УДК 543.544.5

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РОДСТВЕННЫХ ЛИГНИНУ ФЕНОЛОВ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Д.В. Овчинников, Д.С. Косяков, Н.В. Ульяновский

Северный (Арктический) федеральный университет имени М.В. Ломоносова, Центр коллективного пользования научным оборудованием «Арктика»
Российская Федерация, 163002, г. Архангельск, набережная Северной Двины, 17
d.kosyakov@narfu.ru

Поступила в редакцию 11 июня 2014 г.,
после исправления – 26 июня 2014 г.

Пара-производные 2-метоксифенола и 2,6-диметоксифенола, а также их метиловые эфиры широко распространены в природе, являются важными участниками метаболизма высших растений, прекурсорами в биосинтезе лигнина и образуются при его деградации, в том числе в ходе технологических процессов переработки растительного сырья. В работе предложен подход для экспрессного одновременного определения двенадцати основных представителей родственных лигнину соединений, а также фенола, основанный на сочетании хроматографического разделения в изократическом режиме с использованием бифункциональных обращенных неподвижных фаз (Zorbax Bonus-RP и Nucleodur PolarTec) и многоволнового спектрофотометрического детектирования. Установлено, что оптимальное разделение достигается при использовании в качестве подвижной фазы системы ацетонитрил-вода-муравьиная кислота (18 : 82.5 : 0.5). Пределы обнаружения для исследованных соединений лежат в диапазоне от 1.6 до 21 мкг/л. Для повышения чувствительности анализа предложено применение твердофазной экстракции аналитов на сверхсшитом полистироле, что позволяет надежно определять фенольные соединения на уровне концентраций, не превышающем величин ПДК для водоемов рыбохозяйственного назначения. Разработанные подходы испытаны при анализе реального объекта – сточной воды целлюлозно-бумажного предприятия.

Ключевые слова: Высокоэффективная жидкостная хроматография, фенольные соединения, родственные лигнину фенолы, твердофазная экстракция.

Овчинников Денис Владимирович – аспирант кафедры теоретической и прикладной химии САФУ, инженер ЦКП НО «Арктика» САФУ.

Область научных интересов – высокоэффективная жидкостная хроматография, анализ объектов окружающей среды, фенольные соединения.

Косяков Дмитрий Сергеевич – кандидат химических наук, директор ЦКП НО «Арктика» САФУ.

Область научных интересов – хроматография, масс-спектрометрия, химия природных соединений.

Ульяновский Николай Валерьевич – младший научный сотрудник ЦКП НО «Арктика» САФУ.

Область научных интересов – высокоэффективная жидкостная хроматография, масс-спектрометрия.

ВВЕДЕНИЕ

Пара-производные 2-метоксифенола (гваякола) и 2,6-диметоксифенола (сирингола), а также их метиловые эфиры (вератровые соединения) широко распространены в природе, являются важными участниками метаболизма высших растений и прекурсорами в биосинтезе второго по распространенности биополимера – лигнина, составляющего до 30 % биомассы растений. Как в свободном состоянии, так и в связанных формах (гликозиды, полифенолы), гваяцильные и сирингильные фенолы в значительных количествах встречаются в продуктах питания (многих ягодах, фруктах, овощах, кофе, чае, соках и винах), выполняют важные физиологические функции, обладая разнообразными видами биологической активности, например противоязвенной, противовоспалительной, противовирусной, противоопухолевой. Кроме того, природные фенолы широко известны своими антиоксидантными свойствами [1-4].

С другой стороны, составляя основу лигнина, такие соединения образуются при его деградации как в природных условиях, так и в технологических процессах химической переработки растительного сырья, могут в больших количествах попадать в поверхностные воды, нарушая процессы фотосинтеза и ухудшая общее санитарное состояние водоемов ввиду значительного снижения содержания растворенного кислорода. Некоторые фенолы обладают заметной токсичностью, канцерогенными и мутагенными свойствами [5], что позволяет относить их к приоритетным загрязняющим веществам [6, 7].

В связи с этим весьма актуальной является разработка способов одновременного определения максимально широкого круга родственных лигнину фенольных соединений как в растительных экстрактах, так и в природных водах, а также технологических растворах и стоках предприятий лесохимического комплекса.

В настоящее время существует несколько групп методов, используемых для определения фенолов и различающихся между собой по чувствительности, селективности, трудоемкости и требуемой аппаратуре, однако наибольшее распространение получили хроматографические методы.

Для определения летучих фенолов часто используют газохроматографические методики. Использование пламенно-ионизационного детектирования [8, 9] при этом позволяет достигать пределов обнаружения до 0.5 мкг/л. Недостатками данного метода являются возможность деструкции наиболее термолабильных соединений в ходе анализа, а также необходимость предварительного перевода некоторых фенолов в летучие производные (метилирование, силилирование).

