

Identifikácia a stanovenie chlórovaných fenolov v požívatinách plynovou chromatografiou

EVA KLIMENTOVÁ — JÁN UHNÁK — MARTA VENINGEROVÁ

Súhrn. V práci sa riešilo stanovenie a identifikácia pentachlórfenolu vo vode a potravinách živočíšneho pôvodu plynovou chromatografiou s ECD priamo a po metylácii metyljodidom ako náhradou za karcinogénny diazometán. Zistili sa optimálne podmienky metylácie a stanovenia pentachlórfenolu plynovou chromatografiou na vzorkách vody a hydínového mäsa. Použila sa kolóna s náplňou 1,5 % OV-17 + 1,95 % QF-1 na Chromosorbe W. Navrhol sa postup na stanovenie pentachlórfenolu vo vodách, potravinách živočíšneho pôvodu a biologických materiáloch.

Otázka kontaminácie životného prostredia rezíduami perzistentných chlórovaných zlúčenín je stále aktuálna. Aj keď sa používanie chlórovaných insekticídov v poľnohospodárstve obmedzilo a v niektorých krajinách úplne zakázalo, predsa ich degradačné produkty ešte vždy kolujú v živom prostredí a kumulujú sa v potravinovom reťazci [1]. Vzniknuté degradačné produkty môžu mať väčšiu toxicitu ako pôvodné látky. Z degradačných produktov chlórovaných insekticídov, najmä hexachlórbenzénu (HCB) a hexachlórecyklohexánu (HCH), z toxikologického hľadiska sú najvýznamnejšie chlórované benzény a fenoly. S pribúdajúcim počtom atómov chlóru sa u laboratórnych zvierat zvyšuje toxicita chlórovaných fenolov [2].

Na dôkaz a stanovenie chlórovaných fenolov sa používajú viaceré metódy, napr. IČ spektrometria [3], titračné postupy [4, 5], tenkovrstvová chromatografia, iónovo-výmenná chromatografia [6], UV spektroskopia [7, 8], rtg — fluorescencia [9], neutrónová aktivácia [10], plynová chromatografia, hmotnostná spektrometria a iné. Na identifikáciu a stanovenie reziduí degradačných produktov v biologických materiáloch sa využívajú najmä chromatografické metódy, predovšetkým plynová chromatografia [11—15]. Jej výhody sú v rýchlosti, presnosti stanovenia a nízkej medzi dokázateľnosti.

Analytici sa tu stretávajú s problémom koincidencie s rezíduami chlórovaných insekticídov a iných zlúčenín zo životného prostredia. Treba preto iden-

Ing. Eva Klimentová, Výskumný ústav potravinársky, Trenčianska 53, 825 09 Bratislava.

Ing. Ján Uhnák, CSc., Ing. Marta Veningerová, Výskumný ústav preventívneho lekárstva, Limbova 14, 833 01 Bratislava.

titu skúmaných zlúčenín vždy potvrdiť. Jednou z možností potvrdenia identity je príprava vhodných derivátov hľadaných látok a ich stanovenie. Ďalším dôvodom na prípravu derivátov môže byť nestálosť analyzovanej látky, ktorá sa pri chromatografii rozpadá. V týchto prípadoch možno dosiahnuť zvýšenie prechavosti a potlačenie nežiadúcich vlastností takou chemickou derivatizáciou, ktorá blokuje možnosť medzimolekulárnych asociácií a obmedzuje reaktivnosť látky. Okrem toho možno vhodne volenou derivatizáciou prisúdiť molekule niektoré vlastnosti výhodné z hľadiska separácie a detekcie [16 až 22]. Zvýši sa tepelná stabilita, detekcia sa stane citlivejšou, môže sa zlepšiť separácia dvoch látok alebo sa umožní separácia látok, ktoré sa ako voľné nedajú oddeliť. Veľmi výhodná je derivatizácia látok s voľnými hydroxylovými alebo karboxylovými skupinami, ktoré sa vo voľnom stave ťažko chromatografujú, pretože sa svojimi polárnymi skupinami adsorbujú na nosiči, čo spôsobuje „chvostovanie.“ Špeciálne deriváty sa používajú na zvýšenie citlivosti detektora. Chlórované a fluorované deriváty poskytujú významnú odozvu na detektore využívajúcom zachytenie elektrónov (ECD) a často sa používajú na stopovú analýzu látok [23].

