СОДЕРЖАНИЕ

_

-

Том 76, номер 2, 2021

ОБЗОРЫ	
Стандартные образцы растительных материалов — инструмент обеспечения единства химических измерений И. Е. Васильева, Е. В. Шабанова	99
ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ	
Использование химически активных добавок для определения бора в графите дуговым атомно-эмиссионным методом <i>Н. И. Золотарева, С. С. Гражулене</i>	124
Определение витамина E (ацетата α-токоферола) на поверхности кожи человека методом ИК-Фурье спектрометрии и изучение некоторых аспектов его трансдермального переноса	130
Опреление каротиноидов плодов томатов различной окраски В. И. Дейнека, Т. Г. Буржинская, Л. А. Дейнека, И. П. Блинова	130
Изучение метаболизма нового ноотропного препарата — унифирама методом ультра высокоэффективной жидкостной хроматографии—масс-спектрометрии высокого разрешения <i>А. З. Темердашев, М. О. Зорина, Е. В. Дмитриева, А. А. Азарян</i>	143
Оптимизация совокупности процедур и условий одновременного определения амикарбазона и его метаболитов в объектах окружающей среды и растительных матрицах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектированием <i>T Л Черманская F Ю Азаксеве</i>	151
Определение золедроновой кислоты и креатинина методом гидрофильной хроматографии Л. А. Карцова, В. Д. Сомова, Е. А. Бессонова	161
Идентификация и определение неионогенных поверхностно-активных веществ методом ультра высокоэффективной жидкостной хроматографии—масс-спектрометрии высокого разрешения В. Г. Амелин, Д. С. Большаков	166
Дифференциальная сканирующая калориметрия как метод контроля подлинности растительных масел О. Б. Рудаков, И. А. Саранов, Нгуен Ван Ань, Л. В. Рудакова, К. К. Полянский	183
Дифференциальная сканирующая калориметрия как метод контроля подлинности растительных масел О. Б. Рудаков, И. А. Саранов, Нгуен Ван Ань, Л. В. Рудакова, К. К. Полянский	18

———— ОБЗОРЫ ——

УДК 006.9:(543+53.089.6+581.192)

СТАНДАРТНЫЕ ОБРАЗЦЫ РАСТИТЕЛЬНЫХ МАТЕРИАЛОВ – ИНСТРУМЕНТ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ЕДИНСТВА ХИМИЧЕСКИХ ИЗМЕРЕНИЙ

© 2021 г. И. Е. Васильева^{а,} *, Е. В. Шабанова^а

^{*а*}Институт геохимии им. А.П. Виноградова Сибирского отделения Российской академии наук ул. Фаворского, 1А, Иркутск, 664033 Россия **e-mail: vasira@igc.irk.ru* Поступила в редакцию 17.07.2020 г. После доработки 26.08.2020 г. Принята к публикации 26.08.2020 г.

В обзоре обсуждается роль стандартных образцов состава растительных материалов как инструмента, обеспечивающего единство измерений и достоверность результатов при выполнении экологических исследований, производстве пищевых продуктов и лекарственных средств. Особенности состава растений как объектов химического анализа и требования к методам его определения рассмотрены с точки зрения обеспеченности стандартными образцами традиционных сельскохозяйственных задач, геохимических, экологических и медико-биологических проектов. Представлены международные и российские нормативные документы по разработке стандартных образцов с учетом нормируемых содержаний токсичных элементов в растительных материалах. Отмечено различное наполнение классов существующих сертифицированных, референтных и для контроля качества стандартных образцов растительных материалов разных производителей. Показана необходимость расширения списка матричных стандартных образцов для обеспечения надежности выполнения аналитических процедур при использовании методов химического анализа растительных материалов и сопоставимости их результатов.

Ключевые слова: стандартные образцы, растительные материалы, элементный состав, методы химического анализа, обеспечение единства измерений.

