

Инструкция

по применению Аналитического комплекта

"Фенолы"

МОСКВА2005

Настоящая Инструкция предназначена для описания условий и способов применения Аналитического комплекта в подготовке проб и хроматографическом определении фенолов в водных средах за исключением сточных вод. Авторы предлагаемых в настоящей Инструкции методических подходов к определению фенолов методом твёрдофазной экстракции с радостью и огромным вниманием отнесутся к любым замечаниям и предложениям, относящимся к работе с Аналитическими комплектами.

I. Цель и назначение аналитического комплекта "Фенолы"

I.1. Цель выпуска Комплекта "Фенолы"

Целью выпуска *Аналитического комплекта "Фенолы"* является обеспечение хроматографического способа определения содержания фенолов, унифицированного для водных сред, за исключением сточных вод. Основной характеристикой разработанного способа является экстремально низкий порог обнаружения, не превосходящий 0,1 от величины предельно допустимой концентрации (ПДК), установленной для каждого из приоритетных фенолов, что достигается последовательным применением твердофазного концентрирования на патронах ДИАПАК П и градиентной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на "традиционных" зарубежных или отечественном хроматографе "Милихром-5-3 УФ" с одно- или многоволновым детектированием при рутинном или арбитражном методе контроля соответственно.

I.2. Назначение Комплекта "Фенолы"

Аналитический комплект "Фенолы" предназначен для концентрирования проб природных вод, а также питьевой воды, причем коэффициент концентрирования на патронах ДИАПАК П составляет около 10^3 .

Последующее разделение фенолов обращеннофазовой ВЭЖХ на градиентном хроматографе в подвижной фазе вода-ацетонитрил, pH=2.5, при градиенте концентрации ацетонитрила 20-70 об.% со спектрофотометрическим детектированием обеспечивает реализацию способа определения содержания фенолов в следующих двух вариантах:

1. рутинные измерения, проводимые при длине волны детектирования 220 нм с количественной обработкой хроматографической информации штатными средствами математической обработки хроматографа;
2. арбитражный метод, предполагающий использование для идентификации фенолов различия в их спектральных характеристиках, реализуемое при пяти- (220, 230, 240, 270 и 280 нм) или десятиволновом (220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300 и 310 нм) детектировании с обязательным применением программы обработки многоканальной хроматографической информации "МультиХром-Спектр".

Порог обнаружения по любому из фенолов с *Комплектом "Фенолы"* составляет не более 0,1 мкг/л для природных и питьевых вод, что соответствует 0,1 от величин ПДК фенола и 2-хлорфенола как наиболее жестко регламентированных Министерством здравоохранения РФ в основных нормативных документах: СанПиН № 4630-88 и СанПиН 2.1.4.559-96.

I.3. Особенности Комплекта "Фенолы"

Характерными особенностями *Аналитического комплекта "Фенолы"* являются:

1. Двухступенчатая схема концентрирования фенолов на концентрирующем патроне для пробоподготовки методом твердофазной экстракции ДИАПАК П (ТУ 4215-002-05451931-94), что обеспечивает:
- практическое отсутствие расхода органических растворителей (гексан, хлороформ, бутилацетат), обычно применяемых для жидко-жидкостной экстракции фенолов из воды;

- автоматическую по ходу процесса регенерацию патрона "ДИАПАК П" и возможность его многократного использования;
 - унификацию методов концентрирования фенолов из водных сред;
2. Высокочувствительное хроматографическое определение в градиентном режиме на специально тестированной по фенолам колонке, реализуемое на "традиционном" зарубежном или широко распространенном отечественном хроматографе "Милихром-5-3 УФ", что обеспечивает:
- быстрое (30 мин вместе с набором градиента), в одном вводе подготовленной пробы, отдельное количественное определение до 12 приоритетных фенолов, нормируемых СанПиН № 4630-88 и СанПиН 2.1.4.559-96;
 - реализацию как одноволновой (220 нм), так и пяти-десятиволновой (в диапазоне 220-310 нм, для штатной или расширенной поставки ПО хроматографа "Милихром-5-3 УФ"), схем детектирования фенолов и их использование, соответственно, для рутинного анализа и в качестве арбитражного метода;
 - применение в последнем случае программы обработки многоканальной хроматографической информации "МультиХром-Спектр", реализуемой на IBM-совместимой ПЭВМ и поставляемой ЗАО "БиоХимМак СТ".
3. Наличие в составе комплекта аттестованных образцов состава растворов 7 фенолов (остальные стандартные растворы метил- и нитрофенолов потребитель готовит, при необходимости, весовым методом) позволяет аналитику самостоятельно приготовить рабочие стандартные смеси фенолов и использовать их как для градуировки собственно хроматографа, так и для метрологической аттестации всей аналитической схемы в целом.

