

УДК 535.8:543.420.62;543.422.5;543.432;543.544.8:543.8

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИАЦЕТИЛА ПРИ ПОМОЩИ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ И ТЕРМОЛИНЗОВОЙ СПЕКТРОМЕТРИИ

Н.А. Пурецкий, М.А. Проскурнин, А.В. Пирогов

(кафедра аналитической химии, Michael@analyt.chem.msu.ru)

Предложены условия спектрофотометрического и термолинзового определения диацетила с помощью креатина и 2-нафтола. Полученное значение предела обнаружения для спектрофотометрии ($\lambda = 527$ нм), равное 10 нг/мл, ниже существующих в пять раз. На основе спектрофотометрического определения без изменения методики предложены условия термолинзового определения диацетила ($\lambda = 514,5$ нм, мощность индуцирующего излучения 40 мВт). Термолинзовое определение характеризуется не только снижением предела обнаружения в пять раз (до 2 нг/мл), что сопоставимо с определением диацетила методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (предел обнаружения 0,7 нг/мл), но и улучшением других метрологических характеристик определения диацетила. Показано, что, в отличие от использования газовой хроматографии, этанол не мешает как спектрофотометрическому, так и термолинзовому определению диацетила.

Ключевые слова: термолинзовая спектрометрия, диацетил, спектрофотометрия, высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием.

Диацетил и другие вицинальные дикетоны содержатся во многих продуктах питания (пиво, вина, сыры и т. д.), при этом крайне желательно определять диацетил на уровне нанограммовых концентраций. К сожалению, существующие спектрофотометрические [1–5], вольтамперметрические [6, 7] и хроматографические методы [8–10] не позволяют этого делать. Настоящая работа посвящена оптимизации условий спектрофотометрического определения диацетила для увеличения его чувствительности, а также изучению возможности использования термолинзовой спектрометрии [11] как современного высокочувствительного метода молекулярной абсорбционной спектроскопии для дополнительного увеличения чувствительности определения диацетила.

Экспериментальная часть

Аппаратура. Для спектрофотометрических измерений использовали сканирующий спектрофотометр “Shimadzu UV1240-mini” (Япония). Измерения проводили в диапазоне длин волн 190–700 нм. Использовали пластиковые кюветы с $l = 1$ см, объемом 4 мл. Термолинзовые измерения проводили на двухлазерном параллельно-лучевом термолинзовом спектрометре [12]. Термолинзу индуцировали в кювете (длина оптического пути 1 см) излучением аргонового ионного

лазера “Innova 90–6” (“Coherent”, США, TEM_{00} -мода, 488,0 и 514,5 нм). В качестве зондирующего лазера использовали He–Ne-лазер “SP-106-1” (“Spectra Physics”, США) с $\lambda_p = 632,8$ нм (TEM_{00} -мода, 10 мВт). Для измерений pH среды использовали универсальный иономер “inoLab pH Level 1” со стеклянным индикаторным электродом и хлорид-серебряным электродом сравнения. Точность измерения pH составляет $\pm 0,01$. Отбор необходимых количеств веществ производили дозаторами фирмы “LabMate” (“HTL”, Польша). Использованы дозаторы для отбора растворов разного объема: 2–20 мкл (точность отбора 0,01 мкл), 20–200 мкл (точность отбора 0,1 мкл) и 1–5 мл (точность отбора 0,005 мл). Для хромато-масс-спектрометрического определения использовали газовый хроматограф марки “Smart InterAB” (“Agilent Technologies”, Россия) с масс-спектрометрическим детектором “5973 Network”. Колонка “HP-5” (95% силоксана, 5% фенилметилсилоксана). Параметры колонки: длина 30 м, диаметр 250 мкм, толщина неподвижной фазы 0,25 мкм. Подвижная фаза – гелий, скорость потока 1 мл/мин. Объем вводимой пробы 1 мкл (инжектор “Agilent Technologies 7683B Series”).

