

КОНЦЕНТРИРУЮЩИЕ ПАТРОНЫ ДИАПАК

Выпуск 2

*Г.Г.Васияров, Г.С.Алексеева
(под редакцией д.х.н. С.М.Старовой)*

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
1. МЕТОД ТВЕРДОФАЗНОЙ ЭКСТРАКЦИИ.....	4
2. КОНЦЕНТРИРУЮЩИЕ ПАТРОНЫ ДИАПАК	7
3. ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ВЫБОРА ПАТРОНА.....	9
3.1. Концентрирование и очистка неполярных соединений	9
3.2. Концентрирование и очистка ионогенных соединений.....	11
3.3. Концентрирование и очистка полярных соединений	15
3.4. Концентрирование неорганических соединений	18
3.5. Фракционирование соединений методомэксклюзионной ТФЭ	19
4. УКАЗАНИЯ ПО РАБОТЕ С ПАТРОНАМИ ДИАПАК	20
5. РЕКОМЕНДАЦИИ ПО СОЗДАНИЮ МЕТОДИК ПРОБОПОДГОТОВКИ	21
5.1. Общие вопросы создания методик.....	21
5.2. Применение ТФЭ в анализе объектов окружающей среды	22
5.3. Применение ТФЭ в фармацевтическом анализе	27
6. ВКЛЮЧЕНИЕ ТФЭ-СХЕМ ПРОБОПОДГОТОВКИ В СОСТАВ МЕТОДИК ВЫПОЛНЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ И МЕТРОЛОГИЧЕСКАЯ АТТЕСТАЦИЯ МЕТОДИК	32
7. ПРИМЕРЫ МЕТОДИК ПРОБОПОДГОТОВКИ	34
7.1. Подготовка проб для определения приоритетных фенолов в воде с использованием концентрирующего патрона ДИАПАК П [22].....	35
7.2. Подготовка проб для определения ионов переходных металлов в природных водах, молоке и молочных продуктах с использованием патрона ДИАПАК ИДК [14, 15]	35
7.3. Подготовка проб для определения синтетических красителей в окрашенных алкогольных напитках с использованием патрона ДИАПАК А [16]	36
7.4. Подготовка проб для определения афлатоксина М ₁ в молочных продуктах с использованием комплексной схемы на патронах ДИАПАК С16М и ДИАПАК С [17,18].....	37

7.5. Подготовка проб для определения патулина в осветленных соках и напитках, соках и напитках с мякотью и консистентных продуктах с использованием комплексной схемы на патронах ДИАПАК П-3 и ДИАПАК С [17, 18].....	38
7.6. Подготовка проб для определения дезоксиниваленола и Т-2 токсина в зерне и зернопродуктах с использованием комплексной схемы на патронах ДИАПАК АУ-3 и ДИАПАК Н (схема МТ-2 ДТ) [17-20].....	40
7.7. Подготовка проб для определения афлатоксина В ₁ и зеараленона в зерне, зернопродуктах и маслосодержащих продуктах с использованием комплексной схемы на патронах ДИАПАК А-3, П-3 и Н (ДИАПАК С для кукурузы и продуктов ее переработки) (схема МТ-2 АЗ) [17-19, 22]	41
7.8. Подготовка проб для определения хлорорганических пестицидов (ХОП) в зерне, зернопродуктах, плодовоощной и жиросодержащей продукции с использованием комплексной схемы на патронах ДИАПАК А-3, П-3 и С [23- 25]	43
7.9. Подготовка проб для определения полихлорированных бифенилов (ПХБ) в рыбе, рыбных и жировых продуктах с использованием комплексной схемы на патронах ДИАПАК А-3, П-3 и С [23, 24, 26]	44
7.10. Подготовка проб для определения бенз[а]пирена (БП) в пищевых продуктах, продовольственном сырье и почве с использованием комплексной схемы на патронах ДИАПАК А-3, П-3 и С [27]	45
7.11. Использование аминофазных патронов ДИАПАК для подготовки проб соков и гидролизатов растворимого кофе.....	46
ЛИТЕРАТУРА.....	48
ПРИЛОЖЕНИЕ	50

Введение

Современные физико-химические методы анализа, как например, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), газовая хроматография (ГХ), масс-спектрометрия (МС), спектрофотометрия (СФ) в видимой, ультрафиолетовой и инфракрасной областях, в подавляющем большинстве случаев требуют предварительной подготовки образца, включающей стадию очистки и/или концентрирования. Нет сомнения в том, что очистка образца от посторонних компонентов часто и в решающей степени повышает качество проводимого анализа, избавляет оператора от возможных ошибок, обусловленных маскирующим влиянием примесей. Кроме того, наличие в образце примесей, концентрация которых зачастую значительно превышает концентрацию определяемого компонента, может привести не только к ошибочным результатам, но и к сокращению срока службы аналитических инструментов, колонок для ВЭЖХ и ГХ. К объектам исследования, требующим предварительной очистки, относятся биологические ткани и жидкости, продовольственное сырье и пищевые продукты, корма, объекты окружающей среды (природные и сточные воды, воздух) и т.д.

Важнейшей операцией пробоподготовки является концентрирование следовых количеств определяемых компонентов. Принято считать, что компонент находится в следовых количествах, если его концентрация в другом веществе (или смеси), называемом матрицей, составляет величину порядка ppm (одна часть компонента на миллион частей матрицы, $10^{-4}\%$) или ppb (одна часть компонента на миллиард частей матрицы, $10^{-7}\%$). Однако часто возникает необходимость в определении соединений с концентрацией 10^{-7} – $10^{-10}\%$ (1 нг–1 пг определяемого вещества в 1 г матрицы) либо еще более низкой [1]. Такие уровни содержания вещества лежат вне пределов чувствительности самых современных аналитических приборов и для их определения необходимо повышать концентрацию пробы в десятки и сотни раз.

Особенно важен следовой анализ в тех случаях, когда речь идет о соединениях с высокой токсичностью, тератогенностью, канцерогенностью или мутагенностью. К таким веществам относятся микотоксины, полиароматические соединения (бенз[а]пирен и т.п.), полихлорированные диоксины, бифенилы и бензофураны, некоторые алкалоиды, тяжелые металлы и многие другие органические и неорганические соединения. Определение следовых количеств веществ также необходимо в клиническом анализе при диагностике заболеваний и терапевтическом контроле; в разработке, производстве и обороте лекарственных средств.

1. Метод твердофазной экстракции

Многие годы основными методами выделения, очистки и концентрирования веществ являлись жидкостная экстракция, осаждение, центрифугирование, колоночная и тонкослойная хроматография. Подготовка образцов с помощью указанных методов – это длительный и многоступенчатый процесс, требующий расхода большого количества особо чистых (не привносящих примесей!) растворителей и реактивов, дополнительного оборудования и значительных трудозатрат. При исследовании объектов окружающей среды не обойтись также без отбора большого количества пробы, ее консервации и скорейшей доставки в стационарную лабораторию для проведения пробоподготовки и последующего анализа. Все эти операции существенно усложняют и удорожают анализ. Кроме того, перед исследователем подчас возникают трудноразрешимые проблемы, связанные с недостаточной воспроизводимостью результатов измерения, низкой степенью извлечения и очистки определяемых компонентов. В наибольшей мере эти недостатки проявляются при проведении экологических и биохимических анализов, где оперативность получения достоверных данных служит определяющим фактором для жизни и здоровья людей.

Настоящим переворотом в практике подготовки проб оказался предложенный более 20 лет тому назад простой и эффективный метод [2], основанный на выделении интересующих компонентов путем сорбции их на твердом носителе. Метод был назван «твердофазная экстракция» (ТФЭ) («solid-phase extraction» – SPE), и в дальнейшем мы будем придерживаться этого термина, хотя, на наш взгляд, такое название не вполне отражает суть происходящих при этом хроматографических процессов. В большинстве случаев процесс ТФЭ протекает по дискретной схеме «посадка-смыв», напоминая собой ступенчатое градиентное элюирование, хотя возможны фильтрационный и вытеснительный варианты. Таким образом, метод ТФЭ подобен колоночной хроматографии и основан на специфических взаимодействиях выделяемого компонента (или мешающих его определению компонентов матрицы) с сорбентом, находящимся в небольшом патроне («cartridge»).

Патрон обычно состоит из инертной полиэтиленовой или полипропиленовой оболочки, внутри которой помещен сорбент, плотно и равномерно упакованный между двумя пористыми фильтрами. В зависимости от свойств определяемых компонентов, их количества и концентрации, а также свойств раствора матрицы, может быть выбран один или несколько последовательно соединенных патронов с одинаковыми или различными сорбентами. В сложных случаях приходится разбивать процесс ТФЭ-очистки на ряд дополнительных этапов, причем на каждом из них за счет применения специально подобранной пары патрон-элюент решается та или иная задача, будь то задача предварительной очистки, или концентрирования, или тонкой очистки, или фракционирования целевых компонентов и т.д.

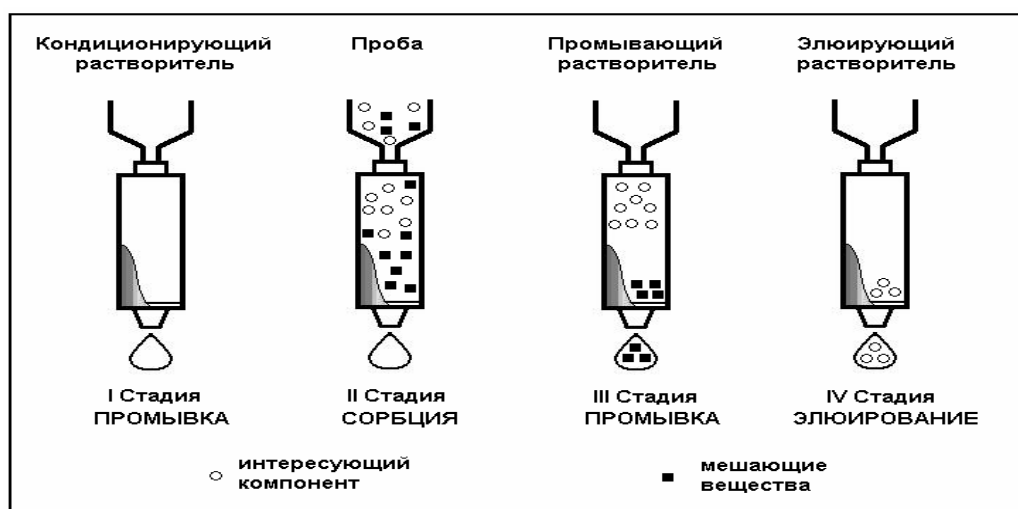
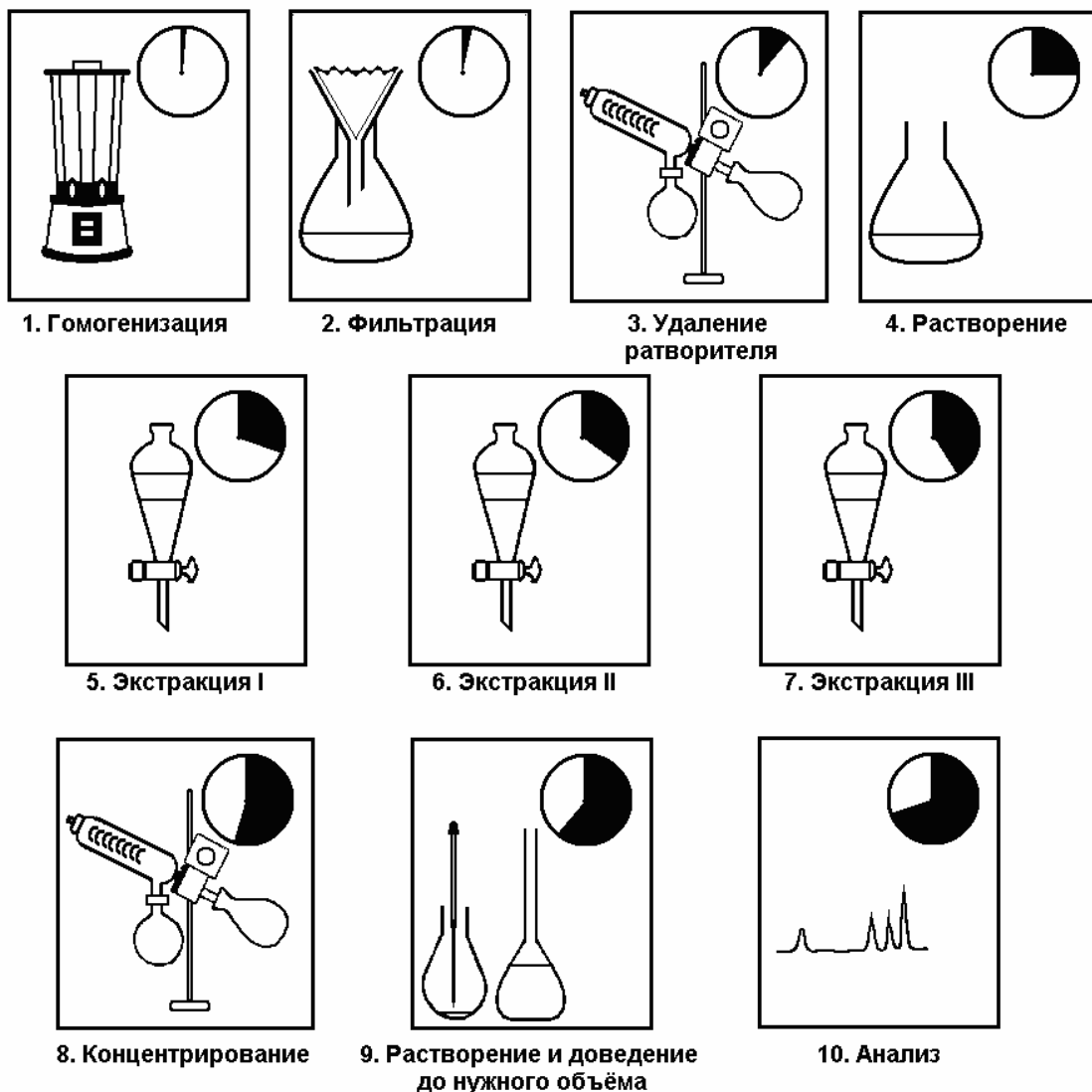


Рис. 1. Разделение компонентов раствора матрицы в ТФЭ-патроне

На рис. 1 изображены последовательные стадии процесса, протекающего в ТФЭ-патроне при разделении компонентов раствора матрицы. Под термином «раствор матрицы» будем подразумевать раствор или экстракт исходного образца («матрицы») в том или ином растворителе, хотя в ряде случаев возможна прямая ТФЭ компонентов из гомогенных (газообразных или жидких) матриц.

Подготовка образца с использованием жидкостной экстракции



Подготовка образца с использованием твердофазной экстракции

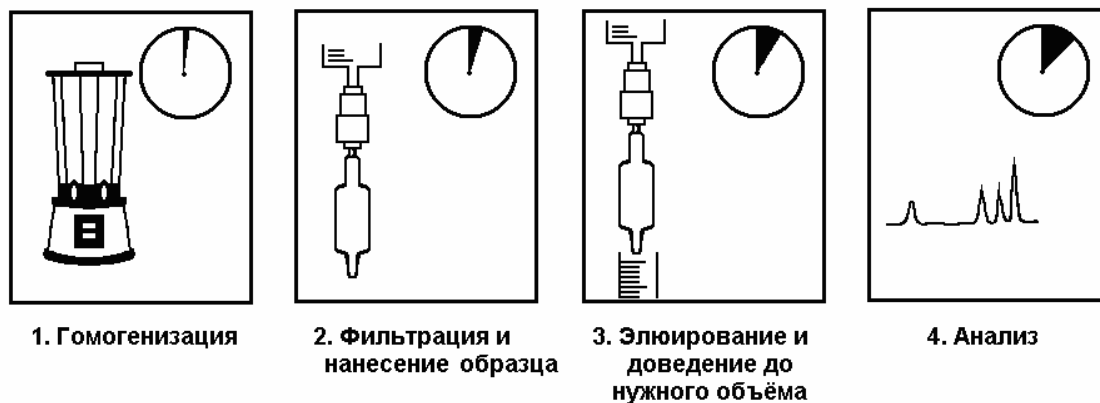


Рис. 2. Сопоставление методов жидкостной экстракции и ТФЭ по числу этапов, времени и трудозатратам, необходимыми для выполнения пробоподготовки

Характерная особенность ТФЭ по сравнению с жидкостной экстракцией состоит в том, что первый метод обладает более широкими возможностями, позволяющими варьировать природу и силу взаимодействия образца с сорбентом и элюентом. Благодаря расширению диапазона специфических взаимодействий, повышающих селективность разделения, ТФЭ в большей степени обеспечивает количественное выделение, тонкую очистку, концентрирование и извлечение каждого из определяемых соединений или их отделение от мешающих компонентов.

В тех случаях, когда матрица представляет собой многокомпонентную систему, требующую более детального исследования, ТФЭ позволяет проводить фракционирование пробы. На последовательно соединенных патронах можно одновременно разделять и выделять различные классы соединений: органические и неорганические, высоко- и низкомолекулярные, неполярные, ионогенные и т.д. Значительное сокращение числа операций, объема растворителей и количества вспомогательного оборудования уменьшает продолжительность пробоподготовки, снижает ее стоимость и приходящиеся на нее трудозатраты, а также повышает точность последующего анализа. На рис. 2 представлена сравнительная схема проведения пробоподготовки методами жидкостной экстракции и ТФЭ (из материалов проспекта фирмы Waters Ass.)

В настоящее время зарубежные производители предлагают широкий ассортимент устройств для ТФЭ, различающихся природой сорбента, а также конструкцией и объемом самого патрона. Наиболее известные из них: «Sep-Pak» производства фирмы Waters Ass., «Bakerbond SPE» – фирмы J.T. Baker, «Bond Elute» и «Chem Elute» – фирмы Varian, “EVOLUTE” и “ISOLUTE” – фирмы Biotage [3-5].

В большинстве случаев для заполнения патронов используются сорбенты на основе силикагеля с химически привитыми функциональными группами. Вместе с тем по-прежнему находят широкое применение полярные адсорбенты – силикагель и оксид алюминия. Одним из важнейших достоинств сорбентов на основе силикагеля является высокая интенсивность сорбции и десорбции, позволяющая работать при достаточно высоких скоростях нанесения анализируемой пробы на патрон и ее элюирования с патрона, что существенно ускоряет процедуру пробоподготовки.

Другим преимуществом указанных сорбентов является постоянство их объема при контакте с органическими и водно-солевыми растворами. Сорбенты на основе силикагеля не требуют длительного предварительного набухания и после проведения кратковременной активации, кондиционирования или регенерации пригодны к работе.

Третью особенность привитым сорбентам придает их достаточно высокая химическая стабильность, хотя по этому показателю они все же уступают полимерным сорбентам. Эта стабильность обусловлена относительной кратковременностью контакта растворителей, используемых для концентрирования и очистки, с поверхностью сорбента, что напрямую связано с дискретным характером протекания ТФЭ по схеме «посадка-смыв». Например, гидролитическая стабильность обращенно-фазовых (ОФ) сорбентов, применяемых в ТФЭ, гарантируется в диапазоне pH 1–10, т.е. значительно более широком, чем это принято для ВЭЖХ-сорбентов с той же химической природой поверхности. Для одноразовых (нерегенерируемых) патронов этот диапазон еще шире.