Эти особенности *Аналитического комплекта "Фенолы"* позволяют реализовать унифицированный хроматографический способ определения содержания фенолов в природных и питьевых водах, превосходящий по основным метрологическим характеристикам на 1-2 порядка как традиционные фотометрические, так и разработанные ранее хроматографические подходы:

- Методика хроматографического определения фенолов в природных водах. Свидетельство ВНИИМС МА № 27-89;
- Методика измерения массовой концентрации фенола и его производных в очищенных сточных водах методом жидкостной хроматографии с использованием хроматографа "Милихром-5-3 УФ", № 02-92. Свидетельство ВНИИМС МА № 52-92.

II. Состав аналитического Комплекта "Фенолы"¹

1. Комплект концентрирующих патронов для пробоподготовки методом твердофазной экстракции ДИАПАК П (ТУ 4215-002-05451931-94) в количестве 10 штук, обеспечивающий подготовку не менее 100 единичных проб для определения фенолов.
2. Высокоэффективная хроматографическая колонка ДИАСФЕР-110-С10СН или ДИАСОРЬ-130-С10СН, 5-7 мкм, (ТУ 4215-001-05451931-94) одного из двух типоразмеров:
 - 4×150 мм (для любых зарубежных хроматографов)-**ТИП 1**;
 - 2×80 мм (для хроматографа "Милихром-5-3 УФ")-**ТИП 2**.
3. Каждая колонка поставляется с типовой тест-хроматограммой аналитического разделения 7 фенолов (от фенола до пентахлорфенола).

¹ Примечание.

1. Общелабораторное оборудование, реактивы и растворители в состав комплекта не входят.
2. Для проведения анализов методом ВЭЖХ рекомендуется применять ацетонитрил для жидкостной хроматографии высокой степени прозрачности для длин волн от 210 нм и более, что связано с многоволновым детектированием в диапазоне 220-310 нм в режиме градиентного элюирования.

4. Модификатор подвижной фазы (1,0% трифторуксусная кислота) - 100 мл во флаконе, 1 шт. (достаточно для приготовления 2 л элюентов).
5. Комплект стандартных растворов 7 фенолов объемом 1 мл в ампулах (1 шт. каждого из фенолов) с аттестованными концентрациями (Свидетельство о метрологической аттестации и Инструкция по применению прилагаются).
6. Инструкция по применению *Аналитического комплекта "Фенолы"*.

III. Порядок проведения пробоподготовки

III.1. Отбор и предварительная подготовка проб

Отобранные пробы природных или питьевой вод должны быть обработаны в течение 8 часов с момента отбора. Отмеряют мерным цилиндром 500 мл воды и фильтруют через бумажный фильтр "синяя лента" или, что лучше, мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

III.2. Очистка и концентрирование фенолов

Идея двухступенчатого способа концентрирования фенолов на патронах ДИАПАК П состоит в следующем. Сначала отфильтрованная проба воды по п.3.1. прокачивается через подготовленный патрон ДИАПАК П, при этом фенолы практически полностью сорбируются на патроне, с которого они могут быть смыты небольшим количеством подходящего растворителя.

Рекомендуемый порядок очистки и концентрирования фенолов на патроне ДИАПАК П состоит в проведении следующего ряда операций:

III.2.1. Подготовка концентрирующего патрона

- ⇒ снять с патрона заглушки, прокачать через него с помощью шприца 5 мл перегнанного ацетона квалификации о.с.ч. или х.ч., затем 20 мл бидистиллированной воды и заглушить оба конца патрона; подготовленный таким образом патрон может храниться с герметично закрытыми концами в холодильнике не более 2-х недель.

III.2.2. Концентрирование фенолов на патроне

- ⇒ снять заглушки с подготовленного патрона, прокачать через него с помощью перистальтического насоса или вакуума пробу по п. III.1 при скорости 5 мл/мин, промыть гидравлическую систему 20 мл бидистиллированной воды, отбросить смывы;
- ⇒ элюировать фенолы с патрона 5 мл перегнанного ацетона с квалификацией не ниже х.ч. в сердцевидную отгонную колбу вместимостью не более 10 мл (*элюат I*);
- ⇒ упарить *элюат I* на водяной бане при температуре не выше 25°C (в очень слабом токе газообразного азота) до исчезновения запаха растворителя, измерить с помощью мерной пипетки на 0,5 мл объем водного остатка и довести его до 0,5 мл смесью бидистиллированной воды и ацетонитрила (9:1 по объему).

