

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

OPTIMALIZACE PODMÍNEK PRO IZOLACI A PLYNOVĚ CHROMATOGRAFICKÉ STANOVENÍ FENOLŮ V TUHÝCH VZORCÍCH

EVA TESAŘOVÁ^a, ZDENKA VOZŇÁKOVÁ^b, JAROSLAVA PODEHRADSKÁ^b a MILAN POPL^b

^a Katedra fyzikální a makromolekulární chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Albertov 2030, 128 40 Praha 2, ^b Ústav analytické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6

Došlo dne 9.IX. 1998

Klíčová slova: plynová chromatografie, fenoly

Úvod

Fenoly patří k prioritním polutantům, které se do životního prostředí dostávají buď přímo jako produkty průmyslové výroby a součástí pesticidních přípravků (chlorfenoly, nitrofenoly), nebo následně jako degradační produkty neionogenních tenzidů. Kontaminace fenoly zasahuje všechny složky životního prostředí, tedy i půdy a říční sedimenty. Vzhledem k toxicitě a karcinogenitě fenolických látek je jejich analytickému stanovení věnována značná pozornost, přičemž je nejvíce propracována metodika stanovení ve vodách a v ovzduší^{1,4}.

V pevných vzorcích EPA doporučuje stanovení 11 fenolů, mezi nimiž jsou alkyfenoly, chlorfenoly a nitrofenoly⁵. Využívá se extrakce s následným stanovením metodou plynové chromatografie.

Velmi rozdílná chemická i fyzikální povaha uvedených derivátů fenolu může při jejich stanovení vést k výsledkům zatíženým podstatnou chybou. Proto je nezbytné při analýzách komplexní směsi fenolů sledovat výtěžnost jednotlivých kroků celého postupu.

Pro izolaci je používáno několik způsobů extrakce, např. EPA doporučuje extrakci dichlormethanem v ultrazvukové lázni nebo v Soxhletu⁵. To však vede ke koextrakci řady balastních látek. V našich předchozích pracích^{6,8} jsme na izolaci chlorfenolů a nitrofenolů ze zemin aplikovali metodu extrakce vodným NaOH.

Ve složitých směsích je jedním z potřebných kroků, předcházejících vlastní analýze, preseparace, případně zkoncentrování pomocí extrakce na tuhém sorbentu (SPE). Tato metoda má ve srovnání s extrakcí kapalina-kapalina řadu výhod. Patří mezi ně především omezení práce s často toxickými rozpouštědly a menší časová i finanční náročnost. Fenolické látky lze extrahovat v molekulární formě nebo jako fenoláty. Při použití nepolárních modifikovaných silikagelových sor-

benťů nebo některých polymerních sorbentů pro SPE se využívá první varianta.

Analýza polutantů v pevných maticích, jako jsou např. sedimenty, s sebou přináší, ve srovnání s analýzou kapalných vzorků, mnohé odlišnosti a problémy. Komplexní pevná matrice, ze které je na jedné straně třeba kvantitativně získat látku určené k analýze, na druhé straně se z ní však dostávají i látky, které analýzu komplikují, činí separaci, identifikaci a kvantifikaci složité směsi látek často velmi obtížnou. Příprava vzorku k analýze, izolace sledovaných látek, preseparace, prekoncentrace, příp. derivatizace mohou velmi výrazně ovlivnit výsledek analýzy. Proto jsme se v této práci zaměřili na optimalizaci jednotlivých kroků analýzy komplexní směsi fenolických derivátů v sedimentech.

Experimentální část

Přístroje a zařízení

Plynový chromatograf Varian 3600 s detektorem elektro- nového záchytu (ECD) a s plamenovým ionizačním detektorem (FID) - Varian, Santa Clarita, CA, USA; laboratorní třepačka LT-2 - Kavalier, Votice, ČR; odstředivka - WE-G, Wrocław, Polsko.