Необходимо помнить, что сорбционная емкость сорбентов на основе химически модифицированных силикагелей заметно ниже, чем у их аналогов на основе органических полимеров. Для стандартного патрона объемом 1 мл сорбционная емкость по большинству органических и неорганических веществ обычно находится в пределах 5–20 мг/патрон. Такая емкость вполне достаточна для концентрирования микропримесей. Чтобы с большей точностью установить нагрузку, необходимо предварительно определить емкость патрона «до проскока» интересующего компонента. При этом следует учитывать и возможность перегрузки патрона, причина которой может быть обусловлена не столько перегрузкой по целевому компоненту, сколько по матричным примесям, из-за чего нередко механизм разделения меняется с элюентного проявления на фронтальное вытеснение.

2. Концентрирующие патроны ДИАПАК

Патроны ДИАПАК производятся в двух конструктивных модификациях: Тип-1 и Тип-2 (рис. 3).

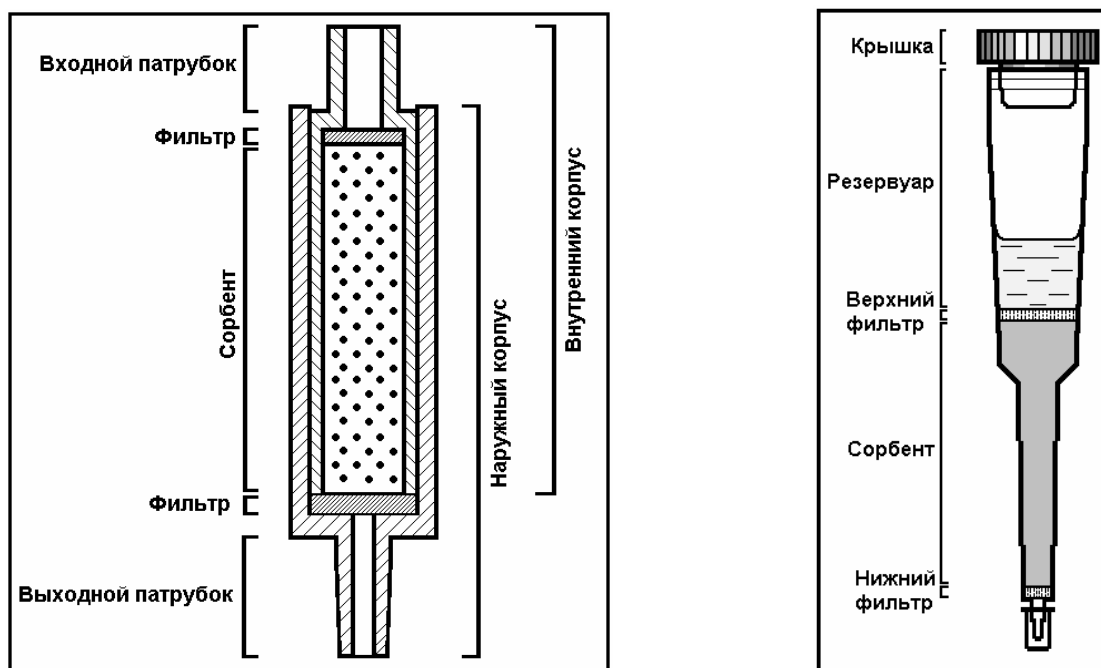


Рис. 3. Устройство патронов ДИАПАК:
слева – конструктивная модификация Тип-1, справа – Тип-2

Патроны ДИАПАК модификации Тип-1 представляют собой разъемные капсулы из химически стойкого полимера. Фиксация сорбента в патроне осуществляется с помощью двух фильтрующих дисков из пористого полимера. Масса сорбента в патроне объемом 1 мл составляет 0,6 г.

Концентрирующие патроны этого типа имеют две взаимозаменяемые заглушки, которые предотвращают попадание в патрон загрязнений и предохраняют сконцентрированный образец от внешних воздействий. Цвет заглушек служит для маркировки патронов. Входной и выходной патрубки патрона соответствуют разъемам типа Льюер, что позволяет последовательно соединять несколько патронов. Нанесение пробы на патрон и ее элюирование может осуществляться либо с помощью шприца с разъемом типа Льюер, либо под действием гидростатического перепада (самотеком), а иногда – с помощью перистальтического или вакуумного насоса.

Патроны ДИАПАК модификации Тип-2 представляют собой неразъемный пластиковый корпус переменного сечения, узкая часть которого служит для размещения сорбента, а широкая, объемом около 10 мл, предназначена как для размещения сорбента (при необходимости), так и элюента. В нижней части пластикового корпуса, под сорбентом, помещен малый пористый фильтр; над столбом сорбента может быть плотно укреплен (благодаря незначительной конусности корпуса патрона) большой пористый фильтр. Патрон модификации Тип-2 герметично закрывается верхней крышкой, а также нижней заглушкой от патрона Тип-1. Верхняя крышка предохраняет патрон от пыли и позволяет перемешивать суспензию сорбента в растворителе. Прокачивание пробы и элюента через патрон достигается с помощью водоструйного насоса. К числу примечательных особенностей патронов данного типа относятся больший объем сорбента (3–6 мл), легкость нанесения пробы и введения элюента, а также удобство подсоединения выходного патрубка к вакуумному устройству посредством резиновой пробки с отверстием (см. рис. 4).

При согласовании обеих модификаций патронов ДИАПАК создается дополнительная конструкция, в которой верхний патрон (Тип-2) выполняет роль воронки, фильтра, вспомогательного разделительного элемента, а нижний патрон (Тип-1) служит в качестве основного разделительного элемента.

Для заполнения патронов ДИАПАК используются сорбенты на основе химически модифицированных силикагелей с размером частиц 63–200 мкм. Средний диаметр пор сорбентов составляет: для патронов ДИАПАК С, Амин-М и с дополнением Plus – 60 Å, для патронов ДИАПАК А (АУ) – 90 Å, во всех остальных случаях 100 Å. Патроны серии Диапак Plus обладают повышенной емкостью, более узким фракционным составом (40-60 мкм) и дополнительно силанизированы.

В табл. 1 представлен перечень патронов ДИАПАК с краткой характеристикой сорбентов и указанием основных областей применения.

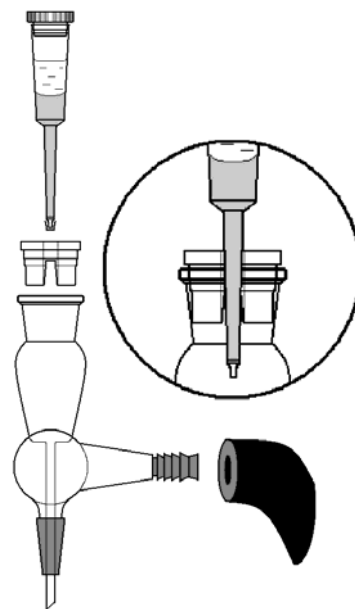


Рис. 4. Подсоединение выходного патрубка к водоструйному насосу

Таблица 1. Характеристика сорбентов, используемых в патронах ДИАПАК

Название патрона	Краткая характеристика сорбента	Основные области применения
ДИАПАК Силикагель (С)	Гидрофильный слабокислотный сорбент (С – с постоянной активностью)	Адсорбционная ТФЭ органических соединений
ДИАПАК А (АУ)	Гидрофильный слабощелочной сорбент (АУ – с добавлением 10% активированного угля)	Адсорбционная ТФЭ органических соединений
ДИАПАК С1 ДИАПАК С8 ДИАПАК С8 Plus ДИАПАК С16 (С16М) ДИАПАК С16 Plus	Гидрофобные сорбенты с привитыми метильными (С1), октильными (С8) и гексадецильными (С16) группами с увеличивающейся гидрофобностью	Обращенно-фазовая ТФЭ органических соединений
ДИАПАК Фенил ДИАПАК Фенил Plus	Гидрофобный сорбент с привитыми фенильными группами	Обращенно-фазовая ТФЭ органических соединений
ДИАПАК Нитрил (Н) ДИАПАК Нитрил Plus	Слабогидрофобный сорбент с привитыми нитрильными группами	Обращенно- и нормально-фазовая ТФЭ органических соединений
ДИАПАК Диол ДИАПАК Диол Plus	Гидрофильный нейтральный сорбент с привитыми диольными группами	Нормально-фазовая ТФЭ органических соединений и эксклюзионная ТФЭ высокомолекулярных соединений
ДИАПАК Амин (Амин-М) ДИАПАК Амин Plus	Слабоосновный анионообменник с привитыми аминогруппами	Нормально-фазовая и анионообменная ТФЭ органических соединений
ДИАПАК ДЕАЕ	Слабоосновный анионообменник с привитыми третичными аминогруппами	Анионообменная ТФЭ органических соединений
ДИАПАК ТА	Сильноосновной анионообменник с привитыми четвертичными аммониевыми группами	Анионообменная ТФЭ органических и неорганических соединений
ДИАПАК Карбокси	Слабокислотный карбоксильный катионообменник	Катионообменная ТФЭ органических соединений
ДИАПАК Сульфо	Сильнокислотный катионообменник	Катионообменная ТФЭ органических соединений и ионов металлов
ДИАПАК ИДК	Комплексообразующий сорбент с привитой иминодиуксусной кислотой	Ионообменная ТФЭ ионов тяжелых металлов на основе комплексообразования
ДИАПАК П	Гидрофобный сорбент на основе сверхсшитого полистирола	Обращенно-фазовая ТФЭ органических соединений

3. Основные принципы выбора патрона

Разработка методики очистки (концентрирования) образцов и выбор соответствующего патрона в значительной мере связаны со свойствами определяемого вещества, свойствами раствора матрицы и методом последующего анализа. В общем случае очистка протекает по одному из трех вариантов:

- *определяемые компоненты не сорбируются, а мешающие компоненты удерживаются в патроне;*
- *определяемые компоненты сорбируются и концентрируются, а вещества, загрязняющие пробу, проходят через патрон;*
- *определяемые и мешающие компоненты удерживаются и концентрируются в патроне, но могут быть фракционированы путем ступенчатого или непрерывного градиентного элюирования (градиент рН, ионной силы или элюирующей силы растворителя).*

Как указывалось выше, ТФЭ имеет много общего с колоночной и тонкослойной хроматографией, поэтому основные закономерности, характерные для хроматографических методов разделения, полностью применимы и к ТФЭ [6,7]. По аналогии с жидкостной хроматографией, методы концентрирования посредством ТФЭ, в основе которых лежит тот или иной механизм межмолекулярных взаимодействий, подразделяются на: нормально-фазовую (НФЭ), обращенно-фазовую (ОФЭ), ион-парную, ионообменную (ИОЭ) и эксклюзионную. Ниже изложены основные подходы к концентрированию и очистке различных классов органических и неорганических соединений с использованием указанных методов ТФЭ.

К настоящему времени методическое обеспечение ТФЭ достаточно хорошо разработано и подробно изложено как в научной литературе, так и в проспектах фирм-производителей. В связи с тем, что по химической природе и основным характеристикам сорбенты серии ДИАПАК весьма схожи с большинством зарубежных сорбентов аналогичного назначения, обращение к иностранному литературному источнику, например [8], при работе с патронами ДИАПАК не должно вносить сколько-нибудь заметных изменений в методику очистки и концентрирования определяемого вещества. Ряд литературных ссылок, касающихся выбора патрона при решении конкретной задачи, приведен в последующих разделах настоящей брошюры, а в разделе 7 описаны разработанные нами методики, которые нашли применение при решении задач в области экологии, медицины, биохимии, пищевой промышленности, и даны рекомендации по метрологической аттестации этих методик.

3.1. Концентрирование и очистка неполярных соединений

Для концентрирования и очистки неполярных соединений наиболее пригодна ОФЭ, выполняемая в системах, в которых сорбент менее полярен, чем элюент. В большинстве случаев метод ОФЭ используется для очистки и концентрирования водных и водно-органических растворов веществ. Данный метод находит широкое применение в экологических исследованиях водных объектов и в биохимии. Для ОФЭ могут быть использованы патроны ДИАПАК С16, ДИАПАК С8, ДИАПАК С1, ДИАПАК Фенил, ДИАПАК Нитрил, отличающиеся между собой спецификой и силой взаимодействия с сорбируемыми компонентами.

В качестве растворителя матрицы используются высокополярные вещества – вода, органические растворители и их смеси – с элюирующей силой более 0,5 (см. Приложение) [9,10]. Элюентом, десорбирующим сконцентрированные в патроне компоненты, могут служить растворители, полярность и элюирующая сила которых меньше, чем у растворителя матрицы. Широкий выбор растворителей матрицы и элюентов в сочетании с более быстрым установлением равновесия в системе сорбент-элюент позволяет тонко воздействовать на процессы сорбции и десорбции, обеспечивая эффективную очистку. Перечень веществ, для которых применим метод ОФЭ, охва-

тывает большинство классов органических соединений; достаточно упомянуть лишь некоторые из них:

- ароматические кислоты и основания, жирные кислоты, углеводороды, фенолы, хлорорганические соединения, ароматические и гетероциклические соединения, эфиры;
- антибиотики, сульфаниламиды, алкалоиды;
- стероиды, холестерин и его производные, каротин, жирорастворимые витамины;
- пестициды, гербициды, полиароматические углеводороды, полихлорированные бифенилы, диоксины, поверхностно-активные вещества, хлор- и нитрофенолы.

Кроме того, при определенных условиях многие полярные и ионогенные соединения также могут быть очищены и сконцентрированы с помощью данного метода.

Ряд примеров очистки органических соединений методом ОФЭ приведен ниже.

3.1.1. Экстракция белка из разбавленного водного раствора

Бычий сывороточный альбумин (БСА) может быть извлечен из водного раствора путем сорбции на широкопористой бутильной ОФ С4. Сорбция достигается за счет проникновения высокомолекулярного белка в широкие поры сорбента.

Используемые условия ТФЭ

Образец: 20 мл раствора БСА (1 мг/мл) в 0,025 М калий-фосфатном буфере при рН 7.

Определяемый компонент: БСА.

Сорбент: широкопористая гидрофобная фаза С4 (Bakerbond), кондиционированная 10 мл метанола, 5 мл 0,5 М калий-фосфатного буфера (рН 7) и 6 мл 0,025 М калий-фосфатного буфера (рН 7).

Процедура: после нанесения образца следует промывка 4 мл 0,025 М фосфатного буфера (рН 7) и элюирование двумя аликвотами по 0,5 мл смеси изопропанол/вода (60:40), содержащей 0,1% трифторуксусной кислоты.

Ссылка: [11, Vi-001].

3.1.2. Экстракция индолил-3-уксусной кислоты

Индолил-3-уксусная кислота может быть выделена из растительной ткани путем гомогенизации 0,1 г образца и последующей экстракции 75 мМ раствором KH_2PO_4 . С помощью 2,8 М раствора фосфорной кислоты рН экстракта доводят до 2,7, затем добавляют 15 мл 0,1 М раствора KH_2PO_4 для проведения диализа. Подстройка рН необходима для протонирования карбоксигруппы и селективного удерживания на гидрофобном сорбенте.

Используемые условия ТФЭ

Образец: водный экстракт растительной ткани.

Определяемый компонент: индолил-3-уксусная кислота.

Сорбент: неподвижная фаза С18 (6 мл), кондиционированная 6 мл метанола и 6 мл 0,1 М раствора KH_2PO_4 (рН 2,7).

Процедура: после нанесения образца следует промывка двумя аликвотами по 1 мл смеси метанол/вода (1:4) при рН 2,7, высушивание в токе воздуха (3 мин) и элюирование двумя аликвотами по 1 мл смеси метанол/вода (4:1).

Ссылки: 1) [11, Vi-006]; 2) Liu S. and Tillberg E. *Physiol. Plants*, 57, 441-447 (1983).

3.1.3. Экстракция катехоламинов из мочи

Катехоламины, входящие в состав биогенных аминов, представляют собой соединения, которые содержат 3,4-дигидроксифенильное (пирокатехиновое) кольцо и боковую группу – этиламиновую или этаноламиновою, гистаминовую, холиновую, ацетилхолиновую, индольную. Катехоламины могут быть выделены из мочи посредством ОФЭ на гидрофобной неподвижной фазе С18.

Используемые условия ТФЭ

Образец: проба мочи, доведенная 2 М раствором NH_4OH до рН 8,5.

Определяемые компоненты: катехоламины.

Сорбент: гидрофобная фаза С18 (1 мл), кондиционированная метанолом (2x1 мл) и раствором $\text{NH}_4\text{Cl}/0,5\% \text{EDTA}$, рН 8,5 (2x1 мл).

Процедура: после нанесения образца и предварительной промывки 0,2 М раствором NH_4Cl , рН 8,5 (2x1 мл) и 1 мл смеси $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{CH}_3\text{OH}$ (80:20), рН 8,5 следует высушивание сорбента в токе воздуха (2 мин) и элюирование 0,08 М раствором CH_3COOH (2x1 мл).

Ссылка: [11, Vi-007].

Другие примеры:

- 1). Хлорорганические пестициды (альдрин, хлордан, эндрин, диэльдрин, гептахлор, эндосульфат) в воде. Патрон с Нитрил-фазой. *Chromatographia*, **35**, 290-294 (1993).
- 2). Полиароматические углеводороды в питьевой воде и почве. Патроны с Нитрил-, С18-, С16-фазами. *Chromatographia*, **28**, 203-211 (1989), Bakerbond Application Note EN-019 [11].
- 3). Неионогенные гербициды в воде и почве. Патрон с С16(18)-фазой. *Anal. Chem.*, **62**, 2043-2048 (1990), *Anal. Chem.*, **64**, 1985 (1992).
- 4). Кислотные гербициды (2,4-D; 2,4,5-T; Дикамба) в воде и почве. Патроны с С16(18)-, П-фазами. *J. Chromatogr.*, **25**, 345-350 (1987), Bakerbond Application Note EN-024 [11].
- 5). Анионогенные поверхностно-активные вещества в воде и почве. Патрон с С8-фазой. *Anal. Chem.*, **62**, 2581-2586 (1990).
- 6). Концентрирование радионуклидов цезия, церия, кобальта, висмута и свинца методом твердофазной экстракции. Патрон Диапак С16. *ЖАХ*, **56**, №3, 272-276 (2001).

3.2. Концентрирование и очистка ионогенных соединений

Очистка, концентрирование и фракционирование ионогенных соединений на ионообменных сорбентах достигается за счет различия в сродстве ионов образца к противоионам ионообменника и ионам растворителя. В качестве ионообменников в ИОЭ применяются анионо- и катионообменные сорбенты различной силы (см. табл. 2).

Таблица 2. Основные свойства ионообменных сорбентов ДИАПАК

Сила ионообменника	Природа ионообменника		Природа сорбируемых соединений
	Анионообменники	Катионообменники	
Сильные	ДИАПАК ТА	ДИАПАК Сульфо	Сильные и слабые кислоты и основания
Слабые	ДИАПАК ДЕАЕ ДИАПАК Амин, Амин-М	ДИАПАК Карбокси	Сильные кислоты и основания

Эффективность ИОЭ зависит от степени ионизации соединений, т.е. от рН анализируемого раствора. Наибольшая эффективность метода достигается в тех случаях, когда молекулы образца полностью (>95%) ионизованы; для основных соединений это наблюдается при $\text{pH} < \text{pK}_a - 2$; для кислотных – при $\text{pH} > \text{pK}_a + 2$. При этом, однако, необходимо учитывать, что величина рН анализируемого раствора не должна превышать 10, так как матрица большинства сорбентов – силикагель – в щелочной среде растворяется.

