

К.С. Сычев

**Подготовка пробы
для газовой и жидкостной
хроматографии**

Второе издание

Издательство Integrated BioSeparation Solutions OU

ISBN 978-5-9905567-4-4

© ИП Сычев К.С., 2019

Оглавление

Глава 1

Техники подготовки пробы	6
1.1. Предварительная обработка проб	8
1.2. Жидкость-жидкостная экстракция (ЖЖЭ)	9
1.3. Разрушение эмульсий и коагуляционных структур	19
1.4. Жидкостная экстракция твердых матриц	22
1.5. Извлечение летучих компонентов	28
1.6. Адсорбционные методы подготовки пробы: адсорбционная очистка (АО) и твердофазная экстракция (ТФЭ)	33
1.7. Высокоэффективные хроматографические методы подготовки пробы.	59
1.8. Ультрафильтрационные методы подготовки пробы.	63
1.9. Методы, основанные на химической дериватизации	63

Глава 2

Примеры разработки комплексных процедур подготовки пробы ...	65
2.1. Представление алгоритма пробоподготовки в виде блок-схемы. Две схемы типовых подходов к пробоподготовке для случаев водных и безводных матриц.	66
2.2. Извлечение неполярных целевых соединений из водных сред на примере определения различных групп стойких органических загрязнителей: ПХБ, ПХТ, ПХДД, ПХДФ, ПАУ, ХОП – в сточных водах методом ЖЭ-АО-ГХ/МС	68
2.3. Извлечение неполярных целевых соединений из водных сред на примере определения пестицидов групп ХОП, ФОС и триазинов в растительных матрицах методом ЖЭ-ТФЭ-АО-ГХ/МС/ДЭЗ.	78
2.4. Извлечение полярных целевых соединений из полярных сред на примере определения патулина в соках методом ТФЭ-ВЭЖХ/УФ	85

2.5. Извлечение неполярных целевых соединений из неводных сред на примере определения ПАУ в жиросодержащих продуктах и копильных препаратах методами ЖЭ-ТФЭ-ВЭЖХ/ФЛД и АО-ТФЭ-ГХ/МС	89
2.6. Извлечение полярных целевых соединений из неводных сред на примере определения производных фурфурола в минеральных маслах методами ЖЭ-АО-ВЭЖХ/УФ и ТФЭ-ВЭЖХ/УФ.	92

Приложение

П1. Обработка, приготовление и хранение неорганических адсорбентов.	97
П2. Таблица смешиваемости растворителей	97
П3. Элюирующая сила растворителей в нормально-фазовом режиме . .	100
П4. Элюирующая сила растворителей в режиме с переносом заряда . .	101

ВЭЖХ услуги и продукты компании IBS

1. ВЭЖХ услуги компании IBS. ВЭЖХ продукты компании IBS	102
2. ВЭЖХ курсы компании IBS	104
3. Порядок проведения квалификации ВЭЖХ оборудования специалистами компании IBS	113
4. Процессы, оцениваемые экспертом компании IBS при проверке готовности аналитической лаборатории к GMP инспекции	116
5. Готовые ВЭЖХ решения IBS Pharm [™] и IBS Nutri [™]	121

В последние годы в области аналитической химии наблюдается столь бурный прогресс, что учебная литература с трудом поспевает за темпами ее развития. Порой, даже специалисту получившему химическое образование несколько лет назад бывает нелегко сориентироваться в этой области. Известно, что в настоящее время хроматография составляет 60 % всех аналитических исследований.

В январе 2017 года компания ООО «Остек-АртТул» стала эксклюзивным дистрибьютором продукции южнокорейской фирмы YL Instruments, в частности газовых и жидкостных хроматографов, а также масс-спектрометров. Компания прежде всего ценит опыт и компетенции, поэтому сотрудничество с лучшими специалистами в своей области для нас не исключение, а правило. Мы фокусируем внимание прежде всего на методической составляющей, ключевой частью которой является не только надежный хроматограф, но и правильная подготовка образца к анализу.

Я на своем личном опыте знаю, что в работе любого специалиста наступает такой момент, когда учебное пособие по хроматографии не может дать исчерпывающие ответы на вопросы пробоподготовки, а связаться с более опытными коллегами нет возможности. И в этот момент — эта книга будет вашим лучшим помощником.

Мы надеемся, читатели найдут в этом издании много интересной и полезной информации, а пробоподготовка будет легкой и простой стадией хроматографического анализа.



*Балакина Марина Григорьевна,
главный специалист по хроматографии
и масс-спектропии ООО «Остек-АртТул»*

Глава 1. Техники подготовки пробы

- 1.1. Предварительная обработка проб
- 1.2. Жидкость-жидкостная экстракция (ЖЖЭ)
 - 1.2.1. Основы метода ЖЖЭ
 - 1.2.2. Применение ЖЖЭ в пробоподготовке. Преимущества и недостатки ЖЖЭ
 - 1.2.3. Техники ЖЖЭ. Жидкость-жидкостная микроэкстракция. Жидкофазная микроэкстракция
 - 1.2.4. Концентрирование пробы отгонкой растворителя: техники, ограничения. Замена растворителя
- 1.3. Разрушение эмульсий и коагуляционных структур
 - 1.3.1. Типы дисперсных систем
 - 1.3.2. Техники разрушения дисперсных систем
- 1.4. Жидкостная экстракция твердых матриц
 - 1.4.1. Специфика и техники жидкостной экстракции твердых матриц
 - 1.4.2. Технические приспособления для экстракции твердых матриц. Традиционные системы. Автоматизированные системы экстракции под давлением
- 1.5. Извлечение летучих компонентов
 - 1.5.1. Статическая и динамическая парофазная экстракция
 - 1.5.2. Паровая дистилляция
 - 1.5.3. Твердофазная микроэкстракция
- 1.6. Адсорбционные методы подготовки пробы: адсорбционная очистка (АО) и твердофазная экстракция (ТФЭ)
 - 1.6.1. Основы методов ТФЭ и АО
 - 1.6.2. Последовательность процедуры ТФЭ. Офф-лайн и он-лайн ТФЭ
 - 1.6.3. Адсорбционные режимы
 - 1.6.3.1. Как происходит удерживание
 - 1.6.3.2. ТФЭ и АО в нормально-фазовом (НФ) режиме
 - 1.6.3.3. ТФЭ и АО в обращенно-фазовом (ОФ) и смешанном ОФ/эксклюзионном режимах
 - 1.6.3.4. ТФЭ и АО в режиме с переносом заряда (ПЗ)
 - 1.6.3.5. ТФЭ в ионном и смешанном ионном/ОФ режимах

-
- 1.6.4. Адсорбционные материалы для ТФЭ и АО; варианты их применения в различных адсорбционных режимах
 - 1.6.4.1. Органические полимерные адсорбенты: нейтральные и бифункциональные. Углеродные материалы
 - 1.6.4.2. Полярные неорганические адсорбенты: силикагели, окись алюминия. Импрегнированные адсорбенты
 - 1.6.4.3. Адсорбенты с ограниченно доступной поверхностью (ОДП) различных типов
 - 1.6.4.4. Высокоселективные аффинные и импринтные адсорбенты
 - 1.6.5. Разработка процедуры ТФЭ
 - 1.7. Высокоэффективные хроматографические методы подготовки пробы
 - 1.7.1. Колоночная ЖХ низкого давления
 - 1.7.2. Эксклюзионная ВЭЖХ
 - 1.7.3. Двумерная ВЭЖХ и ВЭЖХ-ГХ
 - 1.8. Ультрафильтрационные методы подготовки пробы
 - 1.9. Методы, основанные на химической дериватизации

1.1. Предварительная обработка проб

Дотого, каквзятьнавеску, которая является частью всего отобранного для анализа образца, данный образец необходимо усреднить. Нередко для корректного усреднения образца его предварительно механически измельчают. Степень измельчения во многом зависит от навески; чем тоньше размолот образец, тем меньшую навеску можно взять, не ухудшив точности анализа.

Если определение нужно провести в осушенном образце, то сначала сушат образец, затем его усредняют, и только затем берут навеску.

В том случае, когда образец состоит из жидкой фазы и осадка, сначала фильтрованием или центрифугированием отделяют осадок. Жидкая и твердая части образца экстрагируются отдельно. Одна из частей может быть отброшена, то есть не подвергаться экстрагированию, в том случае, если она гарантировано не может содержать целевые вещества в значимых количествах.

Экстракцию суспензий и эмульсий допустимо осуществлять напрямую; однако, в ряде случаев целесообразно разрушать дисперсную фазу до экстракции (см. гл. «Разрушение эмульсий и коагуляционных структур»). Окончательное решение по этому вопросу принимает аналитик.

1.2. Жидкость-жидкостная экстракция (ЖЖЭ)

1.2.1. Основы метода ЖЖЭ

Жидкость-жидкостная экстракция (ЖЖЭ) основана на переводе веществ из одной жидкой фазы в другую при их непосредственном контакте; жидкие фазы не должны смешиваться, то есть их взаимная растворимость должна быть очень мала.

Многokратная последовательная экстракция несколькими порциями экстрагента значительно эффективнее, чем однократная всем объемом экстрагента сразу. Поэтому, как правило, весь объем экстрагента делят на несколько частей (например, три) и проводят несколько последовательных процедур ЖЖЭ; экстракты затем объединяют.

Поскольку жидкость-жидкостная экстракция является равновесным процессом, то добиться полного извлечения вещества из одной фазы в другую невозможно даже теоретически. Тем не менее, при выборе подходящего экстрагента и применении многократной последовательной экстракции, как правило, можно добиться достаточной степени извлечения целевого вещества.

Распределение растворенных веществ между двумя жидкими фазами определяется их полярностью. В частном случае, когда одной из фаз является вода или водная фаза, можно говорить о гидрофильности/гидрофобности веществ.

Гидрофобными считают вещества, которые плохо растворяются в воде и хорошо — в несмешивающихся с водой органических растворителях, к примеру, петролейном эфире, минеральном масле. Гидрофильные вещества, напротив, отлично растворимы именно в водных средах.

При соприкосновении двух фаз, водной и органической, растворенные в них гидрофильные вещества преимущественно переходят в водный слой, а гидрофобные — в органический слой. Через некоторое время для каждого из веществ, распределенных между одной и другой фазой, устанавливается равновесие. Отношение концентрации вещества в одной фазе к его концентрации в другой фазе называется коэффициентом распределения.

Для ионизируемых веществ, диссоциирующих в водных средах, гидрофобность также зависит от соотношения концентраций молекулярной незаряженной и ионной форм. Ионная форма лучше растворима в воде и поэтому менее гидрофобна (или более гидрофильна). Чтобы при помощи ЖЖЭ перевести ионизируемое вещество из водной фазы в органическую, необходимо подавить его диссоциацию. Для этого необходимо создать условия для как можно более полного перехода вещества в незаряженную, то есть более гидрофобную, молекулярную форму.

Если извлекаемое вещество является органической кислотой, то перед экстракцией величину pH ее водного раствора необходимо понизить при помощи добавки сильной неорганической кислоты; pH

должен быть, по крайней мере, на 2 единицы ниже рКа извлекаемой органической кислоты. В том случае, если извлекаемое вещество является органическим основанием, то перед экстракцией величину рН его водного раствора необходимо повысить при помощи добавки сильной щелочи или аммиака; рН должен быть, по крайней мере, на 2 единицы выше рКа извлекаемого органического основания.

Добавка неорганической соли в водную фазу приводит к увеличению эффективности экстракции растворенных в ней веществ. Этот эффект называется высаливанием. Для высаливания часто применяют самую дешевую соль — поваренную, дополнительно очищенную перекристаллизацией. Однако, многие специалисты имеют свои «секретные», более эффективные составы солей для высаливания. В них могут входить: хлорид кальция или сульфат магния (но не одновременно), сульфат натрия, перхлорат лития и в том числе хлорид натрия.

Эффективность экстракции из воды во многом зависит и от применяемого органического растворителя-экстрагента. Насыщенные углеводороды и подобные им вещества лучше экстрагируются гексаном (петролейным эфиром, циклогексаном, изооктаном). Ароматические углеводороды и ароматические вещества в целом — дихлорметаном, толуолом. Полярные кислородсодержащие вещества эффективно извлекаются сложными и простыми эфирами (этилацетат, диэтиловый эфир). Применение в качестве экстрагентов смесей органических растворителей для ЖЖЭ нехарактерно.

Немаловажно, чтобы органический растворитель для экстракции обладал по возможности низкой температурой кипения, до 60°C. Такие растворители удобно удалять отгонкой (см. гл. «Концентрирование пробы отгонкой растворителя»). Этим способом концентрируют полученный экстракт или же выделяют проэкстрагированные вещества в виде сухого остатка. Наиболее легкокипящими растворителями являются диэтиловый эфир и дихлорметан; наиболее тяжело отгоняется высококипящий толуол.

Для ускорения жидкость-жидкостной экстракции фазы должны достаточно активно перемешиваться (по крайней мере, в течении нескольких минут). Если ЖЖЭ проводить вручную в делительной воронке, совершенно необязательно проводить встряхивание непрерывно. Достаточно сделать несколько энергичных встряхиваний с промежутками в полминуты; перед каждым очередным встряхиванием необходимо стравливать давление в делительной воронке.

Наиболее неприятным с технической точки зрения эффектом, в ряде случаев ограничивающим применение жидкость-жидкостной экстракции, является образование в результате встряхивания третьей, дисперсной фазы: эмульсии или, в худшем варианте, достаточно устойчивой коагуляционной структуры — геля. Для разрушения дисперсной фазы применяют различные подходы (см. гл. «Способы разрушения эмульсий и коагуляционных структур»).

1.2.2. Применение ЖЖЭ в пробоподготовке. Преимущества и недостатки ЖЖЭ

ЖЖЭ применяют как с целью получения первоначального экстракта твердых, жидких или дисперсных образцов, так в целях очистки экстракта и замены растворителя экстракта.

Так, первоначальную экстракцию методом ЖЖЭ часто применяют для извлечения органических соединений из водных образцов. Основной целью ЖЖЭ здесь является перевод целевых соединений в фазу более летучего и менее полярного по сравнению с водой органического растворителя.

Типичными экстрагентами для ЖЖЭ из водных образцов являются гексан (верхний слой) и хлористый метилен (нижний слой). Реже, в основном для экстракции наиболее полярных соединений, применяют этилацетат и диэтиловый эфир.

Жидкость-жидкостной экстракцией из водных образцов большого объема порядка 0.1–2 л небольшими объемами экстрагента порядка 3 x 5–15 мл можно достичь значительной степени концентрирования до 1:100. Если целевые соединения нелетучи, то степень концентрирования можно увеличить путем отгонки растворителя из полученного экстракта.

Этот подход, однако, также ограничен степенью насыщенности исходного водного образца компонентами матрицы. Поскольку ЖЖЭ обладает сравнительно низкой селективностью, значительная часть компонент матрицы переходит вместе с целевыми соединениями в экстракт. Попытка отогнать растворитель из такого экстракта может привести к выпадению осадка, загустеванию пробы. По этой причине ЖЖЭ из больших объемов водных образцов успешно применяется лишь для сравнительно «чистых» образцов и является проблемной для «грязных».

К ряду проблемных, к примеру, можно причислить морально устаревший подход с использованием ЖЖЭ для первоначальной экстракции различных соединений из гидролизатов жира и жиросодержащих продуктов. Как правило, вместо прозрачного экстракта получают устойчивый гель, который сложно разрушить даже специальными методами.

ЖЖЭ также применяют для извлечения полярных органических веществ из образцов в углеводородных растворителях: гексане, циклогексане, изооктане. В качестве экстрагентов применяют полярные несмешивающиеся с гексаном растворители: ацетонитрил, ДМСО, ДМФА — а также смеси ацетонитрила с водой в различном соотношении.

Так, классическим способом выделения полярных и полиароматических соединений из гексановых экстрактов, содержащих жиры и высшие углеводороды, является жидкостная экстракция ацетонитрилом. Конечно, этот метод неселективен, и коэффициенты извлечения зависят от типа матрицы, однако он прост, чего в ряде случаев бывает достаточно.

ЖЖЭ нередко применяют и для очистки проб. К примеру, для удаления из гексановых экстрактов, содержащих неполярные целевые соединения, сопутствующие соединения основного характера экстракт промывают водным раствором фосфорной (реже серной) кислоты; для удаления соединений кислого характера применяют раствор аммиака. Промывкой водного экстракта с гидрофильными целевыми соединениями гексаном можно удалить неионные детергенты.

Определенные трудности с количественным извлечением методом ЖЖЭ могут возникнуть в том случае, когда целевые соединения способны связываться с компонентами матрицы за счет межмолекулярных сил.

Первым типичным примером является ЖЖЭ из плазмы крови полярных биологически активных соединений, которые нередко бывают в значительной степени связаны с транспортными белками, альбуминами, которые в данном случае являются компонентами матрицы. Связывание происходит за счет «полярных» взаимодействий: электростатических, водородных связей и т.д. Целевые соединения в принципе способны раствориться в водной среде экстрагируемого образца — необходимо лишь разрушить взаимодействия, связывающие их с белками. Это достигается в основном высаливанием, то есть добавлением в образец сильных электролитов. Если целевые соединения ионные, то вместе с этим необходимо изменить рН образца для перевода аналитов в молекулярную форму.

Существует вариант высаливания, когда весь жидкий образец (например, плазма крови) после изменения рН растирается с безводной солью (к примеру, сульфатом натрия) до получения влажной порошкообразной массы, которая затем экстрагируется; в качестве экстрагента, как правило, применяют ацетонитрил. В таком виде этот метод называется QuEChERS.

В качестве второго типичного примера связывания аналитов с компонентами матрицы можно привести ЖЖЭ из грунтовых вод любых неполярных соединений (например, полиароматических углеводородов, ПАУ). Грунтовые воды нередко содержат растворенные природные полимеры, которые в данном случае являются компонентами матрицы. Они хорошо адсорбируют из водного образца неполярные целевые соединения просто по причине низкой растворимости последних в воде. В этом случае для разрушения комплекса между аналитами и компонентом матрицы достаточно любым способом увеличить растворимость неполярных аналитов в водной среде. Этого достигают добавкой в водный образец небольшой, порядка 5–10 процентов, доли полярного органического растворителя, или же (реже) добавкой ионного ПАВ.

Преимущества ЖЖЭ:

- 1) Простота метода: простота его реализации, выбора условий экстракции, доступность реагентов.
- 2) Универсальность метода: жидкий образец не обязательно должен быть идеально гомогенным; при необходимости можно экстрагировать (пусть менее эффективно) эмульсии и тонкие взвеси. Недопустимо лишь наличие осадка в образце (его необходимо предварительно отделить и экстрагировать далее отдельно).
- 3) Для больших объемов образца скорость проведения ЖЖЭ выше, чем ТФЭ (твердофазной экстракции, см. далее).

Недостатки ЖЖЭ:

- 1) Жидкость-жидкостная экстракция может оказаться достаточно трудоемкой, а иногда достаточно длительной и ресурсоемкой процедурой. Многое зависит от специфики конкретной ситуации и выбранной техники ЖЖЭ.
- 2) Проведение ЖЖЭ нередко осложняется образованием геля на границе между слоями, в результате чего слои бывает весьма

проблематично отделить друг от друга. Более того, в подобных случаях извлечение целевых соединений, как правило, оказывается невысоким. Существует ряд способов разрушения коагуляционных структур (см. гл. «Способы разрушения эмульсий и коагуляционных структур»).

3) Применение ЖЖЭ принципиально не позволяет добиться полного извлечения целевых соединений, поскольку это равновесный метод. Более того, коэффициент распределения может весьма сильно зависеть от типа и концентрации компонентов матрицы в экстрагируемом образце. Образование коагуляционных структур может приводить к еще большей невоспроизводимости степеней извлечения.

1.2.3. Традиционные техники ЖЖЭ. Жидкость-жидкостная микроэкстракция. Жидкофазная микроэкстракция

Все основные техники ЖЖЭ очень схожи между собой и, по сути, различаются лишь объемами экстракта и экстрагента. Уникальной техникой является лишь жидкофазная микроэкстракция с применением полой нити (LPME-NF).

Выделяют, как правило, традиционные и «микро» техники; однако, единого мнения по поводу того какую технику к какой категории относить не существует. Нередко все варианты реализации ЖЖЭ, когда используются небольшие объемы экстрагента, называют жидкость-жидкостной микроэкстракцией и даже жидкофазной микроэкстракцией (что по смыслу не вполне корректно).

Традиционные, то есть наиболее трудоемкие и ресурсоемкие, методы ЖЖЭ все еще доминируют по частоте применения в аналитических лабораториях.

Основной техникой продолжает оставаться экстракция в делительной воронке. Как правило, она осуществляется вручную, поскольку простые автоматы для перемешивания (т.н. «качалки») не могут обеспечить интенсивного встряхивания, которое как раз необходимо для быстрого установления адсорбционного равновесия.

Еще одно неудобство экстракции в делительной воронке проявляется при разделении слоев. В органический слой всегда попадает небольшая часть водного слоя, что в любом случае приводит к необходимости дополнительно осушать органический экстракт. Кроме

того, проскакивающая часть водного слоя является «небольшой» только относительно объемов экстрагента порядка десятков миллилитров, а для объемов в несколько миллилитров она уже недопустимо «большая». Поэтому при проведении экстракции в делительной воронке используют достаточно большие объемы экстрагента, по крайней мере, более десятка миллилитров.

Положительный момент применения делительной воронки заключается в возможности выделить органический слой даже при образовании геля. Очевидно, аликвоту в этом случае отобрать невозможно, и единственный выход заключается как раз в выделении всего органического слоя вместе с гелем.

Существует достаточно распространенное заблуждение, что экстракция в делительной воронке является не слишком затратной процедурой из-за относительной дешевизны посуды и растворителей. В аналитике это утверждение совершенно не соответствует действительности; хорошие делительные воронки из пирекса с тефлоновыми затворами весьма дороги, как и высокочистые растворители, которых для традиционной ЖЖЭ требуется немало.

Если водные образцы достаточно чистые, и вероятность образования геля невысока, значительно более удобным вариантом является ЖЖЭ в специальной экстракционной колбе, которая имеет отвод с узким горлом. Экстракцию проводят вручную, из большого объема водного образца, но объем экстрагента не превышает 5 мл. После проведения экстракции водного образца органический слой (он должен быть легче воды) вытесняют в узкую часть экстрактора путем добавления дистиллированной воды. После этого из органического слоя отбирают аликвоту. При образовании небольшого количества геля (пены, эмульсии) перед отбором аликвоты к экстракту добавляют несколько десятков микролитров полярного органического растворителя, например, этанола.

Трудоемкость этой техники ЖЖЭ можно значительно сократить, заменив ручное встряхивание перемешиванием при помощи достаточно мощной мешалки (т.н. «вортекс»). Экстракция происходит в бутылки со шлифом; после экстракции на шлиф надевают насадку с узким горлом, и далее процесс отбора аликвоты органического слоя повторяется.

При уменьшении объема экстрагируемого образца до 10–20 мл и ниже у метода ЖЖЭ появляется большой потенциал как в плане сокращения ресурсоемкости и повышения производительности процедуры, так и в плане увеличения ее гибкости. Особенно быстро при

сокращении экстрагируемых объемов возрастает производительность экстракции.

ЖЖЭ образцов небольшого объема, как правило, проводят в пробниках различной вместимости. Пробники обязательно должны герметично завинчиваться крышкой с резьбой, выдерживающей существенное давление изнутри. Экстракция проводится при помощи специального «шейкера» — перемешивающего устройства платформой, совершающей быстрые вертикальные колебания и медленные круговые движения; на платформу, как правило, устанавливают сразу несколько пробников. Процесс экстракции длится не более 1–2 минут. После экстракции пробники помещаются в холодильную камеру для снижения давления паров экстрагента; можно сразу же провести «вымораживание» образцов для разрушения возможной дисперсной фазы. После оттаивания образцы, как правило, в тех же пробниках, центрифугируют, что способствует лучшему разделению слоев (см. гл. «Способы разрушения эмульсий и коагуляционных структур»). Далее из пробника отбирают аликвоту органического экстракта.

Существует множество вариантов и модификаций подобного рода техник микроэкстракции. Так, объем экстрагента может быть уменьшен до капли, то есть порядка 5–50 мкл. Если проводить экстракцию из 5–10 мл образца, то степень концентрирования может оказаться даже выше, чем в традиционном варианте ЖЖЭ.

Существуют, конечно, некоторые трудности с выделением капли органического слоя, но они решаемы. Одним из возможных путей является замораживание капли и ее выделение в твердом виде. Для этого необходимо подобрать органический растворитель с температурой плавления в диапазоне от 0°C до 20–30°C (наиболее распространенным растворителем такого рода является бензол с температурой плавления +4°C).

Если экстрагент тяжелее водного образца, каплю экстрагента в смеси с некоторым количеством полярного растворителя-диспергатора (лучшие результаты показывает ТГФ) можно напрямую диспергировать в объеме образца. После разделения слоев (можно ускорить этот процесс центрифугированием) аликвота отбирается со дна пробника; соответственно, в этом случае необходимо брать пробник с коническим дном.

Уникальным вариантом реализации ЖЖЭ является жидкофазная микроэкстракция (с полый нитью), LPME-NF. Основным расходным материалом является полимерный пористый капилляр; до экстракции его

в течение некоторого времени выдерживают в полярном органическом растворителе, не смешивающемся с водой (как правило, *n*-октаноле или дигексильном эфире). В более простом двухфазном варианте капилляр заполняется тем же органическим растворителем. Затем капилляр герметично закупоривают и опускают в водный образец; экстракция происходит при перемешивании образца при помощи магнитной мешалки. Готовый экстракт объемом несколько микролитров переносят в аналитический шприц и, как правило, сразу вводят в хроматограф. Описанный двухфазный вариант подходит для экстракции неполярных соединений из водных образцов.

Наибольший интерес, однако, вызывает трехфазный вариант жидкофазной микроэкстракции, когда экстрагентом является водный раствор кислоты (для извлечения основных органических соединений) или водный раствор щелочи (для извлечения кислых органических соединений).

К примеру, для экстракции органической кислоты водный образец необходимо довести сильной кислотой до рН порядка 2; водный экстрагент, напротив, довести щелочью до рН 10–12. Органическая кислота в гидрофобной молекулярной форме вначале экстрагируется фазой *n*-октанола в полимерном капилляре, а затем в виде гидрофильной ионной формы переходит в водный экстрагент.

Этот метод идеально подходит для извлечения из водных, биологических и экологических, образцов тех органических кислот и оснований, молекулы которых достаточно гидрофобны и невелики по размеру. Для очень гидрофильных соединений и/или соединений с крупной молекулой этот метод не дает хороших результатов.

1.2.4. Концентрирование пробы отгонкой растворителя: техники, ограничения. Замена растворителя

Широко распространенными техниками концентрирования экстрактов путем отгонки растворителя являются упаривание в ротационном испарителе и отгонка в токе азота.

Ротационный испаритель применяют в том случае, когда исходный объем экстракта достаточно велик, ориентировочно более 10 мл. Как правило, экстракт не упаривают досуха, а оставляют небольшой объем 0.5–5 мл. Растворитель удаляется под вакуумом при равномерном нагреве в водной бане.

Если определение проводят с применением внутренних стандартов-суррогатов, то в колбе оставляют, как правило, небольшой объем экстракта порядка 0.5 мл. При помощи шприца в него вносят внутренний стандарт выхода, а затем переносят экстракт из колбы непосредственно в виалу для готовой пробы. Полмиллилитра экстракта можно без затруднений перенести в виалу на 1 мл даже из колб объема 100–200 мл.

По-другому поступают, если определение проводят без применения стандартов-суррогатов. В этом случае потери при переносе экстракта из колбы недопустимы, поэтому в ней оставляют, по крайней мере, несколько миллилитров упаренного экстракта, которые по возможности количественно переносят в пробник (колбу можно промыть небольшим количеством растворителя и добавить смыв к экстракту). Из пробника остаток растворителя удаляют в токе азота.

Отгонка растворителя в токе азота — это очень распространенная техника. Объем исходного экстракта, как правило, не превышает 10 мл, а конечный объем упаренного экстракта составляет порядка 0.2–0.5 мл. В процессе отгонки пробник нередко аккуратно нагревают до 50–60°C для ускорения испарения.

Кроме того, существуют автоматизированные системы упаривания экстрактов различной конструкции. Они применяются при большом потоке анализов с однотипной схемой пробоподготовки, включающей отгонку растворителя. Подобными системами могут комплектоваться и комплексные автоматизированные системы подготовки пробы (например, см. гл. «Автоматизированные системы экстракции под давлением»).

У подхода к концентрированию пробы путем отгонки растворителя есть ряд ограничений. Так, его применение становится проблемным, если целевые соединения обладают высокой летучестью — отгонка растворителя в этом случае гарантировано приводит к их частичной или полной потере. Если целевые соединения обладают умеренной летучестью, потери можно свести к минимуму, если:

- а. применять для экстрагирования сильнолетучие растворители (дихлорметан, диэтиловый эфир, в меньшей степени гексан, ацетон);
- б. работать с экстрактом аккуратно, отгоняя растворитель в слабом токе азота, желательнее, без нагревания (вакуум противопоказан категорически);
- в. не упаривать экстракт до совсем малых объемов, то есть оставлять 0.5–1 мл экстракта.

Попытка значительно сконцентрировать экстракт отгонкой растворителя может закончиться неудачно, если экстракт является слишком «грязным» (включает большое количество компонентов матрицы) или плохо осушен (содержит значительную долю влаги). По этой причине процедуры осушения и очистки экстракта всегда предшествуют отгонке растворителя.

Если объем экстракта, подлежащего очистке, значителен, то отгонку растворителя проводят в два этапа. Сначала проводят осушение и предварительную отгонку растворителя (например, при помощи ротационного испарителя) до объема порядка 10–20 мл (работать с таким объемом уже достаточно удобно). После стадии очистки еще раз отгоняют растворитель, и уже в этом случае доводят объем до разумно минимального, то есть 0.2–0.5 мл.

Отгонка растворителя является одним из подходов, применяемых для его замены. В случае нелетучих и стабильных целевых соединений можно менять растворитель «через сухой остаток»; при этом исходный растворитель сначала полностью удаляют, а сухой остаток перерастворяют в другом растворителе. Второй вариант состоит в том, чтобы упарить экстракт до небольшого объема, а затем разбавить его другим растворителем.

1.3. Разрушение эмульсий и коагуляционных структур

1.3.1. Типы дисперсных систем

Термином «диспергирование» обозначают процесс измельчения твердого тела или жидкости в определенный среде, который приводит к появлению новой, т.н. дисперсной фазы. В зависимости от агрегатного состояния диспергируемой фазы и среды выделяют следующие типы дисперсных систем: суспензии (тв./жидк.), аэрозоли (тв./газ.), эмульсии (жидк./жидк.), жидкие пены (жидк./газ.).

Кроме того, в зависимости от размера частиц дисперсные системы делят на грубые (с более крупными частицами) и тонкие (с мелкими частицами). К примеру, эмульсии подразделяют на грубые эмульсии, эмульсии, и микроэмульсии (лиозоли). Суспензии подразделяют на взвеси, суспензии и золи.