Sorpční kolonky pro extrakci na tuhém sorbentu:

- sorpční kolonka - vnitřní průměr 9 mm, výška sloupce sorbentu 15,7 mm, plněná modifikovaným silikagelem - Separon SGX C18, objem sorbentu 1 ml, zrnění 60 μm (Tessek, Praha, ČR);
- sorpční kolonka - vnitřní průměr 9 mm, výška sloupce sorbentu 15,7 mm, plněná polymerním sorbentem Separon SE, objem sorbentu 1 ml, zrnění 60–100 μm (Tessek, Praha, ČR);
- komerční sorpční kolonka LiChrolut RP 18 (Merck, Darmstadt, Německo), vnitřní průměr 5 mm, výška sloupce sorbentu 8,7 mm, objem sorbentu 0,17 ml, zrnění 40–63 μm .

Chemikálie

Standardy fenolů: 2,4-dimethylfenol (2,4-DMP), 3,4-dimethylfenol (3,4-DMP), 2,3,5-trichlorfenol (2,3,5-TCP), 2,4,6-trichlorfenol (2,4,6-TCP), 4-nitrofenol(4-NP), 4,6-dinitro-*o*-kresol (4,6-DNOC) ze sady Supelco Kit No.27 (Supelco, Bellefonte, PA, USA); 4-(terc.oktyl)fenol (4-TOP), Aldrich, Milwaukee, WI, USA.

Všechny další použité chemikálie a rozpouštědla čistoty p.a. byly produkty firmy Lachema, Brno, ČR nebo Penta, Chrudim, ČR.

Příprava roztoků

Základní roztoky fenolů byly připraveny v methanolu o koncentraci 5,00 g.l⁻¹. Z nich byly následně získány roztoky o požadovaných koncentracích, a to jak pro kontaminaci slepých terénních vzorků, tak jako standardní roztoky pro modelová stanovení.

Pracovní postup

Pro stanovení fenolů v sedimentech byl použit postup, zahrnující následující kroky:

- úprava vzorku,
- extrakce fenolů ze vzorku a oddělení huminových kyselin z extraktu,
- izolace fenolů z extraktu sorpcí na tuhém sorbentu,
- derivatizace fenolů,
- plynově chromatografické stanovení fenolů, resp. jejich derivátů.

Úprava vzorku: K přípravě modelově kontaminovaných vzorků byl použit sediment odebraný v Olšanském potoce (okr. Kutná Hora). V sedimentu byl stanoven obsah vody z 25 g navážky vysušením do konstantní hmotnosti při 105 °C a činil 26,74 % hmotnosti. Hodnota pH byla 7,5.

Kontaminace: Do Erlenmayerovy baňky o objemu 100 ml bylo odměřeno 0,5 ml destilované vody a příslušné množství základního roztoku směsi fenolů v methanolu.

K roztoku v baňce bylo vneseno 5,00 g řádně promíchaného vzorku sedimentu. Směs byla homogenizována 60 min na laboratorní třepačce, a potom ponechána 24 hod v klidu při teplotě 22 °C.

Extrakce fenolů ze vzorku: Ke kontaminovanému sedimentu připravenému shora uvedeným způsobem, resp. k 5 g terénního neupravovaného vzorku sedimentu bylo přidáno 20 ml 5%ního roztoku NaOH. Směs byla třepána na laboratorní třepačce 30 min. Extrakce byla provedena dvakrát. Extrakt byl vždy oddělen odstředěním. Spojené extrakty byly okyseleny koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou na pH 2. Vytvořená sraženina huminových kyselin byla po 15 minutovém stání oddělena od extraktu odstředěním.

Izolace fenolů z extraktu metodou SPE: Pro izolaci fenolů z extraktu byly testovány tři sorbenty. Sorpční kolonka s příslušným sorbentem byla před použitím aktivována postupným promytím 2 ml hexanu, 2 ml acetonu, 2 ml methanolu a 2 ml destilované vody okyselené na pH 2. Přes kolonku pak byl rychlostí 7 ml.min⁻¹ převeden extrakt zbařený huminových kyselin. Po převedení vzorku přes kolonku byl sorbent zbařen větší částí vlhkosti profoukáním dusíkem po dobu 1 min. Zachycené fenoly byly desorbovány 1 ml desorpčního činidla. Jako desorpční činidlo byl testován aceton a methyl-terc-butylether (MTBE). Při testování sorbentů byly jímány frakce desorbátu o objemech 0,2 ml.

