

ШВЕЙЦАРСКИЙ НОЖ ХИМИКА-АНАЛИТИКА: СИСТЕМА ДЛЯ КОМПЛЕКСНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ SHIMADZU NEXERA UC SFE-SFC-MS

Д.Фармаковский, Shimadzu Europa
smo_df@shimadzu.ru

Компания Shimadzu предлагает новую хроматографическую систему Nexera UC SFE-SFC-MS, которая кардинальным образом увеличивает эффективность работы современной аналитической лаборатории, реализуя принципиально новую технологию, "комплексную хроматографию" (UC, Unified Chromatography). Nexera UC – первое в мире универсальное решение, включающее встроенную систему пробоподготовки онлайн-методом сверхкритической флюидной экстракции, разделение компонентов образца в режиме сверхкритической флюидной хроматографии и высокочувствительное масс-спектрометрическое детектирование. Описаны возможности и преимущества нового подхода к работе аналитической лаборатории при полной автоматизации подготовки и проведения анализа. Приведен пример применения новой системы комплексной хроматографии на фармацевтическом производстве.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ И ЭКОНОМИЧНОСТЬ АНАЛИЗА

В методах сверхкритической флюидной экстракции (СФЭ) и сверхкритической флюидной хроматографии (СФХ) в качестве экстрагента и подвижной фазы используют так называемый "сверхкритический" диоксид углерода (СК-СО₂) – особое состояние диоксида углерода, которого он достигает при определенных давлении (73,8 бар) и температуре (31,1°С). В сверхкритическом состоянии диоксид углерода демонстрирует свойства, присущие как газам, так и жидкостям. Подобно жидкости, СК-СО₂ обладает растворяющей способностью, текучестью и сравнительно высокой плотностью, но при этом его вязкость существенно меньше, а проникающая способность выше. Такое сочетание свойств, учитывая еще невысокую стоимость, делает сверхкритический диоксид углерода весьма привлекательным в качестве растворителя и подвижной фазы для экстракции и хроматографии соответственно. Применение СК-СО₂ позволяет проводить извлечение целевых компо-

нентов из исследуемых образцов эффективнее и быстрее, сокращает время хроматографического разделения и позволяет отказаться от таких классических и довольно токсичных растворителей, как гексан, хлороформ или ацетонитрил.

УМЕНЬШЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ФАКТОРА

Nexera UC (рис.1) объединяет в едином процессе извлечение из твердых образцов (сухие пятна крови, полимеры, продукты питания, фармацевтические субстанции и т.п.) целевых компонентов, их хроматографическое разделение и высокочувствительное масс-спектрометрическое детектирование (МС/МС). Полная автоматизация процесса существенно снижает риск ошибки оператора и значительно сокращает общее время анализа.

Nexera UC позволяет идентифицировать и количественно определять сотни соединений различной природы в ходе одного анализа. Например, в случае определения остаточного содержания



Рис.1. Хроматографическая система Nexera UC SFE-SFC-MS

пестицидов в объектах окружающей среды и/или пищевых продуктах одна система Nexera UC может с успехом заменить традиционные методы анализа с помощью ГХ-МС/МС и ВЭЖХ-МС/МС.

Сам процесс сверхкритической флюидной экстракции осуществляется в специализированном модуле SFE-30 (рис.2), который позволяет проводить СФЭ в широком диапазоне условий в зависимости от природы образца и задач исследования. Например, варьировать растворяющую способность CO₂ путем изменения давления и температуры. Благодаря тому, что извлечение целевых компонентов происходит в анаэробных условиях при относительно низкой температуре и в отсутствии света, даже самые лабильные соединения могут быть экстрагированы без изменения их нативных свойств.

По окончании извлечения из образца смесь целевых компонентов автоматически вводится в поток CO₂ в хроматографическую систему, где происходит ее разделение на индивидуальные соединения с последующим масс-спектрометрическим детектированием.