III.2.3. Регенерация использованных патронов

- ⇒ регенерацию патронов ДИАПАК П проводят последовательным прокачиванием через патрон с помощью шприца 5 мл ацетона и 20 мл бидистиллированной воды; условия хранения патронов после регенерации аналогичны указанным в п. III.2.1

IV. Проведение идентификации и количественного определения фенолов с помощью ВЭЖХ

IV.1. Порядок проведения ВЭЖХ-анализа

Порядок проведения ВЭЖХ-анализа фенолов в обращенно-фазовом варианте при изократическом элюировании в системе ацетонитрил-вода, содержащей 1% уксусной кислоты, описан в ранее разработанных методиках, приведенных в п. I.3. Однако, указанные варианты ВЭЖХ фенолов обладает рядом существенных недостатков:

- проведение ВЭЖХ единичной пробы фенолов в двух различных элюентах: с 35 об.% ацетонитрила - для анализа 6 компонентов, от фенола до 2,4-дихлорфенола, и с 65 об.% ацетонитрила - для анализа 2-х компонентов, 2,4,6-трихлорфенола и пентахлорфенола, что, по меньшей мере, вдвое увеличивает время ВЭЖХ - анализа;
- неудачный выбор длин волн детектирования в каждом из элюентов - 280 и 250 нм, соответственно, не являющихся спектральными максимумами поглощения фенолов, что приводит к 5-10-кратному снижению чувствительности ВЭЖХ-анализа;
- использование в качестве модификатора элюента уксусной кислоты, препятствующей из-за ее спектральных характеристик детектированию фенолов на максимумах поглощения, лежащих около 214-230 нм.

Аналитический комплект "Фенолы" рассчитан на проведение градиентного элюирования фенолов в системе ацетонитрил-вода с использованием в качестве модификатора 0.05% трифторуксусной кислоты, что позволяет реализовать следующие варианты количественного ВЭЖХ - анализа:

- 1) рутинные измерения концентрации фенолов в подготовленных пробах при одноволновом детектировании на оптимальной длине волны 220 нм и обработкой хроматографической информации штатными средствами математической обработки, входящими в состав хроматографа;

- 2) арбитражный метод, проводимый в пяти- (или более) волновом режиме на характерных максимумах поглощения фенолов (220, 230, 240, 270 и 280 нм) и обеспечивающий детальную спектральную обработку хроматограмм, включая спектральную идентификацию и вычленение полезного сигнала пиков фенолов из фонового сигнала мешающих примесей, причем обработка хроматографической информации в этом случае проводится с помощью программы обработки "МультиХром-Спектр", поставляемой для IBM-совместимых ПЭВМ ЗАО "БиоХимМак СТ".

Дополнительным преимуществом программы "МультиХром" является возможность автоматического управления хроматографом "Милихром-5-3 УФ" по заданной программе, включающей как отработку режимов хроматографического разделения фенолов, так и автоматической обработки количественной информации. Таким образом, объединение хроматографа "Милихром-5-3 УФ", Аналитического комплекта "Фенолы" и программы "МультиХром-Спектр" позволяет создать комплекс для высокочувствительного и высокоточного хроматографического анализа фенолов, рекомендуемый ЗАО "БиоХимМак СТ" для арбитражного контроля фенолов в природных и питьевых водах.

IV.2. Особенности проведения ВЭЖХ - анализа приоритетных фенолов с Комплектом "Фенолы"

IV.2.1. Приготовление элюентов

- ⇒ в мерных цилиндрах приготовить две смеси ацетонитрила, модификатора и бидистиллированной воды в объемных долях соответственно (20:5:75) - элюент А и (70:5:25) -элюент Б;
- ⇒ оба элюента тщательно профильтровать через бумажные фильтры "синяя лента" или, что предпочтительнее, через мембранные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм и дегазировать выдерживанием на водяной бане в течение 10-15 мин при температуре 50-60°C с последующим охлаждением до комнатной температуры.