Наиболее широко для определения фенольных соединений используются способы обращенно-фазовой ВЭЖХ, не требующие дополнительных стадий дериватизации, с различными типами детектирования: флуориметрическим [10, 11], электрохимическим [12, 13], фотометрическим [14-16]. Поскольку эти соединения, как правило, характеризуются сильным поглощением в УФ-области спектра, наиболее часто используемым методом детектирования в ВЭЖХ является спектрофотометрия. Вследствие существенного различия в полярности фенольных соединений с различными заместителями в ароматическом ядре, в большинстве работ используется градиентное элюирование в широком диапазоне концентраций органического компонента подвижной фазы, что может приводить к возникновению на хроматограммах артефактов, а также увеличению времени анализа ввиду необходимости дополнительного кондиционирования колонки после завершения программы градиента. В качестве альтернативы такому подходу можно рассматривать применение вместо классических неполярных сорбентов с привитыми октильными или октадецильными группировками бифункциональных неподвижных фаз, содержащих как гидрофобные, так и полярные группы (гидроксильные, амидные и пр.).

Несмотря на значительное количество работ по определению фенолов в различных объектах, основное внимание различными авторами уделяется наиболее опасным соединениям, таким как собственно фенол, его галоген- и алкилзамещенные производные, в то время как лишь отдельные представители гваяцильных и сирингильных фенолов попадают в круг исследуемых веществ. До настоящего времени хроматографическое определение широкого набора таких соединений практически не освещено в литературе. Исключением является работа [17], посвященная исследованию сточных вод целлюлозно-бумажной промышленности и выполненная с использованием октадецильной неподвижной фазы, обеспечившей разделение одиннадцати фенольных соединений, в том числе фенола, некоторых производных гваякола, двухатомных фенолов и крезолов. Ограничения со стороны использованной приборной базы (микроколоночный хроматограф) не позволили расширить круг определяемых соединений и достичь высокой чувствительности определения, что потребовало применения многостадийного концентрирования образцов.

На восполнение данного пробела направлено настоящее исследование, целью которого является разработка подходов к одновременному экспрессному определению родственных лигнину фенолов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объекты исследования. В качестве объектов исследования выбраны коммерчески доступные препараты производства Sigma-Aldrich и Fluka, моделирующие основные структурные фрагменты природных лигнинов: ацетованилон (**I**), ацетосирингон (**II**), ванилин (**III**), ванилиновая кислота (**IV**), вератровый альдегид (**V**), вератрол (**VI**), гваякол (**VII**), конифериловый альдегид (**VIII**), сиреневый альдегид (**IX**), сиреневая кислота (**X**), сирингол (**XI**), фенол (**XII**), феруловая кислота (**XIII**), с содержанием основного компонента более 97 %. Структурные формулы соединений представлены на рис. 1.

В качестве реального объекта исследования для апробации разрабатываемых подходов использовали пробу сточной воды цеха отбелки целлюлозы предприятия целлюлозно-бумажной промышленности.

Хроматографический анализ. Хроматографический анализ выполняли с использованием УВЭЖХ-системы LC-30 “Nexera” (Shimadzu, Япония), состоящей из вакуумного дегазатора DGU-20A$_5$, двух насосов LC-30AD с системой формирования градиента на стороне высокого давления, автосамплера SIL-30AC, термостата колонок CTO-20A и ди-

одно-матричного спектрофотометрического детектора SPD-M20A, оснащенного термостатируемой аналитической полумикрокюветой с длиной оптического пути 5 мм.

Для разделения применяли обращенно-фазовые колонки Zorbax Eclipse Plus C18, 100x3.0 мм, 3.5 мкм, (Agilent, США), Zorbax Bonus-RP, 150x3.0 мм, 3.5 мкм, (Agilent, США) и Nucleodur PolarTec, 150x2.0 мм, 1.8 мкм (Macherey-Nagel, Германия). В качестве элюента использовали смеси ацетонитрила (0 сорт, НПК "Криохром", С.-Петербург) и высокочистой воды I типа с удельным сопротивлением 18.2 МОм·см, полученной непосредственно перед проведением эксперимента в системе Simplicity UV (Millipore, Франция). Для подавления диссоциации аналитов [18] в подвижную фазу добавляли 0.5 % об. муравьиной кислоты (HPLC grade, Aldrich). Во всех экспериментах использовали изократический режим элюирования, скорость потока элюента составляла 0.4 мл/мин, температура термостата – 40 °С; объем вводимой пробы – 10 мкл. Детектирование осуществляли в диапазоне длин волн 200-400 нм со спектральным разрешением 1.2 нм.

Приготовление градуировочных растворов. Весовым методом готовили исходные растворы индивидуальных компонентов в ацетонитриле с концентрацией 1000 мг/л. Путем последовательных разбавлений получали градуировочные растворы в диапазоне концентраций от 0.1 до 10.0 мг/л. Исходные растворы хранили при температуре 4 °С не более недели, рабочие растворы использовали непосредственно после приготовления.

Твердофазная экстракция. Для концентрирования аналитов использовали метод твердофазной экстракции (**ТФЭ**), находящий широкое применение в современной аналитической практике при определении фенолов и обладающий несомненными преимуществами в плане простоты и экспрессности пробоподготовки. Эксперименты проводили с использованием патронов для ТФЭ объемом 1 мл "Диапак-С16 Plus" и "Диапак-П" (ЗАО БиоХимМак СТ, Москва), содержащих сорбенты на основе гидрофобизированного силикагеля и сверхсшитого полистирола соответственно [19, 20].

