

# ПРОБОПОДГОТОВКА В ХИМИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ МЕТОДОМ СВЕРХКРИТИЧЕСКОЙ ФЛЮИДНОЙ ЭКСТРАКЦИИ

О.Покровский, ЗАО "ШАГ"  
opokrovskiy@schag.ru

**В** статье изложены основы метода сверхкритической флюидной экстракции и рассмотрены некоторые аспекты его применения для проведения пробоподготовки в химическом анализе. Экстракция сверхкритическим диоксидом углерода обладает рядом преимуществ по сравнению с жидкостной, которые делают эту технику весьма привлекательным инструментом как рутинной, так и специализированной лабораторной работы. Это, прежде всего, широкий набор приемов управления селективностью экстракции, скорость извлечения, высокая проникающая способность сверхкритического флюида, дешевизна основного компонента растворителя и легкость очистки от растворителя после экстракции. В работе приведено несколько примеров использования технологии в анализе как природных, так и синтетических объектов.

Проблема пробоподготовки в последнее время вышла на первое место в ряду технологических ограничений скорости химического анализа и, в частности, аналитической хроматографии. В течение нескольких десятилетий последовательно совершенствуются хроматографическое оборудование, колонки и методы разделения веществ. Разделение даже очень сложных смесей совершается рутинно с использованием стандартных, отработанных приемов, и при этом время анализа редко превышает 10 минут. Нередко от сотрудников лабораторий контроля качества можно услышать, что зачастую они тратят на пробоподготовку образца в 5-10 раз больше времени, чем на сам анализ и обработку данных. Это обстоятельство заставляет сообщество аналитиков внимательнее присмотреться к существующим приемам пробоподготовки, их сравнительным достоинствам и недостаткам, областям применения, а также к путям их усовершенствования. При анализе сложных природных и синтетических объектов первая стадия пробо-

подготовки – экстракция целевых компонентов из матрицы. Как правило, для этого используется жидкостная экстракция подходящим растворителем. Из-за сравнительно высокой вязкости, низких коэффициентов диффузии и высокого поверхностного натяжения, жидкости плохо проникают даже в пористые матрицы. Для достижения необходимой полноты извлечения анализируемых веществ из матрицы, экстракцию необходимо проводить в течение очень длительного периода времени. Основной прием, который сегодня используется для увеличения скорости экстракции, – нагрев. Его недостатки очевидны: помимо деструкции термолабильных компонентов, есть ограничения в выборе растворителей. Другие методы ускорения экстракции, например ультразвуковая стимуляция, также имеют свои недостатки, в основном связанные со сложностью конструкции и недостаточно высокой эффективностью.

Альтернативой жидкостной экстракции может быть экстракция с помощью сверхкритических

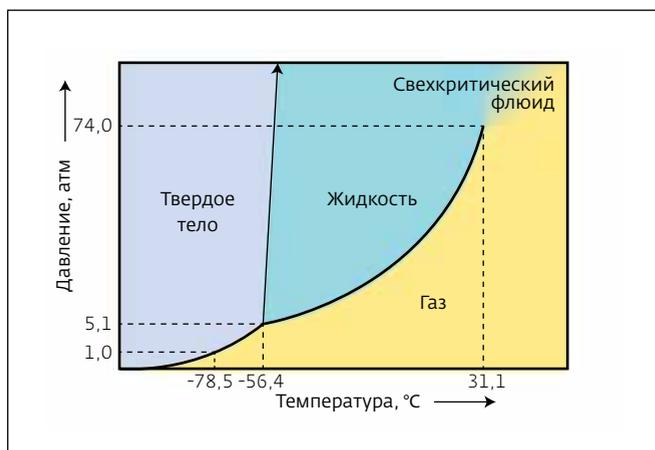


Рис.1. Фазовая диаграмма диоксида углерода

флюидов. Сверхкритический флюид (СКФ) – особое состояние вещества, по своим свойствам промежуточное между жидкостью и газом. В это состояние вещество переходит при превышении определенных пороговых значений температуры и давления, индивидуальных для каждого химического вещества и называемых критическими параметрами данного вещества (см. рис.1). В области выше критических температуры и давления уже не существует границы раздела фаз