ОПТИМАЛЬНЫЕ УСЛОВИЯ ДЛЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО РАЗДЕЛЕНИЯ

Диоксид углерода в сверхкритическом состоянии является скорее неполярным растворителем, и его растворяющей способности недостаточно для полярных соединений. Поэтому в большинстве случаев, когда CO₂ используют в качестве основы подвижной фазы для хроматографии, дополнительно вводят полярные соразтворители или модификаторы. Такая модифицированная под-

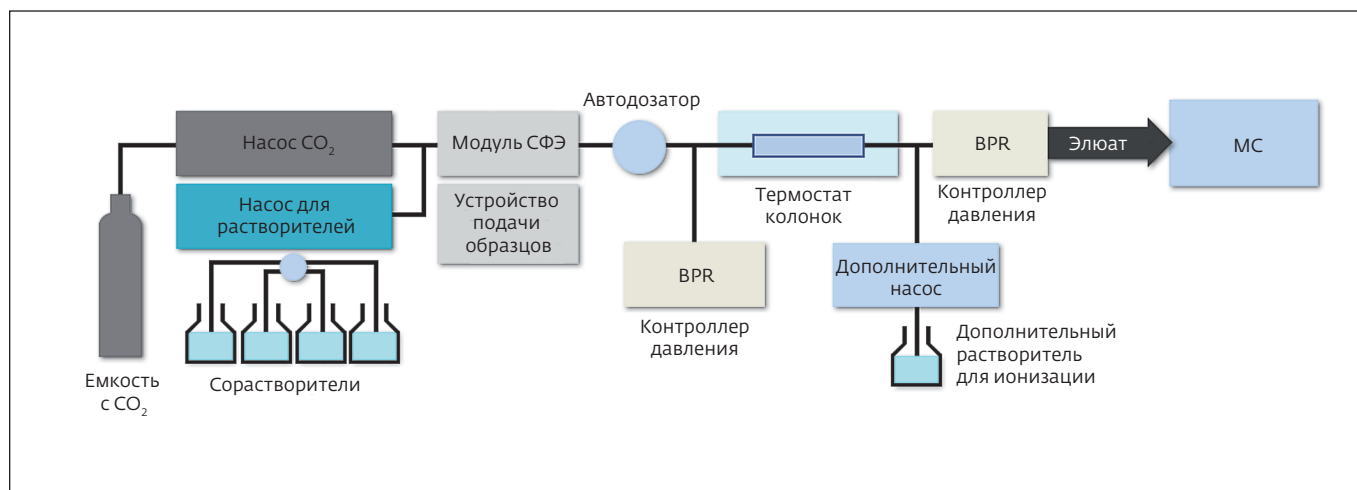


Рис.2. Конфигурация системы Nexera UC SFE-SFC-MS

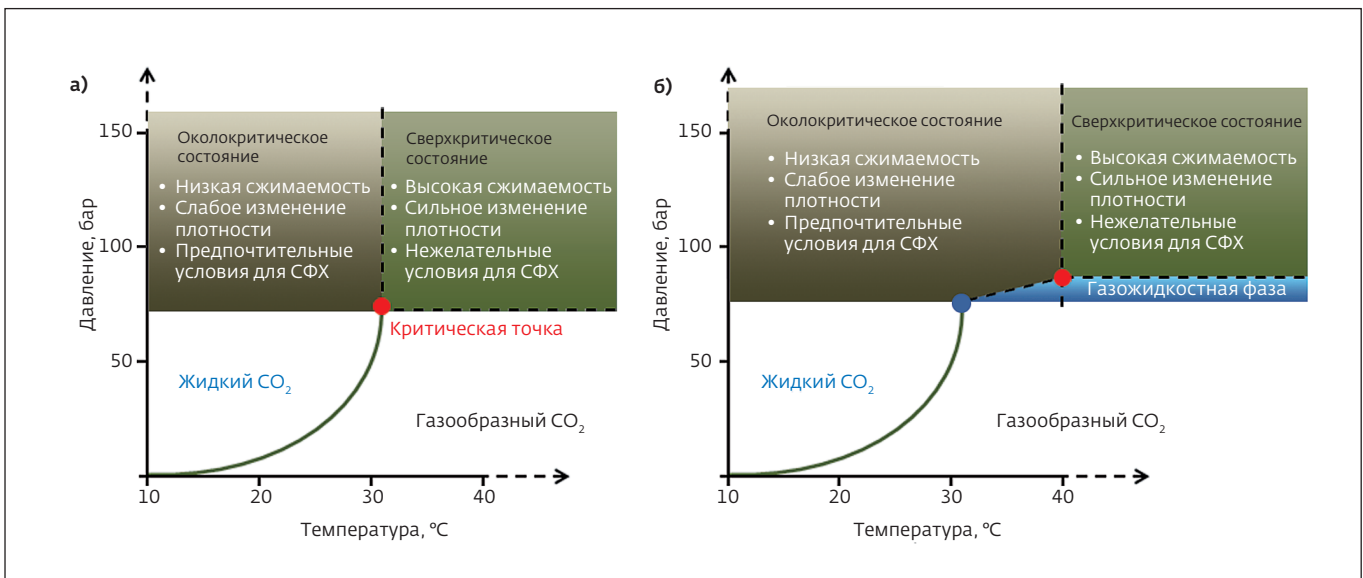


Рис.3. Фазовые диаграммы для: а) CO₂ (критическая точка при давлении 73,8 бар и температуре 31,1°C) и б) смеси CO₂ (96,5%) и метанола (3,5%) (критическая точка при давлении 83 бар и температуре 40°C [Eric Lesellier ICOA, UMR 7311, SFC 2014])

вижная фаза уже не находится, строго говоря, в сверхкритическом состоянии, хотя термин "сверхкритическая флюидная хроматография" продолжает использоваться. В окоокритическом состоянии подвижная фаза сохраняет такие свойства, как низкая вязкость, высокая проникающая способность, но при этом характеризуется существенно меньшей зависимостью вязкости и плотности от давления и температуры. Таким образом, окоокритическое состояние подвижной фазы наиболее предпочтительно и обеспечивает более надежную работу хроматографической системы (рис.3).

