

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ (НИ ТГУ)

Химический факультет
Кафедра органической химии

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ В ГЭК
Руководитель ООП, канд.хим.наук,
доцент

_____ В.В. Шелковников
«__» _____ 2018 г.

ДИПЛОМНАЯ РАБОТА

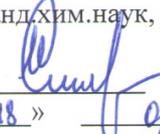
Методы дериватизации при ГХ и ГЖХ анализе карбоновых кислот

по специальности

04.05.01 – Фундаментальная и прикладная химия

Данилов Кирилл Аркадьевич

Зав. кафедрой органической химии,
канд.хим.наук, доцент


_____ Ю.Г. Слизов
« 18 » _____ 2018 г.

Руководитель ВКР
канд.хим.наук, доцент
_____ В.В. Хасанов

Автор работы
студ. группы № 08303

_____ К.А. Данилов

Томск – 2018

Томский государственный университет
Химический факультет
Кафедра *Органической химии*

«УТВЕРЖДАЮ»
Руководитель ООП, к.х.н., доцент
уч. степень, звание
В.В. Щелковников
инициалы, фамилия
подпись
«25» 12 2017 г.

ЗАДАНИЕ НА ДИПЛОМНУЮ РАБОТУ СПЕЦИАЛИСТА

студенту Данилову Кириллу Аркадьевичу группа 08303
фамилия, имя, отчество

1. **Тема выпускной работы** Методы дериватизации при ГХ и ГЖХ анализе карбоновых кислот

2. **Цели и задачи исследования** Цель: Разработка способа анализа микроколичеств органических карбоновых одноосновных кислот в водных объектах с пределом количественного обнаружения не более 1 мкг/л и приемлемой погрешностью

Задачи: Поиск способов экстракции, пригодных для концентрирования органических кислот C2-C20 из разбавленных растворов в воде, разработка этапов концентрирования, дериватизации и ГХ-анализа

3. **Объекты, методы исследования и оценка достоверности результатов** Объекты исследования- вода природная, вода водопроводная, стандартные растворы кислот в воде, методы исследования – газовая хроматография – масс – спектрометрия, оценка достоверности результатов – стандартная.

4. **Перечень основных этапов работы (сроки выполнения), ожидаемые результаты**
1. Литературный обзор (15.01.18-15.05.18 г.) 2. Экспериментальная часть – приготовление стандартных растворов кислот (15.02.18-1.05.18 г.). 3. Эксперимент на реальных объектах- вода речная, озерная, водопроводная. 4. Результаты исследования представлены в виде таблиц и графиков (1.03.18.-15.05.18). Ожидаемые результаты: разработка способа анализа карбоновых кислот C2-C20 в водных объектах на уровне до 1 мкг/л.

5. **Предприятие, организация, по заданию которого выполняется работа** НИ ТГУ

Зав. кафедрой ОХ

Руководитель выпускной работы
доцент каф. орг. химии ХФ
должность, место работы

подпись

Ю. Г. Слизов
инициалы, фамилия

подпись

В. В. Хасанов
инициалы, фамилия

Задание принял к исполнению 21.12.17
дата

подпись студента

Аннотация

Работа посвящена разработке метода анализа растворенного органического вещества в природных водах. Разработан способ анализа микроколичеств органических карбоновых одноосновных кислот в водных объектах. Поскольку свободные карбоновые кислоты мало подходят для качественного газохроматографического разделения (по причине образования прочных водородных связей с полярными группировками сорбентов), они требуют предварительной дериватизации. В работе рассмотрены достоинства и недостатки наиболее распространенных приемов дериватизации карбоновых кислот – силилирование, метилирование и т.д. Показано преимущество разработанного метода дериватизации алкилированием пентафторбензилбромидом в плане улучшения чувствительности определений и снижения трудоемкости анализов. Карбоновые кислоты извлекаются из подкисленной до pH 2-3 воды в свободном виде экстракцией гексаном, после чего гексановая вытяжка высушивается над содой и сухой остаток обрабатывается модификатором. Предложенная методика позволяет снизить трудозатраты, значительно облегчаются анализ и интерпретация результатов.

Работа изложена на 47 страницах, содержит 66 источников, 1 таблица, 1 рисунок, 10 приложений.

Ключевые слова

Карбоновые кислоты, природные воды, жидко-жидкостная экстракция, газовая хроматография – масс-спектрометрия



ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ

ГАХ – газо-адсорбционная хроматография

ГЖХ – газо-жидкостная хроматография

ГХ – газовая хроматография

ГХ – МС - газовая хроматография – масс-спектрометрия.

ЖЖЭ – жидко-жидкостная экстракция

m/z – отношению массы к заряду

ТМС - триметилсилил

PFBB – пентафторбензилбромид

TMCS – Триметилхлорсилан.

HMDS – Гексаметилдисилазан.

BSA – Бис-(Триметилсилил)ацетамид.

BSTFA – N, N-бис - (триметилсилил)трифторацетамид.

DMF - Диметилформаид

ТВН - Гидроксид тетрабутиламмония

СОДЕРЖАНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ	2
СОДЕРЖАНИЕ.....	3
ВВЕДЕНИЕ	5
1. Литературный обзор	6
1.1 Процедура жидко-жидкостной экстракции (ЖЖЭ)	7
1.2 Химическая модификация (дериватизация) сконцентрированных примесей	8
1.3 Описание химических процессов, протекающих в различных приемах дериватизации образцов.....	8
1.3.1 Реакции алкилирования и их механизм	8
1.3.2 Реакции силилирования и их механизм	12
1.4 Анализ состояния проблемы на основе изучения имеющихся на настоящий момент данных (анализ литературного обзора).....	15
1.4.1 Выбор способа концентрирования образцов.....	15
1.4.1 Другая подготовка образцов	16
1.5 Анализ состояния проблемы на основе изучения имеющихся на настоящий момент данных (анализ литературного обзора).....	19
2. Экспериментальная часть.....	21
2.1 Техника безопасности	21
2.2 Жидко-жидкостная экстракция	22
2.3 Подготовка образцов воды для анализа.....	Ошибка! Закладка не определена.
2.3 Описание процедуры анализа вод из различных источников ...	Ошибка! Закладка не определена.
2.4 Анализ органических кислот в воде методом газовой хроматографии- масс- спектрометрии (ГХ-МС)	23
3. Результаты и обсуждения.....	23
ВЫВОДЫ	26
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	27
ПРИЛОЖЕНИЕ А	32
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.1-Б.2	33
ПРИЛОЖЕНИЕ В.....	34
ПРИЛОЖЕНИЕ Г	35

ПРИЛОЖЕНИЕ Д.....	36
ПРИЛОЖЕНИЕ Ж.....	37
ПРИЛОЖЕНИЕ И	38
ПРИЛОЖЕНИЕ К.....	39
ПРИЛОЖЕНИЕ Л.....	40
ПРИЛОЖЕНИЕ М.....	42

ВВЕДЕНИЕ

Исследованиям органических соединений природной воды, их влияния на биологию и экологию посвящено множество работ. Разработке в этой области считаются приоритетными, помогающими устанавливать фундаментальные взаимосвязи между состоянием экосистемы и деятельностью человека, влиянием на изменение глобального климата [1-5]. Исследования посвящены изучению влиянию глобального потепления на состояние вечной мерзлоты в районе Восточной Сибири, исходя из состава и количества органического вещества, выносимого реками в Северный ледовитый океан [6-11]. Мониторингу динамики растворенного органического вещества (РОВ) в различных водах посвящен обзор [12], разработана методология выделения и изучения РОВ [13-26].

Актуальной задачей является изучение влияние таяния вечной мерзлоты на уровень и трансформацию органических веществ в поверхностных водах (реки и озера) [27-33].

При этом особый интерес представляет вопрос – возможно ли получить определенную зависимость между содержанием в природной воде отдельных классов органических соединений, например, карбоновых кислот, и исчезновением вечной мерзлоты, происходящей в результате потепления климата [38-47]. Другими словами, каким образом влияет таяние мерзлоты на состав и содержание карбоновых кислот, в природной воде (реки, озера) субарктической зоны Восточной Сибири.

Целью настоящей работы явилась разработка способа анализа микроколичеств органических карбоновых одноосновных кислот в водных объектах с пределом количественного обнаружения не более 1 мкг/л и приемлемой погрешностью.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи**:

1. Поиск способов экстракции, пригодных для концентрирования органических кислот C_2 - C_{20}
2. Разработка этапов концентрирования, дериватизации и ГХ-анализа.

Для решения поставленных задач был использованы следующие физико-химические методы исследования: газовая хромато-масс-спектрометрия.

В ходе работы были исследованы вода природная, вода водопроводная, стандартные растворы кислот в воде.

1. Литературный обзор

Поскольку содержание РОВ в природных водах достаточно мало, процедуры концентрирования органики из природной воды являются неизбежными [48-51, 53], после чего уже идет анализ этого сконцентрированного РОВ [50, 52-56].

Жидкостно-жидкостная экстракция на основе обратимого химического комплексобразования представляет собой эффективный метод разделения, который является высокоэффективным и селективным для отделения полярных органических кислот (монокарбоновых кислот) от их водной среды [49].

В методах экстракции в роли растворителя выступают неполярные растворители, которые смешиваются с водой, чтобы извлечь целевое соединение из воды с использованием большей растворимости целевого соединения в растворителе чем вода. В идеальном случае, один растворитель селективно экстрагирует целевое соединение с использованием растворителя, полярность которого близка к полярности целевого соединения. Летучие растворители, такие как гексан, бензол, простой эфир, этилацетат и дихлорметан обычно используют для экстракции полу летучих соединений из воды. Гексан подходит для экстракции неполярных соединений, таких как алифатические углеводороды, бензол подходит для ароматических соединений, эфиры и этилацетат подходят для относительно полярных соединений, содержащих кислород [39]. Дихлорметан обладает высокой эффективностью экстракции для широкого диапазона неполярных полярных соединений. Дихлорметан подходит для анализа из-за следующих преимуществ: его точка кипения низкая и легко реконцентрировать после извлечения, его легко отделить от воды из-за его более высокой удельной массы, и это не воспламеняется. Однако дихлорметан, как и бензол, является канцерогенным, а по последним тенденция имеют необходимо воздерживаться от использования этих растворителей в жидкостно-жидкостных экстракциях. Иногда возможно селективное извлечение полу летучих соединения из воды, изменяя характер проб, а не изменяя растворители. Например, путем изменения pH образцов, только кислотные или основные вещества могут быть извлеченным. Когда pH воды меньше 3, основные соединения полностью ионизируются и не экстрагируется растворителем, что позволяет селективно экстрагировать кислотные и нейтральные соединения [51].

При экстрагировании соединений, которые относительно хорошо растворяются в воде, методы высаливания используется для увеличения скорости извлечения. Добавление соли в водный образец уменьшает сольватную способность раствора и растворимость

соединений-мишеней. Это полезно не только для жидкостно-жидкостной экстракции, а также для твердофазной экстракции.

Экстракция обычно достигается путем встряхивания образца воды и растворителя в разделительной воронке. Однако, иногда образуются большие количества эмульсии, и из-за этого трудно отделить растворитель от водной фазы. Если это происходит, эмульсию можно эффективно диспергировать (разделить) путем либо добавления небольшого количества этанола, либо ультразвуковой обработкой смеси в ультразвуковой ванне, либо добавлением безводного сульфата натрия или, иначе, непрерывная экстракция жидкость-жидкостью может превратиться в образец, который образуют эмульсии. При непрерывных способах экстракции жидкость-жидкость растворитель постоянно циркулирует в специальной посуде, но, хотя этот метод имеет хорошую эффективность экстракции, он не подходит для термически нестабильных соединений, потому что время экстракции является длительным [49-56].

1.1 Процедура жидко-жидкостной экстракции (ЖЖЭ)

Жидкостно-жидкостная экстракция (ЖЖЭ) является одним из методов концентрирования примесей и широко применяется в аналитической практике. ЖЖЭ позволяет проводить относительное и абсолютное концентрирование примесей самой различной природы. Метод ЖЖЭ рекомендован для определения токсикантов в воде Американским агентством по защите окружающей среды (United States Environmental Protection Agency – US EPA). Жидкофазная экстракция является основой большинства методик, рекомендованных государственными стандартами РФ для анализа вод различного происхождения

Экстракция представляет собой распределение, т.е. одновременное и взаимосвязанное растворение вещества в двух соприкасающихся жидких фазах. Растворение и экстракция – это процессы, в которых наиболее заметно проявляется взаимодействие межмолекулярных сил. Межфазное равновесие достигается в результате влияния ряда факторов, действующих между молекулами экстрагируемого вещества и экстрагента. Одним из таких факторов является взаимодействие за счет Ван-дер-Ваальсовых сил, наблюдаемых между незаряженными молекулами (физический механизм экстракции). Различают три слагаемых этого взаимодействия:

- ориентационное (диполь-дипольное) взаимодействие, возникающее при наличии у несимметричных молекул постоянного диполя;

- индукционное взаимодействие, проявляемое в тех случаях, когда постоянный диполь молекулы создает в соседней неполярной молекуле индуцированный диполь;
- дисперсионное взаимодействие, происходящее между неполярными молекулами.
-

Вторым видом взаимодействия является сольватация одной или несколькими молекулами экстрагента с образованием сольвата определенного состава (специфическая сольватация). Сольватация происходит вследствие донорно-акцепторного взаимодействия (образование π -комплексов) или под влиянием межмолекулярных водородных связей.

