



# Материалы и методы пробоподготовки в хроматографии: твердофазное концентрирование и адсорбционная очистка

Сычев К.С., Даванков В.А.

*Институт элементоорганических соединений РАН, Москва*

## Аннотация

В обзоре рассматриваются основные подходы к применению метода твердофазной экстракции (ТФЭ) для концентрирования и адсорбционной очистки пробы с целью ее дальнейшего хроматографического анализа; приведены и охарактеризованы основные типы адсорбционных материалов, применяемых для ТФЭ; рассмотрены основные виды схем пробоподготовки, включающих ТФЭ, с демонстрацией примеров их практической реализации.

## 1. Введение

Конечной целью прикладных исследований в области аналитической химии является разработка методов анализа определенных веществ или групп веществ (аналитов) в различных образцах. Комплексный аналитический метод как правило состоит из целого ряда стадий: отбора пробы, хранения образца, выделения аналитов из матрицы, очистки пробы от нежелательных примесей, идентификации аналитов в пробе и измерения их количеств. Стадии выделения аналитов из матрицы образца, очистки пробы и ее концентрирования могут быть объединены общим названием: подготовка пробы, или пробоподготовка. В большинстве случаев наибольшие затраты труда, времени и химических реактивов связаны именно с проведением стадии подготовки пробы.

Среди классических и вместе с тем наиболее трудоемких процедур приготовления пробы следует отметить прежде всего жидкостную экстракцию и отгонку растворителя на ротормном испарителе. Жидкостная экстракция неизбежна, если матрица образца твердая; в этом случае объектом дальнейших манипуляций становится первоначальный жидкий экстракт, или раствор [1]; альтернативой для жидкостной экстракции аналитов из твердых образцов может служить сверхкритическая флюидная экстракция [2].

При работе с жидкими образцами и первоначальными экстрактами классические методы пробоподготовки можно заменить значительно более удобным методом твердофазной экстракции (ТФЭ).

Сущность метода ТФЭ состоит в извлечении аналитов из жидкого образца или экстракта путем их концентрирования на малом количестве (от десятков до сотен

миллиграмм) адсорбционного материала. Смыв аналитов с адсорбента осуществляется сравнительно небольшим объемом растворителя (в пределах десяти миллилитров), что дает возможность либо сразу применить полученный концентрат для анализа, либо дополнительно сконцентрировать пробу через стадию получения сухого остатка, испарив растворитель в токе инертного газа (то есть не прибегая к использованию роторного испарителя).

Таким образом, твердофазную экстракцию можно определить как сорбционный метод подготовки пробы, в котором аналиты переводятся из жидкого образца в твердую фазу концентрирующего сорбента.

Благодаря неоспоримым преимуществам перед жидкость-жидкостной экстракцией (liquid-liquid extraction, LLE), метод твердофазной экстракции уже более двух десятков лет является объектом интенсивных исследований в области адсорбционных технологий [3]. Последние успехи в применении ТФЭ, повлекшие за собой модернизацию метода в целом, можно связать прежде всего с появлением коммерчески доступных полимерных адсорбционных материалов нового типа, сочетающих высокую емкость, механическую прочность и химическую стабильность.

В иностранной печати последние достижения в области твердофазной экстракции отражены в ряде обзоров [3-11].

## **2. Методы ТФЭ**

В целом, все методы твердофазной экстракции (Solid-Phase Extraction, SPE) можно разделить на две группы: он-лайн и офф-лайн ТФЭ (on-line SPE, off-line SPE).

В офф-лайн методах стадии пробоподготовки и идентификации аналитов аппаратурно разделены; поэтому подготовленная проба может быть сохранена и позже проанализирована несколькими различными аналитическими методами.

В он-лайн методах концентрирующий картридж с сорбентом напрямую соединен с аналитической колонкой жидкостного хроматографа; в этом случае проба не выделяется, а сразу анализируется методом ВЭЖХ. Соответствующий он-лайн метод существует и для газовой хроматографии – это метод твердофазной микроэкстракции ТФМЭ (Solid-Phase Microextraction, SPME). Он значительно отличается от метода ТФЭ и поэтому не может рассматриваться как одна из его модификаций [3]; метод ТФМЭ не будет рассмотрен в данном обзоре.

### **2.1. Офф-лайн твердофазная экстракция**

В большинстве случаев метод ТФЭ реализуется в офф-лайн исполнении. Основная причина успеха офф-лайн метода состоит в возможности комбинирования процедуры экстракции и концентрирования аналитов с последующими процедурами адсорбционной очистки и замены растворителя.

В офф-лайн режиме концентрирование может проводиться в статических и динамических условиях.

В статическом методе адсорбционный материал (зачастую не в виде гранульного сорбента, а в виде спрессованной таблетки или полимерной пленки) выдерживается в жидком образце до наступления адсорбционного равновесия, а затем переносится в емкость с элюирующим растворителем, где происходит смыв аналитов с адсорбента. Этот метод ТФЭ применяется довольно редко, т.к. требует значительных затрат

времени для достижения адсорбционного равновесия в системе. В последнее время наибольшее распространение получила модификация этого метода, в которой адсорбционный материал, полисилоксановая пленка, нанесена на магнит мешалки (метод Stir Bar Solid Extraction, SBSE [12]). Метод особенно удобен для экстракции из загрязненных механическими примесями образцов, из коллоидных растворов и гомогенизаторов. Однако в нем не устраняется основной недостаток всех методов статической сорбции: невозможность полной экстракции целевых компонентов пробы. Степень экстракции в этих случаях всегда ограничена коэффициентами фазового распределения извлекаемых соединений и соотношениями объемов фаз раствора и сорбента в равновесной системе.

Наиболее распространенным методом ТФЭ является метод динамического офф-лайн концентрирования. В этом методе анализируемый раствор пропускается через картридж, заполненный адсорбентом. В динамическом процессе при правильном подборе условий сорбции целевые компоненты пробы могут быть извлечены из раствора полностью.

Жидкий образец может нагнетаться в картридж с помощью воздушного компрессора, вакуума, центробежной силой в центрифуге, насосом (к примеру, перистальтическим) и вручную. Как правило, в случае средних объемов жидкость перемещается вакуумом; при этом картриджи закрепляются в специальном держателе – манифолде. Небольшие количества жидкого образца обычно пропускаются через картридж вручную с помощью шприца; аналиты смываются с картриджа также вручную.

Современные картриджи для ТФЭ представлены большим числом модификаций двух основных типов: патрона и диска, отличающихся диаметром и толщиной слоя адсорбента. Для диска высота слоя не превышает нескольких миллиметров, а для патрона она может достигать нескольких сантиметров.

Мелкие частицы адсорбента (до 60 мкм) закреплены в диске волокнообразующим наполнителем и предназначены для скоростной экстракции. Размер частиц в патроне (обычно 60 мкм и более) ограничивается гидродинамическим сопротивлением слоя, которое возрастает обратно пропорционально квадрату диаметра частиц адсорбента.

По сравнению с дисками патроны обладают большей сорбционной емкостью, что играет решающую роль в случае концентрирования следовых количеств аналитов, сильно различающихся по своему сродству к адсорбенту, из больших объемов сложных многокомпонентных образцов.

Концентрирующие диски удобны в работе с небольшими объемами вязких растворов, например, при концентрировании аналитов из плазмы крови, которую из шприца пропускают через картридж вручную с невысокой скоростью. С другой стороны, диски применяются также для быстрого концентрирования из больших, до литра, объемов водных растворов в тех случаях, когда образец не содержит значительных количеств адсорбирующихся примесей, а целевые аналиты характеризуются значительным удерживанием на адсорбенте.

Десорбция сконцентрированных в офф-лайн методе аналитов осуществляется обработкой сорбента подходящим растворителем. Метод позволяет производить предварительную промывку картриджа, реэкстракцию аналитов из концентрата, упаривание, перерастворение, однако каждая новая стадия может приводить к дополнительным потерям определяемых компонентов.

## 2.2. Он-лайн твердофазная экстракция

В он-лайн методе ТФЭ концентрирующий патрон присоединяется к инъекционному крану вместо дозирующей петли и, таким образом, оказывается напрямую связан с аналитической ВЭЖХ колонкой. Небольшие объемы образца, до десяти миллилитров, можно пропускать через патрон вручную с помощью шприца, однако это может привести к преждевременному износу инъекционной системы. Концентрирование из больших объемов требует применения отдельного насоса и специального крана-дозатора.

Смысл аналитов с картриджа осуществляется потоком подвижной фазы в момент начала анализа непосредственно в аналитическую колонку. Поэтому он-лайн метод позволяет без потерь переносить в колонку все количество сконцентрированных путем адсорбции аналитов, сводя таким образом причины снижения степени их извлечения только к неполноте экстракции и неполноте десорбции. В этом и состоит основное достоинство он-лайн концентрирования, которое позволяет получать более воспроизводимые и нередко более высокие значения степеней извлечения, чем в методе офф-лайн концентрирования.

Для увеличения хроматографической эффективности он-лайн системы в картриджах необходимо применять узкие фракции адсорбционных материалов с небольшим, порядка 10-30 мкм, средним диаметром частиц.