IV.2.2. Режимы элюирования

- ⇒ на “традиционных” хроматографах зарубежных фирм с колонкой **тип 1** – линейный градиент от элюента А до элюента Б за 15-20 мин с выдержкой 5-10 мин на элюенте Б при скорости потока 0.8-1.0 мл/мин и температуре 20-25°C (при использовании элюентов: А с меньшим, а Б - с большим содержанием ацетонитрила необходимо отрегулировать соотношение элюентов А/Б в начале и конце градиентного цикла по рекомендации п. 4.2.1.);
- ⇒ в сосудах для элюентов №№ 8-1 УВПА хроматографа "Милихром-5-3 УФ" сформировать в необходимых количествах следующие элюенты, соответственно, в объемных долях: элюент А, смеси А:Б- 1:9, 1:4, 3:7, 2:3, 1:1, 7:3 и элюент Б;
- ⇒ схема набора градиента из сосудов №№ 1-8, мкл, соответственно, - 500, 200, 200, 300, 300, 300, 300 и 500 (из них 300- на регенерацию); схема может быть модифицирована в зависимости от температуры окружающей среды, т.е. каждая из ступеней может быть увеличена (уменьшена) на 100-200 мкл, однако минимальный объем ступени не должен быть менее 100 мкл, а объем регенерации из первой ступени - не менее 300 мкл;
- скорость потока элюента через колонку **тип 2**, входящую в состав комплекта, установить равной 80±100 мкл/мин;

IV.2.3. Подготовка к хроматографическому определению

- ⇒ дважды прокачать через колонку подготовленные элюенты в градиентном режиме до получения стабильной базовой линии на регистраторе (дрейф в конце градиента не должен превышать 0,2 е.о.п., иначе придется забраковать партию использованного ацетонитрила) и паспортного уровня флуктуационных шумов для данного хроматографа при длине волны детектирования 220 нм;
- ⇒ провести не менее 2-х пробных вводов по 50 мкл рабочей стандартной смеси 7 фенолов (готовится из стандартных растворов фенолов комплекта путем смешения и разведения смеси бидистиллированной водой

до получения концентрации каждого из фенолов около 1 мг/л) до получения стабильных времен удерживания компонентов смеси;

- ⇒ провести градуировку хроматографа по набору рабочих стандартных смесей 7 фенолов с концентрациями в диапазоне 0,1-100 мг/л.

IV.2.4. Проведение хроматографического определения

- ⇒ ввести в хроматограф пробу фенолов, подготовленную по п. III.2.2, нужное для статистической достоверности число раз, записать хроматограммы, рассчитать площади пиков S_i , совпадающих по временам удерживания с пиками фенолов при вводе рабочих стандартных растворов и провести количественную оценку концентраций идентифицированных в пробе фенолов, исходя из градуировочной зависимости, полученной по п. IV.2.3.

IV.3. Расчет содержания фенолов в исходных пробах воды

Разработанные ЗАО "БиоХимМак СТ" патроны ДИАПАК П обладают значительно более высокими значениями R_i для фенолов (не менее 0.9 по фенолу при прокачивании 0,5 л воды), чем для ранее применявшихся патронов ДИАПАК С16, но и в этом случае табулирование значений R_i было бы серьезной метрологической ошибкой! При работе с *Комплектом "Фенолы"* рекомендуется проводить параллельный градуировочный опыт на смеси 7 фенолов с концентрациями на уровне ПДК.

Рекомендуемый порядок проведения градуировочного опыта и количественного расчета состоит из следующих операций:

IV.3.1. Составление градуировочной смеси

- ⇒ 1,00 мл рабочей стандартной смеси 7 фенолов по п.4.2.3. внести в мерную колбу вместимостью 1000 мл долить до метки бидистиллированной водой, закрыть и несколько раз тщательно перемешать;

- ⇒ концентрация каждого из фенолов в этом растворе составит около 1,0 мкг/л (зафиксируйте точные! значения концентраций C_{i0}), при необходимости, могут быть составлены и другие смеси с неравновеликими значениями C_{i0} .

IV.3.2. Проведение градуировочного опыта

- ⇒ обработать 0,5 л градуировочной смеси по полной схеме пробоподготовки (см. п.п. III.1 и III.2), получив подготовленную пробу в объеме 0,5 мл;
- ⇒ ввести пробу в хроматограф в соответствии с п. IV.2.4, получить хроматограммы и рассчитать площади пиков S_i^* и концентрации C_i^* каждого из 7 фенолов в градуировочном опыте, используя градуировочные характеристики хроматографа по п. IV.2.3;
- ⇒ при необходимости, рассчитать коэффициенты извлечения $R_i = C_i^*/C_{i0}$ для каждого из фенолов (R_i не должны быть менее 0,9 - критерий качества патронов "Диапак П").