В качестве соразтворителей используют низшие спирты (как доноры водородных связей), ацетонитрил (как акцептор водородных связей) и ряд других соединений. Варьируя концентрацию соразтворителей в подвижной фазе, исследователь легко может управлять ее элюирующей силой и, соответственно, временем и селективностью анализа.

БЫСТРАЯ И ПРОСТАЯ РАЗРАБОТКА НОВЫХ МЕТОДИК АНАЛИЗА

Nexera UC помогает быстро разрабатывать новые методики анализа или оптимизировать условия уже существующих. Для этого используют аппаратно-программную опцию "Method Scouting", которая дает возможность произвольно комбинировать четыре соразтворителя с 12-ю различными хроматографическими колонками. Специализированное программное обеспечение позволяет быстро запрограммировать систему для поиска оптимальных условий анализа. Достаточно в соответствующем окне программы "Method Scouting Solution" отметить интересующие соразтворители и колонки, задать скорость потока подвижной фазы/время анализа (рис.4), и программа автоматически сформирует файлы с условиями измерения и запустит последовательность анализов. Расширенные возможности анализа полученных результатов дают исследователю информацию, чтобы в дальнейшем выбрать оптимальные условия разделения.

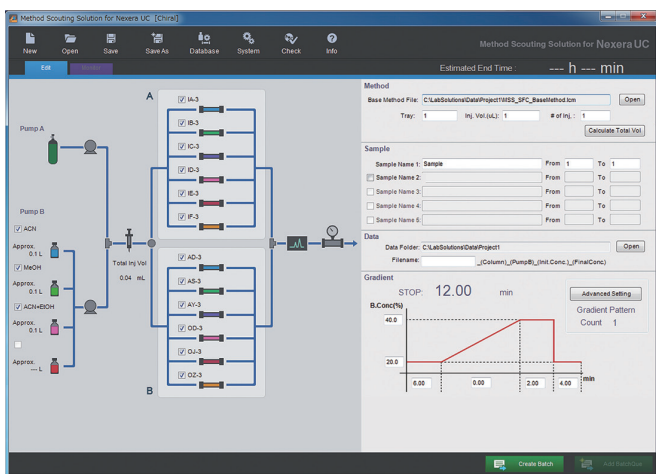


Рис.4. Программа "Method Scouting Solution": окно программирования условий анализа

