

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

направление обучения «Химия»

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Сорбенты в биохимических исследованиях

Студент 4-го курса

Лашуков Михаил Сергеевич

Уровень/ступень образования:

бакалавриат

Заведующий кафедрой:

д.х.н., профессор А.Б. Никольский

Научный руководитель:

к.х.н., доцент А.А. Селютин

Оглавление

Перечень условных обозначений	3
Введение	4
Обзор литературы	5
1. Определение сорбции и ее механизмы	5
2. Основные типы сорбентов и их применение для биохимических исследований	6
2.1 Обращенно-фазовые сорбенты	6
2.2 Нормально -фазовые сорбенты	9
2.3 Ионообменные и хелатные сорбенты	10
2.4 Сорбенты, основанные на молекулярном распознавании (иммуно-афинные сорбенты и полимеры с молекулярными отпечатками)	12
2.5 Сорбенты с ограниченно доступной поверхностью	14
2.6 Сорбенты смешанного типа	15
2.7 Другие сорбенты	17
3. Выбор сорбента и условий сорбции/десорбции	17
4. Варианты технической реализации процедуры сорбции	19
4.1 Классические способы	19
4.2 Миниатюризация процедуры извлечения	21
4.2.1 Способы извлечения в ТФМЭ	23
4.2.2 Сорбенты, используемые в ТФМЭ	24
4.2.3 Влияние условий сорбции	25
4.2.4 Применение ТФМЭ в биохимическом анализе	27
4.2.4.1 Токсиканты	27
4.2.4.2 Вещества с наркотическим действием	29
4.2.4.2.1 Амфетамины	29
4.2.4.2.2 Бензодиазепины	30
4.2.4.2.3 Барбитураты	30
4.2.4.2.4 Другие наркотические вещества	31
4.2.4.3 Вещества, исследуемые в клинической биохимии	32
Заключение	39
Список литературы	40

Перечень условных обозначений

ТФМЭ – твердофазная микроэкстракция

ВЭМХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГХ-МС – газовая хроматография с масс-спектрометрическим
детектированием

Введение

С увеличением интереса исследователей к изучению биохимических процессов, существует растущая необходимость анализа очень низких концентраций соединений, которые присутствуют с большим количеством мешающих веществ в крови, моче и других биологических образцах, являющихся сложными по составу. Часто в качестве предварительной стадии требуется пробоподготовка, которая занимает более 75 процентов времени анализа. С помощью нее количественно отделяют аналиты от мешающих компонентов, концентрируют их для увеличения чувствительности и переводят в подходящую для анализа форму. Для этой применяется целый ряд методов: центрифугирование, хроматографию, перегонку, сорбцию, фильтрацию, лиофильную сушку и осаждение. Привлекательным является применения различных сорбентов, позволяющих извлекать целевые вещества так, чтобы происходила сорбция только целевого вещества, а мешающие компоненты оставались в жидкой фазе. Мешающие компоненты отделяются, а целевые соединения десорбируют с использованием растворителя, подходящего для выбранного инструментального метода анализа. Альтернативным путем является сорбция мешающих компонентов на твердом сорбенте, при этом аналиты остаются в водной фазе, однако, не происходит концентрирования и из-за этого данный подход используется нечасто.

В настоящее время разработан широкий спектр сорбентов, извлекающих вещества различных классов: обращенно-фазовые, нормально-фазовые, ионообменные, хелатные и др.

Целью данной работы явилось рассмотрение основных классов сорбентов, их свойств, областей применения в биохимическом анализе. Также были описаны факторы, влияющие на выбор сорбента и условий сорбции, и варианты технической реализации процедуры экстракции, в том числе в миниатюризованном варианте.

Обзор литературы

1. Определение адсорбции и ее механизмы

Сорбция (от лат. sorbeo— поглощаю, втягиваю)— процесс поглощения одного вещества (сорбтива) другим веществом (сорбентом), независимо от механизма поглощения. На основе этого можно сказать, что сорбенты - это вещества, избирательно поглощающие (сорбирующие) из окружающей среды газы, пары или растворённые вещества. Наиболее важными в биохимических исследованиях с практической точки зрения являются методы извлечения веществ с помощью твердых сорбентов. В данном случае можно говорить о протекании адсорбции, т.е. концентрировании веществ на поверхности раздела фаз. В состоянии равновесия количество адсорбированных молекул остается постоянным сколь угодно долго, если неизменны внешние условия (давление, температура и состав системы).

Адсорбция делится на несколько видов: физическую адсорбцию, хемосорбцию и капиллярную конденсацию

Физическая адсорбция обусловлена неспецифическими (то есть не зависящими от природы вещества) силами межмолекулярного взаимодействия, в основном силами Ван-дер-Ваальса. По своей природе эти взаимодействия относятся к типу электростатических диполь-дипольных взаимодействий и включают:

а) дисперсионные силы, порожденные синхронными осцилляциями взаимодействующих диполей (характерны для адсорбции неполярных молекул на неполярных адсорбентах (типа графита и угля));

б) индукционные силы, порожденные взаимодействием диполя с другим наведенным им диполем (характерны для адсорбции неполярных молекул на полярных адсорбентах с ионной связью (типа SiO_2 , Al_2O_3 и др.) и для адсорбции полярных молекул на неполярных адсорбентах и металлах);

в) ориентационные силы, порожденные взаимной ориентацией взаимодействующих диполей (характерны для адсорбции полярных молекул на полярных адсорбентах с ионной связью (типа SiO_2 , и др.)).

Кроме диполь-дипольных, в физической адсорбции участвуют ион-дипольные и квадрупольные взаимодействия.

На поверхности раздела двух фаз помимо адсорбции, обусловленной в основном физическими взаимодействиями (главным образом это Ван-дер-Ваальсовы силы), может идти химическая реакция. Этот процесс называется хемосорбцией. Чёткое разделение на адсорбцию и хемосорбцию не всегда возможно. Одним из основных параметров по которым различаются эти явления является тепловой эффект: так, тепловой эффект физической адсорбции обычно близок к теплоте сжижения адсорбата, тепловой эффект хемосорбции значительно выше. Кроме того в отличие от физической адсорбции хемосорбция обычно является необратимой и локализованной.

Капиллярная конденсация – поглощение и конденсация адсорбируемого твердым микропористым адсорбентом. Адсорбтив, поглощенный адсорбентом, становится адсорбатом и начинает конденсироваться в микропорах, образуя вогнутый мениск. Это происходит вследствие того, что давление паров над вогнутым мениском жидкости меньше, чем давление насыщенного пара над плоской поверхностью жидкости при той же температуре.

2. Основные типы сорбентов и их применение для биохимических исследований

Рассмотрим основные типы сорбентов, используемых для сорбции веществ из водных и органических сред. (Таблица 1)

2.1 Обращенно-фазовые сорбенты.

Обращенно-фазовые сорбенты являются неполярными и служат для выделения относительно неполярных аналитов из полярной среды, чаще всего водной. Сродство вещества к сорбенту определяется его гидрофобностью. Для элюирования сорбированных веществ с сорбента используются различные органические растворители (ацетон, этилацетат, метанол). Для удаления более неполярных веществ используется смесь этилацетат и хлористого метилена. Удерживание на сорбентах полярных соединений может осуществляться за счет добавления ион-парного агента [1, 2]. Наиболее распространены обращенно-фазовые сорбенты на основе силикагеля с привитыми через силанольные группы углеводородными цепочками или другими неполярными группами. Сорбенты данной группы делятся на монофункциональные и

трифункциональные в зависимости от числа связей атома кремния в привитой группе с атомами кислорода силиanolных групп силикагеля (рис.1).

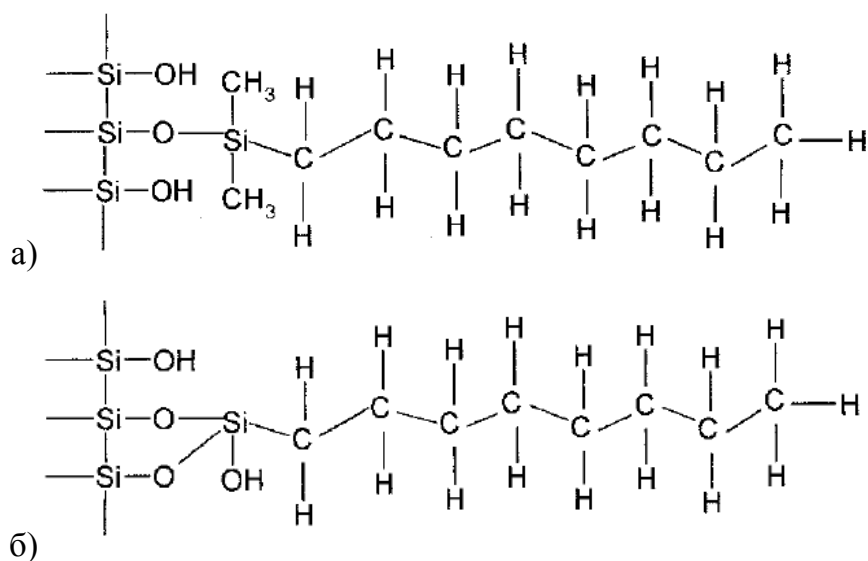


Рис.1 Структура поверхности моно- (а) и трифункциональных (б) силикагелей

Наиболее часто используют силикагели с привитыми октадецильными (C18) и октильными группами [1-6]. Также прививают циклогексильные, цианопропилэтильные, метильные или фенильные группы. Сорбенты с привитыми октадецильными цепочками обладают наиболее сильным удерживанием, но при этом сорбируют и мешающие компоненты. На циклогексильных фазах сорбируются фенолы. Дериватизация силиanolных групп проходит не до конца и свободные силиanolные группы остаются на поверхности силикагеля. При pH больше 2 эти группы диссоциируют и становятся доступными для вторичных ионных взаимодействий. Это может быть использовано для сорбции более полярных веществ, таких как основные лекарственные вещества. С другой стороны, эти группы могут быть блокированы с помощью триметилсилиanolных групп (рис. 2). Тем не менее полная деактивация силиanolных групп на поверхности сорбента не происходит. Сила связывания вещества с сорбентом может изменяться в зависимости от того, являются ли свободные силиanolные группы изолированными, вицинальными и геминальными.

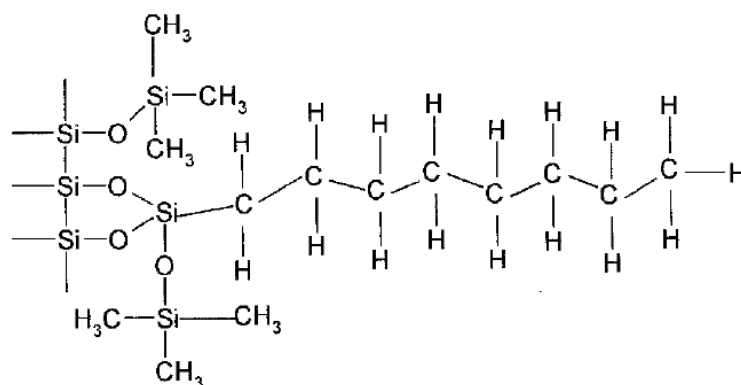


Рис.2 Структура поверхности модифицированного силикагеля с блокированными силанольными группами

Обращенно-фазовые сорбенты стабильны в органических растворителях и растворах кислот (для трифункциональных сорбентов – до pH 2), имеют широкий набор различных химически прививаемых групп и недороги. Свойства данных сорбентов зависят от того, моно- или трифункциональными они являются, блокированы ли немодифицированные силанольные группы, от размера частиц и распределения частиц по размерам, от типа привитой фазы и площади поверхности (от 200 до 600 м²). Размер пор определяет площадь поверхности сорбента: чем меньше поры, тем больше поверхность. Однако большие молекулы (более 2000 дальтон) могут не проникнуть в маленькие поры, для их сорбции необходим больший размер пор. Сорбенты с большим размером пор (более 27 нм) с привитыми короткоцепочечными углеводородными радикалами (C3 и C4) имеют более доступную поверхность для молекул большого размера. Обычно для элюирования вещества с сорбента требуется 250-600 мкл растворителя на 100 мг сорбента. Обращенно-фазовые сорбенты нашли применение для извлечения лекарственных веществ, пептидов и стероидов, а также для удаления фосфолипидов и белков из биологических образцов при определении низкомолекулярных липидов и метаболитов [7].

Также в качестве обращенно-фазовых сорбентов используются сшитые сополимеры стирола и дивинилбензола [3-9], графитированные сажи и активные угли [1, 10]. По сравнению с сорбентами на основе силикагеля они более гидрофобны, обладают более сильным удерживанием и стабильны в диапазоне pH от 0 до 14 и не участвуют во вторичных ионных взаимодействиях. Однако они требуют предварительного замачивания, так как дают плохо

воспроизводимые результаты при высушивании. Графитированные сажи позволяют извлекать полярные и водорастворимые вещества из водных растворов. Были созданы полимерные сорбенты на основе N-винилпирролидона и дивинилбензола, которые не требуют вымачивания и обладают хорошими характеристиками удерживания [4]. Они нашли применение для извлечения лекарственных веществ: улифлоксацина, фенбуфена, фелбинака из плазмы крови [11], бензодиазепинов из сыворотки крови и мочи [12], флаваноидов [13] и полиаминов [14] из сыворотки крови.