DOI: 10.31857/S0044450221020146

Растения содержат практически все химические элементы Периодической системы Д.И. Менделеева, отражают взаимосвязь живой и неживой природы и участвуют в биогеохимическом круговороте веществ на Земле [1-3]. Для изучения закономерностей изменения природной среды актуально получение достоверной химической информации о растительном мире. Традиционно растения рассматривают с двух позиций: потребление человеком (использование растений для питания, обеспечения одеждой и техническими тканями; строительство; энергетика; медицина и химия) и влияние жизнедеятельности человека на окружающую среду (экологический аспект). С точки зрения аналитической химии образцы растительных материалов следует рассматривать как объекты постоянного (регулярного) аналитического контроля и как некоторые природные и искусственные артефакты – стандартные образцы (СО) состава [4, 5]. Сертифицированные СО являются материальными моделями однородного растительного вещества [6], поэтому их химический состав должен быть исследован подходящими аналитическими методами по определенным алгоритмам и описан в соответствующем документе (сертификате) опорными значениями содержаний элементов (изотопов) и соединений с указанием их неопределенности (погрешности) и метрологической прослеживаемости [7–16]. Желательно, чтобы каждый СО как достоверная модель обладал свойствами устойчивости (неизменяемость вещества в конкретном интервале времени – стабильность) и полноты (максимальная характеризация основного и примесного состава). Таким образом, выполняется условие состоятельности информации о характеристиках СО конкретного вида растения и способности существующих аналитических методов (в их генеральной совокупности) адекватно отражать действительность. Большинство современных методов химического анализа являются относительными, поэтому для установления связи между измеряемым свойством и количеством аналита используют особый тип математического моделирования - градуировку – с целью учета специфических особенностей объекта анализа (в данном случае растительного материала), конкретного метода анализа и применяемого аналитического оборудования, способа пробоподготовки и требований заказчика к точности результата. Последнее зависит от того, для каких целей и задач выполняется аналитическое исследование, например, для изучения биологических особенностей конкретного вида растений, описания экологического состояния территории, оценки безопасности лекарственного растительного сырья (ЛРС) или продуктов питания (овощей и фруктов, чая и кофе и т.д.). В этом случае СО растительных материалов являются необходимым инструментом при градуировании (валидации) и контроле качества измерений (quality assurance and quality control, QA/QC) для обеспечения единства измерений состава веществ, синтезируемых растениями и/или получаемых в процессе переработки растительного сырья [17-19]. Применение СО регламентируется международными и национальными нормативными документами в сфере охраны окружающей среды [20] и в производстве продуктов, безопасных для здоровья человека [21].

Согласно определению ISO/REMCO (комитет Международной Организации по стандартизации и эталонным материалам), сертифицированный референтный материал (CRM) – это "эталонный материал, характеризующийся метрологически обоснованной процедурой для одного или нескольких указанных свойств, сопровождаемый сертификатом эталонного материала, который обеспечивает ценность указанного свойства, связанную с ним неопределенность и заявление о метрологической прослеживаемости" [10], что отличается от определения "стандартный образец" в российской законодательной метрологии [22]. После принятия в Российской Федерации ряда нормативных документов [9, 23 и т.д.] происходит сближение международной и российской терминологий. В настоящее время согласно ISO Guide 30 стандартные образцы разделены по уровню надежности установления метрологических характеристик и метрологической прослеживаемости на сертифицированные и справочные (референтные) СО (англ. CRM и RM). В Российской Федерации ССО – это государственные СО (ГСО) утвержденного типа и справочные образцы (референтные материалы, РМ), т.е. стандартные образцы предприятия, отраслевые стандартные образцы и контрольные пробы. Некоторые производители отмечают образцы, используемые для контроля качества, аббревиатурой КК (англ. QC). Национальный институт стандартов и технологии США (NIST) обозначает ССО как SRM® и присваивает три категории сертифицируемым значениям: сертифицированные, справочные и информационные [24]. Сертифицированные значения гарантируют наивысший уровень уверенности в том, что известные или предполагаемые

источники систематической погрешности были исследованы или учтены. Наиболее распространенным подходом к сертификации химического состава является измерение двумя или более независимыми аналитическими методами. Если результаты, полученные с использованием независимых методов, включая, но не ограничиваясь выполнением перед количественными измерениями процедур концентрирования, очистки, разделения и обнаружения, согласуются, то существует большая уверенность в точности присвоенного значения; так как систематические сдвиги привели бы к разногласиям между результатами разных методов. Значения, которые не соответствуют критериям, необходимым для сертификации, указываются как справочные или информационные значения. Некоторые производители ССО используют термин "справочные" для всех средних значений, которые не соответствуют требованиям категории "сертифицированные".

В веществе стандартных образцов состава растений в качестве аналита, для которого устанавливают метрологические характеристики, может выступать массовая доля химического элемента (изотопа), индивидуального органического соединения или группы органических соединений, относящихся к определенному классу. Предлагаемый обзор сосредоточен на обсуждении матричных стандартных образцов растительного происхождения, в которых охарактеризованы содержания индивидуальных химических элементов.