Обработка данных измерений. Термолинзовые измерения представляют собой последовательность

циклов включения-выключения индуцирующего лазера, дающую серию сигналов θ , вычисленных из уравнения:

$$\theta = \frac{1}{B} \left(1 + \sqrt{\frac{I_{\text{выкл}} - I_{\text{вкл}}}{I_{\text{вкл}}}} \right), \quad (1)$$

где $I_{\text{выкл}}$ и $I_{\text{вкл}}$ – интенсивность в центре зондирующего луча в отсутствие термолинзы и при полностью развившейся термолинзе соответственно, а геометрический фактор B для использованной схемы измерений равен 0,396 [12]. Пересчет аналитического сигнала θ в оптическую плотность проводят по уравнению

$$A = \frac{\theta}{2,303 E_0 P_e}, \quad (2)$$

где P_e – мощность лазерного излучения с длиной волны λ_e , индуцирующего термолинзу [11], E_0 – фактор увеличения чувствительности термооптических измерений (увеличение чувствительности по сравнению с традиционной спектрофотометрией для мощности индуцирующего излучения 1 мВт),

$$E_0 = \frac{dn/dT}{k\lambda_p}, \quad (3)$$

где dn/dT – температурный градиент показателя преломления, k – коэффициент теплопроводности среды, λ_p – длина волны излучения, зондирующего термолинзу. Теоретически ожидаемый рост чувствительности термолинзовых измерений по сравнению со спектрофотометрией рассчитывали из уравнения

$$\theta/A = 2,303 E_0 P_e \frac{\varepsilon_{\lambda_{\text{ТЛС}}}}{\varepsilon_{\lambda_{\text{СФ}}}}, \quad (4)$$

где $\varepsilon_{\lambda_{\text{ТЛС}}}$ и $\varepsilon_{\lambda_{\text{СФ}}}$ – молярные коэффициенты поглощения продукта реакции на длинах волн, используемых для термолинзовых измерений и спектрофотометрии соответственно.

Реагенты и растворители. Использованы следующие реагенты: диацетил (97%, $d = 0,981$, “Aldrich”, “х.ч.”); 2-нафтол (“Aldrich”, “х.ч.”); креатин (“Weider”, “ч.”); NaOH (“Merck”, “х.ч.”); H_2SO_4 , “х.ч.”; ацетонитрил (“LiChrosolv®”, “ос.ч.” для градиентного хроматографического элюирования, “Merck”). Растворы диацетила и фотометрируемого соединения готовили непосредственно перед экспериментом. Для приготовления всех растворов использована дистиллированная вода; для приготовления раствора диацетила для хромато-масс-спектрометрического определения – ацетонитрил. Стеклянную ла-

бораторную посуду вымачивали в хромпике и промывали дистиллированной водой.

Рабочие растворы диацетила готовили путем разбавления 97%-го раствора реагента: 100 мкл раствора разбавляли водой до 10 мл. Концентрация диацетила в полученном растворе 0,01 мл/мл. Рабочие растворы 2-нафтола (0,26 М в 0,8 М NaOH) готовили путем растворения 0,71 г 2-нафтола и 0,61 г NaOH в 18,7 мл воды. Рабочие растворы креатина готовили путем растворения избытка креатина в дистиллированной воде до получения насыщенного раствора и его последующей фильтрацией через пористый фильтр (диаметр пор 0,45 мкм).

Методика 1. Хромато-масс-спектрометрическое определение диацетила. Готовили раствор диацетила в ацетонитриле: 0,7 мкл диацетила (“Sigma”) растворяли в 99,3 мл ацетонитрила. Далее 1 мкл этого раствора вводили в хромато-масс-спектрометр. Регистрацию хроматограммы проводили в течение 2,5 мин. Получен масс-спектр пика, отвечающий диацетилу ($t_R = 2,0$ мин).

Методика 2. Исходная методика спектрофотометрического определения диацетила. Реакционную смесь готовили последовательным введением рабочих растворов 2-нафтола (150 мкл), креатина (350 мкл), диацетила (конечная концентрация в смеси 0,01–0,20 мкг/мл) и дистиллированной воды до 10 мл. Выдерживали в течение 40 мин, а затем регистрировали спектры поглощения образующегося продукта в области длин волн 400–600 (190–700) нм. При длине волны 527 нм, соответствующей максимуму полосы поглощения в видимой области, проводили фотометрирование.