Поскольку в качестве элюента в ИОЭ почти исключительно используют воду, то на разделение можно воздействовать, меняя величину рН, ионную силу и род буфера (вид противоионов). Удерживание кислотных или основных соединений зависит от рН элюента, так как в зависимости от величины рН они могут либо находиться в диссоциированном состоянии и разделяться в результате ионного обмена, либо проходить через патрон в виде недиссоциированных молекул. Еще в большей степени на удерживание влияет ионная сила элюента; ее увеличение вызывает уменьшение коэффициента емкости. Значительное влияние на ионный обмен оказывает также природа противоионов сорбента, или, другими словами, та форма, в какой находится ионообменник. Для катионообменных патронов предпочтительно использовать в качестве противоиона H^+ , NH_4^+ , Na^+ , Li^+ , которые легко замещаются на катион анализируемого соединения. Для анионообменных патронов предпочтительными противоионами являются CH_3COO^- , HCO_3^- ; реже используются Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} . С другой стороны, ионы, характеризующиеся сильным взаимодействием с сорбентом и осложняющие ионный обмен, могут служить в качестве компонентов элюирующих растворов. В тех случаях, когда процесс элюирования с ионообменных патронов требует больших объемов элюента или осложнен подбором необходимой ионной силы или рН, рекомендуется заменить сильный ионообменник на более слабый.

Метод ИОЭ применим к следующим классам соединений:

- органические и неорганические кислоты и основания, ионы металлов;
- нуклеиновые кислоты, аминокислоты, нуклеотиды, нуклеозиды, пептиды, катехоламины;
- антибиотики, алкалоиды, водорастворимые витамины;
- ионогенные поверхностно-активные вещества.

Ниже приведены отдельные примеры очистки методом ИОЭ.

3.2.1. Очистка органических соединений

Ионогенные органические соединения можно отделить от неионогенных соединений путем ионного обмена. Реакции ионного обмена проходят в метаноле и некоторых других органических растворителях так же хорошо, как они идут в воде. Примером подобного рода может служить разделение анионогенных и неионогенных поверхностно-активных веществ (ПАВ), метанольный раствор которых наносят на слабую анионообменную смолу, находящуюся в протонированной форме. Оба типа веществ растворимы в метаноле, но анионоактивные ПАВ прочно связываются со смолой по механизму ионного обмена, в то время как неионогенные соединения, не сорбируясь, проходят через ионообменник. Анионоактивные ПАВ могут быть эффективно смыты с анионообменной смолы разбавленным в метаноле основанием.

Используемые условия ТФЭ

Образец: метанольный раствор жидкого мыла, содержащий ПАВ.

Определяемые компоненты: анионогенные и неионогенные ПАВ.

Сорбент: аминопропильная неподвижная фаза (500 мг), кондиционированная 2 мл метанола и 2 мл деионизованной воды и затем переведенная в активную Cl^- -форму 2 мл 0,1 М HCl и кондиционированная 2 мл деионизованной воды и 2 мл метанола.

Процедура: наносят образец при слабом вакууме; анионогенные ПАВ сорбируются на анионообменнике, неионогенные ПАВ – не удерживаются; элюент – смесь $\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_4\text{OH}$ (1:1), 3 мл.

Ссылка: Модификация метода из *Anal. Chem.*, **59**, 1798-1802 (1988).

3.2.2. Оксатразиновые метаболиты из воды

Оксатразиновые метаболиты являются главными почвенными метаболитами гербицидов триазинового ряда. Они представляют собой полярные соединения, способные переходить в форму катиона при величине рН, близкой к рК_а (~ 5). Будучи слишком полярными, чтобы удерживаться на гидрофобной фазе С18 или стирол-дивинилбензольной смоле, они могут быть эффективно выделены из водных образцов путем катионного обмена и в дальнейшем количественно определены методом ВЭЖХ.

Используемые условия ТФЭ

Образец: проба речной воды (250 мл), доведенная 0,1 М буферным раствором КН₂РО₄ до рН 5.

Определяемые компоненты: оксатразиновые метаболиты, рК_а ~ 5.

Сорбент: сильный катионообменник (500 мг), кондиционированный 2 мл метанола и 2 мл деионизованной воды.

Элюент: 2 мл смеси ацетонитрил/фосфатный буфер, рН 7.

Ссылка: J. *Agricul. Food Chem.*, **42**, 922-927 (1994).

3.2.3. Паракват и дикват в воде

Паракват и дикват представляют собой полярные соединения, относящиеся к числу катионогенных гербицидов. Как правило, органические катионы обладают сильным сродством к поверхности силикагеля и легко подвергаются катионному обмену. Последнее обстоятельство объясняет тот факт, что они встречаются в воде в следовых количествах, так как сорбируются по катионнообменному механизму на поверхности почвы и растений. Концентрируют их сорбцией на полярной цианопропильной неподвижной фазе и элюируют 1,5 N HCl.

Используемые условия ТФЭ

Образец: проба речной воды (100 мл), без добавок.

Определяемые компоненты: паракват и дикват.

Сорбент: CN-фаза (400 мг), кондиционированная 2 мл метанола и деионизованной воды.

Элюент: 2 аликвоты по 2 мл 1,5 N HCl.

Ссылка: [11, EN-020]

3.2.4. Экстракция кофеина, сахарина и бензоата натрия из питьевых продуктов

Добавки в диетической «коле» – кофеин, сахарин и бензоат натрия – представляют собой соединения различных классов, тем не менее с помощью анионообменника первые два вещества могут быть отделены от третьего в ходе одной процедуры. Кофеин и сахарин – это нейтральные (незаряженные) соединения, не проявляющие ионогенных свойств; они сорбируются на ионообменнике за счет ван-дер-ваальсовых взаимодействий, для которых характерна низкая энергия адсорбции. Бензоат натрия – ионогенное соединение, способное к диссоциации; он удерживается на анионообменнике вследствие реакции ионного обмена.

Используемые условия ТФЭ

Образец: диетическая кола (10 мл), дегазированная встряхиванием.

Определяемые компоненты: кофеин, сахарин и бензоат натрия.

Сорбент: *сильный анионообменник (SAX), 500 мг, в исходной форме, кондиционированный 3 мл метанола, 3 мл концентрированного гидроксида аммония, 3 мл деионизованной воды и переведенный в активную СГ-форму 3 мл 0,2 N HCl.*

Элюент: *2 аликвоты по 2 мл 0,2 M раствора K_3PO_4/CH_3OH .*

Ссылка: *[11, FF-006].*

3.2.5. Экстракция метилимидазола из пищевых продуктов

Экстракция метилимидазола из пищевых продуктов (и кормов) основана на катионном обмене анализируемого вещества и сорбента. Образец пробы готовят гомогенизацией в метаноле, фильтрацией и упариванием фильтрата досуха. Экстракт растворяют в воде и фильтруют. Вымывают метилимидазол с сильного катионообменника соляной кислотой.

Используемые условия ТФЭ

Образец: *водный экстракт пищевого продукта.*

Определяемый компонент: *метилимидазол.*

Сорбент: *сильный катионообменник в H^+ -форме (500 мг), кондиционированный 3 мл деионизованной воды*

Процедура: *после нанесения образца следует двойная промывка 3 мл деионизованной воды и элюирование двумя аликвотами по 1 мл 0,5 N HCl.*

Ссылка: *[11, FF-010].*

3.2.6. Экстракция аминокислот из лекарственных растений

Выделение аминокислот из экстрактов лекарственных растений также основано на реакциях катионного обмена. Растительный материал предварительно гомогенизируют и измельчают в метаноле, фильтруют и упаривают досуха. Перерастворяют образец в 10%-ном водном метаноле и фильтруют.

Используемые условия ТФЭ

Образец: *водно-метанольный экстракт растительного материала.*

Определяемые компоненты: *аминокислоты.*

Сорбент: *сильный катионообменник в H^+ -форме (500 мг), кондиционированный 3 мл метанола и 3 мл деионизованной воды.*

Элюент: *1 мл 0,1 N HCl.*

Ссылка: *[11, PH-015].*

3.2.7. Экстракция циметидина из мочи

Циметидин относится к противоязвенным H_2 -антигистаминным препаратам. Его выделение из мочи основано на том, что содержащееся в нем имидазольное кольцо подвержено протонированию, вследствие чего оно способно вступать в реакции ионного обмена. Это обстоятельство дает возможность использовать слабый катионообменник для извлечения циметидина.

Используемые условия ТФЭ

Образец: *проба мочи (1 мл) с 25 мкл 14,8 M раствора NH_4OH .*

Определяемый компонент: *циметидин.*

Сорбент: слабый катионообменник (500 мг) в исходной кислотной форме ($-\text{COO}^- \text{H}^+$), кондиционированный 3 мл метанола и переведенный в активную солевую NH_4^+ -форму 3 мл 0,15 М раствора гидроксида аммония.

Процедура: после нанесения образца следует промывка 3 мл 0,15 М раствора гидроксида аммония с последующим элюированием метанолом (2x500 мкл).

Ссылка: [11, РН-034].

3.3. Концентрирование и очистка полярных соединений

Для концентрирования и очистки полярных соединений, помимо уже обсуждавшихся методов ОФЭ и ИОЭ, используется также НФЭ, выполняемая в системах, в которых сорбент более полярен, чем элюент. Среди патронов ДИАПАК для НФЭ наиболее распространенным является ДИАПАК Силикагель, однако в случае экстракции веществ в соответствии с методиками, регламентированными нормативными документами, лучше использовать силикагель с постоянной активностью (ДИАПАК С). За удерживание веществ на силикагеле ответственны главным образом поверхностные силанольные группы, и поскольку они обладают кислотными свойствами, соединения основного характера удерживаются прочнее, чем кислотные или нейтральные; дополнительный вклад в удерживание вносят диполь-дипольные взаимодействия. Силикагель способен адсорбировать полярные компоненты, растворенные в таких органических растворителях, элюирующая сила которых находится в интервале значений ϵ от 0 до 0,32 (от *n*-гептана до метиленхлорида, см. Приложение). Чаще всего растворителями для матрицы являются гексан, циклогексан, хлороформ, метиленхлорид.

Варьируя силу растворителя, можно оказывать селективное воздействие на сорбцию тех или иных компонентов матрицы. Наличие влаги в матрице резко снижает сорбционную емкость силикагелевых патронов и ведет к дезактивации сорбента. Как было сказано выше, основные компоненты достаточно прочно удерживаются на силикагеле, в связи с чем сильноосновные соединения лучше концентрировать на патроне ДИАПАК А, слабощелочные свойства которого способствуют количественному смыву адсорбированных целевых компонентов. Десорбцию сконцентрированных соединений проводят растворителями с $\epsilon > 0,35$ (см. Приложение).

Кроме патронов ДИАПАК С, для НФЭ используются патроны с привитыми фазами – ДИАПАК Нитрил, ДИАПАК Амин, ДИАПАК Диол, которые проявляют меньшую адсорбционную активность по отношению к полярным и сильнополярным соединениям, но, с другой стороны, способствуют ускорению их элюирования. Эти химически связанные фазы по полярности занимают промежуточное положение между неполярными алкильными фазами и такими полярными адсорбентами, как силикагель. На таких фазах можно работать с полярным элюентом в ОФ-режиме либо с неполярным (или слабополярным) элюентом в НФ-режиме. В этих случаях компоненты образца элюируются либо в порядке уменьшения их полярности (ОФЭ), либо, наоборот, в порядке ее увеличения (НФЭ). Следует также помнить, что селективность неподвижных фаз с привитыми функциональными группами может существенно отличаться от селективности немодифицированных силикагелей, в частности, ДИАПАК Амин в воде проявляет свойства слабого анионообменника, тогда как в водно-ацетонитрильных смесях вполне пригоден для разделения сахаров.

Метод НФЭ применяют для очистки и концентрирования следующих соединений:

- спирты, фенолы, альдегиды, кетоны, амины, аминокислоты, органические кислоты, нитросоединения, углеводы, гетероциклические соединения;
- нуклеотиды, пептиды, сахара, витамины, порфирины, стероиды, липиды;
- антибиотики, алкалоиды, барбитураты;
- пестициды, гербициды, инсектициды, полихлорированные бифенилы, полиароматические углеводороды, микотоксины и афлатоксины.

Ниже приведены примеры очистки и концентрирования некоторых соединений.

3.3.1. Экстракция ароматических углеводородов из сырой нефти

Для экстракции ароматических углеводородов из сырой нефти используют два последовательно соединенных патрона с цианопропильной неподвижной фазой и силикагелем. В этой процедуре ароматические углеводороды сорбируются на обоих сорбентах, в то время как соединения гетероциклического ряда, содержащие азот, серу и кислород, удерживаются только цианопропильной фазой.

Используемые условия ТФЭ

Образец: от 25 до 35 мг сырой нефти в 6 мл петролейного эфира.

Определяемые компоненты: ароматические углеводороды и соединения гетероциклического ряда.

Сорбенты: силикагель (1 г) и CN-фаза (1 г), кондиционированные петролейным эфиром.

Процедура: устанавливают цианопропильный патрон поверх силикагелевого и помещают над первым патроном фильтр; наносят образец на фильтр под вакуумом; промывают патроны петролейным эфиром (2x0,5 мл); снимают фильтр вместе с нерастворимой фракцией нефти; еще раз промывают патроны петролейным эфиром (2x1 мл); разъединяют патроны и каждый в отдельности элюируют смесью (2x1 мл) бензол/петролейный эфир (1:3), собирая и объединяя оба элюата для последующего упаривания, взвешивания и анализа ароматических углеводородов; цианопропильный патрон повторно элюируют смесью (2x1 мл) бензол/метанол (1:1), собирая элюат в отдельный приемник.

Ссылка: [11, EN-004].

3.3.2. Экстракция полихлорированных бифенилов (ПХБ) из трансформаторного масла

Экстракция ПХБ из трансформаторного масла, выполняемая с целью последующего хроматомасс-спектрометрического анализа, – необходимый этап в процедуре по утилизации трансформаторов. Разделение выполняется на флорисиле (силикат магния) с последующим элюированием гексаном.

Используемые условия ТФЭ

Образец: 200 мг трансформаторного масла.

Определяемые компоненты: ПХБ.

Сорбент: флорисил (1 г), кондиционированный 2 мл гексана.

Процедура: после нанесения образца, без каких-либо предварительных промывок, проводят элюирование 25 мл гексана.

Ссылка: [11, EN-014].

3.3.3. Экстракция каротинов из растительной ткани

Экстракцию каротинов из растительной ткани проводят на кизельгуре, который также называют диатомовой землей. Подготовительная процедура включает гомогенизацию материала в смеси петролейного эфира и ацетона и последующую фильтрацию растительного экстракта. Особенность очистки состоит в том, что при промывке и элюировании петролейным эфиром кизельгур не сорбирует каротины, но удерживает другие растительные пигменты.

Образец: экстракт из 10 г растительной ткани и 100 мл смеси петролейный эфир/ацетон (95:5).

Определяемые компоненты: каротины.

Сорбент: кизельгур (1 г), кондиционированный 6 мл петролейного эфира.

Процедура: после нанесения 3 мл растительного экстракта собирают слив и проводят промывку и элюирование петролейным эфиром (2x1 мл), после чего собирают объединенную фракцию, соединяя ее с первым сливом. В этой процедуре все смывы являются одной и той же фракцией.

Ссылка: [11, FF-003].

3.3.4. Экстракция N-нитрозамина (N-нитрозопирролидина) из свиной грудинки

Экстракция N-нитрозопирролидина из свиной грудинки на цианопропильной неподвижной фазе основана на взаимодействии аминного азота N-нитрозопирролидина с привитыми функциональными группами сорбента. Образец наносят в растворе гексан/дихлорметан, что позволяет солюбилизовать животный жир и не препятствует вышеуказанному взаимодействию. Присутствие полярного метанола в элюенте способствует эффективному вымыванию N-нитрозопирролидина.

Образец: раствор 1 г животного жира в 5 мл смеси гексан/дихлорметан (9:1).

Определяемый компонент: N-нитрозопирролидин.

Сорбент: цианопропильная неподвижная фаза (0,5 г), кондиционированная 3 мл смеси гексан/дихлорметан (9:1).

Процедура: после нанесения образца следует двойная промывка указанной выше смесью (по 0,5 мл) и элюирование двумя аликвотами по 0,5 мл смеси метанол/дихлорметан (95:5).

Ссылка: [11, FF-009].

3.3.5. Экстракция пиридонкарбоксильных антибактериальных средств из рыбных тканей

Настоящая процедура включает извлечение оксолиновой, налидиксовой и пиромидовой кислот из рыбных тканей путем экстракции смесью гексан/этилацетат и последующего их концентрирования на привитой аминопропильной неподвижной фазе. Выделение основано на слабых кислотно-основных взаимодействиях между кислотными группами извлекаемых компонентов и основными группами сорбента, а также на диполь-дипольных взаимодействиях. В процедуру разделения также может быть включен анионообменный механизм, протекающий при введении в состав элюента щавелевой кислоты, которая выступает в качестве «вытеснителя» (конкурирующего иона).

Образец: размешивают в блендере 5 г рыбной ткани в смеси экстрагента – гексан/этилацетат (1:3) и 10 г сульфата натрия; декантируют смесь и после повторной экстракции объединяют экстракты.

Определяемые компоненты: пиридонкарбоксильные антибактериальные средства.

Сорбент: аминопропильная неподвижная фаза (0,5 г), кондиционированная 10 мл метанола и 3 мл экстрагента.

Процедура: после предварительного введения 2–3 мл экстрагента, наносят весь экстракт образца; промывают 5 мл экстрагента и элюируют 10 мл смеси ацетонитрил/метанол/10 мМ раствор щавелевой кислоты (рН 3).

Ссылка: [11, FF-017].

3.3.6. Экстракция витамина D из сыворотки

Витамин D относится к числу жирорастворимых витаминов. Его применяют для профилактики и лечения рахита, а также костных заболеваний, вызванных нарушениями обмена кальция. Витамин D экстрагируют из сыворотки с помощью дихлорметана, после чего концентрируют на силикагеле и элюируют эфир-гексановой смесью.

Используемые условия ТФЭ

Образец: к экстракту из 2 мл сыворотки и 7,5 мл смеси дихлорметан/метанол (33:67) добавляют 2,5 мл дихлорметана и, после встряхивания и декантирования, собирают нижний дихлорметановый слой.

Определяемый компонент: витамин D.

Сорбент: силикагель (0,5 г), кондиционированный 3 мл смеси безводный эфир/гексан (1:9).

Процедура: после нанесения образца следует промывка 10 мл смеси безводный эфир/гексан (1:9) и элюирование 7,5 мл смеси безводный эфир/гексан (33:67).

Ссылка: [11, PH-026].