РАСТЕНИЯ КАК ОБЪЕКТ ХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Усвоение растениями элементов минерального питания является сложным физиологическим процессом, зависящим от биологических особенностей самого растения, природных факторов (свойств почв, обеспеченности водой, экспозиции и высоты древостоев, инсоляции, микроклимата) и их взаимодействия, которые до сих пор недостаточно изучены, поскольку большинство исследований проводится в очень ограниченных районах и не охватывает полностью разнообразие экосистем [2, 25]. В процессе жизнедеятельности растения синтезируют белки (в том числе ферменты) и иные азотсодержащие соединения (аминокислоты, пептиды), жиры (липиды, масла), углеводы (крахмал, сахара, целлюлоза, лигнин, клетчатка, пектиновые вешества) и т.д. Содержание воды в большинстве вегетативных органов растений составляет 70-95%, в семенах - от 5 до 15%. Сухое вещество растений содержит 90-95% органических соединений и 5-10% минеральных солей. Органические соединения также представлены биологически активными веществами (БАВ); растения содержат до 92 химических элементов (ХЭ), которые в высоких концентрациях могут быть опасны для здоровья человека и животных.

В 2001 г. Международная организация "Interstate Technology and Regulatory Cooperation Work Group" [26, 27] отнесла 20 элементов (С, Н, О, N, P, K, Ca, Mg, S, Mo, Zn, Cu, B, Mn, Co, Cl, I, Na, V и Fe) к эссенциальным (биофильным или биогенным), т.е. незаменимым для роста, развития и размножения растений. Каждый эссенциальный элемент при наличии его биологически доступной формы в достаточной концентрации выполняет или активизирует в организме растения специфические функции. Например. установлено положительное влияние на рост и развитие некоторых растений кремния, содержание которого может достигать нескольких процентов [28-32]. В некоторых публикациях условно токсичные элементы оценены как условно биофильные, например Li, Rb и Sr [1, 30, 33]; Zn, Pb [34], Zn, Cd [35]; Br, F [36, 37] и Al, Ag, Au, Cd, Se, Ti, Cr, Ni, U и Th [1, 30, 33, 38, 39]. Данные о высокой токсичности алюминия приведены в публикациях [40, 41 и др.]. При огромном разнообразии растений граница между эссенциальными и условно эссенциальными элементами не столь отчетлива, как считалось ранее в традиционной физиологии растений [1, 42-44 и т.д.], и отнесение каждого химического микроэлемента к жизненно необходимым или токсичным для конкретных групп или видов требует подтверждения [1, 2, 32]. Считается, что потребность растения в том или ином элементе вырабатывалась в длительном эволюционном развитии, но физиологическое значение в жизни растений ультрамикроэлементов, содержание которых менее 0.0001 мас. %, до сих пор изучено мало. Это замечание справедливо для благородных металлов Pt, Pd, Rh и Au [45–51], редкоземельных элементов (РЗЭ) [52, 53], используемых в полупроводниковой промышленности индия [41]. германия [1] и других редких и рассеянных элементов. Биологическая избирательность в отношении микроэлементов позволяет растениям индивидуально контролировать свой химический состав, но возможности подобного контроля все же ограничены [1]. Метаболические нарушения в растениях могут быть вызваны не только повышенным содержанием токсичных микроэлементов, но также недостатком или избытком биофильных элементов [1, 54-56]. Таким образом, изучение растений предполагает определение валовых и локальных содержаний и форм присутствия большого числа химических элементов и использование практически всего разнообразия существующих аналитических методов.

ТРАДИЦИОННЫЙ ПОДХОД К ИЗУЧЕНИЮ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА РАСТЕНИЙ

Традиционный подход к изучению химического состава растений связан с агрохимическими задачами по повышению продуктивности сельскохозяйственных культур, сосредоточен на влиянии минерального питания и оценке токсичности некоторых элементов. Разные сельскохозяйственные культуры выращивают для получения продукции с определенным содержанием органических и минеральных веществ. Для оценивания качества продуктов растениеводства определяют белки, жиры, углеводы, зольные (минеральные) элементы и воду [42-44, 57]. Химический состав растений определяют также для контроля правильности использования удобрений и пестицидов, оценки обеспеченности микроэлементами земель сельскохозяйственного назначения [25. 58] в целях достижения баланса белков, углеводов, жиров, витаминов, БАВ и микроэлементов в рационах питания человека, домашних животных и птицы [30, 39]. Растения являются важным источником питания, но загрязнение окружающей среды негативно меняет продуктивность сельскохозяйственных растений и питательную ценность продуктов пищевой цепочки. Обзоры [56, 59] указывают на ограниченность научной информации о воздействии содержаний токсичных элементов на синтез в растениях белков, аминокислот, углеводов, жиров и витаминов в разных видах растений. Анализ естественно возникающих изотопных вариаций биофильных элементов является перспективным инструментом для исследования их переноса и круговорота в растениях [60-62].