Derivatizace fenolů: K derivatizaci fenolů před GC stanovením byla použita acetylace acetanhydridem. Testovány byly tři způsoby provedení:

- a) K 1 ml MTBE desorbátu ve vialce bylo přidáno 2,5 ml destilované vody, 0,5 ml 0,5 mol.l⁻¹ Na₂HPO₄, 50 μl acetanhydridu a 1 ml hexanu. Po 3 minutách třepání byla hexanová vrstva stažena do nové vialky, vysušena přidávkou bezvodého síranu sodného a analyzována na plynovém chromatografu².
- b) K 1 ml MTBE desorbátu ve vialce bylo přidáno 50 μl čerstvé acetylační směsi (1 ml pyridinu + 0,4 ml acetanhydridu). Vialka byla umístěna na 15 min do ultrazvukové lázně. Po přidávku 1 ml hexanu a 3 ml 0,01 mol.l⁻¹ K₂CO₃ byla směs třepána 3 min. Hexanová vrstva byla převedena do nové vialky, vysušena bezvodým síranem sodným a analyzována GC (cit.³).
- c) K 1 ml MTBE desorbátu ve vialce byly přidány 2 ml 0,1 mol.l⁻¹ K₂CO₃. Po 2 minutách třepání bylo 1,5 ml vodné

vrstvy převedeno do nové vialky. K tomuto roztoku bylo přidáno 75 μl acetanhydridu a roztok byl protřepán; dále byl přidán 1 ml hexanu a 0,5 g směsi K₂HPO₄ + KCl (2:1). Po promíchání byla hexanová vrstva oddělena, vysušena bezvodým síranem sodným a analyzována GC (cit.¹).

Podmínky plynově chromatografického stanovení:

Alkylfenoly

Kolona SPB1 30 m x 517 μm, tloušťka filmu 1 μm (Supelco, Bellefonte, PA, USA); teplotní program: izotermálně 6 min 80 °C, pak program 10 °C.min⁻¹ na 270 °C; nosný plyn vodík, průtoková rychlost 7 ml.min⁻¹.

Detektor FID, teplota 250 °C, vodík 25 ml.min⁻¹, vzduch 200 ml.min⁻¹, přidavný plyn dusík 30 ml.min⁻¹.

Nástřík bez děliče, teplota 270 °C, objem vzorku 1 μl.

Nitrofenoly, chlorfenoly a jejich acetáty

Kolona NB54 25 m x 200 μm, tloušťka filmu 0,25 μm (Nordion, Helsinky, Finsko); teplotní program: izotermálně 1 min 70 °C, pak program 20 °C.min⁻¹ na 110 °C, 4 °C.min⁻¹ na 170 °C, 10 °C.min⁻¹ na 270 °C; nosný plyn helium, průtoková rychlost 1,2 ml.min⁻¹.

Detektor ECD, teplota 300 °C, přidavný plyn dusík 30 ml.min⁻¹.

Nástřík bez děliče, teplota 280 °C, objem vzorku 1 μl.

Výsledky a diskuse

Odlíšné chemické i fyzikální vlastnosti alkylfenolů, chlorfenolů a nitrofenolů mohou vést při analýze polutantů přítomných ve složitých vzorcích životního prostředí k výsledkům zatíženým značnou chybou. Proto jsme se snažili sledovat výtěžnost a následně optimalizovat jednotlivé kroky celého postupu izolace, prekoncentrace a stanovení směsi fenolů v pevných maticích.