Образование дисперсной системы не является самопроизвольным процессом; для ее появления необходимо совершить некоторую

работу, которая увеличивает полную энергию системы на величину свободной поверхностной энергии. Поскольку термодинамическая система стремится к состоянию с минимальной энергией, любая дисперсная система является термодинамически неустойчивой. Это значит, что измельченная фаза при любой возможности будет самопроизвольно укрупняться, пытаясь восстановить целостность исходной фазы.

Тем не менее, существуют кинетически стабильные дисперсные системы, которые не разрушаются в течение значительного времени. Это значит, что на них оказывают влияние те или иные стабилизирующие факторы, в том числе образование на поверхности частиц двойного электрического слоя, формирование структурно-механического барьера и т.д.

По характеру неустойчивости дисперсные системы разделяют на коагуляционно-неустойчивые и седиментационно-неустойчивые.

Седиментационно-неустойчивыми являются системы, в которые частицы дисперсной фазы по прохождении некоторого времени выделяются в виде осадка; к примеру, седиментационно-неустойчивыми нередко являются грубые дисперсии. Тонкодисперсные системы могут стать седиментационно-неустойчивыми вследствие процессов коагуляции.

Термином «коагуляция» обозначают слипание мелких частиц в более крупные частицы и структуры.

Образование крупных частиц, по сути, означает переход тонкодисперсной системы в грубодисперсную. В случае жидких частиц этот процесс называется коалесценцией (например, выпадение дождя — это пример коалесценции).

Более сложный процесс происходит, когда при слипании из мелких частиц образуются достаточно стабильные сложные структуры, которые называются коагуляционными.

Коагуляционной структурой в жидкой среде является желеобразная масса — гель. Гели могут возникать как в виде рыхлого осадка, так и в виде достаточно плотной массы по всему объему первоначальной жидкой фазы. Гели с водной дисперсной средой называют гидрогелями, а с органической (часто углеводородной) средой — органогелями. Образованию гидрогелей способствует присутствие в системе ионных ПАВ, а образованию органогелей — неионных ПАВ.

1.3.2. Техники разрушения дисперсных систем

При проведении подготовки пробы образование дисперсной системы любого типа является крайне нежелательным процессом. Особенно много проблем возникает с гелями и пенами, которые, образуясь на границе раздела фаз, серьезно затрудняют их физическое отделение друг от друга. Помимо этого, дисперсная фаза всегда содержит в себе определенную долю экстрагируемых целевых соединений, которые невозможно выделить, не разрушив эту фазу.

Наибольшую проблему представляют гели. Для борьбы с ними применяют т.н. «вымораживание», то есть замораживание образца (полное или частичное) с последующим его оттаиванием. Температура, при которой выдерживают образец, может быть весьма низкой, обычно от -10°C до -30°C , но возможно и ниже; предел отрицательной температуры ограничен в основном применяемыми техническими средствами.

Применение вымораживания далеко не всегда приводит к разрушению геля, особенно если матрица образца содержит достаточные количества стабилизирующих гель веществ (к примеру, низко- и высокомолекулярных ПАВ). Тем не менее, в результате этой процедуры рыхлые гели, как правило, уплотняются. Плотная структура содержит меньше т.н. «неподвижного растворителя», то есть, в данном случае, экстракта; таким образом, проведение вымораживания приводит к сокращению потерь целевых соединений. Более того, в отличие от рыхлой структуры плотный осадок значительно легче отделяется от экстракта.

Для обработки экстрактов в неполярных органических растворителях, которые содержат эмульсию и/или небольшие количества геля, применяют подход, основанный на комбинировании механического и адсорбционного воздействия. Экстракт пропускают через небольшую колонку или фильтр со слоем ваты (верхний слой) и небольшим количеством неорганической соли (нижний слой). В самом простом варианте применяют хлорид натрия или безводный хлорид кальция (гранулы соли не должны быть слишком мелкими, экстракт должен фильтроваться без затруднений). Такой фильтр разбивает гель, а также поглощает часть влаги и стабилизирующих дисперсную фазу поверхностно-активных веществ. Главное в этом подходе — чтобы вата или соль не адсорбировали целевые соединения.

Наконец, для разрушения обратных эмульсий (то есть эмульсий водной фазы в органическом растворителе) нет никакой необходимости

прибегать к каким-либо специальным способам — вполне достаточно провести стандартную процедуру осушения экстракта при помощи безводного сульфата натрия или хлорида кальция.

Для разрушения прямых эмульсий (то есть эмульсий в водной фазе), стабилизирующихся, как правило, в присутствии ионных ПАВ, применяют целый ряд методов: добавляют концентрированные растворы электролитов, изменяют рН, нагревают экстракт. Успех того или иного подхода во многом зависит от типа матрицы, поэтому эффективность его применения оценивают эмпирически.

Для разрушения пен на границе раздела водной и органической фаз применяют небольшие добавки спиртов: этанола, изопропанола.

Тонкие суспензии эффективно коагулируют под воздействием небольших добавок специальных полиэлектролитов — флокулянтов. Для осаждения суспензий из водных сред чаще всего применяют широко доступные полиакриламид (ПАА) и поливиниловый спирт (ПВА). Хлопьевидные агрегаты (флокулы), образовавшиеся в результате коагуляции, удаляют центрифугированием.

1.4. Жидкостная экстракция твердых матриц

1.4.1. Специфика и техники жидкостной экстракции твердых матриц

Твердые образцы не могут быть проанализированы хроматографическими методами напрямую. По этой причине целевые соединения вначале переводят из твердой матрицы в жидкую фазу (жидкостная экстракция) или газообразную фазу (парофазная экстракция). Применение парофазной экстракции ограничено извлечением летучих соединений, поэтому этот метод не универсален. Таким образом, жидкостная экстракция является наиболее распространенным методом извлечения целевых соединений из твердых матриц.

Техники проведения жидкостной экстракции твердых матриц имеют ряд особенностей, не характерных для жидкость-жидкостной экстракции.

Для проведения экстракции методом ЖЖЭ необходимо на некоторое время диспергировать обе жидкие фазы (образца и экстрагента) друг в друге, чтобы увеличить скорость достижения адсорбционного

равновесия. Для подобного грубого диспергирования необходимо совсем небольшое по мощности воздействие, причем низкой частоты (к примеру, достаточно простого ручного встряхивания). В свою очередь, чтобы диспергировать твердую матрицу, ее необходимо разрушить. Если матрица прочная, для этого может понадобиться довольно мощное воздействие, в ряде случаев — высокой частоты.

Облегчить процесс разрушения твердой матрицы можно путем адсорбционного снижения ее прочности. Первый вариант состоит в правильном выборе растворителя, который должен не только хорошо растворять целевые соединения, но и способствовать легкому разрушению матрицы. Общая закономерность состоит в том, что полярные растворители снижают прочность полярных матриц (особенно эффективны добавки воды), а неполярные растворители снижают прочность неполярных матриц.

Второй вариант состоит в применении экстрагентов с добавками поверхностно-активных веществ, или детергентов, которые наиболее эффективно снижают межфазное поверхностное натяжение и, соответственно, значительно облегчают диспергирование (то есть разрушение) твердых матриц. Оба подхода, разумеется, можно сочетать.

Еще одно отличие от ЖЖЭ состоит в том, что диффузия веществ из твердой матрицы в экстрагент может оказаться очень медленной даже в том случае, когда твердый образец диспергирован. Это характерно для образцов, в которых целевые соединения не концентрируются преимущественно в порах твердых частиц, а распределены относительно равномерно внутри их объема.

К факторам, эффективно ускоряющим диффузию, относят температуру и давление. Высокая температура приводит к снижению вязкости экстрагента, и высокое давление буквально «вгоняет» высокотекучую жидкость даже в мельчайшие поры твердой матрицы.

Наконец, даже на поверхности пор целевые соединения могут весьма сильно удерживаться за счет адсорбционных взаимодействий. Таким образом, применяемый экстрагент должен не только хорошо растворять целевые вещества, но и обладать по отношению к ним и к матрице высокой элюирующей силой (см. гл. «Адсорбционные режимы»).

Экстрагент пытаются подобрать таким образом, чтобы он отвечал целому ряду требований; по этой причине, для экстракции твердых матриц нередко применяют смеси различных растворителей. Смеси растворителей, однако, нельзя регенерировать (за исключением

азеотропных смесей); применение индивидуальных растворителей с этой точки зрения выглядит более практично. С другой стороны, многие аналитики считают практику применения регенерированных растворителей в химическом анализе неприемлемой в принципе.

Техники проведения экстракции могут весьма сильно отличаться друг от друга, но между ними есть, безусловно, и много общего. Так, перед проведением экстракции образец стараются предварительно измельчить, то есть максимально разрушить твердую, и нередко весьма прочную, матрицу. Измельчение, как правило, производят механическими автоматизированными методами; для эластичных образцов применяют режущее воздействие, для неэластичных — дробящее.

Для более мелкого помола в образец добавляют абразив. К примеру, при жидкостной экстракции продуктов питания предварительно измельченный образец (после взятия навески) перетирают с безводным сульфатом натрия, который играет сразу три роли: абразива, осушителя и высаливающего реагента.

Как правило, экстракцию твердых образцов, содержащих влагу, проводят неполярными растворителями, не смешивающимися с водой. Однако, существует специальная техника экстракции полярными, смешивающимися с водой растворителями — уже упоминавшийся в книге QuEChERS.

В этой технике применяемый растворитель-экстрагент должен выделяться в отдельную фазу при внесении в водно-органический раствор неорганической соли. Так ведут себя ацетонитрил, ТГФ, диоксан; как правило, для экстракции применяют ацетонитрил. В качестве высаливающего реагента в данном случае применяют безводный сульфат магния, который в том числе работает как абразив.

Предварительно измельченный образец перетирают с сульфатом магния и ацетонитрилом. Эффективно проделать это вручную невозможно, так что процесс должен быть автоматизирован. Далее без заминки (поскольку вобравший влагу сульфат магния быстро схватывается в твердую массу) декантируют экстракт и отбирают его аликвоту. Полученный в результате такой процедуры ацетонитрильный экстракт имеет очень малую, менее 1 %, долю влаги, а также, что крайне важно, содержит минимум липидов и насыщенных углеводов.

Одним из способов перевода в раствор матриц, содержащих жиры, белки, углеводороды и другие природные олигомеры, является гидролиз. Применяют кислотный, щелочной или ферментативный гидролиз.

Для гидролиза жиров, как правило, применяют щелочной гидролиз раствором гидроксида калия в смеси этанола с водой. Гидролиз является морально устаревшей техникой, весьма трудоемкой и ресурсоемкой.

Кроме того, полученный гидролизат необходимо экстрагировать неполярным растворителем при повышенной температуре (иначе омыленные продукты застывают, что делает проведение ЖЖЭ невозможным). Во-первых, это крайне неудобно технически — экстрагент в процессе буквально закипает в делительной воронке. Во-вторых, результатом экстракции гарантированно является тяжело отделяемая от образца эмульсия или гель. Таким образом, гидролиз целесообразно применять только как вариант дополнительной обработки водных образцов, содержащих жиры и/или белковые соединения.

Наконец, в ряде случаев твердый образец может быть переведен в жидкую фазу при помощи растворения. Подход очень заманчив: в результате экономятся реагенты, время, труд, улучшается правильность и воспроизводимость измерений. Поэтому, если существует принципиальная возможность применить его, то нужно пытаться это сделать.

Сложность может состоять в том, что применяемый инструментальный метод далеко не всегда бывает совместим в пробой, полученной растворением образца в подходящем растворителе. В этих случаях необходимо менять сам инструментальный метод, или проводить дополнительную очистку растворенного образца и/или замену исходного растворителя на тот, который совместим с применяемым инструментальным методом.

1.4.2. Техническое оформление экстракции твердых матриц. Традиционные системы. Автоматизированные системы экстракции под давлением

Традиционным способом извлечения веществ из твердых матриц является экстракция в аппарате Сокслета. Образец, помещенный в патрон из пористого материала (или обернутый в стекловолокно), непрерывно экстрагируется чистым растворителем, получаемым в результате циклического процесса регенерации из экстракта. Этот подход, безусловно, является весьма ресурсоемким (требует применения порядка 100 мл экстрагента), но главное — медленным; он занимает от 6 до 48 часов. Низкая скорость экстракции обусловлена тем, что

температура поступающего в отделение с образцом экстрагента низкая — тепло теряется при его прохождении через обратный холодильник прибора.

Этот недостаток частично устранен в аппаратах для автоматизированной экстракции методом Сокслета. На первой стадии пористый стакан с образцом находится в колбе для приема экстракта, где образец около часа экстрагируется обычным кипячением в экстрагенте. Затем следует стадия экстракции по обычной схеме Сокслета (также около часа), после чего растворитель автоматически отгоняется из экстракта; его конечный объем составляет 1–2 мл.

Экстракцию под воздействием ультразвука проводят при помощи ультразвуковой ванны или обычного ультразвукового экстрактора с металлическим стержнем. Процесс экстракции очень быстрый, порядка 10–20 минут или менее, и простой — достаточно поместить стакан с измельченным образцом и экстрагентом в ультразвуковую ванну и запустить процесс. Метод оптимален для разрушения весьма твердых, но при этом хрупких матриц; эффективность повышается при сочетании обработки ультразвуком с применением экстрагентов, содержащих добавки поверхностно-активных веществ.

Многие исследователи отмечают недостаточную универсальность ультразвуковой экстракции, что во многом справедливо. Обработку ультразвуком хорошо применять как предварительную стадию экстракции, направленную, прежде всего, на разрушение структуры твердой матрицы. Экстракцию под воздействием ультразвука, к примеру, можно комбинировать с экстракцией в аппарате Сокслета или микроволновой экстракцией.

Микроволновая экстракция осуществляется путем воздействия на образец с экстрагентом микроволнового излучения, которое приводит к их разогреву. Теплотворная мощность сильно зависит от полярности растворителя-экстрагента. Быстро и сильно разогреваются полярные растворители с низкой диэлектрической проницаемостью: спирты, ацетон, ацетонитрил, дихлорметан. Также эффективно действует вода в виде добавки в экстрагент на уровне 10–15 %. В то же время, углеводородные растворители: гексан, толуол — разогреваются плохо, поэтому их необходимо смешивать с более полярными растворителями (например, с ацетоном).

Микроволновые экстракторы бывают открытого и закрытого типа. В экстракторах открытого типа процесс экстракции проходит в колбе, которая через обратный холодильник соединена с атмосферой.

Микроволновое излучение фокусируется на дне колбы, где находится образец. За один раз таким способом можно экстрагировать только один образец.

Напротив, применение экстрактора закрытого типа позволяет одновременно экстрагировать несколько образцов. Процесс проходит в герметичной капсуле, которая способна выдерживать значительное давление (порядка 100 атм и даже выше). Время экстракции составляет порядка 10–20 минут, и еще около 20 минут необходимо для того, чтобы капсула остыла.

К преимуществам метода относят высокую эффективность и скорость. Недостатки: возможность разложения целевых веществ при высокой температуре и неизбирательность экстракции, которая приводит, как правило, к необходимости дополнительной очистки экстрактов. Микроволновая экстракция особенно хорошо зарекомендовала себя как метод выделения соединений из сложных, разнородных по составу матриц, содержащих жиры, жировые основы, сажу, полимеры, растительные остатки; метод также применяется для извлечения лекарственных веществ из таблетированных форм.

Одной из наиболее современных техник экстракции твердых матриц является жидкостная экстракция под давлением (ЖЭД, PLE), или, в другом варианте, ускоренная жидкостная экстракция (ASE); существование различных названий обусловлено тем, что оборудование выпускается конкурирующими компаниями.

Экстракция проводится при повышенной (до 100–150°C) температуре и повышенном (до 100–120 атм.) давлении традиционными растворителями в специальных стальных ячейках, которые напоминают ВЭЖХ колонки. Ячейки могут быть различного объема. Они находятся в термостате; растворители подаются насосом высокого давления; миксер на стороне низкого давления позволяет смешивать различные растворители-компоненты экстрагента в требуемом соотношении. В процессе экстракции насос периодически подает в ячейку небольшие объемы экстрагента; готовый экстракт постепенно подается в приемную емкость.

ЖЭД является весьма экономной, быстрой, эффективной и полностью автоматизированной техникой экстракции. Она широко применяется для извлечения стойких органических загрязнителей из различных матриц. Достаточно существенные затраты на ЖЭД экстрактор более чем окупаются высокой производительностью и низкой ресурсоемкостью этой системы.

Система жидкостной экстракции под давлением может быть дополнена автоматизированной системой колоночной хроматографии для очистки экстрактов, а также автоматизированной системой отгонки растворителя. Их применение снижает трудоемкость процедуры очистки, но существенно повышает ресурсоемкость всей процедуры в целом; кроме того, стоимость автоматизированных систем колоночной хроматографии достаточно высока.

1.5. Извлечение летучих компонентов

1.5.1. Статическая и динамическая парофазная экстракция

Для извлечения летучих целевых соединений нередко применяют парофазную экстракцию. Сущность этого подхода состоит в выделении из образца паров содержащихся в нем летучих соединений при помощи нагревания, пропускания тока инертного газа или при применении комбинации обоих воздействий. Агрегатное состояние образца может быть как жидким, так и твердым.

В том случае, когда паровую фазу выделяют в замкнутой емкости (обычно при небольшом нагревании до 40–80 °С в течение 1–10 минут), подход называют статической парофазной экстракцией, СПЭ, или «хедспейс» (headspace) экстракцией. При выборе условий СПЭ стремятся к тому, чтобы состав паровой фазы был как можно ближе к равновесному, что крайне важно с точки зрения воспроизводимости анализа.

Динамическую парофазную экстракцию, ДПЭ, или «пёрдж-энд-трэп» (purge&trap) экстракцию, реализуют при пропускании через образец инертного газа, который захватывает с собой летучие соединения, которые затем каким-либо образом концентрируются — например, поглощаются твердым адсорбентом. При выборе условий ДПЭ стремятся к тому, чтобы по возможности количественно извлечь из образца целевые летучие соединения.

Оба подхода автоматизированы и устойчиво вошли в практику определения летучих соединений методом газовой хроматографии. Автоматический статический парофазный экстрактор состоит из термостата, автосамплера с пробниками (которые выполняют также функцию экстракционных емкостей) и соединенной с аналитическим шприцем газовой линии, по которой проба паровой фазы попадает

в газовый хроматограф. Все операции выполняются в непрерывном режиме согласно программе, введенной оператором.

Автоматический динамический парофазный экстрактор состоит из экстракционной емкости и газового крана, к которому присоединен т.н. термодесорбер — устройство с адсорбционными трубками, которые поглощают летучие соединения образца (10–15 минут), а по завершении экстракции при резком нагревании за 1–2 минуты высвобождают их. Термически десорбированные летучие соединения поступают в газовый хроматограф, где они конденсируются криомодулятором и затем вводятся в колонку.

Автоматическая динамическая парофазная экстракция широко применяется в экологическом анализе для определения летучих органических соединений в воде и почвах.

Для решения иных задач самой различной специфики применяют, как правило, менее дорогостоящий и более доступный метод статической парофазной экстракции. Он не только доступен, но и прост, что позволяет легко реализовать его и без применения автоматизированных устройств, то есть при работе вручную.

С другой стороны, у статической парофазной экстракции, как и любого равновесного метода, есть свои «подводные камни». Степень извлечения и особенно воспроизводимость результатов зависят от соблюдения нескольких правил, основанных на закономерностях СПЭ.

Рассмотрим ситуацию, когда образец жидкий. Эффективность СПЭ зависит от растворимости целевого вещества в жидком образце. Чем больше вещество растворимо в определенной жидкости, тем меньше давление насыщенного пара этого вещества над жидким образцом — и тем меньшая доля летучего вещества попадает в равновесную паровую фазу. К примеру, если водный образец содержит этанол и гексан, то после проведения СПЭ практически весь гексан переходит в паровую фазу, тогда как основная часть этанола остается в образце (в паровую фазу переходит очень малая часть этанола). Таким образом, плохо растворимые в образце летучие вещества экстрагируются методом СПЭ значительно эффективнее, чем хорошо растворимые.

Увеличить концентрацию целевого вещества в паровой фазе можно несколькими методами; основных методов два: это увеличение температуры и повышение объемно-фазового соотношения, то есть объема жидкого образца относительно всего объема экстракционного пробника. Повышение температуры экстракции дает видимый эффект

только в том случае, когда целевое соединение хорошо растворимо в образце. В противном случае, когда вещество растворимо плохо, и оно уже практически полностью находится в паровой фазе, этот способ не дает эффекта.

Напротив, повышение объемно-фазового соотношения приводит к видимому эффекту именно в том случае, когда оно плохо растворимо в образце. Поскольку такое вещество практически полностью находится в паровой фазе, увеличение объемной доли образца в емкости приводит к практически пропорциональному увеличению его концентрации в паровой фазе. Соответственно, повышение объемно-фазового соотношения не дает эффекта при СПЭ хорошо растворимых в образце веществ.

При СПЭ из водных образцов полярных, хорошо растворимых в воде соединений действенным способом повышения их концентрации в паровой фазе является высаливание, то есть добавление в образец неорганических солей в концентрации более 1М. Часто в качестве высаливающего агента применяют сульфат натрия или хлорид натрия.

Таким образом, при СПЭ из водного образца, к примеру, этанола целесообразно применять повышенную (до 80°C) температуру и высаливание. При СПЭ из водного образца гексана лучше увеличить в разумных пределах объемно-фазовое соотношение. «Разумный предел» составляет примерно $\beta = 3$, что соответствует 5 мл образца в 20 мл пробнике.

Необходимо отметить, что при проведении определения с применением СПЭ из одного пробника (экстракционной емкости) делают одну инъекцию в хроматограф. Другими словами, в общем случае будет ошибкой делать из одного пробника несколько инъекций. Это может привести к существенной нестабильности количественных результатов, особенно для плохо растворимых в образце летучих соединений (которые находятся преимущественно в паровой фазе).

Теперь рассмотрим ситуацию, когда образец твердый. Здесь появляются два варианта. С одной стороны, парофазную экстракцию можно проводить непосредственно из твердого образца. С другой стороны, сначала можно провести жидкостную экстракцию твердого образца, а затем парофазную экстракцию первоначального жидкого экстракта. У каждого из подходов есть преимущества и недостатки.

Основным преимуществом непосредственной парофазной экстракции твердого образца является простота всей процедуры.

Образец перемалывают (или нарезают) некоторым единообразным способом и переносят в экстракционный пробник; СПЭ, как правило, проводят при повышенной температуре. Недостаток подобного подхода заключается в том, что степень извлечения здесь весьма сильно зависит от матрицы образца, причем иногда даже для однотипных объектов. Соответственно, методики с применением СПЭ твердых образцов, как правило, имеют достаточно узкую область применения. Более того, при подобном подходе могут возникать неизбежные трудности с точным количественным анализом за редким исключением случаев, когда для градуировки можно приобрести подходящий стандартный матричный материал.

Этих недостатков лишен подход с промежуточной жидкостной экстракцией, минусы которого, в свою очередь, связаны именно с проведением дополнительной ресурсоемкой стадии жидкостной экстракции. К тому же, ЖЭ имеет свои ограничения (см. гл. «Жидкостная экстракция твердых матриц»).

Парофазную экстракцию, как правило, сочетают с газовой хроматографией, поскольку она идеально подходит для анализа летучих соединений. Тем не менее, ПЭ также совместима и с жидкостной хроматографией.

В варианте ДПЭ инертный газ с экстрагированными летучими веществами пропускают через некоторый объем подходящего растворителя. Аликвоту полученной жидкой пробы инжектируют в жидкостной хроматограф.

В варианте СПЭ применяют жидкостную микроэкстракцию: паровая фаза контактирует одновременно с образцом и с очень малым (до одной капли) объемом растворителя в верхней части экстракционного пробника; в этом случае в хроматограф инжектируют весь объем полученной пробы.

1.5.2. Паровая дистилляция

Паровая дистилляция является широко распространенным способом извлечения среднелетучих соединений с температурой кипения до 200°C. Идея метода заключается в том, что при одновременной дистилляции с водным паром целевые соединения возгоняются при температуре значительно более низкой, чем температура кипения чистых веществ.

Техника метода очень проста. Жидкий или твердый образец переносят в колбу вместе с достаточным количеством воды и нагревают смесь; конденсат через прямой холодильник попадает в приемную емкость.

Если извлекаемые летучие соединения не растворимы в воде (например, эфирные масла), они выделяются в виде отдельного органического слоя или эмульсии. Как правило, дистилят в этом случае дополнительно экстрагируют неполярным растворителем. Если отгоняемые соединения растворимы в воде (например, метилфенолы), то дистилят представляет собой раствор целевых веществ. В зависимости от ситуации их можно извлечь из дистилята методом ЖЖЭ или ТФЭ, или же непосредственно использовать дистилят как пробу.

Метод паровой дистилляции хорошо совместим и с газовой, и с жидкостной хроматографией.

1.5.3. Твердофазная микроэкстракция, ТФМЭ

Метод твердофазной микроэкстракции, ТФМЭ, основан на адсорбции соединений из жидких или газообразных образцов на капилляре, покрытым полимерной пленкой.

После проведения экстракции рабочий капилляр перемещается внутрь стальной иглы специального аналитического шприца. Игла выполняет две функции: защитной оболочки и интерфейса для прямого ввода адсорбированных соединений непосредственно в газовый хроматограф методом термодесорбции. Таким образом, ТФМЭ позволяет извлекать сильнолетучие и среднелетучие соединения, которые способны к десорбции с поверхности рабочего капилляра при его кратковременном нагревании в инжекторе газового хроматографа.

Сменные рабочие капилляры можно использовать повторно, однако, количество экстракций на один капилляр закономерно уменьшается при переходе к более грязным матрицам. При ТФМЭ из паровой фазы на одном капилляре можно провести несколько сотен экстракций, тогда как при экстракции из насыщенных нелетучими соединениями жидких матриц, как правило, не удается использовать капилляр более нескольких раз.

Селективность экстракции можно варьировать, применяя капилляры с различной химией пленки: полидиметилсилоксаном

(PDMS), полидиметилсилоксан-дивинилбензолом (PDMS/DVB), полиэтиленгликоль-дивинилбензолом (CW/DVB), полиакрилатом (PA). Для ТФМЭ сильнолетучих соединений и/или экстракции из паровой фазы выбирают капилляры с большей толщиной пленки, от 50 до 100 мкм. Для ТФМЭ среднелетучих соединений применяют пленки меньшей толщины вплоть до 7 мкм, которые обеспечивают более полную термодесорбцию.

При ТФМЭ из паровой фазы время экстракции составляет порядка 5 минут, а из жидких образцов — порядка 30 минут.

1.6. Адсорбционные методы подготовки пробы: адсорбционная очистка (АО) и твердофазная экстракция (ТФЭ)

1.6.1. Основы методов ТФЭ и АО

Метод твердофазной экстракции, ТФЭ, основан на извлечении целевых соединений из жидких образцов, экстрактов и газообразных образцов путем их адсорбции на малых количествах (от миллиграмм до сотен миллиграмм) адсорбционных материалов.

Элюирование (смыв) целевых соединений осуществляют сравнительно небольшими объемами в пределах десяти миллилитров, что дает возможность избежать при проведении пробоподготовки всех неудобств, связанных с применением больших объемов растворителей.

Метод адсорбционной очистки, АО, основан на извлечении из жидких образцов и экстрактов загрязняющих их компонентов матрицы путем адсорбции на малых количествах (от миллиграмм до сотен миллиграмм) адсорбционных материалов. При проведении АО целевые соединения проскакивают через адсорбционный материал, то есть не адсорбируются, а остаются в образце (экстракте).

Закономерности и технические средства проведения ТФЭ и АО одинаковы; различие подходов заключается в логике их применения. В методе ТФЭ целевые соединения на первой стадии удаляются из образца (экстракта) адсорбцией на подходящем материале, что позволяет проводить как очистку пробы, так и ее концентрирование, а также проводить замену растворителя пробы. В методе АО целевые соединения проскакивают через адсорбент, который лишь поглощает

часть загрязняющих пробу соединений; таким образом, АО применима исключительно для проведения очистки пробы.

Нередко АО осуществляют на достаточно дешевых адсорбентах, которые применяют однократно и выбрасывают после использования. При проведении ТФЭ, напротив, стараются регенерировать адсорбционные материалы и использовать их многократно — что дает возможность применять для твердофазной экстракции более дорогие и качественные (нередко также специализированные) адсорбенты.

В совокупности ТФЭ и АО называют адсорбционными методами подготовки пробы. Адсорбция может осуществляться в статических и динамических условиях.

В статическом методе адсорбционный материал (в виде сыпучего адсорбента, спрессованной таблетки или полимерной пленки) выдерживают в жидком образце (экстракте). В случае статической АО очищенный экстракт с целевыми соединениями декантируют, а использованный адсорбционный материал отбрасывают.

Как правило, в статических условиях проводят именно адсорбционную очистку (АО), а не ТФЭ. Это обусловлено тем, что время достижения адсорбционного равновесия может быть весьма большим — порядка десятков минут или даже часов, даже при условии значительного удерживания целевых соединений выбранным адсорбентом. Кроме того, степень извлечения в этом случае сильно зависит от матрицы образца (экстракта). Все это неприемлемо для ТФЭ, но вполне приемлемо для АО, если задача состоит лишь в удалении большей части загрязняющих компонентов при минимуме затрат труда.

ТФЭ, как правило, проводят в динамическом варианте: жидкий образец (экстракт) пропускают через картридж, заполненный адсорбентом. Подобным образом в динамическом режиме проводят и адсорбционную очистку.

Разница, как правило, заключается в том, что при проведении АО в качестве картриджа применяют небольшую стеклянную колонку, заполненную адсорбентом объемом не более нескольких миллилитров. Для проведения ТФЭ используют специальные адсорбционные картриджи объемом не более 1 мл, а в случае твердофазной экстракции значительных объемов — экстракционные диски с пористой полимерной пленкой.

Жидкий образец может нагнетаться в картридж с помощью воздушного компрессора, вакуумного насоса, перистальтического насоса, а также вручную. Для проведения одновременной ТФЭ большого

количества образцов применяют специальную емкость-держатель для установки адсорбционных картриджей — манифолд, а для нагнетания вакуума для него применяют вакуумный насос.

Активно развивается сравнительно новый технический способ реализации динамической адсорбции — микро ТФЭ (МТФЭ), или MEPS (Micro Extraction by Packed Sorbent). Микрокартридж с объемом адсорбента порядка нескольких микролитров расположен в основании сменной иглы специального аналитического шприца на 100–250 мкл; пробу пропускают через картридж вручную, при помощи автосамплера или специального автоматизированного устройства (e-Vol).

На данный момент MEPS является простым удобным методом адсорбционной очистки микроколичеств пробы, которую можно непосредственно (он-лайн) вводить из MEPS шприца в хроматограф.

1.6.2. Последовательность процедуры ТФЭ

Процедура ТФЭ состоит из достаточно стандартной последовательности из нескольких этапов: 1) кондиционирования адсорбента, 2) нанесения пробы, 3) промывки адсорбента, 4) сушки адсорбента, 5) смыва (элюирования) целевых соединений, 6) регенерирования адсорбента. Если картридж используется многократно, то данная последовательность повторяется по циклу.