В начале 1990-х под эгидой Международной ассоциации официальных сельскохозяйственных химиков (AOAC INTERNATIONAL) была разработана организационная система пищевых составов, которая позволяет на единой основе сопоставлять различные продукты питания и применимость для их исследования разных аналитических методов (методик) [63]. Вершины треугольника пищевых композиций соответствуют 100%-ному содержанию белков, углеводов и жиров, а вершины девяти треугольников-секторов – долям содержаний этих пищевых основ. С начала 2000-х NIST принял эту стратегию для разработки любых стандартных материалов, представляющих пищевую ценность: продуктов растительного и животного происхождения. детского и диетического питания, биологически активных добавок (БАД) и т.д. В обзоре [64] подробно рассмотрена эволюция стандартных образцов и аналитических методов для определения содержания органических питательных веществ в пищевых продуктах и пищевых добавках. Рассмотрены процедуры отбора, приготовления, аттестации и хранения вещества и методы определения проксиматов (влажности, зольности и др.), содержания групп и индивидуальных органических питательных веществ, витаминов и витаминных метаболитов, каратиноидов, жирных кислот, БАДов, пестицидов, лекарств и т.д. К сожалению, применить плоскую модель пищевой органической матрицы, чтобы отразить такую особенность этих СО как число аттестованных, рекомендованных и информационных содержаний химических элементов (так называемых "минералов"), которое варьирует от одного до 80 и даже более, не представляется возможным. Вероятно, это является одной из причин, почему огромное количество публикаций, посвященных накоплению и перераспределению химических элементов в растениях и их органах в разные периоды развития, еще не систематизировано.

Например, установлено, что продуктивные органы некоторых овощей являются хорошими аккумуляторами токсичных ХЭ (данные для Cd, As, Pb, Cu, Zn и Cr получены методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой, МС-ИСП), и при регулярном потреблении таких овощей риск для здоровья населения увеличивается [65]. Модельное исследование показало, что распределение Zn и Pb в продуктивных и вегетативных органах разных культур (лен долгунец стебли и листья, цикорий и картофель - корнеплоды), выращенных в одних и тех же почвенных и погодно-климатических условиях при увеличении концентрации биодоступных форм этих элементов в почве, зависит от биологических особенностей растений [34]. В этом эксперименте были использованы результаты атомно-абсорбционной спектрометрии (ААС). Методом атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (АЭС-ИСП) были определены содержания K, Ca, Na, P, Mg, Fe, Mn, Zn, Sr и Мо в 55 образцах белой и красной капусты (Brassica oleracea), выращенной в разных регионах Бразилии, и установлено, что их существенные вариации не связаны с цветом листьев и местом произрастания [66]. Определение Cu, Mn и Se методом электротермической ААС легло в основу сопоставления питательной ценности в период сбора урожая тыквы (Cucurbita moschata), свеклы "Beet Crosby Egyptian" (Beta vulgaris esculenta), моркови "Нант" (Daucus carota) и капусты "Капуста Южная Грузия" (Brassica oleracea var. acephala) [67]. По данным атомно-эмиссионной спектрометрии с лазерно-индуцировнной плазмой (LIBS) изучено содержание Fe, Mg, Cu, Ca, Al, Mn, Ba, P, K и Sr в мятном чае [68]; в коммерческом продукте чае мате Иерба оценено методом МС-ИСП содержание токсичных элементов As, Cd и Pb [69]. Сравнение пяти сортов перца выполнено по содержаниям элементов-биофилов Ca, Fe, K, Mg, Mn, P и Zn, которые определены методом АЭС-