Kombinácia plynovej chromatografie s chemickou derivatizáciou chromatografovaných látok predstavuje analytickú disciplínu, ktorá má veľký význam najmä v oblasti biochemických výskumov. Treba však brať do úvahy, že derivatizácia znamená ďalšiu operáciu navyše a tým aj zdroj chýb v analytickom postupe. Treba preto dôkladne poznať reakciu a vplyv rozličných faktorov ovplyvňujúcich jej výsledok. Zvýšenú pozornosť treba venovať čistote rozpúšťadiel a chemikálií, stabilite derivátov a rýchlosti reakcie [24].

Niektoré deriváty sa pri dlhšom skladovaní rozkladajú pôsobením zvýšenej teploty, vlhkosti, svetla a pod. V týchto prípadoch treba deriváty pripravovať tesne pred analýzou.

Na dosiahnutie kvantitatívnej analýzy neznámej vzorky je žiadúce poznať stupeň konverzie reakcie. Vo väčšine prípadov tento stupeň nepoznáme, a preto predpokladáme, že reakčná rýchlosť štandardnej látky je rovnaká ako pri látke v roztoku (extrakte) obsahujúcom koextrahovateľné balasty. Musia sa zachovať rovnaké reakčné podmienky, ako sú: teplota, čas reakcie, typ katalyzátora a pod.

Pri identifikácii pentachlórfenolu (PCF) sa najčastejšie používajú metylčné metódy, pričom vzhľadom na stupeň konverzie sa najlepšie výsledky dosiahli diazometánom [25]. Diazometánová metóda je výhodná pre jednoduchosť prípravy metyléterov. Nevýhodou diazometánu je jeho značná reaktivita a silná karcinogenita, preto sme sa pokúsili nahradiť ho menej nebezpečným reagentom.

V predloženej práci sme sa zamerali na optimalizáciu postupu metylácie metyljodidom, na identifikáciu a stanovenie pentachlórfenolu plynovou

chromatografiou s ECD priamo a po metylácii metyljodidom na príslušný metylderivát [26]. Túto techniku sme uplatnili vo vzorkách vodovodnej vody a hydínového mäsa.

Experimentálna časť

Princíp metódy

Pentachlórphenol sa z okyslených vzoriek vôd extrahuje toluénom priamo a zo vzoriek potravín živočíšneho pôvodu po zmydelnení s KOH a úprave pH. V extraktoch sa plynovou chromatografiou stanoví pentachlórphenol, ako aj jeho derivát pentachlórhanizol (PCA) po metylácii metyljodidom.

Izolácia PCF zo vzoriek vody

Jeden liter vzorky sa okyslí 0,5 M H_2SO_4 (pH 5) a trikrát extrahuje 50, 25 a 25 ml toluénu. Spojené toluénové extrakty sa prefiltrujú cez bezvodý síran sodný a zahustia vo vákuovej rotačnej odparke na objem 2 ml. Roztok sa použije na priame stanovenie PCF plynovou chromatografiou a alikvotné množstvo sa podrobí derivatizácii metyljodidom.

Izolácia PCF zo vzoriek potravín živočíšneho pôvodu

Naváži sa 5 g vzorky pokrájanej na drobné kúsky a refluxuje pod spätným chladičom s 10 ml 1 M KOH na každý gram vzorky 20 min. Po vychladnutí sa do zmesi pridajú varné kamienky, 50 ml 5 M H_2SO_4 , 500 ml destilovanej vody a destiluje sa. Zachytáva sa 200 + 200 ml destilátu a po úprave pH na 5 sa každý podiel extrahuje trikrát 5 ml toluénu. Pre väčšiu účinnosť sa zachytí ďalších 10 ml, pH sa upraví na 5 a extrahuje sa 5 ml toluénu. Spojené toluénové extrakty sa prefiltrujú cez vrstvu bezvodého síranu sodného a zahustia vo vákuovej rotačnej odparke na objem 2 ml. Roztok sa použije na priame stanovenie PCF plynovou chromatografiou a alikvotné množstvo sa podrobí derivatizácii metyljodidom.

Derivatizácia PCF na pentachlórhanizol metyláciou metyljodidom

Do kónickej banky sa odpipetuje 1 ml etanolového roztoku PCF koncentrácie $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ a rozpúšťadlo sa odparí. K odparku sa pridá 3–5 mg K_2CO_3 , 0,5 ml acetónu a 1,5 ml metyljodidu. Zmes sa varí pod spätným

chladičom 30 min pri 85 °C. Roztok sa vákuove zahustí do sucha a odparok sa rozpustí v 1 ml toluénu a dávkuje do plynového chromatografu. Rovnako sa spracujú štandardné vzorky PCF v koncentráciách 0,5, 1,0, 2,0 a 4,0 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ a vzniknuté produkty sa použijú na zhotovenie kalibračnej čiary pre kvantitatívnu analýzu. Uvedeným postupom sa metylujú aj zahustené toluénové extrakty zo vzoriek vôd a potravín živočíšneho pôvodu.