Он-лайн твердофазная экстракция все же обладает двумя серьезными принципиальными недостатками. Суть первого состоит в том, что для получения качественной хроматограммы картридж и колонка должны быть совместимы по своим адсорбционным свойствам. Он-лайн экстракция с последующим хроматографическим анализом пока реализованы только в обращенно-фазовом варианте, и здесь условие совместимости можно сформулировать таким образом: гидрофобность адсорбционного материала аналитической колонки должна не уступать, а лучше - превосходить гидрофобность материала концентрирующего картриджа. В противном случае подвижная фаза либо медленно и неполно десорбирует аналиты из концентрирующего патрона, либо не обеспечивает их достаточного удерживания в аналитической колонке. Это приводит к уширению хроматографических зон и падению эффективности разделения. Во многих случаях условие совместимости сорбентов не выполняется, т. к. наиболее распространенные C18 хроматографические колонки уступают в гидрофобности новым полимерным материалам для ТФЭ. «Экстенсивный» метод решения проблемы уширения пиков состоит в применении градиентного элюирования на длинных, 250 мм, хроматографических колонках (см. рис. 1). Этот метод позволяет увеличить эффективность системы по сильно удерживаемым аналитам до приемлемого уровня, однако по слабо удерживаемым аналитам эффективность разделения обычно недостаточна для их надежного определения в реальных пробах [13-15]. «Интенсивный» метод состоит в разработке новых полимерных [16] и углеродных [17] высокоэффективных сорбентов большой гидрофобности для ВЭЖХ аналитических колонок. До последнего времени коммерчески доступными фазами этого типа являлись две фазы на основе полистирола (PLPR-S, PRP-1) и одна углеродная фаза (Hypercarb).

Вторым серьезным недостатком он-лайн ТФЭ является отсутствие в этом методе стадий комплексной очистки пробы, что особенно затрудняет анализ сложных образцов, в которых присутствуют значительные количества мешающих детектированию соединений. Одним из решений данной проблемы может служить применение селективного детектирования. К сожалению, этот подход не является универсальным, т. к. круг задач, решаемых ВЭЖХ с флуориметрическим и электрохимическим детектированием, сравнительно невелик, а жидкостные хроматографы с масс-спектрометрическим детектором пока слишком дороги.

Альтернативный подход может заключаться в применении высокоселективных аффинных или импринтных адсорбционных материалов для он-лайн ТФЭ, которые однако еще не появились на рынке сорбентов.

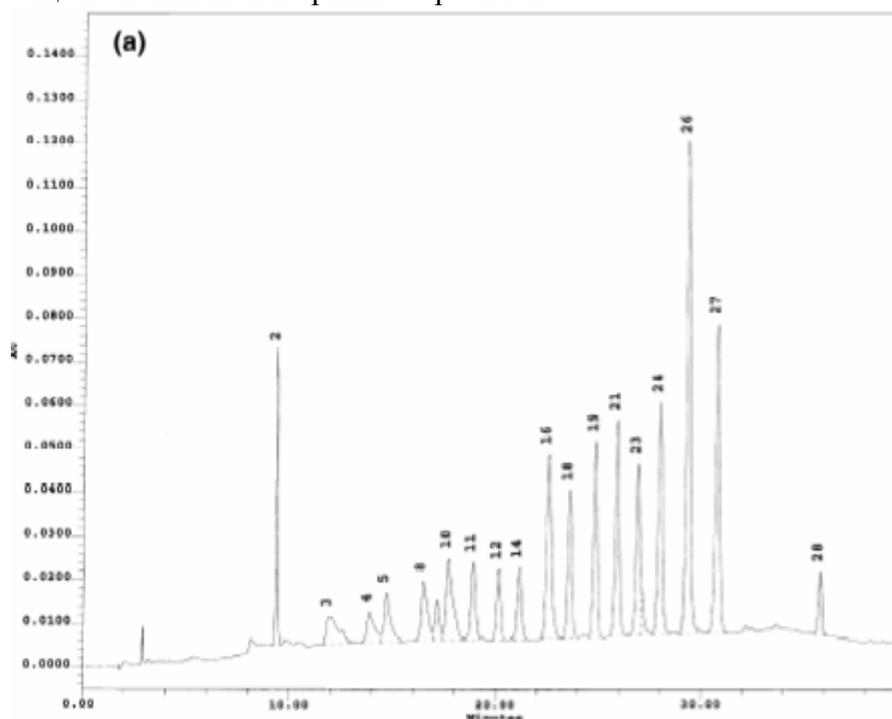


Рис. 1. Хроматограмма замещенных анилинов и фенолов, полученная градиентным элюированием на обращенной C18 фазе с применением он-лайн концентрирования на полистироле высокой степени сшивки PLPR-S. Несоответствие гидрофобности материалов для ТФЭ и ВЭЖХ приводит к уширению пиков слабоудерживаемых аналитов. 1 – анилин, 2 – кофеин, 3 – фенол, 4 – 4-нитроанилин, 5 – 4-нитрофенол [14].

### 2.3. Адсорбционная очистка

Анализируемая проба по возможности должна содержать как можно меньше компонентов матрицы образца, могущих помешать определению целевых аналитов или загрязнить узлы применяемой для анализа аппаратуры. Адсорбционная очистка пробы имеет целью быстрое и эффективное удаление мешающих веществ матрицы при помощи различных адсорбционных материалов.

Адсорбционная очистка может происходить без перевода аналитов в фазу сорбента; в этом случае процедура очистки не приводит к концентрированию целевых аналитов, которые остаются в жидкой фазе, тогда как примеси сорбируются и удаляются.

В другом методе адсорбционной очистки на первом этапе проводят концентрирование аналитов на твердой фазе с последующим смывом примесей на второй стадии, и по возможности более селективным смывом аналитов на третьей. Фактически, этот способ адсорбционной очистки активно использует твердофазную экстракцию; в зарубежной печати этот подход называется SPE cleanup, что можно перевести как «очистка с применением ТФЭ». В сущности, любая процедура ТФЭ сопровождается некоторой очисткой пробы, т. к. из образца удаляются соединения, не удерживаемые адсорбционным материалом, к примеру, неорганические соли [18].

Очистку можно продолжить, если удастся подобрать элюент, вымывающий из сорбента примеси без заметной десорбции аналитов. Такая возможность очевидна в случае применения для ТФЭ наиболее селективных адсорбционных материалов, таких как ионообменные и комплексообразующие смолы, аффинные и импринтные материалы. Селективные картриджи для твердофазной экстракции как правило не дешевы; их регенерируют и применяют многократно.

Адсорбционная очистка без ТФЭ аналитов в основном осуществляется на однократно используемых дешевых марках адсорбентов, таких как силикагель, амино-, циано-, диол-, С8- и С18-силикагели, флоризил, сульфат магния, окись алюминия. Адсорбционная очистка может проводиться как динамическим методом на картридже, так и статическим (путем перемешивания пробы с адсорбентом и ее фильтрацией).

Резюмируя, можно сказать, что многие адсорбционные материалы могут применяться в зависимости от ситуации как для концентрирования, так и для адсорбционной очистки, либо для обеих целей одновременно.

### 3. Методы оценки эффективности процедуры ТФЭ

Рассмотрим стандартную твердофазную экстракцию офф-лайн методом как процедуру, состоящую из трех стадий: адсорбции аналитов, их десорбции подходящим растворителем и замены последнего на растворитель, наиболее удобный для анализа. (Стадии подготовки картриджа, активации сорбента и кондиционирования картриджа будут рассмотрены ниже).

Ключевыми понятиями, применяемыми для оценки эффективности стадии адсорбции на концентрирующих картриджах, являются понятия «проскока» и сорбционной емкости картриджа. График зависимости концентрации аналита в фильтрате от объема пропускаемого через картридж жидкого образца называется кривой выхода сорбции или «кривой проскока» (breakthrough curve). Эта кривая имеет характерную S-образную форму с более или менее резким подъемом концентрации аналита в области насыщения им сорбирующего картриджа. Объемом проскока принято считать тот объем пропускаемого образца, при котором концентрация аналита в фильтрате достигает 10% от его концентрации в исходном растворе. Термин «объем проскока» для метода ТФЭ по своей сути является аналогом хроматографического термина «объем удерживания». Строго же говоря, «объемом удерживания» для твердофазной экстракции, являющейся по сути реализацией фронтального хроматографирования, является объем  $V'$ , соответствующий точке перегиба на кривой выхода сорбции при предельно низких концентрациях аналита. Нередко объем проскока не измеряют напрямую, а оценивают по значению  $V'$ , которое получают из хроматографических данных, либо рассчитывают из результатов эксперимента по статической сорбции аналита [19].

Измерение объемов проскока обычно начинают в «идеальных» условиях – жидким образцом является раствор аналита в чистом растворителе, например, в воде, водном буфере или водно-органической смеси. На практике, когда через картридж пропускается реальный жидкий образец или первоначальный экстракт со сложной матрицей, наблюдаемые значения объемов пробы могут оказаться значительно ниже «идеальных», что обусловлено конкуренцией доминирующих компонентов матрицы с адсорбцией аналитов. Другими словами, при повышенных концентрациях сорбируемых соединений насыщение сорбента в картридже наступает раньше, и объем проскока соответственно уменьшается.

После надежного установления эффективности стадий адсорбции и смыва анализов (в офф-лайн ТФЭ) измерение степени извлечения может использоваться для контроля эффективности процедур дополнительной очистки экстракта и замены растворителя. Нередкими являются случаи, когда основные потери анализов происходят именно на этих последних стадиях пробоподготовки. При оптимизации всей процедуры удовлетворительными можно считать такие условия, в которых достигается максимальная чистота пробы при приемлемом уменьшении степеней извлечения.

В случае концентрирования следовых количеств соединений из водных образцов существует еще один источник потерь анализов: их адсорбция на стенках посуды и подводных капиллярах. Уменьшения вклада стеночной адсорбции можно добиться экстенсивным методом, сократив длину подводных капилляров и увеличив соотношение объема пропускаемого образца к общему объему используемых сосудов. Лучшего решения проблемы можно достичь, добавив в водный образец некоторое количество органического растворителя, что снижает адсорбцию неполярных анализов на поверхности подводных капилляров и стекла.