Третьей причиной экстракции может быть химическое взаимодействие растворенного соединения с экстрагентом или со специально введенными реагентами, приводящее к образованию экстрагируемых соединений. Сюда относится экстракция веществ в виде солей, ионных ассоциатов, внутрикомплексных соединений [44-48].

1.2 Химическая модификация (дериватизация) сконцентрированных примесей

Содержание анализируемых соединений после экстракции все еще недостаточное для количественного определения, а степень концентрирования примерно 100x –1000x (даже с учетом полной сорбции и десорбции). Кроме того, соединения находятся в виде, в котором они трудно определяются обычными методами ГХ и ВЭЖХ и чувствительность определения в таком состоянии будет мала. Часто и состав элюента непригоден для непосредственного анализа в ВЭЖХ или ГХ, или несовместим с подвижной фазой и сорбентами ВЭЖХ, или колонки для ГХ [58-60].

Поэтому элюат с десорбированными компонентами высушивают в гомогенизаторе-диспергаторе ротор-статоре Heidplph и подвергают дериватизации. Эти операции позволяют довести степень концентрирования до нескольких тысяч раз и более.

1.3 Описание химических процессов, протекающих в различных приемах дериватизации образцов

1.3.1 Реакции алкилирования и их механизм

Как и другие реагенты дериватизации, реагенты алкилирования уменьшают молекулярную полярность путем замены активных водородов алкильной группой, R-COOH, R-OH, -SH, R-SH, R-NH-R, R-NH₂, R-CONH₂, R-CONH-R 'и R-COCH₂-CO-R', с дериватирующим агентом. Эти реагенты используются для модификации соединений, имеющих кислотные водороды, как карбоновые кислоты и фенолы. Замена такого водорода алкильной группой важна в хроматографическом анализе, так как это уменьшает полярность производного вещества. Уменьшение полярности и межмолекулярной ассоциации особенно важны для анализа с помощью газовой хроматографии и масс-спектрометрии [41].

Алкилирование слабых кислотных групп, таких как спирты, требует сильного основного катализатора (метоксид натрия, метилат калия). Более сильные кислотные группы, такие как фенолы и карбоновые кислоты, требуют меньших катализаторов (трифторид бора).

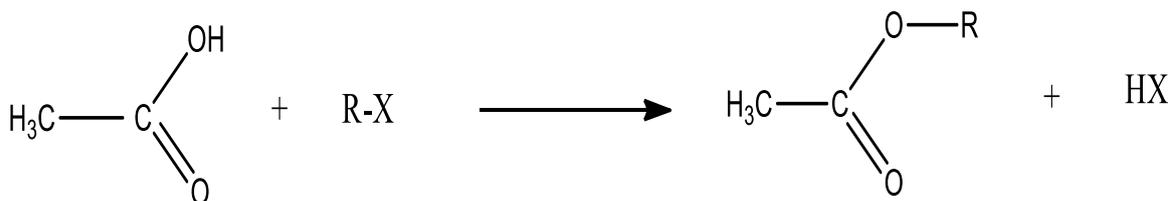


Рис. 1 – реакция алкилирования карбоновых кислот.

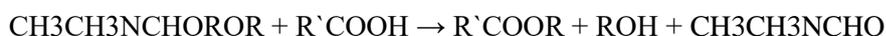
Хроматография, в которой используется эта реакция, представляет собой превращение органических кислот в сложные эфиры, которые дают лучшие хроматограммы, чем свободные кислоты.

Реакции алкилирования также могут быть использованы для получения простых эфиров, тиоэфиров, N-алкиламинов, амидов и сульфонамидов. Поскольку кислотность активного водорода уменьшается, необходимо использовать более сильный алкилирующий реагент. Когда реагенты и условия становятся более жесткими, селективность и применимость метода становятся более ограниченными.

В общем, продукты алкилирования менее полярны, чем исходные материалы, поскольку активный водород бы замещен алкильной группой. Образованные сложные эфиры имеют отличную стабильность и могут изолироваться и храниться в течение продолжительных периодов, если это необходимо. При этерификации кислота реагирует со спирт с образованием сложного эфира. В реакции катализатор чаще всего представляет собой неорганическую кислоту, такую как соляной кислоты или тионилхлорида, что рекомендуется, например, в трансэтерификацию жиров или масел

Диметилформаид (DMF)

N,N-Диметилформаид – (CH₃CH₃NCHOROR) используют для этерификации кислот в их метиловые эфиры. Диалкилацетали имеют более широкая применимость для дериватизации ряда функциональных групп, содержащих активные водороды. Поскольку основным продуктом реакции являются диалкилацетали (ДМФ), выделение производной не требуется, и реакционную смесь можно вводить непосредственно в газовый хроматограф. Этот реагент - отличный выбор для дериватизация соединения, для которого недоступен опубликованный метод. Реакция между диметилацеталем N,N-диметилформаидом и карбоновой кислотой выглядит следующим образом [41]:



Диазометан (N₂CH₂)

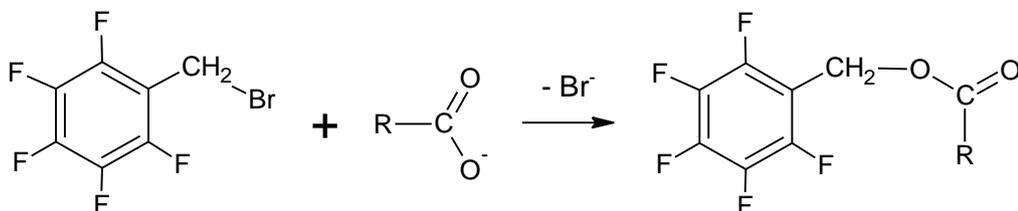
Диазометан (N₂CH₂) представляет собой самый быстрый и чистый метод для получения аналитических количеств метиловых сложных эфиров. Реакция диазометана с карбоновой кислотой является количественной и по существу мгновенный в эфирных растворах. В присутствии небольшого количества метанола в качестве катализатора, диазометан быстро реагирует с жирными кислотами, образуя метиловые эфиры. Устранение газов азота ведет реакцию вперед. Реакция превращения карбоновых кислот в метиловые эфиры (уравнение 3) описаны ниже:



Выход высокий, побочные реакции минимальны. Размеры пробы 100 - 500 мкл легко дериватизируются и выделение метиловых эфиров является простым и количественным, когда речь идет о кислотах с длиной цепью от C₈ до C₂₄. Однако следует соблюдать осторожность при обращении с диазометаном, поскольку он является канцерогенным, высокотоксичным и потенциально взрывоопасным.

Pentafluorobenzyl bromide (PFBBr)

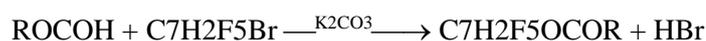
Пентафторбензилбромид (C₇H₂F₅Br) может быть использован для этерификации фенолов, тиолов и карбоновых кислот. Уравнение ниже является примером процесса дериватизации PFBBr:



Дериватизация органических кислот:

Следующая процедура представляет собой вариацию методов, ранее использовавшихся для анализа органических кислот и фенолов. В данном методе образец экстрагируется для дериватизации органической кислоты / фенола. Его сначала сушат, пропуская нежный поток азота в образец. После выпаривания растворителя добавляют ацетон для приведения каждого образец до объема 500 мкл. В каждый образец добавляют 20 мкл 10% раствора PFBBr и 50 мкл 1,4,7,10,13,16-гексаоксациклооктадекан [C₂H₄O]₆ (эфир 18-краун-6 эфира), как в ацетоне. Приблизительно 10 мг калия добавляют к каждому экстракту, и экстракты ограничены и обрабатывали ультразвуком в течение трех часов. После завершения обработки ультразвуком ацетон испаряется путем пропускания нежный поток азота, и остаток растворяли в гексане для анализа ГХ.

Уравнение 5 ниже показывает химические реакции для превращения органических кислот и фенолов в их пентафторбензиловые эфиры и эфир, соответственно, с использованием пентафторбензила бромида (PFBBr).



Трифторид бора (BF₃) в метаноле или бутаноле

Трифторид бора (BF₃) в метаноле или н-бутаноле имеет общую формулу: F₃B:HO-C_nH_{2n}+1, где (n = 1 или 4). Этот реагент является удобным и недорогим способом получения сложных эфиров. Это чаще всего используют для образования метил

(бутилового) эфира путем его взаимодействия с кислотами, как показано следующее общее уравнение.



Реагент трифторида бора образует соединения фторбората реакцией с атмосферным кислородом и метанола и, следовательно, делает его склонным к нестабильности (Christie 1993). Следовательно, его всегда следует хранить при температуре холодильника, отброшенной через несколько месяцев использования.

Гидроксид тетрабутиламмония (ТВН)

Дериватизация карбоновой кислоты гидроксидом тетрабутиламмония (ТВН) образует сложный бутиловый эфир, что позволяет увеличить время удерживания в колонке GC. Реагент наиболее часто используется для низкомолекулярных кислот и особенно подходит для аминов с низкой молекулярной массой (Regis, 1999). Уравнение представляет собой реакцию дериватизации для превращения карбоновой кислоты в алкиловые эфиры с использованием ТВН.

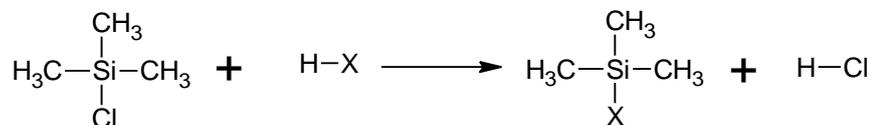


Следующая процедура дериватизации может быть использована для флэш-алкилирования, которая подходит для биологических жидкостей и анализа термически стабильных жирных кислот. Сначала биологическая жидкость или ткань экстрагируют с использованием толуола. Затем 4 мл экстракта переносят в ниппельную трубку и испаряют под нежным потоком газообразного азота при 60° C. 25 мкл раствора ТВН добавляют к растворяют остаток. Через 30 минут 4 мкл растворенного остатка вводят непосредственно из хроматографа. Температура впрыска устанавливается при 260° C или выше в GC инструмент.

1.3.2 Реакции силилирования и их механизм

Силилирование [57-60] довольно часто применяется при анализе соединений природного происхождения методами газовой хроматографии и масс-спектрометрии, вследствие ее простоты и доступности реагентов.

Механизм включает замену активного водорода (в группах -ОН, -СООН, -NH, -NH₂, и -SH) на триметилсилильную группировку -Si(CH₃)₃. Таким образом, силилирование, протекающее по механизму нуклеофильного замещения SN2 [61], протекает тем успешнее, чем легче отщепляется уходящая группа. Общий механизм показан ниже:



Уходящей группой в показанном случае с ТМКС является ион Cl⁻.

При проведении силилирования важно обеспечивать отсутствие влаги в образце и самом реагенте для силилирования. Реагенты для силилирования в общем очень чувствительны по отношению к влаге и должны храниться в герметично закупоренных контейнерах, а используемые растворители (наиболее часто применяется пиридин) должны быть очень чистыми и применяться в минимальных количествах. Все это предотвращает появление избыточных пиков, которых и в идеальных условиях образуется большое количество, усложняя идентификацию продуктов и обработку результатов. Реакционная способность соединений при силилировании может быть расположена в следующем ряду:

Спирты > фенолы > карбоновые кислоты > амины > амиды/гидроксиламины

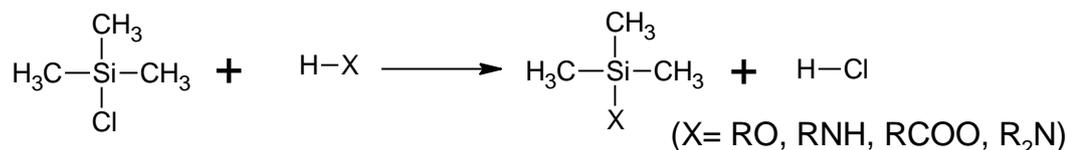
Среди спиртов наблюдается следующий порядок изменения реакционной способности:

Первичные > Вторичные > третичные

Наиболее часто применяемые для силилирования реагенты и их особенности

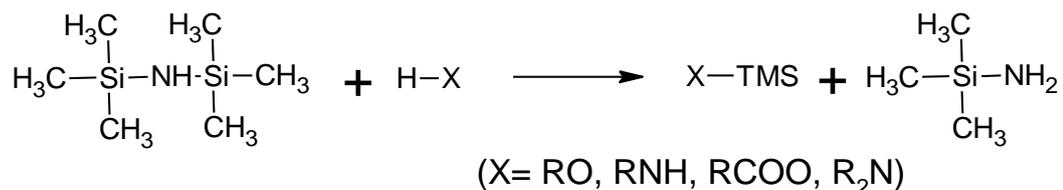
Триметилхлорсилан (ТМКС)

Триметилхлорсилан является относительно слабым реагентом, образующим в результате реакции соляную кислоту. Однако, он часто используется в качестве катализатора при силилировании другими реагентами. Пример реакции показан ниже.



