількостей фенолу, тому у подальшому для покращання вимірювань застосували твердофазну екстракцію на етапі підготовки проби. Цей підхід

## МЕТОДИ І МЕТОДИКИ

дозволяє концентрувати зразки і, тим самим, значно підвищувати чутливість методу.

Концентрування фенолів (з низькою межею виявлення) за допомогою ТФЕ проводять на активованому вугіллі, хімічно модифікованих кремнеземах, або на полімерних сорбентах [1]. У даній роботі, використовувалися полімерні адсорбційні матеріали нового типу – Amberlite, що поєднують у собі високу ємність, механічну міцність та хімічну стабільність.

Amberlite – це гідрофобні пористі полімерні сорбенти на основі зшитого полістирол-дивінілбензолу (XAD-2, XAD-4), або на основі більш гідрофільного аліфатичного акрилового полімеру (XAD-7). Ці адсорбенти завдяки своїм функціональним групам, які утворюють пори, мають високу адсорбційну ємність, що дозволяє вилучати феноли (навіть у дуже низьких концентраціях) із розчинів. Фізичні характеристики цих сорбентів наведено в **табл. 1**.

Таблиця 1

**Фізичні характеристики пористих полімерних сорбентів**

Сорбенти	Хімічна природа	Площа поверхні,	Об'єм пор,	Середній діаметр пор,	Коефіцієнт набухання в ацетоні
		мг/г	см <sup>3</sup> /г	нм	
XAD-2	Сополімер стирол-дивінілбензолу	350	0,65	9,0	1,3
XAD-4	Сополімер стирол-дивінілбензолу	780	0,98	5,0	1,4
XAD-7	Акриловий полімер	450	1,14	9,0	1,5

Результати дослідження впливу кислотності середовища у діапазоні рН від 2,5 до 4,8 на властивості сорбентів вилучати фенол з розчину представлені в **табл. 2**. Цю залежність оцінювали по кінцевій концентрації фенолу у зразках (після 10-ти хв експозиції на сорбенті), який вимірювали методом ВЕРХ та виражали у вигляді R (recovery, %): де

$$R = \left( \frac{\text{знайдено аналіта}}{\text{взято аналіта}} \right) \times 100\%.$$

Найкращими були результати одержані на Amberlite XAD-7 ( $R = 96 \pm 20\%$ ) при рН 3,2.

Таблиця 2

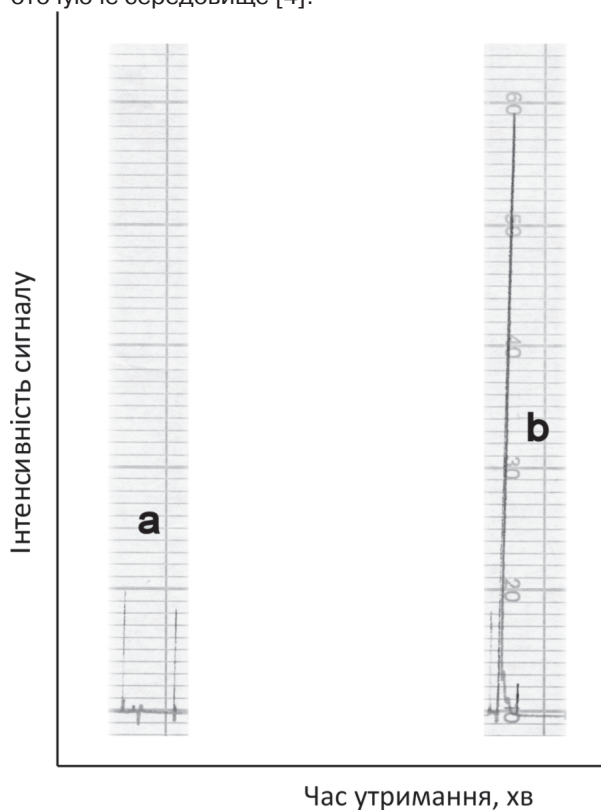
**Залежність адсорбційних властивостей полімерних сорбентів від рН розчину ( $M \pm m, n=5$ )**

Сорбенти	Концентрація фенолу, мг/л		
	рН 2,5	рН 3,2	рН 4,8
XAD-2	0,036 ± 0,011	0,031 ± 0,011	0,03 ± 0,08
XAD-4	0,04 ± 0,010	0,041 ± 0,010	0,034 ± 0,010
XAD-7	0,043 ± 0,010	0,048 ± 0,009	0,039 ± 0,008

На **рис.** показано хроматограму фенолу (0,05 мг/л) без застосування ТФЕ (а) та після концентрування зразка за допомогою ТФЕ на XAD-7 (b). Як видно, без концентрування проби пік фенолу практично відсутній (знаходиться на рівні базової лінії), а після ТФЕ – є таким, який можна обраховувати.

Таким чином, після оптимізації параметрів твердофазної екстракції та застосування цієї процедури для концентрування фенолу з водного розчину, чутливість ВЕРХ методу підвищилася майже на два порядки. Встановлено, що межа кількісного визначення фенолу в досліджуваних екстрактах без попередньої ТФЕ була  $0,02 \pm 0,001$  мг/мл, стандартне відхилення при цьому дорівнювало 6% ( $P \leq 0,05$ ),

тоді як вилучення його з екстрактів за допомогою полімерного носія Amberlite XAD-7 дозволяє вимірювати феноли у мінімально допустимій концентрації  $0,05 \pm 0,01$  мг/л, стандартне відхилення при цьому становить 20% ( $P \leq 0,05$ ), що узгоджується з нормативами допустимої кількості міграції (ДКМ) фенолу в оточуюче середовище [4].