### 3.1. Методы оценки сорбционной емкости в случае ТФЭ

Понятие сорбционной емкости, наряду с понятием объема «проскока», также является важным понятием в практическом приложении метода твердофазной экстракции. Важно отметить, что в методе ТФЭ в понятие «сорбционной емкости» вкладывается несколько иной смысл, чем в классической теории адсорбции. В методе твердофазной экстракции «сорбционная емкость» тесно связана с объемом «проскока» анализа и степенью «загрязненности» концентрируемого образца компонентами матрицы.

Фактически, сорбционной емкостью картриджа следовало бы назвать суммарное количество компонентов матрицы образца, поглощенного им к моменту проскока исследуемого анализа. С другой стороны, количественно выразить емкость в соответствии с этим определением нельзя, так как образец содержит множество различных «загрязняющих» компонентов в различных концентрациях. Такая ситуация привела к тому, что понятие сорбционной емкости применяется для метода ТФЭ крайне редко, и в основном оценки емкости носят качественный характер; основным же понятием является объем «проскока», измеренный в определенных условиях, «идеальных» или для конкретного образца.

Затруднение в количественной оценке емкости можно избежать, измеряя ее значение лишь для одного из основных компонентов матрицы, наиболее типичного в изучаемом случае, и присутствующем в образце в наибольшей концентрации. Располагая сведениями о концентрации в образце «загрязняющих» его компонентов матрицы, и зная значение емкости применяемого сорбента для ТФЭ по основному компоненту матрицы или по структурно подобному соединению, можно оценить максимальный объем образца, который удастся сконцентрировать на картридже с известным количеством этого сорбента без значительных потерь анализа.

Заранее следует отметить, что определение емкостей картриджей для различных нагружающих компонентов матрицы и различных анализов целесообразно лишь при разработке аналитических методик или при исследовании адсорбционных свойств материалов для твердофазной экстракции.

Для экспериментального определения сорбционной емкости необходимо получить ряд кривых выхода сорбции анализа для модельных образцов, содержащих

нагружающий компонент матрицы в различных концентрациях и исследуемый аналит с постоянной концентрацией, соответствующей реальным образцам. Далее строится зависимость объемов «проскока» аналита от концентрации нагружающего компонента матрицы. Исходя из чувствительности применяемого аппаратного метода, оценивается объем образца, который необходимо сконцентрировать. Этому объему на построенной зависимости соответствует определенная максимально допустимая концентрация компонента матрицы, выше которой количественное концентрирование аналита становится невозможным. Сорбционная емкость для данного случая вычисляется как произведение этой предельно допустимой концентрации нагружающего компонента матрицы на объем «проскока» аналита, приведенное к единице массы сорбента.

Так как изотерма адсорбции обычно описывается выпуклой кривой с насыщением, из изотермы адсорбции нагружающего компонента матрицы можно определить предельную емкость сорбента, соответствующую его полному насыщению этим веществом. «Частные» значения сорбционной емкости по этому компоненту матрицы, измеренные по приведенной выше схеме для любого конкретного аналита, всегда будет меньше значения предельной емкости.

Значения предельной емкости являются удобными критериями для сравнения эффективности различных марок сорбентов для ТФЭ. Сорбенты с большей предельной емкостью насыщаются медленнее, что положительно сказывается на объеме «проскока» любого аналита: он уменьшается медленнее при росте концентрации компонентов матрицы в концентрируемом образце.

В заключение следует еще раз отметить, что значения объемов «проскока» и емкостей справедливы лишь для тех условий, в которых они определены. Эти условия: тип матрицы образца, его объем и скорость пропускания, марка адсорбента, его масса и размер частиц, исследуемый аналит и его приблизительная концентрация – должны указываться рядом с экспериментально определенными значениями объемов пробы и емкостей.

#### **4. Адсорбенты для твердофазной экстракции и адсорбционной очистки**

До сравнительно недавнего времени алкилированные С8 и С18 силикагели являлись фактически единственными адсорбционными материалами для твердофазной экстракции. В очень редких случаях в этих целях применялись пористые полистирол-дивинилбензолные (ПС-ДВБ, PS-DVB) смолы типа Amberlite XAD-1-4 [3]. В настоящее время на лидирующее место выходят полимерные адсорбционные материалы, за ними по частоте применения следуют активированные угли и лишь затем – С8, С18 и другие привитые силикагели [7]. Полимерные сорбенты и угли, особенно с большой удельной поверхностью, обладают на один-два порядка большими, чем С18, объемами пробы при ТФЭ из водных и водно-органических систем и позволяют добиваться значительно более высоких эффектов концентрирования.

Твердофазные адсорбционные материалы по отношению к концентрируемым анализам можно условно разделить на селективные, универсальные и групповые (см. рис. 2). Последние должны сочетать по возможности количественную адсорбцию определенной группы анализов (внутри-групповую универсальность) с отсутствием адсорбции нежелательных классов соединений (меж-групповой селективностью). К примеру, для скрининга низкомолекулярных веществ из биологических жидкостей или растительных образцов наиболее эффективная подготовка пробы включает

---

твердофазную экстракцию на адсорбенте, обладающем максимальным сродством к любым низкомолекулярным анализатам (внутри-групповая универсальность) и минимальным сродством ко всем высокомолекулярным соединениям (меж-групповая селективность).

#### **4.1. Универсальные адсорбенты для ТФЭ**

Универсальные адсорбенты («generic» sorbents [20]) как правило применяются для извлечения из образца возможно более широкого спектра соединений различных классов и многократного их концентрирования.

##### **4.1.1. Нейтральные полимерные адсорбционные материалы**

Адсорбционные свойства полимерных материалов зависят от совокупности их структурных и химических характеристик; к первым относятся величина удельной площади поверхности, размер пор, распределение пор по размеру, суммарный объем пор, ко вторым - гидрофобность или гидрофильность поверхности, наличие функциональных групп. Априорный выбор оптимального сорбента часто оказывается затруднительным, так как фирмы-производители редко сообщают все эти характеристики сорбентов.

Структурные параметры сорбента определяются степенью сшивки его полимерного каркаса и использованием определенных порогенов в процессе синтеза.

Материалы низкой степени сшивки не обладают пористостью в сухом состоянии, но способны набухать в ограниченном наборе жидких сред и, как правило, используются для получения ионообменных смол. Последние набухают в водных средах и извлекают из воды катионы или анионы как минеральной природы, так и органические кислоты или основания. Слабо сшитые гидрофильные материалы на основе декстранов также набухают в воде и могут использоваться для получения ионообменных или специфических сорбентов. Однако эти сорбенты в набухом состоянии довольно эластичны и сминаются в колонке при повышении перепада давления.

Сорбенты со средней степенью сшивки обычно синтезируют в присутствии осаждающего полимер порогена, что приводит к фазовому распаду системы и образованию макропористой структуры конечного материала. Удельная поверхность такого материала редко превышает несколько десятков м<sup>2</sup>/г, но поры имеют от сотен до тысяч ангстрем в диаметре. Такие поры, с одной стороны, позволяют сорбировать крупные молекулы, с другой - закреплять на поверхности пор крупные лиганды, например сложные молекулы красителей, комплексы металлов и даже белковые антитела. Макропористые полимеры используют для синтеза специфических сорбентов для селективной аффинной (биоспецифической) или металло-хелат-аффинной (лигандообменной) сорбции белков, или наоборот, для закрепления крупных антител и селективной сорбции низкомолекулярных антигенов (см. ниже). Примером сорбентов со средней степенью сшивки являются PLRP-S (PolymerLabs, Великобритания) и PRP-1 (Hamilton, США). Эти материалы способны работать в определенном наборе растворителей, что ограничивает возможности выбора среды для проведения процессов сорбции и десорбции.

Еще в 1970-х годах В.А. Даванков и М.П. Цюрупа интенсивной сшивкой полистирола в присутствии термодинамически хорошего растворителя (предотвращающего фазовый распад системы) впервые получили жесткие микропористые полимерные материалы, практически одинаково набухающие и способные работать в любых жидких средах. Этому типу полимерных сеток и адсорбционных материалов было предложено название «сверхсшитые» (hypercrosslinked) [21]. Отличительным признаком сверхсшитых сорбентов является их исключительно высокая удельная поверхность – порядка  $1000 \text{ м}^2/\text{г}$  и выше и, соответственно, высокая сорбционная активность. Характерный размер пор этих материалов 20-40 ангстрем. В настоящее время для ТФЭ применяются несколько марок коммерчески доступных сверхсшитых полистирольных материалов: Puropor MN-200 (Purolite, Великобритания) и Isolute ENV (IST, Великобритания) – эти сорбенты, кроме сорбционных микро и мезо-пор, содержат еще и транспортные макропоры. Сверхсшитую полистирольную природу имеет и сорбент LiChrolut EN (фирма Merck, Германия). По величине удельной поверхности и сорбционной емкости указанным сверхсшитым полистиролам существенно уступают пористые стирол-дивинилбензолные материалы типа Amberlite XAD-4 (Rohm&Haas, США). Все эти ПС-ДВБ сорбенты имеют гидрофобную поверхность. К сорбентам XAD по своей пористой структуре близок материал Oasis HLB (Waters, США), однако у него в ПС-ДВБ-матрицу включено до 30% звеньев поливинилпирролидона и потому он более гидрофилен, в частности, напрямую смачивается водой, тогда как гидрофобные сорбенты требуют предварительного смачивания («активации») метанолом или ацетонитрилом.