Гексаметилдисилазан (HMDS)

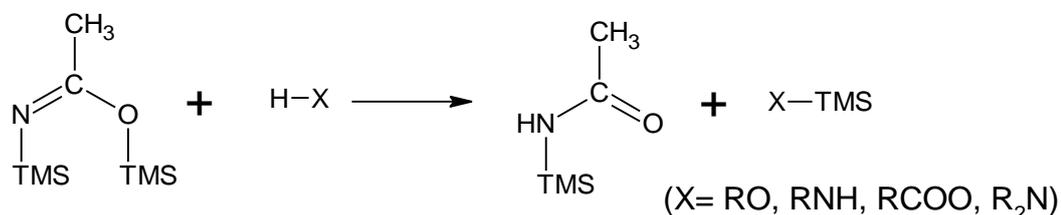
Симметричный гексаметилдисилазан является слабым реагентом, атакуя только соединения с активным водородом, подвергаясь легкому силилированию:



HMDS можно использовать для силилирования углеводов. Его можно использовать в смеси с пиридином и трифторуксусной кислотой. Процедура дериватизации проста и включает добавление к образцу 2 мл HMDS, 2 мл пиридина и 175 мкл трифторуксусной кислоты, после чего смесь прогревается при 60 °С в течение 1 часа.

Бис-(Триметилсилил)ацетамид (BSA)

BSA был первым широко использовавшимся реагентом для силилирования. Его способность к силилированию была обусловлена хорошей уходящей группой- ацетамидом. Реакции протекают в мягких условиях и образует относительно стабильные продукты, однако, пики побочных соединений триметилсилил-ацетамида могут иногда перекрывать пики интересующих продуктов модификации.



BSA образует стабильные триметилсилилпроизводные с большинством органических функциональных групп в мягких условиях, но их смеси могут легко окисляться до диоксида кремния, загрязняющего детекторы ионизации в пламени. Как показали эксперименты, BSA является очень эффективным реагентом, которого требуется небольшое количество. Более того, реакция протекает при комнатной температуре и с хорошей скоростью. Saraji и Mirmahdieh [59-60] изучали влияние различных параметров на дериватизацию внутри шприца. Было изучено влияние количества BSA, времени и температуры реакции. Было показано, что 0,2 мкл BSA является достаточным количеством для дериватизации за 2 минуты при комнатной температуре.

Бис(триметилсилил)трифторацетамид (Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA)

N, N-бис-(триметилсилил)трифторацетамид (BSTFA) подобно BSA является наиболее популярным реагентом для силилирования. Он также легко реагирует с большинством органических функциональных групп, давая высокие выходы продуктов силилирования. Gerhke разработал метод, при котором несколько мг карбоновой кислоты помещают в сосуд и добавляют 50 мкл BSA или BSTFA.

Реакция заканчивается за секунды, но для уверенности полноты протекания смесь нагревают 5-10 минут при 60 °С. BSTFA реагирует быстрее и полнее, чем BSA, благодаря трифторацетамидной уходящей группе. В результате получают прозрачные растворы триметилсилилпроизводных кислот, фенолов и спиртов, готовые для анализа на хроматографе.

Существует большое количество литературы, описывающей силилирующие агенты и способы дериватизации силилированием, алкилированием и другими методами. Имеются многочисленные бюллетени химических компаний, производящих коммерчески доступные продукты для силилирования с подробными описаниями свойств агентов и методов дериватизации ими [59,61,63].

1.4 Анализ состояния проблемы на основе изучения имеющихся на настоящий момент данных (анализ литературного обзора)

В результате изучения литературных данных по проблеме можно сделать следующие выводы.

1.4.1 Выбор способа концентрирования образцов

Широко распространенными техниками концентрирования экстрактов путем отгонки растворителя являются упаривание в ротационном испарителе и отгонка в токе азота.

Ротационный испаритель применяют в том случае, когда исходный объем экстракта достаточно велик, ориентировочно более 10 мл. Как правило, экстракт не упаривают досуха, а оставляют небольшой объем 0.5-5 мл. Растворитель удаляется под вакуумом при равномерном нагреве в водной бане.

Если определение проводят с применением стандартов-суррогатов, то в колбе оставляют, как правило, небольшой объем экстракта порядка 0.5 мл. При помощи шприца в него вносят стандарт выхода, а затем переносят экстракт из колбы непосредственно в виалу для готовой пробы. Полмиллилитра экстракта можно без затруднений перенести в виалу на 1 мл даже из колб объема 100-200 мл – все дело в тренировке [42].

По-другому поступают, если определение проводят без применения стандартов-суррогатов, то есть методом внешнего стандарта, или же внутреннего стандарта, когда стандарт добавляют непосредственно перед вводом пробы в хроматограф. В этом случае потери при переносе экстракта из колбы недопустимы, поэтому оставляют по крайней мере несколько миллилитров упаренного экстракта, которые по возможности количественно переносят в пробник (колбу можно промыть небольшим количеством растворителя и добавить смыв к экстракту). Из пробника остаток растворителя удаляют в токе азота [57].

1.4.1 Другая подготовка образцов

ЖЖЭ применяют как с целью получения первоначального экстракта, так в целях дополнительной обработки проб.

Первоначальную экстракцию методом ЖЖЭ очень часто применяют для извлечения органических соединений из водных образцов. Основной целью здесь является перевод целевых соединений в фазу более летучего и менее полярного по сравнению с водой органического растворителя.

Жидкость-жидкостной экстракцией из водных образцов большого объема порядка 0.1-2 л небольшими объемами экстрагента порядка 3 x 5-15 мл можно достичь значительной степени концентрирования до 1:100. Если целевые соединения нелетучи, то степень концентрирования можно увеличить путем отгонки растворителя из полученного экстракта.

Этот подход, однако, также ограничен степенью насыщенности исходного водного образца компонентами матрицы. Поскольку ЖЖЭ обладает сравнительно низкой селективностью, значительная часть компонента матрицы переходит вместе с целевыми соединениями в экстракт. Попытка отогнать растворитель из такого экстракта может привести к выпадению осадка, загустеванию т.д., то есть к потере экстрактом гомогенности. По этой причине ЖЖЭ из больших объемов водных образцов бывает успешна для сравнительно «чистых» образцов и проблематична для «грязных» [47,48].

К очень проблематичным можно причислить морально устаревший подход с использованием ЖЖЭ для первоначальной экстракции различных соединений из гидролизатов жира и жиросодержащих продуктов. Как правило, все заканчивается получением вместо «чистого» экстракта устойчивого геля, который сложно разрушить даже специальными методами.

Типичными экстрагентами для ЖЖЭ из водных образцов являются гексан (верхний слой) и хлористый метилен (нижний слой). Реже, в основном для экстракции наиболее полярных соединений, применяют этилацетат и диэтиловый эфир.

ЖЖЭ также применяют и для извлечения полярных органических веществ из образцов в углеводородных растворителях: гексане, циклогексане, изооктане. В качестве экстрагентов применяют полярные несмешивающиеся с гексаном растворители: ацетонитрил, ДМСО, ДМФА – а также смеси ацетонитрила с водой в различном соотношении.

Так, классическим способом выделения полярных и полиароматических соединений из гексановых экстрактов, содержащих жиры и высшие углеводороды, является жидкостная экстракция гексаном. Конечно, этот метод неселективен, и коэффициенты извлечения зависят от типа матрицы, однако он прост, чего в ряде случаев бывает достаточно.

ЖЖЭ нередко применяют и для очистки проб. К примеру, для удаления из гексановых экстрактов, содержащих неполярные целевые соединения, сопутствующие соединения основного характера экстракт промывают водным раствором фосфорной (реже серной) кислоты; для удаления соединений кислого характера применяют раствор аммиака. Промывкой водного экстракта с полярными целевыми соединениями гексаном можно удалить неионные детергенты.

Определенные трудности с количественным извлечением методом ЖЖЭ могут возникнуть в том случае, когда целевые соединения способны связываться с компонентами матрицы за счет межмолекулярных сил [49].

Первым типичным примером является ЖЖЭ из плазмы крови полярных биологически активных соединений, которые нередко бывают в значительной степени связаны с транспортными белками, альбуминами, которые в данном случае являются компонентами матрицы. Связывание происходит за счет «полярных» взаимодействий: электростатических, водородных связей и т.д. Целевые соединения в принципе способны

раствориться в водной среде экстрагируемого образца – необходимо лишь разрушить взаимодействия, связывающие их с белками. Это достигается в основном высаливанием, то есть добавлением в образец сильных электролитов. Если целевые соединения ионные, то вместе с этим необходимо изменить рН образца для перевода аналитов в молекулярную форму.

Существует вариант высаливания, когда весь жидкий образец (например, плазма крови) после изменения рН растирается с безводной солью (к примеру, сульфатом натрия) до получения влажной порошкообразной массы, которая затем экстрагируется.

В качестве второго типичного примера связывания аналитов с компонентами матрицы можно привести ЖЖЭ из грунтовых вод любых неполярных соединений (например, полиароматических углеводородов, ПАУ). Грунтовые воды нередко содержат растворенные природные полимеры, которые в данном случае являются компонентами матрицы. Они хорошо адсорбируют из водного образца неполярные целевые соединения просто по причине низкой растворимости последних в воде. В этом случае для разрушения комплекса между аналитами и компонентом матрицы достаточно любым способом увеличить растворимость неполярных аналитов в водной среде. Этого достигают добавкой в водный образец небольшой, порядка 5-10 процентов, доли полярного органического растворителя, или же (реже) добавкой ионного ПАВ.

Преимущества ЖЖЭ:

- Простота метода: простота его реализации, выбора условий экстракции, доступность реагентов.
- «Всеядность» метода: жидкий образец не обязательно должен быть идеально гомогенным; в ряде случаев можно проэкстрагировать и эмульсию. Не допустимо лишь наличие осадка в образце (его необходимо предварительно отделить и экстрагировать далее отдельно).
- Для больших объемов образца скорость проведения ЖЖЭ выше, чем ТФЭ (твердофазной экстракции, см. далее).

Недостатки ЖЖЭ:

- Жидкость-жидкостная экстракция может оказаться достаточно трудоемкой, а иногда достаточно длительной и ресурсоемкой процедурой. Много зависит от специфики конкретной ситуации и выбранной техники ЖЖЭ.

- Проведение ЖЖЭ нередко осложняется образованием геля на границе между слоями, в результате чего слои бывает весьма проблематично отделить друг от друга. Более того, в подобных случаях извлечение целевых соединений, как правило, оказывается невысоким. Существует ряд способов разрушения коагуляционных структур (см. гл. «Способы разрушения эмульсий и коагуляционных структур»).
- Применение ЖЖЭ принципиально не позволяет добиться полного извлечения целевых соединений, поскольку это равновесный метод. Более того, коэффициент распределения может весьма сильно зависеть от типа и концентрации компонентов матрицы в экстрагируемом образце. Образование коагуляционных структур может приводить к еще большей невоспроизводимости степеней извлечения [57].

1.5 Анализ состояния проблемы на основе изучения имеющихся на настоящий момент данных (анализ литературного обзора)

Согласно литературным данным анализ карбоновых кислот возможен как в вариантах газовой, так и жидкостной хроматографии. Те и другие способы имеют как преимущества, так и недостатки. При анализе методами газовой хроматографии возможно использование масс-спектрального детектора и соответственно идентификация соединения, что немаловажно при анализе природных объектов в силу их комплексной природы. В настоящее время в распоряжении исследователя имеются достаточно обширные библиотеки масс-спектров соединений, в том числе пентафторбензиловых производных карбоновых кислот, а также и метиловых эфиров карбоновых кислот. Получение производных карбоновых кислот алкилированием концентратов образцов проблемой не является и осуществляется в довольно простой процедуре. Так что идентификация труда не составит. У этого способа есть и отрицательные стороны, которые заключаются в том, что приходится использовать только очень высококачественные колонки с индексом «для масс-спектрометрии (ms)», которые к тому же, сравнительно новые и не поврежденные в процессе эксплуатации, обеспечивают низкие значения фона масс-спектра и, соответственно, высокую чувствительность. Притом, что анализ карбоновых кислот в виде их пентафторбензильного катиона подразумевает использование программирования температуры термостата вплоть до 260-280°C, это накладывает определенные ограничения [64].

Что касается комбинации ВЭЖХ с масс-спектральным детектированием, к его преимуществам по сравнению с ВЭЖХ–УФ стоит отнести лишь большую

чувствительность. Но для реализации этого преимущества требуются более сложные варианты дериватизации, которые могут усложнять процессы разделения. Опять же, как и в обычном варианте ВЭЖХ, масс-спектральное детектирование очень подходит для анализа известных соединений и не имеет преимуществ по сравнению с вариантами ГХ–МС [65-66].

Учитывая все вышесказанное, для разработки способов анализа органического вещества природной воды была использована газовая хроматография с масс-спектральным детектированием (ГХ–МС) и алкилированием с пентафторбензилбромидом в качестве дериватизации, как наиболее простым способом пробоподготовки [60].