Непосредственно перед проведением концентрирования патрон кондиционировали пропусканием 5 мл ацетонитрила и 10 мл воды, содержащей 0.5 % муравьиной кислоты. Аликвоту исследуемой пробы объемом 100 мл подкисляли муравьиной кислотой до pH = 2.1-2.2 и пропускали через патрон, установленный в вакуумный манифолд (Macherey-Nagel, Германия), со скоростью не более 5 мл/мин. Сорбированный аналит смывали 2 мл ацетонитрила, элюат разбавляли в два раза деионизованной водой. Таким образом, достигалось концентрирование в 25 раз. Полученный раствор фильтровали при помощи мембранного нейлонового фильтра (0.22 мкм) и вводили в хроматографическую систему.

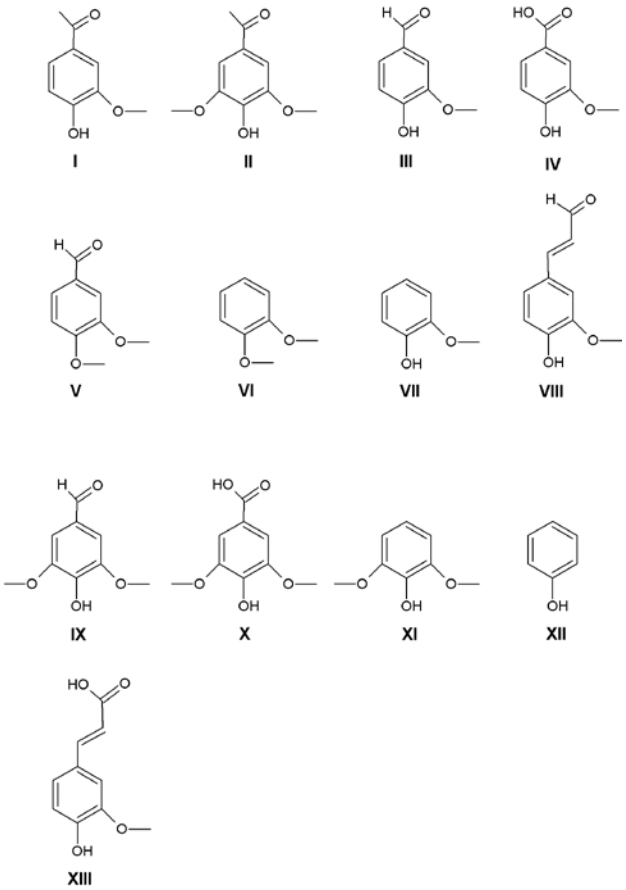

Рис. 1. Структурные формулы исследуемых соединений

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Хроматографическое разделение. Исходя из необходимости достижения максимальной простоты и экспрессности проведения анализа, все эксперименты проводили в изократическом режиме элюирования. Отказ от формирования градиента состава подвижной фазы не позволил достичь приемлемого разделения на классическом октадецильном сорбенте (Zorbax Eclipse Plus C18) ввиду большого различия в полярности исследуемых веществ. Так, снижение элюирующей силы подвижной фазы для обеспечения величин коэффициентов емкости (k') фенольных карбоновых кислот и альдегидов на уровне, превышающем 1, ведет к недопустимому увеличению времени удерживания таких компонентов, как вератрол и конифериловый альдегид (более 40 мин) сопровождающемуся сильным размыванием хроматографических пиков и, как следствие, потерей чувствительности. Решение задачи полного разделения наиболее полярных аналитов в таких условиях оказалось в принципе несовместимым с определением гидрофобных соединений – наиболее удерживаемые компоненты не элюируются из колонки за разумное время.

Для преодоления данной проблемы в дальнейших экспериментах нами использована бифункциональная неподвижная фаза на основе силикагеля с тетрадецильными радикалами, ковалентно привитыми через внедренные в алкильные цепи

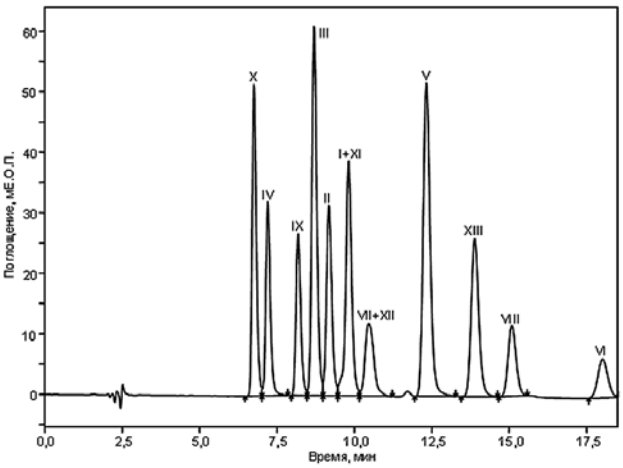

Рис. 2. Хроматограмма стандартной смеси фенолов. Параметры разделения: неподвижная фаза Zorbax Bonus-RP, элюент ацетонитрил – вода (18 : 82), скорость потока 0.4 мл/мин, длина волны 280 нм