ИСП [70]. Установлены источники поступления и накопление As, B, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni и Sr в листьях винограда в разные фазы роста виноградной лозы по данным АЭС-ИСП-методик [71, 72]. В обзоре [73] рассмотрены современные представления о физиологических и молекулярных механизмах транслокации токсичных элементов (Hg, As, Pb, Cd и Cr) в ряде сельскохозяйственных пищевых культур при использовании разных аналитических методов, что позволило рекомендовать подходы к управлению рекультивацией загрязненных почв. Если содержания элементов определены надежно, то соотношения между элементами свидетельствуют об условиях произрастания и питания сельскохозяйственных и дикорастущих видов растений [1, 33, 74-76]. Достоверность аналитических данных в большинстве статей подтверждена применением ССО, метода добавок или сравнением результатов, полученных несколькими методами анализа. Характерной особенностью исследования растений, т.е. традиционного подхода к изучению их химического состава при использовании разных аналитических методов, является обсуждение и интерпретация результатов определения только небольшого числа биофильных и/или токсичных химических элементов.

ЭКОЛОГИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ИЗУЧЕНИЮ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА РАСТЕНИЙ: ГЕОХИМИЧЕСКИЕ, ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ И МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЕКТЫ И ПРОГРАММЫ

Изучение изменений состояния окружающей среды не теряет своей актуальности в связи с увеличением техногенной нагрузки на биосферу и наблюдаемую ее металлизацию [45, 48, 50, 51, 65, 77–80].

В зонах природного, техногенного и антропогенного загрязнения водные и наземные растения подвергаются воздействию вредных составляющих окружающей среды и являются своего рода индикаторами, которые указывают на особенности и степень загрязненности ареала их распространения [2, 3, 81, 82]. Элементный состав растений-гипераккумуляторов металлов успешно используют при поисках месторождений полезных ископаемых [81, 83], экологическом мониторинге [65, 84, 85] и биоремидиации почв загрязненных территорий [86–88].

С 1960-х гг. исследования закономерностей накопления ХЭ в одном или разных видах (органах) растений проводят в рамках региональных и глобальных геохимических, экологических и медико-биологических проектов и программ.

Геохимические проекты, обычно включающие разработку стандартных образцов состава со-

102

пряженных сред (порода-почва-растение), сосредоточены на картировании распределений химических элементов в пространстве и времени [89–95].

Экологические проекты рассматривают проблемы влияния загрязняющих веществ на условия жизни и здоровье человека, обеспечения безопасности окружающей среды. Это касается последствий регионального и глобального аэрозольного переноса вредных производственных выбросов, сохранения естественных природных территорий и поддержания плодородия почв [2, 65, 85, 96, 97]. Экологический мониторинг предусматривает определение биофильных и токсичных элементов в широких диапазонах концентраций в большом числе образцов растений разных видов. Чтобы сравнительное исследование характеризовало экосистему достаточно полно и надежно, необходимо собрать много видов разных растений, характерных для изучаемых территорий, следуя одному и тому же протоколу отбора и аналитического исследования проб, используя одно и то же (схожее или близкое по аналитическим возможностям) оборудование. Для минимизации систематических и временных трендов в результатах желательно, чтобы во всех образцах за короткий промежуток времени было выполнено определение широкого круга элементов и соединений в одной лаборатории. Только такие наборы данных позволяют оценить влияние региональных факторов на растения и установить достоверные фоновые концентрации ХЭ в различных видах растений при проведении экологических исследований, если гарантирована надежность аналитических результатов. Для оценки качества (надежности) результатов химического анализа предполагается включение зашифрованных СО растений в партии анализируемых проб.

Медико-биологические проекты посвящены изучению влияния питания и условий жизни растений, установлению медико-гигиенических нормативов как предельно допустимых (ПДК) и/или ориентировочно допустимых концентраций токсичных элементов и соединений в воде, пищевых, лекарственных, косметических продуктах и средствах гигиены. Несмотря на широкое использование в медицине и косметологии лекарственных растений, механизмы их фитотерапевтического действия на человека и животных изучены недостаточно [3, 98–101]. Поскольку направленность фотосинтеза, постфотосинтетические реакции, транспорт БАВ и распределение их между органами и тканями растений обусловлены генетически, поступление и накопление отдельных элементов и их соотношение имеют видовую специфику, хотя под воздействием внешних условий могут меняться. В целях безопасности необходима постоянная оценка качества ЛРС и лекарственных препаратов на их основе (отваров, на-

стоек, порошков и таблеток, БАД), так как они широко используются для лечения распространенных заболеваний органов желудочно-кишечного тракта [102-106], опорно-двигательного аппарата [31, 107], нервной системы [36, 108], вирусных заболеваний [109] и т.д. Несмотря на то, что растительные лекарственные и косметические препараты используются в лечебной практике давно, данных о содержаниях химических элементов в различных растениях и их органах очень немного. Кроме того, авторы работ [104, 105, 107, 110] указывают, что нередко сравнить данные о содержаниях одних и тех же элементов в конкретном виде растений из разных регионов мира не представляется возможным, так как эти данные отличаются в сотни раз. а в публикациях не сообщается об оценке надежности полученных результатов или верификации использованных методик анализа.

НОРМАТИВНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ К СОДЕРЖАНИЯМ ТОКСИЧНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В СТАНДАРТНЫХ ОБРАЗЦАХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ, ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ И ПРЕПАРАТОВ НА ЕГО ОСНОВЕ

Каждая страна мира в соответствии с географическим положением, климатическими и национально-культурными особенностями имеет свой список приоритетных традиционно возделываемых сельскохозяйственных культур и пищевых продуктов из них, ЛРС и препаратов на его основе. Безопасность их применения зависит от накопленного в них количества органических соединений и микроэлементов, вредных для здоровья человека. Уровни безопасных содержаний токсичных элементов законодательно регулируются международными и национальными нормативными документами. Всемирная организация здравоохранения [111] установила ПДК некоторых токсичных элементов в лекарственном растительном сырье: Cd – 0.3, As – 1.0 и Pb – 10 мг/кг. В соответствии с требованиями безопасности, принятыми в Российской Федерации, Государственные фармакопеи XIII и XIV изданий [112, 113] и "Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов" [114] в ЛРС и препаратах на его основе указывают, что ПДК четырех химических элементов, так называемых "тяжелых металлов" и мышьяка, составляют (мг/кг): Pb – 6.0, Cd – 1.0, Hg – 0.1 и As – 0.5.

Популярность лекарственных растений в мире увеличивается. Однако экологические проблемы в отдельных регионах, где они выращиваются, вызывают серьезную озабоченность международных организаций качеством и безопасностью лекарственного сырья [111], так как при регулярном использовании лекарств традиционной тибет-

Элемент (element)	Класс опасности (class)	Пероральный прием (oral PDE, µg/day)	Инъекции и ингаляции (parenteral PDE, µg/day)	Ингаляция, дыхание (inhalation PDE, µg/day)
Cd	1	5	2	2
Pb	1	5	5	5
As	1	15	15	2
Hg	1	30	3	1
Co	2A	50	5	3
V	2A	100	10	1
Ni	2A	200	20	5
T1	2B	8	8	8
Au	2B	100	100	1
Pd	2B	100	10	1
Ir	2B	100	10	1
Os	2B	100	10	1
Rh	2B	100	10	1
Ru	2B	100	10	1
Se	2B	150	80	130
Ag	2B	150	10	7
Pt	2B	100	10	1
Li	3	550	250	25
Sb	3	1200	90	20
Ba	3	1400	700	300
Мо	3	3000	1500	10
Cu	3	3000	300	30
Sn	3	6000	600	60
Cr	3	11000	1100	3

Таблица 1. Допустимые суточные экспозиции (ПДЭ) для примесей элементов [117] (permitted daily exposures (PDE) for elemental impurities [117])

ской и индийской медицины известны случаи отравления из-за присутствия в них высоких содержаний токсичных элементов [106, 115, 116]. В связи с этим современные требования к содержанию примесей элементов ужесточаются, и фармакопеи разных стран регулярно пересматривают и вносят новые статьи/главы. Например, с 2018 г. Фармакопейная Конвенция США (USP) ввела три новые общие главы по примесям элементов в ЛРС с рекомендациями по аналитическим процедурам для определения в сырье, фармацевтических продуктах и пищевых добавках 24 элементов (Cd, Pb, As, Hg, Co, V, Ni, Tl, Au, Pd, Ir, Os, Rh, Ru, Se, Ag, Pt, Li, Sb, Ba, Mo, Cu, Sn и Cr) [117, 118]. Установленные предельно допустимые суточные экспозиции (ПДЭ) этих элементов связаны с их токсичностью, определяемой как максимально допустимое ежедневное воздействие (maximum permitted daily exposure, PDE) в мкг/сутки для четырех основных категорий лекарств (табл. 1). Эти нормативы обязательны при санитарном надзоре за качеством пищевых продуктов и медикаментов.