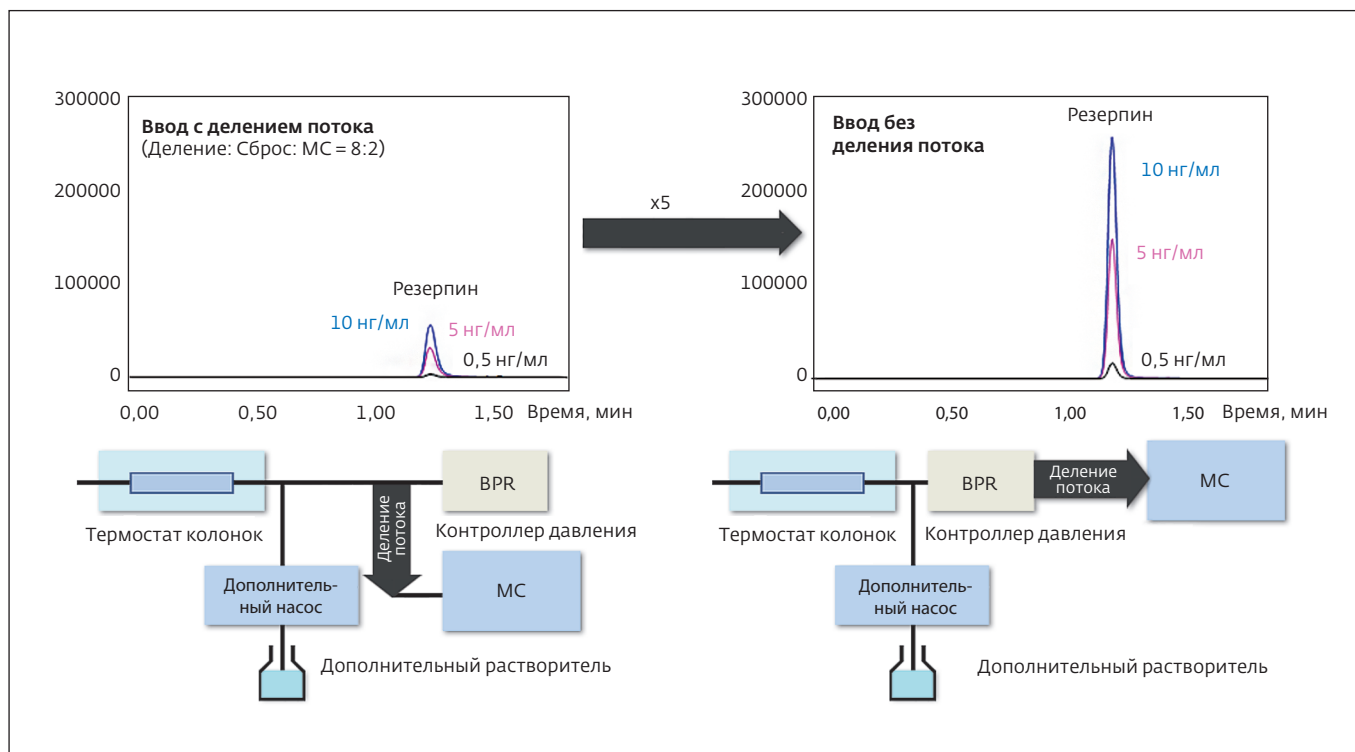


Рис.5. Увеличение чувствительности анализа благодаря использованию контроллера давления с минимальным мертвым объемом

По сравнению с традиционной жидкостной хромато-масс-спектрометрией СФХ-МС-анализ позволяет определять существенно более низкие концентрации целевых соединений. Это достигается, во-первых, благодаря дополнительному концентрированию аналита за счет испарения CO_2 , а во-вторых, вследствие использования контроллера давления с минимальным мертвым объемом. Минимальный мертвый объем позволяет отказаться от деления потока перед вводом в детектор, и, соответственно, весь объем элюата поступает в масс-спектрометр. Это увеличивает общую чувствительность Nexega UC приблизительно в пять раз по сравнению с системами, в которых используются контроллеры давления традиционной конструкции (рис.5).