Методика 3. Модифицированная методика спектрофотометрического определения диацетила. Реакционную смесь готовили последовательным введением рабочих растворов 2-нафтола (50 мкл), креатина (100 мкл), диацетила (конечная концентрация в смеси 0,001–0,300 мкг/мл) и дистиллированной воды до 10 мл. Через 40 мин после смешивания, проводили фотометрирование при 527 нм.

Методика 4. Термолинзовое определение предварительно синтезированного продукта реакции. Растворы готовили по методике 3, затем разбавляли бидистиллированной водой до концентрации продукта $0,1\text{--}1,2 \times 10^{-4}$ мкг/мл (в пересчете на диацетил). Регистрацию полученных растворов проводили на термолинзовом спектрометре при длине волны 514,5 нм. Так же проводили измерения сигнала раствора фона (на 10 мл конечного раствора добавляли 160 мкл рабочего раствора 2-нафтола и 350 мкл рабочего ра-

створа креатина в отсутствие диацетила) и дистиллированной воды.

Методика 5. Методика термолинзового определения диацетила. Реакционную смесь готовили последовательным введением рабочих растворов 2-нафтола (50 мкл), креатина (100 мкл), диацетила (конечная концентрация в смеси 2×10^{-4} –0,02 мкг/мл) и дистиллированной воды до 10 мл. Через 40 мин после смешивания проводили измерения термолинзового сигнала при 514,5 нм. Так же готовили фоновый раствор (50 мкл рабочего раствора 2-нафтола и 100 мкл рабочего раствора креатина в отсутствие диацетила). Термолинзовые измерения проводили через 40 мин после введения компонентов на длине волны 514,5 нм.

Результаты и их обсуждение

Существующие методы спектрофотометрического определения диацетила обладают недостаточно высокой чувствительностью и селективностью [1–4]. Самый чувствительный из них основан на проведении фотометрической реакции с креатином в присутствии нафтолов с образованием продукта неопределенного состава [1]. Представляют интерес спектрофотометрический и термолинзовый способы детектирования диацетила в растворах с малыми концентрациями при использовании менее дорогого реагента – 2-нафтола,

который может участвовать в рассматриваемой фотометрической реакции, но пока никем не исследован. Таким образом, необходимо подобрать условия спектрофотометрического определения диацетила, адаптировать их для термолинзовых измерений и сравнить данные с результатами, полученными при помощи хроматографических методов анализа со спектрофотометрическим и масс-спектрометрическим детектированием.

Хромато-масс-спектрометрическое определение диацетила. Полученные по методике 1 пики идентифицированы как ацетонитрил и диацетил (рис. 1). На масс-спектре хроматографического пика с $t_R = 2$ мин видны интенсивные сигналы ионов с отношением массы к заряду 86 и 43 Да (вставка на рис. 1), что соответствует диацетилу и наиболее легко получаемому фрагментарному иону – ацетилу. Сравнение полученных спектров со стандартными масс-спектрами базы данных прибора показывает очень хорошее согласие со спектром диацетила. По результатам анализа проведена оценка предела обнаружения диацетила при помощи ГХ–МС, он составил 0,7 нг/мл, что примерно в два раза ниже, чем литературные данные [10]. Таким образом, хромато-масс-спектрометрия позволяет определять диацетил на уровне микроколичеств, однако определению мешает