IV.3.3. Расчет содержания фенолов в пробах воды

Массовую концентрацию i -фенола (C_i) в исходной пробе воды в мг/л вычисляют по формуле:

$$C_i = \frac{S_i \cdot C_{i0}}{S_i^* \cdot 1000};$$

- где S_i - площадь пика i -фенола в пробе по п.4.2.4., е.о.п.;
- C_{i0} - концентрация i -фенола в градуировочной смеси по п. IV.3.1, мкг/л;
- S_i^* - площадь пика i -фенола в градуировочном опыте по п. IV.3.2, е.о.п..

V. Арбитражный метод идентификации и количественного определения фенолов с помощью хроматографического комплекса "Милихром-5-3 УФ"- "Фенолы"- "Мультихром-Спектр"

1. Как отмечалось в п. I.3, сочетание возможностей хроматографа "Милихром-5-3 УФ", *Аналитического комплекта "Фенолы"* и программы обработки многоканальной хроматографической информации "МультиХром-Спектр" позволяют создать хроматографический комплекс с уникальными аналитическими характеристиками по идентификации и количественному определению фенолов в природных и питьевых водах. Использование многоволнового (5-10 длин волн) детектирования в сочетании с оригинальной обработкой многоканальных хроматограмм является решающим фактором создания арбитражного метода, результаты применения которого не должны зависеть от наличия в пробе каких-либо мешающих компонентов.

Двухступенчатая схема концентрирования фенолов, использованная в *Комплексе "Фенолы"*, позволяет устранить влияние на конечный результат ВЭЖХ-анализа основной массы полярных органических соединений, таких как белки и углеводы. Единственным классом веществ, чье присутствие в подготовленной пробе возможно, являются ароматические кислоты, такие как бензойная, ванилиновая, коричная, п-кумаровая, феруловая и др.

Не следует, также, забывать о возможном присутствии и других, ненормируемых, фенольных соединений. К ним относятся малотоксичные изомеры приоритетных фенолов, нафтолы, полифенолы. Непредсказуемость их нахождения в конкретных пробах природных вод и воздуха делает необходимым наличие в составе арбитражного метода аналитического подхода, позволяющего, при необходимости, отфильтровать полезные сигналы приоритетных фенолов от фона примесей, затрудняющих идентификацию и точный количественный анализ.

Таким аналитическим подходом и является спектральный анализ многоволновых хроматограмм, реализуемый на стандартном хроматографе "Милихром-5-3 УФ" на 5 длинах волн (при замене комплекта ПЗУ версии 4.9 на версию 6.5 - до 10 длин волн) с многоканальной математической обработкой хроматограмм программой "МультиХром-Спектр". Основные возможности программы - идентификация компонентов по спектрам, спектральное разложение неразделенных пиков, фильтрация шумов и развернутые возможности

количественного анализа - обеспечивают достоверную идентификацию приоритетных фенолов и снижение порога обнаружения по предлагаемому способу еще в 2-5 раз (в зависимости от конкретного фенола).

2. Описанный арбитражный метод ВЭЖХ-анализа фенолов в природных водах и питьевой воде на хроматографе "Милихром-5-3 УФ" имеет следующие аналитические характеристики:

- длины волн детектирования - 220, 230, 240, 270, 280 нм (стандартный набор) и 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310 нм (расширенный набор для версии 6.5 ПЗУ хроматографа);
- достоверность идентификации приоритетных фенолов (определяется по степени выделения сигналов фенолов на фоне ароматических кислот) - не менее 0,95;
- порог обнаружения по любому из приоритетных фенолов с Комплектом "Фенолы" составляет не более – 0,1 мкг/л для проб воды.

Порядок работы с программой "МультиХром-Спектр" изложен в Руководстве по программе версии 1.5х, поставляемой ЗАО "БиоХимМак СТ" применительно к IBM-совместимым ПЭВМ в составе Аналитического комплекта "Фенолы" для арбитражного анализа.

Разработал: _____ /Г.Г.Васияров/

“ _____ “ _____ 2005г.Закрытое

Акционерное Общество "БиоХимМак СТ"

Россия, 119992, Москва, Ленинские горы, МГУ им. М.В. Ломоносова, д. 1, стр. 11
тел./факс (095) 939-59-67, 939-58-06 /офис/ 939-36-66 /лаборатория/ E-mail: info@bcmst.ru www.bcmst.ru