K izolaci chlorfenolů a nitrofenolů ze zemin jsme zvolili metodu extrakce vodným roztokem NaOH, která se osvědčila v našich předchozích pracích⁶⁻⁸. Dvojnásobná extrakce třepáním vzorku s 5%ním vodným roztokem NaOH vykazovala, ve srovnání s extrakcí ultrazvukem, jak pro chlorfenoly, tak pro nitrofenoly dostatečný výtěžek (tj. 100-60% podle derivátu fenolu a absolutního množství kontaminantu) s přiměřenou opakovatelností (hodnoty relativních směrodatných odchylek se pohybovaly řádově v jednotkách procent). Extrakce ultrazvukem poskytovala výtěžky mezi 40 % a 60 %. Zvolenou metodu extrakce roztokem NaOH jsme porovnávali též s extrakcí za použití Soxhletova přístroje. Výtěžek extrakce směsí aceton-methanol (1:1) v Soxhletově přístroji po dobu 7 hodin byl pro testované fenoly srovnatelný s námi zvolenou metodou. Osvědčil se především pro chlorfenoly, pro které činil 93 %. Extrakt však obsahoval mnohem větší množství koextrahovaných látek a vedl v konečné fázi analýzy k překrývání signálu fenolů a komplikacím při vyhodnocení chromatogramů.

Dalším krokem, předcházejícím vlastní analýze, je prekoncentrace (preseparace) extrakcí na tuhém sorbentu. V této práci byly testovány tři sorbenty: polymerní Separon SE a dvě oktadecylsilikagelové fáze - Separon SGX C18 a LiChrolut RP-18. Vhodnost použitého sorbentu byla zkoumána pro tři vybrané fenolické deriváty jako zástupce jednotlivých sledovaných skupin. Z alkylfenolů byl zvolen 3,4-DMP, z chlorfenolů 2,4,6-TCP a jako zástupce nitrofenolů 4-NP. Pro aplikaci

Tabulka I
Výtěžky SPE při použití různých sorbentů

Sorbent	Desorpční činnidlo	3,4-DMP		2,4,6-TCP		4-NP	
		výtěžek [%]	RSD ^a [%]	výtěžek [%]	RSD ^a [%]	výtěžek [%]	RSD ^a [%]
Separon SE	MTBE	80,7	6,4	70,9	10,7	82,8	13,3
	aceton	77,3	8,9	59,5	6,3	71,3	12,9
LiChrolut RP-18	MTBE	48,1	8,3	70,3	5,9	5,9	15,0
Separon SGX C18	MTBE	83,9	4,8	91,0	8,1	90,8	3,9

^a RSD - relativní směrodatná odchylka vypočtená z 5 stanovení

Tabulka II
Výtěžky různých způsobů derivatizace^a

Fenol	ρ^b [mg.l ⁻¹]	Výtěžek [%]		
		A	B	C
2,4-DMP	100	31,3	35,8	39,8
3,4-DMP	100	76,5	78,2	80,1
2,4-DCP	20	81,3	96,7	98,7
2,4,6-TCP	1	67,8	100,0	97,6
4-NP	100	87,1	70,7	92,4
4,6-DNOC	100	30,2	66,2	71,4

^a Popis způsobů A, B a C pro derivatizaci viz Experimentální část, ^b ρ - hmotnostní koncentrace

Tabulka III
Meze detekce^a volných fenolů a jejich acetátů

Fenol	Detektor	Mez detekce [mg.l ⁻¹]	
		fenol	acetát
2,4-DMP	FID	1,0	50,0
3,4-DMP	FID	1,0	6,0
4-t-OP	FID	5,0	—
2,4-DCP	ECD	0,8	0,1
2,4,6-TCP	ECD	0,1	0,1
4-NP	ECD	20,0	6,0
4,6-DNOC	ECD	6,0	2,0

^a Vypočtené ze signálů odpovídajících trojnásobku šumu základní linie

Tabulka IV
Výtěžek postupu stanovení fenolů v sedimentu^a

Fenol	Výtěžek [%]	RSD ^b [%]
3,4-DMP	61,08	7,39
4-t-OP	40,55	11,37
2,4,6-TCP	59,78	5,29
4-NP	83,84	4,42