3.3.7. Экстракция хлортетрациклина из мази

Экстракцию хлортетрациклина гидрохлорида из мази проводят с использованием гексана в качестве экстрагента и диольной колонки для последующего концентрирования антибиотика.

Используемые условия ТФЭ

Образец: экстракт из 50 мг мази и 2 мл гексана в виде суспензии.

Определяемый компонент: хлортетрациклина гидрохлорид.

Сорбент: диольная неподвижная фаза (0,5 г), кондиционированная 3 мл гексана.

Процедура: после нанесения образца следует промывка гексаном (2x1 мл), высушивание в токе воздуха и элюирование двумя аликвотами по 1 мл смеси $\text{CH}_3\text{OH}/0,1 \text{ N HCl}$ (1:1).

Ссылка: [11, PH-037].

3.4. Концентрирование неорганических соединений

Наряду с очисткой органических соединений, метод ИОЭ успешно применяется и для концентрирования неорганических соединений.

Для концентрирования анионов неорганических кислот наиболее употребим универсальный патрон ДИАПАК ТА. Этот анионообменник выпускается в СГ-форме, поэтому при определении хлоридов его необходимо предварительно перевести в другую форму – ацетатную или гидрокарбонатную. Эффективность извлечения анионов сильных неорганических кислот (хлорида, бромида, нитрита, нитрата, сульфата) практически не зависит от кислотности анализируемого раствора. Извлечение анионов фосфорной кислоты растет с ростом рН; при определении фосфата сорбцию предпочтительнее проводить при рН > 5. Выбор элюента для десорбции анионов в значительной мере определяется методом после-

дующего анализа. Так, при использовании метода одноколоночной ионной хроматографии наиболее эффективными элюентами являются натриевые и калиевые соли бензойной и фталевой кислот. Для концентрирования ионов щелочных и щелочноземельных металлов можно использовать сильнокислотный катионообменник ДИАПАК Сульфо, выпускаемый в H^+ -форме; чтобы десорбировать сконцентрированные на нем ионы, используются растворы сильных кислот (соляной или азотной).

Значительный интерес в настоящее время вызывает определение в различных матрицах ионов переходных металлов. Ионообменное связывание ионов переходных металлов на патроне ДИАПАК Сульфо протекает в широком диапазоне значений pH, однако эффективность извлечения существенно зависит от ионной силы анализируемого раствора; следует также учитывать, что ионы щелочноземельных металлов обладают высоким сродством к сильнокислотному катионообменнику и в больших концентрациях подавляют сорбцию ионов переходных металлов.

Для концентрирования ионов переходных металлов широкое распространение получил метод ИОЭ на основе комплексообразования. Такой механизм ИОЭ протекает в патронах ДИАПАК ИДК, в которых привитая к носителю иминодиуксусная кислота образует комплексы различной устойчивости с широким кругом ионов переходных металлов, что позволяет осуществлять как индивидуальное, так и групповое концентрирование путем варьирования величины pH анализируемого раствора. Главным достоинством патронов ДИАПАК ИДК является слабая зависимость эффективности извлечения от ионной силы раствора, а также то, что ионы щелочноземельных металлов, обладая низким сродством к данному сорбенту, в слабокислой среде практически не влияют на эффективность извлечения ионов переходных металлов.

3.5. Фракционирование соединений методом эксклюзионной ТФЭ

Для фракционирования соединений, отличающихся молекулярной массой или размером молекул, применяется метод эксклюзионной ТФЭ. Принцип этого метода заключается в том, что на инертных сорбентах, т.е. в отсутствие специфических взаимодействий пробы и неподвижной фазы, порядок элюирования компонентов пробы во всех случаях является функцией размера молекул. При пропускании образца через такой патрон вначале элюируются высокомолекулярные соединения, не удерживаемые в порах сорбента, затем соединения со средней молекулярной массой и лишь потом низкомолекулярные соединения. В первой порции элюата будут находиться соединения с молекулярными массами, превышающими верхний предел эксклюзии (для сорбентов с диаметром пор, например 130 Å, он составляет величину порядка 100000 дальтон). В последующих порциях будут накапливаться соединения с молекулярной массой в интервале 100000–10000 дальтон, и лишь в конце будут выходить низкомолекулярные соединения. Настоящий метод в основном применяется для очистки биологических и биохимических образцов, в отдельных случаях – в экологических анализах и анализах пищевых продуктов для отделения высокомолекулярных компонентов матрицы, наличие которых резко снижает срок службы хроматографических колонок.

Обычно для эксклюзионной ТФЭ используют патроны ДИАПАК Диол. Подбор условий разделения и очистки образцов на патронах ДИАПАК Диол осуществляется в каждом конкретном случае отдельно, и если в последующих исследованиях вновь встречается данный тип матрицы, то подобранная ранее методика хорошо воспроизводится.

4. Указания по работе с патронами ДИАПАК

В общем случае при использовании патронов для ТФЭ выполняются следующие операции:

I. Активация – приведение патрона в рабочее состояние. Для НФЭ патроны промывают неполярным растворителем или смесью растворителей, как правило хорошо обезвоженных; для ОФЭ промывка патронов осуществляется смесью полярных или малополярных (в отдельных случаях неполярных) растворителей; для ИОЭ – буферными растворами или растворами электролитов, переводящими патроны в ту или иную ионную форму.

II. Кондиционирование (уравновешивание) – промывка патрона растворителем (или смесью растворителей), который использовался для растворения матрицы. При этом также происходит удаление избытка активирующих агентов.

III. Нанесение образца – загрузка подлежащего очистке или концентрированию образца на патрон.

IV. Продувка (обычно сухим азотом) или **промывка** слабым растворителем для удаления остатков раствора матрицы или предварительной очистки сконцентрированного образца.

V. Элюирование – смыв сконцентрированной или очищенной пробы с патрона.

После того как сделан выбор соответствующего патрона и определены условия его активации, необходимо руководствоваться следующими положениями.

1). Использовать для кондиционирования патрона тот же растворитель (или смесь растворителей), какой применялся для растворения матрицы или определяемого компонента. Объем кондиционирующего раствора должен составлять от 3 до 10 мл.

2). Избегать употребления несмешивающихся активирующего и кондиционирующего растворителей (см. Приложение). В случае необходимости между активацией и кондиционированием ввести промежуточную операцию – промыть патрон растворителем (1–2 мл), хорошо смешивающимся с обоими агентами, например изопропанолом. Для активации использовать от 2 до 10 мл растворителя.

3). Ни в коем случае не допускать высыхания патрона или попадания в него пузырьков воздуха как на стадии активации, так и кондиционирования. Сразу после кондиционирования приступить к следующей стадии работы; в случае приостановки работы герметично закрыть патрон с двух концов прилагаемыми заглушками.

4). Использовать растворители с низкой вязкостью.

5). Кроме отдельных случаев, наносить пробу на патрон со скоростью 2–5 мл/мин, иначе может произойти «проскок» слабоудерживаемых компонентов матрицы, что повлечет за собой снижение эффективности концентрирования или потерю целевых компонентов.

6). Использовать для растворения матрицы только такие растворители, которые хорошо смешиваются между собой (см. Приложение).

7). После нанесения раствора образца продуть патрон током сухого очищенного азота в течение 1–2 мин либо, в случае легколетучих или сильносорбирующихся компонентов, промыть патрон слабым растворителем (для ИОЭ и ОФЭ обычно используется деионизованная дистиллированная вода).

8). Как правило объем элюирующего растворителя должен составлять 5–10 мл. Элюент желательно вводить порциями по 0,5 мл, причем для установления равновесия в системе и более полного извлечения компонентов интервал между введением первой и второй порций должен составлять 1–2 мин.

9). Поскольку для большинства веществ полная сорбционная емкость патронов не превышает 15–20 мг, необходимо предварительно оценить концентрацию целевого компонента в матрице.

10). Для нанесения растворов на патрон Тип-1 использовать шприц или закрепленную в верхнем штуцере воронку, через которую раствор будет стекать самотеком (иногда

используется водоструйный насос). Растворы вводить только в одном направлении – сверху вниз. При загрузке больших объемов жидкости, последнюю необходимо предварительно отфильтровать на мембранном фильтре с диаметром пор не более 0,45 мкм.

11). Для нанесения растворов на патрон Тип-2 использовать водоструйный насос, не допуская при этом попадания воздуха в патрон. Консервацию сорбента в герметично закрытом патроне Тип-2 производить под двух-трехсантиметровым слоем консервирующего агента, например водно-ацетонитрильной смеси в случае ОФ-системы.

Справочно: для одновременной работы с 10–15 концентрирующими патронами следует использовать специальные устройства, работающие с водоструйными или мембранными насосами, например Manifold.

5. Рекомендации по созданию методик пробоподготовки

5.1. Общие вопросы создания методик

Эффективность ТФЭ включает в себя эффективность сорбции интересующего компонента из раствора матрицы и эффективность последующей десорбции данного компонента. При использовании модельной системы, в которой матрица максимально приближена к природной, суммарная эффективность экстракции, или степень извлечения (R) i -го компонента пробы по ходу всех проделанных операций, может быть рассчитана по формуле:

$$R = q_i / Q_i,$$

где q_i – количество i -го компонента, извлеченного из матрицы; Q_i – количество i -го компонента в матрице.

Эта величина должна быть учтена в первую очередь при проведении количественного определения интересующих компонентов. Для повышения степени очистки и понижения предела обнаружения концентрируемых соединений необходимо стремиться к максимальной эффективности ТФЭ, в связи с чем особое значения приобретают методические аспекты процедуры пробоподготовки.

Наибольшие осложнения возникают тогда, когда интересующие компоненты либо слабо связываются с сорбентом, либо прочно удерживаются на нем. В обоих случаях эффективность извлечения оказывается невысокой, что происходит вследствие «проскока» некоторой части компонента при нанесении пробы или по причине неполного элюирования, т.е. когда некоторое количество компонента остается в патроне.

В первом случае проблема может быть решена за счет перехода к более сильному сорбенту, например: от менее гидрофобного ДИАПАК С8 к более гидрофобному ДИАПАК С16, или от слабого анионообменника ДИАПАК Амин к сильному ДИАПАК ТА, или от слабого катионообменника ДИАПАК Карбокси к сильному ДИАПАК Сульфо. Следует также иметь в виду, что на сорбцию компонентов в значительной мере влияет состав матрицы: тип используемого растворителя, наличие конкурирующих за места связывания соединений и т.д. В этой связи эффективность ТФЭ повышают путем модифицирования раствора матрицы – подбирая более удобный растворитель или смесь растворителей, изменяя величину рН, удаляя перед экстракцией конкурирующие компоненты, снижая или, наоборот, повышая ионную силу раствора. В биологических пробах при экстракции и концентрировании биогенных низкомолекулярных веществ мешающими и конкурирующими компонентами служат сывороточные белки, поэтому их либо удаляют денатурацией с последующим центрифугированием или фильтрованием, либо отделяют с помощью эксклюзионных патронов ДИАПАК Диол. При определении пестицидов и полихлорированных бифенилов в жировых тканях мешающим компонентом является жир, по-

этому его растворяют гомогенизацией в экстрагирующем растворителе (метиленхлориде, гексане); охлаждение полученного экстракта позволяет отделить жир от растворенных определяемых компонентов, благодаря чему удается провести их количественное концентрирование на патроне.

Во втором случае проблему можно решить либо заменой патрона с сильным сорбентом на более слабый (это ускорит элюирование компонентов), либо, пользуясь тем же патроном, подбором элюента с более низким для ОФЭ и более высоким для НФЭ значением элюирующей силы (см. Приложение). В ИОЭ оптимизировать условия разделения, в том числе понизить удерживание компонентов, удастся за счет изменения типа и концентрации противоионов, величины рН, введения в состав элюента органического модификатора.

Объем анализируемого раствора также может оказывать влияние на эффективность метода ТФЭ. Превышение сорбционной емкости патрона или отклонение объема раствора от оптимальной величины нагрузки снижает эффективность экстракции. Расчет оптимального объема раствора для многокомпонентной системы может быть проведен по методике, описанной в работе [12].

Выбор последующего метода анализа также накладывает определенные ограничения на методику пробоподготовки, в особенности на выбор элюирующих растворителей. Так, в ГХ нельзя использовать пробы, содержащие растворы солей и в ряде случаев следы влаги. Если растворитель, в котором находится проба, пригоден для ГХ (не осмолается и не разлагается при повышенной температуре), то следы влаги могут быть удалены пропусканьем раствора через слой прокаленного сульфата натрия. Отделение солей может быть проведено путем диализа или высушивания пробы с последующим ее растворением в растворителе (или смеси растворителей), в котором соли не растворяются. Пренебрежение этими операциями создает риск повреждения аналитических колонок.

Если конечным методом анализа является ВЭЖХ, то следует помнить о недопустимости использования в составе проб таких растворителей, которые не смешиваются с подвижной фазой или поглощают в спектральном диапазоне, предназначенном для детектирования определяемых компонентов; недопустимо также применение водосодержащих проб в режиме НФ-хроматографии и проб, содержащих гексан (или подобные ему растворители), в режиме ОФ-хроматографии. В этих случаях необходимо предварительно упарить (в токе сухого азота или при повышенной температуре) и перерастворить пробу в более подходящем растворителе. Эти операции также приводят к концентрированию пробы (например, упаривание 5 мл пробы и ее перерастворение в 50 мкл растворителя увеличивает конечную концентрацию определяемых компонентов в 100 раз). При высушивании пробы следует остерегаться потери легколетучих или нестабильных соединений.

В заключение следует отметить, что во всех случаях использования метода ТФЭ необходимо четко представлять, какому роду матрицы присущи исследуемые соединения. Например, при определении приоритетных фенолов в водных средах матрицей является вода, из которой и происходит сорбция и концентрирование определяемых соединений. Поскольку фенолы могут также находиться в сорбированном состоянии на седиментах и в донных отложениях, для исследования распределения этих загрязнителей внутри экосистемы анализу должна быть подвергнута каждая матрица в отдельности (седименты и донные отложения).

5.2. Применение ТФЭ в анализе объектов окружающей среды

5.2.1. Хлорорганические пестициды в воде

В силу того что экстрагируемые соединения, относящиеся к данному классу пестицидов, являются неполярными, их выделяют в режиме ОФЭ с использованием среднепо-

лярной неподвижной циано-фазы, на которой при элюировании этилацетатом повышается степень извлечения определяемых компонентов.

Используемые условия ТФЭ

Образец: проба речной воды (100 мл), без добавок.

Определяемые компоненты: эндрин, диэльдрин, хлордан, эндосульфан.

Сорбент: CN-фаза (360 мг), кондиционированная 2 мл метанола, 2 мл этилацетата, 2 мл метанола и 2 мл дистиллированной воды.

Процедура: после нанесения образца следует продувка сорбента воздухом для удаления остаточной воды и элюирование 2 мл этилацетата.

Ссылка: модифицированная методика из *Chromatographia*, **35**, 290-294 (1993).

5.2.2. Хлорорганические пестициды в почве и осадках

Экстракцию выполняют в аппарате Сокслета при помощи смеси метанол/дистиллированная вода (9:1). Метанол эффективно извлекает большинство хлорорганических пестицидов из почвенных и осадочных матриц. Последующую операцию проводят на гидрофобной неподвижной фазе С18 в этилацетате, предварительно снизив концентрацию метанола в экстракте до 10%.

Используемые условия ТФЭ

Образец: проба почвы или осадков (20 г), без добавок.

Определяемые компоненты: эндрин, диэльдрин, хлордан, эндосульфан.

Сорбент: неподвижная фаза С18 (360 мг), кондиционированная 2 мл метанола, 2 мл этилацетата, 2 мл метанола и 2 мл дистиллированной воды.

Процедура: после нанесения образца следует продувка сорбента воздухом для удаления остаточной воды и элюирование 2 мл этилацетата.

Ссылка: модифицированная методика из *Anal. Chem.*, **64**, 1985 (1992).

5.2.3. Полиароматические углеводороды в воде и почве

Извлечение полиароматических углеводородов (ПАУ) из воды выполняют на неподвижных фазах CN, C8, C18 с использованием в качестве элюента смеси этилацетат/толуол. Последний добавляют для того, чтобы усилить растворимость ПАУ и повысить извлечение с сорбента. Вследствие менее сильных дисперсионных взаимодействий, относительно более гидрофобные ПАУ (пирен) эффективнее извлекаются со слабополярных неподвижных фаз (CN, C8). После экстракции ПАУ 90%-ным метанолом концентрацию спирта доводят до 10%.

Используемые условия ТФЭ

Образец: проба речной воды (100 мл), без добавок.

Определяемые компоненты: ПАУ.

Сорбент: неподвижная фаза CN, C8 или C18 (360 мг), кондиционированная 2 мл метанола, 2 мл смеси этилацетат/толуол, 2 мл метанола и 2 мл дистиллированной воды.

Процедура: после нанесения образца ПАУ элюируют 2 мл смеси этилацетат/толуол (1:1); если используется более гидрофобный растворитель (гексан или хлористый метилен), сорбент должен быть освобожден от воды.

Ссылка: 1) модифицированная методика из *Chromatographia*, **28**, 203-211 (1989); 2) [11, EN-019].

5.2.4. Неионогенные гербициды в воде и почве

К числу пестицидов относятся также неионогенные гербициды, проявляющие свойства соединений со средней полярностью. Их растворимость в воде составляет от 10 до 500 мг/л. Концентрируют гербициды на гидрофобной неподвижной фазе С18 и элюируют этилацетатом.

Используемые условия ТФЭ

Образец: проба воды (100 мл), без добавок.

Определяемые компоненты: неионогенные гербициды.

Сорбент: неподвижная фаза С18 (360 мг, частицы 40 мкм), кондиционированная 2 мл метанола, 2 мл этилацетата, 2 мл метанола и 2 мл дистиллированной воды.

Процедура: после нанесения образца следует продувка сорбента воздухом для удаления остаточной воды и элюирование 2 мл этилацетата.

Ссылка: *Anal. Chem.*, **62**, 2043-2048 (1990).

Используемые условия ТФЭ

Образец: проба почвы или осадков (20 г), без добавок.

Определяемые компоненты: те же.

Сорбент: тот же и тем же образом кондиционированный.

Процедура: двукратную экстракцию проводят в аппарате Сокслета 90%-ным метанолом; экстракт разбавляют водой до 360 мл; последующие операции – те же.

Ссылка: модифицированная методика из *Anal. Chem.*, **64**, 1985 (1992).

5.2.5. Фосфорорганические пестициды в воде и почве

Фосфорорганические пестициды (паратион, метилпаратион, диазинон, диметоат) широко применяются в качестве инсектицидов, фунгицидов и противоинвазионных препаратов. Будучи неионогенными соединениями средней полярности, они сорбируются на гидрофобной неподвижной фазе С18 и вымываются этилацетатом.

Используемые условия ТФЭ

Образец: проба почвы или осадков (20 г), без добавок.

Определяемые компоненты: метилпаратион и другие соединения.

Сорбент: неподвижная фаза С18 (360 мг), кондиционированная 2 мл метанола, 2 мл этилацетата, 2 мл метанола и 2 мл дистиллированной воды.

Процедура: двукратную экстракцию проводят в аппарате Сокслета 90%-ным метанолом; экстракт разбавляют водой до 360 мл; после нанесения образца удаляют остаточную воду и элюируют 2 мл этилацетата.