В настоящее время некоторые из перечисленных выше геохимических проектов функционируют как постоянно действующие с акцентом на экологические и медико-биологические проблемы. Следовательно, проведение экологического мониторинга и оценка качества продуктов питания, лекарственных и косметических препаратов предполагают определение химических элементов (в том числе токсичных) в широких диапазонах концентраций для большого числа разнообразных по составу проб растительного происхождения. Для контроля содержаний аналитов желательно использовать простые и экспрессные методы (методики) анализа с пределами обнаружения элементов в 2-10 раз ниже ПДК и учитывать особенности растительных объектов при отборе пробы, пробоподготовке, выборе метода и верификации методики анализа.

МЕТОДЫ АНАЛИЗА РАСТИТЕЛЬНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Основными требованиями, предъявляемыми к определению химического состава растений и продуктов из них, являются полнота и надежность информации о макро-, микро- и ультарамикро- (следовых) содержаниях ХЭ и их соединений (от $n \times 10^{-7} - 10^{-4}$ до $n \times 10\%$) при обеспечении метрологической прослеживаемости. Выполнение этих требований затруднительно из-за огромного разнообразия видов растений и методов исследования их химического состава. По состоянию на начало 2010 г. данные Международного союза охраны природы (IUCN) включали около 320 тысяч видов низших (водоросли) и высших растений, из них около 280 тысяч видов цветковых, 1 тысяча видов голосеменных, около 16 тысяч мохообразных, около 12 тысяч видов высших споровых растений (плауновидные и папоротникообразные) [119]. Однако число описанных растений постоянно меняется вследствие исчезновения одних видов и открытия новых [120]. Кроме того, ни один из аналитических методов не позволяет собрать полную информацию даже о валовых содержаниях всех элементов в растении. Поэтому для изучения состава, закономерностей накопления токсичных и полезных ХЭ и соединений в органах растений обычно используют сочетания разных аналитических методов (методик), которые существенно отличаются для каждой отрасли знаний (агрохимия, ботаника, биохимия, биогеохимия, экология, фармакология и др.). Перманентное совершенствование методов осуществляется за счет выбора оптимального способа полного или частичного (группового) переведения растительных проб в раствор; групповых (индивидуальных) способов концентрирования и разделения ХЭ с применением сорбции/экстракции ХЭ органическими реагентами или их смесями. Развитие инструментальных методов, благодаря компьютеризации и автоматизации измерительных процедур, обеспечивает возможность унификации анализа при повышении экспрессности и точности. Типичным примером унификации аналитических методов является изменение содержания и числа статей (методик) в Фармакопеях США и Европейского союза [19]. К сожалению, в Российской фармакопее до сих пор не проведены такие обобщения для используемых в современной аналитике более 20 лет методов АЭС-ИСП, МС-ИСП, рентгенофлуоресцентного анализа (РФА), а предлагаемые способы переведения растительных проб в раствор нередко неэффективны и трудозатратны [113].

Образцы дикорастущих и сельскохозяйственных растений отбирают и передают в лабораторию на анализ в естественном (живом) виде или после высушивания на воздухе, сублимации или лиофилизации [1, 87, 121-123]. Растительные образцы в живом виде характеризуются высоким содержанием органического вещества и воды. Определение содержания воды (влаги), золы и групп органических соединений (проксиматов) обязательная процедура оценки условий вырашивания и качества продуктов растениеводства [64, 124, 125]. Высушенные растения обычно измельчают до порошка с размером частиц 0.15 мм или меньше. Порошки обезвоженных растений являются сложными многокомпонентными смесями органических, элементоорганических и минеральных веществ, разделение которых связано с существенными трудностями, так как одни соединения плохо растворяются в минеральных кислотах, другие – в органических растворителях. В агрохимии и пищевой промышленности зольность является суммарным показателем количества неорганических веществ в растительных материалах [125].

Современному аппаратурному и методическому развитию аналитических методов или отдельных стадий анализа посвящены учебники, оригинальные статьи и регулярно публикуемых обзоры, в которых представлены моно- и многоэлементные методы определения валовых содержаний элементов и их соединений. использующие предварительное разложение (минерализацию) растительной пробы, и прямые методы анализа для изучения переноса элементов непосредственно в органах и клетках растений, не предусматривающие деструкцию проб растительного происхождения. Однако практический интерес представляют методы (методики) анализа одновременного определения в растениях химических элементов в широком диапазоне содержаний без использования кислотного разложения и озоления.