В статье [11] для извлечения лекарственных веществ из плазмы крови с целью изучения фармакокинетики и их взаимодействия использовался обращенно-фазовый полимерный сорбент Bond Elut Plexa на основе дивинилбензола. Для анализа замороженные пробы плазмы размораживали и центрифугировали. 1 мл водной фазы пропускали через картридж и промывали его дважды водой по 1 мл. Далее пропускали 2 мл метанола для элюирования аналитов. Растворитель удаляли потоком азота. К остатку добавляли 200 мкл подвижной фазы и 20 мкл полученного раствора вводили с помощью автосэмплера в жидкостный хроматограф с фотометрическим детектором.

2.2 Нормально-фазовые сорбенты

При использовании нормально фазовых сорбентов полярные соединения растворяют в неполярном растворителе (диэтиловом эфире, гексане). При этом полярные вещества сорбируются на полярной поверхности сорбента с помощью слабых взаимодействий (диполь-дипольных, водородной связи, пи-пи взаимодействия). Десорбцию производят с помощью растворителей, обладающих большой элюирующей силой. Сначала использовали сорбенты на основе оксида алюминия, силиката магния, кизельгура и силикагеля. Оксид алюминия и силикагель поглощает воду. При этом деактивируются центры связывания по водородной связи, уменьшается удерживание и ухудшается воспроизводимость. Эти сорбенты хранят в эксикаторах и сушат перед использованием. В целом, основные соединения лучше удерживаются на силикагеле, а кислотные – на оксиде алюминия. Сильнополярные соединения, такие как углеводы и азотистые соединения очень прочно связываются с поверхностью данных сорбентов без возможности десорбции. Извлечение таких

соединений возможно с помощью силикагелей, химически модифицированных аминопропильными, цианопропильными, пропилдиольными группами. В биохимическом анализе их применяют в основном для извлечения метаболитов витамина D, жиров, углеводов и фенолов [1, 3, 5]. В частности для определения содержания свободных жирных кислот в плазме крови методом ГХ-МС были использованы сорбционные колонки на основе силикагеля с привитыми аминопропильными группами [15]. Их определение необходимо при диагностике диабета и метаболического синдрома.

Для проведения анализа 50 мкл плазмы разбавляют дистиллированной водой до 500 мкл. Далее добавляют 2,5 мл смеси изопропанола и н-гексана (80:20) с 0,1% содержанием серной кислоты; 1,5 мл н-гексана и 1 мл дистиллированной воды. Перемешивают 15-30 секунд. Органическую фазу, содержащую н-гексан с извлеченными веществами, отделяют и удаляют растворитель под вакуумом. Остаток растворяют в 2 мл хлороформа и пропускают через колонку; далее пропускают 2 мл смеси изопропанола и хлороформа (1:2). При этом свободные жирные кислоты удерживаются, а нейтральные жиры - нет. Сорбированные кислоты элюируют 2 мл смеси диэтилового эфира и уксусной кислоты (99:1). Растворитель удаляют под вакуумом. Далее для хромато-масс-спектрометрического определения получают метиловые эфиры данных кислот. Для этого к остатку добавляют 2 мл метанола, 0,2 мл ацетилхлорида и 0,5 мл н-гексана и перемешивают. После протекания реакции добавляют 5 мл 6% карбоната натрия; перемешивают, центрифугируют в течение 10 минут. Органическую фазу отделяют и 100 мкл данной фазы вводят в хроматограф.

2.3 Ионообменные и хелатные сорбенты

На ионообменных сорбентах сорбция происходит за счет ионных взаимодействий [1, 3, 5, 16]. Благодаря этому полярные вещества могут извлекаться из воды и полярных органических растворителей. Ионообменные группы сильного ионита ионизированы при любом значении pH. Ионизация слабых ионитов зависит от pH. Ионообменники могут быть на основе силикагеля или полимерной матрицы. Сильные катионообменники имеют на поверхности сульфоновые группы, слабые – карбоксильные группы. Их

используют для извлечения основных соединений, например, катехоламинов, пуринов и пиримидинов. Сильные анионообменники содержат группы четвертичных аммониевых оснований, слабые – двухзамещенные аминогруппы или аминопропильные группы. Они находят применение для извлечения кислотных соединений: желчных кислот, циклических нуклеотидов, жирных кислот и витаминов. Слабые иониты используются, когда сродство соединения к сильным ионитам настолько сильно, что они удерживаются без возможности элюирования. Например, слабый катионит с привитыми карбоксильными группами (Strata-X-CW) был применен для определения содержания грибных токсинов в моче [17], слабый ионит с группами четвертичного аммониевого основания - для сорбции сульфониламидов из сыворотки крови [18]. В первом случае 1 мл анализируемой мочи пропускали через картридж, промывали его 1 мл ацетатного буферного раствора (рН 4.5) и высушивали в течение 30 с. Аналиты элюировали с помощью 1 мл 5% муравьиной кислоты в метаноле и 1 мл метанола. Элюаты объединяли, растворитель удаляли потоком азота. Остаток растворяли в 50 мкл подвижной фазы и 5 мкл вводили с помощью автосэмплера в систему ВЭЖХ-МС.

Ионы на сорбенте нейтрализованы с помощью противоионов. Наиболее легко замещаемыми являются ионы лития, водорода и натрия на сильных катионитах и гидроксид-, фторид- и ацетат-ионы – на сильных анионитах. Сильные иониты, на поверхности которых имеются ионы бария и серебра используются для удаления сульфат- и галогенид-ионов. Для проведения извлечения рН раствора доводят до такого значения, при котором целевые вещества находятся в ионной форме, что приводит к тому, что они сорбируются на противоположно заряженных группах ионита. Элюирование после извлечения производят с помощью изменения рН и/или добавления растворов солей, содержащих более удерживаемые ионы. Основные органические соединения протонированы (присутствуют в форме катионов) на 50% при значении рН близком к их рКа. Снижение рН на 2 единицы влечет за собой почти полное протонирование и, как следствие, эффективную сорбцию вещества на катионите. При увеличении рН на 2 единицы выше рКа можно произвести элюирование. Для кислотных соединений все с точностью до

наоборот: сорбцию проводят при рН на 2 единицы выше рКа, а десорбцию – при рН на две единицы ниже рКа [5]. На селективность ионита влияет рН, тип противоионов и ионная сила. Эффективность извлечения зависит от содержания конкурирующих ионов: например, на анионите мешающее влияние могут оказывать цитрат-ионы. К сорбентам на основе сополимеров стирола и дивинилбензола также можно прививать группы, образующие хелатные циклы с ионами. Например, привитые иминодиацетатные группы, содержащие в качестве противоионов ионы натрия, позволяют сорбировать ионы переходных металлов и двухзарядные катионы.

2.4 Сорбенты, основанные на молекулярном распознавании (иммуно-аффинные сорбенты и полимеры с молекулярными отпечатками)

Данные сорбенты крайне селективны по отношению к определенным соединениям, содержащимся в следовых количествах, даже в присутствии высоких концентраций мешающих веществ [19-22]. Иммуно-аффинные сорбенты содержат биологические антитела, ковалентно связанные с силикагелем, стеклянными частицами, агарозой или другими мягкими гелями. Их выдерживают в фосфатных буферных растворах в нейтральной среде. Сорбцию производят при рН от 5 до 8, а десорбцию – при рН от 2 до 4 с использованием смесей фосфатного буферного раствора с метанолом или этанолом. Сорбенты пригодны для многократного использования (до 50 раз) [1, 21]. Антитела способны связывать также близкие к антигену по структуре соединения, которые далее могут быть разделены хроматографически. Данное явление называется кросс-реактивностью антител. Извлечение с помощью иммуно-аффинных сорбентов проводят преимущественно для дальнейшего хроматографического анализа. Данный тип сорбентов применяется для извлечения из биологических жидкостей животных и человека анаболических стероидов, кортикостероидов, дексаметазона, нортестостерона, эстрогенов, наркотических веществ (ЛСД, морфин и его метаболиты) [1, 21].

Полимеры с молекулярными отпечатками изготавливаются с использованием целевого вещества как шаблона [1, 9, 19, 23, 24]. Их производят таким способом: смешивают мономер (метакриловая кислота или 2- и 4-винилпиридин), сшивающий агент и раствор целевого вещества. После

полимеризации при помощи растворителя из полимера удаляется целевое соединение. При этом получается сорбент со структурно комплементарными полостями (молекулярными отпечатками). С помощью данного сорбента можно извлекать целевое вещество и структурно близкие к нему соединения из раствора, при этом нужное соединение попадает в полости, комплементарные его форме. Также с помощью таких сорбентов возможно разделение энантиомеров [1, 25]. Десорбцию производят с помощью органического растворителя, в котором данное соединение имеет высокую растворимость. Полимеры с молекулярными отпечатками стабильны в широком диапазоне pH. Однако, могут возникать трудности с полным удалением молекулы-шаблона из полостей сорбента, что может оказывать мешающее влияние при анализе. Эта проблема может быть решена следующим образом: в качестве шаблона используют соединение структурно близкое к целевому, при этом с помощью сорбента возможно извлечение и целевого соединения; при последующем ВЭЖХ анализе целевое вещество и структурно близкое разделяются на колонке, и определение содержания целевого вещества происходит в отсутствие мешающего влияния, так как сорбент не загрязняется целевым веществом [19, 24]. С помощью полимеров с молекулярными отпечатками в биомедицинских исследованиях проводят извлечение из мочи и сыворотки и плазмы крови лекарственных веществ (фенитоина [26], теофиллина [27], пропранолола [28], 7-гидроксикумарина [29], бупивакаина [30], антибиотиков (ампициллина [31], гатифлоксацина [32]), ацикловира [33], целекоксиба [34], берберина [35] и тизанидина [36]), биологических маркеров (эпинефрина [37], холестерина [38], глутатиона [39]), токсикантов (бисфенолов [40, 41], гидроксипирена [42]), наркотических веществ (тетрагидроксиканнабиола и его метаболитов [43]) и фитоэстрогенов (биоханина А, дайдзеина и генистеина [44]).

В качестве примера рассмотрим методику определения противовирусного лекарственного средства (ацикловира) в моче [33]. В данной работе использовались гибридные полимеры с молекулярными отпечатками, которые сочетают в своей структуре полимерные участки с силанольными группами и группами метакриловой кислоты. Такие сорбенты более устойчивы к механическим воздействиям и органическим растворителям.

Для их приготовления смешивали 3-аминопропилтриэтоксисилан и метакриловую кислоту, после чего нагревали 24 часа при 60 °С. В итоге получался мономер, за счет функциональных групп которого преимущественно происходит сорбция целевого вещества. Далее данный мономер смешивался с веществом-шаблоном (теофиллином) и хлороформом. Емкость с полученной эмульсией помещали в УЗ-ванну до растворения компонентов и оставляли на 1 час при 4 °С. После этого вносили два сшивающих агента, тетраэтоксисилан и этиленгликольдиметакрилат, и радикальный инициатор - 2,2-азобисизобутиронитрил.

Далее при помощи барботирования азота удаляли кислород и проводили полимеризацию при 60 °С в течение суток. После полимеризации полимер измельчали, просеивали и удаляли молекулу-шаблон в аппарате Сокслета в течение суток в смеси метанола и уксусной кислоты (9:1).

Изготовленный полимер помещали в центрифужной пробирке между двумя ограничителями для предотвращения потери сорбента. Сверху добавляли 2 мл пробы мочи, после ее прохождения через сорбент его промывали 1 мл ацетонитрила, а аналит элюировали 1,5 мл смеси метанола и уксусной кислоты (95:5). Растворитель из элюата удаляли под вакуумом, остаток растворяли в подвижной фазе и анализировали с помощью ВЭЖХ с фотометрическим детектированием.

2.5 Сорбенты с ограниченно доступной поверхностью

Они представляют собой частицы силикагеля, в которые не способны проникать высокомолекулярные компоненты матрицы, например, белки. При этом целевые вещества, которые характеризуются низкой молекулярной массой и за счет этого являются малыми по размеру, сорбируются в порах благодаря гидрофобным, ионным или специфическим взаимодействиям [1, 3, 45]. Данный эффект достигается при помощи малого размера пор либо с помощью гидрофильного покрытия на поверхности сорбента. В последнем случае возможно использование полимеров с молекулярными отпечатками с гидрофильной поверхностью, что было продемонстрировано в работе [46], посвященной извлечению 2-метоксиэстрадиола из плазмы крови. Наиболее популярны сорбенты на основе силикагеля, модифицированного бутильными

(C4), октильными (C8) или октадецильными группами (C18). Например, силикагель на основе C18 обеспечивает эффективное отделение белков [47, 48]. Сорбенты такого типа используются контроля содержания кортизола, кортизона, флудрокортизона и преднизолон в плазме крови [49]; гидрокортизона, андростендиона, прогестерона и тестостерона в моче [50], а также при определении содержания бупивакаина [48].