2. Экспериментальная часть

2.1 Техника безопасности

Помещение химической лаборатории должно быть просторным и светлым. Лаборатория должна быть снабжена необходимыми приборами и оборудованием [57]. В лаборатории должна быть хорошая вентиляция, необходимо наличие вытяжного шкафа, в котором проводят работы с использованием дурно пахнущих или ядовитых соединений, а также обжиг различных веществ. В специальных вытяжных шкафах хранят легколетучие, вредные, дурно пахнущие и легковоспламеняющиеся вещества (кислоты и щелочи, органические жидкости и др.). В лаборатории также необходимы водопровод, канализация, проводка электрического тока. Лаборатория должна иметь установку для дистилляции воды, так как все опыты нужно проводить только с использованием дистиллированной воды. Кроме рабочих столов в лаборатории должны быть письменные столы, шкафы и тумбочки для хранения посуды и реактивов, приборные столы для установки различных приборов.

При работе в химической лаборатории необходимо соблюдать следующие правила:

- Работа должна быть предварительно спланирована учащимся и одобрена преподавателем.
- На лабораторном столе во время работы не должно быть посторонних предметов.
- В лаборатории следует работать в хлопчатобумажном халате, волосы должны быть убраны.
- Строго запрещается принимать в лаборатории пищу.
- До и после выполнения работы необходимо вымыть руки.
- Работать нужно аккуратно, результат опыта зависит от чистоты проведения эксперимента.
- Все опыты с ядовитыми и пахучими веществами выполнять в вытяжном шкафу.
- Химические реактивы брать только шпателем, пинцетом или ложечкой (не руками!).
- Неизрасходованные реактивы не высыпать и не выливать обратно в те сосуды, откуда они были взяты.
- Жидкости переливать через химические воронки. Слянку, из которой переливают жидкость, необходимо держать этикеткой к руке во избежание её порчи.
- При нагревании растворов и веществ в пробирке необходимо использовать держатель. Отверстие пробирки должно быть направлено в сторону от себя и других работающих.

- Нельзя наклоняться над сосудом, в котором происходит нагревание или кипячение жидкости.
- При необходимости определить запах выделяющихся при реакции газов нужно легким движением ладони направить струю газа от горла сосуда к себе и осторожно вдохнуть.
- При разбавлении концентрированных кислот и щелочей небольшими порциями приливать кислоту (или концентрированный раствор щелочи) в воду, а не наоборот.
- Опасные продукты реакции сливать только в соответствующие банки в вытяжном шкафу.
- Со всеми возникающими вопросами сразу же обращаться к преподавателю.

2.2 Жидко-жидкостная экстракция

Важнейшим этапом проведения процедуры ЖЖЭ является правильный подбор экстрагента. Анализ литературных данных приводит к заключению о том, что для извлечения из водных сред полярных органических соединений, таких как карбоновые и фенолкарбоновые кислоты, и других аналогичных соединений, наиболее подходящими являются гексан (верхний слой) и хлористый метилен (нижний слой). Реже, в основном для экстракции наиболее полярных соединений, применяют этилацетат и диэтиловый эфир. Так, классическим способом выделения полярных и полиароматических соединений из гексановых экстрактов, содержащих жиры и высшие углеводороды, является жидкостная экстракция гексаном. Конечно, этот метод неселективен, и коэффициенты извлечения зависят от типа матрицы, однако он прост, чего в ряде случаев бывает достаточно.

Все основные техники ЖЖЭ очень схожи между собой, и по сути различаются лишь по вовлекаемым в экстракцию объемами – как образца, так и экстрагента. Уникальной техникой является лишь жидкофазная микроэкстракция с применением полрой нити (LRME-NF). Традиционные, то есть наиболее трудоемкие и ресурсоемкие, методы ЖЖЭ все еще являются доминирующими.

Основной техникой продолжает оставаться экстракция в делительной воронке. Как правило, она осуществляется вручную, поскольку простые автоматы для перемешивания (т.н. «качалки») не могут обеспечить интенсивного встряхивания, которое как раз необходимо для быстрого установления адсорбционного равновесия.

Еще одно неудобство экстракции в делительной воронке проявляется при разделении слоев. В органический слой всегда попадает небольшая часть водного слоя, что в любом случае приводит к необходимости дополнительно осушать органический экстракт. Кроме того, проскакивающая часть водного слоя является «небольшой» только

относительно объемов экстрагента порядка десятков миллилитров, а для объемов в несколько миллилитров она уже недопустимо «большая». Поэтому при проведении экстракции в делительной воронке используют достаточно большие объемы экстрагента, по крайней мере, более десятка миллилитров.

2.3 Анализ органических кислот в воде методом газовой хроматографии- масс-спектрометрии (ГХ-МС)

Анализ органических соединений в концентратах из воды проводили на хромато-масс-спектрометре Agilent 7890 с детектором MSD 5975С. Анализировали пентафторбензиловые производные в условиях:

Колонка капиллярная кварцевая с полиамидным покрытием диаметром 0,25 мм и 30 м длиной, с привитым метил-фенил (5%) силиконовым покрытием, типа DB-5ms или аналогичная. Толщина привитой фазы на колонке составляет 0,25 мкм.

Анализ проводится в режиме с градиентом температуры по программе: 0-4 мин – 50 °С, подъем со скоростью 10 град. С/мин до температуры 290 °С и выдержка при этой температуре 20 мин. Температура испарителя 280 °С, температура переходной линии 290 °С, ионного источника – 220 °С, квадруполя- 150 °С. Режим ввода пробы- без деления, импульсный, с давлением (pulsed splitless), 17 psi, 40 сек, объем пробы 0,5 мкл. Режим детектора- scan 45-500 a.m.u. (a.e.m.). Метод ионизации – электронный удар (70 эВ).

Количественное определение проводят по характеристическим массам ($m/z=181$), калибровка- по стандартным растворам кислот в воде. Стандартные растворы кислот обрабатывают в таких же условиях, как и анализируемые образцы воды.

Типичная хроматограмма, записанная по полному ионному току (ПИТ) в режиме СКАН 45-500, представлена в ПРИЛОЖЕНИИ Б.

Хроматограммы, полученные в ходе проведения анализов представлены в приложениях В – П.

3. Результаты и обсуждения

Для достижения цели работы были проведены следующие исследования:

1. Отработка процесса экстракции гексаном
2. Оптимизация методики дериватизации пентафторбензилбромидом

3. Оптимизация процессов хроматографического разделения и обработки результатов измерений.

1. При отработке процесса экстракции изучали влияние на полноту извлечения карбоновых кислот рН среды, объема экстрагента (при однократной и повторной экстракциях). Было установлено, что лучшие результаты приносит подкисление образцов воды до рН 3.0. Для разных образцов воды требуется добавление от 1 до 2 мл концентрированной соляной кислоты на один литр воды. Образцы, доставляемые из регионов на анализ, подкисляют на месте отбора проб добавлением в них соляной кислоты (конц. HCl) в количестве 1 мл/л воды. Кислота добавляется в образцы для консервации и сохранения его состава стабильным, в противном случае, присутствующая микрофлора меняет состав и количество органических кислот в воде.

Было показано, что однократная экстракция гексаном обеспечивает вполне удовлетворительные результаты по извлечению карбоновых кислот, сокращая время и трудоемкость анализов. Двух-трехкратная экстракция гексаном позволяет увеличить выход экстрактивных веществ, но удлиняет время анализа, увеличивает его трудоемкость и снижает воспроизводимость результатов (увеличивает погрешность измерений). Степень извлечения кислот при экстракции составляет около 20% (для кислот C12-C22, для кислот с малым числом атомов углерода эта величина еще меньше), но эта цифра стабильна и позволяет количественные анализа.

При анализе карбоновых кислот в виде триметилсилильных производных хроматограмма по полному ионному току (ПИТ) имеет вид, представленный в ПРИЛОЖЕНИИ Б.

На нижней половине части ПРИЛОЖЕНИЯ Б приведен масс-спектр пика гексадекановой кислоты C16:0. Структура производного приведена там же. Масс-спектр содержит молекулярный ион очень малой интенсивности, определить который непросто из-за мизерной интенсивности. Гораздо более характерным является осколок [M-CH₃]⁺ (m/z=313), образующийся из молекулярного иона отщеплением метильного радикала CH₃. Вообще, для триметилсилиловых эфиров карбоновых кислот этот осколочный ион очень характерен. В ПРИЛОЖЕНИЯХ В, Г и Д приведены масс-спектры ТМС производных карбоновых кислот: C18:0, C15:0, C16:1. Все они похожи как на вышеприведенный масс-спектр пика кислоты C16:0, так и на масс-спектр пентадекановой кислоты C15:0 и пальмитолеиновой кислоты C16:1.

Количественное определение можно проводить, выстраивая хроматограмму по m/z, характерным для каждой из этих производных (m/z=299 – C15, 311 – C16:1, 313 – C16:0, 341

– C18:0, и так далее). Однако, это не совсем удобно, а что касается режима съемки, то приходится прибегать к сложной настройке программных переключений режимов SIM с учетом «окон» времени выхода каждой кислоты.

Гораздо удобнее представляется анализировать карбоновые кислоты в виде PFBB производных. В ПРИЛОЖЕНИЯХ Ж и И представлены хроматограммы разделения PFBB производных карбоновых кислот и соответствующих им масс-спектров

Фрагмент SIM хроматограммы того же образца воды с добавками кислот показан В ПРИЛОЖЕНИИ К и там отчетливо наблюдаются пики кислот, сама хроматограмма свободна от посторонних соединений.

Масс-спектры производных кислот очень схожи (ПРИЛОЖЕНИЕ Л). Различить их трудно по той причине, что пик молекулярного иона практически отсутствует. Масс-спектры различаются группами из трех малоинтенсивных пиков, соответствующих ацильному катиону кислоты [R-COO]⁺ и его двум осколкам, образующимся в результате потери молекул воды [R-COO- H₂O]⁺ [R-COO-2H₂O]⁺ (например, m/z=241, 223 и 205, характерным для пентадекановой кислоты).

Однако, количественная обработка результатов анализа по пику m/z=181 в масс-спектрах очень удобна и дает самые точные результаты. Примеры хроматограмм образцов представлены В ПРИЛОЖЕНИИ М.

Таблица с перечнем содержания кислот в образцах воды:

Образец	S пика*	**С, мкг/л	S пика	С, мкг/л	S пика	С, мкг/л
	C15		C16		C18	
Реагенты бланк	30	0,02	187	0,11	62	0,04
Вода очищенная 1	16	0,01	326	0,18	147	0,10
Вода очищенная 2	166	0,11	1431	0,81	243	0,17
Монодистиллят	148	0,10	1653	0,93	102	0,07
Речная вода SN1	986	0,66	3906	2,21	1093	0,76
Стандарт в воде	21000	14,00	17000	9,60	11000	7,60

*(выражается в импульсах*мин, приведена в масштабе 1:1000)

** (концентрация 1 мкг/л примерно эквивалентна ½ чайной ложки вещества на олимпийский бассейн – 3 125 куб. м воды)

ВЫВОДЫ

1. Пентафторбензиловые (PFBB) производные карбоновых кислот дают очень сходные друг с другом масс-спектры с очень мало интенсивным молекулярным ионом. Основной сигнал в них принадлежит пентафторбензил-катиону ($m/z=181$), который образуется в одинаковых количествах, независимо от вида модифицированной карбоновой кислоты.
2. Количественное определение легко производится по площадям пиков на хроматограмме, записанной либо в режиме мониторинга выбранного иона (т.н. SIM), либо перестроенной из СКАН хроматограммы по $m/z=181$.
3. Дериватизация с PFBB облегчает серии анализов при мониторинге состояния воды (построенном на списке известных кислот), облегчая количественные расчеты, но из-за малоинформативных масс-спектров трудно применима при качественном анализе.



СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. R.L. Tate. Soil Organic Matter: biological and Ecological Effects. Wiley, New York, 1987.
2. Guggenberger G., Kaiser K. Dissolved organic matter in soil: challenging the paradigm of sorptive preservation. *Geoderma*. 2003. V. 113. P. 293–310.
3. E.M. Thurman. Organic Geochemistry of Natural Waters. Nijhoff/Junk, Dordrecht, 1985.
4. Zsolnay A. Dissolved organic matter: artefacts, definitions, and functions. *Geoderma*. 2003. V. 113. P. 187–209.
5. A. Zsolnay. The prediction of the environmental function of the dissolved organic matter in ecosystems. Final Report of the European Science Foundation Exploratory Workshop. 2001. <http://www.esf.org/medias/0020L.pdf>.
6. G. Lüttig. Plants to peat: the process of humification. C.H. Fuchsman (Ed.), Peat and Water, Elsevier, Amsterdam, 1986. P. 73–87.
7. Zsolnay Á., Steindl H. Geovariability and biodegradability of water-extractable organic material in an agricultural soil. *Soil Biol. Biochem.* 1991. V. 23. P. 1077–1082.
8. Maurer L.G. Organic polymers in seawater. *Deep-Sea Res.* 1976. V. 23. P. 1059–1064.
9. F.J. Stevenson. Humus Chemistry. Wiley, New York, 1982.
10. Ghosh K., Schnitzer M. Model macromolecular structures of humic and fulvic acids *Soil Sci.* 1980. V. 129. P. 266–273.
11. Harvey G.R., Boran D.A., Chesal L.A., Tokar J.M. The structure of marine fulvic and humic acids *Mar. Chem.* 1983. V. 12. P. 119–132.
12. Kalbitz K., Solinger S., Park J.-H., Michalzik B., Matzner E. Controls on the dynamics of dissolved organic matter in soils: a review. *Soil Sci.* 2000. V. 165. P. 277–304.
13. Leenheer J.L. Comprehensive approach to preparative isolation and fractionation of dissolved organic carbon from natural waters and waste waters. *Environ. Sci. Technol.* 1981. V. 15. P. 578–587.
14. Sun L., Perdue E.M., McCarthy J.F. Using reverse osmosis to obtain organic matter from surface and ground waters. *Water Res.* 1995. V. 29. P. 1471–1477.
15. Guggenberger G., Zech W. Sorption of dissolved organic carbon by ceramic P-80 suction cups. *Z. Pflanzenernahr. Bodenkd.* 1992. V. 155. P. 151–155.
16. Wessel-Bothe S., Pätzold S., Klein C., Behre G., Welp G. Adsorption von Pflanzenschutzmitteln und DOC an Saugkerzen aus Glas und Keramik. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 2000. V. 163. P. 53–56.
17. Belin C., Quellec C., Lamotte M., Ewald M., Simon P. Characterization by fluorescence of the dissolved organic matter in natural water application to fractions obtained by tangential ultrafiltration and XAD resin isolation. *Environ. Technol.* 1993. V. 14. P. 1131–1144.