Сверхсшитые полимерные материалы совместимы с любыми растворителями: водой, спиртами, эфирами, хлорорганикой и углеводородами. Термин «совместимость» в данном случае означает, что, с одной стороны, сверхсшитый адсорбционный материал остается проницаемым для средних молекул («набухает») в любом растворителе; с другой стороны, жесткость полимерной сетки не позволяет сорбенту менять свой объем при пропускании через картридж растворителей различной природы, так что каждый последующий растворитель быстро и количественно вытесняет предыдущий, не разрушая упаковку полимера в картридже.

Особенным свойством сверхсшитых полистиролов является их способность концентрировать аналиты не только из водных сред, но и из органических растворителей. Из метанола и ацетонитрила активно сорбируются неполярные аналиты. Из углеводородов сорбируются органические соединения, структура которых включает ненасыщенные системы: кратные связи углерод-углерод, углерод-кислород, ароматические (в том числе гетероциклические ароматические) молекулярные фрагменты. В последнем случае адсорбция происходит за счет пи-взаимодействий ненасыщенных систем аналитов и адсорбента [22, 23]. Режим сорбции в этих условиях был назван «квази-нормально-фазовым» для сверхсшитых полистирольных адсорбентов, не содержащих полярных групп [24]. Метод квази-нормально-фазного концентрирования применим для извлечения ароматических веществ из растительных и машинных масел, масляных экстрактов, нефтей и топлив.

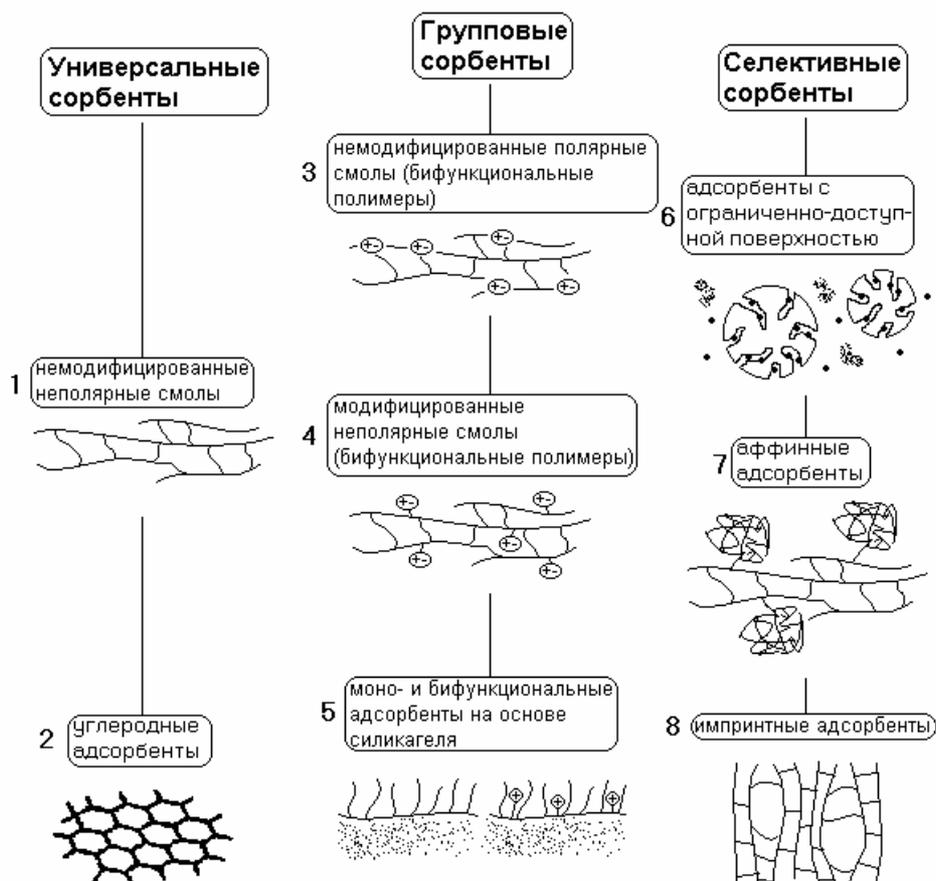


Рис. 2. Классификация адсорбентов для ТФЭ по свойству селективности.

#### 4.1.2. Углеродные адсорбционные материалы

Достаточно перспективными материалами для ТФЭ являются активированные угли и сажи. Удельная поверхность этих материалов может варьироваться в широких пределах в зависимости от технологии их изготовления: от  $10 \text{ м}^2/\text{г}$  для непористых саж (ENVI-Carb, Supelco, США) до  $1000 \text{ м}^2/\text{г}$  (различные активированные угли). Сажи, выпускаемые для твердофазной экстракции, графитизуются при высокой температуре для гомогенизации их поверхности, удаления с нее остаточных полярных групп. Угли содержат на своей поверхности значительное количество полярных групп.

Углеродные адсорбенты демонстрируют лучшие результаты по адсорбции из водных и водно-органических сред по сравнению со всеми остальными типами адсорбционных материалов. Гидрофобность углей такова, что позволяет адсорбировать липофильные аналиты даже из некоторых органических полярных растворителей, к примеру, метанола и в некоторых случаях – ацетона [2]. Основным и очень существенным недостатком углеродных адсорбентов является затрудненная десорбция аналитов, что ограничивает интенсивное применение углей. Для смыва аналитов с такого рода материалов обычно применяют термодесорбцию горячими растворителями с относительно высокими температурами кипения: толуолом, ксилолом, хлороформом и их смесями. В случае применения термодесорбции картриджи для углеродных материалов изготавливаются из стекла.

### 4.1.3. Смешанные адсорбенты

Смешанные сорбенты могут представлять собой смеси различных типов адсорбентов в определенных пропорциях. Как правило, один из адсорбентов является обращенно-фазовым, а другой – ионообменным [25]; к примеру, для концентрирования основных соединений может применяться смесь нейтрального и сульфированного ПС-ДВБ.

### 4.1.4. Способы применения универсальных адсорбентов для твердофазной экстракции и твердофазной очистки

Наиболее универсальными адсорбентами являются угли с высокой удельной поверхностью пор; такие углеродные адсорбенты фактически не проявляют селективности при концентрировании из воды и водных буферов, адсорбируя аналиты в широких интервалах их размеров и полярностей. Подобным свойством обладают и сверхсшитые нейтральные полистиролы. Нередкими оказываются ситуации, когда наряду с количественной адсорбцией аналитов такие адсорбенты также поглощают множество компонентов матрицы образца. Для уменьшения их негативного влияния концентрирование аналитов полезно проводить в условиях, ограничивающих сорбцию нецелевых компонентов. Такие условия зачастую могут быть созданы регулированием рН раствора или добавлением в водные образцы органических растворителей, к примеру, метанола или ацетонитрила.

Регулирование рН образца применяется в том случае, когда основные мешающие компоненты матрицы являются ионизирующимися соединениями. Так, нейтральные (и даже слабощелочные – до рН 8.0) водные среды предпочтительнее кислых при концентрировании некоторых фенолов из грунтовых вод на сверхсшитых полистиролах [26], так как гуминовые кислоты и фульвокислоты, являющиеся в этом случае основными мешающими компонентами матрицы, адсорбируются при нейтральном рН в значительно меньших количествах, чем при рН 2-3, обычно рекомендуемом для экстракции фенолов. Конечно, изменение рН с кислого на нейтральный приводит к уменьшению объемов пробы по фенолам, однако для таких активных и гидрофобных сорбентов как сверхсшитые полистиролы этот недостаток незначителен, и большинство фенольных соединений все равно извлекаются количественно.

Добавление в водные образцы органических растворителей дает хорошие результаты, когда в процессе твердофазной экстракции необходимо избавиться от большинства более гидрофильных нейтральных и ионных компонентов матрицы при концентрировании более гидрофобных аналитов. Вместе с тем, концентрирование из водно-органических смесей позволяет уменьшить адсорбцию целевых гидрофобных аналитов на стенках сосудов, подводных капиллярах, а также на нередко содержащихся в образцах коллоидных частицах. Так, при экстракции ПАУ из грунтовых вод добавление в образец органического растворителя приводит к очистке адсорбируемой пробы от гуминовых кислот и одновременно способствует повышению степеней извлечения ПАУ за счет уменьшения их связывания с полимерными молекулами гуминовых веществ [27]. Реализация эффективного концентрирования из водно-органических систем возможна только в случае применения полимерных и углеродных адсорбционных материалов; С8, С18 силикагели не могут применяться для этой цели по причине их низкой гидрофобности (см. рис. 3).

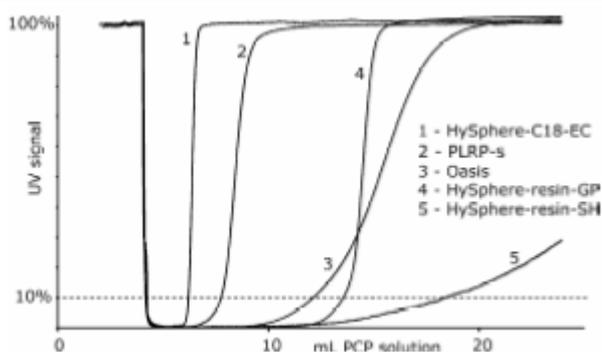


Рис. 3. Кривые «проскока» для пентахлорфенола из его раствора в системе ацетонитрил-вода (рН 2) 30:70. 1 – C18 фаза, 2-5 – различные типы полимерных адсорбционных материалов [20].