Рассмотрим методику определения стероидных гормонов в пробах мочи, разбавленных дистиллированной водой в 10 раз [50]. В качестве сорбента использовались магнитные частицы, модифицированные додецильными силанольными группами. Синтез проводили следующим образом: к 2 г магнитных наночастиц на основе Fe_3O_4 , приготовленных методом окислительного соосаждения, добавляли 10 мл додецилтриэтоксисилана и 50 мл толуола и нагревали при 120 °С 16 часов. Модифицированные частицы отделяли магнитом, промывали метанолом и сушили. Далее с помощью 0,5 %-ного раствора неионогенного ПАВ (Твин 20) на поверхности сорбента создавали пористую пленку, которая являлась непроницаемой для высокомолекулярных веществ. После этого частицы промывали водой и сушили при 80 °С 12 часов. Покрытие стабильно в диапазоне рН от 2 до 8

Для анализа к 4 мл пробы добавляли хлорид натрия в твердом виде до концентрации 100 мг/л, вносили 20 мг полученных наночастиц и помещали емкость в ультразвуковую ванну на 10 минут. Частицы собирали магнитом, промывали 500 мкл воды и снова отделяли тем же способом. Затем к частицам с сорбированными аналитами добавляли 150 мкл метанола и помещали в ультразвуковую ванну на 10 минут. После отделения частиц магнитом элюат анализировали с помощью ВЭЖХ с фотометрическим детектированием. Объем вводимой пробы - 20 мкл.

2.6 Сорбенты смешанного типа

Сорбенты смешанного типа включают как неполярные (C18, к примеру), так и ионообменные функциональные группы. Их комбинация подбирается таким образом, чтобы целевое вещество сорбировалось сразу по двум механизмам. Данный прием особенно полезен при необходимости извлечения гидрофобных соединений, имеющих группы, способные к ионизации. Сорбенты

смешанного типа все активнее используются для извлечения лекарственных веществ [1, 3, 45, 51].

Более 80% лекарственных веществ содержат азот, а значит, могут быть протонированы. Это и дает возможность одновременного осуществления как катионообменного, так и обращенно-фазового механизма сорбции. Рассмотрим подробнее: сначала доводят рН до нейтрального так, чтобы целевые соединения присутствовали нейтральной или анионной форме; проводят сорбцию – она при этом осуществляется за счет обращенно-фазового механизма; потом – промывают сорбент буферным раствором или водой – избавляются от мешающего влияния полярных соединений; далее – подкисляют, целевое соединение протонируется и прочно связывается с катионообменными группами; промывают сорбент метанолом – избавляются от мешающего влияния гидрофобных соединений; наконец – создают щелочную среду, происходит десорбция и осуществляется анализ.

Обращенно-фазовый силикагель с привитыми углеводородными цепочками может выступать в качестве сорбента смешанного типа (углеводородные цепочки – обращенно-фазовый механизм; остаточные силанольные группы – связывание за счет образования водородных связей) [3]. Однако, появились новые типы сорбентов, позволяющие проводить сорбцию из крови, плазмы крови и мочи. Наиболее популярны сорбенты на основе силикагеля с привитыми алкильными цепочками и ионообменными группами. Также, существуют сорбенты, изготовленные из сополимера дивинилбензола и N-винилпирролидона с привитыми сильными ионообменными группами.

Также возможно смешивание частиц сорбентов с различными свойствами либо использование картриджей, в которых слоями расположены сорбенты разного типа, для более полного очищения пробы от мешающих компонентов [45, 52].

Такие сорбенты применяются для выделения лекарственных препаратов (антидепрессанты, диклофенак, антипсихотические и противосудорожные препараты), наркотических веществ (амфетамины, кокаин, опиаты, фенциклидин, тетрагидроканнабиол, экстази, кодеин, метадон, морфин и их метаболиты), ядов, токсикантов (малеиновая кислота), нейромедиаторов из

мочи, крови, плазмы крови для последующего определения их содержания [1, 3, 4, 53-61].

Малеиновая кислота может попадать в организм из продуктов питания и способна наносить вред здоровью, поэтому была разработана методика ее определения в пробах мочи с целью получения данных о ее содержании в организме [60]. Была использована колонка Stability BS-C17 со смешанным сорбентом, позволяющим проводить сорбцию по двум механизмам, анионообменному и обращенно-фазовому, благодаря группам четвертичного аммониевого основания, расположенными в качестве спейсера между гидрофобными участками углеводородных радикалов C₃ и C₁₄.

Перед анализом к пробе мочи или сыворотки крови добавляют ацетонитрил для осаждения белков, центрифугируют, жидкую фазу отбирают для анализа. Далее с помощью автоматизированной системы в удерживающую спираль отбирают 10 мл пробы. Ее прокачивают с помощью первого насоса в сорбционную колонку смесью 100 мМ ацетата аммония, ацетонитрила и воды. После этого кран переключается и с помощью второго насоса через сорбционную колонку пропускается смесь 100 мМ ацетата аммония, ацетонитрила и воды, но уже в другом соотношении для десорбции. После десорбции поток направляется в аналитическую колонку для ВЭЖХ анализа с масс-спектрометрическим детектированием.

2.7 Другие сорбенты

Соединения с вицинальными диольными группами (катехоламины, углеводы, нуклеотиды) могут быть извлечены при помощи сорбентов на основе силикагеля, модифицированного фенилбороновой кислотой [45].

3. Выбор сорбента и условий сорбции

При выборе сорбента следует учитывать следующие факторы:

- химические свойства целевого соединения (наличие или отсутствие каких-либо функциональных групп; способность к переходу в ионную форму; растворимость в воде и органических растворителях);
- природа матрицы (ее pH, ионная сила; ее тип – водная или органическая);
- природа возможных мешающих компонентов;

- концентрация целевого соединения в пробе;
- чувствительность и селективность инструментального метода анализа, используемого для детектирования целевого соединения;
- требуемая степень концентрирования и очищения.

Важной характеристикой сорбента является его сорбционная емкость – максимальное количество вещества, которое может удерживаться на сорбенте в конкретных условиях. Если при извлечении происходит сорбция также других соединений, присутствующих в пробе, то сорбционная емкость по отношению к целевому веществу снижается.

Тип сорбента должен быть выбран таким образом, чтобы на нем происходило удерживание целевого вещества при отсутствии сорбции мешающих компонентов. Выбор диктуется полярностью целевого вещества. При анализе биологических объектов в подавляющем большинстве случаев матрица является водной. Если целевой компонент способен к ионизации, то оправдано использование ионообменных сорбентов. Если же аналит содержит сильнополярные функциональные группы в неионизированной форме (амино-, карбокси-, гидроксильные и сульфгидрильные группы), то его извлечение можно провести с помощью полярных сорбентов. В случае слабополярных и неполярных веществ находят применение обращенно-фазовые сорбенты. Нормально-фазовые сорбенты используют для извлечения полярных незаряженных веществ из среды органического растворителя.

Количество сорбента должно быть таким, чтобы обеспечивать эффективное извлечение исходного соединения. При этом при увеличении количества сорбента требуется больший объем органического растворителя для элюирования, что приводит к разбавлению, поэтому необходимо стремиться к использованию как можно меньшего количества сорбента. Таким образом, находят некий компромисс между эффективностью извлечения и количеством элюирующего растворителя. Оптимальное количество сорбента отвечает наибольшему аналитическому сигналу.

Целевое вещество должно иметь большее сродство к элюирующему растворителю, чем к поверхности сорбента, чтобы обеспечивалась эффективная десорбция. Смеси органических растворителей часто показывают лучшие

результаты. Элюирующий растворитель должен быть совместим с инструментальным методом анализа: для ВЭЖХ используется метанол или ацетонитрил; для газовой хроматографии – этилацетат или хлороформ. Объем растворителя должен в 2-5 раз превышать объем, требуемый для полного заполнения трещин и пор сорбента. Для частиц размером 40-60 мкм он составляет 120 мкл растворителя на 100 мг сорбента [1, 62]. Для выбора элюирующего растворителя полезным является такой показатель, как элюирующая сила. Данный параметр показывает, насколько эффективно растворитель десорбирует вещество с данного сорбента. Из-за сорбции воды на силикагеле к неполярному элюирующему растворителю добавляют полярный, смешивающийся с ним растворитель, служащий для смачивания сорбента. Для удаления воды в случае использования сильно неполярного элюирующего растворителя (например, н-гексана) можно применить добавление этилацетата, который замещает воду в порах сорбента и затем испаряется вместе с ней, либо же высушить сорбент под вакуумом [3]. В некоторых случаях к элюирующему растворителю добавляют реагент для одновременного проведения дериватизации целевого вещества.

4. Варианты технической реализации процедуры сорбции

4.1 Классические способы

Существует несколько вариантов реализации процедуры сорбции (рис. 3, [1, 3, 16, 45, 63, 64]).

Наиболее распространенным вариантом является проведение сорбции с помощью полипропиленовых или полиэтиленовых шприцев объемом от 1 до 25 мл. Сорбент с размером частиц 40-50 мкм и размером пор обычно равным 6 нм (от 0,1 до 1 г) помещается между двумя слоями пористых полиэтиленовых дисков толщиной 20 мкм. Стеклянные или тефлоновые шприцы с дисками из нержавеющей стали используются во избежание загрязнения пробы пластификатором, который может оказывать мешающее влияние при газохроматографическом определении. Пробы и растворители могут проходить сквозь поры сорбента под действием сил гравитации или под вакуумом.

Колонки и картриджи с сорбентами могут забиваться частицами и компонентами матрицы, что приводит к изменению плотности сорбента.

Наличие каналов в слое сорбента может приводить к увеличению скорости протекания растворителя, что приводит к снижению удерживания целевого вещества, что приводит к низким степеням извлечения и плохой воспроизводимости [63, 64]. Проблемы такого типа решаются с применением дисковых сорбентов.

Мембраны на основе частиц сорбента размером 8-12 мкм, связанных волокнами инертного политетрафторэтилена, представляют собой плоские диски диаметром от 4 до 96 мм и толщиной 0,5 мм. Такие мембраны на 90% состоят из частиц сорбента. Они не требуют больших объемов элюирующих растворителей и позволяют проводить более эффективное концентрирование.

Жесткие диски на основе частиц химически модифицированного силикагеля (10-30 мкм) в стекловолокне доступны в большом диапазоне размеров и обеспечивают большую скорость потока по сравнению с политетрафторэтиленовыми мембранами.

Диски «Speeddisks» состоят из двух стекловолоконных фильтров с расположенными между ними частицами сорбента размером 10 мкм.

Диски «Memsep» представляют собой сжатые в единое целое целлюлозные диски с порами, модифицированными ионообменными группами.

Диски являются тонкими и содержат частицы с большой удельной поверхностью для достижения эффективности. Благодаря малой толщине дисков, скорость протекания жидкости через них выше, чем для обычных набивных колонок. Так как скорость протекания пропорциональна площади диска, она может быть увеличена применением большего по размеру диска. Использование сорбентов в форме дисков уменьшает риск забивания пор сорбента. Также они обладают большей механической прочностью, что предотвращает образование каналов. Так как количество сорбента, требуемое для изготовления диска, меньше, необходимый объем элюирующего растворителя невелик по сравнению с колоночным вариантом, что позволяет добиться большей степени концентрирования [63].

Планшеты с 96 экстракционными ячейками позволяют значительно повысить производительность анализа [45, 65, 66]. В каждой ячейке находится сорбент в виде слоя или диска. Такая конструкция также позволяет проводить

извлечение под вакуумом и центрифугирование и автоматизировать анализ. Наибольшую распространенность они получили в фармацевтическом анализе [66]. Также подобные планшеты были применены для извлечения сульфатов эстрогена из мочи [67].