Ссылка: модифицированная методика из *Anal. Chem.*, **64**, 1985 (1992).

5.2.6. Нелетучие органические соединения: гербициды на основе карбаматов, замещенных амидов и фенилмочевины в воде и почве

Указанные соединения относятся к неионогенным среднеполярным гербицидам. Их концентрируют на неподвижной фазе С18 с использованием, в зависимости от степени их растворимости, метанола или этилацетата в качестве элюента.

Используемые условия ТФЭ

Образец: проба речной воды (100 мл), без добавок.

Определяемые компоненты: гербициды на основе карбаматов, замещенных амидов и фенилмочевины.

Сорбент: неподвижная фаза С18 (360 мг), кондиционированная 2 мл метанола и 2 мл дистиллированной воды.

Элюент: 2 мл метанола.

Ссылка: 1) модифицированная методика из *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **42**, 15 (1990); 2) [11, EN-025].

Используемые условия ТФЭ

Образец: проба почвы или осадков (20 г), без добавок.

Определяемые компоненты: те же.

Сорбент: тот же, кондиционированный 2 мл метанола, 2 мл этилацетата, 2 мл метанола и 2 мл дистиллированной воды.

Процедура: двукратную экстракцию проводят в аппарате Сокслета 90%-ным метанолом; экстракт разбавляют водой до 360 мл; после нанесения образца удаляют остаточную воду и элюируют 2 мл этилацетата.

Ссылка: модифицированная методика из *Anal. Chem.*, **64**, 1985 (1992).

5.2.7. Метаболиты гербицидов в воде и почве

Метаболиты гербицидов ряда триазина, образующиеся в почве в результате дезалкилирования исходных веществ, относятся к неионогенным полярным соединениям. Их растворимость в воде составляет не менее 1000 мг/л. Проявляя неполярные свойства, они сорбируются на стирол-дивинилбензольном сополимере и углеродных адсорбентах. Они растворимы в этилацетате и метаноле, каждый из которых может быть использован в качестве элюента. Кроме того, исходные соединения и их дезалкилированные метаболиты могут быть сконцентрированы на неподвижной фазе С18, при этом с хорошим выходом очищается диэтилатразин и диизопропилатразин, несколько хуже – дидезалкилатразин.

Используемые условия ТФЭ

Образец: проба речной воды (100 мл), без добавок.

Определяемые компоненты: диэтилатразин, диизопропилатразин и дидезалкилатразин.

Сорбент: стирол-дивинилбензольная смола (1 г), кондиционированная 2 мл метанола, 2 мл этилацетата, 2 мл метанола и 2 мл дистиллированной воды.

Процедура: после нанесения образца удаляют остаточную воду и элюируют 2 мл этилацетата.

Ссылка: Неопубликованные данные.

Используемые условия ТФЭ

Образец: тот же.

Определяемые компоненты: те же.

Сорбент: неподвижная фаза С18 (360 мг), кондиционированная тем же образом.

Процедура: та же.

Ссылка: *Anal. Chem.*, **62**, 2043 (1990).

Примечание: относительно низкий выход дидезалкилатразина (60%) можно повысить, перейдя к стирол-дивинилбензольному сорбенту.

Используемые условия ТФЭ

Образец: проба почвы или осадков (20 г), без добавок.

Определяемые компоненты: те же.

Сорбент: тот же, что и в первом случае.

Процедура: двукратная экстракция в аппарате Сокслета 90%-ным метанолом с последующим упариванием метанола в токе азота и проведением водной экстракции; элюент – тот же.

Ссылка: модифицированная методика из *Anal. Chem.*, **64**, 1985 (1992).

5.2.8. Фенол и хлорированные фенолы в воде и почве

Определяемые ионогенные соединения отличаются по полярности: фенол, будучи полярным соединением, хорошо сорбируется на стирол-дивинилбензольной смоле (СДБ); хлорированные фенолы, являясь менее полярными соединениями, хорошо удерживаются как на СДБ, так и на гидрофобном сорбенте С18. В качестве элюента применяются растворители, хорошо смешивающиеся с водой – ацетон, ацетонитрил, метанол и т.д. Необходимо учитывать, что при использовании метанола существует вероятность метилирования исследуемых соединений.

Используемые условия ТФЭ

Образец: проба речной воды (100 мл), без добавок.

Определяемые компоненты: фенол и хлорированные фенолы.

Сорбент: СДБ-смола (1 г) или С18, кондиционированная 2 мл ацетонитрила и 2 мл дистиллированной воды.

Элюент: 2 мл ацетонитрила (можно использовать метанол или ацетон).

Ссылка: 1) модифицированная методика из *Chromatographia*, **18**, 323-325 (1984); 2) [11, EN-012].

Используемые условия ТФЭ

Образец: проба почвы или осадков (20 г), без добавок.

Определяемые компоненты: те же.

Сорбент: СДБ-смола (1 г), кондиционированная 2 мл метанола, 2 мл этилацетата, 2 мл метанола и 2 мл дистиллированной воды.

Процедура: двукратную экстракцию проводят в аппарате Сокслета 90%-ным метанолом; экстракт разбавляют водой до 360 мл; после нанесения образца удаляют остаточную воду и элюируют 2 мл этилацетата.

Ссылка: модифицированная методика из *Anal. Chem.*, **64**, 1985 (1992).

5.2.9. Кислые гербициды (2,4-D, 2,4,5,-Т, Дикамба) и гербициды сульфомочевины в воде и почве

Эти гербициды содержат ионогенные группы средней полярности, способные к диссоциации в водных растворах при $\text{pH} \approx 7$. Для подавления диссоциации и усиления гидрофобных взаимодействий с неподвижной фазой С18, водные растворы этих соединений должны быть подкислены. Это условие выполняется тогда, когда величина pH на 2 единицы меньше pK_a , что обычно составляет величину pH не ниже 2. При более низких значениях pH возникает угроза разрушения ОФ-сорбента, в связи с чем привитые «полимерные» неподвижные фазы выглядят предпочтительнее, чем «мономерные». Еще бóльшую устойчивость в кислых средах проявляет сополимер СДБ, который можно использовать при $\text{pH} < 2$.

Используемые условия ТФЭ

Образец: проба речной воды (100 мл), $pH < pK_a - 2$.

Определяемые компонент: кислые гербициды (2,4-D, 2,4,5,-Т, Дикамба) и гербициды сульфомочевины.

Сорбент: «полимерная» неподвижная фаза С18 (400 мг) или СДБ-смола, кондиционированная 2 мл метанола или 2 мл дистиллированной воды (рН 2).

Элюент: 2 мл метанола.

Ссылка: 1) модифицированная методика из *J. Chromatogr.*, **25**, (1987); 2) [11, EN-024].

Используемые условия ТФЭ

Образец: проба почвы или осадков (20 г), без добавок.

Определяемые компоненты: те же.

Сорбент: СДБ-смола (1 г), кондиционированная 2 мл метанола, 2 мл этилацетата, 2 мл метанола и 2 мл дистиллированной воды.

Процедура: двукратную экстракцию проводят в аппарате Сокслета 90%-ным метанолом; экстракт разбавляют водой до 360 мл; после нанесения образца удаляют остаточную воду и элюируют 2 мл этилацетата.

Ссылка: модифицированная методика из *Anal. Chem.*, **64**, 1985 (1992).

5.2.10. Анионогенные ПАВ в воде и почве

Указанная группа веществ может быть надежно извлечена из воды методом ОФЭ с использованием метанола или ацетонитрила в качестве элюента.

Используемые условия ТФЭ

Образец: проба сточной воды (100 мл), без добавок.

Определяемые компонент: линейные алкилсульфонаты.

Сорбент: неподвижная фаза С8 или С18 (360 мг), кондиционированная 2 мл ацетонитрила, 2 мл метанола и 2 мл дистиллированной воды.

Элюент: 2 мл ацетонитрила (метанола).

Ссылка: *Anal. Chem.*, **62**, 2581-2586 (1990).

Используемые условия ТФЭ

Образец: проба почвы или осадков (20 г), без добавок.

Определяемые компоненты: анионогенные ПАВ.

Сорбент: неподвижная фаза С18 (360 мг), кондиционированная 2 мл метанола, 2 мл этилацетата, 2 мл метанола и 2 мл дистиллированной воды.

Процедура: двукратная экстракция в аппарате Сокслета 90%-ным метанолом; разбавление экстракта водой до 360 мл; элюирование 2 мл метанола.

Ссылка: модифицированная методика из *Anal. Chem.*, **62**, 2581 (1990).

5.3. Применение ТФЭ в фармацевтическом анализе биологических объектов

В данном разделе представлены некоторые методики ТФЭ, используемые для подготовки биологических проб к последующему анализу.

5.3.1. Циклоспорин в крови

Несмотря на то что циклоспорин распределяется главным образом вне кровяного русла, он тем не менее обнаруживается в эритроцитах, гранулоцитах, лимфоцитах. Ввиду заметной гидрофобности циклоспориона, его выделяют методом ОФЭ на циано-фазе.

1. К 1 мл крови (с антикоагулянтом типа гепарина) добавляют 2 мл смеси ацетонитрил/вода (30:70); образец подвергают гемолизу в течение 5 мин.

2. Наносят центрифугированный и разбавленный образец на CN-фазу.

3. Промывают сорбент сначала смесью ацетонитрил/0,5 М уксусная кислота (20:80), затем смесью ацетонитрил/0,15 М уксусная кислота (40:60).

4. Элюируют 2 мл ацетонитрила.

Ссылка: Clin. Chem., **31**, 196-201 (1985).

5.3.2. 25-Гидроксивитамин D в сыворотке

25-Гидроксивитамин D (25-ОН-D) и его метаболит 1,25-дигидроксивитамин D (1,25-(ОН)₂-D) представляют собой весьма гидрофобные соединения, которые могут быть выделены из сыворотки методом ОФЭ на неподвижной фазе C18 и по отдельности сконцентрированы на амино-фазе.

1. Кондиционируют C18-сорбент 2 мл метанола и 2 мл воды.

2. К 3 мл сыворотки добавляют 4 мл 0,1 N HCl, затем 8,5 мл метанола, после чего образец наносят на сорбент.

3. Промывают сорбент смесью метанол/вода (70:30) для удаления примесей.

4. Элюируют 25-ОН-D и 1,25-(ОН)₂-D 3 мл смеси метанол/вода (90:10).

5. Кондиционируют NH₂-сорбент гексаном.

6. Наносят элюат с сорбента C18 на сорбент NH₂.

7. Промывают NH₂-сорбент 0,5%-ным изопропанолом в гексане.

8. Элюируют 25-ОН-D смесью изопропанол/гексан (4:96).

9. Элюируют 1,25-(ОН)₂-D смесью изопропанол/гексан (25:75).

Ссылка: Clin. Chem., **30**, 56-61 (1984).

5.3.3. Липиды из сыворотки и тканей

Липиды – это широкий класс соединений, содержащих липофильные цепи, что делает их растворимыми в органических растворителях и нерастворимыми в воде. Настоящий пример демонстрирует возможность ТФЭ в качестве метода выделения из биологической пробы семи классов липидов, включая жирные кислоты, фосфолипиды, эфиры холестерина, холестерин, моно-, ди- и триглицериды. Липиды существенно различаются по полярности, что затрудняет выбор неподвижной фазы и элюента для их индивидуального разделения в пределах каждого класса. Поэтому их очистка сводится к групповому выделению отдельных классов. Матрицей для анализа служит хлороформный экстракт сыворотки или адипозной ткани. Выделение липидов проводят на амино-фазе в режиме НФЭ и ИОЭ, так как NH₂-фаза проявляет свойства слабого анионообменника.

1. Кондиционируют амино-колонку 2 мл гексана.

2. Наносят хлороформный экстракт на NH₂-колонку.

3. Смесью хлороформ/пропанол (2:1) элюируют нейтральные липиды (фракция № 1).

4. Жирные кислоты элюируют 2%-ной уксусной кислотой в эфире (фракция № 1).

5. Фосфолипиды элюируют метанолом (фракция № 2).
 6. Фракцию № I упаривают и перерастворяют в гексане.
 7. Гексановый экстракт наносят на sdвоенную амино-колонку. Эфиры холестерина элюируют гексаном (фракция № 3), при этом вторая колонка будет удерживать холестерин вместе с триглицеридами.
 8. Триглицериды элюируют гексаном, содержащим смесь эфир/дихлорметан в соотношении 1:10 (фракция № 4).
 9. Колонки разъединяют и элюируют холестерин со второй (нижней) колонки 5%-ным этилацетатом в гексане (фракция № 5).
 10. Диглицериды элюируют с первой (верхней) колонки 15%-ным этилацетатом в гексане (фракция № 6).
 11. Моноглицериды элюируют с первой колонки смесью хлороформ/метанол в соотношении 2:1 (фракция № 7).
- Ссылка: Kaluzny B.D. Proceedings of the Second International Symposium on Sample Preparation and Isolation using Bonded Silicas, Analytichem International, Amsterdam (1985).

5.3.4. Витамин B₁₂ в моче или водном растворе

Витамин B₁₂, (цианокобаламин) относится к группе водорастворимых витаминов. Благодаря своей гидрофильности он может быть выделен из водного раствора путем ОФЭ на неподвижной фазе C18.

1. Кондиционируют C18-сорбент 2 мл метанола и 2 мл воды, а затем 0,05 М раствором NaH₂PO₄ (один объем колонки).
 2. Образец мочи или водного раствора (10 мл) наносят на 1 г сорбента.
 3. Промывают колонку одним объемом дистиллированной воды, не давая ей просохнуть.
 4. Элюируют витамин B₁₂ 2 мл 50%-ного этанола в 0,05 М растворе NaH₂PO₄, а затем 3 мл дистиллированной воды.
- Ссылка: J. Chromatogr. Sci., 28, 42-45 (1990).

5.4. Применение ТФЭ для выделения компонентов из пищевых продуктов

5.4.1. Атразин из кукурузного масла

Атразин – гербицид ряда *симм*-триазинов – применяется для уничтожения сорных растений на кукурузных полях Среднего Запада США. Цель выделения состоит в определении следовых количеств атразина в кукурузном масле.

1. Кукурузное масло разбавляют гексаном в соотношении 1:10 и наносят экстракт на диольную колонку. Компоненты масла практически не удерживаются и проходят через колонку вместе с гексаном, в то время как атразин сорбируется на неподвижной фазе за счет водородных связей между своими аминогруппами и гидроксильными группами сорбента.
 2. Мешающие примеси элюируют 2 мл гексана.
 3. Атразин элюируют растворителем, способным разрушать водородные связи, например метанолом (2 мл).
- Ссылка: [8, стр.229].

5.4.2. Напитки: органические кислоты и антоцианины из вина

Поскольку органические кислоты и антоцианины значительно отличаются по полярности, их выделяют с использованием двух типов сорбента. Винная, яблочная и фумаровая кислоты – полярные соединения, не сорбирующиеся на гидрофобной фазе С18, поэтому их выделение основано на реакциях ионного обмена. Антоцианины, напротив, неполярные соединения: их выделяют на ОФ-сорбентах, с которыми они вступают в гидрофобные взаимодействия.

Антоцианины очищают на циклогексильной неподвижной фазе в режиме ОФЭ; органические кислоты – на анионообменнике в СГ-форме, для чего используется сильная кислота, которая протонирует органические кислоты и замещает хлор-ион на ионообменном сорбенте.

1. Кондиционируют циклогексильную и анионообменную колонки 2 мл метанола и 2 мл воды.

2. Наносят 50 мл образца на систему из двух колонок, причем циклогексильная колонка предшествует анионообменной.

3. Промывают систему деионизованной водой.

4. Антоцианины элюируют с циклогексильной колонки 2 мл метанола.

5. Органические кислоты элюируют с анионообменной колонки 1 мл 0,1 N HCl.

Ссылка: [8, стр.230].

5.4.3. Тетрациклиновые антибиотики в мясе

Тетрациклиновые антибиотики широко используются в современном животноводстве в качестве средства ветеринарной обработки скота. Санитарный контроль остаточных количеств тетрациклинов в мясе забойных животных является важной областью здравоохранения. Очистку тетрациклиновых антибиотиков проводят на неподвижной фазе С18 в режиме ОФЭ с последующим анализом сконцентрированного образца методом ТСХ или ВЭЖХ.

1. Измельчают 5 г образца в высокоскоростном блендере с трехкратным центрифугированием и экстракцией 20, 20 и 10 мл 0,1 М раствора Na₂EDTA в McIlvaine-буфере (pH 4,0). Супернатанты объединяют, снова центрифугируют и фильтруют.

2. Фильтрат наносят на С18-сорбент, предварительно активированный 2 мл метанола и промытый 5 мл буферного раствора Na₂EDTA.

3. Патрон промывают 20 мл дистиллированной воды и высушивают пропуском воздуха в течение 5 мин.

4. Тетрациклиновые антибиотики элюируют 10 мл этилацетата, а затем 20 мл смеси этилацетат/метанол (95:5); элюат упаривают досуха при пониженном давлении при 30° С. Остаток перерастворяют в метаноле и анализируют методом ТСХ или ВЭЖХ.

Ссылка: Oka H., Ikai Y., Hayakawa J., Masuda K., Harada K., Suzuki M., Martz V., McNeil J. D. J. *Agricul. Food Chem.*, **41**, 410-415 (1993).

5.4.4. Фумонизин В₁ в кормах для грызунов

Фумонизин В₁ является главным фумонизиновым метаболитом, продуцируемым грибами *Fusarium moniliforme*. С ним связывают возникновение раковых заболеваний у животных. Поскольку фумонизин В₁ содержит аминные и карбоксильные группы, при его выделении из кормов используются механизмы ОФЭ и анионного обмена. В ОФ-режиме на неподвижной фазе С18 образец «высаливают» 1%-ным раствором KCl. Добавлением в

элюент нейтральных солей сводится к минимуму влияние остаточных силанольных групп на характер элюирования способных к диссоциации растворенных соединений. Такая добавка, помимо подавления диссоциации карбоксильных групп фумонизина В₁, способствует также подавлению диссоциации остаточных силанольных групп ОФ-сорбента, которые могут взаимодействовать по ионообменному механизму с основными группами выделяемого соединения.

1. Корм (50 г) обрабатывают 200 мл смеси ацетонитрил/вода (50:50) в блендере в течение 2 мин; экстракт (20 мл) центрифугируют, 2 мл центрифугата разводят 5 мл 1%-ного водного KCl и наносят на C18-колонку, предварительно кондиционированную 5 мл метанола и 5 мл 1%-ного раствора KCl.

2. Колонку промывают 3 мл 1%-ного раствора KCl, а затем 2 мл смеси CH₃CN/KCl (20:80). Промывка очищает экстракт, при этом фумонизин В₁ удерживается на колонке.

3. Фумонизин В₁ элюируют 2 мл смеси метанол/вода (70:30).

4. Элюат разбавляют 4 мл смеси метанол/вода (70:30) и наносят на SAX-колонку (сильный анионообменник), предварительно кондиционированную 8 мл смеси метанол/вода (70:30).

5. Промывают SAX-сорбент 8 мл смеси метанол/вода (70:30) и 3 мл метанола.

6. Фумонизин В₁ элюируют с SAX-сорбента 14 мл 1%-ной уксусной кислоты в метаноле. Элюат досуха упаривают и переводят в смесь ацетонитрил/вода (50:50) для последующего ВЭЖХ-анализа.