18. Blaser P., Heim A., Luster J. Total luminescence spectroscopy of NOM-typing samples and their aluminium complexes. *Environ. Int.* 1999. V. 25. P. 285–293.
19. Kalbitz K., Geyer W., Geyer S. Spectroscopic properties of dissolved humic substances – a reflection of land use history in a fen area. *Biogeochemistry.* 1999. V. 47. P. 219–238.
20. Kumke M.U., Löhmannsröben H.-G., Roch Th. Fluorescence spectroscopy of polyaromatic compounds in environmental monitoring. *J. Fluoresc.* 1995. V. 5. P. 139–153.
21. Laane R.W.P.M. Influence of pH on the fluorescence of dissolved organic matter. *Mar. Chem.* 1982. V. 11. P. 395–401.
22. Ohno T. Fluorescence inner-filtering correction for determining the humification index of dissolved organic matter. *Environ. Sci. Technol.* 2002. V. 36. P. 742–746.
23. Ewald M., Berger P., Visser S.A. UV–visible absorption and fluorescence properties of fulvic acids of microbial origin as function of their molecular weights. *Geoderma.* 1988. V. 43. P. 11–20
24. Tam S.-C., Sposito G. Fluorescence spectroscopy of aqueous pine litter extracts: effects of humification and aluminium complexation. *J. Soil Sci.* 1993. V. 44. P. 513–524.
25. Yang Y.H., Zhang D.H. Concentration effect on the fluorescence spectra of humic substances. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 1995. V. 26. P. 2333–2349.
26. Zsolnay Á., Baigar E., Jimenez M., Steinweg B., Saccomandi F. Differentiating with fluorescence spectroscopy the sources of dissolved organic matter in soils subjected to drying. *Chemosphere.* 1999. V. 38. P. 45–50.
27. Cox L., Celis R., Hermosín M.C., Cornejo J., Zsolnay Á., Zeller K. Effect of organic amendments on herbicide sorption as related to the nature of the dissolved organic matter. *Environ. Sci. Technol.* 2000. V. 34. P. 4600–4605.
28. Kalbitz K., Popp P. Seasonal impacts on β -hexachlorocyclohexane concentration in soil solution. *Environ. Pollut.* 1999. V. 106. P. 139–141.
29. Kalbitz K., Wennrich R. Mobilization of heavy metals and arsenic in polluted wetland soils and its dependence on dissolved organic matter. *Sci. Total Environ.* 1998. V. 209. P. 27–39.
30. Marschner B. DOM-enhanced mobilisation of benzo(a)pyrene in a contaminated soil under different chemical conditions. *Phys. Chem. Earth.* 1998. V. 23. P. 199–203.
31. Pettine M., Camusso M., Martinotti W., Marchetti R., Passino R., Queirazza G. Soluble and particulate metals in the Po River factors affecting concentrations and partitioning. *Sci. Total Environ.* 1994. V. 145. P. 243–265.
32. Staunton S., Dumat C., Zsolnay Á. Possible role of organic matter in radiocaesium adsorption in soils. *J. Environ. Radioact.* 2002. V. 58. P. 163–173.

33. Steinweg B., Zsolnay Á. Untersuchungen zur in-situ-Verfügbarkeit von wasserlöslichem Humus (DOM) und seiner Funktion als Sorbent für hydrophobe Schadstoffe. Mitt. Bodenkd. Ges. 1999. V. 91. P. 510–513.
34. Gu B., Doner H.E. Dispersion and aggregation of soils as influenced by organic and inorganic polymers. Soil Sci. Soc. Am. J. 1993. V. 57. P. 709–716.
35. Haag W.R., Hoigne J. Singlet oxygen in surface waters: 3. Photochemical formation and steady-state concentrations in various types of waters. Environ. Sci. Technol. 1986. V. 20. P. 341–348.
36. Goodroad L.L., Keeney D.R. Nitrous oxide emissions from soils during thawing. Can. J. Soil Sci. 1984. V. 64. P. 187–194.
37. Gustafsson O., Gschwend P.M. Aquatic colloids: concepts, definitions, and current challenges. Limnol. Oceanogr. 1997. V. 42. P. 519–528.
38. H.Haken, H.C. Wolf. Molekülphysik und Quantenchemie. Springer, Heidelberg, 1992.
39. Hutchins S.R., Tomson M.B., Bedient P.B., Ward C.H. Fate of trace organics during land application of municipal wastewater. CRC Crit. Rev. Environ. Control. 1985. V. 15. P. 355–416.
40. Kalbitz K., Schmerwitz J., Schwesig D., Matzner E. Biodegradation of soil-derived dissolved organic matter as related to its properties. Geoderma. 2003. V. 113. P. 273–291.
41. Derivatization Reactions and Reagents for Gas Chromatography Analysis - http://cdn.intechopen.com/pdfs/32817/InTech-Derivatization_reactions_and_reagents_for_gas_chromatography_analysis.pdf.
42. Analytical methods. Outline of chemical analysis in the environment - <https://www.env.go.jp/en/chemi/pops/Appendix/04-GuideLine/04Chapter3.pdf>
43. Downstream Processing Prof. Mukesh Doble Department of Biotechnology Indian Institute of Technology, Madras - <http://nptel.ac.in/courses/102106022/1>
44. Joerg Koch, Glenn Shiveler, November 2015 - Design Principles for Liquid-Liquid Extraction - <https://www.aiche.org/resources/publications/cep/2015/november/design-principles-liquid-liquid-extraction>
45. Derivatization Reagents For Selective Response and Detection in Complex Matrices - <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/migrationresource4/Derivatization%20Rgts%20brochure.pdf>
46. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16574135>
47. Zsolnay Á., Görlitz H. Water extractable organic matter in arable soils: effects of drought and long-term fertilization. Soil Biol. Biochem. 1994. V. 26. P. 1257–1261.

48. Roubef, V., Mounier, S., Benaim, J.Y., 2000. [Solid phase extraction applied to natural waters](#): efficiency and selectivity. *Organic Geochemistry* 31, 127-131.
49. Dittmar, T., Koch, B., Hertkorn, N., Kattner, G., 2008. [A simple and efficient method for the solid-phase extraction of dissolved organic matter \(SPE-DOM\) from seawater](#). *Limnology and Oceanography: Methods* 6, 230–235.
50. Kim, S., Simpson, A.J., Kujawinski, E.B., Freitas, M.A., Hatcher, P.G., 2003b. [High resolution electrospray ionization mass spectrometry and 2D solution NMR for the analysis of DOM](#) extracted by C18 solid phase disk. *Organic Geochemistry* 34, 1325–1335.
51. Spencer, R.G., Aiken, G.R., Dyda, R.Y., Butler, K.D., Bergamaschi, B.A., Hernes, P.J., 2010. [Comparison of XAD with other dissolved lignin isolation techniques](#) and a compilation of analytical improvements for the analysis of lignin in aquatic settings. *Organic Geochemistry* 41, 445–453.
52. Minor, E. C., Steinbring, C.J., Longnecker, K., 2012. [Characterization of dissolved organic matter in Lake Superior](#) and its watershed using ultrahigh resolution mass spectrometry. *Organic Geochemistry* 43, 1–11.
53. D’Andrilli, J., Chanton, J. P., Glaser, P.H., Cooper, W.T., 2010. Characterization of [dissolved organic matter in northern peatland soil porewaters by ultra high resolution](#) mass spectrometry. *Organic Geochemistry* 41, 791–799.
54. Kido Soule, M.C., Longnecker, K., Giovannoni, S.J., Kujawinski, E.B., 2010. [Impact of instrument and experiment parameters on reproducibility of ultrahigh resolution ESI FT-ICR](#) mass spectra of natural organic matter. *Organic Geochemistry* 41, 725–733.
55. Ball, G. I., Aluwihare L. I., [CuO-oxidized dissolved organic matter \(DOM\) investigated with comprehensive two dimensional gas chromatography-time](#) of flight-mass spectrometry (GC-GC-TOF-MS). *Organic Geochemistry* 75 (2014) 87–98.
56. Burns, K.A., Hernes, P.J., Brinkman, D., Poulsen, A., Benner, R., 2008. [Dispersion and cycling of organic matter from the Sepik River outflow to the Papua New Guinea coast](#) as determined from biomarkers. *Organic Geochemistry* 39, 1747–1764.
57. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) - <http://www.chromforum.ru/>
58. Silylating Agents. Derivatization Reagents. Protecting-Group Reagents. Organosilicon Compounds. Analytical Applications. Synthetic Applications. 1995, Fluka Chemie AG. CH-9471 Buchs, Switzerland. ISBN 3-905617-07-2.
59. Silylation and Silanes in Organic Synthesis. Alfa Aesar booklet. www.alfa.com
60. F. Orata (2012). Derivatization Reactions and Reagents for Gas Chromatography Analysis, *Advanced Gas Chromatography - Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications*, Dr. Mustafa Ali Mohd (Ed.).

61. Sobolevsky T.G., Alexander I. R., Miller B., Oriedo V., Chernetsova E. S., Revelsky I. A. Comparison of silylation and esterification/acylation procedures in GC-MS analysis of amino acids. *Journal of Separation Science*. 2003. V. 26, No 17, P. 1474–1478.
62. A. E. Pierce. *GC Derivatization. Applications Handbook & Catalog*. 2004.
63. Supelco. BSTFA+TMCS. Product Specification Bulletin T496021A. 1997, Sigma-Aldrich Co.
64. Derivatization Reagents For Selective Response and Detection in Complex Matrices. Bulletin T4071288. Sigma-Aldrich Co., 2011.
65. Deng P., Zhan Y., Chen X., Zhong D. Derivatization methods for quantitative bioanalysis by LC-MS/MS. *Bioanalysis*. 2012. V. 4. No. 1. P. 49–69.
66. Santa T., Al-Dirbashi O. Y., Fukushima T. Derivatization reagents in liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry for biomedical analysis. *Drug Discoveries & Therapeutics*. 2007. V. 1. No. 2. P. 108-118.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

time, min	1,0 литр	добавл	содерж	6_scan	6_sim
15.015				441	653
16.404	C13	6,2	6,2	6682	6093
17.274	C14	0,0	0,0	850	727
18.113	C15	14,0	14,0	23000	21000
18.922	C16	9,6	9,6	17000	17000
20.455	C18	7,6	7,6	6743	11000

Таблица А – времена удерживания карбоновых кислот.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б.1-Б.2