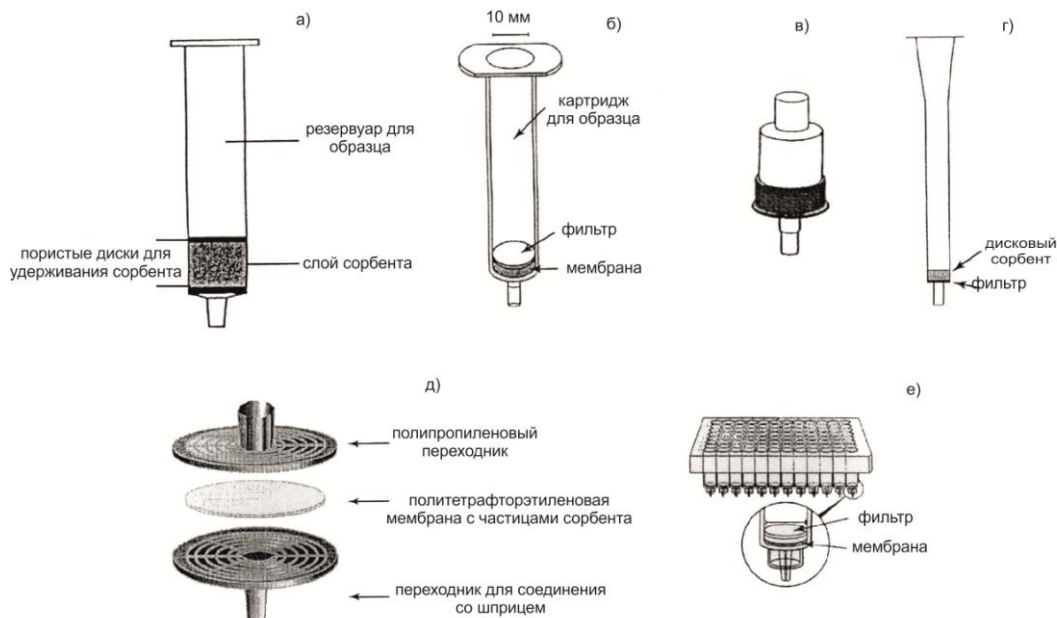


Рис. 3 Технические решения, используемые для проведения сорбции: а) шприц со слоем сорбента; б) шприц с дисковым сорбентом; в) картридж с упакованным сорбентом, г) полимерным наконечник пипетки с дисковым сорбентом, д) дисковый сорбент с переходниками для соединения со шприцем, е) планшет с 96 экстракционными ячейками, в каждой из которых расположен сорбент.

4.2 Миниатюризация процедуры извлечения

В последнее время развитие получил новый метод реализации процедуры сорбции на твердом сорбенте, а именно твердофазная микроэкстракция (ТФМЭ), в различных областях анализа, включая биохимический. Данный метод пробоподготовки является простым и дешевым, совместим с газовой и жидкостной хроматографией, капиллярным электрофорезом, не требует использования органических растворителей и автоматизируем. Суть состоит в следующем: в шприцеподобном устройстве вместо иглы используется тонкий стержень из плавленого кварцевого стекловолокна, на которое нанесено покрытие из полимерного материала, выступающего в роли сорбента (рис. 4, [68]). Для проведения сорбции стержень выдвигается при помощи плунжера и

опускается в раствор пробы (direct-immersion mode) либо размещается в пространстве над ним (headspace mode). После достижения равновесия или через строго определенное время, стержень втягивается обратно, после чего осуществляется ввод в прибор: в случае газовой хроматографии используют термическую десорбцию в испарителе хроматографа, в случае ВЭЖХ и капиллярного электрофореза проводят элюирование вещества с сорбента органическим растворителем, совместимым с данными методами анализа.

Для автоматизации твердофазной экстракции в случае жидкостной хроматографии используется схема, представленная на рис. 5. Извлечение протекает в капилляре, представляющем собой часть капиллярной газохроматографической колонки. Капилляр многократно заполняется небольшим объемом образца (25 мкл) и опорожняется с помощью шприцевого насоса, в процессе чего происходит сорбция целевых веществ на сорбенте, нанесенном на стенки капилляра. При этом шестиходовой кран-переключатель находится в положении «ввод». Затем он переключается в положение «заполнение», в капилляр подается элюирующий растворитель (например, метанол) и полученный элюат направляется в удерживающую петлю. Происходит переключение крана в положение «ввод» и прокачивание элюата потоком подвижной фазы в хроматографическую колонку, в которой происходит разделение и детектирование целевых соединений. Также твердофазная микроэкстракция была успешно совмещена с капиллярным электрофорезом [69, 70] и сверхкритической флюидной хроматографией [71].

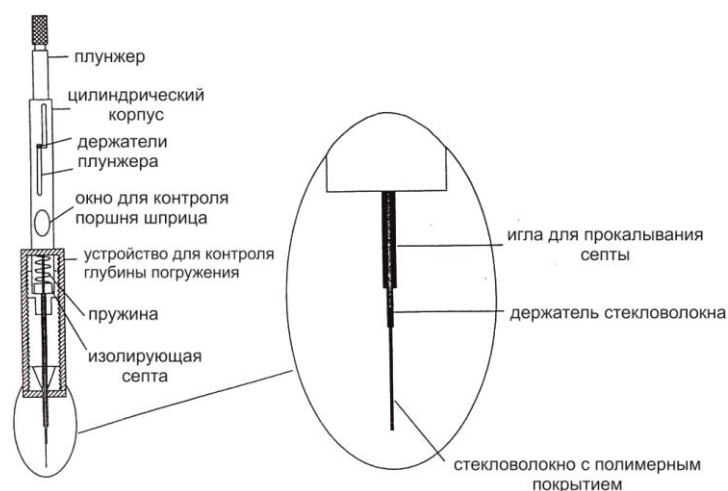


Рис.4 Схема шприцеподобного устройства для проведения твердофазной микроэкстракции [68]

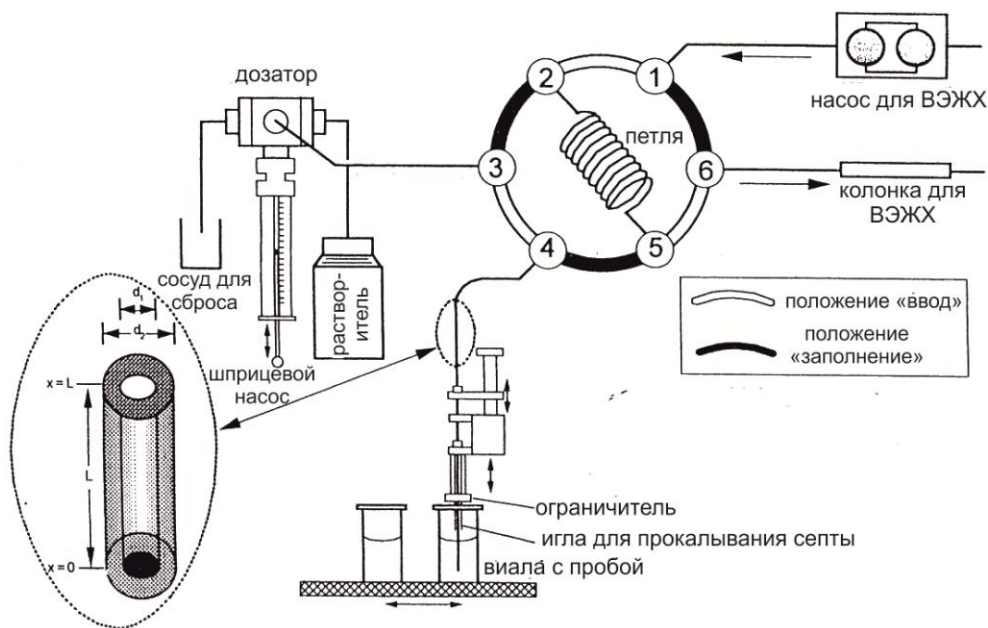


Рис.5 Схема автоматизированной установки для совмещения твердофазной микроэкстракции с ВЭЖХ [72]

4.2.1 Способы извлечения в ТФМЭ

Существуют два способа извлечения в ТФМЭ: прямой (классический вариант) и паро-твердофазный. Выбор того или иного способа зависит от природы матрицы, летучести целевого соединения и средства анализа к матрице. Вещества средней летучести из относительно чистых матриц могут быть извлечены прямым способом. В этом случае скорость массопереноса зависит в основном от скорости диффузии вещества к сорбенту из жидкой фазы. На деле тонкий диффузионный слой жидкости образуется вокруг сорбента и препятствует прямому попаданию вещества в поры сорбента. Диффузионный слой стационарен и устойчив даже при сильном перемешивании. Для более загрязненных образцов стекловолоконно покрывается мембраной для защиты [68].

Паро-твердофазный способ используется для летучих соединений [73]. Его достоинствами являются большая чистота экстрактов, большая селективность и более долгий срок службы сорбентов. В экстракционный процесс вовлекаются три фазы – сорбент, газовая и водная фазы – поэтому эффективность экстракции определяется сродством аналитов к каждой из них. Последовательность операций следующая: септа закрытого флакона с пробой протыкается иглой с расположенным внутри стекловолоконном, покрытым сорбентом; затем стекловолоконный стержень выдвигается в газовую фазу над

пробой и выдерживается в течение некоторого времени; после этого стержень вытягивается обратно, игла вытаскивается, и проводят анализ. Флакон обычно нагревают до определенной температуры для насыщения газовой фазы определяемым веществом.

4.2.2 Сорбенты, используемые в ТФМЭ

Химические и физические свойства сорбента играют решающую роль в сорбционных процессах. В основном используются полимерные покрытия на основе полидиметилсилоксана (ПДМС) (7, 30 и 100 мкм толщиной), полиакрилата (85 мкм), полидиметилсилоксана /дивинилбензола (60 и 65 мкм), карбоксена/полидиметилсилоксана (75 мкм), карбовакса/дивинилбензола (65 мкм) и карбовакса/полимерной смолы (50 мкм). Карбоксен представляет собой пористый углеродный сорбент, а карбовакс – полиэтиленгликоль. Выбор сорбента основывается на общеизвестном принципе «подобное растворяет подобное». Неполлярные вещества имеют довольно большое сродство к долговечным полидиметилсилоксановым сорбентам. Полиакрилат является более полярным и используется для относительно полярных соединений. Смешанные сорбенты применяются для извлечения летучих соединений, характеризуются более высокой по сравнению с ПДМС эффективностью экстракции, но менее долговечны. Толщина полимерного покрытия подбирается в соответствии с требуемой степенью извлечения, необходимым временем экстракции и природой определяемого вещества. При использовании более тонких покрытий равновесие достигается быстрее. Выбор покрытия также диктуется молекулярной массой вещества: для веществ с низкой молекулярной массой высокая эффективность экстракции может быть достигнута при сравнительно тонком покрытии.

Недавно для ТФМЭ были предложены новые покрытия на основе частиц оксида кремния, модифицированных октильными и октадецильными группами [74, 75] или графитированной сажей [76]. Также с применением золь-гель метода был получен ПДМС, устойчивый до 320 °С, что является преимуществом при извлечении менее летучих веществ.

4.2.3 Влияние условий сорбции

Высокая эффективность экстракции может быть достигнута путем оптимизации условий извлечения: значения рН, солесодержания и объема образца, а также температуры и времени извлечения. Солесодержание и рН оказывают такое же влияние на ТФМЭ, как и в случае твердофазной и жидкостной экстракции. Добавление солей к образцу (NaCl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Na_2CO_3) может повысить степень извлечения за счет высаливающего эффекта, который состоит в том, что ионы солей гидратируются, уменьшая тем самым диссоциацию целевого вещества за счет снижения доступности молекул воды. В случае, если соединение может быть протонировано, установление определенного значения рН может увеличить степень извлечения. Обычно добиваются значения рН, при котором целевое вещество находится в нейтральной форме, при этом дополнительный положительный эффект дает добавление солей. Необходимо учитывать, что при прямом способе извлечения значения рН должны находиться в диапазоне от 2 до 10 во избежание деструкции слоя сорбента. Объем пробы выбирается в соответствии со значением коэффициента распределения. Чем больше коэффициент распределения, тем при большем объеме пробы зависимость эффективности экстракции от объема пробы будет выходить на плато. Дальнейшее увеличение объема не приводит к увеличению степени извлечения [77, 78]. При паротвердофазном способе экстракции объем газовой фазы над образцом должен быть минимален.

Перемешивание образца используется для ускорения наступления равновесия. Оно может осуществляться с помощью магнитной мешалки, ультразвуковой ванны, вибрации стекловолокна или проточных ячеек. Слишком сильное перемешивание может повредить полимерному покрытию и должно использоваться с осторожностью.

Возрастание температуры может повысить эффективность экстракции в неравновесных условиях, однако, оно также может снизить коэффициент распределения. В большинстве случаев время извлечения составляет от 1 до 60 минут. Время установления равновесия зависит от скорости массопереноса между жидким образцом и сорбционным полимерным покрытием, которая в

свою очередь определяется его толщиной, температурой, типом перемешивания и т.д.

Рассмотрим влияние различных факторов на эффективность извлечения на примере экстракции бензодиазепинов, психоактивных веществ со снотворным, седативным и противосудорожным эффектами, из проб мочи с последующим ВЭЖХ определением [79]. На рис.6а представлена зависимость площади хроматографического пика от времени экстракции. Видно, что эффективность экстракции постепенно увеличивается, достигая постоянных значений. Повышение температуры образца приводит к получению больших площадей пиков за счет увеличения скорости массопереноса (рис. 6б). Однако при температурах более 60 °С происходит термическое разложение бензодиазепинов и уменьшение коэффициентов распределения из-за чего происходит уменьшение аналитического сигнала. Положительное влияние высаливающего эффекта наглядно продемонстрировано на рис. 6в. Наибольшая эффективность экстракции для большинства бензодиазепинов достигается при нейтральном значении рН, так как в этих условиях аналиты находятся в неионизированной форме (рис. 6г).