Plynová chromatografia

Pracovali sme na plynovom chromatografe Carlo Erba, typ 452 GI za týchto podmienok: sklenená kolóna $180 \times 0,3$ cm, detektor ^{63}Ni ECD, napätie detektora 10 V, teplota kolóny 180 °C, teplota detektora 250 °C, teplota injekčného priestoru 195 °C [1], 225 °C [2], prietok nosného plynu (dusíka) 60 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$, posun registračného papiera 0,5 $\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$, dávkovanie 1 μl .

Na rozdelenie pentachlórfenolu a jeho derivátu sme použili kolóny s náplňou: 1. 1 % Igepal CO 880 + 1 % H_3PO_4 + 2 % Apiezon L na Chromosorbe W (100–120 mesh); 2. 1,5 % OV-17 + 1,95 % QF-1 na Chromosorbe W AW (80–100 mesh).

Výsledky a diskusia

Metyláciu chlórovaných fenolov metyljodidom, ktorá sa používa pri metylácii barbiturátov [13] sme aplikovali na pentachlórfenol. Rovnaké množstvo PCF ($1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) sme podrobili metylácii pri zvyšujúcich sa teplotách od 50 do 90 °C. Teplota sa zvyšovala po 5 °C. Stupeň konverzie sa pohyboval v rozmedzí 36–72 %.

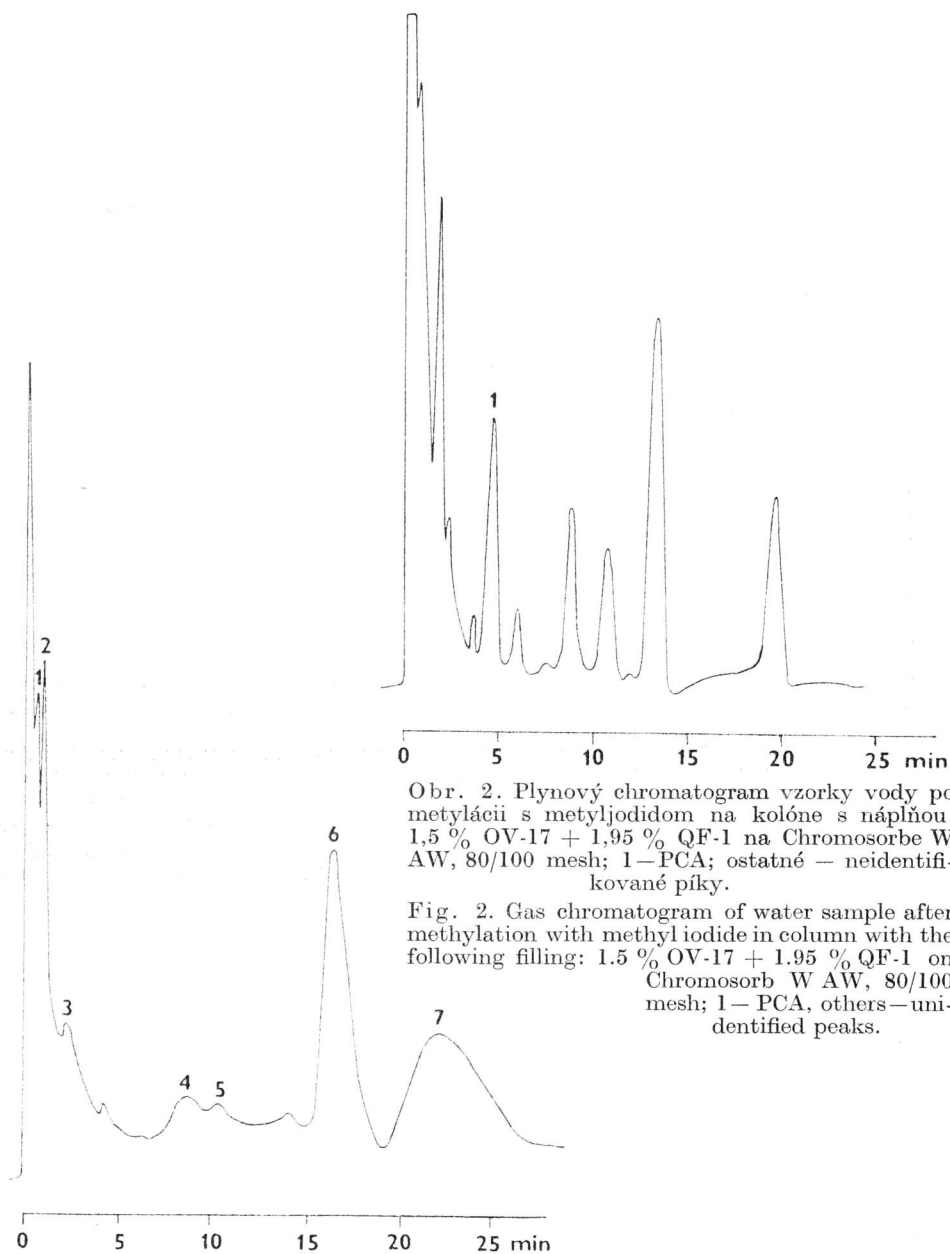
Tabuľka 1. Výsledky metylácie PCF metyljodidom