между жидкостью и газом, а есть единая текучая, относительно плотная, легко сжимаемая среда, не имеющая постоянного объема. В такой форме вещество, с одной стороны, все еще обладает существенной растворяющей способностью, подобно жидкостям, а с другой – обладает транспортными характеристиками, больше характерными для газов, – низкой вязкостью, легко варьируемой плотностью, высокими коэффициентами диффузии. Плотностью сверхкритического флюида легко управлять, изменяя давление или температуру, поэтому при его использовании в качестве растворителя появляется нехарактерная для жидкостей возможность тонко настраивать растворяющую способность растворителя под конкретную задачу. Благодаря отсутствию межфазного натяжения сверхкритические флюиды легко проникают в поры малого диаметра. Такое сочетание свойств обуславливает интерес к сверхкритическим флюидам как средам для проведения транспортных химических процессов, в том числе и экстракции. Более быстрые процессы проникновения в матрицу сырья и диффузионного транспорта растворенных веществ к поверхности частиц матрицы обеспечивают ускорение извлечения целевых веществ. А управление растворяю-

щей способностью флюида дает возможность контролировать селективность экстракции, не меняя химической природы растворителя.

Наиболее распространенный растворитель, используемый в сверхкритической флюидной экстракции, – диоксид углерода ( $\text{CO}_2$ ). Это связано в первую очередь с его низкими критическими параметрами ( $P_{\text{крит}} = 74$  атм,  $T_{\text{крит}} = 31^\circ\text{C}$ ), относительно высокой растворяющей способностью и легкой доступностью. Кроме того, диоксид углерода – негорючий, нетоксичный и химически инертный растворитель. Немаловажным является и тот факт, что в нормальных условиях  $\text{CO}_2$  – газ. При проведении какого-либо транспортного процесса в СК- $\text{CO}_2$ , например экстракции, очистка продукта от растворителя достигается простым сбросом давления. Сверхкритический  $\text{CO}_2$  при этом переходит в газ и улетучивается, избавляя тем самым аналитика от необходимости проводить длительное упаривание экстракта после выделения, часто приводящее к частичной термодеструкции целевых веществ.

Сверхкритическая флюидная экстракция (СФЭ), как правило, осуществляется в проточном либо в периодическом проточно-стационарном режиме. Типичная схема оборудования для СФЭ приведена на рис.2.

Помимо возможности варьирования плотности сверхкритического флюида, в методе СФЭ применяется такой мощный инструмент управления селективностью экстракции, как использование соразтворителей. Если растворяющей способности чистого  $\text{CO}_2$  не хватает для извлечения

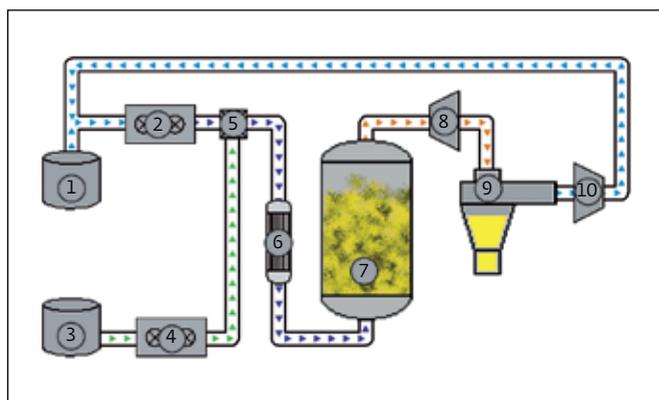


Рис.2. Типичная схема сверхкритического флюидного экстрактора. Обозначения: 1 – источник  $\text{CO}_2$ , 2 – насос  $\text{CO}_2$ , 3 – источник жидкого соразтворителя, 4 – насос соразтворителей, 5 – смеситель, 6 – нагреватель, 7 – экстракционный сосуд, 8 – регулятор давления, 9 – сепаратор, 10 – система рециркуляции  $\text{CO}_2$

какого-то компонента, то в поток  $\text{CO}_2$  добавляется небольшое количество жидкого растворителя, способного повысить растворяющую способность флюида по отношению к данному веществу. Оперируя давлением, температурой, типом и содержанием соразтворителей, с помощью СФЭ можно проводить тонкое селективное фракционирование анализируемого объекта уже на стадии пробоподготовки.