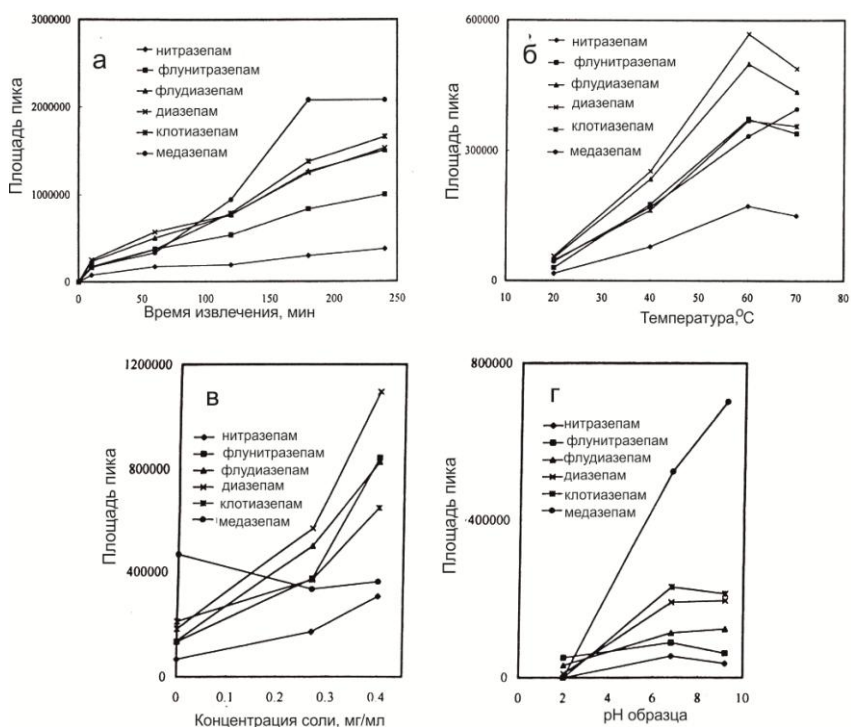


Рис. 6 Влияние различных факторов на эффективность микроэкстракции бензодиазепинов из проб мочи: а) времени извлечения, б) температуры, в) концентрации соли, г) рН [79]

4.2.4 Применение ТФМЭ в биохимическом анализе

ТФМЭ получила широкое распространение в биохимическом анализе после того как была совмещена с жидкостной хроматографией и капиллярным электрофорезом. Данные методы позволяют определять содержание белков, полярных алкалоидов, лекарственных веществ и ПАВов, что невозможно в газовой хроматографии. Рассмотрим основные группы веществ, извлекаемые из различных матриц с помощью ТФМЭ.

4.2.4.1 Токсиканты

ТФМЭ активно применяется в токсикологическом анализе. Данный метод был применен для извлечения этанола и хлористого метилена из проб мочи, ряда алканов из образцов желудочного сока [80]. Широкое использование ТФМЭ получила при определении содержания низкомолекулярных спиртов в биологических матрицах, например, этанола в моче и крови водителей транспортных средств [81-84]. Эффективность экстракции на полярном карбоваксе/дивинилбензоле может быть повышена добавлением к пробе сульфата аммония. Также для извлечения этанола недавно был использован сорбент на основе карбоксена/полидиметилсилоксана [82].

ТФМЭ нашла применение и при анализе ядовитых веществ, таких как малатион или цианид-ион. Для повышения степени извлечения малатиона из крови в паро-твердофазном варианте к пробе добавляли сульфат аммония и серную кислоту. Цианид-ион является одним из самых сильно- и быстродействующих ядов и плохо извлекается из проб крови. Однако ТФМЭ в паро-твердофазном варианте позволяет определять его содержание с максимальной чувствительностью и хорошей точностью [85].

Нереистоксин представляет собой основу для производства широко используемых пестицидов. Была предложена методика определения содержания нереистоксина и его метаболитов в плазме крови с ТФМЭ паро-твердофазным способом с последующим газохроматографическим определением [86]. Такой же метод был применен для определения содержания уретановых и органофосфорных пестицидов в моче и крови [87-89].

Пентахлорфенол широко применяется в качестве консерванта, биоцида и пестицида, потенциально канцерогенен. Была разработана методика

газохроматографического определения содержания пяти хлорфенолов в моче заводских рабочих, при этом в качестве сорбента выступало полиакрилатное полимерное покрытие [90-92]. Также извлечение более 20 видов хлороорганических соединений было осуществлено с помощью ТФМЭ: наряду с полярными соединениями, такими как три-, тетра- и пентахлорфенолы, извлекались менее полярные – гексахлорбензол, альфа-, бета- и гамма-гексахлорциклогексаны, дихлордифенилтрихлорэтан и их метаболиты, а также полихлорированные бифенилы [93]. По сравнению с ранее используемыми методиками описанные выше обладают рядом преимуществ: высокая экспрессность, воспроизводимость, низкая стоимость и отсутствие необходимости проведения процедуры дериватизации.

Полициклические ароматические углеводороды являются хорошо изученными канцерогенами. Для исследования уровня попадания в человеческий организм данных токсикантов необходимо измерить концентрацию их метаболитов в биологических жидкостях. Содержание нафталинов, фенантронов и пиренов было определено в моче курильщиков с помощью извлечения данных веществ на полиакрилатное покрытие с одновременной дериватизацией с помощью бис(триэтилсил)трифторацетамида или гидролизом и последующего анализа с использованием газовой хроматографии [94]. Процедура дериватизации проводится для повышения летучести целевого вещества. В данном случае дериватизация протекает на самом полимерном покрытии (*in-situ*): после извлечения прямым способом, сорбент помещается на определенное время над раствором дериватирующего агента.

Для мониторинга соединений ртути, попадающих в организм через пищу, в большинстве случаев проводят дериватизацию с боратными реагентами. Была разработана методика определения содержания метилртути в биологических образцах методом атомно-абсорбционной спектроскопии с предварительной дериватизацией с помощью тетрагидробората калия в паро-твердофазном варианте ТФМЭ [95]. Вместо полимерного покрытия, показавшего неудовлетворительные результаты, в качестве сорбента использовался силикагель, предварительно вымоченный в плавиковой кислоте в течение 3,5

часов с последующим нагреванием до 200 °С в течение 3 часов. Также для дериватизации при определении содержания метилртути и ртути, присутствующей в моче, а также соединений свинца и олова, был использован другой реагент – тетраэтилборат натрия [96, 97].

4.2.4.2 Вещества с наркотическим действием

4.2.4.2.1 Амфетамины

Контроль содержания амфетаминов и их метаболитов необходим для проведения токсикологических и медицинских исследований, а также при расследовании случаев нарушения законодательства в сфере оборота наркотических средств. Амфетамины представляют собой среднелетучие соединения, поэтому возможно их извлечение паро-твердофазным способом при 60 °С [98-103].

Недавно был представлен метод определения содержания амфетаминов с ТФМЭ извлечением паро-твердофазным способом из проб волос [104]. При этом пробоотбор представляет простую процедуру с возможностью неограниченного взятия материала. Более того, наркотические вещества пребывают в волосяном покрове даже спустя месяцы после потребления. Пробу волос подщелачивают с помощью раствора гидроксида натрия и нагревают до 55 °С. Сорбция протекает в течение 20 минут.

Иногда для повышения эффективности экстракции получают уретановые производные амфетаминов. Такой подход был недавно применен для автоматизированного определения содержания метилендиоксиметамфетамина («экстази») и производных амфетамина в моче [105].

ТФМЭ трех амфетаминов и четырех психостимуляторов прямым способом была оптимизирована для анализа проб мочи [106]. Было обнаружено, что покрытие на основе ПДМС имеет большее сродство к целевым соединениям, чем полиакрилатное. Для получения воспроизводимых результатов ионная сила пробы должна быть постоянна. Добавлением хлорида натрия или гидроксида калия (до рН 10) можно добиться повышения эффективности экстракции в 2-62 раза в зависимости от прочих условий. В другой работе [107] извлечение проводили даже в более жестких условиях: рН доводили до 12 10М раствором гидроксида натрия и опускали сорбент в пробу

на 20 минут. Перед введением стекловолокна в испаритель газового хроматографа сорбент обмывали боратным буферным раствором (рН 12).

4.2.4.2.2 Бензодиазепины

В первой статье, опубликованной по данной теме, описывалась методика определения содержания 13 бензодиазепинов в моче с твердофазной микроэкстракцией прямым способом [108]. Недавно та же научная группа представила модификацию метода, в которой перед извлечением проводился гидролиз бензодиазепином с образованием бензофенонов [109]. Также для увеличения эффективности извлечения возможно смачивание полиакрилатного волокна *n*-октанолом перед введением сорбента в пробу крови [110]. Компоненты биологической матрицы могут снижать эффективность экстракции в сравнении с модельными водными растворами, что наблюдалось при изучении сорбции оксазепам и лоразепам.

Для совместного определения бензодиазепинов и барбитуратов используется ТФМЭ с последующим анализом методами ВЭЖХ и мицеллярной электрокинетической хроматографии [79, 111-114]. Использование микро- и полумикроколонок позволяет снизить расход органических растворителей. При анализе проб мочи проводят насыщение их солями для создания постоянной ионной силы, так как солесодержание может меняться от образца к образцу, внося погрешность в результат определения. В основном используются три типа покрытий: полиакрилатное; на основе карбовакса/полимерной смолы; ПДМС, созданный по золь-гель методу и модифицированный ундецильными углеводородными группами. Благодаря золь-гель методу повышается площадь поверхности и термическая стабильность по сравнению с обычным ПДМС покрытием. Также такие покрытия содержат на поверхности свободные гидроксильные группы и имеют большее сродство к полярным соединениям. Наибольшая эффективность извлечения наблюдается именно с использованием данных покрытий. Однако наибольшая скорость достижения равновесия достигается с применением покрытия на основе карбовакса/полимерной смолы.

4.2.4.2.3 Барбитураты

Для извлечения барбитуратов лучшие результаты дает полярное покрытие на основе карбовакса/дивинилбензола [115]. Добавление солей

повышает эффективность экстракции. Во избежание эффекта памяти после термической десорбции внутри испарителя газового хроматографа полимерное покрытие обрабатывают водным раствором метанола.

ТФМЭ барбитуратов была совмещена с капиллярным электрофорезом [113, 116]. Пластифицированная мембрана из ПВХ была нанесена на тонкий стержень из нержавеющей стали диаметром 1,1 мм вместо стекловолокна. Процедура заключалась в следующем: 50 мкл пробы было помещено в тонкий тефлоновый сосуд диаметром 1,5 мм, затем туда был опущен стержень с сорбентом на 4 минуты, после чего в тефлоновом сосуде диаметром 1,2 мм, заполненном 5 мкл элюирующего растворителя, происходила десорбция. Элюат вводился в капилляр для электрофоретического разделения и детектирования исследуемых барбитуратов. Данный метод является селективным, так как не происходит сорбция основных и нейтральных соединений. Пористый сорбент на основе тризамещенных эфиров ортофосфорной кислоты позволяет проводить экстракцию с большей эффективностью.

4.2.4.2.4 Другие наркотические вещества

Одним из первых применений ТФМЭ в биохимическом анализе было ее использование для извлечения метадона из мочи [117]. рН пробы был доведен до 7,7, в качестве покрытия использовался ПДМС. Анализ наркотических веществ (кокаин, героин) и продуктов их разложения в газовой фазе может быть полезен при проверке закрытых пространств (контейнеров грузовиков) на предмет присутствия данных веществ в этих пространствах. Наиболее распространенными психоактивными веществами среди потребляемых являются каннабиониды, поэтому определение их содержания является актуальной задачей. Иммунологический анализ и газовая хроматография используется наиболее широко в данной области. Были разработаны методики их извлечения из слюны [118] и волос [119] с помощью ТФМЭ. Слюна является привлекательным объектом исследования, так как содержит малые количества белков и солей и позволяет проводить неинвазивный пробоотбор. Перед анализом пробу подкисляют. Было исследовано пять коммерчески доступных покрытий, все из которых эффективно извлекали каннабиониды. Однако при использовании покрытия на основе карбовакса/дивинилбензола наблюдался

эффект памяти из-за плохой десорбции липофильных каннабиоидов. Три покрытия на основе ПДМС были выбраны для последующих экспериментов также из-за того, что стабильны при высоких температурах десорбции (270 °С). Добавление уксусной кислоты к пробе увеличивает эффективность экстракции.

Алкилнитриты вошли в употребление благодаря своим афродизиатическим свойствам. Их извлечение проводят в паро-твердофазном варианте. Полиакрилатные покрытия более эффективны для извлечения полярных алкилнитритов, чем покрытия на основе ПДМС, однако требуют большего времени для установления равновесия. В таких условиях проводилось извлечение н-бутилнитрита из крови [120].

4.2.4.3 Вещества, исследуемые в клинической биохимии

ТФМЭ имеет ряд преимуществ перед другими методами в клинической биохимии [121-123].