## 4.2. Селективные адсорбенты для ТФЭ

### 4.2.1. Бифункциональные адсорбционные материалы

Бифункциональными называются материалы, на которых осуществляется селективная сорбция аналитов комбинацией нескольких механизмов взаимодействия с сорбентом. Такие адсорбенты могут содержать в своей структуре наряду с неполярными фрагментами различные полярные функциональные группы, в том числе ионные и хелатирующие группировки, а также ненасыщенные системы. Примером бифункционального материала может являться силикагель с различными одновременно привитыми фазами, обращенно-фазовой (октадецильной) и ионообменной (триметиламинопропильной или сульфопропильной).

Широким классом бифункциональных адсорбентов являются химически модифицированные ПС-ДВБ смолы [4]. Кроме частичного сульфирования, модификация полистирольных материалов легко осуществляется ацилированием по Фриделю-Крафтцу, либо хлорметилированием с последующим аминированием. Улучшение адсорбционных свойств при концентрировании полярных и ионных аналитов принято связывать прежде всего с ускорением массопереноса вследствие увеличения смачиваемости изначально неполярных исходных материалов, а также с появлением дополнительных полярных взаимодействий адсорбент-аналит. Зависимость эффективности адсорбции на модифицированных смолах от плотности прививки полярных фрагментов проходит через максимум, так как чрезмерное количество полярных групп приводит к уменьшению гидрофобности материала и снижению адсорбции [5, 9, 28]. Степень сульфирования 0.6 мэкв/г была признана по результатам работы [28] оптимальной, повышающей факторы емкости по различным полярным аналитам в десятки раз по сравнению с несulfированными смолами (см. табл. 1). Активация картриджей метанолом перед экстракцией приводит к дополнительному увеличению удерживания полярных соединений.

Наиболее широко применяемыми на данный момент бифункциональными адсорбентами для твердофазной экстракции являются Oasis HLB, Oasis MCX и Oasis MAX (Waters) [29], являющиеся сополимерами неполярных стирола и дивинилбензола и полярного винилпирролидона с высокой степенью сшивки: нейтральный (Oasis HLB), с привитыми сульфогруппами (Oasis MCX) и с триметиламино-группами (Oasis MAX).

Фирма Purolite также предлагает бифункциональные сверхсшитые полистирольные материалы для ТФЭ серии Puropsep-2xx с небольшим содержанием аминных, карбоксильных или сульфогрупп.

Таблица 1. Зависимости адсорбционных свойств ПС-ДВБ с высокой степенью сшивки от степени их сульфирования [28]. Жирным шрифтом выделены значения  $k'$ , полученные после активации адсорбента метанолом; обычным шрифтом – без активации метанолом

| Степень сульфирования, мэкв/г | Фактор емкости $k'$ |     |           |    |             |    |               |    |
|-------------------------------|---------------------|-----|-----------|----|-------------|----|---------------|----|
|                               | Фенол               |     | Катехол   |    | Этилпируват |    | 2,3-Бутандион |    |
| 0.0                           | <b>49</b>           | 21  | <b>10</b> | 1  | <b>0</b>    | 0  | <b>1</b>      | 0  |
| 0.1                           | <b>124</b>          | 40  | <b>32</b> | 1  | <b>4</b>    | 0  | <b>2</b>      | 1  |
| 0.4                           | <b>350</b>          | 272 | <b>45</b> | 34 | <b>49</b>   | 40 | <b>4</b>      | 3  |
| 0.6                           | <b>457</b>          | 436 | <b>90</b> | 74 | <b>79</b>   | 60 | <b>14</b>     | 12 |
| 1.0                           | <b>381</b>          | 315 | <b>70</b> | 59 | <b>55</b>   | 54 | <b>8</b>      | 8  |
| 1.5                           | <b>209</b>          | 183 | <b>45</b> | 38 | <b>34</b>   | 26 | <b>6</b>      | 6  |
| 2.7                           | <b>55</b>           | 47  | <b>12</b> | 10 | <b>6</b>    | 5  | <b>2</b>      | 2  |

Бифункциональный адсорбент может быть получен также динамической модификацией базового нейтрального продукта. В этом случае в водный образец добавляется ион-парный реагент, динамически модифицирующий нейтральный адсорбент и повышающий его сродство к ионным анализам. Этот подход может быть реализован и в он-лайн исполнении, если концентрирующий картридж и хроматографическая колонка заполнены полимерными адсорбентами со сравнимой гидрофобностью [30].

#### 4.2.2. Адсорбенты с ограниченно доступной поверхностью

Межгрупповой селективности по молекулярной массе аналитов можно добиться, применяя адсорбенты с ограниченно доступной поверхностью (restricted-access SPE materials). Адсорбенты этого типа сочетают универсальность в отношении адсорбции низкомолекулярных веществ с селективностью, основанной на гель-фильтрационном механизме исключения высокомолекулярных соединений. Одним из таких материалов является С18-модифицированный силикагель с привитой «сетью» из цепей полиэтиленгликоля, непроницаемой для высокомолекулярных соединений. Другая модификация С18 силикагелей с ограниченно доступной поверхностью имеет на поверхности частиц привитые нейтральные поверхностно-активные вещества («бислойные» адсорбенты). Высокомолекулярные белковые соединения в своем большинстве не удерживаются на таких фазах, а способные к диффузии низкомолекулярные вещества сорбируются по обращенно-фазовому механизму [31] в гидрофобных порах. Сорбенты этого типа позволяют концентрировать лекарственные препараты и их метаболиты непосредственно из плазмы крови без предварительного осаждения белков.

Иным типом адсорбентов с ограниченно доступной поверхностью являются микропористые сверхсшитые полистиролы, например Puropsep 270. Средний размер микропор в таком материале составляет величину порядка 20-30 ангстрем, то есть сопоставим с размером молекулы. В результате, сорбент концентрирует лишь те

аналиты, эффективный размер молекул которых (учитывая сольватную оболочку) не превышает некоторого предела. Недостатком микропористых материалов может оказаться замедленный массоперенос, обусловленный отсутствием крупных транспортных пор.

### 4.2.3. Аффинные и импринтные адсорбционные материалы

К наиболее селективным материалам для ТФЭ можно отнести аффинные (Affinity SPE) и импринтные (Molecular Imprinted Solid-Phase Extraction, MISPE) адсорбенты.

Принцип действия аффинных адсорбционных материалов основан на селективности биоконплементарных взаимодействий пары лиганд-аналит [32], например, пары антитело-антиген. Антитела являются белками, которые вырабатываются иммунной системой млекопитающих для связывания чужеродных соединений, называемых антигенами. В случае аффинного концентрирования анализом является антиген, а прививаемым на стационарную фазу лигандом является соответствующее анализу антитело.

В одном из наиболее распространенных методов для получения аффинных лигандов используются иммуноглобулины G (IgG), антитела белковой природы с молекулярной массой порядка 150 кДа. Иммуноглобулины вырабатываются организмами лабораторных животных в результате иммунного ответа на вводимый антиген (аналит) или комплексный антиген, представляющий собой анализ, ковалентно связанный с белковым соединением для усиления иммунной реакции. Выделяемая из сыворотки крови фракция IgG содержит различные виды иммуноглобулинов (поликлональные антитела), среди которых лишь в среднем 15% проявляют активность по отношению к определяемому анализу. Для получения лигандов приемлемого качества поликлональный пул антител может быть подвергнут фракционированию и обогащению [33]. Таким методом ранее были получены антитела для селективного концентрирования высокомолекулярных соединений, а за последние несколько лет - и целого ряда низкомолекулярных анализов: антибиотиков, гормонов, пестицидов и ароматических углеводородов [10].

Для прививки (иммобилизации) антител применяются три типа стационарных фаз: полисахаридные носители (агароза, целлюлоза), макропористые полимерные носители на основе полиметакрилата или ПС-ДВБ, а также силикагель и макропористые стекла [11]. Метод офф-лайн ТФЭ совместим с аффинными адсорбционными материалами на любой основе, в то время как он-лайн анализ возможен лишь с применением аффинных адсорбентов на основе силикагеля и ПС-ДВБ, способных выдерживать значительный перепад давления в экстракционном картридже.

Одним из недостатков аффинных адсорбентов для ТФЭ является потеря их адсорбционной активности в водно-органических смесях с большой концентрацией органических растворителей, то есть в оптимальных условиях смыва анализов. Для продления срока службы аффинных он-лайн картриджей применяется следующий технический прием: подвижная фаза пропускается через картридж только первые несколько минут градиентного элюирования до достижения определенного содержания органического растворителя в водном буфере, затем инжектор переключается в положение прерывания потока; подвижная фаза идет через хроматографическую колонку минуя картридж, который во время анализа регенерируется водным буфером [34]. В среднем, на одном аффинном картридже можно провести до десятка анализов.

Высокая селективность импринтных адсорбентов обусловлена наличием полостей, комплементарных структуре концентрируемых аналитов [8, 35]. Импринтные адсорбенты получают сополимеризацией полярных мономеров типа акриламида, метилакрилата, винилпиридина со значительным количеством сшивающего агента (чаще всего этиленгликольдиметакрилата) в присутствии либо самого целевого аналита (формообразователя), либо аналогичного по структуре соединения. Затем это соединение тщательно отмывается, оставляя в сильно сшитой матрице полимера полости соответствующего размера и конфигурации. Одним из интересных с аналитической точки зрения свойств импринтных (а также аффинных) адсорбционных материалов является повышенная селективность удерживания структурно близких соединений (для аффинных адсорбентов – аналогов антигена); это свойство соответствует зарубежному термину «cross-reactivity». Так [36], в ряду замещенных феноксиуксусных кислот наиболее селективное удерживание наблюдается для гербицидов, структура которых близка к структуре молекулы-формообразователя, в данном случае 2,4,5-Т (см. табл. 2).