Традиционная сфера применения СФЭ с  $\text{CO}_2$  – извлечение неполярных субстанций, таких как жирные и эфирные масла, стероиды, терпеноиды, каротиноиды, ароматические соединения, воск и т.п. Так, подготовка к анализу триглицеридных масел с помощью СФЭ занимает в ~8-10 раз меньше времени, чем экстракция гексаном в аппарате Сокслета. При этом СФЭ одинаково хорошо подходит для извлечения триглицеридов из любых матриц, как растительных, так и животных. Это особенно актуально для анализа жиров морских животных с высоким содержанием полиненасыщенных жирных кислот, легко окисляющихся при нагреве. Извлечение жиров в СФЭ идет в бескислородной среде при невысоких температурах ( $40-60^\circ\text{C}$ ), что обеспечивает их сохранность в интактной форме. При этом в чистом сверхкритическом  $\text{CO}_2$  не растворяются полярные фракции жиров – фосфолипиды, гликолипиды и проч. Поэтому, в отличие от экстракции гексаном, в СФЭ при рабочих давлениях до 400 бар исследователь сразу получает продукт, состоящий только из триглицеридов и пригодный к непосредственному вводу в хроматограф после растворения без дополнительной обработки. Если же стоит задача анализа и полярных липидов, то при добавлении небольшого количества низших спиртов (5-10% метанола или этанола) к СК- $\text{CO}_2$  легко экстрагируются и эти фракции.

Анализ эфирных масел – одна из тех задач, в которых возможность проведения предварительного фракционирования экстракта с помощью ступенчатой СФЭ является весомым преимуществом. На рис.3 приведена кинетическая схема экстракции розмарина. На первом шаге при низком давлении из сырья извлекается эфирное масло, затем на втором этапе давление повышается, и идет экстракция антиоксидантных компонентов розмарина. Как правило, эти две группы соединений анализируются разными хроматографическими техниками, первая – с помощью ГХ, вторая – с помощью ВЭЖХ или сверхкритической флюидной хроматографии (СФХ). СФЭ пред-

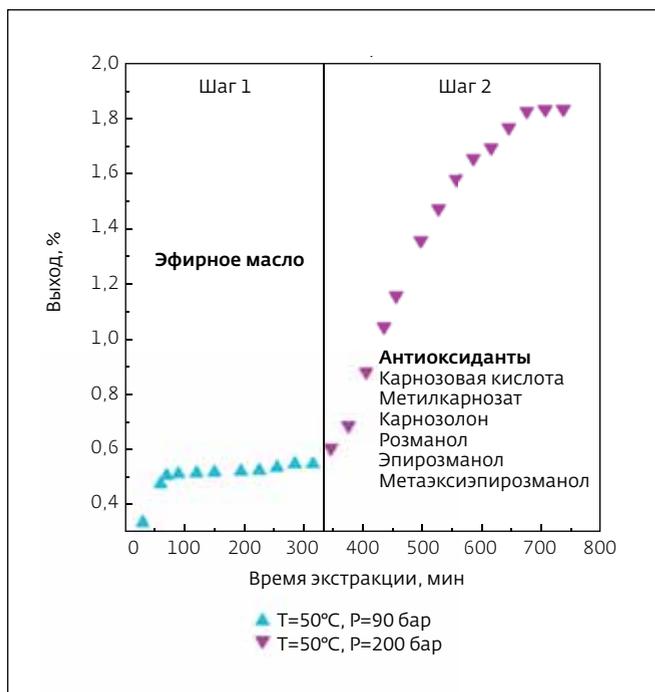


Рис.3. Кинетическая схема экстракции розмарина

лагает уникальную возможность разделить данные фракции между собой без дополнительных усилий.

Один из примеров управления селективностью в сверхкритической экстракции – извлечение из молочая потенциального лекарства против ВИЧ-инфекции ингенола [1]. Традиционный процесс выделения этого вещества представляет собой экстракцию гексаном с последующей многоступенчатой хроматографической очисткой. На рис.4 приведены хроматограммы стандарта ингенола и двух экстрактов молочая – сверхкритического и жидкостного.

Как видно, в случае СФЭ исследователям удалось найти такие условия, в которых селективность извлечения целевого компонента намного выше по сравнению с экстракцией гексаном, что заметно облегчает последующий анализ. Такая возможность обусловлена в первую очередь простотой изменения плотности сверхкритического флюида путем изменения давления.