С помощью ТФМЭ, совмещенной с ГХ-МС, был исследован метаболизм лекарственного вещества - 2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксила - в кератиноцитах [124]. В качестве сорбента использовался ПДМС (7 мкм толщиной). По сравнению с жидкостной и твердофазной экстракцией были достигнуты более высокие степень извлечения и точность.

Бензофенон входит в состав кремов от загара [125]. Это вещество может впитываться через кожу, поэтому имеется необходимость изучения его накопления в организме, метаболизма и выведения. ТФМЭ бензофенона была реализована для анализа проб мочи и природной воды.

Для определения содержания путресцина и кадаверина было разработано устройство для накопления аналитов с использованием электрохимической реакции [126]. В качестве рабочего электрода выступал стержень из нержавеющей стали, покрытый слоем графита, в качестве электрода сравнения – хлоридсеребрянный электрод. К пробе был добавлен боратный буферный раствор, после чего были погружены электроды. После наложения внешнего напряжения происходило электрохимическое восстановление протонов, что приводило к росту pH. При этом целевые вещества переходили в депротонированную форму и сорбировались на графитовом сорбенте.

Определение содержания выдыхаемых веществ является привлекательным в клиническом и токсикологическом анализе. При помощи ГХ-МС (газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием) было обнаружено, что в данном объекте анализа содержится более 100 легколетучих веществ. Применение ТФМЭ позволило избежать недостатков методов, используемых ранее, а именно: большой длительности процедуры, использования сложного оборудования и мешающего влияния водных паров [127]. При анализе стержень с полимерным покрытием устанавливается прямо во рту испытуемого. Было исследована сорбция этанола, ацетона и изопрена из стандартных образцов с относительной влажностью 99%. Было найдено, что требуемое время анализа составляет от 1 до 3 минут, при этом обеспечиваются низкие пределы обнаружения – нмоль/л.

Паро-твердофазная ТФМЭ была применена для определения содержания моноциклических ароматических аминов в биологических жидкостях [128, 129]. При этом эффективность извлечения падает с увеличением сложности матрицы – при анализе крови она снизилась, а при анализе мочи – была близка к той, что наблюдалась при анализе водных растворов. Методика показала отличную воспроизводимость и низкие пределы обнаружения при биомониторинге данных аминов, являющихся токсичными для человека, в различных матрицах – моче, крови и грудном молоке. Сорбция триэтиламина на карбоваксе/ПДМС была использована для определения его содержания в моче. Методика оказалась полезной для идентификации триметиламинурии у пациентов [130].

Для диагностики некоторых заболеваний требуется определение органических кислот, содержащихся в моче. В подавляющем большинстве случаев требуется дериватизация, поскольку эти кислоты сильно разнятся по полярности и структуре. Существующие аналитические процедуры трудоемки и требуют использования органических растворителей. На основе прямого варианта ТФМЭ на полиакрилатном покрытии была реализована возможность определения 29 органических кислот в моче более простым путем и в отсутствие мешающего влияния [131]. Процедура дериватизации с тетрафторборатом занимала всего 15 минут и проводилась в водной среде

пробы. Образовавшиеся эфиры сорбировались на покрытии, которое затем вводилось в испаритель газового хроматографа для анализа.

Определение содержания картинина, индикатора метаболизма жирных кислот, является важным с клинической точки зрения. ТФМЭ на карбоваксе была использована для извлечения ацилкартининов из мочи [132]. Однако гидрофобная природа аналита вызывала малое сродство аналита к покрытию, что значительно удлиняло время анализа. Тем не менее, методика была успешно применена для анализа мочи пациентов, страдающих заболеваниями сердечнососудистой системы.

Полиакрилатное покрытие толщиной 85 мкм было использовано для сорбции гомоцистеина, цистеина и метионина после алкилформиатной дериватизации [133]. Также была разработана методика определения содержания метилксантинов в крови и моче в варианте ТФМЭ после употребления испытуемыми напитков - какао и кофе [134, 135].

Таблица. Основные типы сорбентов и примеры их применения [136]

Механизм сорбции	Сорбенты	Типы сорбтивов	Матрица	Используемые растворители	Примеры сорбтивов/область применения
Обращенно-фазовый	Силикагели, модифицированные C ₁₈ , C ₈ , C ₆ , C ₄ , C ₂ , фенильными и циклогексильными группами	Соединения с неполярными функциональным и группами (например, алкильными, ароматическими)	Полярные среды: вода, буферы, биологические жидкости	Метанол, ацетонитрил, этилацетат, хлороформ, подкисленный метанол, гексан, хлористый метилен	Лекарственные вещества, пестициды, белки, стероиды, жирорастворимые витамины,
	Графитированные сажи				Фенолы и пестициды; метаболиты лекарственных веществ
	Сополимеры стирола/N-винилпирролидона и дивинилбензола (Waters)				Лекарственные вещества в крови и моче
Нормально-фазовый	Силикагели, модифицированные цианопропильными, 2,3-дигидроксипропокси-пропильными, аминопропильными или аминогруппами Силикагель, кизельгур Оксид алюминия Флорисил (силикат магния)	Соединения с полярными группами (например, гидроксид- и аминогруппы) и гетероатомами (S, O, N)	Неполярные среды: гексан, масла, хлороформ, жиры	Метанол, изопропанол, ацетон, хлористый метилен, этилацетат	Метаболиты витамина D, жиры, углеводы, фенолы

Анионообменный	<p>Сильные аниониты: сорбенты, содержащие на поверхности группы четвертичных аммониевых оснований</p> <p>Слабые аниониты: сорбенты, содержащие на поверхности аминопропильные, амино-, диэтиламинопропильные, группы; полиэтиленимины (Waters, JT Baker)</p>	Кислоты (карбоновые,сульфо-, и фосфорные кислоты)	Вода, щелочные буферные растворы с низкой ионной силой, биологические жидкости	Кислые буферные растворы или буферные растворы с высокой ионной силой	Жирные и органические кислоты, витамины, желчные кислоты, циклические нуклеотиды, фосфаты, антибиотики
Катионообменный	<p>Сильные катиониты: сорбенты, содержащие на поверхности бензолсульфо-, пропилсульфогруппы</p> <p>Слабые аниониты: сорбенты, содержащие на поверхности карбоксильные группы (Waters, JT Baker)</p>	Основания (например, амины, пиримидины)	Вода, кислые буферные растворы с низкой ионной силой, биологические жидкости	Щелочные буферные растворы или буферные растворы с высокой ионной силой	Катехоламины, пурины, пиримидины, нуклеотиды, водорастворимые витамины, лекарственные вещества

Смешанный (обращенно-фазовый/катионообменный)	Силикагель, модифицированный октильными, сильными катионообменными или аренсульфоновыми группами; сополимер дивинилбензола и стирола с аренсульфогруппами (Bond Elut Certify (Varian), IST, Waters, JT Baker, BAS Technology)	Основные неполярные соединения	Вода, кислые буферные растворы, биологические жидкости	-	Опиаты, амфетамины, ЛСД, бензоилэкоин, фенилциклидин, бензодиазепины, трициклические антидепрессанты, прокаиамид, анаболические стероиды
Смешанный (обращенно-фазовый/анионообменный)	Силикагель, модифицированный октильными или сильными/слабыми анионообменными группами (Bond Elut Certify II (Varian), IST, Waters)	Кислотные неполярные соединения	Вода, щелочные буферные растворы, биологические жидкости	-	Метаболиты каннабиоидов, нестероидные противовоспалительные лекарственные вещества
Смешанный (обращенно-фазовый/анионо- и катионообменный)	Силикагель, модифицированный октадецильными и катионо- и анионообменными группами (IST)	Неполярные анионы и катионы	Вода	-	Разделение сложных смесей

Анионо- и катионообменный	Силикагель, модифицированный катионо- и анионообменными группами (Bond Elut Accurat)	Катионы и анионы	Вода, буферные растворы, биологические жидкости	-	Катехоламины, органические кислоты, основные лекарственные вещества и их метаболиты
Иммуноафинный	Сорбенты на основе оксида кремния, пористого стекла или агарозы, поверхность которых модифицирована антителами	Лекарственные вещества, эндогенные соединения	Биологические жидкости	-	Эстрогены, кортикостероиды, анаболические стероиды, дексаметазон, ЛСД, морфин, сальбутамол, афлатоксины
Афинный	Полимеры с молекулярными отпечатками	Определенное вещество и его метаболиты	Биологические жидкости	-	Теofilлин. Пропанолол, бупивакаин, 7-гидроксикумарин
Эксклюзионный	ChromSper 5 Biomatrix (ChromPak), Lichospher ADS (Merck), HiSep (Supelco), Utraboisep (Hypersil), BioTrap 500 (Chromtech)	Неполярные и кислоты и основания	Вода, биологические жидкости	-	Кортизол, кортизон, преднизолон, флудрокортизон в плазме
Ковалентное связывание	Силикагель, модифицированный фенолбороновой кислотой (Bond Elut PBA (Varian))	Вещества с вицинальными диольными группами	Вода, биологические жидкости	-	Катехоламины, углеводы, нуклеотиды

Заключение.

Использование сорбции на твердых сорбентах в биохимических исследованиях является эффективным инструментом для изучения различных биохимических процессов, в том числе для диагностики заболеваний, мониторинга токсикантов, попадающих в организм человека из внешней среды, исследования фармакинетики лекарственных веществ и т.д. В биохимическом анализе особенно часто сталкиваются с трудностями, возникающими из-за сложного состава анализируемого объекта. Следовательно, необходимо применение современных методов разделения и концентрирования, позволяющих не только избавиться от мешающего влияния компонентов пробы, но и повысить чувствительность анализа. На основе данной работы можно заключить, что разработанные методы твердофазного извлечения с успехом справляются с поставленной задачей. Более того, использование твердофазной микроэкстракции значительно упрощает процедуру анализа, повышает экспрессность и чувствительность, снижает количество используемых реагентов и органических растворителей. Совмещение ТФМЭ с газовой хроматографией позволяет вовсе избежать их использования, так как десорбция аналита осуществляется прямо в испарителе хроматографа.

В рамках данной работы были рассмотрены основные типы сорбентов, их свойства; примеры практического применения для решения важных практических задач, возникающих в биохимическом анализе; варианты технической реализации процедуры сорбции.

Список литературы

1. Hennion M-C. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1999; 856: 3- 54
2. Carson MC. Ion-pair solid-phase extraction. *J Chromatogr A* 2000; 885: 343-50
3. Thurman EM, Mills MS. *Solid Phase Extraction: Principles and Practice*. Chichester: Wiley, 1998
4. Huck CW, Bonn GK. Recent developments in polymer-based sorbents for solid-phase extraction. *J Chromatogr A* 2000; 885: 51- 72
5. Zief M, Kiser R. *Solid Phase Extraction for Sample Preparation*. Phillipsburg: J.T. Baker Inc., 1988
6. Martin P, Morgan ED, Wilson ID. Effect of carbon loading on the extraction properties of C-18 bonded silica used for solid-phase extraction of acidic and basic analytes. *Anal Chem* 1997; 69: 2972- 5
7. Li Y. et al. A novel approach to the simultaneous extraction and non-targeted analysis of the small molecules metabolome and lipidome using 96-well solid phase extraction plates with column-switching technology // *J. Chromatogr. A*. 2015. Vol. 1409. P. 277–281.
8. Bouvier ESP, Iraneta PC, Neue UD, McDonald PD, Phillips DJ, Capparella M, et al. Polymeric reversed-phase SPE sorbents: characterization of a hydrophilic-lipophilic balanced SPE sorbent. *LC-GC Int* 1998; 11: 35- 40
9. Liska I. Fifty years of solid-phase extraction in water analysis: historical development and overview. *J Chromatogr A* 2000; 885: 3- 16
10. Hennion MC. Graphitized carbons for solid-phase extraction. *J Chromatogr A* 2000; 885: 73- 95
11. Ferrone V. et al. Bioanalytical method development for quantification of ulifloxacin, fenbufen and felbinac in rat plasma by solid-phase extraction (SPE) and HPLC with PDA detection // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2016. Vol. 123. P. 205–212.
12. Saito K., Kikuchi Y., Saito R. Solid-phase dispersive extraction method for analysis of benzodiazepine drugs in serum and urine samples // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2014. Vol. 100. P. 28–32.