^a Koncentrace každého fenolu 5 mg/kg, ^b relativní směrodatná odchylka vypočtená z 5 stanovení

určitého sorbentu k prekoncentraci stanovovaného analytu je rozhodující hodnota průnikového objemu, spotřeba desorpčního činidla, ale především výtěžnost extrakce. Tabulka I ukazuje procentuální výtěžek tří zvolených derivátů fenolu na třech testovaných kolonkách. V případě Separonu SE byla testována dvě odlišná rozpouštědla. Výtěžnost desorpce MTBE byla vyšší než při použití acetonu, což společně s výhodou MTBE pro GC analýzu přispělo ke zvolení tohoto rozpouštědla v další práci jako elučního činidla. Hodnoty v tabulce I ukazují, že největší výtěžky všech studovaných derivátů byly získány na kolonce Separon SGX C18. U tohoto sorbentu bylo docíleno i nejlepší opakovatelnosti, vyjádřené relativní směrodatnou odchylkou (RSD). Daný sorbent byl nevhodnější i z hlediska nejvyšších průnikových objemů¹⁰. Spektrofotometrickým měřením bylo zjištěno, že k desorpci všech sledovaných fenolů postačuje 0,2 ml MTBE. Pro zajištění dokonalé desorpce a usnadnění kvantifikace byl však v další práci zvolen konstantní objem desorpčního činidla 1 ml. Nejméně vhodný se ukázal sorbent LiChrolut RP-18, přestože se v zásadě jedná o stejně modifikovaný silikagel jako v případě Separonu SGX C18. LiChrolut RP-18 byl zcela nevyhovující především pro prekoncentraci nitrofenolů (4-NP). Rozdíl mezi oběma sorbenty lze vysvětlit menším vlivem zbytkových silanolových skupin na povrchu silikagelového nosiče v případě sorbentu LiChrolut RP-18. Zatímco v retenčním mechanismu analytů na povrchu Separonu SGX C 18 se uplatňují nejen interakce s oktadecylovými řetězci, ale též interakce se silanolovými skupinami, v případě druhého sorbentu je tato možnost značně omezena, což je pro polárnější nitro fenoly méně výhodné.

Z povahy tří testovaných skupin alkyl-, chlor- a nitrofenolů je zřejmé, že jejich společné přímé stanovení plynovou chromatografií nepovede k uspokojivému cíli. U polárních látek, jako jsou fenoly, je nebezpečí jejich sorpce v nástřiku nebo interakce fenolické skupiny se stacionární fází, což má za následek chvostování píků a zkrácení kvantitativních relací. Tyto negativní jevy byly pozorovány zejména u nitrofenolů. K jejich odstranění může přispět derivatizace. Pro derivatizaci fenolů se využívá kromě jiných metod acylace anhydridem kyseliny octové ve vhodném rozpouštědle, resp. ve vodném prostředí. Sledovány byly tři doporučené způsoby derivatizace fenolů acetanhydridem s cílem vybrat postup, poskytující co nejvyšší výtěžek derivatizace pro sledované skupiny fenolů. Neméně důležitým kritériem byla jednoduchost provedení. Výsledky získané podle testovaných derivatizačních postupů A, B a C (viz Experimentální část) jsou shrnuty v tabulce II. Z tabulky je zřejmé, že nejméně vhodný je způsob A, posky-

tující nejnižší výtěžky pro všechny testované fenoly. Způsoby B a C jsou pro chlorfenoly prakticky rovnocenné; nejvyšší výtěžky pro nitrofenoly lze získat postupem C. Při akceptování požadavků na výtěžek i jednoduchost provedení byl jako nejvhodnější zvolen způsob derivatizace B.

Vzhledem k přítomnosti různých funkčních skupin v molekule testovaných fenolů je vhodné volit pro plynově chromatografické stanovení i různé způsoby detekce. Pouze tak lze dosáhnout pro všechny skupiny fenolů srovnatelných mezi stanovitelnosti. Proto bylo při stanovení alkylfenolů použito plamenového ionizačního detektoru (FID), pro chlorfenoly a nitrofenoly detektoru elektronového záchytu (ECD). Bylo porovnáváno i přímé stanovení fenolů se stanovením jejich acetátů. Porovnání z hlediska mezi detekce je uvedeno v tabulce III. Je zřejmé, že mez detekce acetátů chlorfenolů a nitrofenolů je nižší, než mez detekce při přímém stanovení chlor- a nitrofenolů. Mimo to přináší derivatizace zejména pro nitrofenoly podstatné zvýšení symetrie píků, a tím i jednodušší kvantitativní vyhodnocení. Na rozdíl od toho má derivatizace alkylfenolů pouze negativní vliv ve zvýšení meze detekce acetátů alkylfenolů oproti samotným alkylfenolům.