Таблица 2. Зависимость удерживания на импринтном адсорбенте от структуры сорбируемых аналитов – производных феноксиуксусных кислот [36].

| Гербицид       | $k'$<br>(импринт.) | $k'$ (бланк) | $\alpha$ | R1              | R2        | R3              |
|----------------|--------------------|--------------|----------|-----------------|-----------|-----------------|
| <b>2,4,5-Т</b> | <b>4.39</b>        | <b>0.44</b>  | <b>1</b> | <b>Cl</b>       | <b>Cl</b> | <b>H</b>        |
| 2,4-D          | 3.00               | 0.27         | 0.68     | Cl              | H         | H               |
| Fenoprop       | 2.72               | 0.39         | 0.62     | Cl              | Cl        | CH <sub>3</sub> |
| Dichlorprop    | 2.22               | 0.23         | 0.51     | Cl              | H         | CH <sub>3</sub> |
| МСПА           | 1.38               | 0.55         | 0.31     | CH <sub>3</sub> | H         | H               |
| Месопроп       | 1.22               | 0.27         | 0.28     | CH <sub>3</sub> | H         | CH <sub>3</sub> |
| 4-СПА          | 0.72               | 0.17         | 0.16     | H               | H         | H               |

Полярные, содержащие ионные группы импринтные адсорбенты на основе полиметакриловой кислоты или винилпиридина во многих случаях не обладают необходимой гидрофобностью для проведения эффективного концентрирования из водных образцов большого объема. В этих случаях импринтные адсорбенты применяются для твердофазной экстракции аналитов из пробы, уже сконцентрированной с помощью универсальных адсорбционных материалов [37].

#### **4.2.4. Неорганические полярные адсорбенты: окись алюминия, флоризил, силикагель; полярные адсорбенты на основе силикагеля**

Дешевизна неорганических полярных адсорбентов делает привлекательным их применение для адсорбционной очистки проб, особенно в случаях проведения рутинных анализов. В методах пробоподготовки с применением ТФЭ адсорбционной очистке неорганическими материалами подвергается как правило элят с концентрирующего картриджа, то есть концентрированная проба в неполярном растворителе. Сорбция на минеральном сорбенте эффективно удаляет из пробы полярные компоненты матрицы, что наиболее важно в случае последующего анализа пробы методом ГХ, где присутствие гидрофильных слабо летучих соединений является крайне нежелательным.

---

Твердофазная экстракция на полярных неорганических адсорбентах применяется для концентрирования полярных компонентов из растворов липофильные образцов в гексане; в этих случаях как правило используется силикагель [38] или его аминопропилированный аналог [39].

## **5. Комплексные процедуры подготовки пробы с применением твердофазной экстракции и адсорбционной очистки**

Выбор аппаратного аналитического метода для идентификации и количественного определения аналитов накладывает на качество пробы определенные требования, которые можно сформулировать следующим образом:

1. растворитель для растворения (или перерастворения) пробы должен обеспечивать максимальную эффективность ее последующего анализа выбранным аппаратным методом;
2. концентрация аналитов в пробе должна быть достаточной для их надежной идентификации и количественного определения;
3. концентрации в пробе веществ, мешающих определению аналитов и приводящих к загрязнению узлов оборудования, должны быть снижены до приемлемого уровня.

Задача пробоподготовки состоит в приготовлении пробы, удовлетворяющей этим требованиям, с наименьшими затратами труда персонала, времени и химических реактивов. Составление схемы подготовки пробы сводится к поиску компромисса между предъявляемыми требованиями к качеству пробы и требованиями по сокращению затрачиваемых на анализ ресурсов, и подразумевает выбор оптимального варианта из нескольких возможных. По своей малой ресурсоемкости и высокой эффективности метод ТФЭ выигрывает у классических методов пробоподготовки, что и делает его привлекательным для применения в комплексных аналитических методах.

### **5.1. Подготовка пробы с помощью офф-лайн методов**

#### **5.1.1. Концентрирование на универсальном адсорбенте, адсорбционная очистка на полярном неорганическом адсорбенте**

Одна из наиболее простых схем подготовки пробы с помощью офф-лайн ТФЭ включает два основных шага: концентрирование образца на универсальном адсорбенте и адсорбционную очистку пробы полярным неорганическим адсорбентом. Одним из примеров реализации этой схемы может служить определение микотоксина патулина в соках [40]. 20 мл сока пропускается через картридж с 1 мл сверхсшитого полистирола Purosep 200; далее картридж промывается 5 мл воды и сушится в токе азота. Аналит вымывается 5 мл этилацетата; полученная проба в этилацетате пропускается через тонкий слой силикагеля. Растворитель отгоняется в токе азота, сухой остаток перерастворяется в 100 мкл этилацетата и анализируется методом НФ ВЭЖХ-ДМД (с диодно-матричной детекцией). Концентрирующий картридж регенерируется 10 мл 4% фосфорной кислоты в смеси вода-ацетонитрил 1:1 (очистка от пигментов), 5 мл ацетонитрила и кондиционируется 10 мл воды. Кратность концентрирования по данной

методике составляет величину 200-500 (объем образца при необходимости можно увеличить до 50 мл). Очистка пробы на силикагеле уменьшает содержание в пробе полярных веществ, загрязняющих хроматографическую колонку в режиме НФ ВЭЖХ. Эффективная регенерация концентрирующего картриджа позволяет применять его многократно.

Во многих случаях целью первой стадии - твердофазной экстракции может оказаться не достижение высоких значений кратности концентрирования, а замена растворителя с целью более эффективной адсорбционной очистки пробы. Одним из примеров реализации такого подхода является метод определения остаточных количеств пестицидов в растительных образцах, разработанный автором (неопубликованные данные). 5 мл ацетонитрильного экстракта растительного гомогената разбавляется 20 мл 50мМ водного раствора хлорида натрия; 25 мл полученного образца пропускаются через картридж со сверхсшитым полистиролом. Картридж промывается 5 мл воды, затем вода вытесняется из картриджа воздухом, и пестициды смываются 10 мл этилацетата. Этилацетатный смыв сушится над сульфатом магния и пропускается через картридж со слабым анионообменным адсорбентом, диэтиламинопропилсиликагелем (DEAE-силикагель), на котором происходит основная очистка пробы. Этилацетат отгоняется в токе азота до объема 100-200 мкл, остаток перерастворяется в 1-10 мл (в зависимости от требуемой чувствительности анализа) гексана со введенным внутренним стандартом. Проба может быть проанализирована как методом ГХ-МС, так и методом ГХ-ДЭЗ. Этилацетат может быть отогнан досуха (при этом теряются некоторые высоколетучие пестициды); перерастворив сухой остаток в 100 мкл ацетонитрила, полученную пробу можно проанализировать и методом градиентной ВЭЖХ-МС. Основная идея применения ТФЭ в данном случае состоит в замене первоначального экстракта в ацетонитриле на пробу в этилацетате. Этилацетат является менее полярным растворителем, чем ацетонитрил, соответственно, эффективность очистки пробы от гидрофильных соединений на полярном DEAE-силикагеле возрастает многократно. Кроме того, уже в процессе ТФЭ на сверхсшитом полистироле образец очищается от большинства сахаридов, органических кислот и части гликозидов. Более того, методика имеет запас по чувствительности; пробу всегда можно дополнительно сконцентрировать, отогнав этилацетат досуха и перерастворив пробу в меньшем количестве гексана; также следует учесть, что проба может быть проанализирована более чувствительным методом - ГХ-ДЭЗ для подтверждения полученных результатов в спорных ситуациях.

В некоторых случаях адсорбционная очистка образца может осуществляться до стадии концентрирования. Подобная схема подготовки пробы была реализована в разработанном автором методе определения ПАУ в порошкообразных копильных препаратах (неопубликованные данные). 5 г копильного препарата экстрагируется 50 мл гексана, к экстракту добавляется 1 мл изопропанола. Экстракт пропускается через слой DEAE-силикагеля, а затем через картридж со сверхсшитым полистиролом (квазинормально-фазовая ТФЭ). Концентрирующий картридж промывается 1 мл метанола и сушится в токе азота; аналиты смываются 10 мл хлористого метилена. Растворитель отгоняется в токе азота, сухой остаток перерастворяется в 100 мкл хлористого метилена; проба анализируется методом ГХ-МС. Целью адсорбционной очистки гексанового экстракта на DEAE-силикагеле в данном случае является удаление из образца фенольных соединений, содержание которых в копильных препаратах очень велико. Проведение стадии очистки образца до твердофазной экстракции предотвращает перегрузку концентрирующего картриджа веществами матрицы образца, и таким образом увеличивает практические значения объемов проскока аналитов. Добавка 2% изопропанола в гексановый экстракт предотвращает адсорбцию

---

ПАУ на DEAE-силикагеле; промывка картриджа 1 мл метанола дополнительно очищает пробу от фенолов.

### **5.1.2. Концентрирование на универсальном адсорбенте, адсорбционная очистка на ионообменных и бифункциональных адсорбентах**

Одним из примеров реализации такого подхода является метод определения фенольных соединений в грунтовых водах, описанный в работе [6]. Образец грунтовой воды пропускается через картридж с непористой графитизированной сажей; при этом наряду с адсорбцией фенолов происходит извлечение больших количеств компонентов матрицы, в основном нейтральных и анионных сурфактантов. Концентрирующий картридж сушится в токе азота, аналиты смываются смесью хлористый метилен-метанол 6:4. Полученная проба пропускается через картридж с сильным анионообменным адсорбентом, который извлекает из пробы соединения кислого характера, то есть определяемые фенолы и анионные сурфактанты; нейтральные сурфактанты не задерживаются анионообменным адсорбционным материалом и вымываются с элюатом. Фенольные соединения смываются затем с анионообменного адсорбента 100% муравьиной кислотой; анионные же сурфактанты остаются на картридже.