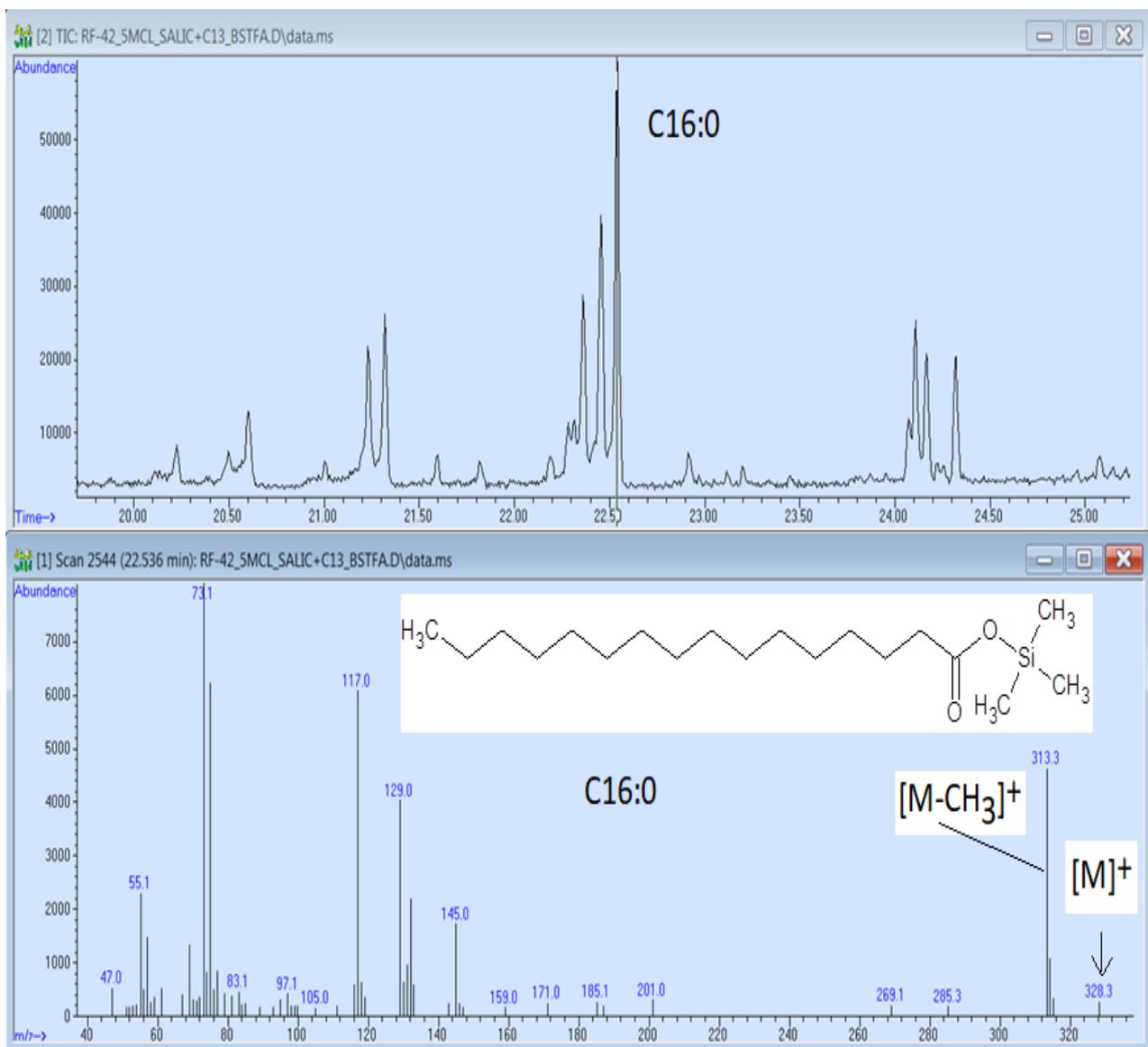


Рисунок Б.1 – Типичная хроматограмма ТМС - производных кислот по ПИТ.

Рисунок Б.2 – масс-спектр триметилсилильного эфира (ТМС-производная октадекановой кислоты)

ПРИЛОЖЕНИЕ В

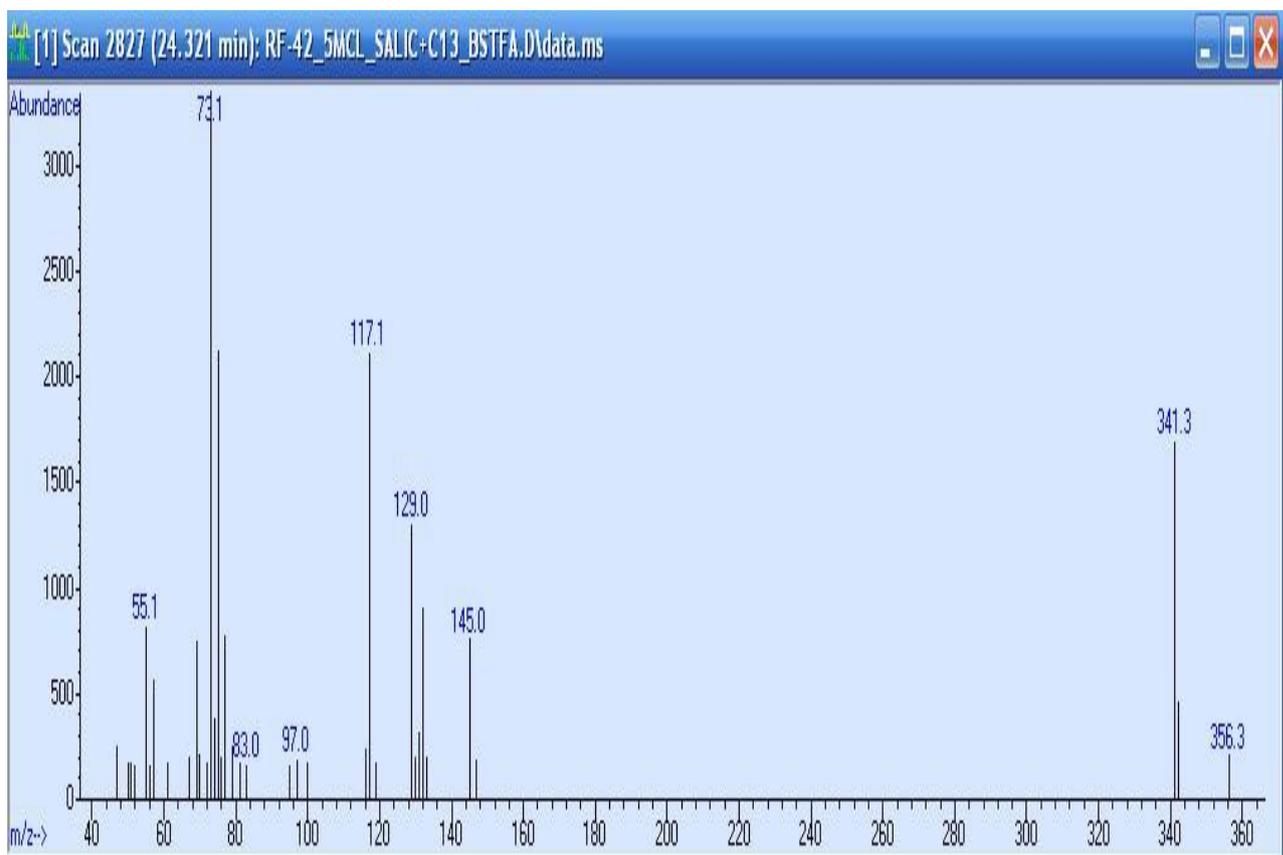
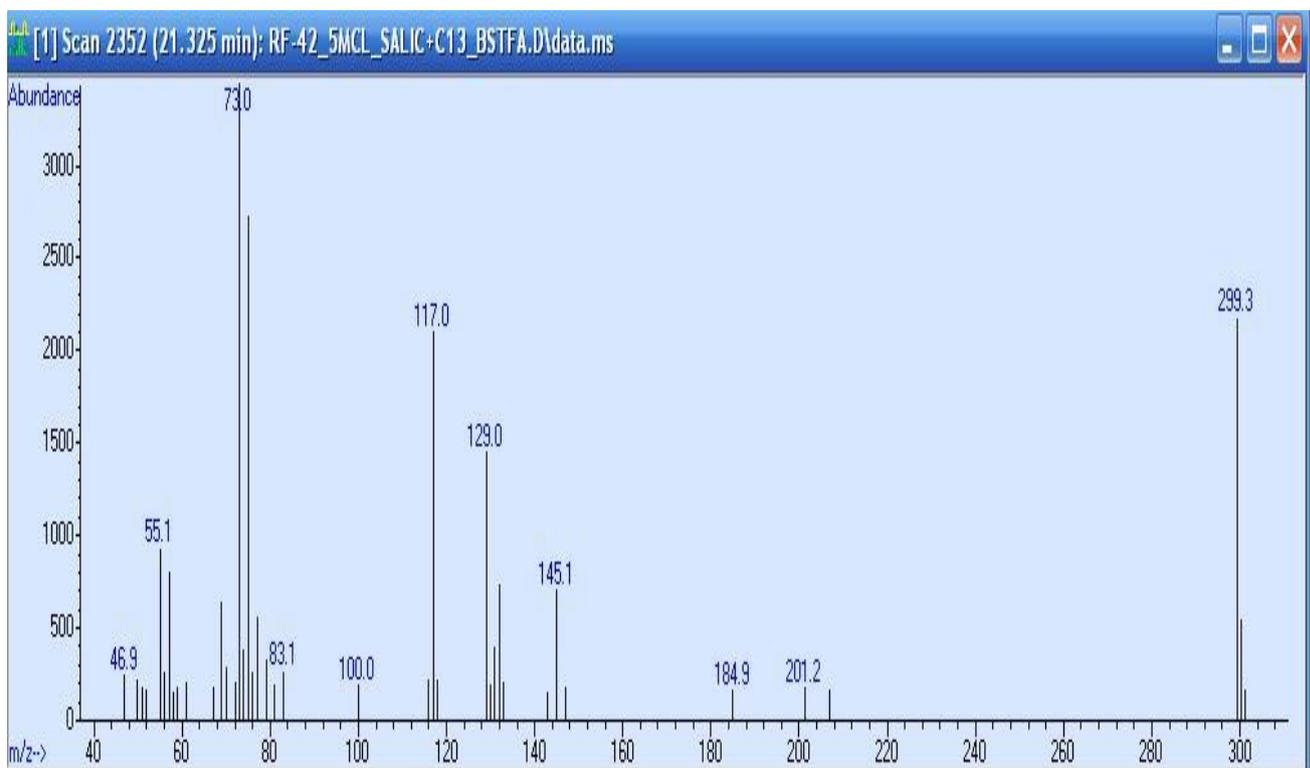


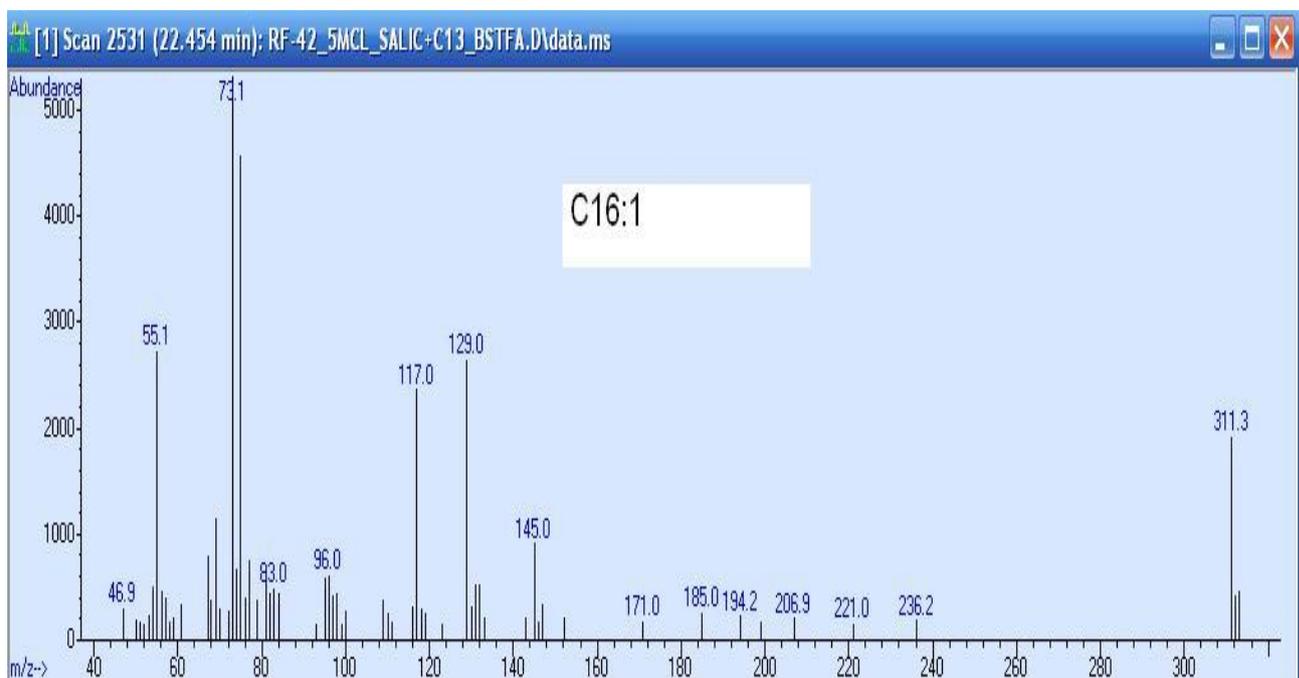
Рис. Приложения В. Масс-спектр пика ТМС-производного октадекановой кислоты C18:0 (время удерживания пика 24,32 мин).