Ссылка: [8, стр. 233].

5.4.5. Витамин К₁ в пищевых продуктах

Витамин К₁ играет важную роль в образовании печени протромбина и других белков, принимающих участие в процессах свертывания крови. Очистку жирорастворимого витамина К₁ проводят на силикагеле и далее его анализируют методом ВЭЖХ.

1. Для экстракции витамина К₁ из образцов молока и соков используют гексан в сочетании с ультразвуковой обработкой, после чего гексановый слой отделяют. Хлебные и овощные образцы доводят до порошкообразного состояния, затем экстрагируют гексаном.

2. Кондиционируют силикагель 8 мл смеси гексан/эфир (93:3), а затем 8 мл гексана.

3. Наносят 2 мл гексанового экстракта на колонку и промывают 8 мл гексана.

4. Витамин К₁ элюируют 8 мл смеси гексан/эфир (93:3).

5. Образцы высушивают и перерастворяют в 20 мкл дихлорметана, а затем добавляют 180 мкл метанола, содержащего 10 mM хлорида цинка, 5 mM уксусной кислоты и 5 mM ацетата натрия. Проводят ВЭЖХ-анализ.

Ссылка: [8, стр. 235].

5.4.6. α-Томатин в томатах

α-Томатин – главный гликоалкалоид, присутствующий в листьях, стеблях и незрелых плодах томата. Сообщалось о его потенциальной токсичности и антигрибковой активности. Методика его выделения включает лиофилизацию томатов, измельчение, рассев, водную экстракцию и последующую очистку на ОФ-сорбенте.

1. Свежие томаты нарезают и сразу же замораживают в жидком азоте. Образцы лиофилизируют. Сухие томаты размалывают и просеивают через сито размером 0,5 мм.

2. Образец (1 г) обрабатывают 20 мл 1%-ной уксусной кислоты в течение 2 ч, а затем центрифугируют и фильтруют.

3. Сорбент C18 кондиционируют 5 мл метанола и 5 мл воды. Образец (30 мл) наносят на сорбент.

4. Промывают сорбент 10 мл воды, 5 мл смеси ацетонитрил/вода с 1%-ным раствором NH_4OH (30:70) и 5 мл воды.

5. Алкалоиды элюируют 10 мл смеси ацетонитрил/водный цитратно-фосфатный буфер, pH 3 (70:30).

6. Элюат упаривают, реэкстрагируют в бутаноле, вновь упаривают и переводят в смесь метанол/ацетатный буфер для последующего ВЭЖХ-анализа.

Ссылка: [8, стр. 236].

5.4.7. Фолиевая кислота в капусте

Фолиевая кислота (витамин B_9) относится к числу водорастворимых витаминов группы В. Она содержится в свежих овощах, а также в печени и почках животных. Сама фолиевая кислота неактивна. В организме она восстанавливается до тетрагидрофолиевой кислоты, являющейся коферментом многих метаболических процессов. Описанный метод включает экстракцию фолиевой кислоты в условиях скоростного нагревания и энзиматической деконъюгации почечной конъюгацией и панкреатическими ферментами. Экстракты очищают на сильном анионообменнике. Анализ проводят методом ВЭЖХ.

1. Образец белокочанной капусты (от 2 до 5 г) обрабатывают 75 mM фосфатного буфера (pH 6,0), содержащего 52 mM смеси аскорбиновая кислота/аскорбат и 0,1 об.% 2-меркаптоэтанола. Обработку проводят либо в течение 1 мин в микроволновой печи, либо в течение 10 мин на кипящей водяной бане.

2. Образец центрифугируют и подкисляют уксусной кислотой до pH 4,9, затем добавляют конъюгазу и панкреазы и инкубируют при 37° С в течение 2 ч.

3. Экстракт разводят 3–5 мл воды и добавляют к нему 15 мкл 0,1%-ного раствора 2-меркаптоэтанола (pH 7).

4. Образец медленно наносят на сильный анионообменник и промывают двумя порциями по 1,5 мл кондиционирующего агента, состоящего из 0,01 М фосфатного буфера (pH 7,0) и 0,1%-ного 2-меркаптоэтанола.

5. Фолиевую кислоту элюируют с находящегося в фосфатной форме анионообменника 2,5 мл 0,1 М раствора ацетата натрия, содержащего 10 вес.% хлорида натрия и 1 вес.% аскорбиновой кислоты.

Ссылка: Vahteristo L. T., Ollilainen V., Koivistoinen P. E., Varo P. J. *Agricul. Food Chem.*, **44**, 477-482.

6. Включение ТФЭ-схем пробоподготовки в состав методик выполнения измерений и метрологическая аттестация методик

Метрологическая аттестация (МА) методик выполнения измерений (МВИ) состоит в установлении регламентированных метрологических характеристик, дающих возможность оценить правильность, воспроизводимость, точность и другие показатели проводимого анализа вещества. В этом смысле аттестация МВИ на базе ТФЭ ничем не отличается от аттестации других методик, поэтому в обоих случаях общим нормативным документом является ГОСТ Р 8.563-96. Однако наша практика МА МВИ при определении содержания микотоксинов и бенз[а]пирена в продовольственном сырье, пищевых продуктах и кормах (для бенз[а]пирена – также в почве) показала необходимость учета ряда дополнительных факторов, обусловленных схожестью протекания сорбционных процессов в ТФЭ и хроматографии. Следование нашим рекомендациям позволит даже не очень искушенным аналитикам избежать затруднений, которые могут возникнуть как при оценке первичных мет-

рологических характеристик, полученных на этапе внутрилабораторного эксперимента, так и при оценке статистических данных, полученных в ходе межлабораторного эксперимента (ГОСТ Р ИСО 5725-(1-6)-2002).

После выбора конкретной ТФЭ-методики возникает проблема стандартизации условий пробоподготовки. Эта проблема в первую очередь связана с самим хроматографическим процессом, протекающим в концентрирующем патроне. Дело в том, что всякий хроматографический процесс зависит от трех факторов – температуры, сорбционных свойств сорбента, состава и скорости прокачивания элюента, в связи с чем нестабильность любого из этих факторов приводит к дополнительной случайной погрешности. Изменение температуры не очень сильно сказывается на удерживании и селективности; вместе с тем температура и состав подвижной фазы не могут быть независимыми переменными, поэтому различным температурам соответствует свой оптимальный состав подвижной фазы. Что касается стабильности сорбционных свойств неподвижной фазы, то даже самый тщательный контроль не может обеспечить абсолютную идентичность сорбентов одного вида из разных партий (поэтому, пользуясь аттестованными методиками, рекомендуется дублировать патроны, заполненные сорбентом одной и той же партии). Однако главным фактором нестабильности, безусловно, является подвижная фаза: состав элюента и скорость его прокачивания через патрон. Этот же фактор, уязвимый с метрологической точки зрения, одновременно является и наиболее мощным средством воздействия на характер сорбционных и селективных процессов в ТФЭ. Любые вариации в системе сорбент-элюент могут привести к дополнительной погрешности: может либо снизиться выход определяемого компонента, либо ухудшиться его отделение от мешающих примесей.

Принимая во внимание вышеизложенное, настоятельно рекомендуем перед проведением МА МВИ разработать схемы модельных экспериментов на стандартных растворах. Только такой подход при периодическом его применении позволит на практике «отследить» труднопредсказуемые изменения свойств разделительной системы, вызванные ухудшением качества растворителей или ошибками оператора при приготовлении смешанных элюентов.

Указанный способ контроля воспроизводимости свойств системы сорбент-элюент особенно важен в следовом анализе токсикантов, содержащихся в сложных по составу природных матрицах, например в продуктах питания. Нами этот способ был с успехом применен для анализа микотоксинов по МУК 4.1.787-99. Следует подчеркнуть, что рекомендательное «Приложение» к указанному документу, в свою очередь, устанавливает процедуры проведения модельных экспериментов по всем нормируемым микотоксинам для каждой стадии пробоподготовки и жестко нормирует допустимые значения степени извлечения (эффективности экстракции).

Проведение любого метрологического эксперимента невозможно без «стандартных образцов», т.е. таких образцов, которые были бы близки к определяемым компонентам матрицы по химической структуре и концентрации. При наличии выбора можно воспользоваться одним из двух вариантов:

- использовать готовый стандартный образец (СО), аттестованный в установленном порядке;
- использовать рабочий СО, приготовленный самим аналитиком с помощью метода добавок и аттестованный по методике приготовления.

Первый вариант весьма привлекателен, но малодоступен, так как имеющийся ассортимент СО крайне ограничен, особенно в сфере анализа органических соединений.

Второй вариант менее точен, зато гораздо более доступен. Он заключается в том, что весовым или объемным способом в матрицу объекта или в первичный экстракт вводят известное количество стандарта. Самостоятельное «изготовление» СО имеет много преимуществ: возможность внесения добавок с разными уровнями содержания; возможность приготовления СО с несколькими целевыми компонентами и т.д.

Метод добавок является наиболее распространенным способом МА, дающим приемлемые с практической точки зрения значения погрешностей МВИ. Алгоритм метода доба-

вок прост: степень извлечения целевого компонента считается постоянной величиной как для пробы матрицы, так и для пробы матрицы с добавкой при условии, что обе пробы приготовлены одинаково. Вторым условием является допущение, состоящее в том, что отклик выходного аналитического сигнала детектора имеет заведомо меньшую погрешность по сравнению с погрешностью, которую вносит в результаты анализа применяемая схема пробоподготовки.

Первое условие легко выполняется при следовом анализе токсикантов в объектах окружающей среды, включая пищу и корма, так как перегрузка патронов по целевому компоненту невозможна, а концентрация матричных компонентов одинакова. Второе условие также считается вполне достижимым с учетом высокого уровня современной аналитической техники. Гораздо важнее договориться об оптимальной процедуре внесения добавок в матрицу и правильной оценке погрешности при определении содержания целевого компонента в матрице с добавкой. При этом не имеет никакого значения, содержит матрица целевой компонент или нет. Важно, чтобы уровень содержания целевого компонента в пробе с добавкой находился в пределах рабочего диапазона определяемых содержаний. Чаще всего количественное содержание добавки выбирают близким к значению предельно допустимого содержания (ПДС) нормируемого компонента в объектах данного типа; обычно эта величина составляет от 0,5 до 5 ПДС.

Принимая, что преобразование содержания (концентрации) целевого компонента в пробах матрицы (C_m) и в пробах матрицы с добавкой ($C_m + C_d$) в соответствующие выходные аналитические сигналы (I_1 и I_2), например площади хроматографических пиков, носит линейный характер, получаем систему из двух уравнений с двумя неизвестными:

$$\begin{aligned} I_1 &= K C_m \\ I_2 &= K(C_m + C_d), \end{aligned}$$

где K – совокупный множитель, включающий в себя коэффициент преобразования, или поправочный коэффициент аналитического сигнала, и суммарную степень извлечения по ходу всех этапов пробоподготовки.

Решение этой системы дает формулы расчета C_m и K .

$$\begin{aligned} C_m &= I_1 C_d / (I_2 - I_1) \\ K &= (I_2 - I_1) / C_d. \end{aligned}$$

Таким образом, метод добавок позволяет с большей точностью измерить содержание целевого компонента в матрице и оценить величину K , которая отражает столь важные метрологические характеристики МВИ, как правильность и воспроизводимость.

Сравнение статистически достоверного значения K ($n=2-5$) с нормированной по МВИ величиной является основанием для вынесения оценки о квалификационном уровне аналитика в частности и лаборатории в целом. Этот критерий может быть использован при аттестации аналитических лабораторий и испытательных центров на право проведения испытаний данного вида.

7. Примеры методик пробоподготовки

В данной главе практическая значимость изложенного выше теоретического материала проиллюстрирована на примере методик либо уже метрологически аттестованных, либо находящихся на стадии утверждения. Разработанные нами методики ТФЭ на патронах ДИАПАК позволили решить сложные задачи в области следового анализа целого ряда токсичных соединений: микотоксинов, фенолов, бенз[а]пирена, хлорорганических пестицидов, полихлорированных бифенилов, пищевых красителей, а также ионов переходных металлов в продовольственном сырье, пищевых продуктах, кормах, почве и воде.

7.1. Подготовка проб для определения приоритетных фенолов в воде с использованием концентрирующего патрона ДИАПАК П [22]

7.1.1. Отбор и предварительная подготовка проб

Проба воды должна быть обработана в течение 8 ч с момента отбора. Отмеряют мерным цилиндром 500 мл воды и фильтруют через бумажный фильтр «синяя лента» или мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

7.1.2. Очистка и концентрирование фенолов

Концентрирующий патрон ДИАПАК П после удаления заглушек кондиционируют пропусканием через него с помощью шприца 5 мл перегнанного ацетона (о.с.ч. или х.ч.), а затем 20 мл дважды дистиллированной воды. Подготовленный таким образом герметично закрытый патрон может храниться в холодильнике не более 2 недель.

Высушивание патрона – не допускается!

Отфильтрованную пробу воды объемом 500 мл наносят на патрон ДИАПАК П с помощью перистальтического или вакуумного насоса со скоростью не более 5 мл/мин, затем гидравлическую систему промывают 20 мл дважды дистиллированной воды, а смыв отбрасывают.

Сконцентрированные фенолы посредством шприца элюируют с патрона 5 мл перегнанного ацетона (не ниже х.ч.) в сердцевидную отгонную колбу емкостью не более 5–10 мл. Элюат упаривают на водяной бане при температуре не выше 25° С в очень слабом токе азота до исчезновения запаха растворителя. Объем водного остатка измеряют при помощи микропипетки и доводят до 500 мкл смесью вода/ацетонитрил (9:1 по об.)

Комментарий:

- кондиционирование патрона завершается пропусканием через него дважды дистиллированной воды – «растворителя» фенолов;
- сильногидрофобные свойства ОФ-сорбента ДИАСОРБ П и низкая для ОФ-систем элюирующая сила растворителя (воды) обеспечивают надежную сорбцию всех приоритетных фенолов (целевых компонентов), при этом гидрофильные примеси на патроне не удерживаются;
- сочетание ТФЭ с упариванием ацетона из элюата приводит к дополнительному концентрированию пробы и позволяет перевести концентрат в водный ацетонитрил – растворитель, пригодный для последующего анализа фенолов методом ВЭЖХ в режиме градиентного ОФ-элюирования.

7.2. Подготовка проб для определения ионов переходных металлов в природных водах, молоке и молочных продуктах с использованием патрона ДИАПАК ИДК [14, 15]

7.2.1. Подготовка проб природной воды

Пробу природной воды (500 мл) подкисляют азотной кислотой до pH 0,3–1,0 и нагревают в течение 1 ч на песчаной бане, затем фильтруют через бумажный фильтр «синяя лента» или мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

7.2.2. Концентрирование ионов переходных металлов

7.2.2.1. Концентрирование Fe (III), Cu (II), Pb (II), Zn (II), Ni (II)

Концентрирующий патрон ДИАПАК ИДК предварительно кондиционируют промывкой 10 мл дистиллированной воды, подкисленной до pH 3.

К отфильтрованной пробе воды (500 мл) добавляют 100 мл 0,5 М раствора ацетата аммония и раствором гидроксида натрия доводят pH пробы до 3,0. Пробу наносят на подготовленный патрон со скоростью 10 мл/мин. Сорбированные на патроне ионы Fe (III), Cu (II), Pb (II), Zn (II), Ni (II) элюируют 5 мл 1 М раствора азотной кислоты (концентрат 1).

7.2.2.2. Концентрирование Cd (II)

Концентрирующий патрон ДИАПАК ИДК промывают 20 мл дистиллированной воды (pH 5–6). К пробе воды, пропущенной через патрон согласно п. 7.2.2.1, добавляют раствор гидроксида натрия до получения значения pH 4,5–5,0. Пробу наносят на патрон со скоростью 5 мл/мин. Сорбированный на патроне Cd (II) элюируют 5 мл 1 М раствора азотной кислоты (концентрат 2). Концентраты 1 и 2 объединяют и проводят определение элементов методом ААС.

7.2.3. Определение ионов переходных металлов

Концентрацию ионов определяют методом атомной абсорбции. При необходимости концентрация ионов Fe (III), Ni (II) может быть определена спектрофотометрическим методом с использованием селективных органических реагентов: Fe (III) с сульфосалициловой кислотой, Cu (II) – с пикрамином эпсилон, Ni (II) – с диметилглиоксимом.

Эффективность извлечения ионов Fe (III), Cu (II), Pb (II) и Cd (II) в указанных условиях сорбции и десорбции не ниже 0,95; Ni (II) и Zn (II) – 0,90.

Комментарий:

– сорбция ионов металлов на патроне ДИАПАК ИДК зависит от величины pH, вследствие чего их концентрирование проводят в две стадии.

7.3. Подготовка проб для определения синтетических красителей в окрашенных алкогольных напитках с использованием патрона ДИАПАК А [16]

Извлечение красителей на патронах для ТФЭ

Пипеткой набирают 20 мл анализируемого алкогольного напитка и переносят в стакан емкостью 50 мл. В тот же стакан добавляют пипеткой 1 мл уксусной кислоты. Стакан помещают в водяную баню, нагретую до температуры 80–90° С, и выдерживают в течение 5–6 мин.

С помощью медицинского шприца набирают из стакана окрашенный раствор и подсоединяют шприц к патрону для ТФЭ, заполненному окисью алюминия. Окрашенный раствор наносят на патрон по каплям. При необходимости может быть использован дополнительный патрон.

Дистиллированную воду (100 мл) наливают в стакан объемом 200 мл. В тот же стакан добавляют пипеткой 1 мл уксусной кислоты. Полученный раствор тщательно пере-

мешивают стеклянной палочкой. Этим раствором при помощи шприца промывают патрон, удаляя с сорбированного красителя маскирующие примеси.

Краситель десорбируют с патрона, пропуская при помощи шприца 25%-ный раствор аммиака. Аммиачный раствор количественно собирают в выпарную чашку и выпаривают досуха на водяной бане, после чего охлаждают. Освобожденный от препятствующих определению примесей краситель растворяют в выпарной чашке в 1 мл дистиллированной воды.

Комментарий:

– возникающие на поверхности «основной» окиси алюминия ионообменные взаимодействия, в которых принимают участие сульфогруппы красителей и остаточный байерит в форме катионообменных центров алюмината натрия, позволяют адсорбировать красители из сложных смесей в присутствии спирта, кислот и углеводов;

– эффективность ТФЭ повышается благодаря подкислению раствора матрицы (ионизация молекул красителей) и упариванию части спирта;

– присутствие иных компонентов в растворе матрицы, особенно органических кислот, требует предварительного удаления сопутствующих нейтральных и основных примесей (промывка патрона) перед элюированием целевой фракции красителей;

– термическая устойчивость красителей позволяет упаривать элюат досуха в жестких условиях.