Еще одно весьма широкое поле применения аналитической сверхкритической флюидной экстракции – извлечение присадок, наполнителей, пластификаторов, мономеров и прочих низкомолекулярных соединений из полимерных и композитных материалов. Благодаря отсутствию межфазного натяжения и низкой вязкости сверхкритический CO<sub>2</sub> легко проникает в толщу поли-

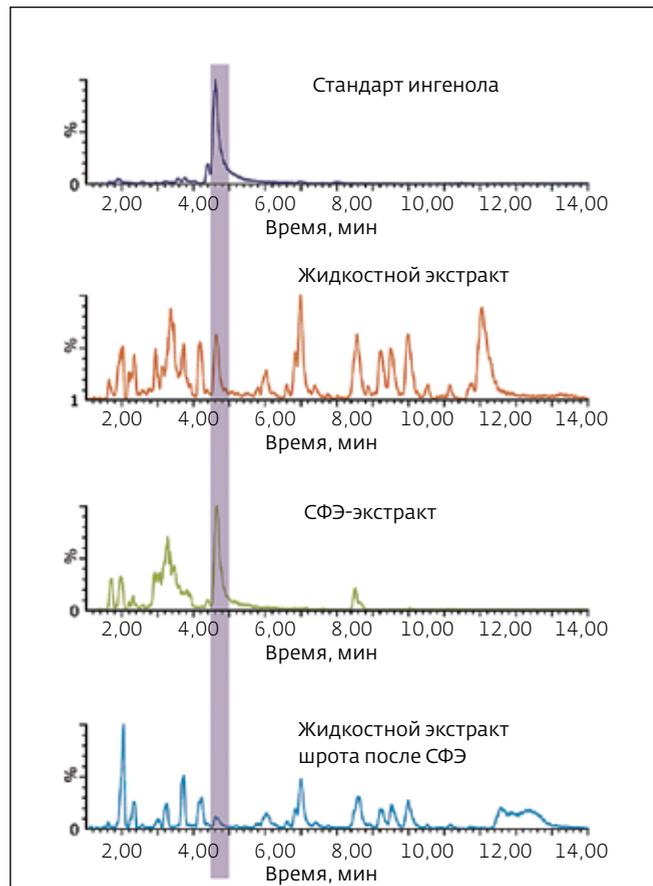


Рис.4. Сравнение профиля сверхкритического и жидкостного экстрактов молочая

мерных материалов на большую глубину и извлекает оттуда целевые компоненты эффективнее, чем традиционные органические растворители. Более того, многие полимеры могут набухать и пластифицироваться в сверхкритическом диоксиде углерода, что также облегчает массоперенос экстрактивных веществ внутри полимерных материалов. В качестве иллюстрации на рис.5 приведена фотография пластиковой трубки до и после извлечения пластификаторов из нее с помощью СФЭ.

СФЭ также имеет серьезные перспективы в области судебно-медицинской экспертизы [2]. Большое число токсинов, наркотических веществ и других препаратов, содержание которых в живых тканях и биологических жидкостях контролируется в ходе таких экспертиз, имеют небольшой срок жизни в растворах. Так, например, героин после экстракции из волос быстро гидролизует до морфина. Если пробоподготовка проходит слишком долго, то целевое вещество успеет разложиться еще до ввода пробы образца в хроматограф, и это фатальным

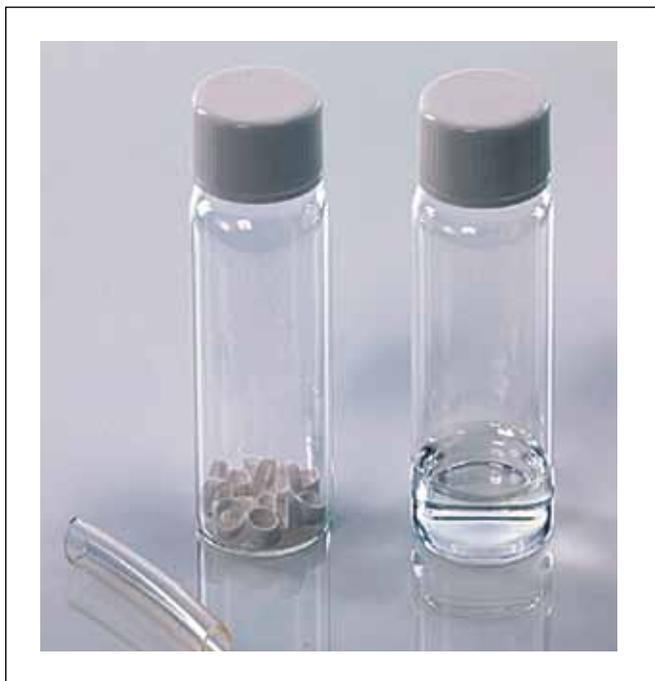


Рис.5. Экстракция пластификаторов из полимеров. Прозрачная трубка – исходный материал. Нарезанные непрозрачные кольца – материал после экстракции

образом скажется на результатах экспертизы. Аналитическая СФЭ позволяет с легкостью извлекать опиатные производные, бензодиазепины и многие другие контролируемые продукты из волос и костной ткани за считанные минуты. При этом степень сохранности этих веществ, как правило, выше, чем при жидкостной экстракции, в силу использования более щадящих режимов экстракции.