ПРИЛОЖЕНИЕ Г



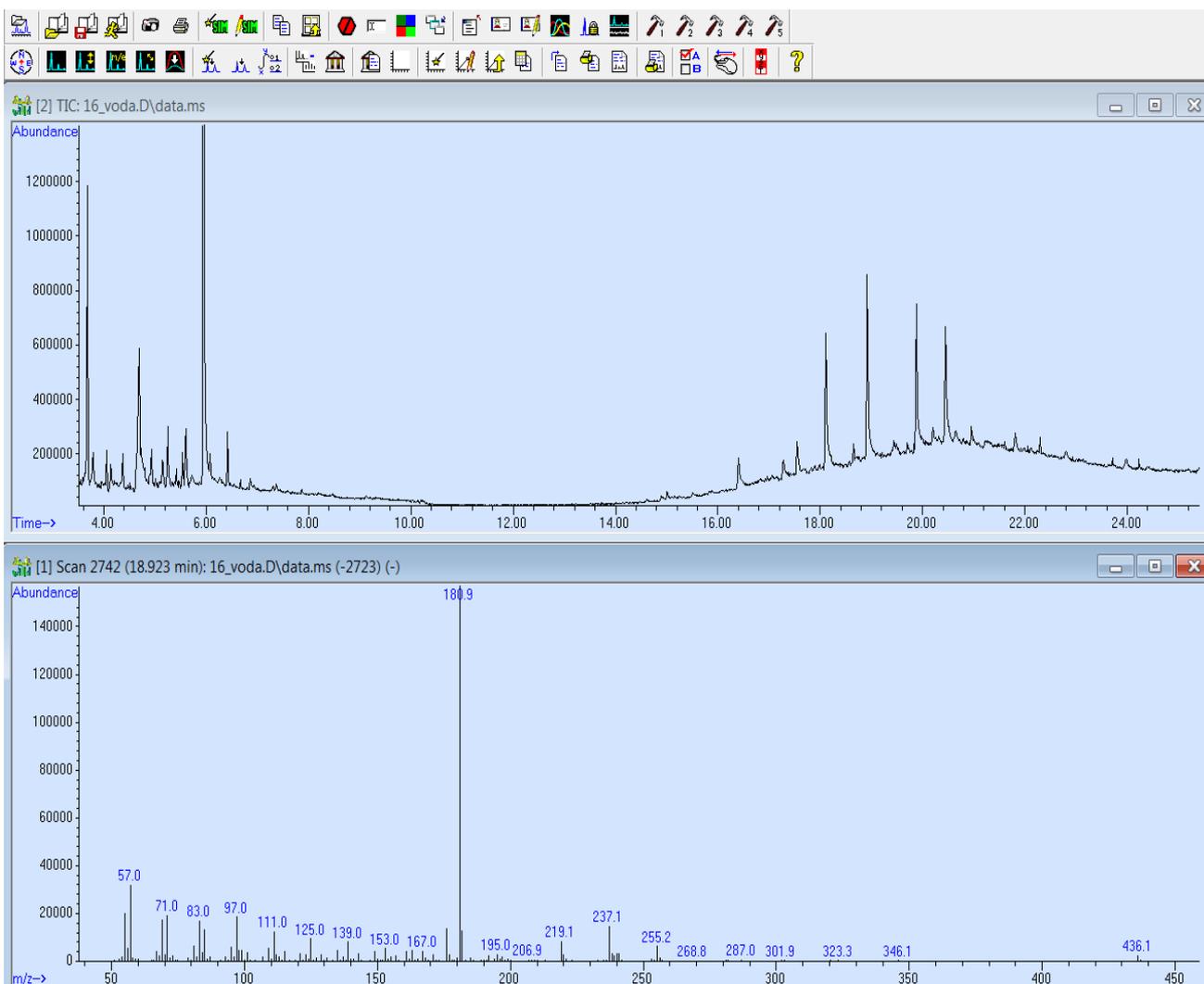
Приложение Г - масс-спектр пентадекановой кислоты C15:0.

ПРИЛОЖЕНИЕ Д



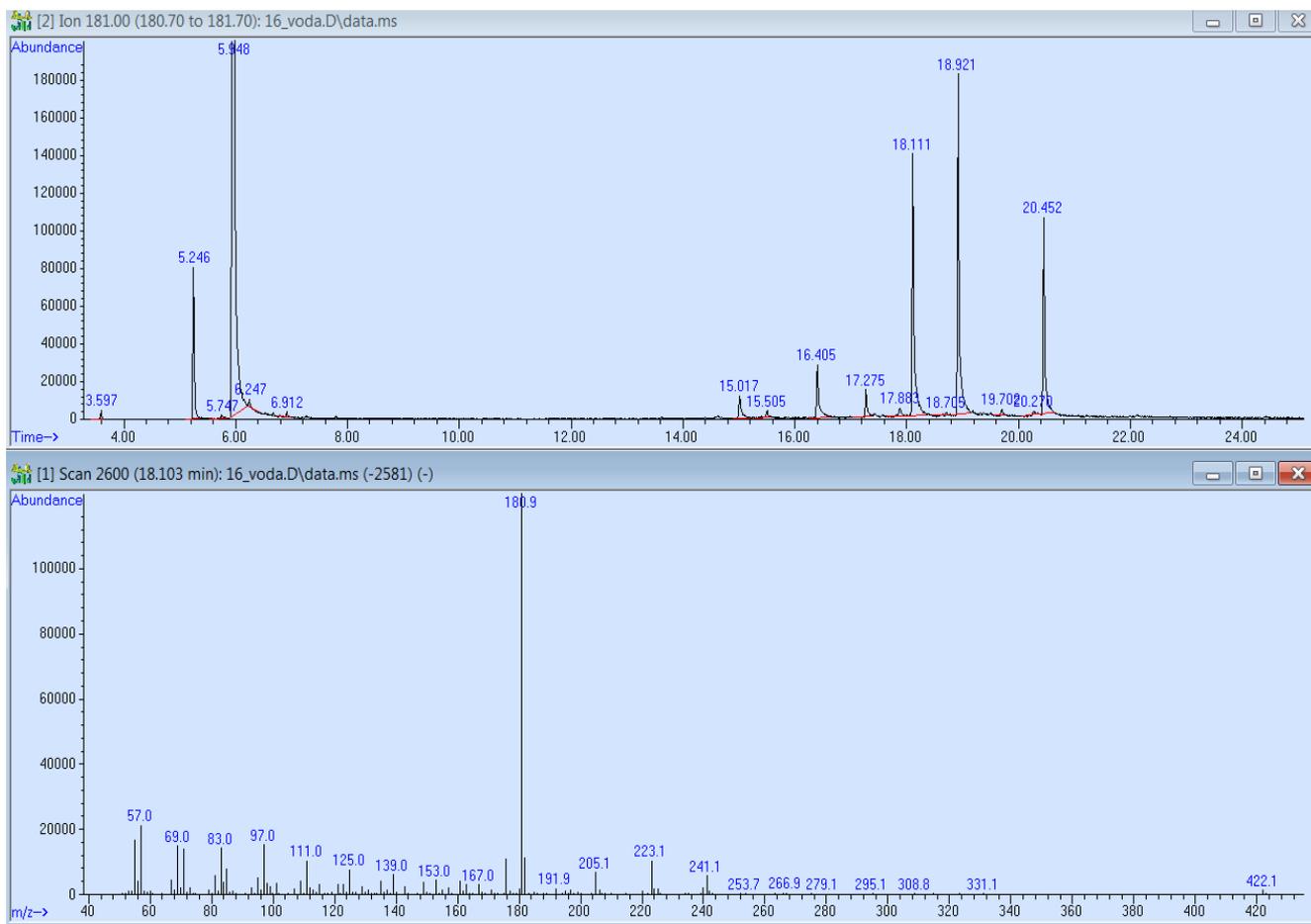
Приложение Д - Масс-спектр пика пальмитолеиновой кислоты C16:1.

ПРИЛОЖЕНИЕ Ж



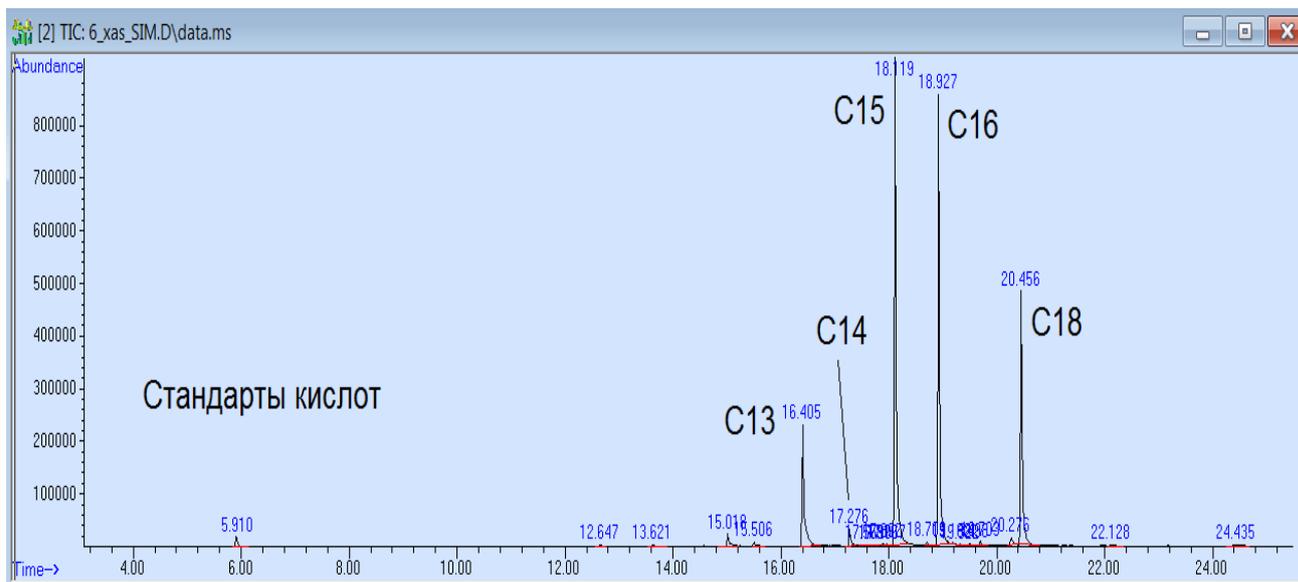
Приложение Ж - Скан-хроматограмма (по ПИТ) образца воды с добавкой стандартных кислот и масс-спектр пика производного кислоты C15:0.

ПРИЛОЖЕНИЕ И



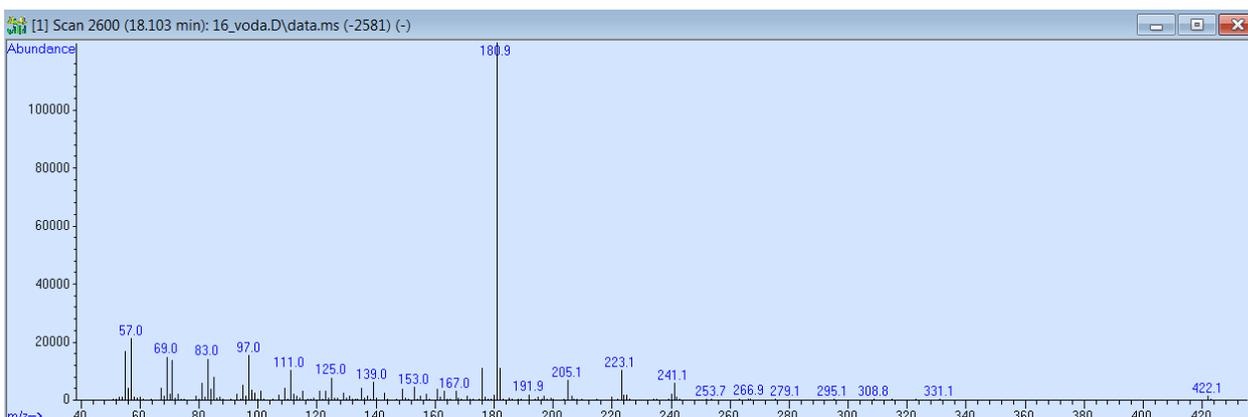
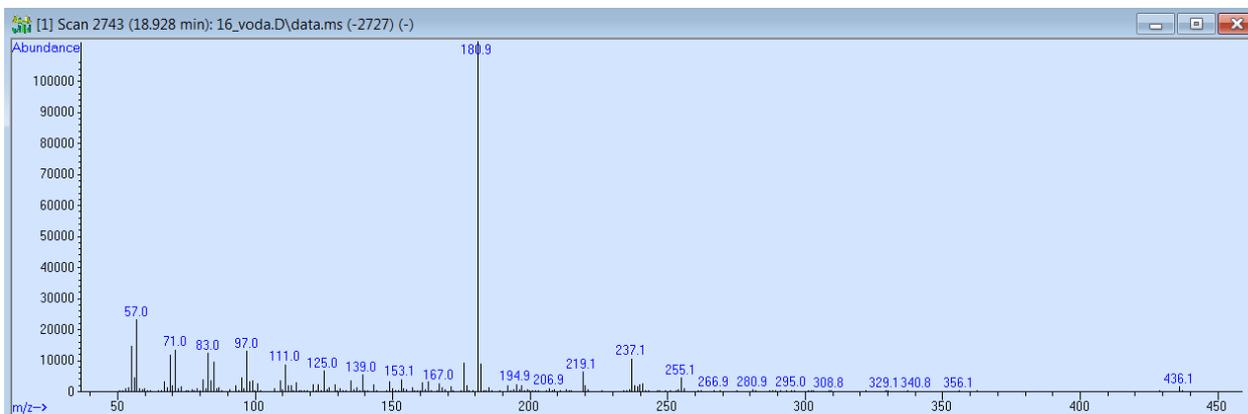
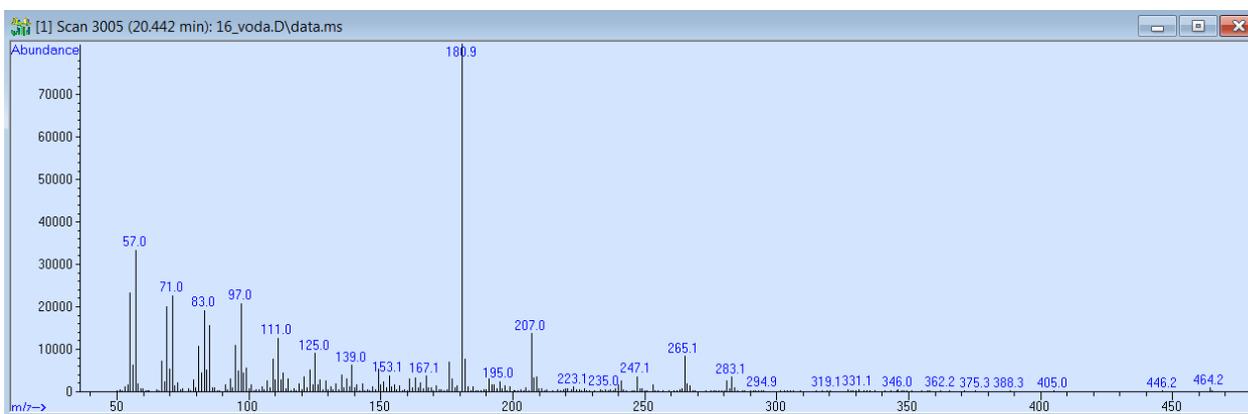
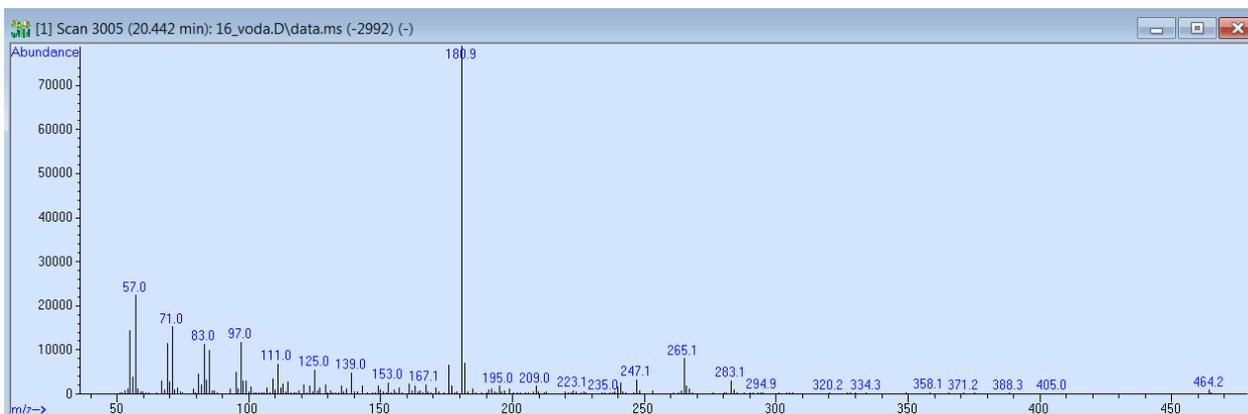
Приложение И - Скан-хроматограмма (верхний рисунок) переработанная по $m/z=181$ и тот же масс-спектр производного пентадекановой кислоты.