Table 1. Results of methylation of pentachlorophenol with methyl iodide

Teplota pri metylácii ⁽¹⁾ [°C]	50	55	60	65	70	75	80	85
Konverzia ⁽²⁾ [%]	36,1	47,2	55,5	57,7	69,2	65,4	70,5	71,8

(1) Temperature during methylation, (2) Conversion.

Z tabuľky 1 vyplýva, že najvyššie percento konverzie (71,8) sa dosiahne pri 85 °C. Táto teplota bola optimálna. Pri vyššej teplote je reakcia búrlivá a dochádza k stratám sledovaných látok. Metylácia PCF metyljodidom zo

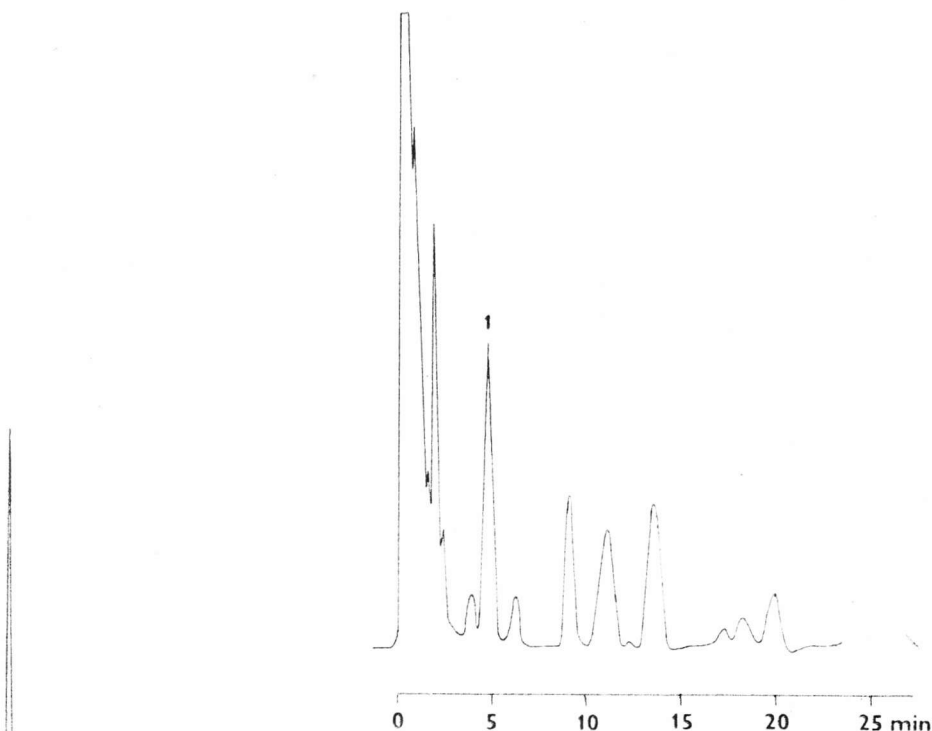


Obr. 2. Plynový chromatogram vzorky vody po metylácii s metyljodidom na kolóne s náplňou: 1,5 % OV-17 + 1,95 % QF-1 na Chromosorbe W AW, 80/100 mesh; 1—PCA; ostatné — neidentifikované píky.