7.4. Подготовка проб для определения афлатоксина M_1 в молочных продуктах с использованием комплексной схемы на патронах ДИАПАК С16М и ДИАПАК С [17,18]

7.4.1. Подготовка, концентрирование и очистка проб молока

Пробу молока (50 мл) центрифугируют на подходящем оборудовании в течение 5 мин при 1000 об/мин. Для определения афлатоксина M_1 отбирают 20 мл супернатанта таким образом, чтобы избежать попадания жира. Подготовленную пробу молока (20 мл) нагревают до 40° С и наносят на предварительно кондиционированный ацетонитрилом и водой патрон ДИАПАК С16М со скоростью 3 капли в секунду. Затем патрон промывают 5 мл дистиллированной воды и высушивают, продувая воздухом в течение 1 мин. Элюаты отбрасывают. Патрон промывают 10 мл гексана и вновь высушивают в течение 1 мин.

Афлатоксин M_1 элюируют 6 мл хлороформа. Собранный элюат заливают в пластиковую воронку с помещенным на дне трехмиллиметровым слоем безводного сульфата натрия, откуда элюат стекает самотеком (экстракт М).

7.4.2. Подготовка проб сметаны и кисломолочных продуктов

В коническую колбу емкостью 250 мл помещают навеску 20 г сметаны или 40 мл кисломолочного напитка. Затем туда же вносят 10 мл водного раствора из 2 г хлорида натрия и 0,24 г лимонной кислоты и 100 мл хлороформа (все составные части предварительно подогревают до температуры 35–38° С). Содержимое колбы встряхивают 2–3 мин, переносят в центрифужные стаканы и центрифугируют 15 мин при 3–4 тыс. об/мин. Отделяют нижний хлороформный слой, высушивают над 10 г безводного сульфата натрия, отфильтровывают, измеряют объем фильтрата и упаривают до 5–6 мл (экстракт М).

7.4.3. Окончательная очистка пробы

Экстракт М наносят на патрон ДИАПАК С, кондиционированный бензолом, со скоростью 3–4 капли в секунду через пластиковую воронку. Сушат хлороформ сульфатом натрия и наносят 1 мл хлороформа на патрон после прекращения скапывания экстракта М. Афлатоксин М₁ элюируют с патрона 10 мл 20%-ного ацетона в хлороформе или 7 мл 5%-ного метанола в хлороформе. Элюат собирают и упаривают досуха на роторном испарителе или в слабом токе азота при температуре не выше 40° С. Сухой остаток сразу же перерастворяют в смеси вода/ацетонитрил (9:1 по об.) для последующего ВЭЖХ-анализа.

Комментарий:

- кондиционирование патрона ДИАПАК С16М завершается промывкой водой – «растворителем» молока;
- предварительные операции – подогрев, центрифугирование (фильтрация) позволяют избавиться от сгустков молока;
- патрон ДИАПАК С16М с ОФ-сорбентом эффективно адсорбирует из воды среднеполярные молекулы афлатоксина М₁ наряду с липидами молока;
- перед вымыванием сконцентрированной фракции афлатоксина М₁ необходима предварительная промывка патрона водой для удаления белков и углеводов, а также гексаном для частичного удаления жиров;
- тонкую очистку афлатоксиновой фракции выполняют на патроне ДИАПАК С с постоянной активностью силикагеля. Использование сухих элюентов и дополнительное высушивание элюатов (принципиальное отсутствие влаги!) препятствует снижению сорбционной активности сорбента и способствует получению воспроизводимых результатов;
- упаривание досуха является необходимым условием для перерастворения пробы в водном ацетонитриле – подвижной фазе для ВЭЖХ-анализа в ОФ-режиме.

7.5. Подготовка проб для определения патулина в осветленных соках и напитках, соках и напитках с мякотью и консистентных продуктах с использованием комплексной схемы на патронах ДИАПАК П-3 и ДИАПАК С [17, 18]

7.5.1. Подготовка осветленных соков и напитков

Отфильтровывают пробу через плотный бумажный фильтр до получения 20 мл фильтрата (фильтрат П).

7.5.2. Подготовка соков и напитков с мякотью и консистентных продуктов

Навеску пробы массой 10 г помещают в стеклянный стакан, смешивают с небольшим количеством воды и количественно переносят в мерную колбу емкостью 50 мл. В колбу вносят 6 мл раствора Карреза I и раствора Карреза II. Содержимое колбы доводят водой до метки, перемешивают и отфильтровывают в мерный цилиндр через бумажный складчатый фильтр. Измеряют объем фильтрата П.

7.5.3. Концентрирование пробы на патроне ДИАПАК П-3

Весь объем фильтрата П наносят на предварительно кондиционированный патрон со скоростью 1–2 капли в секунду. Промывают патрон 5 мл дважды дистиллированной воды. Все смывы отбрасывают.

Патулин элюируют с патрона 10 мл этилацетата в колбу или мерную пробирку с пришлифованной пробкой, содержащую 5 мл 1,5%-ного раствора карбоната натрия. Колбу закрывают пробкой, содержимое колбы интенсивно перемешивают и дают раствору отстояться. Декантируют верхний этилацетатный слой, высушивают его над безводным сульфатом натрия (3 г) и переносят в колбу для упаривания. В емкость с оставшимся карбонатом натрия добавляют 10 мл этилацетата, перемешивают и, после полного расслоения, декантируют этилацетатный слой, высушивают его и переносят в ту же колбу для упаривания. Операцию повторяют с 5 мл этилацетата.

Упаривают этилацетатный раствор на роторном испарителе при температуре не выше 40° С до объема около 5 мл, переносят количественно (ополаскивая предыдущую колбу этилацетатом) в сердцевидную колбу объемом не более 5 мл и удаляют растворитель в токе азота до объема около 0,5 мл (не упаривать досуха!) Измеряют объем микропипеткой и добавляют бензол из расчета этилацетат/бензол (1:5 по об.)

Комментарий:

– предварительная пробоподготовка продуктов различной консистенции, часто обогащенных пектином, направлена на то, чтобы получить менее вязкий, более прозрачный и очищенный от механических примесей раствор для последующего концентрирования на патроне ДИАПАК П-3;

– кондиционирование патрона ДИАПАК П-3 завершается промывкой водой – «растворителем» матрицы патулина;

– вода, являясь слабым растворителем матрицы патулина, способствует тому, что сильногидрофобный патрон ДИАПАК П-3 удерживает и концентрирует полярный патулин;

– относительно слабое удерживание полярного патулина на ОФ-сорбенте не позволяет отделить сопутствующие примеси путем изменения условий элюирования (введения промежуточных промывок), поэтому смыв фракции патулина этилацетатом в раствор карбоната натрия является компромиссом между жидкофазной- и ТФЭ. Поскольку патулин растворяется в обоих несмешивающихся растворителях, эффективна его трехступенчатая (для снижения потерь) экстракция этилацетатом;

– высокая термо- и окислительная лабильность патулина требует сведения к минимуму стадий упаривания досуха и нагревания, поэтому перед тонкой очисткой проводится лишь *частичное* упаривание в мягких условиях.

7.5.4. Окончательная очистка пробы на патроне ДИАПАК С

Бензол-этилацетатную смесь наносят на патрон ДИАПАК С, кондиционированный бензолом, со скоростью 1–2 капли в секунду. Повторно споласкивают колбу 0,5–1,0 мл 15%-ного этилацетата в бензоле и вновь смесь наносят на патрон. Смывы отбрасывают.

Патулин элюируют с патрона 6 мл 30%-ного этилацетата в бензоле, собирая элюат в отгонную колбу. Элюат упаривают досуха в токе азота при температуре не выше 40° С в суховоздушной бане.

Внимание! После упаривания пробу немедленно перерастворяют в дважды дистиллированной воде (рН 4), охлажденной до 5–8° С, для последующего ВЭЖХ-анализа. Хранят пробу в морозильнике.

Комментарий:

– эффективная ТФЭ фракции, содержащей полярный патулин, происходит на гидрофильном патроне ДИАПАК С по НФ-механизму. В данных условиях с целью удаления сопутствующих примесей возможна предварительная промывка патрона менее полярным элюентом по сравнению с элюентом, который применяется на заключительном этапе вымывания патулина;

– нестабильность патулина требует упаривания элюента в токе азота и немедленного растворения сухого остатка в *охлажденном* растворителе для последующего ВЭЖХ-анализа.

7.6. Подготовка проб для определения дезоксиниваленола и Т-2 токсина в зерне и зернопродуктах с использованием комплексной схемы на патронах ДИАПАК АУ-3 и ДИАПАК Н (схема МТ-2 ДТ) [17-20]

Предварительные пояснения

Подготовка проб для определения афлатоксина В₁, зеараленона, дезоксиниваленола и Т-2 токсина включает единую жидкостную экстракцию указанных соединений водным ацетонитрилом (16:84 по об.): требования САНПИНа 2.3.2.1078-01[21].

Для повышения эффективности ТФЭ водно-ацетонитрильный экстракт орехов и семян масличных культур, а также растительного масла необходимо обезжиривать.

7.6.1. Предварительная очистка и концентрирование пробы на патроне ДИАПАК АУ-3

Водно-ацетонитрильный экстракт (20 мл) наносят на патрон ДИАПАК АУ-3 со скоростью 2–3 капли в секунду. Элюат собирают. Патрон промывают 5 мл водного ацетонитрила (16:84) и отфильтровывают объединенные элюаты в отгонную колбу. Фильтр промывают 2 мл ацетонитрила и собирают в ту же колбу. Фильтрат упаривают досуха на роторном испарителе при температуре 60–70° С и слабом вакууме. Упаривание повторяют 2–3 раза с добавлением в колбу 5 мл изопропанола или ацетонитрила до исчезновения капель воды на стенках колбы (проба ДТ).

7.6.2. Окончательная очистка пробы на патроне ДИАПАК Н

Пробу ДТ растворяют в 0,5 мл хлороформа и наносят на патрон ДИАПАК Н, кондиционированный бензолом. Смыв отбрасывают. Колбу споласкивают двумя объемами по 0,5 мл хлороформа и растворы последовательно наносят на патрон, собирая начальную фракцию Т-2 токсина в отгонную колбу. Завершают элюирование Т-2 токсина 2 мл хлороформа в ту же колбу. Элюат упаривают досуха на роторном испарителе при температуре 40–45° С и перерастворяют в растворителе для последующего анализа (проба Т).

Дезоксиниваленол элюируют с патрона в другую отгонную колбу 6 мл 20%-ного ацетона в хлороформе. Элюат упаривают досуха в аналогичных условиях и перерастворяют пробу в смеси вода/ацетонитрил (95:5 по об.) для ВЭЖХ-анализа (проба Д).

Комментарий :

– смысл предварительной очистки на патроне ДИАПАК АУ-3 состоит в адсорбции по НФ-механизму матричных биополимеров – гликолипидов, гликопротеинов, пигментов и т.д., а также возможных примесей в виде афлатоксинов и зеараленона (вследствие π-электронных взаимодействий ароматических структур с АУ сорбентом) и количественном смыве фракций дезоксиниваленола и Т-2 токсина полярным растворителем матрицы;

– термостабильность молекул дезоксиниваленола и Т-2 токсина позволяет эффективно заменить концентрирование на твердой фазе концентрированием путем упаривания в жестких условиях;

– наличие влаги в наносимой на патрон ДИАПАК Н пробе значительно снижает активность сорбента, поэтому упаривание водного ацетонитрила следует проводить как можно тщательнее;

– протекающая в хлороформе по НФ-механизму гидрофильная сорбция на патроне ДИАПАК Н эффективна лишь для дезоксиниваленола. Разница в полярности позволяет легко отделить целевые микотоксины и первым элюировать Т-2 токсин в хлороформе, что упрощает процедуру последующего анализа, так как определение микотоксинов осуществляют разными способами (Т-2 токсин – ТСХ или ГЖХ, дезоксиниваленол – ВЭЖХ).

7.7. Подготовка проб для определения афлатоксина В₁ и зеараленона в зерне, зернопродуктах и маслосодержащих продуктах с использованием комплексной схемы на патронах ДИАПАК А-3, П-3 и Н (ДИАПАК С для кукурузы и продуктов ее переработки) (схема МТ-2 АЗ) [17-19, 22]

Предварительные пояснения

Экстракцию и обезжиривание экстрактов – см. предв. поясн. к п. 7.6.

7.7.1. Предварительная очистка и концентрирование пробы

Водно-ацетонитрильный экстракт (25 мл) наносят на патрон ДИАПАК А-3 со скоростью 2–3 капли в секунду, отбирают 20 мл элюата и разбавляют его равным количеством дважды дистиллированной воды.

Тщательно перемешанный раствор наносят на патрон ДИАПАК П-3 со скоростью *не более 1 капли* в секунду, после чего промывают патрон 5 мл воды и осушают воздухом в течение 1 мин.

Элюируют целевую фракцию АЗ последовательным прокачиванием 7 мл ацетонитрила, 7 мл смеси бензол/ацетонитрил (1:2 по об.) и 7 мл смеси бензол/ацетонитрил (1:1 по об.) со скоростью *не более 1 капли* в секунду в приемную колбу. Пропускают элюат через 10 г безводного сульфата натрия (двух-трехсантиметровый слой на ватном тампоне в конической воронке) самотеком в отгонную сердцевидную колбу. Ополаскивают приемник 2 мл произвольно подобранной смеси бензол-ацетонитрил и пропускают элюат через осушитель, затем промывают осушитель 3 мл той же смеси и присоединяют ее к элюату. Упаривают досуха на роторном испарителе при температуре не выше 40° С и сразу же перерастворяют в 0,5 мл бензола.

Комментарий:

– смысл предварительной очистки на патроне ДИАПАК А-3 заключается в том, чтобы в соответствии с НФ-механизмом ТФЭ сорбировать матричные биополимеры и количественно смыть фракции целевых микотоксинов благодаря их большей растворимости в сильном элюенте;

– количественная ОФ-сорбция на патроне ДИАПАК П-3 достигается за счет снижения элюирующей силы растворителя, для чего водно-ацетонитрильный элюат с патрона ДИАПАК А-3 вдвое разбавляют водой (смесь воды с ацетонитрилом 58:42 по об.);

– кондиционирование патрона ДИАПАК П-3 завершается промывкой водным ацетонитрилом (58:42 по об.);

– медленно протекающие процессы сорбции-десорбции на патроне ДИАПАК П-3 обуславливают низкую скорость концентрирования и смыва целевой фракции (не более 1

капли в секунду!) В случае форсирования процесса возможен «проскок» афлатоксина В₁ при нанесении пробы на патрон и неполный смыв зеараленона при ее элюировании.

7.7.2. Окончательная очистка пробы на патроне ДИАПАК Н

Оставшиеся от предыдущей процедуры 0,5 мл бензольного раствора наносят на подготовленный патрон ДИАПАК Н (кондиционирован бензолом), используя в качестве воронки полимерный корпус патрона. Споласкивают отгонную колбу бензолом и дважды по 0,5 мл наносят раствор на патрон. Смывы отбрасывают.

Элюируют зеараленон 6 мл смеси бензол/уксусная кислота (49:1 по об.) со скоростью 1–2 капли в секунду в отгонную сердцевидную колбу. Элюат упаривают на роторном испарителе досуха при температуре не выше 50° С до исчезновения запаха уксусной кислоты (проба З).

Элюируют афлатоксин В₁ 5 мл смеси бензол/ацетонитрил (8:2 по об.) в отгонную сердцевидную колбу. Элюат упаривают на роторном испарителе до объема около 0,5 мл и высушивают досуха в токе азота при температуре не выше 40° С (проба А).

7.7.3. Окончательная очистка пробы на патроне ДИАПАК С (применяется для кукурузы и продуктов ее переработки)

По завершении предварительной очистки оставшиеся 0,5 мл бензольного раствора наносят на подготовленный патрон ДИАПАК С (кондиционирован бензолом), используя в качестве воронки полимерный корпус патрона. Споласкивают отгонную колбу бензолом и дважды по 0,5 мл наносят раствор на патрон. Смывы отбрасывают.

Элюируют зеараленон 6 мл смеси бензол/этилацетат (9:1 по об.) со скоростью 1–2 капли в секунду в отгонную сердцевидную колбу. Элюат упаривают на роторном испарителе досуха при температуре не выше 50° С до исчезновения запаха бензола (проба З). Промывают патрон последовательно 3 мл смеси бензол/уксусная кислота (19:1 по об.) и 4 мл смеси эфир/гексан (3:1 по об.), отбрасывая смывы, а затем элюируют афлатоксин В₁ 6 мл смеси дихлорметан/ацетон (9:1 по об.) в отгонную сердцевидную колбу. Элюат упаривают на роторном испарителе до объема около 5 мл, после чего досуха высушивают в токе азота при температуре не выше 40° С (проба А).

Внимание! После упаривания сразу же перерастворяют пробы А и З в растворителях для ВЭЖХ-анализа. К пробе З добавляют 0,2 мл гексана и перемешивают.

При определении афлатоксина В₁ в виде производного афлатоксина В_{2а} методом ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием проводят дериватизацию пробы А после высушивания.

Комментарий:

– необходимость досушивания сконцентрированной пробы АЗ перед нанесением ее на патроны ДИАПАК Н и ДИАПАК С связана с негативным влиянием следов влаги на сорбционную активность сорбентов;

– заметно бóльшая полярность афлатоксина В₁ по сравнению с зеараленоном позволяет разделять фракции целевых компонентов А и З на патроне ДИАПАК Н за счет изменения условий элюирования;

– в еще большей степени НФ-механизм проявляется при адсорбции афлатоксина В₁ на патроне ДИАСОРБ С. Здесь элюированию фракции афлатоксина В₁ сильнополярной смесью растворителей предшествуют две стадии промежуточной промывки примесных компонентов;

– нестабильность молекулы афлатоксина В₁ объясняет необходимость применения мягкого температурного режима и сведения к минимуму времени контакта очищенного сухого остатка пробы А с кислородом воздуха.

7.8. Подготовка проб для определения хлорорганических пестицидов (ХОП) в зерне, зернопродуктах, плодоовощной и жиросодержащей продукции с использованием комплексной схемы на патронах ДИАПАК А-3, П-3 и С [23- 25]

Предварительные пояснения

Экстракцию и обезжиривание экстрактов ХОП – см. предв. поясн. к п. 7.6.

Экстракция ХОП ацетонитрилом или водно-ацетонитрильной смесью зависит от содержания влаги в объекте исследования – зерне, кормах, плодах, овощах и яйцах.

Особенность экстракции ХОП из жиросодержащих продуктов заключается в предварительном извлечении суммарного жира с последующей реэкстракцией ХОП ацетонитрилом. Для животных жиров и растительных масел предварительная экстракция не требуется.

7.8.1. Предварительная очистка экстракта ХОП на патроне ДИАПАК А-3

Наносят на патрон 25 мл экстракта ХОП, а затем патрон промывают 2–3 мл смеси вода/ацетонитрил (16:84 по об.) со скоростью скапывания 2–3 капли в секунду, собирая элюат А в мерную пробирку до объема 25 мл.

7.8.2. Концентрирование фракции ХОП на патроне ДИАПАК П-3

К элюату А добавляют 5 мл дважды дистиллированной воды, перемешивают и наносят полученный раствор на подготовленный патрон со скоростью скапывания 1–2 капли в секунду, а затем патрон промывают 5 мл дважды дистиллированной воды. Смывы отбрасывают. Патрон высушивают в течение 1 мин с помощью водоструйного насоса.