В случаях ионных аналитов концентрирование может быть проведено непосредственно на ионообменном адсорбенте. Примером такого подхода может служить метод определения ароматических аминов в табачном дыме [41], в котором реализована двухстадийная твердофазная экстракция: вначале на ионообменном, а затем на нейтральном полимерном материале. 2 мл экстракта фильтров сигарет в 5% водной HCl пропускается через картридж с катионообменной смолой Oasis MCX; картридж промывается 2 мл 1% водной HCl и 2 мл метанола; аналиты смываются 2 мл 5% NH<sub>4</sub>OH в метаноле. Полученная проба разбавляется 10 мл воды (pH 11), образец пропускается через картридж с нейтральным полимерным материалом Oasis HLB. Картридж промывается 2 мл воды (pH 11), 2 мл смеси метанол-вода 30:70 и затем сушится в токе азота; ароматические амины смываются с полимера 1.5 мл толуола. Высокая степень очистки пробы достигается с помощью комбинирования ионообменного и обращенно-фазового ТФЭ-материалов.

### **5.1.3. Концентрирование и адсорбционная очистка на селективных импринтных и аффинных адсорбентах**

Успешное применение импринтных адсорбционных материалов иллюстрирует метод определения пестицидов триазинового ряда в грунтовых водах [37]. 500 мл грунтовой воды пропускается через диск с C18 силикагелем, затем картридж сушится; аналиты смываются 30 мл дихлорметана. Проба в дихлорметане пропускается через картридж с пестицид-импринтным адсорбентом на основе полиметакриловой кислоты. Полиметакриловая кислота, адсорбент с высокой полярностью, количественно концентрирует полярные слабоосновные аналиты из дихлорэтана. Картридж промывается 2 мл ацетонитрила для очистки пробы от компонентов матрицы образца; потери же аналитов при этой процедуре остаются незначительными. Затем аналиты количественно смываются с картриджа 3 мл метанола.

Применение высокоселективных и достаточно емких импринтных адсорбционных материалов позволяет провести селективное концентрирование аналитов. Примером такой эффективной процедуры может служить метод определения гербицидов на основе феноксиуксусных кислот из водных образцов [36]. 1000 мл образца грунтовой воды пропускается через картридж с импринтным адсорбентом на основе винилпиридина, который эффективно сочетает принцип комплементарности с ионообменным взаимодействием с кислотными гербицидами. Картридж промывается 3 мл метанола; аналиты смываются 2 мл смеси метанол-уксусная кислота 4:1. Проба анализируется методом капиллярного электрофореза. На рисунке 4 показаны результаты анализа проб, полученных с помощью жидкость-жидкостной экстракции, ТФЭ на неселективной C18 фазе и ТФЭ на импринтном материале; удовлетворительное определение возможно лишь при пробоподготовке последним методом.

Примером очистки пробы методом твердофазной экстракции на аффинном адсорбенте (без концентрирования аналитов) может служить метод определения метаболитов героина в образцах крови [42]. 1 мл плазмы крови пропускается через картридж с соответствующим иммуносорбентом, который затем промывается 5 мл воды; аналиты смываются 20 мл элюента, 8% ацетонитрила в кислом фосфатном буфере.

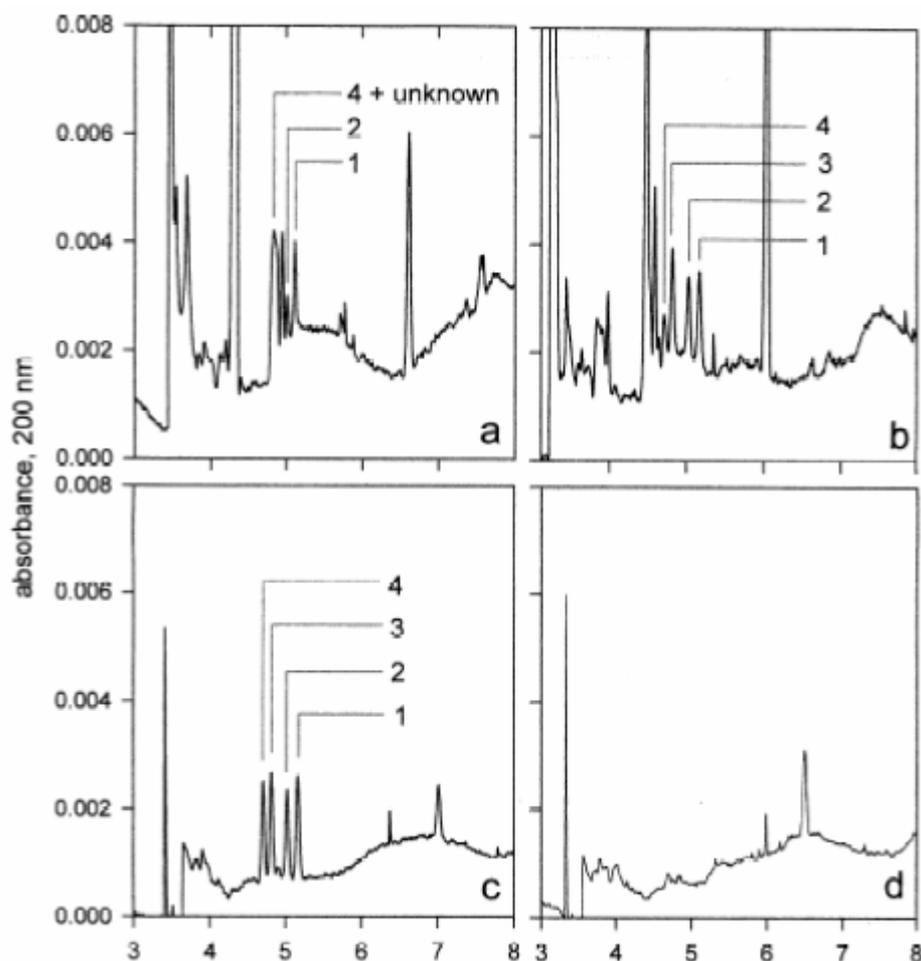


Рис. 4. Результаты анализа гербицидов методом капиллярного электрофореза в пробах грунтовой воды, полученных различными методами [36]. а – с помощью жидкость-жидкостной экстракции, б – ТФЭ на неселективном C18 силикагеле; с – ТФЭ на импринтном адсорбенте; d – ТФЭ на полимерном адсорбенте, полученном без формообразователя (бланк).

## 5.2. Подготовка пробы с помощью он-лайн методов

Применение он-лайн концентрирования на универсальных адсорбционных материалах целесообразно лишь в тех случаях, когда исследуемые образцы не содержат извлекаемых сорбентом компонентов, способных помешать дальнейшему хроматографическому определению аналитов. В большинстве же практических приложений образцы являются комплексными, многокомпонентными. По этой причине наиболее перспективными материалами для он-лайн концентрирования являются высокоселективные импринтные и аффинные адсорбционные материалы. С другой стороны, успешным может оказаться и он-лайн концентрирование на менее селективном сорбенте, если аналитическая колонка позволяет надежно отделить аналиты от сопутствующих компонентов.

Примером применения аффинных адсорбентов для он-лайн твердофазной экстракции может служить метод определения гербицидов группы линурона в образцах грунтовых вод [10]. На рисунке 5 для сравнения приведены хроматограммы, полученные при анализе проб, приготовленных с помощью ТФЭ на аффинном и неселективном C18 материалах; преимущество селективного он-лайн концентрирования на аффинном сорбенте очевидно.

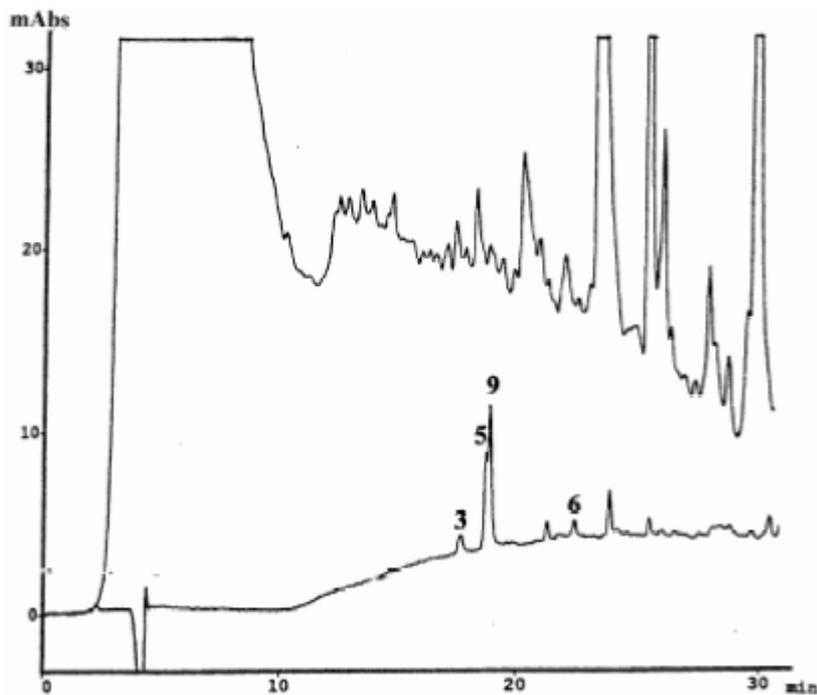


Рис.5. Сравнение хроматограмм, полученных с применением он-лайн концентрирования образца речной воды на картридже с неселективным C18 адсорбентом (вверху) и аффинным адсорбентом (внизу) [10]. 3 – хлортолурун, 5 – изопротурон, 6 – линурон, 9 – диурон.