Fig. 2. Gas chromatogram of water sample after methylation with methyl iodide in column with the following filling: 1.5 % OV-17 + 1.95 % QF-1 on Chromosorb W AW, 80/100 mesh; 1—PCA, others—unidentified peaks.

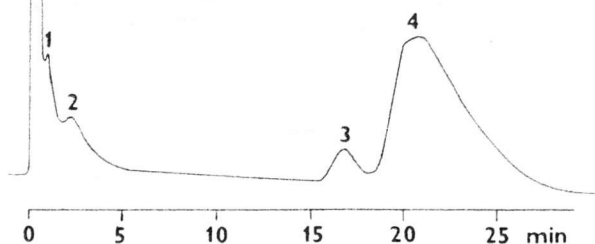
Obr. 1. Plynový chromatogram vzorky vody na kolóne s náplňou: 1 % Igepal CO 880 + 1 % H_3PO_4 + 2 % Apiezon L na Chromosorbe W, 100/120 mesh; 2—2,4-DCF; 3—2,4,6-TCF; 6—PCF; 1, 4, 5, 7—neidentifikované píky.

Fig. 1. Gas chromatogram of water sample in column with the following filling: 1 % Igepal CO 880 + 1 % H_3PO_4 + 2 % Apiezon L on Chromosorb W, 100/120 mesh; 2—2,4-DCF; 3—2,4,6-TCF; 6—PCF; 1, 4, 5, 7—unidentified peaks.



Obr. 4. Plynový chromatogram vzorky mäsa po metylácii metyljodidom na kolóne s náplňou: 1,5 % QV-17 + 1,95 % QF-1 na Chromosorbe W AW, 80/100 mesh; 1 — PCA; ostatné — neidentifikované píky.

Fig. 4. Gas chromatogram of meat sample after methylation with methyl iodide in column with the following filling: 1.5 % OV-17 + 1.95 % QF-1 on Chromosorb W AW, 80/100 mesh; 1 — PCA; others — unidentified peaks.



Obr. 3. Plynový chromatogram vzorky mäsa na kolóne s náplňou: 1 % Igepal CO 880 + 1 % H_3PO_4 + 2 % Apiezon L na Chromosorbe W, 100/120 mesh; 1 — 2,4-DCF; 2 — 2,4,6-TCF; 3 — PCF; 4 — neidentifikovaný pík.

Fig. 3. Gas chromatogram of meat sample in column with the following filling: 1 % IGEPAL CO 880 + 1 % H_3PO_4 + 2 % Apiezon L on Chromosorb W, 100/120 mesh; 1 — 2,4-DCF; 2 — 2,4,6-TCF; 3 — PCF; 4 — unidentified peaks.

štandardných roztokov PCF a zahustených extraktov vzoriek sa preto uskutočnila pri 85 °C. Elučná vlna PCA je vysoká a úzka a odozva detektora ^{63}Ni ECD na PCA je lepšia ako na PCF v tej istej koncentrácii. Metyláciou chlórovaných fenolov metyljodidom možno nahradiť doteraz používaný reaktívny a karcinogénny diazometán, aj keď vzhľadom na stupeň konverzie najlepšie výsledky sa dosiahli diazometánom [25]. Metódu metylácie metyljodidom sme testovali na vzorkách vodovodnej vody a hydínového mäsa. Výsledky sme vyhodnocovali podľa výšky elučných vln metódou kalibračnej čiary, ktorú sme zostrojili zo štyroch bodov zodpovedajúcich koncentráciám jednotlivých štandardov chlórovaných fenolov po metylácii metyljodidom v rozmedzí od 0,5 do 4 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Na obrázkoch 1 a 3 sú chromatogramy vzoriek vody a mäsa nemetylované a na obrázku 2 a 4 po metylácii metyljodidom.

Metóda sa preskúšala pri stanovení PCF vo vzorkách vodovodnej vody a hydínového mäsa po metylácii metyljodidom. Obsah pentachlórfenolu vo vzorkách vodovodnej vody sa pohyboval od 0,54 do 1,84 $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$. Koncentrácia pentachlórfenolu vo vzorkách hydínového mäsa bola v rozmedzí od 0,07 do 0,13 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$.

Pri stanovovaní produktov derivatizácie sa potvrdilo, že na rozdelenie zmesi chlórovaných fenolov je vhodná kolóna s náplňou 1 % Igepal + 1 % H_3PO_4 + 2 % Apiezon L na Chromosorbe W a na rozdelenie zodpovedajúcich anizolov je vhodná kolóna s náplňou 1,5 % OV-17 + 1,95 % QF-1 na Chromosorbe W AW, ako ju použili autori [26].