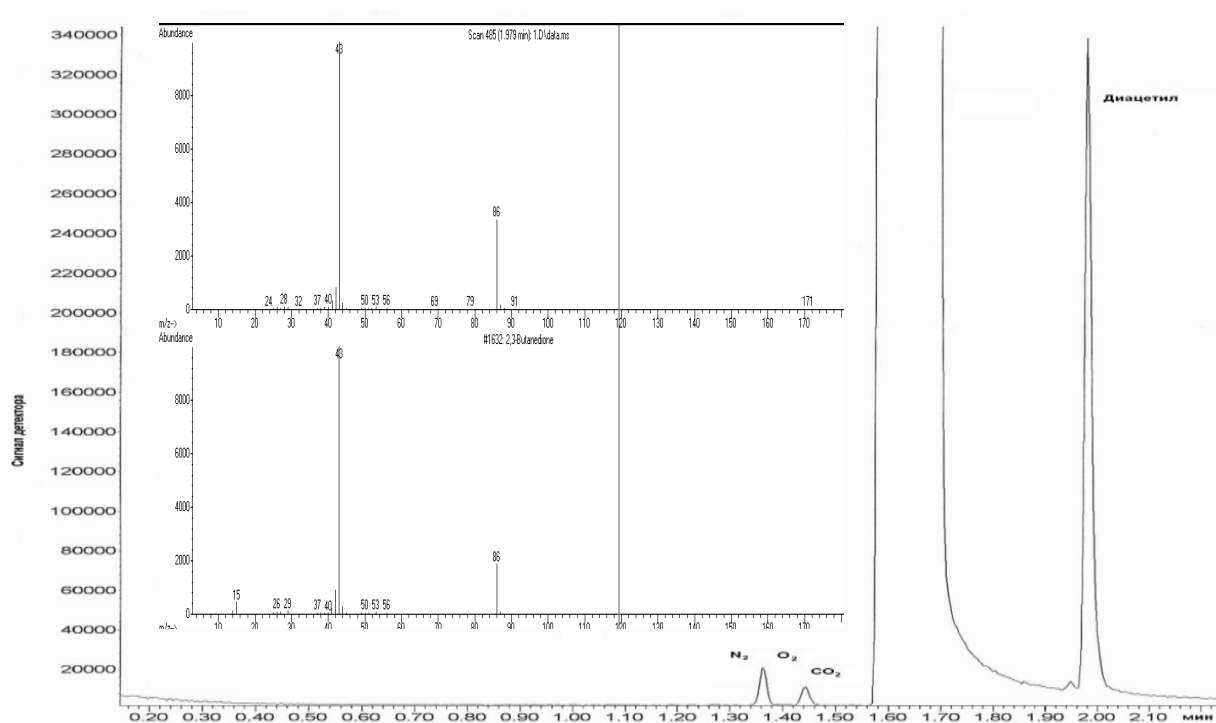


Рис. 1. Хроматограмма ГХ–МС определения диацетила (70 мкг/мл), время элюирования $t_R = 2,00$ мин. Врезка – масс-спектры диацетила, соответствующие пику с $t_R = 2,00$ мин. Верхний масс-спектр отвечает определяемому веществу, нижний – библиотечным данным для диацетила

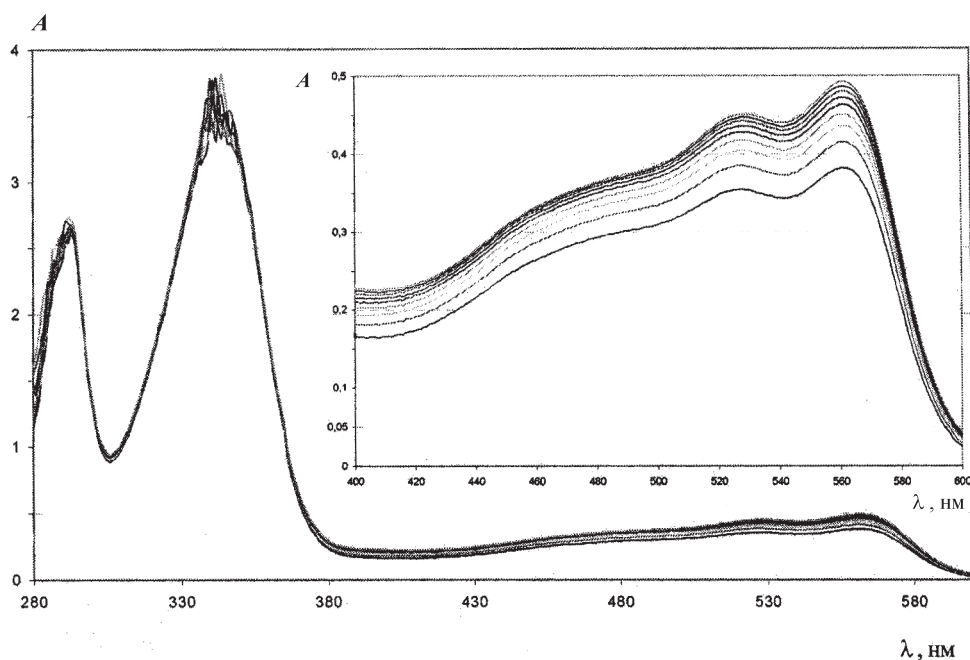


Рис. 2. Зависимость спектра поглощения водного раствора продукта реакции диацетила, креатина и щелочного раствора 2-нафтола (концентрация диацетила 0,03 мкг/мл, методика 3, см. текст) от времени реакции, длина оптического пути $l=1$ см (врезка – диапазон 400 – 600 нм в большем масштабе)

этанол, поскольку у него близкое время удерживания, и проводить идентификацию диацетила по масс-спектру в этих условиях практически невозможно, что сужает круг объектов анализа.