ВАЛИДАЦИЯ ПРОЦЕССОВ ОЧИСТКИ НА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОМ ПРОИЗВОДСТВЕ

На фармацевтическом производстве очистка технологического оборудования чрезвычайно важна для обеспечения высокого качества продукции и безопасности. Один из самых распространенных методов контроля качества очистки состоит из протирки поверхностей оборудования специальными тампонами или сваб-дисками, которые

затем подвергают ВЭЖХ-анализу или проверке при помощи анализаторов общего органического углерода (ТОС). В последнее время использование ВЭЖХ становится все более популярным, поскольку позволяет в отличие от ТОС определять не просто суммарный уровень остаточного загрязнения, но и индивидуальные соединения.

Приведем конкретный пример использования системы Nexega UC для контроля качества очистки технологического оборудования, включая процесс выбора оптимальной хроматографической колонки, для количественного определения остаточного содержания сульфанола. Чтобы уменьшить стоимость аналитической системы, в данном примере использовали детектор с диодной матрицей.

Определение сульфанола проводили с использованием опции "Method Scouting" на четырех хроматографических колонках. По результатам анализов в качестве оптимальной выбрали колонку Shim-pack UCX-SIL, поскольку она обеспечивала наилучшую форму хроматографического пика (рис.6, слева). Далее провели выбор профиля градиентного элюирования, наиболее подходящего для количественного определения сульфанола (рис.6, справа).