Далеко не всегда бывает необходимо задействовать все шесть стадий; нередко в зависимости от конкретной ситуации можно опускать шаги 3, 4 и 6, то есть не всегда адсорбент промывают, сушат и подвергают отдельной регенерации. Таким образом, основных стадий ТФЭ все-таки три: кондиционирование адсорбента, нанесение пробы и смыв целевых соединений.

Кондиционирование адсорбента проводят чистым растворителем, близким по свойствам растворителю пробы. Так, если проба является водной, то картридж кондиционируют водой. В случае ТФЭ из гексанового экстракта адсорбент кондиционируют гексаном.

При использовании неполярных C18 адсорбентов на основе силикагеля при проведении ТФЭ из водных образцов перед кондиционированием водой проводят т.н. «активацию» адсорбента небольшим объемом органического растворителя: ацетонитрилом или спиртом. Это замечание относится только к алкил-привитым

силикагелям, то есть «активировать» современные полимерные адсорбенты перед проведением ТФЭ не требуется.

Объем растворителя для кондиционирования приблизительно равен 2–5 объемам адсорбционного картриджа.

После кондиционирования наносят пробу, то есть пропускают жидкую пробу через картридж. Важным параметром является скорость нанесения пробы; по возможности она не должна превышать 5 объемов картриджа в минуту для классического варианта ТФЭ на адсорбционном картридже. При ТФЭ на адсорбционном диске и МТФЭ, как правило, допустимы более высокие скорости.

Главное, чтобы при нанесении пробы целевые соединения не проскочили, чтобы они количественно поглотились адсорбентом.

Уже на стадии нанесения пробы происходит ее начальная очистка, поскольку только часть загрязняющих компонентов остается на адсорбенте вместе с целевыми соединениями — другая часть плохо удерживаемых компонентов матрицы проскакивает через картридж. Чтобы усилить эффект предварительной очистки, проводят промывку картриджа. Как правило, промывают тем же растворителем, который применяется для кондиционирования, то есть при ТФЭ из водных образцов картридж промывают водой. Главное при промывке — не смыть целевые соединения. По этой причине объем промывки, как правило, не превышает двух объемов картриджа.

После промывки (или после нанесения пробы, если промывка не проводилась) жидкость из картриджа необходимо удалить. Удаление жидкости — это не сушка, которая далеко не всегда бывает необходима, адсорбент после этой процедуры остается влажным. Однако перед смывом целевых соединений большую часть промывочной жидкости или оставшегося образца все же необходимо вытеснить воздухом (как вариант, азотом): — промывочная жидкость не должна смешиваться с элюирующим растворителем.

После удаления жидкости можно проводить сушку картриджа (при необходимости). Если одной из целей ТФЭ является замена растворителя пробы, то сушка требуется однозначно.

Также сушку можно проводить в том случае, когда элюирующий растворитель не смешивается с остаточной промывочной жидкостью («влажность» адсорбента), вытесняя ее в виде капли; в результате подобной произвольной жидкостной экстракции часть целевых соединений может потеряться, оставшись в капле промывочной жидкости.

Сушка неприемлема, если целевые соединения летучи. Если целевые соединения подвержены окислению, сушить картридж необходимо не воздухом, а азотом.

Неудобство сушки связано в основном с тем, что это достаточно долгая процедура — для полной просушки большого картриджа с 1 мл адсорбента может потребоваться 15–20 минут.

Элюирование стараются проводить как можно меньшим объемом подходящего растворителя, который, тем не менее, должен быть достаточен для смыва целевых соединений с адсорбционного картриджа. Разумный диапазон для объема элюирующего растворителя составляет 1–10 объемов картриджа. Степень концентрирования при ТФЭ определяется отношением объема нанесенной пробы к объему смыва (элюата). Кроме того, элюат можно дополнительно сконцентрировать отгонкой растворителя в токе азота, если целевые вещества нелетучи и элюат не слишком насыщен компонентами матрицы (см. гл. «Концентрирование пробы отгонкой растворителя»).

Растворитель для элюирования должен по возможности удовлетворять целому ряду критериев, поэтому к его выбору надо подходить ответственно. Главное — он должен обеспечивать количественное элюирование целевых соединений. Далее, если планируется дополнительно упаривать элюат в токе азота, то требуемый растворитель должен быть как можно более летучим (например, диэтиловый эфир, ацетон, дихлорметан). Если элюат напрямую вводят в газовый хроматограф, растворитель также должен быть достаточно летучим. Подобным же образом, если элюат напрямую (возможно, после разбавления) вводят в жидкостной хроматограф, растворитель для смыва должен быть растворим в подвижной фазе или являться одним из ее компонентов.

Как уже было отмечено, на стадии смыва целевых соединений происходит фактическая замена растворителя пробы. Более того, на этой стадии также происходит дополнительная очистка пробы, поскольку часть компонентов матрицы остается на адсорбенте даже после элюирования целевых соединений.

После стадии смыва также можно определить степень концентрирования пробы. В том случае, когда основной целью проведения ТФЭ является именно концентрирование, степень концентрирования может достигать значений 10–1000 и более.

Специальную регенерацию картриджа проводят в том случае, когда после смыва целевых соединений адсорбент остается загрязненным

компонентами матрицы образца. Достаточно популярным растворителем для регенерации является ацетон, обладающий большой элюирующей силой по всех адсорбционных режимах и неограниченно смешивающийся со всеми органическими растворителями и водой.

После регенерации проводят кондиционирование картриджа, и процесс экстракции повторяется.

В отличие от ТФЭ, для процесса адсорбционной очистки можно выделить только два основных этапа: нанесение пробы и промывку адсорбента. Элюаты, собранные на этих стадиях, объединяют; целевые соединения должны количественно присутствовать в объединенном элюате. Кондиционирование и регенерацию адсорбента при АО проводят редко, поскольку в большинстве случаев адсорбент используют однократно.

1.6.3. Он-лайн ТФЭ для ВЭЖХ

Описанную выше процедуру ТФЭ можно реализовать в двух вариантах: офф-лайн («вне линии») и он-лайн («в линии»). В офф-лайн варианте проба готовится отдельно, а затем вводится в хроматограф. Это наиболее простой и привычный вариант, и поэтому его применяют в большинстве случаев.

В он-лайн варианте ТФЭ картридж является частью инжектора хроматографа. Он-лайн ТФЭ из жидких образцов, как правило, применяют совместно с жидкостным хроматографом, а он-лайн ТФЭ из газообразных образцов (см. гл. «Статическая и динамическая парофазная экстракция») — с газовым хроматографом.

Если для газовой хроматографии он-лайн ТФЭ из воздуха или паровой фазы — это стандартная техника, то в жидкостной хроматографии эту технику применяют сравнительно редко, поскольку она требует хорошей профессиональной подготовки аналитика. Тем не менее, он-лайн ТФЭ для ВЭЖХ имеет весьма большой потенциал и стоит того, чтобы отдельно рассмотреть варианты применения этой техники.

В наиболее простой схеме он-лайн ВЭЖХ адсорбционный картридж для ТФЭ устанавливают на инжектор вместо петли. В этом случае все процедуры по нанесению пробы и промывке картриджа приходится проводить вручную, при помощи аналитического шприца через входной порт инжектора. Это неудобно и, к тому же, почти сводит на нет саму идею он-лайн подготовки пробы. Во-вторых, вручную можно «продавить»

лишь картридж, заполненный крупнозернистым адсорбентом — а для он-лайн ВЭЖХ как раз стараются применять высокоэффективные картриджи с мелкозернистыми адсорбентами.

Значительно лучший вариант реализации он-лайн ТФЭ в ВЭЖХ предполагает наличие еще одного крана высокого давления (в дополнение к инжектору) и еще одного насоса высокого давления. Дополнительный насос необходим для нанесения пробы на ТФЭ картридж и его промывки. Для этой цели необязательно применять насосы высокого давления для ВЭЖХ с пределом в 400–600 атм; вполне достаточно использовать более дешевые дозирующие насосы с пределом давления порядка 20–80 атм.

На инжектор устанавливают большую петлю объема 1–2 мл для дозирования образца. К инжектору подключают вспомогательный насос, прокачивающий растворитель для промывки картриджа. На выходе инжектора монтируют второй кран высокого давления; на него монтируют ТФЭ картридж (на месте инъекционной петли), подключают аналитическую насосную систему хроматографа и на выходе устанавливают аналитическую колонку. При запуске анализа проба переносится из петли в ТФЭ картридж, который автоматически промывается промывочным растворителем. При переключении второго крана в положение «inject» в ТФЭ картридж подается элюент, и с его потоком целевые вещества переносятся в аналитическую колонку.

Разберем преимущества и недостатки он-лайн ТФЭ в ВЭЖХ, сравнив эту технику с офф-лайн ТФЭ.

Наиболее очевидным преимуществом он-лайн ТФЭ является низкая вероятность потери целевых веществ при смыве (остается, однако, возможность потери при нанесении пробы). Крайне низка и вероятность перекрестного загрязнения проб. Таким образом, он-лайн ТФЭ, в принципе, надежнее офф-лайн варианта.

Второе преимущество он-лайн ТФЭ — автоматизация процедуры твердофазной экстракции. Разумеется, автоматизировать при необходимости можно и офф-лайн ТФЭ, но он-лайн ТФЭ автоматизирована по определению — в этом заключается основной смысл подхода.

Производительность и ресурсоемкость двух вариантов ТФЭ сравнивать некорректно, поскольку все сильно зависит от специфики каждой конкретной методики.

К основному недостатку он-лайн ТФЭ следует отнести многочисленные ограничения, накладываемые на процедуру ТФЭ типом аналитической системы. Различные ее компоненты: применяемый

хроматографический режим, используемая аналитическая колонка, система инжектирования и даже детектор — предъявляют к процедуре он-лайн ТФЭ определенные требования, что значительно сокращает гибкость метода ТФЭ.

К примеру, если аналитическая колонка, и адсорбционный картридж работают в обращенно-фазовом адсорбционном режиме, хорошая хроматография возможна лишь при том условии, что гидрофобность адсорбционного материала колонки как минимум не уступает (а лучше превосходит) гидрофобность материала концентрирующего он-лайн ТФЭ картриджа.

Только при соблюдении этого условия подвижная фаза способна одновременно обеспечивать и полный, резкий смыв целевых соединений (для чего необходима элюирующая сила не ниже определенного значения), и необходимое удерживание целевых соединений в аналитической колонке (для чего необходима элюирующая сила не выше определенного значения). Нерезкий же смыв (в худшем случае — еще и неполный) приводит к сильному уширению пиков и их асимметрии (в худшем случае — также потере части целевых соединений), и к этим же негативным последствиям приводит невысокое удерживание (вследствие сильного влияния экстра-колоночных эффектов уширения пиков).

Тем не менее, в реальной жизни приведенное выше условие совместимости выполняется нечасто. Дело в том, что в обращенно-фазовом режиме более гидрофобный ТФЭ материал обладает большей адсорбционной емкостью. По этой причине материал концентрирующего он-лайн ТФЭ картриджа, как правило, превосходит по гидрофобности материал аналитической колонки. С неизбежной потерей эффективности разделения (соответственно, с потерей специфичности и повышением пределов определения) борются различными способами: увеличением длины и диаметра аналитической колонки, применением в целом более эффективных аналитических колонок, применением градиентного элюирования для снижения пределов определения (если позволяет специфичность методики) и т.д.

Второй недостаток он-лайн ТФЭ — ее «эксклюзивность», необходимость индивидуального подхода к разработке каждой ТФЭ процедуры. Чтобы найти оптимальный баланс между приемлемой совместимостью он-лайн ТФЭ и аналитической системы, качеством пробы и стоимостью всей системы, требуется работа высококвалифицированного аналитика-разработчика.

1.6.3. Адсорбционные режимы

1.6.3.1. Как происходит удерживание

Твердофазная экстракция (ТФЭ) и адсорбционная очистка (АО) жидких проб по своей сути являются техниками, схожими с жидкостной хроматографией. Тем не менее, в отличие от последней, в ТФЭ и АО селективность разделения целевого вещества от компонентов матрицы формально может равняться бесконечности, т.е. один из участников разделения может либо проскакать, либо остаться на адсорбционном материале.

По этой причине выбор адсорбционного материала, условий нанесения пробы и смыва целевых соединений в ТФЭ основан на тех же принципах, что и выбор неподвижной и подвижной фаз в ВЭЖХ, однако логика этого выбора различается. В ВЭЖХ элюент подбирается так, чтобы он обладал средней, умеренной элюирующей силой: он должен элюировать целевые вещества не слишком быстро (чтобы они успели хорошо разделиться), но и не слишком медленно (чтобы не увеличивать время анализа). Напротив, в ТФЭ интерес представляют именно крайние варианты: при нанесении пробы целевые вещества должны полностью поглощаться адсорбентом, а при смыве — резко и полностью десорбироваться.

Комбинацию адсорбента и элюента определенных типов в ВЭЖХ принято называть хроматографическим режимом. Существует пять основных адсорбционных режимов разделения, реализуемых в ТФЭ и АО: обращенно-фазовый, ионный, гидрофильный, нормально-фазовый и с переносом заряда.

Для четырех из них: обращенно-фазового, гидрофильного, нормально-фазового и с переносом заряда — применяемые растворители и их смеси можно расположить в ряд по возрастанию элюирующей силы. Такой ряд растворителей и их смесей называется элюотропным рядом. Каждый из приведенных режимов обладает своим уникальным элюотропным рядом растворителей.

Адсорбент способен поглощать вещества по данному механизму в том случае, когда растворитель пробы и промывочный раствор имеют низкую элюирующую силу по отношению к целевым веществам. Смыв, напротив, проводят растворителем, обладающим в данном режиме высокой элюирующей силой по отношению к веществам, которые необходимо смыть с адсорбента.

1.6.3.2. ТФЭ и АО в нормально-фазовом (НФ) режиме

Нормально-фазовый режим реализуется на полярных адсорбентах (силикагель, окись алюминия, флоризил и т.д.). Элюирующая сила растворителей возрастает с их полярностью. Самой низкой элюирующей силой обладают предельные углеводороды, например, гексан. Наиболее высокой элюирующей силой обладают спирты (особенно метанол) и вода.

Удерживание соединений в нормально-фазовом режиме также определяется полярностью. Чем большим дипольным моментом обладает соединение, тем больше оно удерживается в нормально-фазовом режиме, и тем более полярный растворитель необходимо использовать для его смыва. Например, для смыва слабополярных полихлорированных бифенилов (ПХБ) применяют 5 % раствор дихлорметана в гексане, а для смыва среднеполярных полихлорированных дибензодиоксинов (ПХДД) необходимо применять уже смесь гексан-дихлорметан 1:1.

Как правило, при использовании нормально-фазового режима в ТФЭ проба представляет собой гексановый экстракт полярных целевых соединений (гексан обладает наименьшей элюирующей силой). Промывка гексаном позволяет удалить неполярные контаминанты, как правило, предельные углеводороды. Иногда применяют промывку смесями гексана с более полярным растворителем (полярной добавкой) для удаления слабополярных компонентов матрицы, прежде всего триглицеридов (жиров). Смыв целевых соединений в большинстве случаев проводят полярным летучим растворителем, например, дихлорметаном, диэтиловым эфиром, ацетоном, этилацетатом и т.д.

В случае АО в нормально-фазовом режиме проба, как правило, представляет собой раствор неполярных целевых соединений в полярном органическом растворителе. Целевые соединения полностью проскакивают через слой адсорбента, а полярные компоненты матрицы остаются на адсорбенте. АО в нормально-фазовом режиме позволяет очистить пробу от наиболее полярных примесей: органических кислот, антоцианов, сахаров, гликозидов, полярных природных полимеров и т.д.

1.6.3.3. ТФЭ и АО в обращенно-фазовом (ОФ) и смешанном ОФ/эксклюзионном режимах

Обращенно-фазовый режим, как правило, применяют для ТФЭ различных органических соединений из водных образцов.

ОФ режим реализуется на неполярных адсорбентах: С18–привитых силикагелях, нейтральных полимерных материалах, углеродных

материалах (в порядке увеличения гидрофобности). Чаще всего применяют нейтральные полимерные материалы, затем следуют С18–привитые силикагели, а углеродные материалы применяют лишь эпизодически.

Элюирующая сила растворителей возрастает при уменьшении полярности растворителей. Самой низкой элюирующей силой обладает вода и водно-солевые системы. Высокой элюирующей силой обладают среднеполярные органические растворители: метанол, ацетонитрил, изопропанол, ТГФ, ацетон (в порядке увеличения элюирующей силы). Максимальной элюирующей силой обладают: простые и сложные эфиры (диэтиловый эфир, этилацетат), хлорорганические и предельные углеводороды (дихлорметан, гексан) — которые не смешиваются с водой. Их можно применять для смыва целевых соединений с неполярных адсорбентов в офф-лайн варианте после сушки адсорбционного картриджа.

Как правило, обращенно-фазовый режим в ТФЭ применяют в том случае, когда наносимой пробой является водный образец (например, экологический, биологический) или водный экстракт, а целевые соединения растворимы в воде, но обладают при этом достаточной гидрофобностью для удерживания неполярным адсорбентом.

Допускается наличие в водном образце небольшой доли органического растворителя; в этих случаях, как правило, применяют не С18–привитые силикагели, а значительно более гидрофобные полимерные адсорбционные материалы. В некоторые типы водных образцов, к примеру, в грунтовые воды, могут специально вносить 5–10 % ацетонитрила для уменьшения потерь неполярных целевых соединений вследствие их адсорбции на растворенных в воде природных полимерах — гуминовых кислотах. Небольшие добавки органических растворителей в водные образцы могут быть обусловлены также желанием предотвратить потери сильно гидрофобных соединений вследствие их адсорбции на стенках пластиковых капилляров.

ТФЭ в обращенно-фазовом режиме можно применять даже в случаях неводных образцов. К примеру, если образец представляет собой ацетонитрильный экстракт, перед ТФЭ в ОФ режиме его необходимо разбавить водой или соевым раствором, доведя долю ацетонитрила до 15–20 % или меньше. Чем ниже доля ацетонитрила в водном образце, тем больше удерживание целевых веществ и меньше вероятность их проскока.

При ТФЭ биологических образцов, содержащих остаточные белковые соединения, в образец часто добавляют соли (например,

сульфат натрия, или фосфаты калия). В условиях повышенной ионной силы агрегаты целевых веществ и белков (к примеру, альбуминов) разрушаются, что приводит к увеличению степеней извлечения. Кроме того, неорганическая соль действует в ОФ режиме как высаливающий агент, повышая удерживание целевых соединений.

Значительная практическая выгода применения ТФЭ из биологических и экологических образцов может быть достигнута при комбинировании обращенно-фазового и эксклюзионного режимов. В этом смешанном режиме целевые низкомолекулярные вещества поглощаются адсорбентом, в то время как полимерные компоненты матрицы проскакивают. Адсорбенты, работающие в смешанных адсорбционно-эксклюзионных режимах, называют адсорбентами с ограниченно доступной поверхностью, ОДП (restricted access media, RAM).

Обращенно-фазовый режим используют и в адсорбционной очистке. Как правило, очищают водные или водно-органические пробы, удаляя из них наиболее гидрофобные соединения: липиды, детергенты, неполярные пигменты и т.д. Для АО часто применяют С18 и С8 привитые силикагели, которые по гидрофобности уступают полимерным адсорбентам, соответственно, меньше подходят для ТФЭ и больше — для АО. При необходимости С18 адсорбенты после проведения АО можно регенерировать.

1.6.3.4. ТФЭ и АО в режиме с переносом заряда (ПЗ)

В режиме с переносом заряда удерживанием обладают соединения, имеющие двойные связи, карбонильные группы, ароматические системы. В целом, чем больше сопряжена ненасыщенная система соединения, тем сильнее оно удерживается в ПЗ режиме. Наибольшим удерживанием обладают соединения с сопряженными ароматическими, особенно гетероциклическими, системами и сильными электроноакцепторными заместителями в кольце: карбонильной группой, нитро- и циангруппами.

Удерживание по ПЗ механизму происходит на адсорбентах, содержащих либо ароматические структурные фрагменты, либо ионы (атомы, комплексы) переходных металлов, чаще серебра. Адсорбенты с серебром хорошо удерживают соединения с двойными и тройными связями: олефины, ненасыщенные жирные кислоты, триглицериды. Адсорбенты с ароматическими фрагментами хорошо удерживают ароматические же соединения.

Наибольший вклад ПЗ механизм имеет в неполярных жидких средах. Элюирующая сила растворителей в целом совпадает с их способностью образовывать комплексы с переносом заряда. Наиболее низкой элюирующей силой обладают предельные углеводороды и спирты (гексан, изопропанол). Примеси влаги также почти не влияют на удерживание в ПЗ режиме (в отличие от НФ режима, где примесь влаги резко снижает удерживание полярных соединений). Наиболее высокой элюирующей силой в ПЗ режиме обладают полихлорированные углеводороды (дихлорметан), кетоны (ацетон) и ароматические углеводороды (толуол).

Как правило, при использовании режима с переносом заряда в ТФЭ проба представляет собой гексановый экстракт; допустимы небольшие добавки спиртов (гексан и спирты обладают низкой элюирующей силой). Промывка гексаном или гексаном с небольшой добавкой спиртов позволяет удалить ненасыщенные соединения, в том числе предельные углеводороды, а также (если только речь не идет об адсорбентах с серебром) основную часть триглицеридов. Смыв целевых соединений в большинстве случаев проводят дихлорметаном, ацетоном или их смесями с гексаном.

К примеру, для смыва со сверхсшитого полистирола (ССПС) моно- и биароматических углеводородов и полихлорированных бифенилов (ПХБ) вполне достаточно гексана, то есть растворителя с минимальной элюирующей силой. Для того, чтобы смыть три- и тетрациклические полиароматические углеводороды (ПАУ) и полихлорированные дибензофураны (ПХДФ), необходимо применять 10 %-ный раствор дихлорметана в гексане. Наконец, для смыва пентациклических ПАУ (например, бенз[α]пирена) необходимо применять 20 %-ный раствор дихлорметана в гексане.

Адсорбционная очистка в ПЗ режиме применяется, по всей видимости, достаточно редко. Наиболее известным случаем является адсорбционное удаление из гексановых экстрактов элементной серы и серосодержащих соединений на силикагеле, импрегнированном нитратом серебра.

1.6.3.5. ТФЭ в ионном и смешанном ионном/ОФ режимах

В ионном режиме удерживаются соединения, имеющие (в определенном диапазоне рН среды) положительный или отрицательный электрический заряд, то есть существующие в виде органических ионов. В ТФЭ ионный или смешанный ионный/обращенно-фазовый режимы

применяют для экстракции органических оснований и органических кислот из образцов различных типов.

Удерживание по ионному механизму происходит на адсорбентах, содержащих заряженные функциональные группы — ионитах. Адсорбенты, несущие положительно заряженные группы (четвертичные аммониевые, аминогруппы, пиридиновые группы), имеют положительный заряд и удерживают анионы; такие адсорбенты называют анионитами. Адсорбенты, несущие отрицательно заряженные группы (сульфоновые, карбоксильные группы), имеют отрицательный заряд и удерживают катионы; такие адсорбенты называют катионитами.

Катиониты с сульфоновыми группами и аниониты с аминогруппами и четвертичными аммониевыми группами называют сильными ионитами. Термин «сильный ионит» означает, что заряд ионита, и, следовательно, его емкость, остаются неизменными в широком интервале рН. Иониты, которые обладают емкостью и удерживанием лишь в достаточно узком диапазоне рН рядом с рКа их функциональных групп, называют слабыми. К слабым относятся иониты с карбоксильными и пиридиновыми группами.

В большинстве случаев для ТФЭ применяют сильные иониты. Слабые иониты применяют для экстракции многозарядных соединений; в этом случае склонные к высокому удерживанию целевые соединения могут быть смыты достаточно легко и в мягких условиях.

Таким образом, ионный режим в ТФЭ применяют для извлечения заряженных соединений из водных или водно-органических образцов. Адсорбция сильных органических оснований и кислот максимальна в диапазоне рН образца от 3–4 до 7–8 на сильных ионитах или в диапазоне рН от 5 до 6 на слабых ионитах. Для извлечения слабых оснований необходимо применять сильные катиониты при значениях рН образца 2–4. Для извлечения слабых кислот, по аналогии, применяют сильные аниониты при значениях рН образца 7–8 в случае анионитов на основе силикагеля и 8–11 — анионитов на полимерной основе.

В тех случаях, когда применяемые иониты гидрофобны, удерживание происходит по смешанному ионному/обращенно-фазовому механизму. Достаточно высокой гидрофобностью обладают иониты на полимерной основе, в особенности на основе полистирола; меньшей гидрофобностью обладают силикагели со смешанной ионной-С18 прививкой. Вклад обращенно-фазового механизма характерен для целевых соединений, имеющих крупные углеводородные фрагменты, поскольку их гидрофобность даже в ионизированном состоянии

достаточно высока. В целом, смешанный ионный/обращенно-фазовый механизм ТФЭ применяют для лучшего извлечения слабых кислот и оснований, поскольку одного ионного механизма может оказаться для хорошей адсорбции недостаточно.

Смывают органические кислоты и основания, как правило, смесями полярного органического растворителя (метанол, ацетонитрил) и водного раствора летучей кислоты (муравьиная, уксусная, трифторуксусная, соляная) или летучего основания (аммиак) в соотношении от 50:50 до 95:5. Кислой смесью смывают умеренно сильные и слабые кислоты с любых анионитов (здесь можно уменьшать водную часть до 5 %), а также любые основания со слабых катионитов (здесь соотношение водной и органической частей лучше поддерживать на уровне 50:50).

Применение именно летучих добавок хорошо тем, что позволяет отогнать избыточный растворитель из элюата в токе азота и, таким образом, дополнительно сконцентрировать пробу — правда, это недопустимо для летучих целевых соединений.

Если вклад обращенно-фазового механизма невелик, то есть применяют иониты на основе силикагеля, то смыв кислот можно проводить чистой органической летучей кислотой (например, муравьиной) или концентрированным (10 %) раствором аммиака (в последнем случае вместо сухого остатка получают концентрированную водную пробу).

Соединения, которые являются органическими ионами и которые нельзя перевести в незаряженную форму изменением рН (к примеру, четвертичные аммониевые катионы), смывают водным раствором неорганической соли достаточно высокой концентрации, 1–3 моль/л. В этом случае элюирование основано на принципе ионного обмена — вытеснения избытком другого одноименно заряженного иона.

1.6.4. Адсорбционные материалы для ТФЭ и АО; варианты их применения в различных адсорбционных режимах

1.6.4.1. Органические полимерные адсорбенты: нейтральные и бифункциональные. Углеродные материалы

До конца 90-х годов неорганические адсорбенты, включая привитые адсорбенты на силикагеле, являлись фактически единственными адсорбционными материалами для твердофазной экстракции. В очень

редких случаях в этих целях применялись пористые полистирол-дивинилбензолные (ПС-ДВБ, PS-DVB) смолы типа Amberlite XAD-1-4.

В настоящее время для ТФЭ применяют в основном полимерные адсорбционные материалы. К их неоспоримым преимуществам относятся гидrolитическая стабильность и возможность регенерации (соответственно, многократного использования). Более того, нейтральные (то есть без функциональных групп) полимерные адсорбенты при экстракции из водных образцов в обращено-фазовом режиме обладают на один-два порядка большим удерживанием, чем C18 привитые силикагели. По этой причине C18 силикагели, как правило, применяют не для ТФЭ, а для адсорбционной очистки.

Нейтральные полимерные материалы приобрели большую популярность в ТФЭ в первую очередь как так называемые «универсальные адсорбенты» (generic adsorbents), то есть применяемые для извлечения из водных образцов в обращено-фазовом режиме как можно более широкого спектра соединений различных классов и/или их многократного концентрирования.

Адсорбционные свойства нейтральных полимерных материалов в значительной мере зависят от их структурных и химических характеристик. К структурным можно отнести такие характеристики как распределение пор по размеру и жесткость полимерной сетки. К химическим характеристикам относят гидрофобность и наличие функциональных групп.

Распределение пор по размеру зависит от условий синтеза полимера. По размеру поры можно разделить на транспортные 1000–2000 Å, истинные 60–300 Å (в совокупности истинные и транспортные поры обозначают термином «макропоры») и молекулярные псевдопоры, образованные полимерной сеткой («микропоры») 20–30 Å.

Адсорбент может обладать либо одним видом пор, либо может сочетать разные виды пор. Адсорбенты, обладающие только микропорами, называют микропористыми. Адсорбенты, обладающие, по крайней мере, одним видом макропор, называют макропористыми. Адсорбенты, сочетающие макро- и микропоры, называют бипористыми. Наконец, адсорбенты, обладающие только транспортными порами, иногда называют мегапористыми, и адсорбенты без пор называют непористыми — такие адсорбенты не применяют в ТФЭ, поскольку они обладают слишком низкой емкостью.

Выбор материала с тем или иным распределением пор по размеру определяется спецификой решаемой аналитической задачи. К примеру,

микропористые адсорбенты являются ОДП материалами, поэтому часто применяются для экстракции из образцов, загрязненных полимерными компонентами матрицы.

Жесткостью полимерной сетки определяется совместимость полимерного адсорбента с различными органическими растворителями и водой. Чем жестче сетка, тем лучше он подходит для задач ТФЭ; жесткие полимерные адсорбенты не набухают в термодинамически «хороших» растворителях и не сжимаются в термодинамически «плохих». За жесткость полимерной сетки отвечает параметр, называемый степенью сшивки. Адсорбенты низкой степени сшивки в ТФЭ не применяют; широкое применение нашли полимерные адсорбенты средней (около 50 %), высокой (до 100 %) степени сшивки и сверхсшитые (>100 %) полимеры. Степенью сшивки от средней до высокой обладают большинство адсорбентов для ТФЭ: на основе полистирол-дивинилбензола (ПСДВБ), полистирол-поливинилпирролидона (ПСВП), полиакрилатов; сверхсшитыми являются в основном полистирол-дивинилбензолы.

Интересными материалами для ТФЭ являются активированные угли и сажи. Удельная поверхность этих материалов может варьироваться в широких пределах в зависимости от технологии их изготовления: от 10 м²/г для непористых саж до 1000 м²/г для различных марок активированных углей (в ТФЭ применяют в основном угли с небольшой удельной поверхностью). Сажи, выпускаемые для твердофазной экстракции, подвергают графитизации при высокой температуре для гомогенизации поверхности и удаления остаточных полярных групп. Угли же всегда содержат некоторое количество полярных групп.

Главным недостатком углеродных адсорбентов является затрудненная десорбция (смыв) аналитов, что ограничивает их интенсивное применение. Для более полного и резкого смыва аналитов с такого рода материалов можно применять горячие высококипящие растворители, например, толуол; в этом случае, однако, адсорбент должен быть помещен в небольшую колонку или картридж из стекла (не из полипропилена или иной пластмассы).