Спектрофотометрическое определение диацетила. В основе исходной методики спектрофотометрического определения диацетила (методика 2) использованы данные [1]. При замене 1-нафтола на 2-нафтол оптическая плотность для всех исследуемых концентраций оказывается выше, но при этом сигнал контрольного опыта составляет 0,3. Спектры поглощения реакционных смесей показали, что вследствие недостатка фотометрических реагентов в растворах с концентрацией диацетила выше 0,1 мкг/мл наблюдается отклонение от закона Бэра, поэтому вводили небольшой избыток 2-нафтола и креатина по сравнению с [1], а фотометрирование проводили при длине волны 525 нм, что соответствует максимуму полосы поглощения. Градуировочная зависимость описывается уравнением

$$A_{525} = (30,0 \pm 0,1)c + (0,30 \pm 0,03) \quad (5)$$

$(n = 7; P = 0,95; r = 0,98),$

где c – концентрация диацетила (мкг/мл). Предел обнаружения диацетила $c_{\text{мин}} = 30$ нг/мл.

Такие неудовлетворительные характеристики определения диацетила привели к необходимости изменения исходной методики. В результате была предложена

методика 3, в которой уменьшено содержание всех используемых компонентов. Исследованы спектры поглощения продуктов реакции в зависимости от pH раствора, который регулировали добавлением к реакционной смеси разбавленных H_2SO_4 и NaOH. Показано, что оптимальное значение pH составляет 8,5–10,0. Исследована кинетика протекания рассматриваемой фотометрической реакции. Установлено, что наиболее оптимально регистрировать спектры через 35–40 мин после введения компонентов, что соответствует практически полному завершению реакции образования окрашенных продуктов (рис. 2).

Из данных рис. 2 видно, что получающийся окрашенный продукт реакции имеет два максимума поглощения, при 527 и 563 нм. Однако, несмотря на большее значение молярного коэффициента поглощения, второй из них характеризуется худшей линейностью градуировочной зависимости, особенно в области малых концентраций диацетила. Все последующие спектрофотометрические измерения проводили при 527 нм. Градуировочная зависимость описывается уравнением

$$A_{527} = (31,1 \pm 0,1)c + (0,18 \pm 0,02) \quad (6)$$

$(n = 6; P = 0,95; r = 0,9330),$

где c – концентрация диацетила (мкг/мл). Предел обнаружения диацетила равен 10 нг/мл, нижняя граница 40 нг/мл, относительное стандартное отклонение в

диапазоне концентраций диацетила 50–300 нг/мл не превышает 0,2. Достигнутый предел обнаружения в 5 раз ниже, чем для существующей спектрофотометрической методики с использованием 1-нафтола [1]. Влияние этанола в реакционной смеси в количествах 4–6 об.% на метрологические характеристики спектрофотометрического определения диацетила незначимо. Хорошие метрологические характеристики позволяют адаптировать данную методику для термолинзовых измерений.

Термолинзовое определение диацетила. Продукт сочетания диацетила с 2-нафтолом и креатином устойчив к действию лазерного излучения (отсутствует изменение оптической плотности при лазерном облучении и без него). Для термолинзовых измерений выбрана длина волны 514,5 нм, наиболее близкая к максимуму полосы поглощения, выбранного для спектрофотометрического определения диацетила. Градуировочная зависимость для предварительно синтезированного продукта реакции диацетила с 2-нафтолом и креатином в щелочной среде (*методика 4*) описывается уравнением (мощность индуцирующего излучения 40 мВт)

$$\theta_{514,5} = (210 \pm 1)c + (0,069 \pm 0,005) \\ (n = 6; P = 0,95; r = 0,9330), \quad (7)$$