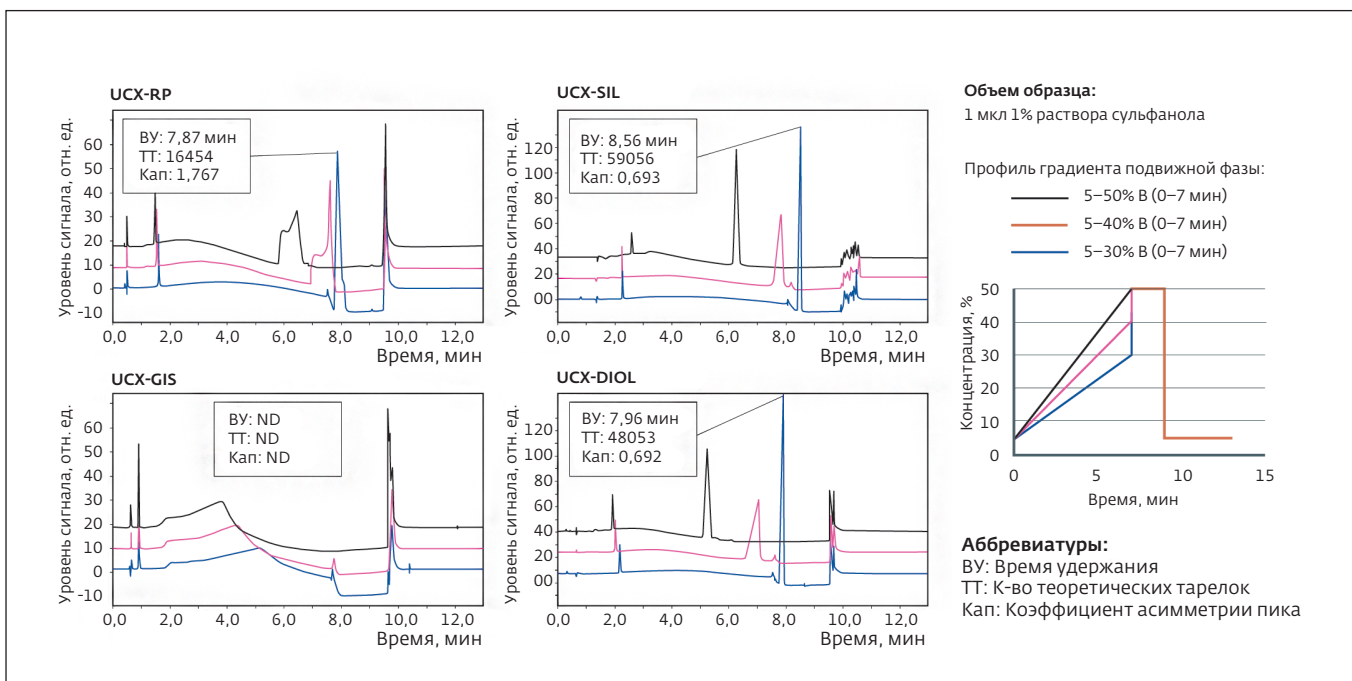


Рис.6. Сравнение разделения стандартного образца сульфанола в режиме СФХ на четырех различных хроматографических колонках

Условия анализа в режиме СФХ

Колонки: Серия Shim-pack UCX (250 мм × 4,6 мм, 5 мкм): UCX-RP, UCX-GIS, UCX-SIL, UCX-DIOL
 Подвижная фаза: А: СК-СО₂ В: Метанол
 Профиль градиента: Приведен на рис.6 справа
 Поток подвижной фазы: 3,0 мл/мин
 Температура колонки: 40°C
 Давление подвижной фазы: 15 МПа
 Длина волны: 220 нм
 Объем образца: Приведен на рис.6

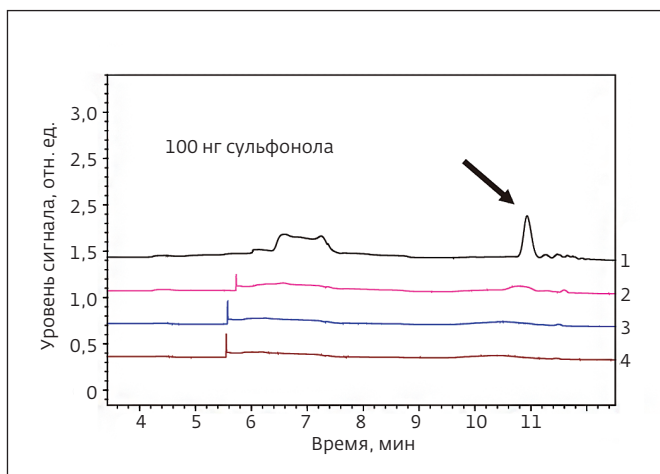


Рис.7. Оценка эффективности извлечения сульфанола в режиме СФЭ. Кривые сдвинуты по оси Y для наглядности. (Цифры 1–4 обозначают номер анализа в серии измерений)

Выбранные аналитические условия (см. врезку) использовали далее для проведения анализа сваб-дисков на предмет выявления в них остаточного содержания сульфанола.

Результаты анализа сваб-диска, к которому было добавлено 100 нг сульфанола приведены на рис.7. Как видно, сульфонol практически полностью извлекается при первой же экстракции. На рис.8 представлена калибровочная кривая, полученная в ходе анализа шести образцов с различным содержанием сульфанола (10–500 мкг). Для оценки воспроизводимости получаемых результатов проведено пять последовательных анализов сваб-дисков с содержанием сульфанола на уровне 100 мкг (рис.9). Коэффициенты вариации времени удерживания и площади хроматографи-

Подготовка образцов

Раствор сульфонола в метаноле (10–500 мкг) наносили на сваб-диски. Последние помещали в емкости для экстракции, которые устанавливали в модуль СФЭ.