Нейтральные полимеры высокой сшивки и углеродные материалы применяют в ТФЭ как для адсорбции летучих веществ из газообразных образцов, так и для экстракции из любых типов жидких образцов. Все типы нейтральных полимерных и углеродных материалов способны эффективно адсорбировать вещества различных групп из водных

и водно-органических жидких сред по обращенно-фазовому механизму. Это их основное применение, именно за эффективную экстракцию в ОФ режиме данные адсорбенты получили всеобщее признание.

Сверхшитые полистиролы (ССПС) и углеродные материалы также хорошо адсорбируют ароматические соединения из гексановых растворов и экстрактов по механизму с переносом заряда.

Для микропористых материалов значительную роль приобретает вклад эксклюзионного механизма. Такие адсорбенты вытесняют не только высокомолекулярные соединения, но и соединения с достаточно крупными молекулами, эффективно адсорбируя только соединения с небольшими молекулами (к примеру, в ПЗ режиме пентациклические ПАУ все еще удерживаются отлично, а каротиноиды уже не удерживаются совсем).

Полимерные адсорбенты для ТФЭ в какой-то мере могут быть загрязнены остаточным катализатором и/или олигомерами. Вообще, это вполне типично для современных материалов, но такую возможность необходимо иметь в виду. Если при разработке процедуры ТФЭ наблюдаются артефакты, которые можно объяснить примесями в адсорбенте, следует или взять другой материал, или предусмотреть специальное кондиционирование. К примеру, до проведения ТФЭ органических оснований можно обработать адсорбент концентрированным аммиаком, перед проведением экстракции ПАУ дополнительно промыть адсорбент дихлорметаном и т.д.

Бифункциональными называются материалы, адсорбционные свойства которых определяются как основой адсорбента, так и введенными в основу функциональными группами. В практике ТФЭ широкое распространение получили полимерные бифункциональные адсорбенты с ионными функциональными группами. Подобные материалы применяются для экстракции ионизируемых соединений в смешанном обращено-фазовом/ионном режиме.

1.6.4.2. Полярные неорганические адсорбенты: силикагель и привитые силикагели, окись алюминия. Импрегнированные адсорбенты

Неорганические полярные адсорбенты: в основном силикагель и окись алюминия, реже привитые amino- и нитрил- силикагели и флоризил — остаются популярными материалами для адсорбционной очистки по нормально-фазовому механизму. Не последнюю роль здесь

играет сравнительная дешевизна этих адсорбентов, что позволяет использовать их однократно.

Часто для ускорения процедуры адсорбционную очистку проводят не динамическим, а статическим методом, добавляя адсорбент в экстракт, а затем отделяя его от экстракта простым декантированием или центрифугированием.

Адсорбционную очистку в НФ режиме проводят из жидких сред с полярностью от низкой до средней. Очищают как экстракты на основе гексана, так и на основе его смесей с органическими растворителями средней полярности: дихлорметаном, диэтиловым эфиром, ацетоном и т.д. Главное требование — в выбранных условиях целевые вещества должны гарантированно проскакивать, или, если очистку проводят в статических условиях, не поглощаться адсорбентом в сколько-нибудь значительных количествах.

При обработке пробы на полярных адсорбентах параллельно происходит ее досушивание, то есть адсорбент поглощает влагу, оставшуюся после сушки пробы над безводным сульфатом натрия. Удаление адсорбентом остаточной влаги — это бесспорная выгода именно для процедуры адсорбционной очистки.

В случае твердофазной экстракции поглощение воды полярным адсорбентом — это недостаток, поскольку свойства адсорбента изменяются прямо при нанесении пробы, что грозит невоспроизводимостью результатов всей процедуры. Таким образом, при проведении ТФЭ в НФ режиме наносимые экстракты необходимо предварительно тщательно досушивать.

Полярные неорганические адсорбенты очень хорошо поглощают влагу из воздуха, поэтому необходимо соблюдать правила их хранения (см. Приложение). Этого бывает вполне достаточно, если в работе используют специализированные адсорбенты, упакованные в герметичные банки, или непосредственно готовые картриджи с адсорбентом.

Если адсорбенты в течение значительного времени хранились в негерметичной таре, то перед применением их необходимо должным образом подготовить (см. Приложение). Ни в коем случае нельзя применять слежавшиеся адсорбенты из «старых» банок.

Несколько особый случай представляет собой окись алюминия. Этот материал обладает большой адсорбционной и даже каталитической активностью. Кроме правильной термообработки и хранения, перед применением окись алюминия необходимо особым

образом кондиционировать (см. Приложение), чтобы обеспечить определенную, не слишком большую величину адсорбционной активности. Некачественная и/или неправильно приготовленная окись алюминия может стать причиной потери аналитов за счет необратимой хемосорбции или каталитического разложения. В то же время, окись алюминия является наиболее полярным адсорбентом, очень хорошо подходящим для фракционирования проб, содержащих слабополярные целевые соединения (которые, как правило, имеют невысокое удерживание в НФ режиме).

Действие флоризила, напротив, мягкое. Этот адсорбент применяют в случае полярных целевых соединений. К примеру, если целевыми являются органические основания, которые способны к хелатированию переходных металлов, примесь которых всегда есть в силикагеле и, особенно, в окиси алюминия.

Большое значение для адсорбционной очистки имеют импрегнированные адсорбенты, которые получают нанесением на исходный полярный адсорбент того или иного реагента. Как правило, основой для импрегнированных адсорбентов служит силикагель. Такие адсорбенты готовят отдельно (см. Приложение), а перед применением переносят в небольшие стеклянные колонки-картриджи. Все импрегнированные полярные адсорбенты применяют в неполярных жидких средах, поскольку добавки полярных растворителей (особенно метанола) могут способствовать смыву реагента с импрегнированного адсорбента.

Наиболее распространенные реагенты для импрегнирования — это неорганические кислоты (серная, фосфорная), щелочи (гидроксид калия) и нитрат серебра.

Силикагель с гидроксидом калия применяют для удаления из неполярных экстрактов кислотных компонентов матрицы, в том числе природных полимерных гуминовых кислот.

Силикагели с нанесенными кислотами обладают менее селективным и более мощным воздействием. Они не только удаляют компоненты матрицы с основными свойствами: эти материалы обладают заметной каталитической активностью и способны разлагать и поглощать вещества различных классов. Наиболее жестким воздействием обладает силикагель с серной кислотой, более мягким — силикагель с фосфорной кислотой. Как правило, выбирают наиболее жесткий вариант очистки из тех, которые способны выдерживать целевые соединения.

Силикагель с нитратом серебра применяют в режиме с переносом заряда для удаления различных ненасыщенных и других сильно поляризуемых соединений, в том числе элементарной серы. В колоночной хроматографии этот адсорбент используют, к примеру, в смешанном НФ/ПЗ режиме для предварительного фракционирования нефтей.

1.6.4.3. Адсорбенты с ограничено доступной поверхностью (ОДП) различных типов

Адсорбенты с ограничено доступной поверхностью, ОДП (restricted access media, RAM) применяются для проведения ТФЭ низкомолекулярных целевых соединений из образцов, загрязненных высокомолекулярными компонентами матрицы. В процессе нанесения пробы высокомолекулярные соединения проскакивают, поскольку не могут проникнуть в поры адсорбента. Остатки контаминантов удаляются на стадии промывки ОДП картриджа.

Таким образом, режим удерживания на ОДП адсорбентах всегда включает эксклюзионный механизм в дополнение к адсорбционному. Адсорбционный механизм может быть любым; тем не менее, в большинстве случаев ОДП материалы применяются в смешанном обращенно-фазовом/эксклюзионном режиме. В этом случае основной целью является удаление из водных образцов белковых соединений (если пробы биологические или пищевые) или гуминовых кислот (если пробы экологические). ТФЭ на ОДП материалах достаточно часто реализуется в он-лайн варианте.

Адсорбенты с ограничено доступной поверхностью могут быть выполнены как на полимерной основе, так и на основе силикагеля.

В случае полимеров наиболее простой способ ограничить доступ высокомолекулярных соединений к порам состоит в применении микропористых адсорбентов. Именно ОДП адсорбенты на полимерной основе наиболее привлекательны для проведения ТФЭ.

К примеру, полностью микропористыми являются определенные марки сверхсшитых полистирольных адсорбентов (ССПС). Кроме ОФ/эксклюзионного режима, микропористые ССПС можно применять и в смешанном ПЗ/эксклюзионном режиме для выделения ароматических соединений из неполярных экстрактов, содержащих как высокомолекулярные мешающие примеси, так и примеси высших предельных углеводородов, детергентов и т.д.

Своеобразным недостатком микропористых ССПС является весьма низкий предел эксклюзив порядка 1000, то есть в поры не проникают не только высокомолекулярные соединения, но и многие низкомолекулярные соединения с достаточно крупными молекулами. Так, при использовании данных адсорбентов могут возникнуть определенные трудности, к примеру, при экстракции гликозидов.

Материалы с ограниченно доступной поверхностью существуют и на основе силикагеля, в том числе с С18 прививкой для применения в ОФ/эксклюзионном режиме. От традиционных С18 силикагелей они отличаются дополнительной прививкой какого-либо гидрофильного полимера, в наиболее распространенном варианте полиэтиленгликоля (ПЭГ), ограничивающего доступ высокомолекулярных соединений к порам адсорбента.

1.6.4.4. Высокоселективные аффинные и импринтные адсорбенты

К наиболее селективным материалам для ТФЭ можно отнести аффинные (affinity SPE) и импринтные (molecular imprinted SPE, MISPE) адсорбенты.

Принцип действия аффинных адсорбентов основан на селективном биокомплементарном взаимодействии привитого на адсорбенте лиганда с целевым соединением. Термин «биокомплементарность» означает то, что участниками взаимодействия являются антитело и антиген, чем и обусловлена его высокая специфичность.

Антитела являются белками, которые вырабатываются иммунной системой млекопитающих для связывания чужеродных соединений (антигенов). Другими словами, ТФЭ моделирует иммунное связывание: антигеном является целевое соединение, а антителом — привитый на полимерную или силикагельную основу лиганд, как правило, соответствующий белок из класса иммуноглобулинов G (IgG). Таким методом в рамках академических исследований были получены антитела для селективного концентрирования антибиотиков, гормонов, пестицидов и ароматических углеводородов.

Недостатком аффинных адсорбентов для ТФЭ является возможность потери их специфичной адсорбционной активности в водно-органических смесях со значительной долей органического растворителя.

Принцип действия импринтных полимерных адсорбентов, по сути, ничем не отличается от такового для «обычных» адсорбентов;

повышенное удерживание целевых соединений обусловлено наличием специфичных микропор, форма которых наиболее оптимально соответствует форме молекулы целевого соединения.

Импринтные адсорбенты получают сополимеризацией полярных мономеров типа акриламида, метилакрилата, винилпиридина со значительным количеством сшивающего агента (чаще всего этиленгликольдиметакрилата) в присутствии либо самого целевого анализа (формообразователя), либо аналогичного по структуре соединения. После синтеза адсорбент от формообразователя отмывают.

Весьма интересным с аналитической точки зрения свойством импринтных (в меньшей мере аффинных) адсорбционных материалов является повышенная селективность не только к конкретному целевому соединению, но и ко всему классу структурно подобных соединений; это свойство называют кросс-реактивностью (cross-reactivity).

В данный момент круг коммерчески доступных импринтных и аффинных ТФЭ материалов ограничен, но с течением времени ситуация может измениться. Так, в настоящее время аффинные адсорбенты широко применяются для пробоподготовки при анализе афлатоксинов.

1.6.5. Разработка процедуры ТФЭ

Разработку процедуры ТФЭ начинают с поиска решений ряда частных задач ТФЭ, которые затем объединяют в одну процедуру и тестируют как единое целое.

1. Главная задача в ТФЭ — избежать потерь целевых соединений, как на стадии нанесения пробы ...

2. ... так и на стадии смыва веществ с адсорбента.

3. Третья задача — создать возможность для нанесения как можно большего объема пробы, чтобы получить большую степень концентрирования.

4. Четвертая задача — обеспечить параллельно сконцентрированием возможность очистки пробы от компонентов матрицы.

5. Наконец, пятая задача — оптимизировать состав элюента таким образом, чтобы он не только хорошо смывал целевые вещества, но также подходил для следующего шага аналитической процедуры без проведения каких-либо дополнительных манипуляций (таким шагом

может быть непосредственно инжектирование смыва в хроматограф — то есть элюат может быть конечной пробой).

Для решения каждой из этих задач необходимо провести ряд тестов: с адсорбентом, модельными растворами и реальными образцами.

Итак, как разработать надежную процедуру ТФЭ, в которой целевые соединения гарантированно бы не терялись на стадии нанесения пробы? Потеря целевого вещества происходит тогда, когда заметное его количество проскакивает через адсорбент и появляется в элюате. «Заметным количеством» считают концентрацию целевого соединения в элюате равной 10 % от его концентрации в пропускаемой пробе. Эту ситуацию называют проскоком. Объем пробы, который удается пропустить через картридж до момента проскока, называют объемом проскока.

Объем проскока зависит от множества факторов: адсорбента, размера картриджа, скорости потока, растворителя пробы, а также индивидуального состава каждой конкретной пробы.

Эксперименты по нанесению пробы начинают с ряда испытаний на модельных образцах, а завершают, как правило, на нескольких типичных реальных пробах. В результате получают некоторый диапазон объемов проскока. Далее, закладывают в методику некоторый запас прочности, деля минимальный объем проскока на два — это и будет рекомендуемый объем наносимой пробы.

Работать начинают с растворами целевого соединения в чистом растворителе, моделирующем пробу. Например, если собираются экстрагировать водные образцы, то готовят модельный образец в воде. Если целевое соединение гидрофобное, то в воду дозируют очень малую аликвоту раствора целевого соединения в ацетонитриле или спирте.

Далее переходят к работе с более сложными модельными пробами. В раствор целевого соединения добавляют какие-либо характерные компоненты матрицы или моделирующие их соединения. Можно сделать несколько растворов с различной концентрацией моделирующих матрицу веществ. Варьировать при этом концентрацию целевого соединения не имеет никакого смысла: его концентрация в пробе на порядки меньше, чем компонентов матрицы, то есть целевое соединение не «нагружает» адсорбент.

Эксперименты с измерением объемов проскока на модельных растворах и реальных пробах проводят следующим образом: с некоторой скоростью их пропускают через картридж, измеряя при

этом концентрацию целевого соединения в элюате. Фактически, этот эксперимент является фронтальным хроматографированием, когда пробу непрерывно подают в колонку. Сигнал вещества выглядит как S-образная ступень, которую в данном случае называют кривой проскока (breakthrough curve). Объем пропущенной пробы, соответствующий одной десятой высоты этой ступени, и есть объем проскока.

Для картриджей со значительной хроматографической эффективностью, которые меньше размывают хроматографическую зону, подъем S-образной ступени более крутой, что соответствует более узкому пику в обычной хроматографии. У менее эффективного картриджа подъем пологий. Таким образом, к моменту формального проскока на менее эффективном картридже теряют по факту больше целевого соединения, чем на более эффективном.

Кривые проскока получают двумя основными способами. Один способ универсальный, но менее удобный: элюат разбивают на фракции, а целевое вещество определяют в каждой фракции любым подходящим методом.

Второй способ состоит в применении изократического ВЭЖХ хроматографа с подходящим детектором, который откликается на целевое соединение, но не реагирует на модельные или реальные компоненты матрицы. В этом случае ТФЭ картридж устанавливают вместо аналитической колонки, а модельный раствор помещают в емкость для подвижной фазы. Как правило, это способ применяют для работы с растворами целевого вещества в чистых растворителях. Например, он очень удобен для проведения предварительных экспериментов по сравнению нескольких картриджей с различными марками адсорбентов для того или иного приложения.

Сначала получают кривые проскока для модельного раствора без компонентов матрицы, а затем для растворов с матрицей — в порядке увеличения концентрации внесенных компонентов. При увеличении концентрации компонентов матрицы, «нагружающих» картридж, объем проскока будет уменьшаться, а форма S-образной ступени будет становиться более полой. Этот эффект хорошо известен в препаративной ВЭЖХ: по причине уменьшающейся емкости адсорбента при увеличении общей нагрузки на колонку времена удерживания веществ уменьшаются (что соответствует уменьшению объема проскока), а сами пики уширяются (что соответствует меньшему наклону кривой проскока).

Следующая, вторая задача состоит в том, чтобы найти условия ТФЭ, в которых целевые соединения не теряются при смыве целевых веществ. Здесь лучшие результаты — за он-лайн ТФЭ; в этом варианте ТФЭ весь элюат поступает непосредственно в аналитическую колонку хроматографа.

В случае офф-лайн ТФЭ для проверки потерь при смыве получают кривую проскока «наоборот», то есть кривую смыва целевых соединений с адсорбционного картриджа. Она выглядит как кривая проскока, зеркально отраженная относительно вертикальной оси. Положительный момент здесь состоит в том, что необходимый объем элюента для смыва мало зависит от свойств нанесенной пробы. Соответственно, достаточно провести всего один эксперимент по смыву, варьируя различные составы элюента для смыва.

Для достижения максимальной полноты смыва может потребоваться достаточно большой объем элюента, с которым будет трудно работать; к тому же, проба окажется более разбавленной. Поэтому существует некоторый оптимум между потерями целевых соединений при смыве и объемом элюата. Если анализ проводят с применением внутренних стандартов-суррогатов, то имеет смысл пренебречь некоторыми потерями и выбрать вариант с меньшим объемом элюата.

Самый простой путь для решения третьей задачи — увеличения объема проскока — состоит в применении картриджей с большим количеством адсорбента. При таком подходе объем элюента увеличивается пропорционально. При работе с водными образцами можно, как в случае ЖЭ, применять высаливание, то есть добавлять в пробу неорганическую соль. В некоторых случаях имеет смысл снижать скорость пропускания образца.

Четвертая задача — очистка в дополнение к концентрированию — решается, как правило, выбором селективных условий промывки картриджа перед элюированием целевых соединений. Здесь надо действовать достаточно аккуратно, чтобы избежать потерь целевых соединений. Тонкая настройка условий промывки способна улучшить качество пробы в том случае, когда удержание основных компонентов матрицы в выбранном режиме уступает по величине удерживанию целевых соединений. Более удерживаемые компоненты матрицы, не элюирующиеся вместе с целевыми соединениями на стадии смыва, удаляют с картриджа уже на стадии регенерации.

1.7. Высокоэффективные хроматографические методы подготовки пробы

1.7.1. Колоночная ЖХ низкого давления

Нередко бывает нужно не просто очистить пробу, а дополнительно ее фракционировать, то есть разделить целевые соединения на несколько групп. Такая необходимость может быть вызвана рядом причин. Например, если одновременное определение всех целевых соединений выбранным аналитическим методом невозможно, то можно сначала разделить их на фракции, и затем каждую фракцию проанализировать отдельно.

Для целей узкого фракционирования ТФЭ не оптимален с точки зрения эффективности разделения — здесь требуется хроматографический метод.

Для предварительного фракционирования больших объемов проб применяют, как правило, сравнительно недорогой метод колоночной жидкостной хроматографии низкого давления. Называется так этот способ потому, что для создания потока элюента здесь необходимо самое минимальное давление, которое могут обеспечить: собственный вес растворителя, сжатый воздух (применяют чаще всего), небольшой вакуум на выходе (применяют реже всего).

Для ЖХ низкого давления применяют крупнозернистые адсорбенты со средним размером частиц порядка 70–150 мкм, которые имеют низкое гидродинамическое сопротивление. Колонки, как правило, бывают выполнены из стекла; их типичный диаметр — два-три сантиметра. Короткие одноразовые «колонки» можно изготовить собственноручно из нарезанных по 5–10 см стеклянных пипеток или из стеклянных шприцев, вытянув у них на стеклодуве носик.

Роль длины колонки играет высота слоя адсорбента, которая может варьироваться от нескольких сантиметров до 10–15 см. Адсорбент переносят в колонку, как правило, сухим; суспензионный способ заполнения применяют очень редко.

Выбор способа нанесения пробы зависит от конфигурации колонки. Небольшой объем пробы наносят в жидком виде. Значительный объем пробы наносить в жидком виде неудобно и неэффективно. Поэтому поступают следующим образом. Вначале отдельно смешивают жидкую пробу с адсорбентом, затем полученный адсорбент с сухим остатком пробы, влажный или специально

высушенный под вакуумом, переносят в колонку, равномерно распределяя его поверх слоя адсорбента. Этот способ очевидно неприменим, если целевые соединения летучи.

1.7.2. Эксклюзионная ВЭЖХ

Среди видов высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) для нужд пробоподготовки чаще всего применяют не адсорбционную хроматографию, а эксклюзионную. Этот подход становится потенциально интересным, когда группы целевых соединений различаются по величине молекулы; соответственно, их можно разделить на подходящей эксклюзионной высокоэффективной колонке. Если одновременно таким способом из пробы также удаляются и высокомолекулярные загрязняющие компоненты матрицы, то применение эксклюзионной ВЭЖХ в целях подготовки пробы становится особенно заманчивым.

По полярности применяемых подвижных фаз эксклюзионные колонки подразделяют на «водные» (SEC) и «неводные» (GPC). На «водных» колонках работают с гидрофильными образцами, к примеру, водорастворимыми белками. Такие колонки изготавливают либо из гидрофильных полимеров (ПВА, гидроксиметакрилат), либо получают химическим модифицированием силикагеля полярными веществами, к примеру, полиспиртами.

На «неводных» колонках работают с любыми образцами, растворимыми в полярных органических растворителях, как правило, ТГФ или дихлорметане. Такие колонки изготавливают либо из силикагеля, либо из гидрофобных полимеров, к примеру, нейтрального полистирол-дивинилбензола высокой степени сшивки.

В аналитической ВЭЖХ эксклюзионный режим в основном применяют для определения ММР (молекулярно-массового распределения) полимеров. Для этой цели необходимо применять условия хроматографирования, при которых все адсорбционные механизмы полностью подавлены, то есть работает только эксклюзионный механизм.

Для целей же подготовки пробы адсорбционные механизмы совсем не обязательно следует подавлять. Более того, часто смешанные эксклюзионно-адсорбционные режимы используют вполне сознательно. Например, по эксклюзионному механизму отделяют полимерные контаминанты от полимерных целевых и от мономерных целевых

соединений, а по адсорбционному механизму — дополнительно разделят мономерные целевые соединения на фракции.

Следует отметить, что у высокоэффективной эксклюзионной хроматографии есть более дешевый и простой по исполнению конкурентный метод селективной фильтрации.

Эксклюзионно-адсорбционную ВЭЖХ применяют при подготовке пробы лишь в самых тяжелых и непростых случаях. К примеру, существует ряд специальных эксклюзионных ВЭЖХ фаз для очистки неполярных экстрактов жирных матриц, содержащих различные группы полихлорированных стойких органических загрязнителей (СОЗ). На микропористых полистирольных неподвижных фазах триглицериды отделяют от целевых соединений, обладающих небольшими компактными молекулами, по эксклюзионному механизму, а группы СОЗ фракционируют на той же колонке, но уже в адсорбционном ПЗ режиме.

1.7.3. Двумерная ВЭЖХ и ВЭЖХ-ГХ

Двумерной ВЭЖХ называют ВЭЖХ систему с двумя высокоэффективными колонками, соединенными через переключающий кран высокого давления, причем селективность этих колонок не должна совпадать. В предельном случае две колонки могут работать в различных хроматографических режимах.

Первую колонку применяют для высокоэффективной очистки и/или фракционирования пробы, а вторая колонка является аналитической. С первой колонки на вторую путем переключения крана переносят достаточно узкую фракцию элюата с целевыми веществами; таким образом, на первой колонке происходит предварительное разделение, а на второй — аналитическое разделение. Такой подход называется «heart-cut method» (метод вырезания сердцевин), что на русский язык часто переводят как «метод «хроматографической лупы».

Обе колонки, для фракционирования и аналитическая, могут различаться селективностью, но при этом работать в рамках одного ВЭЖХ режима и даже на одной и той же подвижной фазе. К примеру, если речь идет об обращено-фазовом режиме, то одна колонка может быть С18 фазой, а другая — С16-амидной фазой, пиренильной фазой и т.д.

Второй и более эффективный вариант состоит в том, что колонки работают в двух различных режимах. Для этого хроматограф, помимо дополнительного переключающего крана, должен иметь, по крайней мере, два насоса высокого давления для отдельной подачи двух различных подвижных фаз (ПФ). ПФ из первой колонки должна обладать низкой элюирующей силой по отношению к ПФ для второй аналитической колонки, а также должна смешиваться с ней — иначе все пики аналитического разделения будут сильно уширены и асимметричны.

По этой же причине, в качестве фракционирующей ставят колонку со значительно меньшим диаметром (например, диаметр колонки 2 мм для фракционирующей колонки и 4.6 мм — для аналитической колонки). Такой подход позволяет значительно снизить объем фракции, инжектируемой в аналитическую колонку (при соотношении 2 мм к 4.6 мм — в пять раз).

Количество приемлемых с этой точки зрения комбинаций ВЭЖХ режимов для реализации двумерной ВЭЖХ ограничено. Вот основные часто применяемые комбинации (первый режим указывается для первой фракционирующей колонки, второй — для аналитической колонки):

- эксклюзионный режим на водной ПФ — обращено-фазовый режим;
- эксклюзионный режим на водной ПФ — ионный режим;
- ионный режим — обращено-фазовый режим;
- обращено-фазовый режим — ионный режим;
- обращено-фазовый режим — гидрофильный режим;
- режим с переносом заряда — нормально-фазовый режим.

ВЭЖХ также может применяться в качестве метода подготовки пробы для анализа методом ГХ. В этом случае ВЭЖХ соединяют через кран-переключатель с РТV-инжектором газового хроматографа. В ГХ переносят достаточно узкую фракцию с целевыми веществами. Применяемая в ВЭЖХ подвижная фаза должна быть по возможности как можно более летучей. Таким образом, последующий анализ газовой хроматографией несовместим с предварительным ВЭЖХ фракционированием в обращено-фазовом, «водном» эксклюзионном и ионном режимах, но может применяться совместно с ВЭЖХ фракционированием в «неводном» эксклюзионном, нормально-фазовом режимах и с режимом с переносом заряда.

1.8. Ультрафильтрационные методы подготовки пробы

Ультрафильтрацию применяют для разделения соединений, значительно различающихся молекулярной массой. В частности, этот метод нашел широкое применение для выделения низкомолекулярных соединений и/или коротких пептидов из биологических образцов, загрязненных белками. Однако область возможного применения этого метода далеко выходит за рамки очистки биологических проб от белковой контаминации.

Например, ультрафильтрацию можно применять как самостоятельный метод для извлечения любых высокомолекулярных целевых соединений (ВМС) из комплексных проб. Таким образом, белки могут быть очищены от любых низкомолекулярных соединений: буферных солей, детергентов и т.д. — а также сконцентрированы в один шаг — просто, быстро и очень экономно в плане расхода реагентов.

Ультрафильтрация основана на применении полимерных фильтров с определенным диаметром пор; в фильтрат попадают все соединения с молекулярной массой менее определенной. На практике широко променяют фильтры, пропускающие соединения с молекулярной массой менее 3, 10, 30 и 100 кДа. Наличие широкого ассортимента фильтров с различным диаметром пор в пределе означает возможность не только очищать и концентрировать образцы ВМС, но и фракционировать их, то есть выполнять задачи, традиционно относящиеся к эксклюзионной хроматографии. Кроме того, ультрафильтрация и эксклюзионная ЖХ могут применяться совместно: эксклюзионной хроматографией можно фракционировать ВМС, а ультрафильтрацией — концентрировать их из собранных фракций, попутно очищая от буферных солей и прочих компонентов подвижной фазы.

1.9. Методы, основанные на химической дериватизации

Химической дериватизацией называют реакцию целевого соединения со специальным реагентом, в результате чего целевое соединение превращается в свое производное, обладающее тем или иным новым свойством, необходимым для его специфичного и чувствительного определения подходящим инструментальным методом или для проведения более эффективной пробоподготовки.

Примерами свойств, необходимыми для определения целевого соединения подходящим инструментальным методом, могут служить:

- поглощение излучения в УФ диапазоне (для ВЭЖХ/УФ определений);
- флуоресценция в УФ диапазоне (для ВЭЖХ/ФЛД определений);
- восприимчивость к тому или иному методу ионизации (для ВЭЖХ/МС и ГХ/МС определений);
- летучесть (для ГХ определений);
- увеличение гидрофобности (для обращено-фазовых ВЭЖХ определений).

Это далеко не полный список всех возможных приложений химической дериватизации. Специально подобранные реакции могут применяться для изменения структуры целевых соединений с целью изменения их адсорбционных свойств при проведении ВЭЖХ и ТФЭ, для подавления нежелательных реакций целевых соединений с компонентами матрицы, для повышения химической стабильности целевых соединений и т.д.

Таким образом, химическая дериватизация в офф-лайн режиме является отдельной задачей подготовки пробы наравне с концентрированием, очисткой и переводом пробы в другой растворитель.

Более того, химическая дериватизация может эффективно сочетаться с другими задачами пробоподготовки в различных вариантах. В самом простом случае целью различных манипуляций с пробой может являться совместимость пробы не столько с инструментальным методом, сколько с реакцией дериватизации, т.е. именно химическая дериватизация в подобных случаях становится центральным элементом пробоподготовки.

Кроме того, химическую дериватизацию можно объединять с другими стадиями пробоподготовки: жидкостной экстракцией (дериватизирующий реагент добавляют в экстрагент), твердофазной экстракцией (дериватизирующий реагент наносят на адсорбционный картридж), ультрафильтрацией (фильтр сушат и помещают в раствор дериватизирующего реагента) и т.д.

Глава 2. Примеры разработки комплексных процедур подготовки пробы

- 2.1. Представление алгоритма пробоподготовки в виде блок-схемы. Две схемы типовых подходов к пробоподготовке для случаев водных и безводных матриц
- 2.2. Извлечение неполярных целевых соединений из водных сред на примере определения различных групп стойких органических загрязнителей: ПХБ, ПХТ, ПХДД, ПХДФ, ПАУ, ХОП — в сточных водах методом ЖЭ-АО-ГХ/МС
- 2.3. Извлечение неполярных целевых соединений из водных сред на примере определения пестицидов групп ХОП, ФОС и триазинов в растительных матрицах методом ЖЭ-ТФЭ-АО-ГХ/МС/ДЭЗ
- 2.4. Извлечение полярных целевых соединений из полярных сред на примере определения патулина в соках методом ТФЭ-ВЭЖХ/УФ
- 2.5. Извлечение неполярных целевых соединений из неводных сред на примере определения ПАУ в жиросодержащих продуктах и копильных препаратах методами ЖЭ-ТФЭ-ВЭЖХ/ФЛД и АО-ТФЭ-ГХ/МС
- 2.6. Извлечение полярных целевых соединений из неводных сред на примере определения производных фурфурола в минеральных маслах методами ЖЭ-АО-ВЭЖХ/УФ и ТФЭ-ВЭЖХ/УФ

2.1. Представление алгоритма пробоподготовки в виде блок-схемы. Две схемы типовых подходов к пробоподготовке для случаев водных и безводных матриц

Алгоритмом подготовки пробы (sample preparation workflow) называют полную последовательность операций проведения пробоподготовки с указанием всех ее стадий и, нередко, вместе с их кратким описанием, включая перечисление всех возможных аналитических подходов для каждой из стадий.