амидные группы (Zorbax Bonus-RP). За счет донорно-акцепторных взаимодействий с ними фенольных гидроксильных и карбоксильных групп аналитов достигается приемлемое удерживание полярных компонентов при содержании ацетонитрила в элюенте, достаточного для элюирования вератрола в течение 20 мин. Варьирование состава подвижной фазы позволило подобрать оптимальные условия разделения с максимальным разрешением при нахождении всех аналитов в целевом диапазоне значений *k′* от 2 до 10 (рис. 2), что достигается при концентрации ацетонитрила, равной 18 % об. Недостатком данной методики является невозможность разделения двух пар соединений, характеризующихся практически идентичными коэффициентами емкости, несмотря на существенные различия в структуре и химических свойствах: гваякола и фенола, а также ацетованилона и сирингола, сильно различающихся по удерживанию на сорбентах с фазами С8 или С18. Данный эффект объясняется двойным механизмом удержи-

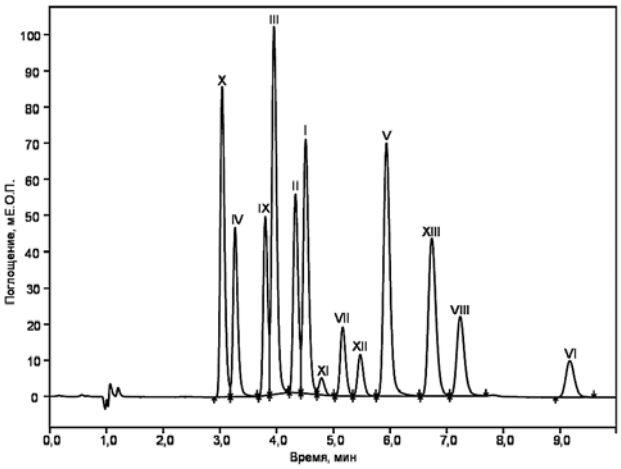

Рис. 3. Хроматограмма стандартной смеси фенолов. Параметры разделения: неподвижная фаза Nucleodur PolarTec, элюент ацетонитрил – вода (18 : 82), скорость потока 0.4 мл/мин, длина волны 280 нм

вания на бифункциональном сорбенте и, в случае наиболее интересной пары фенол-гваякол, по-видимому, связан с одновременным снижением гидрофильности и доступности фенольной гидроксильной группы для донорно-акцепторных взаимодействий за счет образования внутримолекулярной водородной связи при введении *орто*-метоксильной группы. Разделения таких компонентов удается достичь при изменении химической природы подвижной фазы, например, за счет замены ацетонитрила на метанол. Тем не менее, такая замена не оказалась оправданной ввиду резкого ухудшения разрешения между другими компонентами анализируемой смеси.

В связи с этим, дальнейшую оптимизацию разделения родственных лигнину фенольных соединений осуществляли за счет применения амидной неподвижной фазы, аналогичной Zorbax Bonus-RP, но отличающейся большей длиной алкильной цепи (С18), а также меньшим размером зерна сорбента и, соответственно, большей эффективностью – Nucleodur PolarTec.

Полученные результаты показали, что наилучшее разделение достигается при том же составе подвижной фазы, что и в случае сорбента Zorbax Bonus-RP (рис. 3). Все компоненты оказываются разделенными за 10 минут (*k′* = 2-10) благодаря увеличению линейной скорости потока в 2.25 раза при использовании давлений в системе порядка 50 МПа. Наиболее критичным является разрешение пиков предельно близких по своим свойствам соединений гваяцильного и сирингильного рядов, отличающихся только наличием метоксильной группы – сиреневого альдегида и ванилина, а также ацетованилона и ацетосирингона. Тем не менее, при использовании разработанного хроматографического метода разрешение пиков компонентов IX и III составляет 0.92 на уровне концентраций 10 мг/л, а для компонентов I и II – 1.05. Учитывая тот факт, что для количественного анализа необходимо разрешение между пиками не менее 0.8 [21], предложенный подход можно считать приемлемым для анализа фенольных соединений.

Количественный анализ. Исследуемые соединения значительно различаются по спектрам поглощения, в первую очередь за счет наличия или отсутствия в *пара*-заместителе сопряженных с ароматическим ядром карбонильной группы или двойной углерод-углеродной связи, вызывающих батохромный сдвиг полос поглощения, соответствующих $\pi \rightarrow \pi^*$ переходам, а также появление дополнительных полос в области выше 300 нм. В связи с этим, использование спектрофотометрического детектирования при одной фиксированной длине волны приводит к существенному снижению интенсивности сигнала детектора для части аналитов и не представляется оправданным. Применение многоволнового диодно-матричного детектирования позволило нам преодолеть указанное затруднение,

Таблица 1

Пределы обнаружения и количественного определения исследуемых соединений.