**Рис. Типова хроматограма фенолу. Мобільна фаза: MeOH:H<sub>2</sub>O, 40:60, (v/v); рН 3,2, колонка Supelcosil LC-8, температура – 20оС: а – без концентрування на XAD-7; б – з концентруванням на XAD-7, пік фенолу – 0,05 мг/л.**

**Висновки.** Модифіковано метод проведення аналізу фенолів у водному розчині, який включає попереднє концентрування мікрокількостей фенолу на полімерному сорбенті Amberlite XAD-7 та вимірювання концентрації фенолу методом обернено-фазової ВЕРХ, що дозволило підвищити чутливість методу,

зробило аналіз більш надійним та стабільним, покращило умови вимірювання. Визначення фенолів у водному розчині на рівні 0,05 мг/л дозволяє застосовувати запропонований метод для контролю дотримання гігієнічного нормативу щодо допустимої кількості міграції фенолу в оточуюче середовище.

### Список літератури

1. Зайцев М.В. Методи концентрування та визначення фенольних сполук / М.В. Зайцев, В.А. Халаф, Г.М. Зайцев // Методы и объекты химического анализа. – 2008. – Т.3, №1. – С. 4-21.
2. Куценко С.Ф. Основы токсикологии / С.Ф. Куценко // С.-Петербург: Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова. – 2002. – Т.4. – 119 с.
3. Кэц Э. Количественный анализ хроматографическими методами / Э.Кэц. - М.: Мир, 1990. – 310 с.
4. СанПиН 42-123-4240-86 "Санитарные нормы. Допустимые количества миграции (ДКМ) химических веществ, выделяющихся из полимерных и других материалов, контактирующих с пищевыми продуктами и методы их определения".
5. Сычев К.С. Материалы и методы пробоподготовки в хроматографии: твердофазное концентрирование и адсорбционная очистка / К.С. Сычев, В.А. Даванков // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2004. – Т.4, №1. – С. 5-28.
6. Эпштейн Н.А. Оценка пригодности (валидация) ВЭЖХ-методик в фармацевтическом анализе / Н.А. Эпштейн // Хим.-фарм. журн. – 2004. – Т.38, №4. – С.40-56.
7. Bajpai A.K. Responsive polymers in controlled drug delivery / A.K. Bajpai, S.K. Shukla, S. Bhanu, S. Kankane // Progress in Polymer Science. – 2008. – V.33. – P. 1088-1118.
8. Vogl O. Head to head polymers / O. Vogl, M.F. Qin, A. Zilka // Progress in Polymer Science. – 1999. – V.24, №10. – P. 1481-1525.

УДК 543.544:542.63:547.562.1

### ЗАСТОСУВАННЯ ТВЕРДОФАЗНОЇ ЕКСТРАКЦІЇ ТА МЕТОДУ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ МІКРОКІЛЬКОСТЕЙ ФЕНОЛУ У ВОДНИХ РОЗЧИНАХ

Григор'єва М.В.

**Резюме.** Розроблено чутливу та надійну методику визначення мікрокількостей фенолу у водному розчині з використанням твердофазної екстракції (ТФЕ) на Amberlite XAD-7 та обернено-фазової високоєфективної рідинної хроматографії. Показано, що концентрування фенолу за допомогою ТФЕ на Amberlite XAD-7 значно підвищує чутливість визначення фенолу та дозволяє застосовувати цю методику для контролю дотримання гігієнічного нормативу допустимої кількості міграції фенолу в оточуюче середовище.

**Ключові слова:** фенол, концентрування, Amberlite XAD-7, твердофазна екстракція, ВЕРХ.

УДК 543.544:542.63:547.562.1

### ПРИМЕНЕНИЕ ТВЕРДОФАЗНОЙ ЭКСТРАКЦИИ И МЕТОДА ВЫСОКОЭФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОКОЛИЧЕСТВ ФЕНОЛА В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

Григорьева М.В.

**Резюме.** Разработана чувствительная и надежная методика определения микроколичеств фенола в водном растворе с использованием твердофазной экстракции (ТФЭ) на Amberlite XAD-7 и обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. Показано, что концентрирование фенола с помощью ТФЭ на Amberlite XAD-7 значительно повышает чувствительность определения фенола и позволяет применять эту методику для контроля гигиенического норматива допустимого количества миграции фенола в окружающую среду.

**Ключевые слова:** фенол, концентрирование, Amberlite XAD-7, твердофазная экстракция, ВЭЖХ.

UDC 543.544:542.63:547.562.1

### The Use Of Solid Phase Extraction And Hplc For Determination Of Trace Phenol In Aqueous Solutions Grigorieva M.V.

**Summary.** A sensitive and reliable technique was developed based on solid phase extraction (SPE) on Amberlite XAD-7 and reversed-phase high performance liquid chromatography for determining trace amounts of phenol in aqueous solutions. Concentrating phenol on Amberlite XAD-7 using SPE was shown to significantly increase the sensitivity of phenol determination, allowing for application of this technique in monitoring compliance with hygiene regulations for permissible migration quantity of phenol liberated into environment.

**Key words:** phenol, concentrating, Amberlite XAD-7, solid phase extraction, HPLC.

Стаття надійшла 15.11.2011 р.