13. Wang N. et al. Pipette tip solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography for the determination of flavonoids from *Epimedii herba* in rat serum and application of the technique to pharmacokinetic studies // *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2015. Vol. 990. P. 64–72.
14. Magnes C. et al. Polyamines in biological samples: Rapid and robust quantification by solid-phase extraction online-coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* 2014. Vol. 1331. P. 44–51.
15. Kopf T., Schmitz G. Analysis of non-esterified fatty acids in human samples by solid-phase-extraction and gas chromatography/mass spectrometry // *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2013. Vol. 938. P. 22–26.
16. Handley AG, McDowall RD. Solid phase extraction in organic analyses. In: Handley AG, ed. *Extraction Methods in Organic Analyses*. Shef.eld: Academic Press, 1999: 54- 73
17. Tomková J., Ondra P., Válka I. Simultaneous determination of mushroom toxins α -amanitin, β -amanitin and muscarine in human urine by solid-phase extraction and ultra-high-performance liquid chromatography coupled with ultra-high-resolution TOF mass spectrometry // *Forensic Sci. Int.* 2015. Vol. 251. P. 209–213.
18. Arroyo-Manzanares N. et al. Determination of sulfonamides in serum by on-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography with photoinduced fluorescence detection // *Talanta.* 2015. Vol. 138. P. 258–262.
19. Stevenson D, Miller S, Wilson ID. Biological/pharmaceutical applications. In: Handley AG, ed. *Extraction Methods in Organic Analyses*. Shef.eld: Academic Press, 1999: 194- 220
20. Delaunay N, Pichon V, Hennion MC. Immunoaf.nity solid-phase extraction for the trace-analysis of low-molecular-mass analytes in complex sample matrices. *J Chromatogr B* 2000; 745: 15- 37
21. Stevenson D. Immuno-af.nity solid-phase extraction. *J Chromatogr B* 2000; 745: 39- 48
22. Godfrey MAJ. Immunoafinity extraction in veterinary residue analysis: a regulatory viewpoint. *Analyst* 1998; 123: 2501- 6

23. Andersson LI. Molecular imprinting: developments and applications in the analytical chemistry field. *J Chromatogr B* 2000; 745: 3- 13
24. Andersson LI. Molecular imprinting for drug bioanalysis. A review on the application of imprinted polymers to solid-phase extraction and binding assay. *J Chromatogr B* 2000; 739: 153- 73
25. Hwang C-C, Lee W-C. Chromatographic resolution of the enantiomers of phenylpropanolamine by using molecularly imprinted polymer as the stationary phase. *J Chromatogr B* 2001; 765: 45- 53
26. Bereczki A, Toloka'n A, Horvai G, Horva' th V, Lanza F, Hall AJ, et al. Determination of phenytoin in plasma by molecularly imprinted solid-phase extraction. *J Chromatogr A* 2001; 930: 31- 8
27. Mullet WM, Lai EPC. Determination of theophylline in serum by molecularly imprinted solid-phase extraction with pulsed elution. *Anal Chem* 1998; 70: 3636- 41
28. Martin P, Wilson ID, Morgan DE, Jones GR, Jones K. Evaluation of molecular-imprinted polymers for use in the solid phase extraction of propranolol from biological fluids. *Anal Commun* 1997; 34: 45- 7
29. Walshe M, Howarth J, Kelly MT, O'Kennedy R, Smyth MR. The preparation of a molecular imprinted polymer to 7-hydroxycoumarin and its use as a solid-phase extraction material. *J Pharm Biomed Anal* 1997; 16: 319- 25
30. Andersson LI. Efficient sample pre-concentration of bupivacaine from human plasma by solid-phase extraction on molecularly imprinted polymers. *Analyst* 2000; 125: 1515- 7
31. Wu N. et al. A novel surface molecularly imprinted polymer as the solid-phase extraction adsorbent for the selective determination of ampicillin sodium in milk and blood samples // *J. Pharm. Anal.* 2016. № Lc. P. 1–8.
32. Dramou P. et al. Development of novel amphiphilic magnetic molecularly imprinted polymers compatible with biological fluids for solid phase extraction and physicochemical behavior study // *J. Chromatogr. A.* 2013. Vol. 1317. P. 110–120.
33. Yan H. et al. Hybrid molecularly imprinted polymers synthesized with 3-aminopropyltriethoxysilane-methacrylic acid monomer for miniaturized solid-phase

extraction: A new and economical sample preparation strategy for determination of acyclovir in urine // *J. Chromatogr. A*. 2014. Vol. 1346. P. 16–24.

34. Arabi M. et al. Synthesis and application of molecularly imprinted nanoparticles combined ultrasonic assisted for highly selective solid phase extraction trace amount of celecoxib from human plasma samples using design expert (DXB) software // *Ultrason. Sonochem.* ., 2016. Vol. 33. P. 67–76.

35. Zhang W., Chen Z. Preparation of micropipette tip-based molecularly imprinted monolith for selective micro-solid phase extraction of berberine in plasma and urine samples // *Talanta*. 2013. Vol. 103. P. 103–109.

36. Sheykhaghaei G. et al. Magnetic molecularly imprinted polymer nanoparticles for selective solid phase extraction and pre-concentration of Tizanidine in human urine // *J. Chromatogr. B*. 2016. Vol. 1011. P. 1–5.

37. Prasad B.B. et al. Molecularly imprinted micro solid-phase extraction technique coupled with complementary molecularly imprinted polymer-sensor for ultra trace analysis of epinephrine in real samples // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2014. Vol. 113. P. 69–76.

38. Shi Y. et al. Selective solid-phase extraction of cholesterol using molecularly imprinted polymers and its application in different biological samples. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006. Vol. 42, № 5. P. 549–555.

39. Song R. et al. Molecularly imprinted solid-phase extraction of glutathione from urine samples // *Mater. Sci. Eng. C*. 2014. Vol. 44. P. 69–75.

40. Sun X. et al. Highly class-selective solid-phase extraction of bisphenols in milk, sediment and human urine samples using well-designed dummy molecularly imprinted polymers // *J. Chromatogr. A*. 2014. Vol. 1360. P. 9–16.

41. Yang J. et al. Molecularly imprinted polymer microspheres prepared by Pickering emulsion polymerization for selective solid-phase extraction of eight bisphenols from human urine samples // *Anal. Chim. Acta*. 2015. Vol. 872. P. 35–45.

42. Serrano M. et al. On-line flow injection molecularly imprinted solid phase extraction for the preconcentration and determination of 1-hydroxypyrene in urine samples // *Talanta*. 2016. P. 1–8.

43. 4. Nestic M. et al. Molecularly imprinted solid phase extraction for simultaneous determination of tetrahydrocannabinol and its main metabolites by gas

chromatography-mass spectrometry in urine samples // *Forensic Sci. Int.* 2013. Vol. 231, № 1-3. P. 317–324.

44. Chrzanowska A.M., Poliwoda A., Wieczorek P.P. Surface molecularly imprinted silica for selective solid-phase extraction of biochanin A, daidzein and genistein from urine samples // *J. Chromatogr. A.* 2015. Vol. 1392. P. 1–9.

45. Majors RE. A review of modern solid-phase extraction. *LC-GC Int* 1998; 11: 8- 16

46. Du B. et al. A novel restricted access material combined to molecularly imprinted polymers for selective solid-phase extraction and high performance liquid chromatography determination of 2-methoxyestradiol in plasma samples // *Talanta.* 2014. Vol. 129. P. 465–472.

47. Yu Z, Westerlund D. Characterization of the precolumn BioTrap 500 C-18 for direct injection of plasma samples in a column-switching system. *Chromatographia* 1998; 47: 299- 304

48. Yu Z, Westerlund D. Direct injection of large volumes of plasma in a column-switching system for the analysis of local anaesthetics. II. Determination of bupivacaine in human plasma with an alkylidol silica precolumn. *J Chromatogr A* 1996; 725: 149- 55

49. Van der Hoeven RA, Hofte AJ, Frenay M, Irth H, Tjaden UR, van der Greef J, 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 Chromatogr A* 1997; 762: 193- 200

50. Ye L. et al. Restricted-access nanoparticles for magnetic solid-phase extraction of steroid hormones from environmental and biological samples. // *J. Chromatogr. A.* 2012. Vol. 1244. P. 46–54.

51. Franke JP, de Zeeuw RA. Solid-phase extraction procedures in systematic toxicological analysis. *J Chromatogr B* 1998; 713: 51- 9

52. Ferrer I, Barcelo´ D, Thurman EM. Double-disk solid-phase extraction: simultaneous cleanup and trace enrichment of herbicides and metabolites from environmental samples. *Anal Chem* 1999; 71: 1009- 15

53. Degel F. Comparison of new solid-phase extraction methods for chromatographic identification of drugs in clinical toxicological analysis. *Clin Biochem* 1996; 29: 529- 40
54. de Zeeuw RA, Wijsbeek J, Franke JP. SPEC disc solid-phase extraction for rapid broad-spectrum drug screening in urine. *J Anal Toxicol* 2000; 24: 97- 101
55. Poletti A, Groppi A, Vignali C, Montagna M. Fully-automated systematic toxicological analysis of drugs, poisons, and metabolites in whole blood, urine, and plasma by gas chromatography- full scan mass spectrometry. *J Chromatogr B* 1998; 713: 265- 79
56. Paterson S, Cordeo R, McCulloch S, Houldsworth P. Analysis of urine for drugs of abuse using mixed-mode solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Ann Clin Biochem* 2000; 37: 690- 700
57. Lee MR, Yu SC, Lin CL, Yeh YC, Chen YL, Hu SH. Solid-phase extraction in amphetamine and methamphetamine analysis of urine. *J Anal Toxicol* 1997; 21: 278- 82
58. Cooper GA, Oliver JS. Improved solid-phase extraction of methadone and its two major metabolites from whole blood. *J Anal Toxicol* 1998; 22: 389- 92
59. Woo H.I. et al. A simple and rapid analytical method based on solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the simultaneous determination of free catecholamines and metanephrines in urine and its application to routine clinical analysis // *Clin. Biochem.* 2016. Vol. 49, № 7-8. P. 573–579.
60. Chen H.-C., Wu C., Wu K.-Y. Determination of the maleic acid in rat urine and serum samples by isotope dilution–liquid chromatography–tandem mass spectrometry with on-line solid phase extraction // *Talanta.* 2015. Vol. 136, № 0. P. 9–14.
61. He H. et al. Measurement of catecholamines in rat and mini-pig plasma and urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry coupled with solid phase extraction // *J. Chromatogr. B.* 2015. Vol. 997. P. 154–161.
62. Penton ZE. Sample preparation for gas chromatography with solid-phase extraction and solid-phase microextraction. *Adv Chromatogr* 1997; 37: 205- 36

63. Larrivee ML, Poole CF. Solvation parameter model for the prediction of breakthrough volumes in solid-phase extraction with particle-loaded membranes. *Anal Chem* 1994; 66: 139- 46
64. Poole CF, Gunatilleka AD, Sethuraman R. Contributions of theory to method development in solid-phase extraction. *J Chromatogr A* 2000; 885: 17- 39
65. Wells DA. 96-Well plate products for solid-phase extraction. *LC.GC Eur* 1999; 12: 704- 15
66. Rossi DT, Zhang N. Automating solid-phase extraction: current aspects and future prospects. *J Chromatogr A* 2000; 885: 97- 113
67. Zhang H, Henion J. Quantitative and qualitative determination of estrogen sulfates in human urine by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using 96-well technology. *Anal Chem* 1999; 71:3955- 64
68. C.L. Arthur, J. Pawliszyn. Solid-Phase Microextraction. A Solvent-Free Alternative for Sample Preparation. *Anal. Chem.*, 1990; 62; 2145
69. D. Figeys, A. Ducrte, J.R. Yates, R. Aebersold. Protein identification by solid phase microextraction—capillary zone electrophoresis—microelectrospray—tandem mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.*, 1996; 14; 1579
70. C.W. Whang, J. Pawliszyn Solid phase microextraction coupled to capillary electrophoresis *Anal. Commun.*, 1998; 35; 353
71. A. Medvedovici, P. Sandra, F. David. Construction of an interface for SPME-PCSF J. *High Resolut. Chromatogr.*,1997; 20; 619
72. R. Eisert, J. Pawliszyn, Automated In-Tube Solid-Phase Microextraction Coupled to High-Performance Liquid Chromatography, *Anal. Chem.* 69 (1997) 3140
73. Z.Y. Zhang, J. Pawliszyn, Headspace solid-phase microextraction, *Anal. Chem.* 65 (1993) 1843
74. Y. Liu, M.L. Lee, K.J. Hageman, Y. Yang, S.B. Hawthorne, Solid-Phase Microextraction of PAHs from Aqueous Samples Using Fibers Coated with HPLC Chemically Bonded Silica Stationary Phases, *Anal. Chem.* 69 (1997) 5001. (1998) 137.
75. Y. Liu, Y.F. Shen, M.L. Lee, Porous Layer Solid Phase Microextraction Using Silica Bonded Phases, *Anal. Chem.* 69 (1997) 190.