Компонент	λ, нм	λ_{max}, нм	*a*	Предел обнаружения, мкг/л	Предел количественного определения, мкг/л
I	276	280	38670	2.5	8.3
II	298	300	42937	2.2	7.3
III	280	280	55402	1.6	5.4
IV	261	260	45670	1.8	6.1
V	279	280	52994	2.3	7.5
VI	274	280	9091	17	57
VII	276	280	12459	8.0	27
VIII	339	340	87796	1.7	6.8
IX	308	310	39920	2.0	5.3
X	275	280	53677	1.6	5.6
XI	269	270	4673	21	69
XII	271	270	11833	8.8	29
XIII	323	320	63291	2.2	7.2

одновременно повысив достоверность идентификации целевых компонентов в сложных матрицах и селективность анализа. Для целей количественного анализа выбраны длины волн (λ), близкие к максимумам поглощения исследуемых соединений (λ_{max}) в области 250-350 нм (табл. 1). Несмотря на наличие в спектрах поглощения большинства фенолов более интенсивных пиков в районе 210-220 нм, использование их в качестве аналитических не привело к повышению чувствительности определения вследствие существенного возрастания уровня шума в коротковолновой области за счет большего фонового поглощения элюента.

Изучение растворов стандартов с концентрациями 0.1-10.0 мг/л показало соблюдение линейности градуировочных зависимостей, описываемых уравнением зависимости площади пика от концентрации вида "$y = ax$", во всем исследуемом диапазоне с коэффициентом корреляции более 0.995 для каждого компонента. На основе оценок среднеквадратичного отклонения сигналов базовой линии (s_b) на хроматограммах рассчитаны пределы обнаружения и количественного определения на основе критериев $3s_b$ и $10s_b$ соответственно. Полученные результаты представлены в табл. 1.

Очевидно, что большинство исследуемых компонентов характеризуются довольно низкими пределами обнаружения, не превышающими нескольких мкг/л. Тем не менее, уровень ПДК для объектов рыбохозяйственного назначения для такого компонента, как фенол, составляет 1 мкг/л [22], что достижимо лишь с применением техники предварительного концентрирования.

Сорбционное концентрирование фенолов. Проведено сравнение эффективности двух типов сорбентов на основе гидрофобизированного силикагеля и сверхсшитого полистирола, наиболее часто применяемых для фенольных соединений. Проводили три параллельных эксперимента по экстракции из водного раствора смеси фенолов с концентрацией каждого компонента, составляющей 100 мкг/л. По полученным значениям были рассчитаны степени извлечения исследуемых соединений, результаты представлены в табл. 2.

Из полученных данных видно, что гексадецильная фаза может успешно применяться для концентрирования лишь наиболее гидрофобных соединений вератрового типа, а также кониферилового альдегида. Для остальных веществ степень извлечения, достигнутая при использовании сорбента Диапак-С16, является крайне низкой. Более предпочтительным следует признать применение

Таблица 2

Степени извлечения и пределы обнаружения исследуемых соединений при применении ТФЭ концентрирования.

Компонент	Диапак С16 Plus		Диапак-П	
	Степень извлечения, %	Предел обнаружения, мкг/л	Степень извлечения, %	Предел обнаружения, мкг/л
I	26 ± 2.2	0.4	105 ± 3	0.1
II	29 ± 0.1	0.3	88 ± 9	0.1
III	11 ± 0.3	0.6	105 ± 3	0.1
IV	2.8 ± 0.2	2.6	65 ± 7	0.1
V	80 ± 1	0.1	106 ± 2	0.1
VI	94 ± 1	0.7	90 ± 5	0.8
VII	11 ± 0.7	2.9	100 ± 7	0.3
VIII	45 ± 1	0.2	87 ± 9	0.1
IX	17 ± 0.2	0.5	76 ± 6	0.1
X	2.5 ± 0.2	2.6	56 ± 6	0.1
XI	22 ± 1	3.8	96 ± 6	0.9
XII	3.0 ± 0.2	12	91 ± 7	0.4
XIII	8.0 ± 0.7	1.1	52 ± 7	0.2

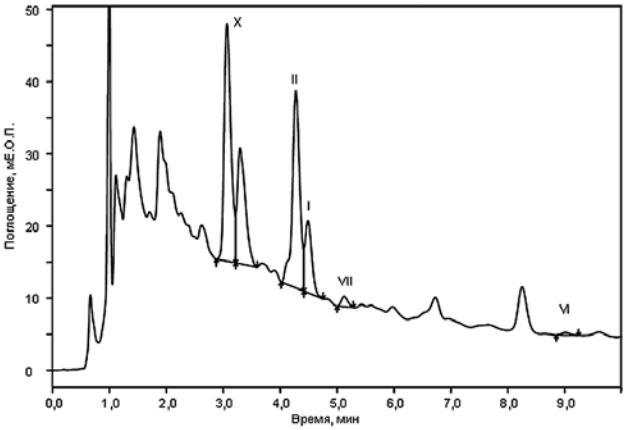

Рис. 4. Хроматограмма сконцентрированной сточной воды отбельного цеха ЦБП. Параметры разделения: неподвижная фаза Nucleodur PolarTec, элюент ацетонитрил – вода (18 : 82), скорость потока 0.4 мл/мин, длина волны 280 нм