Literatúra

1. SZOKOLAY, A, UHNÁK, J., MAĎARIČ, A.: Čs. Hyg. 22, 1977, 10, s. 468.
2. ENGST, R.—MACHOLZ, R. M.—KUJAWA, M.: Residue Rev., 72, 1979, s. 71—95.
3. HAWKES, J. C.: J. Appl. Chem., 7, 1957, s. 123.
4. HUMMELSTEAT, L. E. I.—HUME, O. E.: Anal. Chem., 32, 1960, s. 1793.
5. BRUSS, D. B.—HARLOW, C. A.: Anal. Chem., 30, 1958, s. 1831.
6. SKELLY, N. E.: Anal. Chem., 33, 1961, s. 271.
7. MOHLER, E. F.—JACOB, L. N.: Anal. Chem., 29, 1957, s. 1369.
8. ERNE, K.: Acta Pharmacol., 14, 1958, s. 158.
9. WRIGHT, J. P.—STORKS, K. H.: 27th Amer. Food Preservers Assoc. Annual Convention, 1957.
10. Carlo Erba: Divisione Apparecchi Scientifici, autor F. Poy.
11. CRAMER, J.—FREAL, J.: Life Sci., 9, 1970, s. 121.
12. DIMIRKIS, S. M.—DARBRE, A.: Chromatographia, 95, 1977, s. 169.
13. DÜNGES, W.—BERGHEIM—IRPS, A.: Ann. Lett., 6, 1973, s. 185.
14. HRIVNÁK, J.—MICHÁLEK, M.: Chromatographia, 3, 1970, s. 123.
15. SZOKOLAY, A. et al.: J. Chromatogr., 106, 1975, s. 401.
16. ERNEY, D. R.: J. Assoc. Off. Anal. Chem., 61, 1978, s. 214.
17. KRIJGSAM, W.—KARUP, C. G.: J. Chromatogr., 94, 1974, s. 169.

18. LANGER, S. H.—CONNELL, S. —WENDER, I.: *J. Org. Chem.*, **23**, 1958, s. 30.
19. MATSUMOTO, G.—ISHIWATARI, R.—HAWYA, T.: *Water Res.*, **11**, 1977, s. 693.
20. RUDLING, L.: *Water Res.*, **4**, 1970, s. 533.
21. SHAFIK, T. M.: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **18**, 1978, s. 57.
22. STARK, A.: *J. Agric. Food Chem.*, **17**, 1969, s. 871.
23. LOVELOCK, J. E.: *Nature*, **189**, 1961, s. 729.
24. HAMMARSTRAND, K.—BONELLI, E. J.: *Derivative Formation in Gas Chromatography*. Varian Aerograph, Walnut Creek 1968.
25. VORBECK, M. L. et al.: *Anal. Chem.*, **33**, 1961, s. 1512.
26. VENINGEROVA, M. et al.: *J. Chromatogr.*, **205**, 1981, s. 194—198.
27. COCHRANE, W. P.: *J. Chromatogr. Sci.*, **13**, 1975, s. 246—253.

Идентификация и определение хлорированных фенолов в продуктах питания методом газовой хроматографии

Резюме

В работе решается проблема определения и идентификации пентахлорфенола в воде и продуктах питания животного происхождения методом газовой хроматографии с ECD прямо и после метилирования метилиодидом в качестве заменителя карциногенного диазометана. Были определены оптимальные условия метилирования и определения пентахлорфенола методом газовой хроматографии на образцах воды и мяса домашней птицы. Использовалась колонна с заполнением 1,5 % OV—17 + 1,95 % QF—1 на Хромосорбе W. Был предложен процесс определения пентахлорфенола в водах, продуктах питания животного происхождения и в биологическом материале.

Identification and determination of chlorinated phenols in eatables by means of gas chromatography

Summary

The problems of determining and identifying pentachlorophenol in water and foods of animal origin by gas chromatography with ECD, directly and after methylation by methyl iodide replacing the carcinogenic diazomethane were studied. Optimal methylation conditions and pentachlorophenol determination by gas chromatography in water and poultry meat samples were studied stated. The filled column of 1.5 % OV-17 + 1.95 % OF-1 on Chromosorb W was used. The method of determining pentachlorophenol in water, food of animal origin and in biologic materials was proposed.