Существует два общепринятых представления алгоритма подготовки пробы. С одной стороны, это может быть текстовое представление. Оно плохо тем, что оно не обладает наглядностью, особенно если пробоподготовка сложная и состоит из многих стадий. Чтобы увидеть за текстом определяющую идею, необходимо долго в него вчитываться, что само по себе не очень удобно и занимает немало времени.

Наилучшим представлением алгоритма подготовки пробы является блок-схема. В блок-схеме каждому действию соответствует краткое описание, помещенное в прямоугольную рамку (блок). Блоки соединяются стрелками в последовательности, соответствующей очередности выполнения действий.

Если на определенном этапе подготовки пробы предусмотрен выбор одного из нескольких возможных вариантов действий, такую «развилку» в блок-схеме обозначают блоком с рамкой в виде ромба. Из такого блока выходят несколько стрелок по числу предусмотренных возможностей. Описание блока-ромба должно содержать все условия, необходимые для принятия аналитиком решения — по какому из предложенных путей двигаться дальше.

Бесспорно, для составления блок-схем требуется определенный навык. Сначала может показаться непростой задачей выразить идеи и действия не словами, а нарисованными блок-схемами — в конце концов, не все аналитики обладают мышлением программистов. Но

иного пути удачно зафиксировать последовательность действий с пробой в методике просто нет.

Автор неоднократно сталкивался с аналитиками, которые готовили отличные пробы, но при этом понятия не имели, как им удастся этого достичь. Вопрос «как выглядит блок-схема данной процедуры обработки пробы?» ставил их в тупик. Примерный ответ выглядел как «а мы никогда над этим не задумывались», или вообще «блок-схему нашего подхода нарисовать в принципе невозможно».

К сожалению, такой подход допустим в рамках одной лаборатории, но его никак нельзя перенести на бумагу. Только освоив язык блок-схем, можно уверенно читать, изменять и разрабатывать аналитические методики.

Ниже в качестве примера приведены две блок-схемы, описывающие ряд типовых подходов в подготовке пробы для случаев условно водных и безводных матриц. Задача этих схем состоит в иллюстрации принципов, по которым различные технические методы пробоподготовки комбинируются друг с другом для достижения тех или иных аналитических целей: извлечения из матрицы, очистки, концентрирования, перевода в подходящий растворитель.

Вместо обсуждения алгоритмов пробоподготовки на абстрактных примерах читателю предлагается рассмотреть несколько конкретных методик пробоподготовки, при разработке которых применялись типовые подходы, отраженные в приведенных схемах.

Полярные матрицы

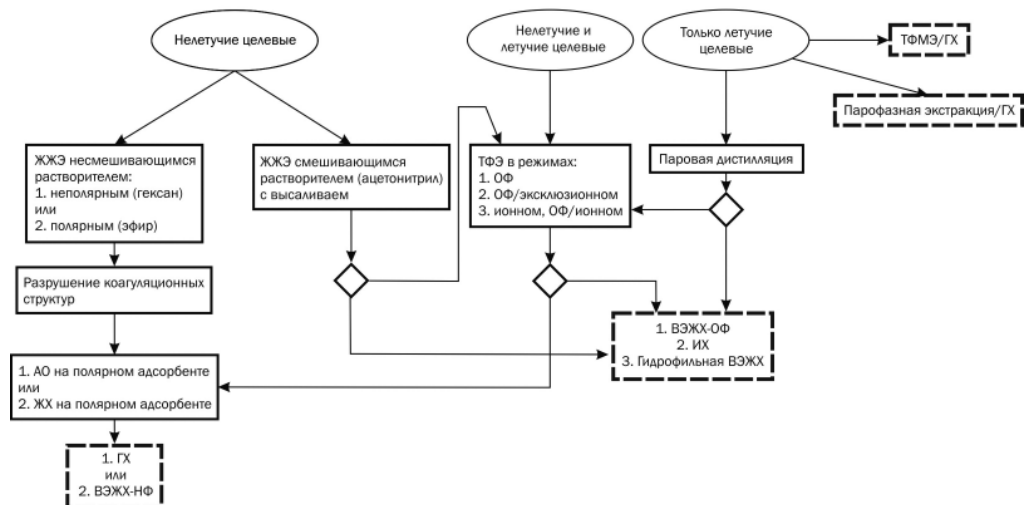


Рисунок 1. Блок-схема выделения целевых соединений из водных матриц.

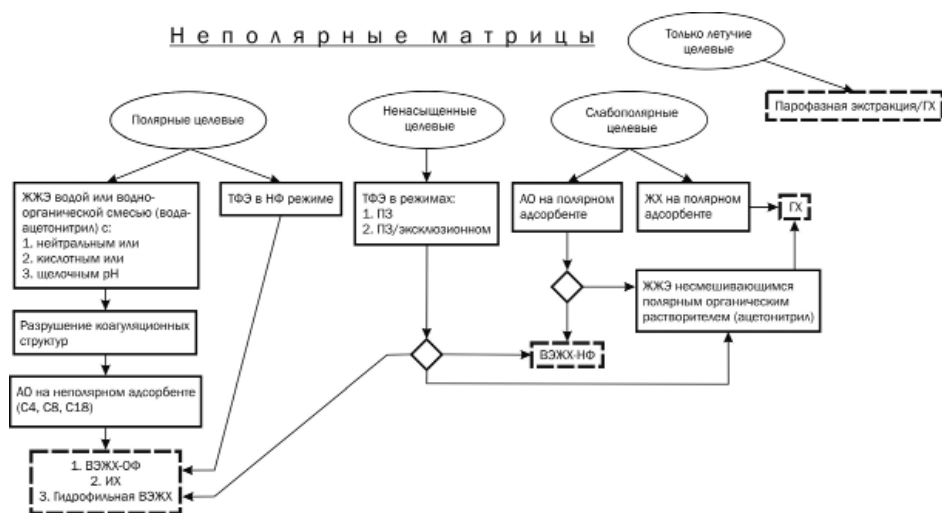


Рисунок 2. Блок-схема выделения целевых соединений из неводных матриц.

2.2. Извлечение неполярных целевых соединений из водных сред на примере определения различных групп стойких органических загрязнителей: ПХБ, ПХТ, ПХДД, ПХДФ, ПАУ, ХОП — в сточных водах методом ЖЭ-АО-ГХ/МС

Сточные воды, безусловно, являются очень сложным и неприятным объектом в плане их химического анализа. Состав сточных вод может быть различным, более того — непостоянным.

Сточные воды могут быть загрязнены органическими веществами природного и искусственного происхождения: гуминовыми кислотами, детергентами, жирами, горюче-смазочными материалами, мономерными и полимерными продуктами химической промышленности. В пределе, образцы сточной воды могут быть неомогенными, то есть представлять собой эмульсии, или вообще состоять из двух отдельных несмешивающихся фаз.

Экстрагирование неполярных целевых веществ из подобных матриц неминуемо приводит к получению очень грязных проб. Таким образом, требуется проводить их интенсивную очистку, в особенности, если целевые соединения необходимо определять на низком уровне концентраций и/или с применением недостаточно специфичного инструментального метода.

Типовой подход для данного случая основан на ЖЖЭ водного образца неполярным растворителем с последующим разрушением коагуляционных структур и адсорбционной очисткой на импрегнированных адсорбентах в НФ и ПЗ режимах. В подробностях эта схема была рассмотрена в работе А.Ю. Михеевой «Определение СОЗ в объектах окружающей среды: унификация алгоритма пробоподготовки для ГХ-МС анализа»; все данные для иллюстрации подхода взяты из этой книги с разрешения автора.

П о л я р н ы е м а т р и ц ы

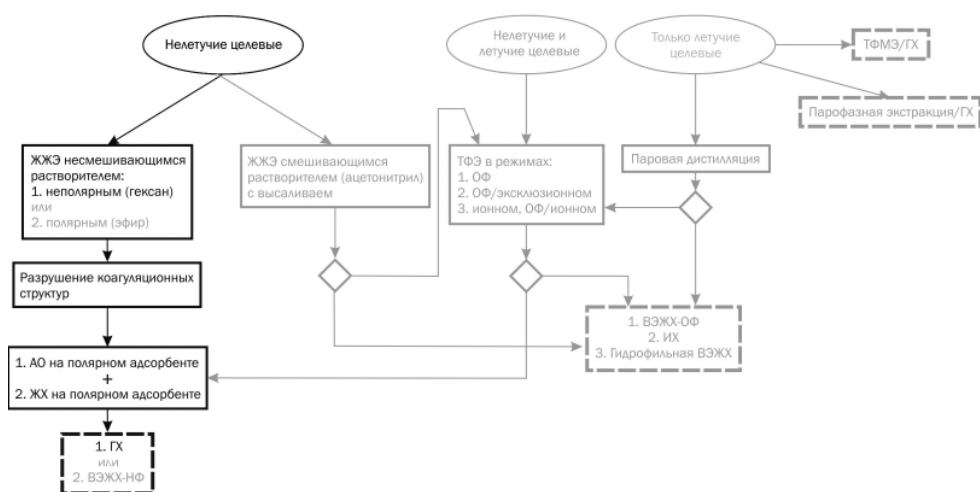


Рисунок 3. Блок-схема, иллюстрирующая примененный подход к подготовке пробы.

Перед автором стояла задача унифицировать процедуру подготовки пробы для определения целого ряда стойких органических загрязнителей (ПХДД, ПХДФ, ПХБ, ПХТ, ХОП, ПАУ, фталатов), взяв за основу стандартную пробоподготовку для определения в сточных водах только ПХБ. Возможность подобной унификации подсказывала схожесть физико-химических свойств целевых соединений. Все приведенные соединения являются либо неполярными, либо слабополярными; они нелетучи, не имеют ионизируемых функциональных групп, в достаточной мере устойчивы к разложению, в большинстве имеют ароматические структурные фрагменты и/или содержат хлор.

Ключевым элементом подготовки пробы на ПХБ, взятой за основу, является адсорбционная очистка гексанового экстракта на стеклянной колонке (картридже), заполненной тремя слоями силикагеля различного

типа: импрегнированного кислотой, щелочью и нитратом серебра; вместо силикагеля с нитратом серебра допускается использование активной меди.

В оригинальной методике применяют силикагель, импрегнированный серной кислотой. Это допустимо для ПХБ, но недопустимо для многих других СОЗ, которые под воздействием серной кислоты претерпевают различные химические превращения. Более мягким вариантом воздействия является применение силикагеля, импрегнированного фосфорной кислотой.

В том случае, когда пробы сильно загрязнены компонентами горючесмазочных материалов, проводят дополнительную очистку экстракта (точнее, упаренного элюата) на стеклянном картридже с щелочной окисью алюминия. Поскольку окись алюминия также обладает высокой каталитической активностью, следует внимательно относиться к выбору подходящей марки адсорбента и процедуре его предварительно кондиционирования — некоторые целевые соединения могут теряться в процессе такой очистки.

Данную процедуру можно проводить как в варианте АО, так и в варианте ЖХ, выборочно выделяя фракции групп целевых соединений. В варианте АО выделяют единую фракцию со всеми группами целевых соединений.

Очистка на окиси алюминия соответствует нормально-фазовому режиму, то есть отделение целевых соединений от высших углеводородов происходит за счет разницы в полярности. Предельные углеводороды неполярны, и элюируются в первых фракциях при промывке картриджа гексаном. Слабополярные целевые соединения в большей или меньшей мере удерживаются адсорбентом, и могут быть вымыты смесями гексана с дихлорметаном. Полиароматические углеводороды хорошо удерживаются за счет образования индуцированных дипольных моментов, поскольку обладают мощной ароматической системой.

Если с проблемой потерь некоторых целевых соединений на окиси алюминия справиться не получается — вместо окиси алюминия пробуют применить очистку на сверхсшитом полистироле (ССПС). В оригинальной методике этому подходу соответствует очистка на активированном угле; однако, ССПС очевидно более удобен в применении по причине более мягких условий десорбции. Удерживание на ССПС в неполярной среде происходит по ПЗ механизму. С помощью этого подхода от предельных углеводородов можно отделить только соединения, обладающие ароматической системой. Таким образом,

ПХДД/ПХДФ

ПХБ

ПХТ

ПАУ: аценафтилен, аценафтен, флуорен, фенантрен, антрацен, флуорантен, пирен, бензо(а)антрацен, хризен, бензо(б)флуорантен, бензо(к)флуорантен, бензо(а)пирен, дибензо(а,н)антрацен, бензо(г,н,и)перилен, индено(1,2,3-с,д)пирен

ХОП: гексахлорбензол (ГХБ), α,β,γ,δ-изомеры гексахлорциклогексана (ГХЦГ), альдрин, диелдрин, изодрин, гептахлор, транс-хлордан, цис-хлордан, оксихлордан, транс-гептахлорэпоксид, цис-гептахлорэпоксид, α-эндосульфан, метоксихлор, мирекс, о,п'-ДДЕ, п,п'-ДДЕ, о,п'-ДДД, п,п'-ДДД, о,п'-ДДТ, п,п'-ДДТ

Фталаты: диметилфталат, диэтилфталат, ди(н-бутил)фталат, бензилбутилфталат, ди(2-этилгексил)фталат, диоктилфталат

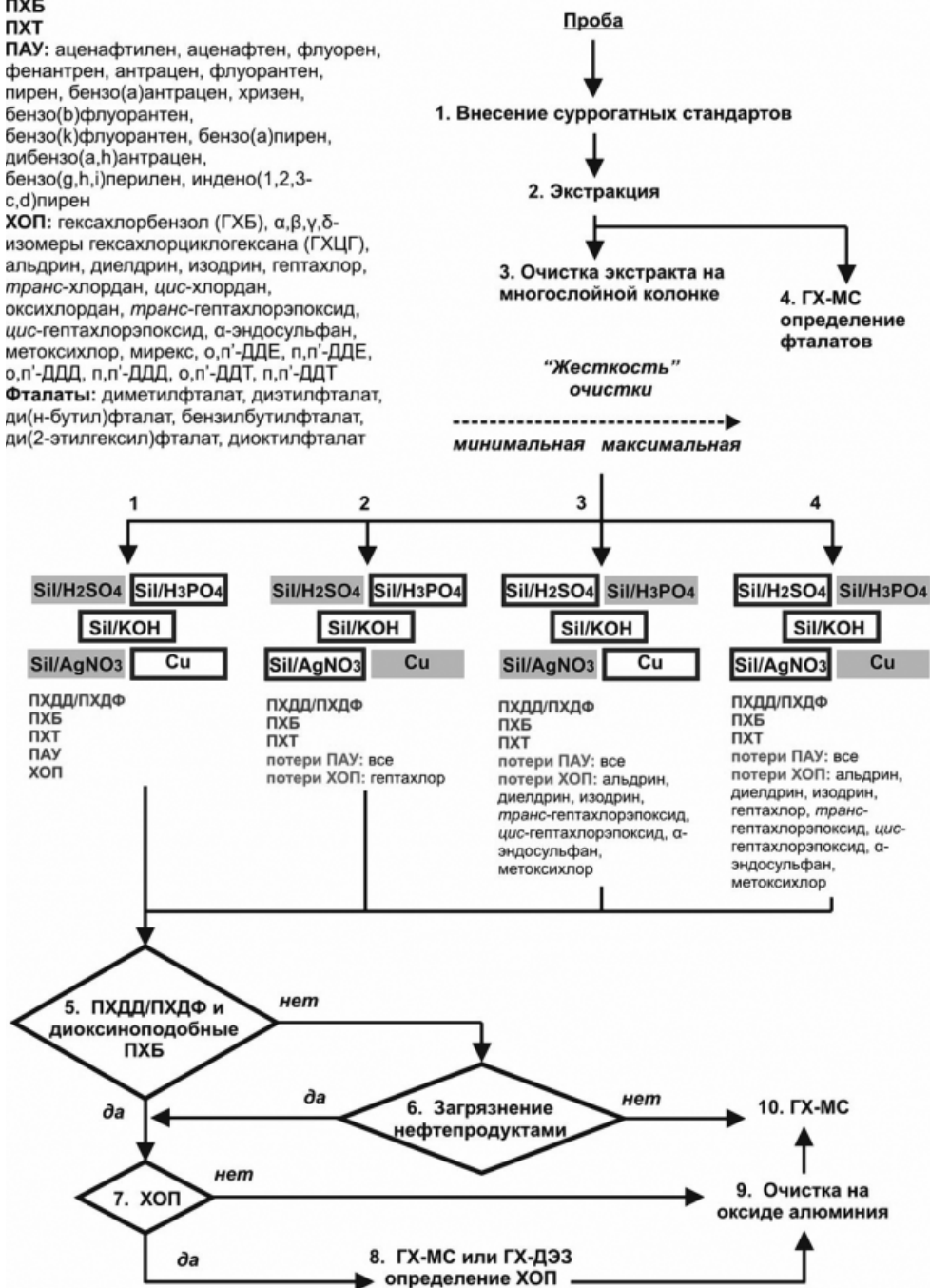


Рисунок 4. Детальная схема, иллюстрирующая примененный подход к подготовке пробы.

очистка на ССПС бесполезна для ряда ХОП, не содержащих в своей структуре ароматических фрагментов.

Основное преимущество приведенного подхода состоит в его унифицированности. В свою очередь, высокая степень очистки дает возможность проводить анализ с применением ГХ-МС низкого разрешения, что делает методику доступной для рядовых лабораторий.



Рисунок 5. Образцы сточных вод. Добавляем стандарты-суррогаты и переходим к экстракции.



Рисунок 6. Более чистый водный образец (слева) экстрагируется нормально. Экстракция эмульсии (справа) приводит к появлению геля и пены.



Рисунок 7. Такую структуру можно попытаться разрушить вымораживанием.

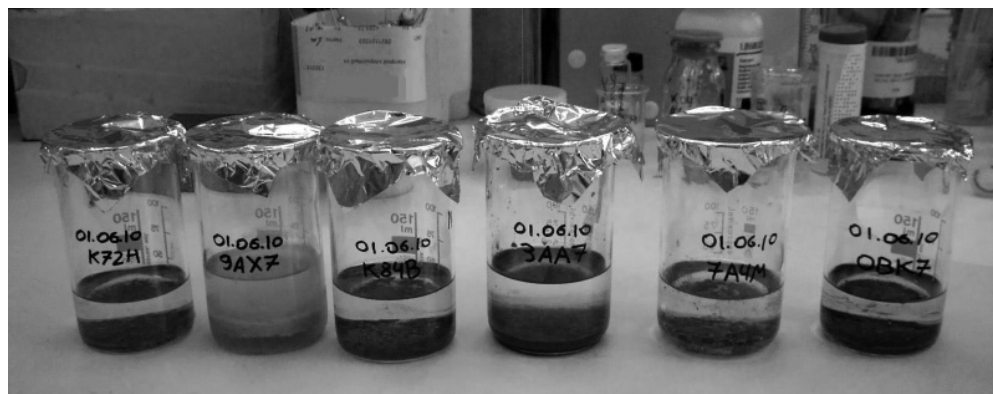


Рисунок 8. После цикла замораживания-размораживания органический слой выглядит более чистым.

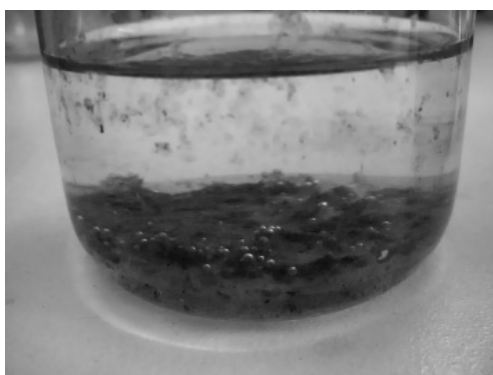


Рисунок 9. Гель не разрушился, но уплотнился.

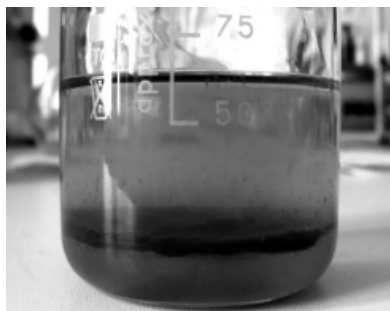


Рисунок 10. В соседней пробе гель разрушился полнее, зато гексановый слой сильно окрашен.



Рисунок 11. По крайней мере, большую часть водного слоя уже можно удалить при помощи обычной пипетки.



Рисунок 12. Добавляем осушитель, ждем, гексановый слой декантируем с плотного осадка.



Рисунок 13. Переносим на предварительно подготовленную многослойную колонку с импрегнированными силикагелями для адсорбционной очистки.



Рисунок 14. Шесть проб в параллели: хорошая производительность. Видно, насколько сильно окрашены слои силикагеля — экстракты действительно очень грязные. На заднем плане видны стаканчики со слоем осушителя, из которых переносились экстракты.



Рисунок 15. Растворитель из очищенных экстрактов отгоняем при помощи роторного испарителя примерно до 0.5 мл — вот так этот объем выглядит в колбе на 100 мл.



Рисунок 16. Вносим стандарт выхода.



Рисунок 17. Переносим пробу из колбы в пробник. Проба готова!

Таблица 1.

Результаты фракционирования СОЗ на окиси алюминия в НФ режиме.

Фракция	Элюент (гексан/ метилхлорид), %	Целевые соединения
1	(100/0)	Нефтепродукты (нецелевая фракция) ХОП: гексахлорбензол
2	(98/2)	ПХБ реперные ХОП: изодрин
3	(95/5)	ПХБ диоксиноподобные ПАУ: аценафтилен, аценафтен ХОП: мирекс
4	(90/10)	ПХДД/ПХДФ ПХТ ХОП: <i>транс</i> — хлордан, <i>цис</i> — хлордан ПАУ: аценафтилен**, аценафтен**, флуорен, фенантрен, флуорантен*, пирен
5	(80/20)	ПАУ: флуорен**, фенантрен**, флуорантен, антрацен*
6	(70/30)	ПАУ: антрацен, бензо(g,h,i)перилен* ХОП: b
7	(60/40)	ПАУ: бензо(a
8	(50/50)	ПАУ: бензо(a
9	(40/60)	ПАУ: бензо(b)флуорантен **, бензо(k) флуорантен, индено(1,2,3-с,d)пирен, дибензо(a,h)антрацен*
10	(30/70)	ПАУ: индено(1,2,3-с,d)пирен **, дибензо(a,h)антрацен
11	(гексан/ацетон), (95/5), % об.	Фталаты

*) начало выхода аналита; **) конец выхода аналита

Таблица 2.

Результаты фракционирования ПХДФ, ПХБ и ПАУ на сверхсшитом полистироле в ПЗ режиме.

Фракция	Элюент гексан/дихлорметан	Целевые соединения
1	100/0	-
2	100/0	нафталин, аценафтилен, аценафтен, флуорен, фенантрен, антрацен, ПХБ
3	95/5	фенантрен*, антрацен*, флуорантен, пирен, ПХДФ (тетра-, пента-)
4	90/10	флуорантен*, пирен*, бензо(а
5	80/20	бенз(а
6	50/50	индено(1,2,3-с,d)пирен**, дибензо(а,h) антрацен**, бензо(g,h,i)перилен**
7	0/100	-

*) начало выхода аналита; **) конец выхода аналита

2.3. Извлечение неполярных целевых соединений из полярных сред на примере определения пестицидов групп ХОП, ФОС и триазинов в растительных матрицах методом ЖЭ-ТФЭ-АО-ГХ/МС/ДЭЗ

Описываемый подход был предложен автором как адаптированный под рутинные анализы сложных растительных матриц вариант методики, известной сейчас в международной практике как QuEChERS-метод группового анализа пестицидов.

Основная идея «квечерса» состоит в селективном выделении пестицидов, что позволяет (по крайней мере, так задумывалось) избежать впоследствии интенсивной очистки экстракта. Растительный образец растирают, смешивают с безводным сульфатом магния и добавляют ацетонитрил; смесь интенсивно перетирают. В результате, пестициды различных групп переходят в ацетонитрильный экстракт, который по причине присутствия избытка безводного сульфата почти не содержит влаги. Основное отличие от традиционной ЖЭ неполярными

растворителями состоит в том, что в экстракт не переходят жиры, жирные кислоты и прочие липиды, мешающие проведению анализа.

Тем не менее, в QuEChERS-варианте экстракции полярным растворителем (ацетонитрилом) в экстракт попадают уже полярные компоненты матрицы, которые также мешают определению. Но такая ситуация с точки зрения пробоподготовки все же лучше ситуации с экстракцией гексаном: удалять полярные примеси из органического растворителя удобнее, чем неполярные: арсенал технических средств для удаления полярных соединений значительно шире.

Тем не менее, создатели «квечерса» легкомысленно отнеслись к этому недостатку, рекомендуя применять АО на амино-силикагеле непосредственно для полученного ацетонитрильного экстракта. В нормально-фазовом режиме ацетонитрил обладает слишком высокой элюирующей силой, и большая часть компонентов матрицы проскакивает вместе с целевыми соединениями, то есть экстракт, по факту, не очищается.

Как вариант решения проблемы было предложено переводить ацетонитрильную пробу (перед проведением адсорбционной очистки в НФ режиме) в менее полярный растворитель, то есть обладающий меньшей элюирующей силой в НФ режиме, чем ацетонитрил. Такой подход, к тому же, позволил бы проводить определение не только ГХ с МС, но и с ДЭЗ детектированием (электрозахватный детектор несовместим с инъектированием в полярных растворителях).

П о л я р н ы е м а т р и ц ы

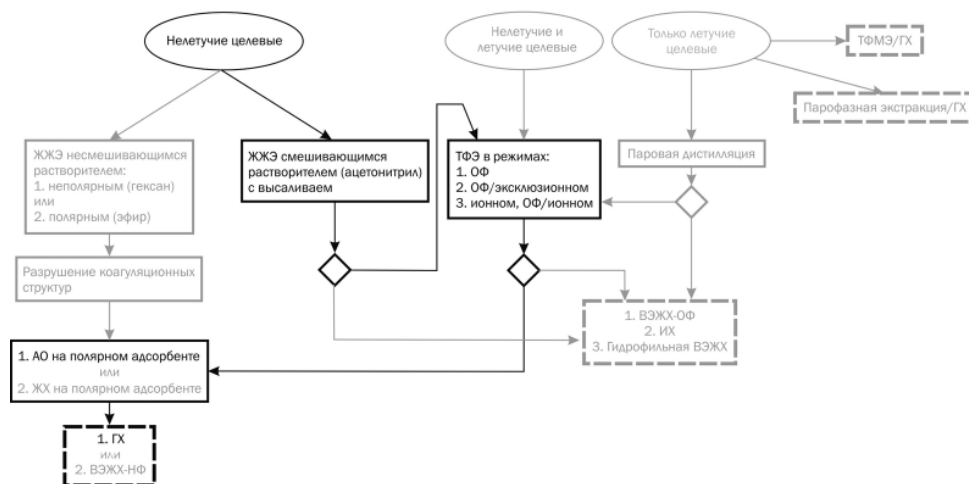


Рисунок 18. Блок-схема, иллюстрирующая примененный подход к подготовке пробы.

Сложность состояла в том, что простым упариванием с перерастворением в новом растворителе эту задачу решить нельзя. В-первых, экстракт достаточно насыщен полярными компонентами, которые при отгонке растворителя начинают выпадать в осадок. Во-вторых, некоторые пестициды летучи, и поэтому существует риск потерять их в процессе отгонки растворителя.

В результате, для замены растворителя применяли ТФЭ. В общих чертах предложенный подход выглядит следующим образом. Ацетонитрильный экстракт разбавляют водным раствором хлорида натрия до 20 %, разбавленный экстракт пропускают через картридж с нейтральным сверхсшитым полистиролом — то есть проводят ТФЭ в обращено-фазовом режиме. Целевые вещества смывают этилацетатом. Элюат в этилацетате подвергают АО на амино-силикагеле.

Эффективность подобного подхода в плане очистки от полярных компонентов матрицы очень высока. Удаление основной части полярных соединений (органических кислот, углеводов) происходит уже на стадии ТФЭ — в обращено-фазовом режиме они хуже всего удерживаются на неполярном адсорбенте и проскакивают в процессе нанесения пробы. Последующая очистка в НФ режиме на амино-силикагеле позволяет удалить из этилацетатного смыва полифенольные соединения и гликозиды.

Описанная процедура имеет ряд параметров, которые вполне допустимо изменять, подстраивая методику под определенные группы целевых соединений. Так, если в список определяемых целевых соединений входят полярные пестициды группы ФОС или триазины, объемы проскока можно увеличить, разбавляя ацетонитрильный экстракт до 10 % и менее. Вместо ССПС можно применять более гидрофобные углеродные адсорбенты.

Интенсивность очистки на амино-силикагеле можно увеличить, разбавив этилацетатный смыв гексаном; с другой стороны, это может повлечь потерю наиболее полярных пестицидов, так что здесь также надо соблюдать некоторый оптимум.

При анализе методом ГХ-МС в хроматограф можно инжектировать этилацетатный смыв напрямую, но перед анализом методом ГХ-ДЭЗ его необходимо предварительно разбавить гексаном.

Основная положительная черта приведенной методики определения — это высокая степень очистки пробы, что позволяет применять модернизированный QuEChERS-метод для рутинных определений. К основной отрицательной черте методики можно отнести относительно

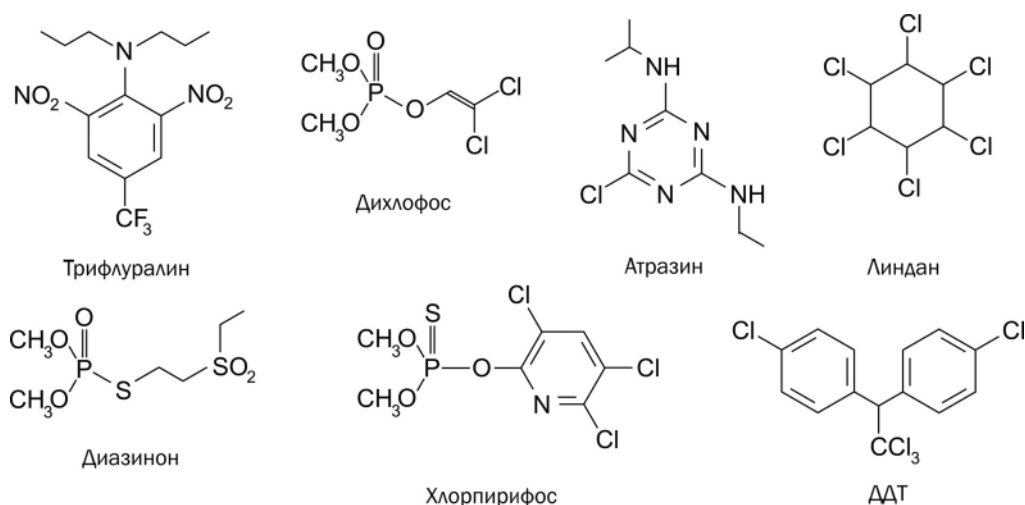


Рисунок 19. Структурные формулы целевых соединений.