сорбента Диапак-П. Он демонстрирует, наряду с хорошей воспроизводимостью, степени извлечения, превышающие 75 % для подавляющего большинства компонентов, что можно считать приемлемым результатом. Карбоновые кислоты (ванилиновая, сиреневая и феруловая) характеризуются извлечением на уровне 50-60 %, однако, учитывая низкие пределы обнаружения, применение ТФЭ концентрирования открывает возможность определения данных веществ на уровне десятых долей мкг/л (табл. 2).

Анализ сточной воды. Для апробации и оценки применимости разработанных подходов определения фенолов в качестве реального объекта была проанализирована проба сточной воды отбельного цеха целлюлозно-бумажного предприятия, реализующего кислородно-щелочную технологию отбелки целлюлозы для удаления остаточных количеств лигнина. Образец подвергали концентрированию с помощью ТФЭ (Диапак-П), экстракт вводили в хроматографическую систему. Полученная хроматограмма представлена на рис. 4. Несмотря на сложность матрицы и низкий уровень концентраций, пики целевых компонентов достаточно хорошо отделены и надежно идентифицируются по временам удерживания и спектрам поглощения. В образце обнаружены гваякол, вератрол, ацетованилон, ацетосирингон и сиреневая кислота. Во избежание ошибок, связанных с возможным наложением хроматографических зон аналитов и посторонних примесей, для определения исследуемых веществ использовали также метод добавок, показавший результаты, идентичные данным, полученным по градуировочным зависимостям (табл. 3).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование метода высокоэффективной жидкостной хроматографии, сочетающего разделение на обращено-фазовых сорбентах с внедренными полярными группами и многоволновым спектрофотометрическим детектированием, позволяет проводить экспрессное одновременное определение широкого круга природных фенолов и их метиловых эфиров в изократическом режиме элюирования. Концентрирование аналитов методом твердофазной экстракции на сверхсшитом полистироле позволяет снизить пределы обнаружения до уровня, не превышающего предельно допустимых концентраций фенолов в природных водах.

Работа выполнена в Центре коллективного пользования научным оборудованием «Арктика» Северного (Арктического) федерального университета при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект №13-03-12238 офи_м).

ЛИТЕРАТУРА

1. Saxena M., Saxena J., Pradhan A. Flavonoids and phenolic acids as antioxidants in plants and human health // Int J Pharm Sci Rev Res. 2012. V.16, № 2. P. 130-134.
2. Dillard C. J., German J. B. Phytochemicals: nutraceuticals and human health // J. Sci Food Agric. 2000. V. 80. P. 1744-1756.
3. Antioxidant activity of selected phenols estimated by ABTS and FRAP methods / I. Biskup [et al.] // Postepy Hig Med Dosw. 2013. V. 67. P. 958-963.
4. Prousek J. Fenton chemistry in biology and medicine // Pure Appl. Chem. 2007. V. 79, №. 12. P. 2325–2338.
5. Вредные химические вещества. Галоген- и кислородсодержащие органические соединения: Справ. изд / А. Л. Бандман [и др.]. СПб: Химия, 1994. 688 с.
6. Воробьева Т.В., Терлецкая А.В., Кущевская Н.Ф. Стандартные и унифицированные методы определения фенолов в природных и питьевых водах и основные направления их совершенствования // Химия и технология воды. 2007. Т. 29, №4. С. 370-390.
7. Физическая химия лигнина / К.Г. Боголицын [и др.]. Архангельск: АГТУ, 2009. 489 с.

Таблица 3

Результаты анализа сточной воды методом добавок

Компонент	Концентрация в пробе, мг/л	Концентрация с введенной добавкой, мг/л	Найдено, мг/л	Относительная погрешность δ, %
X	0.51	0.99	1.3	31
II	0.31	0.63	0.64	1.6
I	0.082	0.18	0.17	5.6
VI	0.020	0.038	0.039	2.6
VII	0.032	0.066	0.068	3.0