Dále byla zjištěna lineární závislost plochy píku na koncentraci v rozsahu 0,4-50 mg.l⁻¹ pro alkylfenoly, nitrofenoly a jejich acetáty a v rozsahu 0,08-10 mg.l⁻¹ pro chlorfenoly a jejich acetáty.

Na základě shora uvedených výsledků byl zvolen nejvhodnější postup pro stanovení fenolických látek v tuhých maticích. Tímto postupem byl zpracován terénní slepý vzorek se standardními přídavky čtyř fenolů, každý o koncentraci 5 mg/kg sedimentu. Výtěžky a opakovatelnost celého postupu jsou uvedeny v tabulce IV.

Porovnáním tabulky IV a tabulky I jsou patrné rozdíly ve výtěžcích. Tyto rozdíly je nutno přičíst na vrub dalších kroků celého analytického postupu: neúplná extrakce, strhávání fenolů do sraženiny huminových kyselin aj. Výsledky v tabulce I zohledňují pouze výtěžek z vodného roztoku standardu. Přesto jsou výtěžky a relativní směrodatné odchylky uvedené v tabulce IV přijatelné, s výjimkou oktylfenolu. U této látky, s ohledem na vysoký bod varu, by bylo vhodné zvolit jinou metodu stanovení.

Závěr

Byly sledovány podmínky pro izolaci, prekoncentraci a vlastní plynově chromatografické stanovení fenolů v sedi-

mentech. Jednotlivé kroky postupu byly studovány z hlediska výtěžnosti, jednoduchosti provedení a vhodnosti pro praktická stanovení.

Pro stanovení fenolických látek v tuhých maticích byl doporučen následující postup: Dvojnásobná extrakce fenolů ze vzorku zeminy nebo sedimentu 5%ním vodným NaOH na laboratorní třepače, SPE na Separonu SGX C18 a desorbce pomocí MTBE. Alkylfenoly se stanoví přímo z desorbátu plynovou chromatografií s FID, nitrofenoly a chlorfenoly jsou následně v desorbátu derivatizovány acetanhydridem podle postupu B a jejich acetáty stanoveny s ECD.

LITERATURA

1. Herterich R.: *J. Chromatogr.* 549, 313 (1991).
2. Korba T., Popl M., Novotná M.: *Fresenius J. Anal. Chem.* 355, 91 (1996).
3. Musmann P., Levsen K., Radeck W.: *Fresenius J. Anal. Chem.* 348, 654 (1995).
4. Tesařová E., Pacáková V.: *Chromatographia* 17, 269 (1983).
5. *Test Methods for Evaluating Solid Wastes*, 3rd ed., EPA SW-846, Method 3540, Method 3550; US Government Printing Office, Washington DC, 1990.
6. Podehradská J., Vozňáková Z., Tesařová E.: *Toxicol. Environ. Chem.*, v tisku.
7. Tesařová E., Sýkora D., Vozňáková Z.: *Fresenius Environ. Bull.* 4, 609 (1995).
8. Vozňáková Z., Podehradská J., Kohlíčková M.: *Chemosphere* 33, 285 (1996).
9. Morén K., Sjövall J.: *J. Chromatogr.* 414, 55 (1987).
10. Šikulová A.: *Diplomová práce*. VŠCHT, Praha 1997.

E. Tesařová^a, Z. Vozňáková^b, J. Podehradská^b, and M. Popl^b (^aDepartment of Physical and Macromolecular Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague, ^bDepartment of Analytical Chemistry, Institute of Chemical Technology, Prague): **Optimization of Conditions for the Determination of Phenols in Solid Matrices**

Determination of phenolic pollutants, alkyl-, chloro- and nitrophenols, in solid matrices was studied. The procedure involving extraction, preconcentration, derivatization and GC analysis was optimized step by step. A simple method for analysis of phenols in sludge was described.