высокие трудозатраты на пробоподготовку, которые, тем не менее, снижаются при автоматизации различных ее стадий.

На рисунках и таблицах приведены наиболее интересные результаты исследований, полученных в ходе отладки подхода, наглядно иллюстрирующие процесс разработки процедуры ТФЭ.

На рисунке 19 показаны структурные формулы соединений, выбранных в качестве модельных целевых соединений. В состав выборки входят три фосфорорганических пестицида (дихлорфос, хлорпирифос, диазинон), два хлорорганических пестицида (линдан, ДДТ), пестицид группы атразина (атразин), пестицид анилиновой группы (трифлуралин). Модельные соединения подобраны по принципу максимального различия по физико-химическим свойствам, что позволяет на практике оценить границы применимости разрабатываемого подхода.

Наиболее гидрофильным пестицидом из выборки является дихлорфос, за ним следует атразин. Эти соединения применялись при оптимизации процедуры ТФЭ в обращено-фазовом режиме, поскольку они обладают самым низким удерживанием и, соответственно, самыми низкими объемами проскока.

Наиболее гидрофобными и слабополярными пестицидами являются ХОП: ДДТ и линдан. Высокой полярностью обладают хлорпирифос, атразин, диазинон, трифлуралин. Хлорпирифос, атразин и трифлуралин являются ионизируемыми веществами, обладающими умеренными основными свойствами. Хлорпирифос, атразин, трифлуралин и ДДТ

обладают ароматическими структурными фрагментами. Линдан и ДДТ содержат хлор в алифатической цепи, дихлофос — у двойной связи; ДДТ, хлорпирифос и атразин — при ароматической системе. Хлорпирифос и диазинон содержат серу в составе различных функциональных групп.

Вначале был проведен тест четырех различных обращено-фазовых адсорбентов: нейтрального сверхсшитого полистирола (ССПС) двух марок (различающихся, в том числе, по фракционному составу), нитрованного ССПС и активированного угля — пиролизованного ССПС. Для всех приведенных материалов были получены кривые проскока дихлофоса (как наименее гидрофобного соединения) из смеси вода-ацетонитрил 60:40.

Максимальный объем проскока наблюдался для активированного угля, однако впоследствии от него пришлось отказаться по причине затрудненной десорбции целевых соединений в выбранных условиях (комнатная температура, этилацетат). Десорбцию с угля лучше всего проводить горячим толуолом, а сам уголь необходимо применять в стеклянном картридже — все это требует значительных затрат труда.

ССПС мелкого зёрнения (40–70 мкм) также показал хороший результат, но от него отказались по причине достаточно высокого гидродинамического сопротивления, не позволявшего наносить образец с достаточной скоростью, пользуясь стандартным вакуумным насосом. Наименее гидрофобный нитрованный ССПС (по гидрофобности он приближается к С18 силикагелям) закономерно показал худший объем проскока и также не применялся.

Для проведения ТФЭ был выбран ССПС более крупного зёрнения (70–140 мкм) — менее эффективный, зато обеспечивающий лучшую проницаемость картриджа.

Скорость нанесения пробы подбирали, получая кривые проскока для дихлофоса из 20 %-ного раствора ацетонитрила в воде при различных скоростях нанесения. При уменьшении скорости от 5 до 1 мл/мин (для картриджа объемом 1 мл) объем проскока увеличивался незначительно, что свидетельствовало о хорошей кинетике массопереноса на выбранном адсорбенте. В результате, скорость пропускания образца в рабочей методике оставили на значении 5 мл/мин.

Наконец, в отдельном эксперименте проверили величину эффекта высаливания, то есть увеличения объема проскока в обращено-фазовом режиме при добавлении в водный образец неорганической соли. Для этого сравнили объемы проскока для дихлофоса из 20 %-ого раствора ацетонитрила в воде и 20 %-ого раствора ацетонитрила в 50 мМ водном

растворе хлорида натрия. Эффект был значительным: объем проскока увеличился примерно на треть.

Экспериментов моделирующими матрицу растворами не проводили, поскольку считали, что основные компоненты матрицы в процессе нанесения пробы проскакивают, то есть не нагружают адсорбент.

В итоге, объем проскока для дихлорфоса в конечных условиях составил порядка 14–16 мл, что после деления на два (запас прочности) дает 7–8 мл образца или 1.5 мл исходного ацетонитрильного экстракта.

В таблице 3 приведены степени извлечения целевых соединений в результате всей пробоподготовки (ТФЭ и АО). При очистке на амино-силикагеле потери в результате всей процедуры пробоподготовки составили порядка 20 % для каждого из модельных соединений, из которых около 5 % приходилось на потери при очистке, и 15 % — на потери при проведении ТФЭ.

Кроме АО на амино-силикагеле, была предпринята попытка провести очистку на окиси алюминия, однако от этой идеи пришлось отказаться из-за значительных потерь целевых соединений. С одной стороны, окись алюминия обладает слишком высоким удерживанием в НФ режиме, чем можно объяснить потери трифлуралина, диазинона и хлорпирифоса. С другой стороны, большие потери линдана с высокой вероятностью обусловлены каталитической активностью материала.

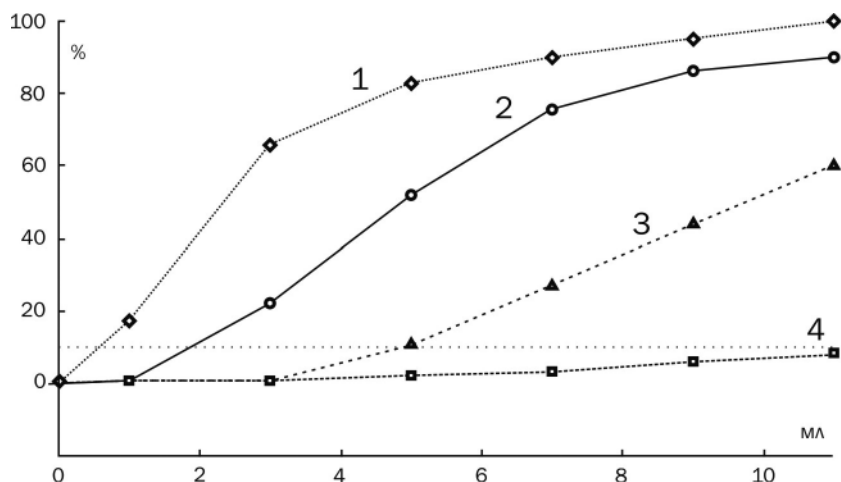


Рисунок 20. Кривые проскока дихлорфоса на различных адсорбционных материалах из раствора в смеси вода-ацетонитрил 60:40. 1 — нитрованный ССПС, 2 — нейтральный ССПС марки 1 (с большим размером частиц), 3 - нейтральный ССПС марки 2 (с меньшим размером частиц), 4 — пиролизированный ССПС (активированный уголь с высокой удельной поверхностью).

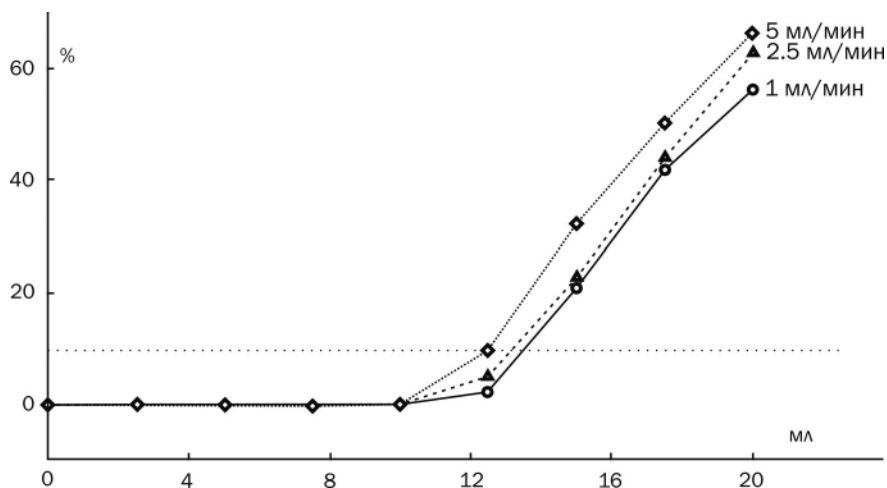


Рисунок 21. Кривые прокола дихлорфоса на нейтральном ССПС из раствора в смеси вода-ацетонитрил 80:20 при различной скорости потока через 1 мл картридж.

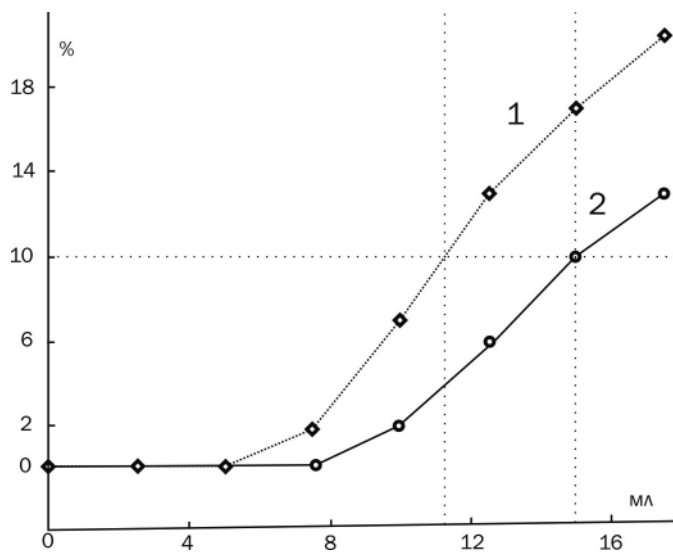


Рисунок 22. Кривые прокола дихлорфоса на нейтральном ССПС из раствора (1) в смеси вода-ацетонитрил 80:20 и (2) из раствора в смеси 50мМ водный хлорид натрия-ацетонитрил 80:20.

Таблица 3.

**Степени извлечения целевых соединений
после ТФЭ на нейтральном ССПС и последующей АО
на amino-силикагеле (левый столбец)
и окиси алюминия (правый столбец).**

Целевое соединение	Степень извлечения, % (очистка на amino- силикагеле)	Степень извлечения, % (очистка на окиси алюминия)
Трифлуралин	81	18
Атразин	81	74
Базудин (диазинон)	87	47
Линдан	80	29
Дурсбан (хлорпирифос)	85	60
ДДТ	78	82

2.4. Извлечение полярных целевых соединений из водных сред на примере определения патулина в соках методом ТФЭ-ВЭЖХ/УФ

ТФЭ в обращено-фазовом режиме является распространенным подходом к извлечению целевых веществ из водных матриц, причем этот способ применим для извлечения даже гидрофильных соединений. Более того, применение гидрофобных нейтральных полимерных или углеродных материалов дает возможность достичь этим способом высокой степени концентрирования образца, до 100 и более.

Методика определения афлатоксина патулина во фруктовых соках и концентратах, предложенная автором, наглядно иллюстрирует такую возможность. В данном случае ТФЭ в обращено-фазовом режиме была применена как альтернатива традиционному подходу, включающему ЖЖЭ целевого соединения из водного образца этилацетатом и имеющему ряд недостатков.

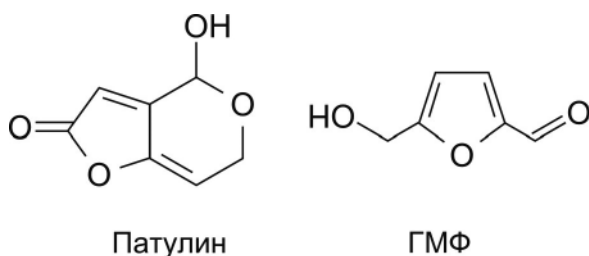


Рисунок 23. Структурные формулы патулина и 5-ГМФ.

Основной недостаток общепринятой методики состоит в том, что после экстракции растворитель необходимо отгонять на роторном испарителе, причем при существенном нагревании экстракта и до состояния сухого остатка. При подобном жестком воздействии патулин может легко дегradировать, поскольку является химически лабильным соединением.

Для решения задачи пробоподготовки методом ТФЭ было необходимо добиться степени концентрирования не менее 100: нормы по патулину довольно низкие, а для инструментального анализа применяют ВЭЖХ с УФ детектированием, который большой чувствительностью не отличается.

Предварительную подготовку образца проводили по традиционной методике. 20 г гомогенизированных фруктов (пюре, сока с мякотью) помещали в плоскодонную колбу 200 мл, добавляли 50 мл воды, 15 мл раствора Карреза 1 и 15 мл раствора Карреза 2. Осадок отделяли центрифугированием (3000 об./мин. в течение 10 мин.), аликвоту 50 мл отбирали для твердофазной экстракции.

В качестве гидрофобного адсорбента для ТФЭ применяли нейтральный сверхсшитый полистирол (ССПС), упакованный в картриджи объемом 1 мл. Эксперимент по получению кривой проскока показал, что проблем с нанесением пробы нет: целевое соединение не проскакивало даже при пропуске 100 мл водного образца.

Для достижения большой степени концентрирования смыв с картриджа было необходимо делать летучим органическим растворителем, чтобы иметь возможность дополнительно сконцентрировать пробу отгонкой растворителя. Эта задача имела два решения: использовать для смыва либо смешивающийся с водой растворитель (например, ацетонитрил, метанол), либо несмешивающийся с водой растворитель, хорошо растворяющий целевое соединение (например, этилацетат).

Первое решение удобно тем, что не требует полностью высушивать картридж, однако плохо тем, что проба содержала бы значительное и неконтролируемое количество влаги, что повлекло бы за собой проблемы с отгонкой растворителя в токе азота. Второй подход, очевидно, требовал проведения тщательного высушивания картриджа, однако не давал проблем при последующей отгонке растворителя. В результате был выбран второй подход.

Последующие эксперименты по измерению открываемости выявили интересный факт: степени извлечения сильно варьировались в параллели, изменяясь от более чем 95 % (количественная открываемость) до 75–80 %. Выяснилось, что результат всей процедуры очень чувствителен к полноте высушивания картриджа с адсорбентом. При неполном высушивании этилацетат при смыве вытеснял всю остаточную влагу из пор адсорбента, которая собиралась в едва заметную каплю на дне пробника — и все потери целевого соединения были обусловлены исключительно его частичным присутствием в этой водной капле.

Таким образом, после нанесения образца и промывки водой картридж было необходимо высушивать весьма тщательно. К счастью, патулин не летуч и не окисляется, так что процесс сушки был предельно прост: картридж оставляли под вакуумом, и через него проходил воздух; за 20–30 минут 1 мл картридж высыхал полностью. С высушенного картриджа патулин всегда смывался практически количественно, на 95 % и более.

Проба, полученная в несмешивающемся с водой растворителе, была несовместима с часто применяемым обращено-фазовым ВЭЖХ определением патулина. Тем не менее, она хорошо подходила для последующего анализа более традиционным методом нормально-фазовой ВЭЖХ, который и был выбран в качестве инструментального метода анализа. Стадию адсорбционной очистки в офф-лайн варианте включать в методику не стали, ограничившись применением предколонки (то есть фактически использовали он-лайн адсорбционную очистку).

Пробу вводили в хроматограф напрямую в этилацетате, без разбавления гексаном. Уменьшать элюирующую силу растворителя пробы не посчитали в этом случае целесообразным: аналитическая 250x4.6 колонка уверенно справлялась с 20 мкл пробы в этилацетате без заметного экстра-колоночного уширения пиков.

Финальный текст методики пробоподготовки выглядит следующим образом. 50 мл аликвоты водного экстракта мякоти или 20 г сока без мякоти пропускают через 1 мл картридж с ССПС, установленном на вакуумном манифолде, при объемной скорости не выше 5 мл/мин.

П о л я р н ы е м а т р и ц ы

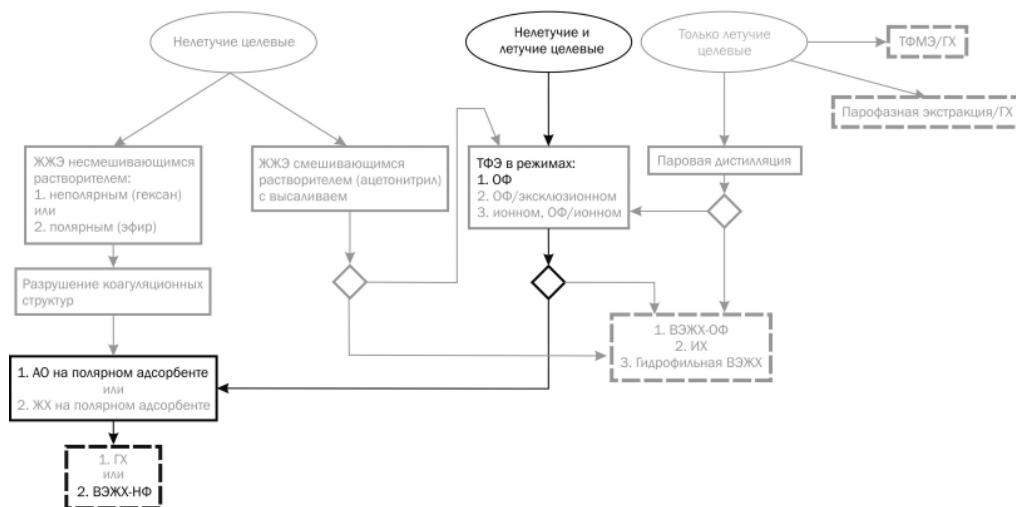


Рисунок 24. Блок-схема, иллюстрирующая примененный подход к подготовке пробы.

С той же скоростью картридж промывают 10 мл воды. После промывки картридж высушивают воздухом в течение 20 минут, оставив картридж на манифолде. Патулин смывают 3 мл этилацетата.

Этилацетат отгоняют в токе азота без нагревания до объема порядка 200–500 мкл; точный объем измеряют при помощи аналитического шприца. 20 мкл пробы вводят в хроматографическую колонку размеров 250x4.6, упакованную 5 мкм силикагелем. Подвижная фаза — гексан-этилацетат-уксусная кислота 70:35:1.5, детектирование в УФ диапазоне диодно-матричным детектором, опорная длина волны 270 нм.

На стадии регенерации картридж последовательно промывают 5 мл этилацетата, 3 мл ацетонитрила, 10 мл смеси ацетонитрил-5 % водная фосфорная кислота 1:1. Затем картридж кондиционируют 10 мл воды.

Основная положительная черта приведенной методики — очень низкий расход реагентов, особенно при рутинном анализе «на потоке», когда одновременно готовят до 20 проб. Экономия касается и ТФЭ материалов: разработанная процедура регенерации делает картридж практически «вечным» (по крайней мере, после 20–30 циклов ТФЭ на одном картридже извлечение оставалось на прежнем высоком уровне).

Основная отрицательная черта методики была никак не связана с процедурой ТФЭ, поскольку касалась необходимости центрифугирования больших объемов образца до 50 мл.

2.5. Извлечение неполярных целевых соединений из неводных сред на примере определения ПАУ в жиросодержащих продуктах и копильных препаратах методами ЖЭ-ТФЭ-ВЭЖХ/ФЛД и АО-ТФЭ-ГХ/МС

Задача по извлечению полиароматических углеводородов (ПАУ) из неполярных матриц методом ТФЭ имеет два решения: ТФЭ в НФ режиме (например, на окиси алюминия) и ТФЭ в ПЗ режиме (например, на активированных углях или сверхсшитом полистироле). ТФЭ материалы, работающие в смешанном ПЗ/НФ режиме можно получить динамическим модифицированием чистого силикагеля или катионита на основе силикагеля водным или водно-органическим раствором нитратом серебра с последующим высушиванием адсорбента.

Целью одного из исследований, в котором принимал участие автор, являлось сравнение адсорбционных свойств нейтрального сверхсшитого полистирола и серебряной формы сульфированного сверхсшитого полистирола при ТФЭ извлечении ПАУ из неводных матриц в режиме с переносом заряда.

В качестве модельного раствора для измерений степеней извлечения (которые приведены в таблице 4) был выбран 10 %-ный раствор растительного масла в гексане. Этот выбор был обоснован тем, что триглицериды являются основным «нагружающим» ПЗ адсорбент компонентом матрицы при анализе жиросодержащих продуктов питания — а именно такие матрицы представляют собой наибольшую проблему при определении ПАУ.

ТФЭ проводили следующим образом: стеклянный картридж с 1 мл адсорбента кондиционировали 10 мл хлористого метилена и 5 мл гексана; 1 мл масла растворяли в 9 мл гексана, 10 мл раствора пропускали через картридж. Далее картридж промывали 10 мл гексана и сушили воздухом в течение 10 минут. ПАУ смывали 3 мл хлористого метилена. Растворитель отгоняли воздухом досуха, остаток перерастворяли в 2 мл ацетонитрила (поскольку методика пробоподготовки была ориентирована на обращено-фазовую ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием).

Потенциальную проблему при таком подходе могут представлять процедуры высушивания картриджа и отгонки растворителя, поскольку именно здесь можно потерять достаточно летучие биароматические ПАУ. В результате было установлено, что на серебряной форме сульфированного ССПС нафталин, как и другие ПАУ, извлекался

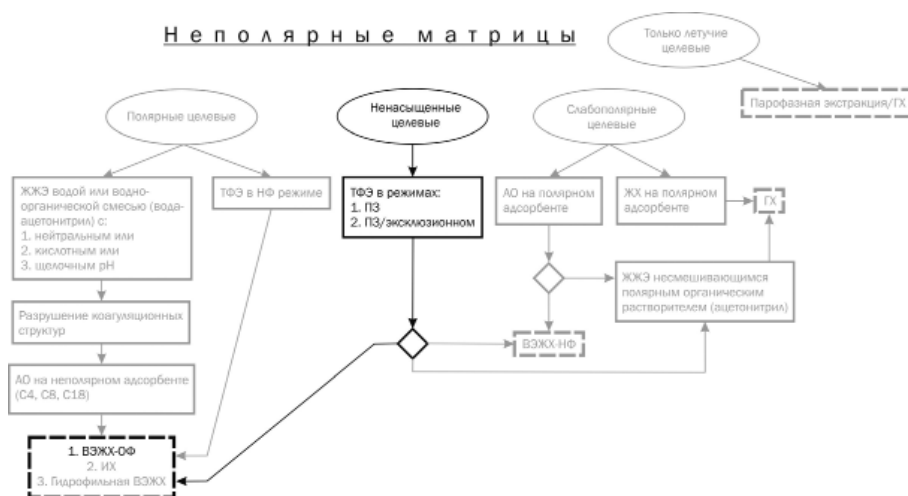


Рисунок 25. Блок-схема, иллюстрирующая примененный подход к подготовке пробы.

практически количественно. В то же время, на нейтральном ССПС бициклические ПАУ в большей или меньшей степени терялись.

Таблица 4.

Сравнение степеней извлечения ПАУ из масла с использованием нейтрального ССПС и серебряной формы сульфированного ССПС.

Целевое соединение	Степень извлечения, %	
	Адсорбент для ТФЭ	
	Нейтральный ССПС	Сульфированный ССПС, Ag форма
Нафталин	8	98
Аценафтилен	-	-
Аценафтен	11	85
Флуорен	40	101
Фенантрен	-	-
Антрацен	96	101
Флуорантен	110	102
Пирен	102	100

Бенз(а)антрацен	95	98
Хризен	87	96
Бенз(б)флуорантен	94	91
Бенз(к)флуорантен	94	93
Бенз(а)пирен	94	95
Дибенз(а,һ)антрацен	93	91
Бензо(ghi)пирен	92	91
Индено(123cd)пирен	79	60

Таблица 5, в свою очередь, хорошо иллюстрирует необходимость применять для извлечения ПАУ твердофазную экстракцию в ПЗ режиме вместо традиционного гидролиза с последующей жидкостной экстракцией гидролизата. Данные в ней — это степени извлечения ПАУ из жирной рыбы (норвежской семги) методами ТФЭ и традиционным методом гидролиза с ЖЭ. Как следует из этих данных, степени извлечения с ТФЭ в ПЗ режиме оказались примерно в шесть раз выше, чем с ЖЭ — и это не говоря о критическом снижении затрат времени, труда и реагентов на проведение пробоподготовки. Правда, для ГХ-МС пробы, полученные с применением ТФЭ, оказались слишком грязными, но для ВЭЖХ-ФЛД определения — вполне приемлемыми.

Таблица 5.

Степени извлечения четырех ПАУ по методике с применением ТФЭ на сверхсшитом полистироле и по стандартной методике с применением жидкостной экстракции.

Целевое соединение	Степень извлечения при ТФЭ, %	Степень извлечения при ЖЭ, %	Отношение степеней извлечения, ТФЭ/ЖЭ
Нафталин	68	21	3.2
Аценафтилен	79	16	4.9
Фенантрен	94	15	6.3
Хризен	93	14	6.6

В качестве еще одного примера применения ТФЭ для экстракции ПАУ можно привести АО-ТФЭ-ГХ/МС определение бенз(а)пирена в копильных препаратах. Основными мешающими компонентами матрицы в случае копильных препаратов являются алкилфенолы и их эфиры, которые также адсорбируются в ПЗ режиме из гексанового экстракта препарата и сильно «нагружают» адсорбент, уменьшая объем проскока ПАУ. Кроме того, при смыве ПАУ с картриджа сконцентрированные на нем алкилфенолы также смываются вместе с ПАУ, что приводит к сильному загрязнению проб.

Чтобы решить обе проблемы одновременно, последовательно соединяют два картриджа: с амино-силкагелем (для адсорбционной очистки в НФ режиме) и нейтральным ССПС (для ТФЭ в режиме ПЗ). В гексановый экстракт делают 2 %-ную добавку изопропанола, который обладает средней элюирующей силой в НФ режиме и крайней низкой элюирующей силой в режиме ПЗ. В результате одновременной процедуры АО и ТФЭ на таком тандеме из картриджей основная часть алкилфенолов остается на первом картридже для АО, а ПАУ проскакивают, потому что 2 %-ный изопропанол в гексане смывает в НФ режиме с полярного адсорбента ПАУ, но не может смыть более полярные контаминанты. Таким образом, на первом картридже происходит адсорбционная очистка. Бенз(а)пирен, как и другие ПАУ, проскакивает через первый картридж и количественно удерживается на втором картридже со сверхсшитым полистиролом по ПЗ механизму.

2.6. Извлечение полярных целевых соединений из неводных сред на примере определения производных фурфурола в минеральных маслах методами ЖЭ-АО-ВЭЖХ/УФ и ТФЭ-ВЭЖХ/УФ

В случае экстракции гидрофильных целевых соединений из неводных матриц применение ЖЭ вполне оправдано; более того, ионизируемые вещества проще всего извлекать именно методом ЖЭ.

Для нейтральных же гидрофильных целевых соединений существуют альтернативные варианты пробоподготовки с применением ТФЭ в НФ или ПЗ режимах. С технической точки зрения ТФЭ все же имеет одно весомое преимущество перед ЖЭ: степень извлечения методом жидкостной экстракции достаточно сильно зависит от состава матрицы,

в то время как применение ТФЭ позволяет нивелировать матричный эффект.

Сравнить два этих подхода можно на примере определения фурфурола и трех его производных (5-гидроксиметилфурфурола, 2-ацетилфурана и 5-метилфурфурола) в минеральных трансформаторных маслах.

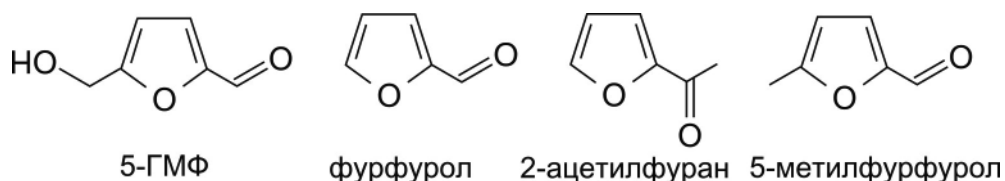


Рисунок 26. Структурные формулы целевых соединений.

Традиционная методика пробоподготовки состоит в жидкостной экстракции масла ацетонитрилом или смесью ацетонитрил-вода 8:2 с последующим разрушением эмульсии (вымораживанием и/или продолжительным отстаиванием экстракта) и адсорбционной очистке экстракта от остатков масла на неполярном С18 силикагеле. Затем пробу разбавляют водой и анализируют методом обращено-фазовой ВЭЖХ с УФ детектированием. При этом в обязательном порядке для защиты аналитической колонки применяют С18 предколонку, что фактически является продолжением адсорбционной очистки пробы.

Основная претензия к этому подходу состоит в том, что коэффициенты извлечения целевых соединений достаточно сильно зависят от характеристик каждой конкретной пробы. А ведь масло может быть разных марок, с разным комплектом присадок; по степени износа масло может быть свежим, в процессе эксплуатации, отработанным и т.д.

При участии автора была разработана методика определения производных фурфурола в минеральном масле с применением ТФЭ в режиме ПЗ с последующим непосредственным анализом смыва методом обращено-фазовой ВЭЖХ. Фурфурол содержит в своей структуре пятичленный ароматический цикл, сопряженный с карбонильной группой. Такого рода системы очень хорошо удерживаются в ПЗ режиме, особенно в среде предельных углеводов.

ТФЭ проводили на нейтральном сверхсшитом полистироле из раствора минерального масла в гексане. Объемы проскока целевых соединений измеряли в эксперименте на реальных пробах с добавкой (см. рис. 27).

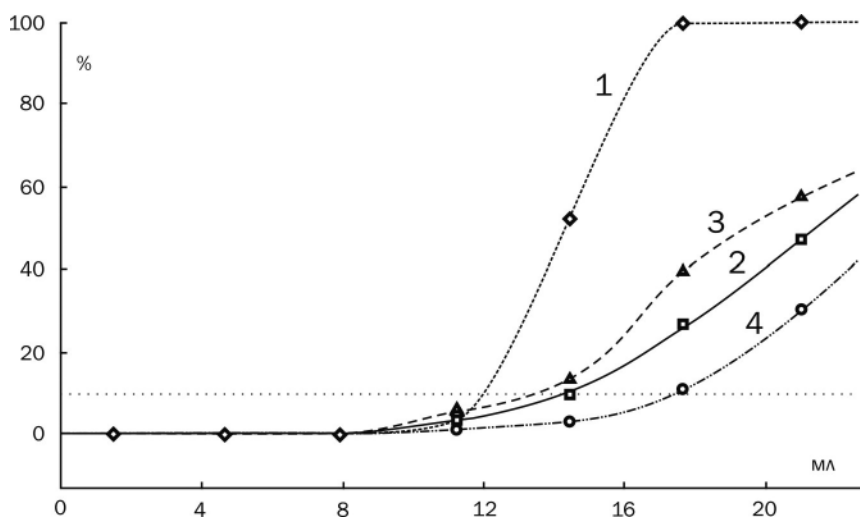


Рисунок 27. Кривые проскака целевых соединений на нейтральном ССПС из раствора гексан-масло 9:1. 1 — 5-гидроксиметилфурфурол, 2 — фурфурол, 3 — 2-ацетилфуран, 4 — 5-метилфурфурол.