## 6. Заключение

Прогресс метода твердофазной экстракции привел к существенной модернизации методов подготовки пробы, которые становятся менее ресурсоемкими и более экспрессными. Тенденция замены «классических» методов пробоподготовки на

метод ТФЭ стала наиболее ярко прослеживаться в последние несколько лет, с момента появления на рынке доступных полимерных и углеродных адсорбционных материалов новых типов.

Применение метода ТФЭ привело к значительному уменьшению доли времени пробоподготовки относительно времени анализа в целом. В значительной степени именно причиной изменения отношения времени пробоподготовки к времени аппаратного анализа обусловлен интерес производителей хроматографической продукции к методам экспрессного анализа, которые могли бы восстановить баланс. К примеру, в жидкостной хроматографии ускорение разделения связывают с появлением коротких высокоэффективных колонок и жидкостных систем для работы с «быстрыми» градиентами. Таким образом, развитие метода ТФЭ в перспективе должно обеспечить не только увеличение качества получаемых проб и скорости их приготовления, но также и уменьшение времен хроматографических анализов.

*Авторы благодарят Наталью Дмитриевну Иванову (ОАО «Научные приборы», С.-Петербург) за содействие в написании раздела по применению аффинных сорбционных материалов и Сергея Владимировича Волковича (Институт питания РАМН, Москва) за помощь в исследованиях в области твердофазной экстракции.*

## 7. Список литературы

1. S.A. Barker. Matrix solid-phase dispersion. J. Chromat. A, 885 (2000) 115-127
2. K.N.T. Norman , S.H.W. Panton. Supercritical fluid extraction and quantitative determination of organophosphorus pesticide residues in wheat and maize using gas chromatography with flame photometric and mass spectrometric detection. J. Chromat. A, 907 (2001) 247-255
3. I. Liska. Fifty years of solid-phase extraction in water analysis – historical development and overview. J. Chromat. A, 885 (2000) 3-16
4. M.E. Leon-Gonzalez, L.V. Perez-Arribas. Chemically modified polymeric sorbents for sample preconcentration. J. Chromat. A, 902 (2000) 3-16
5. C.W. Huck, G.K. Bonn. Recent developments in polymer-based sorbents for solid-phase extraction. J. Chromat. A, 885 (2000) 51-72
6. I. Rodrigues, M.P. Llompart, R. Cela. Solid-phase extraction of phenols. J. Chromat. A, 885 (2000) 291-304
7. M.-C. Hennion. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. J. Chromat. A, 856 (1999) 3-54
8. L.I. Andersson. Molecular imprinting for drug bioanalysis. A review on the application of imprinted polymers to solid-phase extraction and binding assay. J. Chromat. A, 739 (2000) 163-173
9. J.S. Fritz, P.J. Dumont, L.W. Schmidt. Methods and materials for solid-phase extraction. J. Chromat. A, 691 (1995) 133-140
10. N. Delaunay, V. Pichon, M.-C. Hennion. Immunoaffinity solid-phase extraction for the trace-analysis of low-molecular-mass analytes in complex sample matrices. J. Chromat. B, 745 (2000) 15-37
11. Stevenson D. Immuno-affinity solid-phase extraction. J. Chromat. B, 745 (2000) 39-48
12. Sandra P., Tienpont B., David F. Multi-residue screening of pesticides in vegetables, fruits and baby food by stir bar sorptive extraction–thermal desorption–capillary gas chromatography–mass spectrometry. J. Chromat. A, 1000 (2003) 299-309

13. Guenu S., Hennion M.-C. Evaluation of new polymeric sorbents with high specific surface areas using an on-line solid-phase extraction-liquid chromatographic system for the trace-level determination of polar pesticides. *J. Chromat. A*, 737 (1996) 15-24
14. Patsias J., Papadopoulou-Mourkidou E. Development of an automated on-line solid-phase extraction-high-performance liquid chromatographic method for the analysis of aniline, phenol, caffeine and various selected substituted aniline and phenol compounds in aqueous matrices. *J. Chromat. A*, 904 (2000) 171-188
15. Wissiack R., Rosenberg E., Grasserbauer M. Comparison of different sorbent materials for on-line solid-phase extraction with liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry of phenols. *J. Chromat. A*, 896 (2000) 159-170
16. Davankov V., Tsyurupa M., Ilyin M., Pavlova L. *J. Chromatogr. A*, 965 (2002) 65
17. Hanai T. Separation of polar compounds using carbon columns. *J. Chromat. A*, 989 (2003) 183-196
18. Gilar M., Belenky A., Wang B.H. High-throughput biopolymer desalting by solid-phase extraction prior to mass spectrometric analysis. *J. Chromat. A*, 921 (2001) 3-13
19. Gelencser A. et al. A simple method for the determination of capacity factor on solid-phase extraction cartridges. *J. Chromat. A*, 693 (1995) 217-225
20. Schellen A. et al. Generic solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for fast determination of drugs in biological fluids. *J. Chromat. B*, 788 (2003) 251-259
21. Davankov V.A. and Tsyurupa M.P. Structure and properties of hypercrosslinked polystyrene – the first representative of a new class of polymer networks. *Reactive Polymers*, 13 (1990) 27-42
22. Даванков В.А., Сычев К.С., Ильин М.М. Применение сверхсшитых полистирольных сорбентов в высокоэффективной жидкостной хроматографии. *Заводская лаборатория. №4. 2003. Том 69. с. 3-7*
23. Hennion M.-C. et al. *J. Chromat. A*, 712 (1995) 287
24. Davankov V.A., Sychov C.S., Ilyin M.M., Sochilina K.O. Hypercrosslinked polystyrene as a novel type of high-performance liquid chromatography column packing material. Mechanisms of retention. *J. Chromatogr. A*, 987 (2003) 67-75
25. Huang Z., Zhang S. Confirmation of amphetamine, methamphetamine, MDA and MDMA in urine samples using disk solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry after immunoassay screening. *J. Chromat. B*, 792 (2003) 241-247
26. Pichon V. et al. Simple removal of humic and fulvic acid interferences using polymeric sorbents for the simultaneous solid-phase extraction of polar acidic, neutral and basic pesticides. *J. Chromat. A*, 737 (1996) 25-33
27. Li N., Lee H.K.. Solid-phase extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface water. Negative effect of humic acid. *J. Chromat. A*, 921 (2001) 255-263
28. Dumont P.J., Fritz J.S.. Effect of resin sulfonation on the retention of polar organic compounds in solid-phase extraction. *J. Chromat. A*, 691 (1995) 123-131
29. [www.waters.com](http://www.waters.com)
30. Pocurull E. et al. On-line solid-phase extraction-ion-pair liquid chromatography-electrospray mass spectrometry for the trace determination of naphthalene monosulfonates in water. *J. Chromat. A*, 854 (1999) 187-195
31. van der Hoeven R.A.M et al. Liquid chromatography-mass spectrometry with on-line solid-phase extraction by a restricted-access C18 precolumn for direct plasma and urine injection. *J. Chromat. A*, 762 (1997) 193-200
32. Labrou N., Clonis Y. D. The affinity technology in downstream processing. *J. Biothech.*, 36 (1994) 95-119

33. Ostryanina N., Vlasov G., Tennikova T.. Multifunctional fractionation of polyclonal antibodies by immunoaffinity high-performance monolithic disk chromatography. *J. Chromat. A*, 949 (2002) 163-71
34. Pichon V. et al. Selective trace enrichment on immunosorbents for the multiresidue analysis of phenylurea and triazine pesticides. *J. Chromat. A*, 725 (1996) 107-119
35. Caro E. et al. On-line solid-phase extraction with molecularly imprinted polymers to selectively extract substituted 4-chlorophenols and 4-nitrophenol from water. *J. Chromat. A*, 995 (2003) 233-238
36. Baggiani C. et al. Molecularly imprinted solid-phase extraction sorbent for the clean-up of chlorinated phenoxyacids from aqueous samples. *J. Chromat. A*, 938 (2001) 35-44
37. Pap T. et al. Effect of solvents on the selectivity of terbutylazine imprinted polymer sorbents used in solid-phase extraction. *J. Chromat. A*, 973 (2002) 1-12
38. Marquez-Ruiz G. et al. Rapid, quantitative determination of polar compounds in fats and oils by solid-phase extraction and size-exclusion chromatography using monostearin as internal standard. *J. Chromat. A*, 749 (1996) 55-60
39. Johnson C.B.. Isolation of cholesterol oxidation products from animal fat using aminopropyl solid-phase extraction. *J. Chromat. A*, 736 (1996) 205-210
40. Сычев К.С., Эллер К.И., Даванков В.А.. Определение микотоксина патулина во фруктах и соках методом НФ ВЭЖХ с применением твердофазной экстракции на сверхсшитом полистироле. Заводская лаборатория, в печати (2004)
41. Smith C.J., Dooly G.L., Moldoveanu S.C.. New technique using solid-phase extraction for the analysis of aromatic amines in mainstream cigarette smoke. *J. Chromat. A*, 991 (2003) 99-107
42. Beike J. et al. Immunoaffinity extraction of morphine, morphine-3-glucuronide and morphine-6-glucuronide from blood of heroin victims for simultaneous high-performance liquid chromatographic determination. *J. Chromat. B*, 726 (1999) 111-119.