8. РД 52.24.487-2011. Массовая концентрация фенола, алкилфенолов и монохлорфенолов в водах. Методика измерений газохроматографическим методом. Ростов-на-Дону: Росгидромет, 2011. 42 с.
9. МУК 4.1.647-96. Методические указания по газохроматографическому определению фенола в воде. М.: Минздрав России, 1997. 15 с.
10. Rapid quantification of 4-ethylphenol in wine using high-performance liquid chromatography with a fluorimetric detector / G. Nicolini [et al.] // Vitis - J Grapevine Res. 2007. V.46, №4. P. 202-206.
11. Separation of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection / M.A. Rodrıguez-Delgado [et al.] // J. Chromatogr. A. 2001. V. 912, №2. P. 249-257.
12. RP-HPLC analysis of phenolic compounds and flavonoids in beverages and plant extracts using a CoulArray detector / P. Jandera [et al.] // J Sep Sci. 2005. V. 28. P. 1005-1022.
13. Simultaneous determination of six phenolic compounds in jujube by LC-ECD /
14. B.-N. Wang [et al.] // Chromatographia. 2010. V. 71, № 7-8. P. 703-707.
15. Development of an HPLC method for the determination of phenolic by-products: optimisation of the separation by means of the experimental designs methodology / B. Motamed [et al.] // Analusis. 2000. V. 28, № 7. P. 592-599.
16. Lobo I., Mozeto A.A., Cass Q.B. Determination of phenolic compounds from oxidation of lignin lake sediments by high-performance liquid chromatography // Chromatographia. 2000. V. 52, № 11/12. P. 727-731.
17. Ho P., Hogg T.A., Silva M.C.M. Application of a liquid chromatographic method for the determination of phenolic compounds and furans in fortified wines // Food Chem. 1999. V. 64, №1. P. 115-122.
18. Высокоэффективная жидкостная хроматография фенольных компонентов сточных вод ЦБП / К.Г. Боголицин [и др.] // Известия вузов. Лесной журнал. 2003. № 4. С. 116-122.
19. Ragnar M., Lindgren C.T., Nilvebrant N.-O. pKa-values of guaiacyl and syringyl phenols related to lignin // J. Wood Chem. Technol. 2000. V. 20, № 3. P. 277-305.
20. Сурсякова В.В., Бурмакина Г.В., Рубайло А.И. Разработка методик определения фенолов в питьевой и природной водах методами капиллярного электрофореза и высокоэффективной жидкостной хроматографии // Журнал Сибирского федерального университета. Серия: Химия. 2010. Т. 3, №3. С. 268-277.
21. Применение сверхсшитого макросетчатого полистирола для концентрирования фенолов / А.В. Хрящевский [и др.] // Вестник Московского университета. Серия 2: химия. 1998. Т. 39, № 3. С. 196-200.
22. Weston A., Brown P.R. HPLC and CE: Principles and Practice. San Diego: Academic Press. 1997. 280 p.
23. Перечень рыбохозяйственных нормативов: предельно допустимых концентраций (ПДК) и ориентировочно безопасных уровней воздействия (ОБУВ) вредных веществ для воды водных объектов, имеющих рыбохозяйственное значение. М.: Издательство ВНИРО, 1999. 304 с.

DETERMINATION OF LIGNIN RELATED PHENOLS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

D.V. Ovchinnikov, D.S. Kosyakov, N.V. Ul'yanovskii

Northern (Arctic) Federal University named after M.V. Lomonosov,
Core Facility Center "Arktika"
Severnaya Dvina Emb. 17, Arkhangelsk, 163002, Russian Federation
d.kosyakov@narfu.ru

Para-derivatives of 2-methoxyphenol and 2,6-dimethoxyphenol, as well as their methyl esters, are widely spreaded in nature. They play a role of important intermediates in the metabolism of higher plants, precursors in the biosynthesis of lignin and are formed during its degradation including in the processes of plant biomass chemical treatment. An approach for rapid simultaneous determination of twelve main representatives of the lignin related compounds as well as phenol based on combination of chromatographic separation in isocratic mode using bifunctional facing stationary phases (Zorbax Bonus-RP and Nucleodur PolarTec) and multi-wavelength spectrophotometric detection is proposed. It has been established that the optimum separation is achieved using a mobile phase of acetonitrile-water-formic acid (18:81.5:0.5). Detection limits for the compounds studied are in the range from 1.6 to 21 μg / L. To increase the sensitivity of analysis the use of solid phase extraction of analytes on hypercrosslinked polystyrene is proposed, it allows to determine reliably phenolic compounds at levels not exceeding MPCs. The developed approaches have been tested in the analysis of the real object - wastewater of pulp and paper mill.

Key words: High performance liquid chromatography, phenolic compounds, lignin related phenols, solid phase extraction.

REFERENCES

1. Saxena M., Saxena J., Pradhan A. Flavonoids and phenolic acids as antioxidants in plants and human health. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research,* 2012, vol.16, no. 2, pp. 130-134.
2. Dillard C. J., German J. B. Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2000, vol. 80, pp. 1744-1756.
3. Biskup I., Golonka I., Gamian A., Sroka Z. Antioxidant activity of selected phenols estimated by ABTS and FRAP methods. *Postepy Hig Med Dosw*, 2013, vol. 67, pp. 958-963.