где c – концентрация диацетила (мкг/мл). Предел обнаружения предварительно синтезированного продукта реакции при помощи термолинзовой спектрометрии равен 0,3 нг/мл, что в два раза ниже, чем достигнутый предел обнаружения при помощи газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. На основании вышеизложенного с учетом найденных оптимальных условий спектрофотометрического определения диацетила, провели термолинзовое определение диацетила по выбранной реакции (*методика 5*). Регистрацию каждого раствора проводили в течение 3–4 мин для снижения влияния короткопериодического шума термолинзового спектрометра [11, 12]. Градуировочная зависимость описывается уравнением (мощность индуцирующего излучения 40 мВт):

$$\theta_{514,5} = (205 \pm 5)c + (0,12 \pm 0,03) \\ (n = 8; P = 0,95; r = 0,9950), \quad (8)$$

где c – концентрация диацетила (мкг/мл). Таким образом, различия между коэффициентами чувствительности для предварительно синтезированного продукта и методики определения диацетила отличаются незначимо. Предел обнаружения диацетила равен 2 нг/мл. Сравнение данных термолинзового и спектрофотометрического определения диацетила позволяет сде-

лать следующие выводы. Во-первых, теоретическое увеличение чувствительности термолинзовых измерений (514,5 нм) по сравнению со спектрофотометрией (527 нм) уравнение (4) составляет $2,303 \times 42 \text{ мВт} \times 0,11 \text{ 1/мВт} \times 0,60 = 6,36$, в то время как экспериментальное соотношение коэффициентов чувствительности для термолинзовой спектрометрии и спектрофотометрии (уравнения (7) и (5)) дает значение $205/31,1 = 6,6 \pm 0,3$ ($n = 12; P = 0,95$), т.е. имеет место незначимое отличие теоретической и экспериментальной чувствительности термолинзовых измерений. Очень важно то, что отношение коэффициентов чувствительности (6,6) и пределов обнаружения диацетила ($10/2 = 5$) примерно одинаково, поскольку это свидетельствует о незначимом изменении в условиях проведения реакции при переходе к термолинзовым измерениям (от *методики 3* к *методике 5*). Достоинством условий термолинзового определения является также то, что оно характеризуется как меньшей величиной (по абсолютному значению) свободного члена градуировочных уравнений (5) и (7), а также лучшим коэффициентом корреляции градуировочной зависимости ($0,9950/0,9390 = 10\%$).

В целом, подобранные условия фотометрического определения диацетила пригодны для определения его следовых количеств, при этом влияние мешающих факторов достаточно мало, а условия термолинзового определения характеризуются высокой точностью и чувствительностью. Сравнение пределов обнаружения для предварительно синтезированного продукта реакции и для проведения фотометрической реакции показывает, что потенциально чувствительность термолинзового определения может быть существенно снижена за счет более тонкой оптимизации условий реакции, однако это выходит за рамки данной работы.

В отличие от хроматографического определения, в случае использования термолинзовой спектрометрии для определения диацетила следы этанола не оказывают мешающего влияния ввиду малого изменения термооптических характеристик среды. В случае, когда определение проводится в растворе, содержащем этанол на уровне 4–6 об.%, следует учитывать возрастание термолинзового сигнала на 25–30% за счет улучшения термооптических свойств среды [13, 14]. С одной стороны, при работе вблизи предела обнаружения таким возрастанием сигнала можно пренебречь (поскольку результаты будут определяться в основном флуктуациями сигнала контрольного опыта), что не приведет к большой погрешности. С другой стороны, данный эффект можно использовать для повышения чувствительности термолинзового опреде-

ления, если использовать в качестве образцов сравнения растворы с соответствующим содержанием этанола, что может быть предметом дальнейших исследований.

По достигнутым в настоящей работе пределам обнаружения методы ГХ-МС и ТЛС сопоставимы (соответственно 0,7 и 2,0 нг/мл), но в ТЛС предел обнаружения может быть дополнительно снижен не только за счет дополнительной оптимизации условий фотометрической реакции и варьирования состава реакционной среды, но и при увеличении мощности излучения лазера (2). Кроме того, стоимость определения по предложенной методике с малым расходом сравнительно недорогих реагентов оказывается су-

щественно ниже, что может рассматриваться как существенное достоинство фотометрического определения диацетила. Наконец, хотя в этой работе мы использовали достаточно большие времена проведения реакции для увеличения степени завершенности, выход продукта около 50% требует всего 20–30 с, т.е. термолинзовое определение диацетила может быть оптимизировано для определения в потоке, например в микро-проточно-инжекционном анализе или микрофлюидных чипах.