С нейтрального ССПС фурфуролы смывали в обращено-фазовом режиме. В качестве растворителей для смыва были испытаны смеси ацетонитрил-вода с различным соотношением компонентов. Во-первых, были получены кривые смыва целевых соединений (см. рис. 28). Затем была оценена эффективность хроматографического разделения, получаемая при инжестировании проб с разным соотношением воды и ацетонитрила (см. рис. 29). В результате было установлено, что смесь ацетонитрил-вода 60:40 является оптимальной: она обеспечивает количественный смыв и почти максимальную эффективность разделения при достаточно высокой чистоте получаемой пробы.

Тем не менее, для дополнительной очистки пробы и дальнейшего увеличения эффективности разделения было решено дополнительно разбавлять пробу водой перед инжестированием. От легкой опалесценции пробы (компоненты матрицы все же оставались в пробе даже при смыве смесью ацетонитрил-вода 60:40) избавлялись, фильтруя пробу через тефлоновый шприцевой фильтр.

Конечная методика выглядит следующим образом. К 2 мл трансформаторного масла добавляют 8 мл гексана. Полученный раствор (10 мл) пропускают под вакуумом водоструйного насоса со скоростью не более 2 мл/мин через 20×8 мм картридж со сверхсшитым полистиролом. Картридж промывают 2 мл гексана при соблюдении

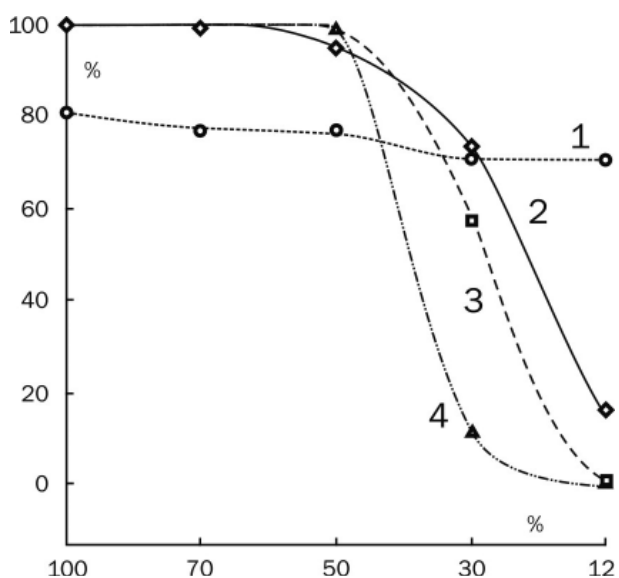


Рисунок 28. Зависимости степени извлечения целевых соединений на стадии смыва от доли ацетонитрила в элюирующей смеси ацетонитрил-вода.

1 — 5-гидроксиметилфурфурол, 2 — фурфурол, 3 — 2-ацетилфуран, 4 — 5-метилфурфурол.

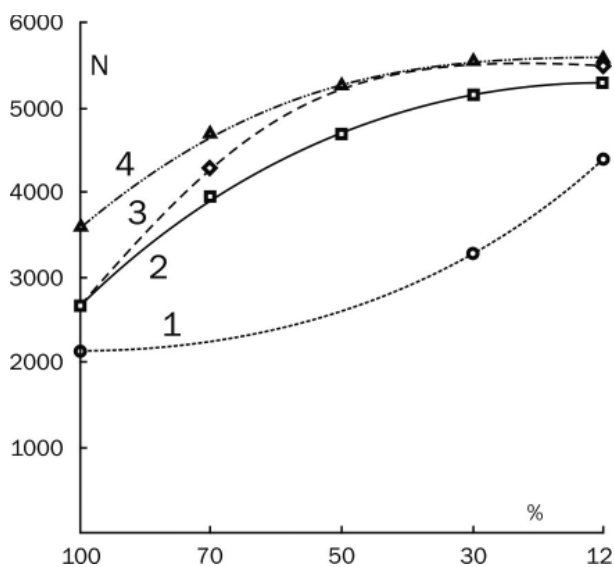


Рисунок 29. Зависимости эффективности ВЭЖХ разделения (по пикам целевых соединений) от доли ацетонитрила в пробе на основе смеси ацетонитрил-вода.

1 — 5-гидроксиметилфурфурол, 2 — фурфурол, 3 — 2-ацетилфуран, 4 — 5-метилфурфурол.

той же скорости, затем оставляют под вакуумом для просушивания воздухом в течение 2 минут. Целевые соединения смывают 2 мл смеси ацетонитрил-вода 60:40, в смыв добавляют 1 мл воды. Полученную пробу фильтруют через тefлоновый шприцевой фильтр и анализируют методом обращено-фазовой ВЭЖХ. Условия хроматографирования: неподвижная фаза – С18-привитый силикагель, 3 мкм, 50x4.6; скорость потока 2 мл/мин.; подвижная фаза – ацетонитрил-вода 12.5:87.5. Время ВЭЖХ анализа составляет около двух минут. Основными выгодами приведенной методики являются правильность, надежность, низкий расход реагентов и экспрессность.

В качестве отрицательного момента можно отметить артефакт, который наблюдался для 5-гидроксиметилфурфуrolа (5-ГМФ) при его смыве с ССПС смесями ацетонитрил-вода. Степень извлечения 5-ГМФ практически не зависит от состава смеси и составляет около 75 %. Это указывает на наличие дополнительного механизма удерживания данного соединения. Вполне возможно его хелатирование остаточным катализатором шивки (железо III), присутствующем в полимерном адсорбенте. Специально проведенный эксперимент позволил установить, что данный артефакт воспроизводится, и при его учете в расчетах он не оказывает влияния на точность измерения. Все остальные фурфуrolы извлекаются из образцов количественно (см. табл. 6).

Таблица 6.

Степени извлечения целевых соединений при использовании офф-лайн и он-лайн ТФЭ на сверхсшитом полистироле.

Целевое соединение	Степень извлечения ± СКО, %	
	Офф-лайн ТФЭ	Он-лайн ТФЭ
5-Гидроксиметилфурфуrol	76.5 ± 1.3	80.0 ± 0.3
Фурфуrol	99.0 ± 0.5	100.0 ± 0.3
2-Ацетилфуран	95.2 ± 1.1	97.2 ± 0.4
5-Метилфурфуrol	98.3 ± 0.9	99.4 ± 0.2

П1. Обработка, приготовление и хранение неорганических адсорбентов

Подготовка оксида алюминия

Адсорбент активируют в течении 4–5 часов в муфельной печи при температуре $(370 \pm 20)^\circ\text{C}$ в токе азота и охлаждают в токе азота до комнатной температуры.

Подготовленный адсорбент используют в течение 4 часов.

Подготовка флорисила

Способ 1:

адсорбент прокаливают в течение 4–5 часов в муфельной печи при температуре $(450 \pm 20)^\circ\text{C}$ и охлаждают до 130°C .

Способ 2:

адсорбент кондиционируют при 130°C не менее 15 часов.

Подготовленный адсорбент переносят в емкость из темного стекла, не охлаждая его и не допуская длительного контакта с воздухом. Адсорбент хранят при комнатной температуре.

Подготовка силикагеля

Силикагель в количестве порядка 50 г помещают в стеклянную колонку диаметром около 1.5 см и промывают 150 мл дихлорметана. Остатки растворителя вытесняют из колонки азотом. Колонку с силикагелем кондиционируют при 130°C не менее 15 часов.

Подготовленный силикагель переносят в емкость из темного стекла, не охлаждая его и не допуская длительного контакта с воздухом. Адсорбент хранят при комнатной температуре.

Подготовка силикагеля, импрегнированного серной кислотой

В стеклянную круглодонную колбу вместимостью 500 мл с притертой пробкой переносят 22 мл концентрированной серной кислоты и добавляют 60 г нагретого до температуры 130°C силикагеля (подготовленного по описанной выше процедуре). Важно не допускать охлаждения адсорбента.

Колбу интенсивно встряхивают порядка 30 минут, разбивая образовавшиеся комки. В результате получают однородный сыпучий порошок. В течение суток его дополнительно выдерживают в закрытом эксикаторе.

Подготовленный импрегнированный силикагель хранят в емкости из темного стекла при комнатной температуре.

Подготовка силикагеля, импрегнированного фосфорной кислотой

В стеклянную круглодонную колбу вместимостью 500 мл с притертой пробкой переносят 23,5 мл концентрированного водного раствора ортофосфорной кислоты и добавляют 60 г нагретого до температуры 130–180°C силикагеля (подготовленного по описанной выше процедуре). Важно не допускать охлаждения адсорбента.

Колбу интенсивно встряхивают порядка 30 минут, разбивая образовавшиеся комки. В результате получают однородный сыпучий порошок. В течение суток его дополнительно выдерживают в закрытом эксикаторе.

Подготовленный импрегнированный силикагель хранят в емкости из темного стекла при комнатной температуре.

Подготовка силикагеля, импрегнированного гидроксидом калия

50 г твердого гидроксида калия переносят в химический стакан (необходимо применять защитные очки и перчатки!). Навеску при небольшом нагревании растворяют в 150 мл метанола. Раствору дают остыть до 30–40°C. При постоянном помешивании в него добавляют 100 г силикагеля при комнатной температуре (подготовленного по описанной выше процедуре) и интенсивно перемешивают массу до однородного состояния. Адсорбент просушивают азотом (следует работать при включенной вытяжке!). Однородный сыпучий адсорбент дополнительно активируют при 130°C не менее 15 часов.

Адсорбент переносят в емкость из темного стекла, не охлаждая его и не допуская длительного контакта с воздухом. Подготовленный импрегнированный силикагель хранят в емкости из темного стекла при комнатной температуре.

Подготовка силикагеля, импрегнированного нитратом серебра

5.6 г нитрата серебра растворяют в 100 мл дистиллированной воды. В полученный раствор добавляют 50 г силикагеля при комнатной температуре (подготовленного по описанной выше процедуре) и интенсивно перемешивают массу до однородного состояния. Воду отгоняют на ротационном испарителе при 60–70°C; колбу с адсорбентом защищают от прямого света. В результате получают сыпучий адсорбент, который дополнительно кондиционируют при 130°C не менее 15 часов.

Полученный адсорбент переносят в емкость из темного стекла. Подготовленный импрегнированный силикагель хранят в емкости из темного стекла при комнатной температуре в защищенном от света месте.

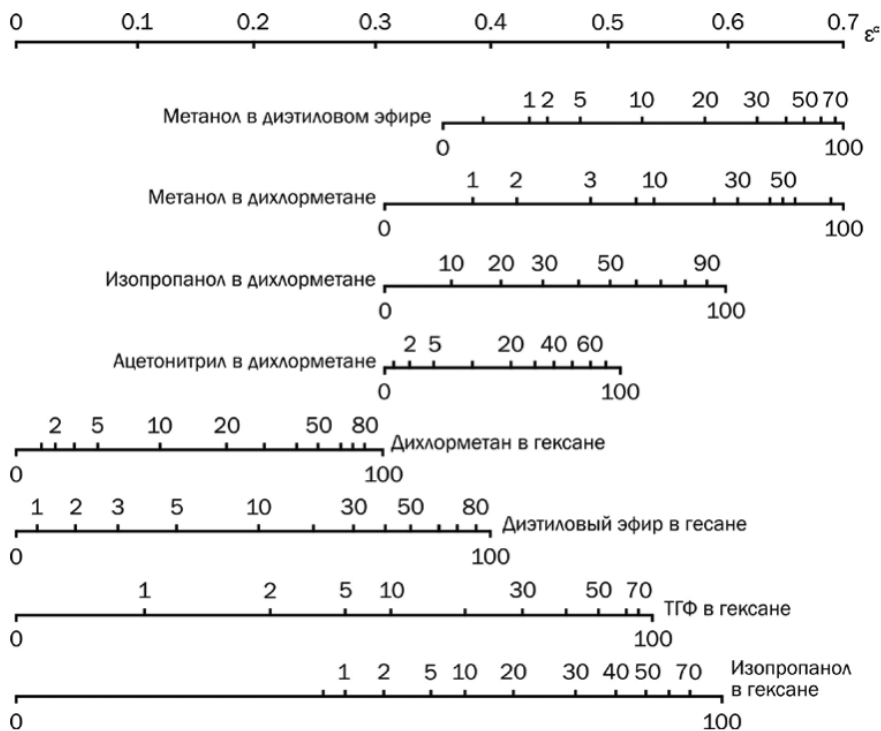
Подготовка сульфата натрия

Сульфат натрия помещают в фарфоровую чашу и прокаливают при 450°C не менее 6 часов. Реактив хранят в закрытой стеклянной посуде.

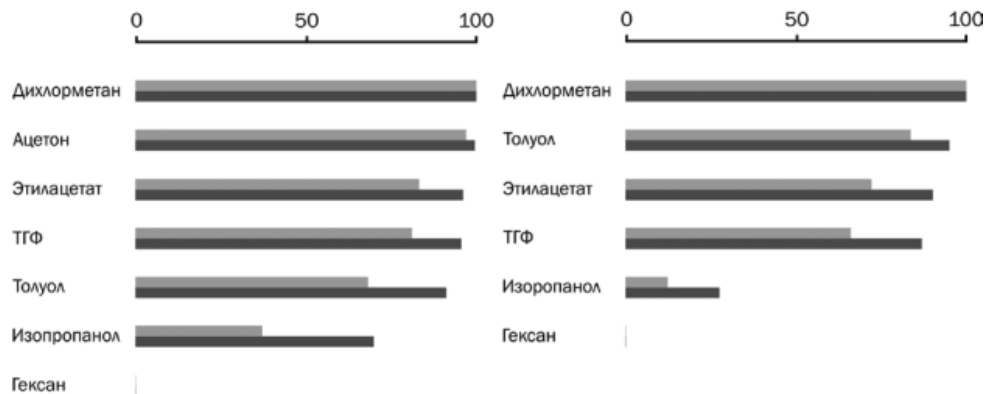
Подготовка хлорида натрия

Хлорид натрия помещают в фарфоровую чашу и прокаливают при 450°C не менее 6 часов. Реактив хранят в закрытой стеклянной посуде.

П3. Элюирующая сила растворителей в нормально-фазовом режиме



П4. Элюирующая сила растворителей в режиме с переносом заряда



ВЭЖХ услуги компании IBS

www.hplc.today/rus, sales@hplc.today

ВЭЖХ курсы

1. Общий курс ВЭЖХ. Разработка ВЭЖХ методик. Основы трансфера и валидации ВЭЖХ методик
2. Современные тренды в разработке новых фармацевтических приложений
3. Решение проблем при трансфере ВЭЖХ методик
4. Применение метода ВЭЖХ в лабораториях ОКК. Правильная эксплуатация ВЭЖХ оборудования и колонок. Основы трансфера и валидации ВЭЖХ методик
5. Курс ВЭЖХ для регистраторов лекарственных средств

Экспертиза и трансфер ВЭЖХ методик

1. Экспертное исследование ВЭЖХ методики
(пригодность, сложность трансфера, экономическая эффективность)
2. Трансфер ВЭЖХ методики на оборудование исполнителя
(подбор ВЭЖХ колонки под данную ВЭЖХ методику, проверка пригодности методики, выдача протокола валидации специфичности разделения)
3. Оптимизация фармакопейной ВЭЖХ методики
(с целью повышения экономической эффективности, точности) в рамках, допустимых фармакопей

Помощь при GMP аудите аналитической лаборатории

1. Проверка готовности к GMP инспекции аналитической лаборатории
2. Помощь при GMP инспекции аналитической лаборатории

Квалификация ВЭЖХ оборудования

1. Квалификация ВЭЖХ оборудования
2. Разработка СОП квалификации оборудования. Обучение квалификации оборудования

Разработка ВЭЖХ методик и проведение исследований методом ВЭЖХ

1. Разработка аналитических ВЭЖХ методик
2. Разработка хиральных ВЭЖХ методик
3. Разработка препаративных ЖХ методик выделения/очистки
4. Проведение исследований хроматографическими и спектральными методами

ВЭЖХ продукты компании IBS

1. Готовые ВЭЖХ решения для анализа фармацевтической, пищевой и агрохимической продукции *IBS Pharm* и *IBS Nutri*
2. ВЭЖХ оборудование *YL Instruments* с готовыми ВЭЖХ решениями *IBS Pharm*, *IBS Nutri*
3. ВЭЖХ оборудование *YL Instruments* с проведенным трансфером фармакопейных и иных ВЭЖХ методик

ВЭЖХ курсы компании IBS

www.hplc.today/rus, sales@hplc.today

Мы проводим корпоративные и локальные ВЭЖХ курсы уже более семи лет, и достаточно хорошо известны на российском рынке. С момента запуска обучения было прочитано 22 корпоративных и более 30 локальных курсов, обучено более 400 специалистов 56 компаний.

Основными заказчиками ВЭЖХ курсов являются фармацевтические и биотехнологические компании, а также исследовательские



Автор курсов (второй справа) с коллективом лаборатории ООО «Франдеса»

и образовательные центры. Тем не менее, большим успехом они пользуются и у компаний с иным профилем деятельности: пищевых, агрохимических, энергетических и нефтехимических.

Мы не просто передаем участникам курсов свой опыт, а выводим их на принципиально иной, более глубокий уровень понимания процессов и закономерностей; помогаем не только разрешить текущие, наиболее острые проблемы, но и показываем возможности улучшений там, где их даже не ожидали увидеть.

«На пути к лучшей хроматографии» — этот девиз мы относим как к себе, так и к нашим заказчикам. Это хороший путь, достойный профессионалов.

Константин С. Сычев,
к.х.н., автор курсов, директор
Integrated BioSeparation Solutions OU,
www.hplc.today/rus

Общий курс ВЭЖХ. Разработка ВЭЖХ методик. Основы трансфера и валидации ВЭЖХ методик

3 дня: лекции, или

5 дней: лекции и практическая часть

Корпоративный курс «Общий курс ВЭЖХ. Разработка ВЭЖХ методик. Основы трансфера и валидации ВЭЖХ методик» является флагманским ВЭЖХ курсом компании; он читается на протяжении семи лет, его прослушали более 200 специалистов из более чем 30-ти компаний.

В отличие от других курсов, дающих отрывочные, плохо связанные между собой знания, данный курс дает целостную картину метода ВЭЖХ, который включает в себя более двух десятков возможных аналитических подходов, основанных на различных адсорбционных, эксклюзионных и смешанных режимах.

Курс предполагает, что за короткое время его слушатель научится:

- предсказывать поведение любого целевого соединения в любом ВЭЖХ режиме,
- пользоваться широким спектром ВЭЖХ колонок, правильно подбирая их под поставленную задачу,
- выбирать оптимальные скорость потока, длину колонки и диаметр частиц адсорбента,

- быстро оценивать качество разделения и находить слабые места в сторонних методиках,
- понимать логику разработки методик, использовать ее в трансфере и валидации.

Курс может дополнительно включать 2 дня практикума, и именно в таком виде он приобрел наибольшую популярность. Секрет успеха 5-ти дневного формата заключается в том, что в течение 2 дней практикума авторы курса со слушателями стабильно разрабатывают по 2–3 оригинальных ВЭЖХ разделения, что фактически окупает все затраты. И это учитывая тот факт, что работа, как правило, ведется над наиболее проблематичными задачами, решить которые ранее своими силами участникам не удавалось.

Курс проводится на территории заказчика. Программу можно скорректировать с учетом специфики задач лаборатории. Количество участников не ограничено. Двухдневный практикум позволяет проводить разработку, трансфер, валидацию ВЭЖХ методик в режиме реального времени.

Современные тренды в разработке новых фармацевтических приложений

2 дня: лекции

Основная задача этого курса состоит в том, чтобы вывести разработчика ВЭЖХ методик за рамки канвы решений, характерных для 80-х годов прошлого века, в течение которых было создано большинство фармакопейных методик.

Слушатели курса получают представление о полном спектре современных прикладных подходов в ВЭЖХ, позволяющих повысить экономическую эффективность и качество разрабатываемых, а также оптимизируемых в процессе трансфера ВЭЖХ методик.

Отдельное место в курсе занимает разбор ряда «привычных», но при этом архаичных решений и подходов, ограничивающих разработчика в своей профессиональной деятельности. Ведь главный принцип разработки гласит, что методика должна создаваться исходя из специфики задачи, а не исходя из решений, к которым привык аналитик.

Решение проблем при трансфере ВЭЖХ методик

5 дней: лекции и практическая часть

Фармацевтические предприятия часто сталкиваются с тем, что методики анализа фармацевтических субстанций или лекарственных форм, полученных от поставщиков, взятых из литературных источников или из фармакопеи, воспроизводятся плохо, или не воспроизводятся совсем.

В большинстве случаев методики не воспроизводятся по причине отличия фактических условий анализа, однако в ряде случаев они могут быть изначально нерабочими, фиктивными.

Новый корпоративный курс-практикум «Решение проблем при трансфере ВЭЖХ методик» позволяет в короткие сроки отработать прикладные навыки трансфера ВЭЖХ методики — от анализа ее исходного текста до диагностики проблем и выполнения корректирующих действий.

В курсе рассмотрены подходы и для значительной коррекции методик (в рамках, допустимых фармакопеей), и для тонкой настройки хроматографической системы для достижения требуемых параметров: разрешения, симметрии пиков и чувствительности.

70 % курса занимает прикладная часть курса. «Подводные камни» трансфера ВЭЖХ методик в обращенно-фазовой, ион-парной, гидрофильной (HILIC) и ионной хроматографии разбираются на конкретных примерах в режиме реального времени.

Курс будет интересен специалистам лабораторий исследований и разработок, лабораторий ОКК фармацевтических предприятий, а также лабораторий контроля качества лекарственных средств.

Практическое владение подходами к решению проблем при воспроизведении ВЭЖХ методик позволяет предприятиям существенно ускорять сроки и снижать риски при постановке на производство и регистрацию новых препаратов.

Курс проводится на территории заказчика. Программу можно скорректировать с учетом специфики задач лаборатории. Количество участников не ограничено.

Применение метода ВЭЖХ в лабораториях ОКК. Правильная эксплуатация ВЭЖХ оборудования и колонок. Основы трансфера и валидации ВЭЖХ методик

2 дня: лекции

Корпоративный курс «Применение метода ВЭЖХ в лабораториях ОКК. Правильная эксплуатация ВЭЖХ оборудования и колонок. Основы трансфера и валидации ВЭЖХ методик» обновлен в 2018 году; он основан на двух ранее отдельных курсах, которые читались на протяжении более пяти лет.

Курс включает в себя ответы на наиболее актуальные вопросы, возникающие в процессе каждодневной работы в любой лаборатории ОКК. Дополнительную остроту поднимаемым в курсе темам придает существование в этой области огромного числа мифов, многие из которых до сих пор успешно поддерживаются как поставщиками оборудования и колонок, так и многими авторитетными печатными источниками и авторами курсов.

По отзыву одной из слушательниц, «все, что Вы говорите, подтверждается нашими наблюдениями, и идет полностью вразрез со всем, что мы когда-либо слышали от сервис-инженеров и на других курсах».

Правильная эксплуатация ВЭЖХ оборудования и колонок приводит к огромной экономии средств вследствие сокращения непроизводительных издержек, а корректно проводимые трансфер и валидация значительно сокращают время внедрения новых аналитических методик.

Данный курс будет интересен не только сотрудникам лабораторий ОКК, но и регистраторам лекарственных средств. Курс проводится на территории заказчика. Программу можно скорректировать с учетом специфики задач лаборатории. Количество участников не ограничено.

Стандартная программа курса «Общий курс ВЭЖХ. Разработка ВЭЖХ методик. Основы трансфера и валидации ВЭЖХ методик»

1. Специфичность ВЭЖХ методики. Специфичность хроматографического разделения и специфичность детектирования.

2. Обзор способов детектирования в ВЭЖХ. Оптические, испарительные, электрохимические и масс-селективные детекторы,

их специфичность и области применения. В каких случаях, и каким образом оптимизируют условия детектирования.

3. Классификация хроматографических методик согласно их назначению. Таргетные и нетаргетные методики. Изократический и градиентный способы элюирования.

4. Основные параметры ВЭЖХ разделения. Факторы, определяющие разрешение пары пиков.

5. Оптимальное удерживание. Оптимальная селективность. Оптимальная эффективность.

6. Три этапа разработки ВЭЖХ методики.

7. Базовые адсорбционные (RP, NP, HILIC, IC, CT, IEC) и эксклюзионные (SEC, IEX) режимы жидкостной хроматографии.

8. Смешанные режимы, часто применяющиеся при анализе фармацевтиков: RP/HILIC, RP/IC, RP/CT, RP/SEC, HILIC/IC, NP/CT.

9. Прогнозирование хроматографического поведения соединения в каждом из хроматографических режимов по его структурной химической формуле.

10. Прогнозирование порядка элюирования в базовых и смешанных режимах, часто применяющихся при анализе фармацевтиков.

11. Обратный-фазовый (RP) механизм удерживания. Регулирование удерживания и селективности в обратном-фазовом режиме. Преимущества и недостатки обратного-фазовой хроматографии.

12. Нормально-фазовый (NP) и гидрофильный (HILIC) механизмы, их сходства и различия. Регулирование удерживания и селективности в нормально-фазовом режиме. Преимущества и недостатки нормально-фазовой хроматографии.

13. Регулирование удерживания и селективности в гидрофильном (HILIC) режиме. Мифы, связанные с гидрофильным режимом. Как разработать робастное гидрофильное разделение.

14. Ионный (IC) механизм удерживания. Регулирование удерживания и селективности в ионном режиме. Преимущества и недостатки ионной хроматографии. Как разработать MS-совместимую методику в ионном режиме.

15. Обзор коммерчески доступных неподвижных фаз для ВЭЖХ.

16. Современные тренды в разработке неподвижных фаз для ВЭЖХ. НФ для работы в смешанных режимах. Поверхностно-пористые НФ, их преимущества и недостатки.

17. Тестирование ВЭЖХ колонок. Измерение их эффективности, химической инертности, величины удерживания по доминирующему

механизму и типа проявляемой селективности. Тесты для обращенно-фазовых и гидрофильных/ионных НФ.

18. Подбор ВЭЖХ колонки, «аналогичной данной».

19. Теория скоростей и уравнение Ван-Деемтера. Гидродинамика ВЭЖХ колонки и закон Дарси.

20. Как выбрать оптимальную скорость потока. Эффективность-оптимальная, средневзвешенная и производительность-оптимальная скорости потока.

21. Как выбрать оптимальную длину колонки и размер частиц.

22. Обеспечение прослеживаемости ВЭЖХ измерения. Основы трансфера ВЭЖХ методик.

23. Основы валидации ВЭЖХ методик. Валидационные характеристики.

24. Неоднозначная зависимость успеха валидации ВЭЖХ методики от выполнения критериев пригодности хроматографического разделения.

25. Взаимосвязь валидационных характеристик. Правильность как комбинация специфичности, линейности и прецизионности. Связь правильности и предела определения с нижней границей рабочего диапазона.

26. Различные способы установления специфичности определения.
День 4 и 5: Практикум: разработка и оптимизация ВЭЖХ методик.

Стандартная программа курса «Применение метода ВЭЖХ в лабораториях ОКК. Правильная эксплуатация ВЭЖХ оборудования и колонок. Основы трансфера и валидации ВЭЖХ методик»

1.1. Что подразумевается под “качеством” колонки. Какую колонку можно считать качественной.

1.2. Как производят ВЭЖХ колонки.

1.3. Какие признаки свидетельствуют о нарушениях в технологии упаковки колонок.

1.4. В каких случаях можно попытаться заменить плохо упакованную колонку у производителя.

1.5. Как обезопасить себя от покупки плохо изготовленной колонки.

1.6. Какими параметрами характеризуется качество адсорбента.

2.1. Как начинать работу с новой обращенно-фазовой колонкой.

2.2. Какого объема подвижной фазы достаточно для кондиционирования новой обращенно-фазовой колонки.

2.3. Чем промывать обращено-фазовые колонки. Миф: колонку необходимо часто промывать, тогда она проживет дольше.

2.4. Можно ли сократить время, затрачиваемое на промывки колонок.

2.5. Какие предосторожности необходимо соблюдать при промывке колонок.

2.6. В чем следует хранить обращено-фазовые колонки.

2.7. От чего обращено-фазовые колонки выходят из строя. Как надежно установить, что колонка вышла из строя и не подлежит восстановлению.

2.8. Причины естественного износа обращенных фаз. Средние сроки эксплуатации колонок на силикагельной и полимерной основах различного типоразмера.

2.9. Способы продления срока эксплуатации колонок.

2.10. Можно ли регенерировать обращено-фазовые колонки. Миф: в любом случае колонку можно регенерировать, если делать это правильно.

2.11. Можно ли работать на “перевернутых” колонках.

3.1. Устранение проблем (troubleshooting). Основные принципы поиска источника проблемы/неисправности.

3.2. Что делать, если пик уширился и/или расщепился. Факторы, определяющие дополнительное уширение и расщепление хроматографических пиков. Мертвые объемы. Перегрузка объемом пробы и количеством вещества. Правильная сборка жидкостной системы. Типы капилляров и фитингов, их правильное применение.

3.3. Отчего времена удерживания бывают нестабильны. Как бороться с нестабильностью времени удерживания.

3.4. Что делать, если площадь пика не воспроизводится.

3.5. Как бороться с “лишними” пиками на хроматограмме. Миф: если на хроматограмме наблюдаются лишние пики — необходимо промыть колонку.

3.6. Что делать, если ожидаемые пики не наблюдаются.

4.1. Что делать, если не работает насосная система

4.2. Почему случаются течи из узлов жидкостной системы. Как с ними бороться

4.3. Повышенное давление в системе: опасно ли это. Как бороться с повышенным давлением

- 4.4. Что делать, если капилляр выбивает из колонки
- 4.5. Причины высоких шумов (при применении УФ детектирования). Как бороться с высоким шумом
- 4.6. Причины дрейфа базовой линии (при применении УФ детектирования). Как бороться с высоким дрейфом
5. Обеспечение прослеживаемости ВЭЖХ измерения. Основы трансфера ВЭЖХ методик.
6. Основы квалификации ВЭЖХ оборудования. Типовые тесты основных узлов ВЭЖХ комплекса.
7. Квалификация протокола обработки данных. Различия в расчете параметров разделения (отношение сигнал/шум, эффективность, асимметрия, разрешение) по стандартному набору формул и формулам EP/USP.
8. Тестирование ВЭЖХ колонок. Измерение их эффективности, химической инертности, величины удерживания по доминирующему механизму и типа проявляемой селективности. Тесты для обращенно-фазовых и гидрофильных/ионных НФ.
9. Основы валидации ВЭЖХ методик. Валидационные характеристики.
10. Специфичность. Протокол валидации специфичности. Различные способы установления специфичности определения.
11. Робастность. Особенности валидации робастности. Протокол валидации робастности. Упущения при валидации робастности как одна из основных причин отсутствия воспроизводимости ВЭЖХ методик.
12. Подтверждение линейности. Определение пределов обнаружения/определения. Способы уменьшения пределов обнаружения/определения.
13. Критерии пригодности хроматографического разделения. Неоднозначная зависимость успеха валидации ВЭЖХ методики от выполнения критериев пригодности хроматографического разделения. Как на практике выглядит пригодное ВЭЖХ разделение.
14. Взаимосвязь валидационных характеристик. Правильность как комбинация специфичности, линейности и прецизионности. Связь правильности и предела определения с нижней границей рабочего диапазона.