76. F. Mangani, R. Cenciarini, Solid phase microextraction using fused silica fibers coated with graphitized carbon black, *Chromatographia* 41 (1995) 678.
77. T. Gorecki, J. Pawliszyn, Effect of Sample Volume on Quantitative Analysis by Solid-phase Microextraction Part 1. Theoretical Considerations, *Analyst* 122 (1997) 1079.
78. T. Gorecki, A. Khaled, J. Pawliszyn, The effect of sample volume on quantitative analysis by solid phase microextraction Part 2. Experimental verification, *Analyst* 123 (1998) 2819.
79. K. Jinno, M. Taniguchi, M. Hayashida, Solid phase micro extraction coupled with semi-microcolumn high performance liquid chromatography for the analysis of benzodiazepines in human urine , *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17 (1998) 1081.
80. W.E. Brewer, R.G. Galipo, S.L. Morgan, K.H. Habben, The Confirmation of Volatiles by Solid-Phase Microextraction and GC-MS in the Investigation of Two Traffic Fatalities, *J. Anal. Toxicol.* 21 (1997) 286.
81. T. Kumazawa, H. Seno, X.P. Lee, A. Ishii, O. Suzuki, K. Sato, Detection of ethanol in human body fluids by headspace solid-phase micro extraction (SPME)/capillary gas chromatography, *Chromatographia* 43 (1996) 393.
82. X.P. Lee, T. Kumazawa, K. Sato, H. Seno, A. Ishii, O. Suzuki, Improved extraction of ethanol from human body fluids by headspace solid-phase microextraction with a carboxen-polydimethylsiloxane-coated fiber, *Chromatographia* 47 (1998) 593.
83. X.P. Lee, T. Kumazawa, T. Kurosawa, I. Akiya, S. Furuta, K. Sato, Simple extraction of methanol in human whole blood by headspace SPME, *Jpn. J. Forensic Toxicol.* 16 (1998) 64.
84. Z.E. Penton, Blood Alcohol Determination with Automated Solid Phase Microextraction (SPME): A Comparison with Static Headspace Sampling, *J. Can. Forensic Soc.* 30 (1997) 7.

85. K. Takekawa, M. Oya, A. Kido, O. Suzuki, Analysis of cyanide in blood by headspace solid-phase microextraction (SPME) and capillary gas chromatography, *Chromatographia* 47 (1998) 209.
86. A. Namera, K. Watanabe, M. Yashiki, T. Kojima, T. Urabe, Simple and sensitive analysis of nereistoxin and its metabolites in human serum using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry, *J. High Resolut. Chromatogr.* 37 (1999) 77.
87. H. Seno, T. Kumazawa, A. Ishii, M. Nishikawa, K. Watanabe, H. Hattori, O. Suzuki, Determination of some carbamate pesticides in human body fluids by headspace solid phase microextraction and gas chromatography, *Jpn. J. Forensic Toxicol.* 14 (1996) 199.
88. X.P. Lee, T. Kumazawa, K. Sato, O. Suzuki, Detection of organophosphate pesticides in human body fluids by headspace solid-phase microextraction (SPME) and capillary gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection, *Chromatographia* 42 (1996) 135.
89. F.Y. Guan, K. Watanabe, A. Ishii, H. Seno, T. Kumazawa, H. Hattori, O. Suzuki, Headspace solid-phase microextraction and gas chromatographic determination of dinitroaniline herbicides in human blood, urine and environmental water, *J. Chromatogr. B* 714 (1998) 205.
90. M. Guidotti, M. Vitali, Determination of Urinary Pentachlorophenol by SPME and GC/MSJ. *High Resolut. Chromatogr.* 21 (1998) 137.
91. M. Guidotti, G. Ravaioli, M. Vitali, Total p-Chlorophenol Determination in Urine Samples of Subjects Exposed to Chlorobenzene, Using SPME and GC-MS, *J. High Resolut. Chromatogr.* 22 (1999) 427.
92. M.R. Lee, Y.C. Yeh, W.S. Hsiang, C.C. Chen, Application of solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry for the determination of chlorophenols in urine, *J. Chromatogr B* 707 (1998) 91.
93. L. Rohrig, M. Puttmann, H.U. Meisch, Determination of persistent organochlorine compounds in blood by solid phase micro extraction and GC-ECD, *Fresenius J. Anal Chem.* 361 (1998) 192.

94. G. Gmeiner, C. Krassnig, E. Schmid, H. Tausch, Fast screening method for the profile analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in urine using derivatisation–solid-phase microextraction, *J. Chromatogr. B* 705 (1998) 132
95. B. He, G.B. Jiang, Z.M. Ni, Determination of methylmercury in biological samples and sediments by capillary gas chromatography coupled with atomic absorption spectrometry after hydride derivatization and solid phase microextraction, *J. Anal. Atom. Spectrosc.* 13 (1998) 1141.
96. M. Guidotti, M. Vitali, Determination of Urinary Mercury and Methylmercury by Solid Phase Microextraction and GC/MS, *J. High Resolut. Chromatogr.* 21 (1998) 665.
97. L. Dunemann, H. Hajimiragha, J. Begerow, Simultaneous determination of Hg(II) and alkylated Hg, Pb, and Sn species in human body fluids using SPME-GC/MS-MS, *Fresenius J. Anal. Chem.* 363 (1999) 466.
98. C. Battu, P. Marquet, A.L. Fauconnet, E. Lacassie, G. Lachatre, Screening Procedure for 21 Amphetamine-Related Compounds in Urine Using Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry, *J. Chromatogr. Sci.* 36 (1998) 1.
99. F. Centini, A. Masti, I.B. Comparini, Quantitative and qualitative analysis of MDMA, MDEA, MA and amphetamine in urine by head-space/solid phase microextraction (SPME) and GC/MS, *Forensic Sci. Int.* 83 (1996) 161.
100. I. Koide, O. Noguchi, K. Okada, A. Yokoyama, H. Oda, S. Yamamoto, H. Kataoka, Determination of amphetamine and methamphetamine in human hair by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography with nitrogen–phosphorus detection, *J. Chromatogr. B* 707 (1998) 99.
101. H.L. Lord, J. Pawliszyn, Method Optimization for the Analysis of Amphetamines in Urine by Solid-Phase Microextraction, *Anal. Chem.* 69 (1997) 3899.
102. N. Nagasawa, M. Yashiki, Y. Iwasaki, K. Hara, T. Kojima, Rapid analysis of amphetamines in blood using head space-solid phase microextraction and selected ion monitoring, *Forensic Sci. Int.* 78 (1996) 95.

103. M. Yashiki, T. Kojima, T. Miyazaki, N. Nagasawa, Y. Iwasaki, K. Hara, Rapid analysis of amphetamines in blood using head space-solid phase microextraction and selected ion monitoring, *Forensic Sci. Int.* 76 (1995) 169.
104. I. Koide, O. Noguchi, K. Okada, A. Yokoyama, H. Oda, S. Yamamoto, H. Kataoka, Determination of amphetamine and methamphetamine in human hair by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection, *J. Chromatogr. B* 707 (1998) 99.
105. H.G. Uglund, M. Krogh, K.E. Rasmussen, Aqueous alkylchloroformate derivatisation and solid-phase microextraction: determination of amphetamines in urine by capillary gas chromatography, *J. Chromatogr. B* 701 (1997) 29.
106. S.W. Myung, H.K. Min, S. Kim, M. Kim, J.B. Cho, T.J. Kim Determination of amphetamine, methamphetamine and dimethamphetamine in Human Urine by Solid-Phase Microextraction (SPME)-Gas Chromatography/Mass Spectrometry, *J. Chromatogr. B* 716 (1998) 359.
107. K. Ameno, C. Fuke, S. Ameno, H. Kinoshita, I. Ijiri, Application of a Solid-Phase Microextraction Technique for the Detection of Urinary Methamphetamine and Amphetamine by Gas Chromatography, *J. Can. Forensic Soc.* 29 (1996) 43.
108. H. Seno, T. Kumazawa, A. Ishii, K.Watanabe, H. Hattori, O. Suzuki, Detection of benzodiazepines in human urine by direct immersion SPME-GC, *Jpn. J. Forensic Toxicol.* 15 (1997) 16.
109. F.Y. Guan, H. Seno, A. Ishii, K.Watanabe, T. Kumazawa, H. Hattori, O. Suzuki, Solid-Phase Microextraction and GC-ECD of Benzophenones for Detection of Benzodiazepines in Urine, *J. Anal. Toxicol.* 23 (1999) 54.
110. M. Krogh, H. Grefslie, K.E. Rasmussen, Solvent-modified solid-phase microextraction for the determination of diazepam in human plasma samples by capillary gas chromatography, *J. Chromatogr. B* 689 (1997) 357.
111. K. Jinno, M. Taniguchi, *Chromatography* 18 (1998) 244.
112. K. Jinno, M. Taniguchi, H. Sawada, M. Hayashida, Microcolumn liquid chromatography coupled with solid phase micro extraction (SPME/micro-LC) for the analysis of benzodiazepines in human urine, *Analisis* 26 (1998) 27.

113. K. Jinno, Y. Han, H. Sawada, M. Taniguchi, Capillary electrophoretic separation of toxic drugs using a polyacrylamide-coated capillary, *Chromatographia* 46 (1997) 309
114. K. Jinno, H. Sawada, Y. Han, Drug analysis by capillary electrophoretic methods, *Biomed. Chromatogr.* 12 (1998) 126.
115. B.J. Hall, J.S. Brodbelt, Determination of barbiturates by solid-phase microextraction (SPME) and ion trap gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 777 (1997) 275.
116. S. Li, S.G. Weber, Determination of Barbiturates by Solid-Phase Microextraction and Capillary Electrophoresis, *Anal. Chem.* 69 (1997) 1217.
117. M. Chiarotti, R. Marsili, Gas chromatographic analysis of methadone in urine samples after solid phase microextraction, *J. Microcol. Sep.* 6 (1994) 577.
118. B.J. Hall, M. SatterfieldDoerr, A.R. Parikh, J.S. Brodbelt Determination of Cannabinoids in Water and Human Saliva by Solid-Phase Microextraction and Quadrupole Ion Trap Gas Chromatography/Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 70 (1998) 1788.
119. R.S. Strano, M. Chiarotti, Solid-Phase Microextraction for Cannabinoids Analysis in Hair and Its Possible Application to Other Drugs, *J. Anal. Toxicol.* 23 (1999) 7.
120. J. Tytgat, P. Daenens, Solvent-free sample preparation by headspace solid-phase microextraction applied to the tracing of n-butyl nitrite abuse, *Int. J. Legal Med.* 109 (1996) 150.
121. J.T. Liu, P. Cheng, O. Suzuki, Solid-phase microextraction (SPME) of drugs and poisons from biological samples, *Forensic Sci. Int.* 97 (1998) 93.
122. F. Degel, Comparison of new solid-phase extraction methods for chromatographic identification of drugs in clinical toxicological analysis, *Clin. Biochem.* 29 (1996) 529.
123. O. Suzuki, H. Seno, A. Ishii, Analytical toxicology, *Forensic Sci. Int.* 80 (1996) 137.
124. C. Kroll, H.H. Borchert, Solid phase microextraction (SPME) of sample preparation during of a complex biological matrix in biotransformation studies, *Pharmazie* 53 (1998) 172

125. T. Felix, B.J. Hall, J.S. Brodbelt, Determination of benzophenone-3 and metabolites in water and human urine by solid-phase microextraction and quadrupole ion trap GC–MS, *Anal. Chim. Acta* 371 (1998) 195
126. E.D. Conte, D.W. Miller, A solid phase microextraction-electrodeposition device for the determination of putrescine and cadaverine by high resolution gas chromatography, *J. High Resolut. Chromatogr.* 19 (1996) 294.
127. C. Grote, J. Pawliszyn, Solid-Phase Microextraction for the Analysis of Human Breath, *Anal. Chem.* 69 (1997) 587
128. L.S. DeBruin, P.D. Josephy, J.B. Pawliszyn, Solid-Phase Microextraction of Monocyclic Aromatic Amines from Biological Fluids, *Anal. Chem.* 70 (1998) 1986.
129. L.S. DeBruin, J.B. Pawliszyn, P.D. Josephy, Detection of Monocyclic Aromatic Amines, Possible Mammary Carcinogens, in Human Milk, *Chem. Res. Toxicol.* 12 (1999) 78.
130. G.A. Mills, V. Walker, H. Mughal, Quantitative determination of trimethylamine in urine by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 723 (1999) 281.
131. H.M. Liebich, E. Gesele, J. Woll, Urinary organic acid screening by solid-phase microextraction of the methyl esters, *J. Chromatogr. B* 713 (1998) 427
132. M. Moder, H. Loster, R. Herzsuh, P. Popp, Determination of urinary acylcarnitines by ESI-MS coupled with solid-phase microextraction (SPME), *J. Mass Spectrom.* 32 (1997) 1195
133. S.W. Myung, M. Kim, H.K. Min, F.A. Yoo, K.R. Kim, Determination of homocysteine and its related compounds by solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry *J. Chromatogr. B* 727 (1999) 1.
134. T. Kumazawa, H. Seno, X.P. Lee, A. Ishii, S.K. Watanabe K. Sato, O. Suzuki, Extraction of methylxanthines from human body fluids by solid-phase microextraction *Anal. Chim. Acta* 387 (1999) 53.
135. Theodoridis G., Koster E.H., de Jong G.J. // *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 2000. Vol. 745, № 1. P. 49–82.
136. Walker V., Mills G.A. // *Ann. Clin. Biochem.* 2002. Vol. 39, № 5. P. 464–477.