Аналитическая СФЭ часто применяется при геологической разведке перспективных месторождений полезных ископаемых, например нефтеносных пластов. После отбора геологами проб пород необходимо провести анализ большого количества образцов на содержание биомаркеров, свидетельствующих о перспективах месторождения. Главная трудность в таком анализе заключается в особой сложности извлекаемых при экстракции смесей веществ и необходимости предварительного фракционирования перед проведением хроматографического анализа. В этом случае помогает включение соразтворителей в состав экстрагента в СФЭ. На рис.6 приведены фотографии трех фракций, извлекаемых из нефтяных пород с помощью СФЭ в трех различных режимах. В первой фракции в результате экстракции чистым  $\text{CO}_2$  при давлении 100 бар преимущественно сконцентрированы алифатические углеводороды; во второй, полученной



Рис.6. Ступенчатая экстракция нефтяных пород с помощью СФЭ с соразтворителями

при использовании 2%-го метанола как соразтворителя и при давлении 300 бар – различные ароматические вещества; в третьей, полученной с использованием 2%-го дихлорметана как соразтворителя – смолы. Подобное разделение заметно облегчает последующий анализ.

В заключение упомянем еще одну интересную область применения аналитической сверхкритической экстракции – подготовку готовых лекарственных средств к анализу качества. Подавляющее большинство фармацевтических субстанций – полярные вещества, так как биодоступность фармпрепарата прежде всего определяется растворимостью в воде. В связи с этим чаще всего их анализ проводят с помощью обращенно-фазовой жидкостной хроматографии. Но если активный фармацевтический ингредиент (АФИ) применяется в мягкой лекарственной форме – мазь, суппозиторий и т.п., – то извлечение из жировой основы перед ОФ-ВЭЖХ совершенно необходимо. Даже остаточные следы крема в образце приводят к плохому воспроизведению данных анализа и скорой порче колонок. При использовании жидкостной экстракции такого рода пробоподготовка представляет собой весьма сложную задачу. Если же в качестве средства пробоподготовки таких препаратов использовать СФЭ, то, применяя неполярный растворитель  $\text{CO}_2$ , можно эффективно и быстро избавиться от жировой основы, получив в экстракционном сосуде практически чистый АФИ.

\*\*\*\*

Компания Waters Corp представляет аналитический сверхкритический флюидный экстрактор ASFE MV-10 (рис.7). Этот прибор специально разработан для проведения пробоподготовки с помощью СФЭ и для автоматизированной оптимизации методик сверхкритической экстракции. Прибор оснащен насосным модулем, обеспечи-



Рис.7. Аналитический сверхкритический флюидный экстрактор ASFE MV-10 компании Waters

вающим подачу флюида с объемной скоростью до 15 мл/мин. Насос соразтворителя снабжен шестипортовым краном для автоматического переключения между различными соразтворителями. Термостат системы может вмещать до десяти экстракционных сосудов одновременно, что позволяет проводить скрининг различных условий экстракции на свежих образцах в автоматическом режиме без вмешательства оператора после окончания каждого акта экстракции. Давление в системе контролируется с помощью

автоматического выходного регулятора давления, что позволяет управлять давлением и скоростью потока флюида независимо друг от друга. Система полностью автоматизирована, управляется с помощью программного обеспечения ChromScope, позволяющего задавать и контролировать все рабочие параметры процесса экстракции, создавать сложные последовательности при работе в периодическом стационарно-проточном режиме, а также последовательности экстракций при необходимости автономизации процесса скрининга различных образцов. Система идеально подходит для реализации описанных выше приложений аналитической СФЭ и может стать незаменимым инструментом в любой аналитической лаборатории.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Alleviating Sample Complexity of a Natural Product Using the MV-10 ASFE System. Waters technology brief. 720004273EN. 2012.
2. Radcliffe C., Maguire K., Lockwood B. Applications of supercritical fluid extraction and chromatography in forensic science. – Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 2000, v.43, p.261-272.