Элюируют фракцию ХОП последовательно 5 мл ацетона и 5 мл смеси дихлорметан/ацетон (1:1 по об.) в приемник с 15 г безводного сульфата натрия, добавляют 10 мл сухого гексана, перемешивают и выдерживают 15 мин. Отфильтровывают элюат в отгонную колбу через осушитель (3–5 г безводного сульфата натрия в пластиковом корпусе воронки), дважды промывают остаток в приемнике 3 мл гексана, пропускают через тот же осушитель и упаривают объединенные фильтраты на роторном испарителе при температуре не выше 35° С до объема около 0,5 мл.

7.8.3. Окончательная очистка фракции ХОП на патроне ДИАПАК С

Приготовленные на предыдущей стадии 0,5 мл гексанового экстракта наносят на подготовленный патрон ДИАПАК С (кондиционирован гексаном), применяя в качестве воронки корпус патрона. Споласкивают отгонную колбу гексаном и наносят полученную смесь на патрон дважды по 0,5 мл, а затем патрон промывают 5 мл смеси гексан/ацетон (6:1 по об.), собирая вместе все элюаты в отгонную колбу. Упаривают фракцию ХОП на роторном испарителе при температуре не выше 35° С до объема около 1 мл. После охлаждения до комнатной температуры измеряют объем пробы в гексане с помощью микропипетки и проводят анализ методом ГЖХ.

Комментарий:

– в ходе предварительной очистки гидрофильные биополимеры сорбируются по НФ-механизму на патроне ДИАПАК А-3, а гидрофобные ХОП на патроне не удерживаются;

– снижение элюирующей силы растворителя (разведением элюата А водой) обеспечивает эффективную сорбцию неполярных ХОП на ОФ-патроне ДИАПАК П-3;

- кондиционирование патрона ДИАПАК П-3 заканчивается промывкой водно-ацетонитрильной смесью (30:70 по об.);
- при упаривании элюата после концентрирования ХОП на патроне ДИАПАК П-3 в пробе остается гексан как наименее летучий растворитель, поэтому окончательную очистку ХОП на патроне ДИАПАК С проводят в гексане. Упаривание проб досуха привело бы к необратимым потерям летучих ХОП;
- во избежание дезактивации сорбента в патроне ДИАПАК С пробу тщательно высушивают безводным сульфатом натрия.

7.9. Подготовка проб для определения полихлорированных бифенилов (ПХБ) в рыбе, рыбных и жировых продуктах с использованием комплексной схемы на патронах ДИАПАК А-3, П-3 и С [23, 24, 26]

Предварительные пояснения

Экстракцию ПХБ из жиросодержащих продуктов – см. предв. поясн. к п. 7.6.

7.9.1. Предварительная очистка ПХБ на патроне ДИАПАК А-3

Данная стадия проводится согласно п. 7.8.1.

7.9.2. Концентрирование ПХБ на патроне ДИАПАК П-3

К элюату А добавляют 5 мл дважды дистиллированной воды и после перемешивания наносят приготовленную смесь на подготовленный патрон со скоростью скапывания 1–2 капли в секунду, а затем патрон промывают 5 мл дважды дистиллированной воды, отбрасывая все смывы. Элюируют с патрона целевую фракцию 7 мл смеси бензол/ацетонитрил (1:1 по об.) в приемник с 5 г безводного сульфата натрия, тщательно перемешивают и выдерживают 15 мин. Дополнительно осушают элюат 2–3 г безводного сульфата натрия (в конической воронке), дважды промывают остаток в приемнике 5 мл элюента, отфильтровывают его через тот же осушитель в отгонную колбу, упаривают элюат на роторном испарителе при температуре не выше 45° С и перерастворяют сухой остаток в 0,5 мл гексана.

7.9.3. Тонкая очистка ПХБ на патроне ДИАПАК С

Наносят 0,5 мл гексанового раствора ПХБ на подготовленный патрон ДИАПАК С (кондиционирован гексаном), используя в качестве воронки полимерный корпус патрона. Смывы отбрасывают. Ополаскивают отгонную колбу и наносят на патрон гексановый раствор дважды по 0,5 мл. Сразу же начинают сбор фракции ПХБ в сердцевидную отгонную колбу; завершают элюирование целевой фракции 10 мл гексана. Упаривают гексан на роторном испарителе при температуре не выше 30° С до объема около 1 мл и после охлаждения колбы до комнатной температуры измеряют фактический объем пробы ПХБ в гексане.

Комментарий:

- в ходе тонкой очистки происходит НФ-адсорбция гидрофильных компонентов матрицы на патроне ДИАПАК С и количественный смыв гексаном фракции ПХБ;
- учитывая нелетучесть ПХБ, гексан можно упаривать досуха. Неполное упаривание гексана допускается в том случае, если последующим анализом служит ГХ или ВЭЖХ в гексановой подвижной фазе.

7.10. Подготовка проб для определения бенз[а]пирена (БП) в пищевых продуктах, продовольственном сырье и почве с использованием комплексной схемы на патронах ДИАПАК А-3, П-3 и С [27]

Предварительные пояснения

Экстракцию БП из жиросодержащих продуктов, зерна и почвы – см. предв. поясн. к п. 7.6.

7.10.1. Предварительная очистка и концентрирование первичного экстракта зерна или копченого продукта

Наносят на патрон ДИАПАК А-3 25 мл водно-ацетонитрильного экстракта БП, а затем промывают патрон 3 мл смеси вода/ацетонитрил (16:84 по об.) в условиях вакуумирования со скоростью 2–3 капли в секунду, собирая элюат в приемную колбу.

Наносят на подготовленный патрон ДИАПАК П-3 собранный элюат, а затем промывают патрон 5 мл ацетонитрила со скоростью 1–2 капли в секунду, отбрасывая смывы. Элюируют с патрона целевую фракцию БП 7 мл смеси бензол/ацетонитрил (1:1 по об.) со скоростью 1–2 капли в секунду в отгонную колбу. Упаривают элюат на роторном испарителе при температуре не выше 50° С, добавляют в колбу 0,5 мл гексана и тщательно встряхивают до растворения сухого остатка.

7.10.2. Предварительная очистка и концентрирование первичного экстракта почвы

Наносят на патрон ДИАПАК А-3 5 мл водно-ацетонитрильного экстракта БП, а затем промывают патрон 3 мл смеси вода/ацетонитрил (16:84 по об.) в условиях вакуумирования со скоростью 2–3 капли в секунду, собирая элюат в приемную колбу. Переносят элюат в мерный цилиндр емкостью 25 мл, ополаскивают колбу двумя объемами по 5 мл смеси вода/ацетонитрил (16:84 по об.) и доводят объем раствора в цилиндре до 20 мл.

Наносят на подготовленный патрон ДИАПАК П-3 5 мл разбавленного элюата, а затем промывают патрон 5 мл ацетонитрила со скоростью 1–2 капли в секунду, отбрасывая смывы. Элюируют с патрона целевую фракцию БП 7 мл смеси бензол/ацетонитрил (1:1 по об.) со скоростью 1–2 капли в секунду в отгонную колбу. Упаривают элюат на роторном испарителе при температуре не выше 50° С, добавляют в колбу 0,5 мл гексана и тщательно перемешивают на микросмесителе до полного растворения сухого остатка.

7.10.3. Тонкая очистка экстракта

На подготовленный патрон ДИАПАК С (кондиционирован гексаном) наносят 0,5 мл раствора пробы в гексане, затем споласкивают колбу двумя порциями по 0,5 мл гексана и последовательно наносят их на патрон, отбрасывая смывы. Элюируют БП 6 мл бензола в отгонную колбу и упаривают на роторном испарителе при температуре не выше 50° С. Растворяют сухой остаток экстракта в смеси ацетонитрил/вода (7:3 по об.) для последующего ВЭЖХ-анализа БП.

Комментарий:

– кондиционирование патрона ДИАПАК П-3 завершается промывкой смесью ацетонитрил/вода (84:16 по об.);

- эффективная ОФ-сорбция на полимерном сорбенте гидрофобного БП сопровождается предварительной промывкой сорбента ацетонитрилом, что приводит к удалению сопутствующих примесей, а также вытеснению воды и более полному смыву целевой фракции;
- использование ацетонитрила позволяет исключить стадию внепатронного досушивания бензол-ацетонитрильного элюата с патрона ДИАПАК П-3;
- промывка патрона ДИАПАК С гексаном позволяет фракционировать более гидрофобные сопутствующие примеси, а при десорбции БП неполярным бензолом более гидрофильные соединения удерживаются на патроне;
- термостабильность БП позволяет упаривать его растворы при повышенных температурах.

7.11. Использование аминофазных патронов ДИАПАК для подготовки проб соков и гидролизатов растворимого кофе

В практической аналитике часто встречается задача удаления из пробы кислотных компонентов, которые мешают дальнейшей ТФЭ-очистке или снижают стабильность колонок при последующем ВЭЖХ-анализе. Химическая нейтрализация таких проб крайне неудобна, так как она связана с возможностью дополнительных потерь целевых компонентов вследствие разбавления или фильтрации осадков. В этой связи нейтрализация жидких проб в процессе ТФЭ служит надежным методическим приемом, позволяющим улучшить метрологические характеристики МВИ.

7.11.1. Подготовка проб соков и напитков для определения углеводов и сорбита на патронах ДИАПАК Амин [28]

Через складчатый бумажный фильтр отфильтровывают 10 мл осветленного сока, нектара или сокодержавшего напитка; образец центрифугируют при 3–4 тыс. об/мин в течение 10–15 мин и отбирают осветленный супернатант. К 10 г концентрата сока добавляют 10 г дважды дистиллированной воды, перемешивают и отфильтровывают через складчатый бумажный фильтр. Фильтрат или супернатант (5 мл) наносят на патрон ДИАПАК Амин при помощи шприца со скоростью 1–2 капли в секунду. Отбрасывают 1 мл элюата, собирают оставшееся количество (около 4 мл) очищенного продукта. Подготовленный образец (2,5 мл) переносят в мерную колбу емкостью 25 мл и доводят объем раствора до метки смесью вода/ацетонитрил (16:84 по об.)

Комментарий:

- если из пробы предварительно не удалены кислотные компоненты, то такая проба рано или поздно способна вывести из строя колонку ДИАСФЕР-110-Аминодиол, которую используют для ВЭЖХ-анализа углеводов;
- ионообменная способность патронов ДИАПАК Амин вполне достаточна, чтобы в условиях ТФЭ нейтрализовать жидкие пробы с невысокой кислотностью;
- разбавление очищенных проб водно-ацетонитрильной смесью не мешает последующему ВЭЖХ-анализу, который проводится в той же системе.

7.11.2. Подготовка проб гидролизатов кофе для определения кофеина, глюкозы и ксилозы на патронах ДИАПАК Амин-М [29]

Навеску 0,5 г растворимого кофе или кофейного напитка гидролизуют 12,5 мл 1 N HCl в мерной колбе объемом 50 мл. Гидролиз проводят на кипящей водяной бане в течение

ние 2,5 ч, встряхивая колбу каждые 30 мин. Содержимое колбы охлаждают до комнатной температуры, доводят водой до метки и отфильтровывают через складчатый бумажный фильтр. Фильтрат (1,5–2,0 мл) наносят на концентрирующий патрон ДИАПАК Амин-М при помощи шприца со скоростью не более 1–2 капель в секунду, отбрасывая первые 0,5 мл и собирая для анализа ровно 1 мл очищенного гидролизата.

Комментарий:

– использование 1 N раствора HCl для гидролиза исходных образцов растворимого кофе по ГОСТ Р 51881-2002 объясняется высокой кислотностью гидролизатов, которая препятствует отделению окрашенных полифенольных компонентов в ходе ТФЭ-очистки исследуемых образцов;

– достаточная ионообменная способность патрона ДИАПАК Амин-М в сочетании с умеренным разведением гидролизата водой и небольшим объемом наносимой пробы позволяют провести её нейтрализацию и очистку от полифенолов за одну стадию, при этом уровень содержания целевых компонентов (кофеина и углеводов) остается неизменным;

– качество очистки пробы столь высоко, что допускается ее прямое нанесение на ВЭЖХ-колонку (сульфокатионитная смола в Pb^{2+} -форме) как в случае определения кофеина, так и в случае фракционирования углеводного пула.

Литература

1. К. Байерман. Определение следовых количеств органических веществ М., Мир, 1987.
2. M. Zief. Sample Preparation Technology, Zymark Corp., 1982.
3. M. Zief, R. Kiser. Sample preparation, Am. Lab., 1990.
4. P.D. McDonald, E.S.P. Bouvier. Solid Phase Extraction Applications guide and Bibliography. A Resource for Sample Preparation Methods Development, Waters, Milford, MA, 1995.
5. N. Simpson, T.A. Dean, J.W. Oudsema, C.F. Pool. Sample preparation for chromatographic separations and overview, Anal. Chim. Acta, 1990.
6. L.R. Snyder. Modern Practice of Liquid Chromatography, Ed.: J.J. Kirkland, Wiley-Interscience, N-Y., 1971.
7. L.R. Snyder. Principles of Adsorption Chromatography, M. Dekker N-Y., 1968.
8. Solid-Phase Extraction. Principles and Practice, E. M. Thurman, M. S. Mills, John Wiley & Sons, 1998, CHEMICAL ANALYSIS, Edit. J. D. Winefordner, v. 147.
9. B.L. Karger, L.R. Snyder, C. Eon. J. Chromatogr., **125**, 71-88 (1976).
10. L.R. Snyder. J. Chromatogr. Sci., **16**, 223-234 (1978).
11. J.T. Baker. Inc. Bakerbond Application Notes, J.T. Baker, Phillipsburg. N. J.
12. Cs. Horvath, W. Melander, I. Molnar. J. Chromatogr., **125**, 129-156 (1976).
13. Инструкция по применению Аналитического комплекта «Фенолы» (ЗАО «БиоХимМак СТ»).
14. Тихомирова Т.И., Лукьянова М.В., Фадеева В.И. и др. ЖАХ, 1993, т. 48, №1, стр. 73.
15. Тихомирова Т.И., Шепелева Е.Н., Фадеева В.И. ЖАХ, 1999, т. 54, №1, стр. 441.
16. ОСТ 10 298-2002. Алкогольные напитки. Методы идентификации и определения содержания синтетических красителей. Минсельхоз России, 2002 г.
17. МУК 4.1.787-99. Определение массовой концентрации микотоксинов в продовольственном сырье и продуктах питания. Подготовка проб методом твердофазной экстракции, Минздрав России, М., 1999.
18. БСТ-МВИ-02-01. Методика выполнения измерений массовой доли микотоксинов в пищевых продуктах и продовольственном сырье методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, М., 2001.
19. М-МВИ-68-00. Методика выполнения измерений массовой доли микотоксинов в пищевых продуктах и продовольственном сырье методом тонкослойной хроматографии, С-Пб-М, 2000.
20. МУ N 3184-84. Методические указания по обнаружению, идентификации и определению Т-2 токсина в пищевых продуктах и продовольственном сырье, утв. МЗ СССР 29 декабря 1984 г.
21. СанПиН 2.3.2.1078-01. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. Минздрав России, 2002.
22. Инструкция по применению Аналитического комплекта «Микотоксин-4» (ЗАО «БиоХимМак СТ»).
23. Справочник «Методы определения микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах и внешней среде», т.1, МВО «Колос», 1992, с. 11-19.
24. 970.52. AOAC Official Methods of Analysis (General Multiresidue Method).
25. Инструкция по применению сорбционного набора «Хлорорганические пестициды сертификат» (ЗАО «БиоХимМак СТ»).
26. Инструкция по применению Аналитического комплекта «Полихлорированные бифенилы» (ЗАО «БиоХимМак СТ»).

27. БСТ-МВИ-03-03. Методика выполнения измерений массовой доли бенз[а]пирена в продовольственном сырье, пищевых продуктах и почве методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, М., 2003 г.
28. Инструкция по применению аналитического комплекта «Углеводы и сорбит в соках» (ЗАО «БиоХимМак СТ»).
29. Инструкция по применению Аналитического комплекта «Кофе растворимый» (ЗАО «БиоХимМак СТ»).

Приложение

Характеристики растворителей, используемых в ТФЭ

	ϵ	ρ	δ	λ
н-гептан	0,00	0,20	7,4	197
н-гексан	0,00	0,00	7,3	195
н-пентан	0,00	0,00	7,1	200
изооктан	0,01	-0,04	7,0	210
циклогексан	0,04	0,00	8,2	195
Тетрахлоруглерод	0,14	1,70	8,6	265
толуол	0,23	2,30	8,9	285
бензол	0,27	3,00	9,2	280
хлороформ	0,29	4,30	9,1	245
диэтиловый эфир	0,30	2,90	7,4	220
метиленхлорид	0,32	3,40	9,6	233
тетрагидрофуран	0,35	4,20	9,1	212
метилэтил кетон	0,39	4,50	-	329
этилацетат	0,41	4,30	8,6	225
диоксан	0,43	4,80	9,8	215
ацетон	0,45	5,40	9,4	330
ацетонитрил	0,50	6,20	11,8	190
изопропанол	0,63	4,30	10,2	205
этанол	0,68	5,20	11,2	210
метанол	0,73	6,60	12,9	205
уксусная кислота	>0,73	6,20	12,4	210
вода	>0,73	9,00	21,0	190

ϵ – элюотропная сила растворителя

ρ – индекс полярности

δ – параметр растворимости

λ – нижняя граница длин волн при использовании УФ-детектирования

Взаимная растворимость элюентов, используемых в ТФЭ

	н-гептан	н-гексан	н-пентан	изооктан	циклогексан	тетрахлоруглерод	толуол	бензол	хлороформ	диэтиловый эфир	метиленхлорид	тетрагидрофуран	метилэтил кетон	этилацетат	диоксан	ацетон	ацетонитрил	изопропанол	этанол	метанол	уксусная кислота	вода	
н-гептан	*																○						○
н-гексан		*															○						○
н-пентан			*														○						○
изооктан				*													○						○
циклогексан					*												○						○
тетрахлоруглерод						*																	○
толуол							*																○
бензол								*															○
хлороформ									*														○
диэтиловый эфир										*													○
метиленхлорид											*												○
тетрагидрофуран												*											○
метилэтил кетон													*										○
этилацетат														*									○
диоксан															*								
ацетон																*							
ацетонитрил	○	○	○	○	○												*						
изопропанол																		*					
этанол																			*				
метанол	○	○	○	○	○															*			
уксусная кислота																						*	
вода	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	*

○ – несмешивающиеся растворители

000 «Диаэм»

Москва

ул. Магаданская, д. 7, к. 3 ■ тел./факс: (495) 745-0508 ■ sales@dia-m.ru

www.dia-m.ru

С.-Петербург
+7 (812) 372-6040
spb@dia-m.ru

Новосибирск
+7 (383) 328-0048
nsk@dia-m.ru

Воронеж
+7 (473) 232-4412
vrn@dia-m.ru

Йошкар-Ола
+7 (927) 880-3676
nba@dia-m.ru

Красноярск
+7 (923) 303-0152
krsk@dia-m.ru

Казань
+7 (843) 210-2080
kazan@dia-m.ru

Ростов-на-Дону
+7 (863) 303-5500
rnd@dia-m.ru

Екатеринбург
+7 (912) 658-7606
ekb@dia-m.ru

Кемерово
+7 (923) 158-6753
kemerovo@dia-m.ru

Армения
+7 (094) 01-0173
armenia@dia-m.ru