Авторы благодарны мл. научн. сотр. А.А. Жиркову (Институт геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского РАН) за участие в обсуждении данных статьи.

Работа осуществлена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 07-03-00859-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Mattessich J., Cooper J.R.* // *Anal. Biochem.* 1989. **180**. P. 349.
2. *Speck J.C.* // *Anal. Chem.* 1948. **20**. P. 647.
3. *Anderson D.R., Williams, C.M., Krise G.M., Dowben R.M.* // *Biochem. J.* 1957. **67**. P. 258.
4. *Eggleton P., Elsdon S.R., Grough N.* // *Biochem. J.* 1943. **37**. P. 526.
5. *Izquierdo-Ferrero M.J., Fernandez-Romero J.M., Luque de Castro M.D.* // *Analyst.* 1997. **122**. P. 119.
6. *Rodrigues J.A., Barros A.A., Almeida P.J., Rodrigues P.G., Fogg A.G.* // *Anal. Chim. Acta.* 2001. **449**. P. 119.
7. *Rodrigues P.G., Rodrigues J.A., Barros A.A., Lapa R.A.S., Lima J.L.F.C., Machado C.J.M., Ferreira A.A.* // *J. Agric. Food Chem.* 2002. **50**. P. 3647.
8. *McCarthy S.L.* // *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 1995. **53**. P. 178.
9. *Zeppa G., Conterno L., Gerbi V.* // *J. Agric. Food Chem.* 2001. **49**. P. 2722.
10. *Hayasaka Y., Bartowsky E.J.* // *J. Agric. Food Chem.* 1999. **47**. P. 612.
11. *Bialkowski S.E.* *Photothermal spectroscopy methods for chemical analysis.* N.Y., 1996.
12. *Проскурнин М.А., Аброскин А.Г., Радушкевич Д.Ю.* // *ЖАХ.* 1999. **51**. С. 101.
13. *Филичкина В.А., Аброскин А.Г., Барбалат Ю.А., Головки И.В., Проскурнин М.А., Савостина В.М.* // *ЖАХ.* 1993. **48**. С. 269.
14. *Georges J.* // *Spectrochim. Acta A.* 2001. **57**. P. 1295.

Поступила в редакцию 20.12.07

DETERMINATION OF DIACETYL WITH SPECTROPHOTOMETRY AND THERMAL-LENS SPECTROMETRY

N.A. Puretskii, M.A. Proskurnin, A.V. Pirogov

(Division of Analytical Chemistry)

The conditions for spectrophotometric and thermal-lens determination of diacetyl with creatine and 2-naphthol are proposed. The obtain detection limit for spectrophotometry (at 527 nm) of 10 ng/mL is fivefold lower than the existing values of spectrophotometric determination of diacetyl. The spectrophotometric procedure was used as is for thermal-lens determination of diacetyl (514.5 nm, excitation power 40 mW). Thermal lens determination is characterized not only by a twofold decrease in the detection limit (to 2 ng/mL, which is comparable to the determination of diacetyl with gas-chromatography–mass spectrometry, the detection limit 0.7 ng/mL), but by an enhancement of other performance parameters of the determination. It was shown that contrary to gas chromatography, ethanol does not interfere with both spectrophotometric and thermal-lens determination of diacetyl.

Key words: *thermal-lens spectrometry, diacetyl, spectrophotometry, high-performance liquid chromatography with mass-spectrometric detection.*

Сведения об авторах: Пурецкий Николай Александрович – студент химического факультета МГУ; Проскурнин Михаил Алексеевич – доцент кафедры аналитической химии МГУ, докт. хим. наук (Michael@analyt.chem.msu.ru); Пирогов Андрей Владимирович – вед. науч. сотр. кафедры аналитической химии МГУ, докт. хим. наук (Pirogov@analyt.chem.msu.ru).