4. Prousek J. Fenton chemistry in biology and medicine. *Pure and Applied Chemistry*, 2007, vol. 79, no. 12. pp. 2325-2338.
5. Bandman A. L., Voitenko G. A., Volkova N. V. *Vrednye khimicheskie veshchestva. Galogen- i kislorodsoderzhashchie organicheskie soedineniia* [Harmful chemicals. Halogen-and oxygen-containing organic compounds]. SPb: Khimija, 1994. 688 p. (in Russian).
6. Vorob'eva T.V., Terleckaia A.V., Kushhevskaia N.F. [Standard and unified methods for determining phenols in natural and drinking water and main directions of their improvement]. *Khimiia I Tekhnologiia Vody* [Journal of Water Chemistry and Technology], 2007, vol. 29, no. 4, pp. 370-390 (in Russian).
7. Bogolitsin K.G., Lunin V.V. *Fizicheskaya khimiya lignina* [Physical chemistry of lignin]. Arkhangelsk, ASTU, 2009. 489 p. (in Russian).
8. RD 52.24.487-2011. Massovaia koncentraciia fenola, alkilfenolov i monohlorfenolov v vodah. Metodika izmerenii gazokhromatograficheskim metodom [RD 52.24.487-2011. Mass concentration of phenol, alkylphenols and chlorophenols in water. Measurement technique by gas chromatography]. Rostov-on-Don, The Federal Service for Hydrometeorology and Environmental Monitoring of Russia, 2011. 42 p. (in Russian).
9. MUK 4.1.647-96. Metodicheskie ukazaniia po gazokhromatograficheskomu opredeleniiu fenola v vode [MUK 4.1.647-96. Methodical instructions for the gas chromatographic determinationof phenol in water]. Moscow, Ministry of Health of the Russian Federation, 1997. 15 p. (in Russian).
10. Nicolini G., Larcher R., Bertoldi D., Puecher C., Magno F. Rapid quantification of 4-ethylphenol in wine using high-performance liquid chromatography with a fluorimetric detector. *Vitis - Journal of Grapevine Research*, 2007, vol. 46, no. 4, pp. 202-206.
11. Rodrıguez-Delgado M.A., Malovana S., Perez J.P., Borges T., Montelongo F.J.G. Separation of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection. *Journal of Chromatography A*, 2001, vol. 912, no. 2, pp. 249-257.
12. Jandera P., Skerikova V., Rehova L., Hajek T., Baldrianova L., Skopova G., Kellner V., Horna A. RP-HPLC analysis of phenolic compounds and flavonoids in beverages and plant extracts using a CoulArray detector. *Journal of Separation Science*, 2005, vol. 28, pp. 1005-1022.
13. Wang B.-N., Cao W., Gao H., Fan M.-T., Zheng J.-B. Simultaneous determination of six phenolic compounds in jujube by LC-ECD. *Chromatographia*, 2010, vol. 71, no. 7-8, pp. 703-707.
14. Motamed B., Bцhm J.-L., Hennequin D., Texier H., Mosrati R., Barillier D. Development of an HPLC method for the determination of phenolic by-products: optimisation of the separation by means of the experimental designs methodology. *Analusis*, 2000, vol. 28, no. 7, pp. 592-599.
15. Lobo I., Mozeto A.A., Cass Q.B. Determination of phenolic compounds from oxidation of lignin lake sediments by high-performance liquid chromatography. *Chromatographia*, 2000, vol. 52, no. 11/12, pp. 727-731.
16. Ho P., Hogg T.A., Silva M.C.M. Application of a liquid chromatographic method for the determination of phenolic compounds and furans in fortified wines. *Food chemistry*, 1999, vol. 64, no. 1, pp. 115-122.
17. Bogolitsyn K.G., Kosiakov D.S. Shkaev A.N., Pochtovalova A.S. [High performance liquid chromatography of phenolic components of PPI effluents]. *Lesnoi Zhurnal* [Forest Journal], 2003, no. 4, pp. 116-122 (in Russian).
18. Ragnar M., Lindgren C.T., Nilvebrant N.-O. pKa-values of guaiacyl and syringyl phenols related to lignin. *Journal of wood chemistry and technology*, 2000, vol. 20, no. 3, pp. 277-305.
19. Sursiakova V.V., Burmakina G.V., Rubailo A.I. [Development of methods for phenols determination in drink and natural water using capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography]. *Zhurnal Sibirskogo federal'nogo universiteta. Seriia: Khimiia* [Journal of Siberian Federal University. Chemistry], 2010, vol. 3, no. 3, pp. 268-277 (in Russian).
20. Khriashhevskii A.V., Podlovchenko M.B., Nesterenko P.N., Shpigun O.A. [Use of hypercrosslinked macroreticular polystyrene for the phenols preconcentration]. *Vestnik Moskovskogo Universiteta. Seriia 2: Khimiia*, 1998, vol. 39, no. 3, pp. 196-200.
21. Weston A., Brown P.R. *HPLC and CE: Principles and Practice.* San Diego, Academic Press, 1997. 280 p.
22. Perechen' rybohoziaistvennykh normativov: predel'no dopustimykh koncentratsii (PDK) i orientirovochno bezopasnykh urovnei vozdeistviia (OBUV) vrednykh veshchestv dlia vody vodnyh ob``ektov, imeiushchih rybokhoziaistvennoe znachenie [List of Fishery regulations: Maximum Allowed Concentrations (PDK) and Tentatively Safe Levels of Exposure (OBUV) of hazardous substances to water bodies of water with fish industry]. Moscow, VNIRO, 1999, 304 p. (in Russian).