Статическая экстракция

Время экстракции: 3 мин

Подвижная фаза: А: СК-СО₂

В: 0,1% (w/v) формиата аммония в метаноле

А/В: 90/10% (v/v)

Поток подвижной фазы: 3,0 мл/мин

Давление подвижной фазы: 15 МПа

Динамическая экстракция

Время экстракции: 3 мин

Подвижная фаза: А: СК-СО₂

В: Метанол

А/В: 90/10% (v/v)

Поток подвижной фазы: 3,0 мл/мин

Давление подвижной фазы: 15 МПа

СФХ

Колонка: Shim-pack UCX-SIL (250 мм × 4,6 мм, 5 мкм)

Подвижная фаза: А: СК-СО₂

..... В: Метанол

Профиль градиента: 10%B (0–2 мин),

10–60%B (2–7 мин),

60%B (7–9 мин),

10%B (9–13 мин)

Поток подвижной фазы: 3,0 мл/мин

Давление подвижной фазы: 15 МПа

Длина волны: 220 нм

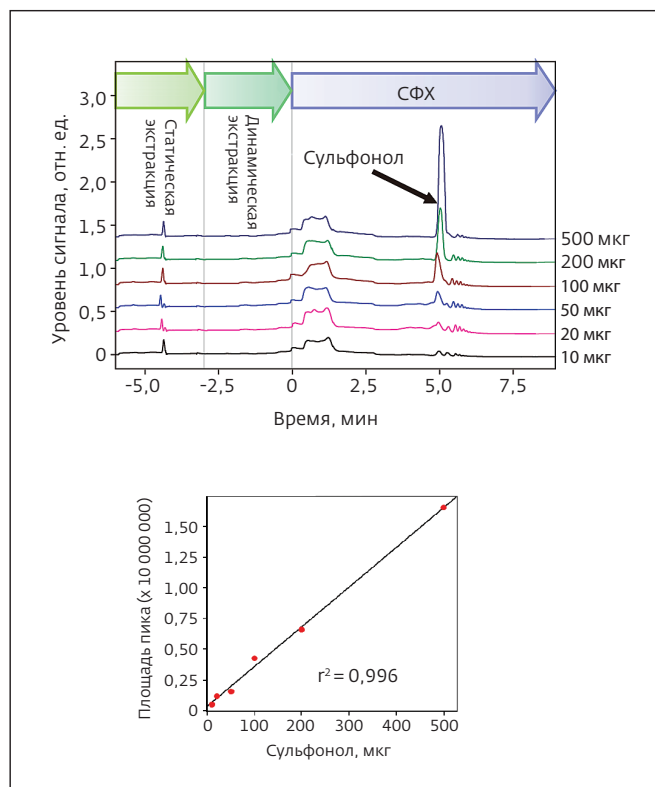


Рис.8. Количественное определение содержания сульфонола в сваб-дисках. Кривые сдвинуты по оси Y для наглядности

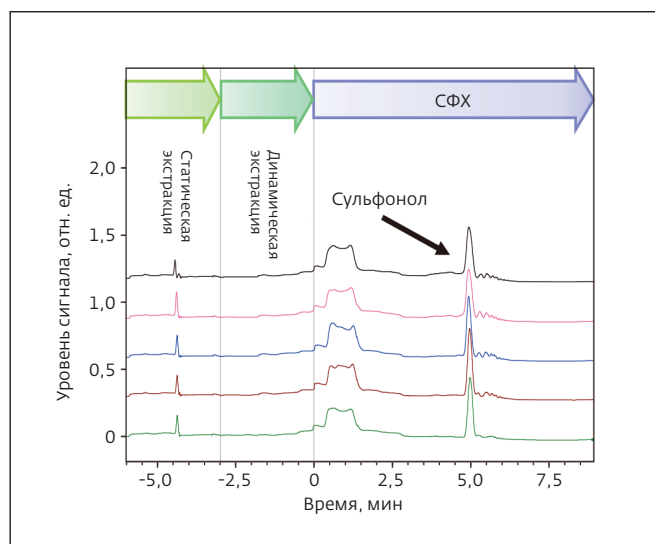


Рис.9. Воспроизводимость результатов количественного определения сульфонола в сваб-дисках. Кривые сдвинуты по оси Y для наглядности

ческого пика составили 0,19 и 5,76% соответственно.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что новая хроматографическая система

Shimadzu Nexera UC SFE-SFC-MS полностью отвечает всем запросам современной фармацевтической индустрии: высокоточная, быстродействующая, эффективная, экономичная.