**Порядок проведения квалификации ВЭЖХ
оборудования специалистами компании IBS**
www.hplc.today/rus, sales@hplc.today

Обозначения:

Обычный шрифт — стандартная процедура.

Курсив — опциональная процедура.

Operational Qualification

Насосная система

1. Точность задания скорости потока (на одной скорости / *трех скоростях потока*).
2. Стабильность потока (по временам удерживания, на одной скорости / *трех скоростях потока*).
3. *Линейность скорости потока.*

В т.ч. **градиентная система** (если есть в наличии):

4. Точность задания градиента (один шаг / *различные шаги*).
5. Время задержки градиента.
6. *Повторяемость времени элюирования в градиентном режиме.*

Детектор УФ

7. Точность установки длины волны (диодно-матричный / *одно- или мультисканальный*).
8. Шум. 9. Дрейф. 10. Предел определения. 11. *Линейность.*

Инжектор автоматический

12. Повторяемость инжектирования
13. Точность инжектирования
14. Линейность инжектирования
15. Керри-овер (стандартное вещество и стандартная промывка / нестандартное вещество и нестандартная промывка).

Инжектор ручной

12. Повторяемость инжектирования.
13. Точность инжектирования.
14. Линейность инжектирования.
15. Керри-овер (стандартное вещество и стандартная промывка / нестандартное вещество и нестандартная промывка).

Жидкостная система

16. Качество сборки жидкостной системы.

Термостат колонки

17. Точность установки температуры (по центру / в трех точках)
18. Стабильность поддержания температуры

Термостат автосамплера

19. Точность установки температуры, нагревание
20. Точность установки температуры, охлаждение

Performance Qualification

Проверка протокола обработки данных

1. Проверка способа расчета разрешения
2. Проверка способа расчета асимметрии
3. Проверка способа расчета эффективности
4. Проверка способа расчета отношения сигнал/шум в стандартных / нестандартных условиях хроматографирования

Тестирование обращенно-фазовых ВЭЖХ колонок

1. Стандартный тест на эффективность (качество упаковки)
2. Измерение относительной величины гидрофобности
3. Установление типа химии обращенной фазы по двухпараметровому тесту селективности
4. Установление относительной величины химической инертности

Тестирование ВЭЖХ колонок для гидрофильной / ионной хроматографии на основе силикагеля

1. Стандартный тест на эффективность в нормально-фазовом режиме (качество упаковки)
2. Перевод ВЭЖХ колонки в гидрофильный/ионный режим хроматографии
3. Измерение относительной величины гидрофильности (удерживания в гидрофильном режиме)
4. Установление знака и относительной величины электрического заряда неподвижной фазы
5. Тест на эффективность в гидрофильном режиме
6. Тест на эффективность анионита в ионном режиме
7. Тест на эффективность катионита в ионном режиме

Процессы, оцениваемые экспертом компании IBS при проверке готовности аналитической лаборатории к GMP инспекции

www.hplc.today/rus, sales@hplc.today

Приведенный ниже список содержит перечень процессов в аналитической лаборатории, которые могут быть проверены экспертом при проведении полной проверки готовности аналитической лаборатории к GMP инспекции. Тем не менее, в каждом конкретном случае план проведения проверки специально оговаривают с заказчиком, а проверку проводят по заранее утвержденному плану.

Работа по пунктам 1–9 проводится удаленно; работа по пункту 10 проводится при личном визите эксперта в аналитическую лабораторию.

1.0 Общая информация

- 1.1 Адрес, мейл, телефон контактного лица.
- 1.2 Сертификат национальной аккредитации (если имеется).
- 1.3 Имеются ли анализы, выполняемые на аутсорсинге? Если да, будут запрошены контрактные договора.

2.0 Система качества

- 2.1 Проводятся ли внутренние аудиты? С какой частотой, кем? Как осуществляются корректирующие действия? Если да, то будет запрошен последний отчет.
- 2.2 Имеется ли СОП на “Out of specification/Out of trend results” и на “Deviations”? Будет запрошена документация на одно или несколько исследований.
- 2.3 Как осуществляется “Change control”?

- 2.4 Как проходит обучение и квалификация работников? Будет запрошена документация, в частности, план обучения и СОП. Каким образом проверяется эффективность обучения?
- 2.5 Имеется ли СОП на валидацию аналитических методик? Определены ли критерии приемлемости на каждый раздел валидации? Будут запрошены один или несколько отчетов валидации и проверено его/их соответствие СОПу. Кто подписывает отчеты о валидациях? Где хранятся хроматограммы?

3.0 Документация

- 3.1 Имеются ли спецификации на каждый тестируемый продукт?
- 3.2 Как обеспечивается контроль того, чтобы лаборанты работали по текущей версии СОПа? (в случае фармакопейной методики — по текущей фармакопее?)
- 3.3 Будут запрошены следующие СОПы: на отбор проб исходных материалов, общие требования к хроматографическому анализу, инструкции по работе с оборудованием, запись в лабораторном журнале, хроматографические колонки, стандарты, реагенты, растворы, сохранённые образцы, получение и запись лабораторных образцов, тесты на устойчивость, результаты вне спецификаций, отклонения, чистка лабораторной посуды, техники безопасности, валидации аналитических методик, тренинг персонала и т.д.
- 3.4 Будут запрошены несколько аналитических методик. Будет оценено насколько детально и доступно описаны процедуры.
- 3.5 Будет проверено наличие журналов аналитического оборудования, и как они ведутся.
- 3.6 Как регистрируются входящие образцы? Есть ли возможность отследить, где находится образец в данное время?
- 3.7 Кто проверяет лабораторные журналы? Прошел ли он/она соответствующую квалификацию? Как хранится “raw data”, например, хроматограммы?

4.0 Помещения и оборудование

- 4.1 Проводится ли мониторинг температуры и влажности в лабораторных помещениях?
- 4.2 Проводится ли мониторинг температуры/влажности критических зон и оборудования, например камер для проверки на устойчивость,

холодильников и т.д.? Имеется ли система сигнализации на случай отклонения от заданных параметров?

- 4.3 В каких условиях хранятся образцы, реагенты и стандарты?
- 4.4 Имеется ли список/файл основного оборудования? Будет проверено наличие наклеек четко определяющих статус приборов.
- 4.5 Как и кем осуществляется обслуживание оборудования? Производится ли превентивное обслуживание? Если да, то с какой частотой? Соответствует ли СОПу? Документируется ли обслуживание в журнале оборудования?
- 4.6 Имеется ли у каждого работника свой персональный вход в программу контролируемую ВЭЖХ/ГХ? Какие привилегии имеются у лаборантов, руководителя лаборатории и т.д.? Как осуществляется бэкап? Имеется ли соответствующая процедура?
- 4.7 Как моется лабораторная посуда? Валидирован ли процесс? Если да, будет запрошен отчет о валидации.

5.0 Материалы

- 5.1 Имеется ли файл/список лабораторных реагентов? Имеется ли сертификат анализа и паспорт безопасности на каждое вещество?
- 5.2 Как производится учёт и контроль за реагентами? Наклейки, фиксируется ли дата получения, открытия контейнера, выбрасывания, как определяется срок годности? Соответствует ли написанному в СОПе? Хранятся ли сертификаты утилизированных реагентов?
- 5.3 Как хранятся стандарты? Имеется ли мониторинг и сигнализация в местах их хранения? Какие типы стандартов используются (первичные, рабочие и т.д.)? Какие тесты производятся для квалификации рабочих стандартов? Если соответствующий СОП? Каким образом определяется “potency” стандарта? Будет запрошен отчет о квалификации одного или нескольких стандартов.
- 5.4 Какая вода используются для приготовления растворов в лаборатории и для приготовления мобильных фаз для ВЭЖХ? Если имеется аппарат по производству воды, каким образом осуществляется мониторинг ее качества? Будет запрошен отчет о квалификации.
- 5.5 Как долго хранятся растворы? Зависит ли срок хранения от типа раствора? Понятно ли они обозначены? Соответствует ли обозначение и сроки годности СОПу?

6.0 Образцы

- 6.1 Как осуществляется отбор образцов для анализа (исходные материалы, промежуточные, конечный продукт)? В какие контейнеры? Определены ли наклейки? Определено ли специальное место для отбора? Кто авторизован осуществлять отбор? Есть ли процедура очистки после отбора? Имеется ли соответствующий СОП?
- 6.2 Как определяются количества вещества/продукта для отбора?
- 6.3 Отбираются ли сохраненные образцы? Как долго они хранятся? Какое количество отбирается? В какие контейнеры и с какими наклейками? Соответствует ли это СОПу, если таковой имеется?
- 6.4 Как долго хранятся образцы перед анализом? В каких условиях? Имеется ли мониторинг температуры?

7.0 Анализ

- 7.1 Как тестируются исходные материалы? Будут запрошены аналитические процедуры и спецификации. Какова общая политика тестирования: идентификация или полный монограф? Где это записано? Есть ли процедура по утверждению поставщиков исходных материалов? Проводился ли аудит у этих поставщиков? Если да, то будет запрошен один из отчетов.
- 7.2 На какой стадии отбирается конечная продукция для анализа? Какие тесты имеются для конечной упаковки? Как определяется репрезентативное количество образцов из серии?
- 7.3 Какова политика отбора и анализа промежуточных образцов и образцов в процессе?
- 7.4 Как осуществляются проверки на устойчивость конечной продукции? Имеется ли мониторинг и сигнализация на камеры? Калиброваны ли сенсоры температуры и влажности? Будет запрошен отчет о калибровке. Имеется ли журнал у каждой камеры? Ведётся ли учёт входящих и исходящих образцов? Будет запрошен один ли несколько протоколов и отчётов по устойчивости. Является ли методика проверки на устойчивость “stability indicating”? Будет запрошен отчет о валидации одной или нескольких методик.
- 7.5 Как производятся титрации? Визуально или с помощью автоматического титратора? Если визуально, были ли персонал обучен? Задokumentировано ли это? Есть ли СОП по приготовлению растворов индикаторов?

- 7.6 Измеряется ли содержание влаги в образцах методом Карла Фишера? Если да, как определяется титр? Есть ли СОП?
- 7.7 Как тестируется рН и проводимость? При какой температуре? Имеется ли автоматическая регулировка температуры?
- 7.8 Как контролируется температура при измерениях показателя преломления и относительной плотности?

8.0 Результаты тестов

- 8.1 Кто проверяет записи в лабораторном журнале? Квалифицирован ли он/она? Каким образом была проведена квалификация?
- 8.2 Имеется ли LIMS? Если да, валидирован ли он? Кто авторизован пользоваться и на каком уровне?
- 8.3 Имеется ли СОП на результаты вне спецификаций? Будут запрошены одно или несколько расследований и проверено на соответствие СОПу. Не происходит ли “testing into compliance”? На каком этапе задействован отдел обеспечения качества (QA)? Как и кем определяется количество репликатов в случае повторного анализа? В каких случаях проводится повторный отбор? Кто принимает решение об отмене первоначальных результатов? В случае лабораторной ошибки, какие предотвращающие действия проводятся? Кто контролирует их исполнение?
- 8.4 Имеется ли СОП на обработку и округление численных результатов? Будет проверено как “raw data” переходит в результат в сертификате, и соответствует ли этот процесс СОПу, если он есть.

9.0 Квалификация приборов

- 9.1 Имеется ли СОП на квалификацию ВЭЖХ (ГХ) оборудования? Каков интервал между квалификациями? Каковы критерии приемлемости? Документируются ли квалификации в журнале оборудования? Кто проводит квалификацию (фирма-поставщик, работники предприятия, лаборанты)? Кто проверяет отчеты о квалификации? Будут запрошены один или несколько отчетов. Было ли проведено IQ/OQ перед началом использования?
- 9.2 Проходят ли весы периодическую квалификацию? Какова минимальная навеска взвешиваемая в лаборатории? Проводится ли верификация весов со стандартными гирьками? Если да, с какой частотой? Находятся ли веса гирек в диапазоне шкалы весов? Сертифицированы ли гирьки? Проходят ли они периодическую квалификацию? Будет запрошена соответствующая документация.

- 9.3 Проходит ли рН-метр периодическую квалификацию? Соответствуют ли буферы для стандартизации рН-электрода значениям рН измеряемых образцов?
- 9.4 Также будут проверены процедуры внешних и внутренних квалификаций других аналитических приборов: температуры плавления, поляриметра, приборов по растворению и распадению таблеток, различных спектрометров, ООУ и т.д.

10.0 Заключительная часть

В заключение будет детально проверен один или несколько анализов. Будет проверен тренинг и квалификация лаборантов, выполнявших анализ, статус всех приборов, реагентов, растворов, стандартов в момент анализа. Будут проверены записи в лабораторном журнале на соответствие написанному в методике/монографии. При необходимости будут запрошены отчеты о квалификации конкретных приборов и любая другая необходимая документация.

Готовые ВЭЖХ решения IBS Pharm™ и IBS Nutri™
www.hplc.today/rus, sales@hplc.today

Готовые ВЭЖХ решения *IBS Pharm* и *IBS Nutri* поставляются с ВЭЖХ колонкой и одним или несколькими специализированными ВЭЖХ приложениями. Специализированные приложения предназначены для решения типовых отраслевых аналитических задач, которые возникают: в фармацевтике, биотехнологиях, сельском хозяйстве, пищевой, химической, нефтяной и энергетической промышленности.

Отличительные черты готовых ВЭЖХ решений *IBS Pharm* и *IBS Nutri*

1. Для всех решений *IBS Pharm* и *IBS Nutri* применен исключительно режим изократического элюирования, который обеспечивает высокую робастность (надежность) ВЭЖХ разделений и возможность использования различных специфичных режимов ВЭЖХ в дополнение к «стандартному» неспецифическому обращено-фазовому режиму.
2. Превосходная специфичность разделения значительно снижает вероятность негативного влияния матрицы образца на ВЭЖХ

разделение, что позволяет применять неспецифичные, но широко распространенные УФ и рефрактометрические детекторы даже в случае сложных образцов.

3. Широкое применение ионного (IC), гидрофильного (HILIC), переносно-зарядного (CT), ион-эксклюзионного (IEC) и смешанных режимов обеспечивает превосходную специфичность разделения, а в некоторых случаях дает возможность существенно сократить процедуру пробоподготовки образца.
4. Упор на применение длинных и эффективных колонок, заполненных полностью пористыми частицами, обеспечивает высокую нагрузочную способность в каждом из решений и, следовательно, возможность анализировать образцы, которые содержат целевые соединения в различных концентрациях, в условиях перегрузки колонки.
5. Готовые ВЭЖХ решения *IBS Pharm* и *IBS Nutri* могут быть опционально настроены специалистами компании на анализ конкретных объектов заказчика.

Список готовых ВЭЖХ решений *IBS Pharm*

АН: Антигипертензивные препараты.

МА: Комбинации основных фармацевтиков.

СМ: Фармацевтические комбинации, содержащие парацетамол, кофеин и фенобарбитал.

IN: Нестероидные противовоспалительные препараты.

НС: Антигистаминные и родственные фармацевтики.

Список готовых ВЭЖХ решений *IBS Nutri*

PS: Подсластители, консерванты и азокрасители в напитках.

BS: Консерванты в жиросодержащих пищевых продуктах.

A: Органические фруктовые кислоты.

AA: Добавленные аминокислоты в премиксах.

NA: Натуральные формы витаминов B1 и B3 в продуктах питания.

BA: Водорастворимые витамины в пищевых добавках и премиксах.

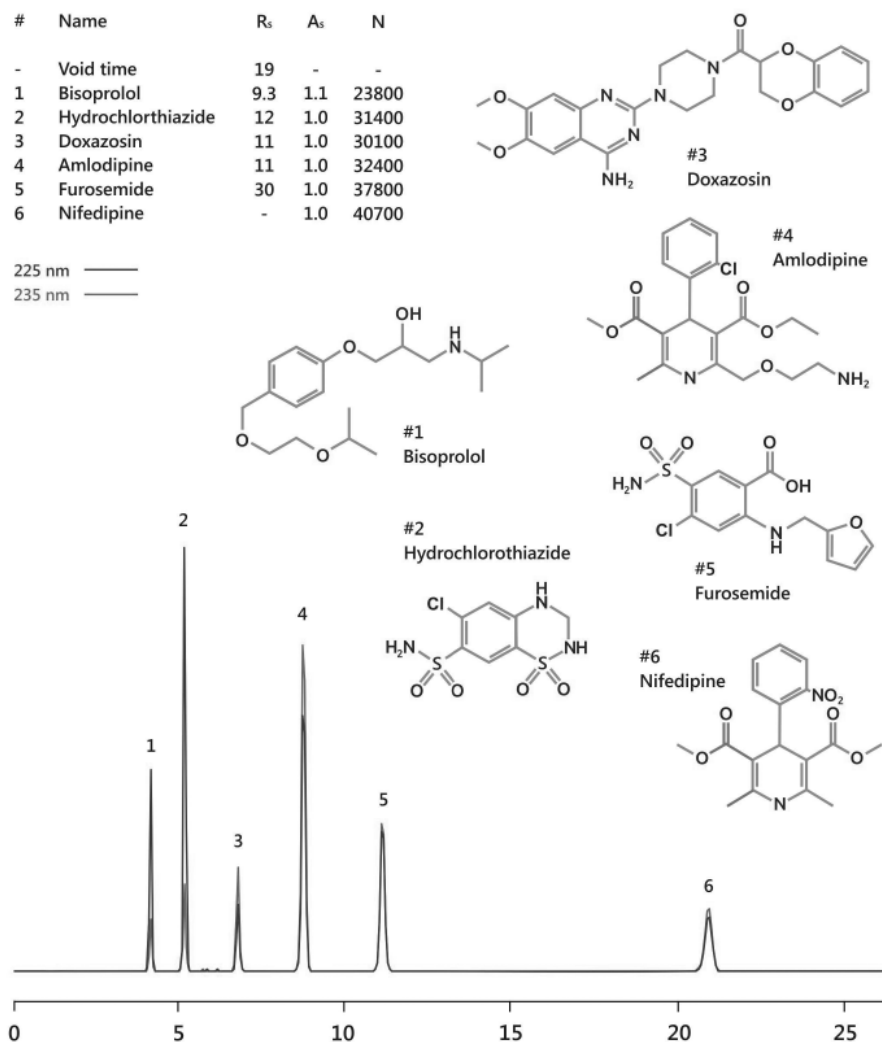
AF: Витамины C и B9 в пищевых добавках и премиксах.

H: Витамины H и B5 в пищевых добавках и премиксах.

BET: Бетаины и витамин B1 в пищевых добавках и премиксах.

Примеры специализированных ВЭЖХ приложений IBS Pharm и IBS Nutri

Изократическое разделение смеси антигипертензивных соединений различных классов и диуретиков на неподвижной фазе IBS Pharm AH



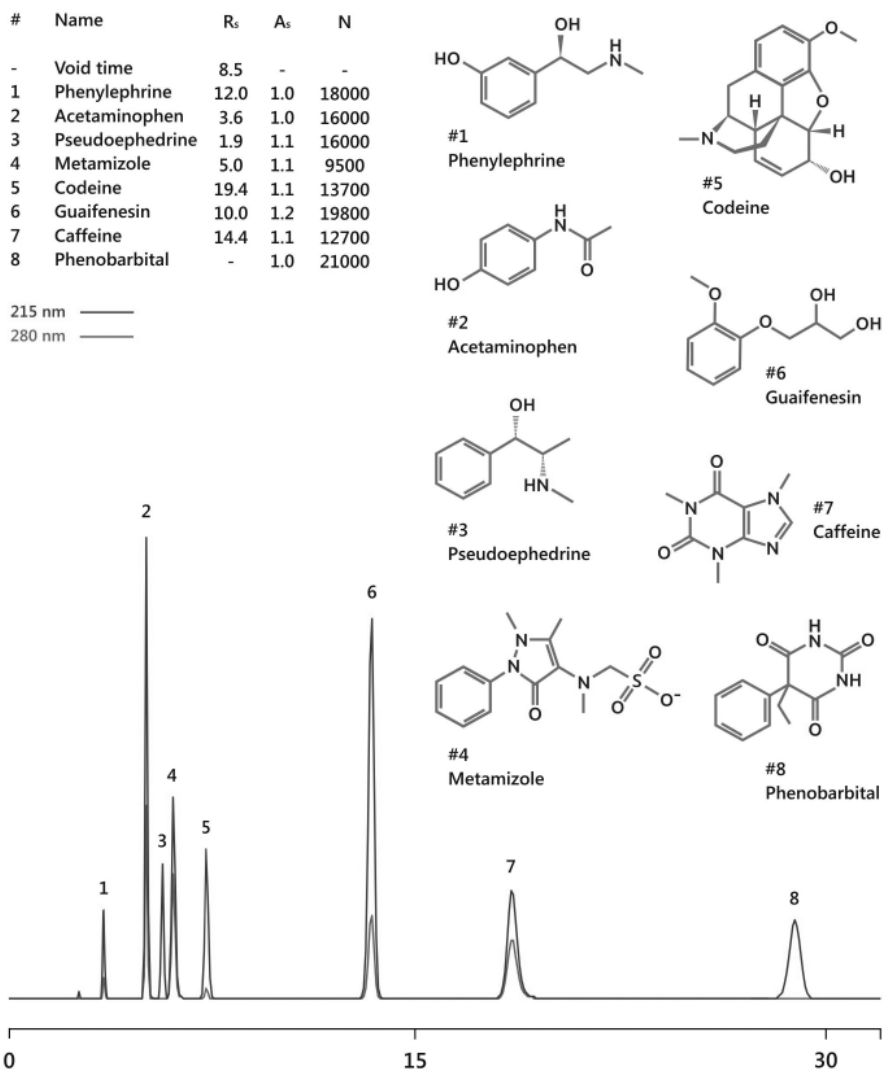
Неподвижная фаза: 250x4.6 IBS Pharm AH

Подвижная фаза: Ацетонитрил-(50 мМ NH₄H₂PO₄ + 0.1 % H₃PO₄) 35:65

Скорость потока: 1.0 мл/мин

Температура колонки: 25 °С

Изохроматическое разделение смеси соединений, в различных комбинациях составляющих противопродные препараты, на неподвижной фазе IBS Pharm CM



Неподвижная фаза: 250x4.6 IBS Pharm CM

Подвижная фаза: Ацетонитрил-(50 мМ NH₄H₂PO₄) 20:80

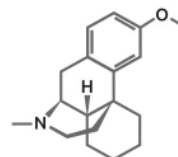
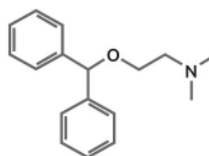
Скорость потока: 1.0 мл/мин

Температура колонки: 25 °С

Изократическое разделение смеси одноосновных азотистых
фармацевтиков на неподвижной фазе IBS Pharm MA

#	Name	R _s	A _s	N
1	Salmeterol	10.2	1.0	21400
2	Drotaverine	9.3	1.1	24700
3	Diphenhydramine	9.2	1.1	28700
4	Dextromethorphan	6.6	1.2	26600
5	Pseudoephedrine	9.5	1.15	29400
6	Codeine	-	1.1	30000

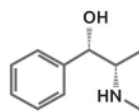
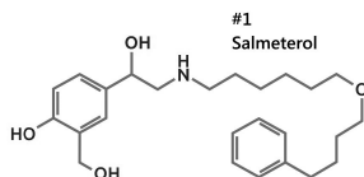
#3
Diphenhydramine



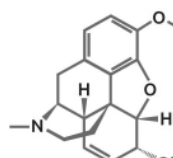
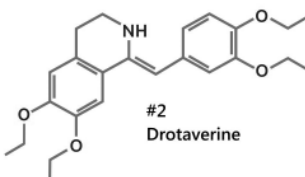
#4
Dextromethorphan

SP: IBS Pharm MA, 250x4.6 3µm
MP: Acetonitrile-Methanol-Buffer 35:15:50,
Buffer = 50mM NH₄H₂PO₄ + 0.2% H₃PO₄
F: 0.8 mL/min
T: 45 °C

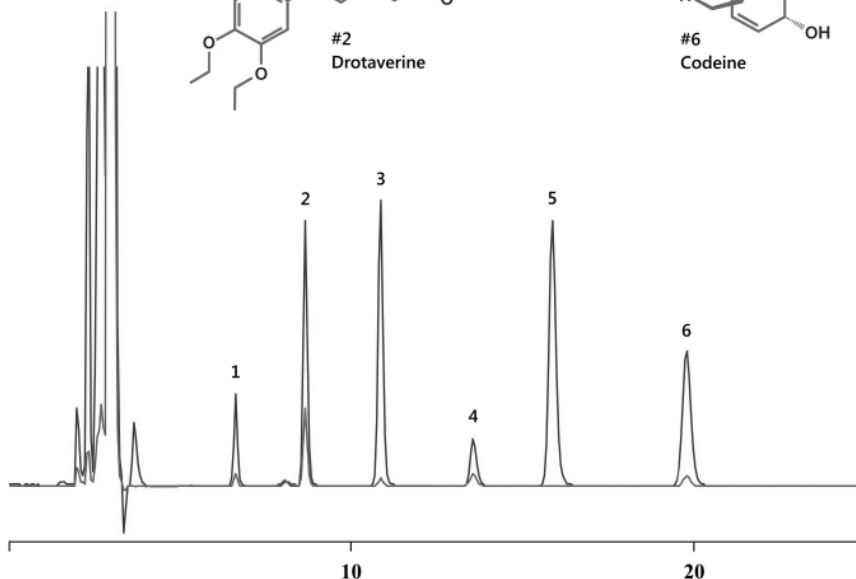
215 nm —
280 nm —



#5
Pseudoephedrine



#6
Codeine



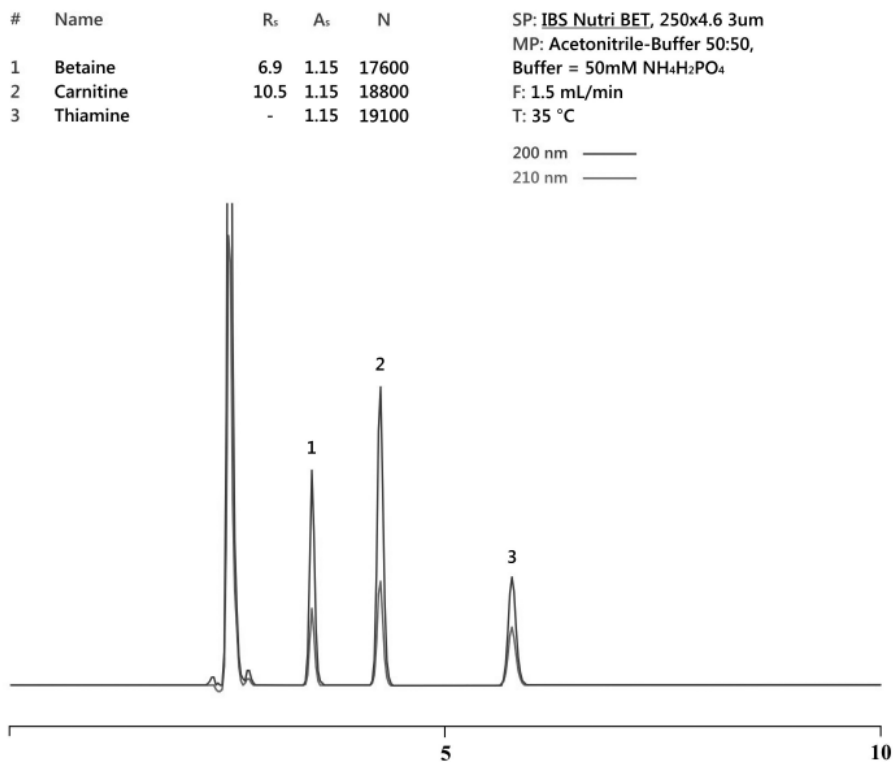
Неподвижная фаза: 250x4.6 IBS Pharm MA

Подвижная фаза: Ацетонитрил-Метанол-(50 мМ NH₄H₂PO₄ + 0.2 % H₃PO₄) 35:15:50

Скорость потока: 0.8 мл/мин

Температура колонки: 45 °C

Высокоселективное изократическое разделение бетаина, карнитина и тиамина (витамин В1) на фоне комплексного витаминного препарата на неподвижной фазе IBS Nutri BET



Неподвижная фаза: 250x4.6 IBS Nutri BET

Подвижная фаза: Ацетонитрил-(50 мМ NH₄H₂PO₄) 50:50

Скорость потока: 1.5 мл/мин

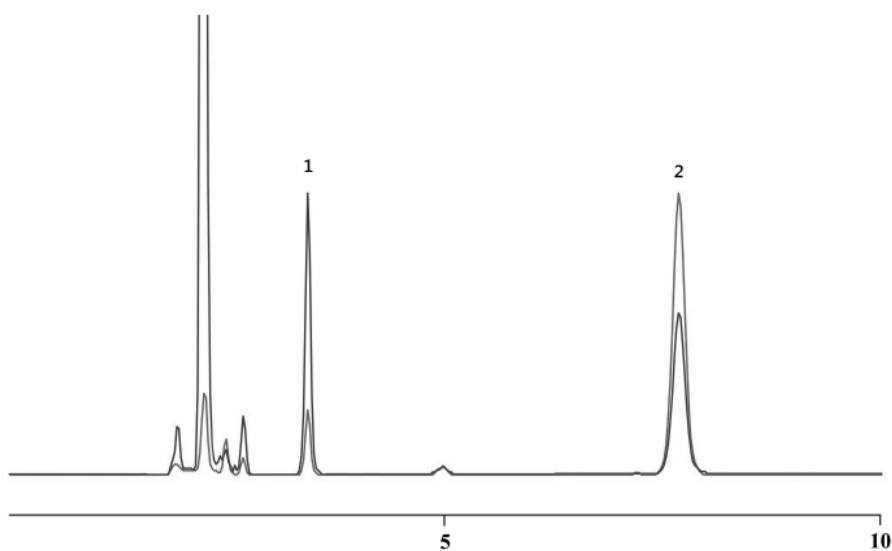
Температура колонки: 25 °C

Высокоселективное изократическое разделение витаминов С и В9 на фоне комплексного витаминного препарата на неподвижной фазе IBS Nutri AF

#	Name	R _s	A _s	N	SP: IBS Nutri AF, 250x4.6 3um
1	Ascorbate (C)	23	1.0	15700	MP: Acetonitrile-Buffer 50:50,
2	Folate (B9)	-	1.0	13700	Buffer = 50mM NH ₄ H ₂ PO ₄

F: 1.5 mL/min
T: 35 °C

260 nm —
290 nm —



Неподвижная фаза: 250x4.6 IBS Nutri AF

Подвижная фаза: Ацетонитрил-(50 мМ NH₄H₂PO₄) 50:50

Скорость потока: 1.5 мл/мин

Температура колонки: 25 °C

Константин Сергеевич Сычев

**Подготовка пробы
для газовой и жидкостной хроматографии**

Редактор: *К.С. Сычев*

Формат 70x108/16. Тираж: 1000 экз.