ПРИЛОЖЕНИЕ К



Приложение К - SIM хроматограмма образца стандартного раствора кислот

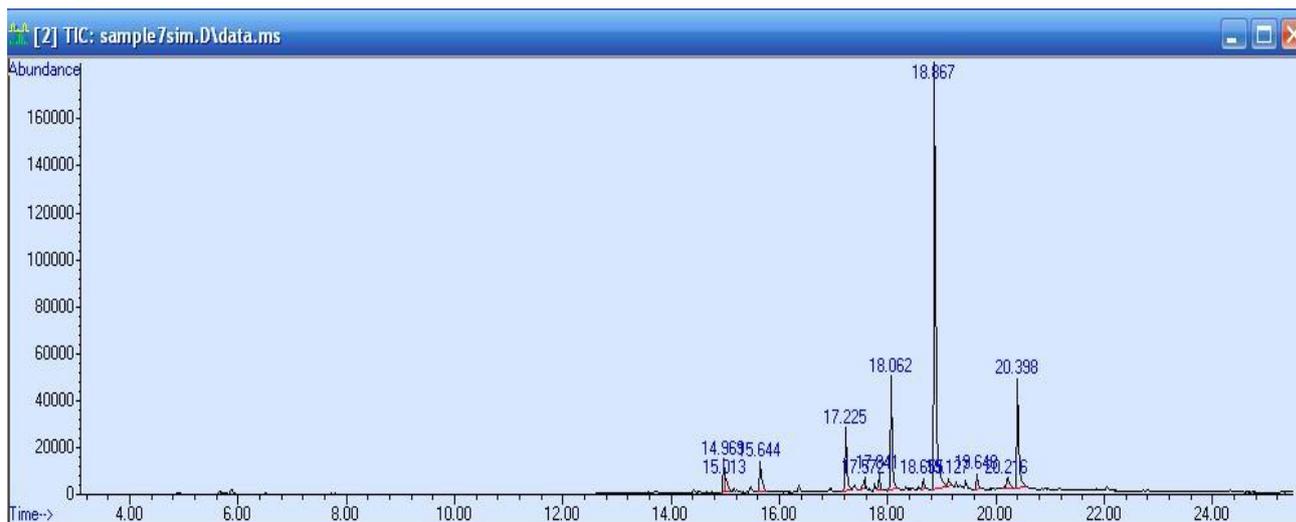
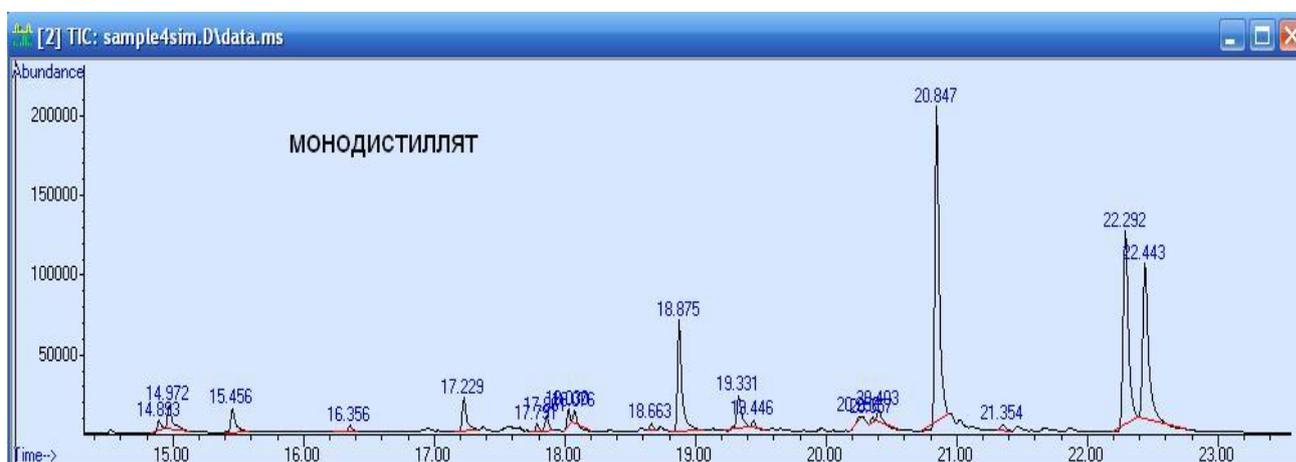
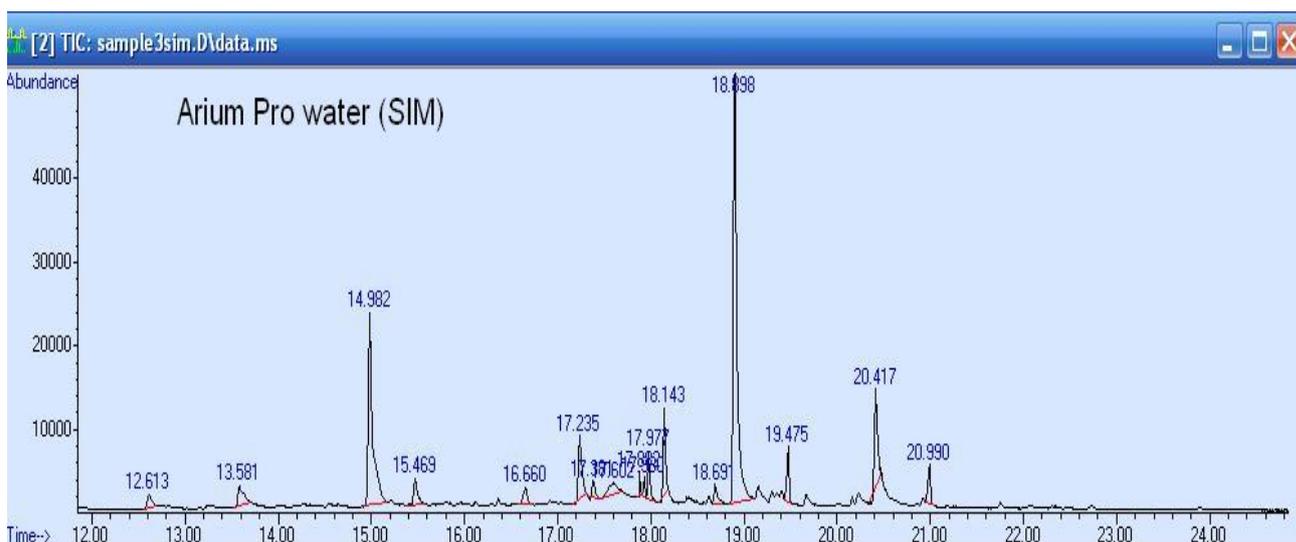
ПРИЛОЖЕНИЕ Л



Приложение Л - Масс-спектры производных различных кислот



ПРИЛОЖЕНИЕ М



Приложение М - Очищенная системой подготовки Arium Pro UV вода. Содержание кислот C14-C18 в сумме около 2 мкг/л.

В соответствии с п. 3.2 «*Регламента размещения текстов выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки ТГУ*» выпускная квалификационная работа дипломника: «Методы дериватизации при ГХ и ГЖХ анализе карбоновых кислот» Данилова К. А. размещается в репозитории с изъятием некоторых разделов в соответствии с решением правообладателя.

Руководитель ООП

В.В.Шелковников



Отчет о проверке на заимствования №1

Автор: Сергеев Макс serga01net@gmail.com / ID: 3074426

Проверяющий: Сергеев Макс (serga01net@gmail.com / ID: 3074426)

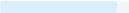
Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат»- <http://www.antiplagiat.ru>

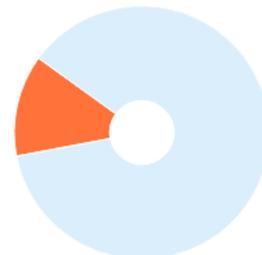
ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

№ документа: 3
Начало загрузки: 18.06.2018 12:51:50
Длительность загрузки: 00:00:01
Имя исходного файла: Diplom_Данилов
Размер текста: 1274 кБ
Символов в тексте: 69610
Слов в тексте: 8305
Число предложений: 839

ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Последний готовый отчет (ред.)
Начало проверки: 18.06.2018 12:51:52
Длительность проверки: 00:00:07
Комментарии: не указано
Модули поиска:

ЗАИМСТВОВАНИЯ	ЦИТИРОВАНИЯ	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ
13,49% 	0% 	86,51% 



Заимствования — доля всех найденных текстовых пересечений, за исключением тех, которые система отнесла к цитированиям, по отношению к общему объему документа.
Цитирования — доля текстовых пересечений, которые не являются авторскими, но система посчитала их использование корректным, по отношению к общему объему документа. Сюда относятся оформленные по ГОСТу цитаты; общепотребительные выражения; фрагменты текста, найденные в источниках из коллекций нормативно-правовой документации.

Текстовое пересечение — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.

Источник — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.

Оригинальность — доля фрагментов текста проверяемого документа, не обнаруженных ни в одном источнике, по которым шла проверка, по отношению к общему объему документа.

Заимствования, цитирования и оригинальность являются отдельными показателями и в сумме дают 100%, что соответствует всему тексту проверяемого документа.

Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые пересечения проверяемого документа с проиндексированными в системе текстовыми источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности заимствований или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

№	Доля в отчете	Доля в тексте	Источник	Ссылка	Актуален на	Модуль поиска	Блоков в отчете	Блоков в тексте
[01]	3,61%	3,61%	Физико – химическая харак...	http://megaobuchalka.ru	22 Мар 2016	Модуль поиска Интернет	3	3
[02]	0%	3,61%	1.Вещество – это то из чего ...	http://tfolio.ru	16 Янв 2017	Модуль поиска Интернет	0	4
[03]	3,03%	3,03%	не указано	http://85.143.0.20	21 Окт 2014	Модуль поиска Интернет	3	3

Еще источников: 17
Еще заимствований: 6,85%