Аналитические методы, такие как титриметрия, спектрофотометрия, электрохимические методы, ААС и атомно-флуоресцентная спектрометрия (АФС), пламенная атомно-эмиссионная спектрометрия (ПАЭС), АЭС-ИСП, атомноэмиссионная спектрометрия с микроплазмой (АЭС-МП) и МС-ИСП, перед измерением требуют переведения проб растений в раствор [121, 126]. Пробоподготовку проводят в открытых системах при атмосферном давлении [127], под давлением нейтрального газа [128], газа-окислителя [69] или с наложением ультразвукового поля [67, 129-132]. Для интенсификации пробоподготовки используют закрытые системы (автоклавы) с термическим нагревом [133] или с наложением микроволнового поля [58, 134-141]. Во всех случаях подбирают состав и соотношение смесей минеральных кислот и аналитической навески для конкретных перечней определяемых элементов. Эти технические приемы снижают потери легколетучих элементоорганических соединений, уменьшают объемы имеющих высокую стоимость необходимых для деструкции или экстракции высокочистых кислот, обеспечивают интенсификацию процедур получения растворов и селективность выделения одного или группы аналитов. Экстракцию аналитов смесями кислот при наложении ультразвука используют при подготовке суспензий для анализа методом электротермической AAC [142, 143].

Применение сорбционного и экстракционного концентрирования позволяет получать концентраты на единой основе из разных по составу растворов минеральных кислот, щелочей, спиртов и других органических растворителей и обойтись без большого числа образцов сравнения, в том числе матричных стандартных образцов. При переходе от водных элюентов к органическим отмечено снижение пределов определения и улучшение метрологических характеристик результатов за счет унификации состава концентрата независимо от исходного разнообразия составов проб. Концентрирование проводят в статическом и динамическом режимах, аналиты определяют методами пламенной и электротермической ААС и АФС, АЭС-ИСП и МС-ИСП, другими методами. Системы с генерацией гидридов As, Cd, Bi, Sb, Se, Sn, Te, Pb и системы определения ртути методом "холодного пара" при детектировании методами пламенной и электротермической ААС и АФС в сочетании с проточными системами сорбционного и экстракционного концентрирования обеспечивают снижение пределов обнаружения и высокую производительность анализа, необходимые в пищевой индустрии, при производстве лекарственных препаратов и БАДов [144-165].

Для группового концентрирования аналитов часто используют медленное озоление растений без/в присутствии окислителей при температурах ниже 450°С, чтобы избежать потерь легколетучих соединений [122, 126]. В некоторых методиках выполняют предварительное сухое озоление, а затем золу переводят в раствор [1, 121, 133]. Если пробы растений перед озолением и после него не взвешивают, то невозможно оценить концентрацию элементов в живых растениях [36, 81, 105, 107, 166, 167]. Вероятность внесения загрязнений или потерь определяемых элементов при использовании перечисленных способов пробоподготовки и концентрирования достаточно велика [121, 122, 126].

Определение валовых содержаний элементов в растениях методом инструментального нейтронно-активационного анализ (**ИНАА**) рассматривается в работах [86, 168—174]. Достижения РФА в анализе растительных материалов обсуждаются в работах [87, 132, 175—178]. В работе [179] продемонстрированы возможности синхротронной рентгеновской флуоресценцентной спектрометрии (S-XRF) и высокоразрешающей вторичной ионной масс-спектрометрия (NanoSIMS) для исследования питания растений и визуализации распределения элементов в различных масштабах от тканевого, клеточного до субклеточных уровней на примере распределения As, Fe, Zn, Mn и Cu в узлах, междоузлиях и листовой оболочке риса.

Аналитические возможности многоэлементной МС-ИСП успешно используются в анализе растительных материалов и разработке стандартных образцов [2, 102, 103, 180-185]. Разработанные методики, дополненные приемами концентрирования аналитов при отгонке основы, экстракции, сорбции, разделения на ионообменных смолах и др., обеспечивают определение микрои следовых уровней РЗЭ, Th и U, радионуклидов, элементов платиновой группы и других элементов [72, 85, 136, 138, 159, 186-194]. Использование метода тандемной масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой для безынтерференционного количественного определения ультраследовых содержаний металлов и металлоидов и их изотопных соотношений в различных типах проб рассмотрено в учебном пособии [195]. Массспектрометрия с индуктивно связанной плазмой и лазерной абляцией (МС-ИСП-ЛА) [196] применена для исследования локализации неорганических элементов в молодых корнях растений в целях определения функциональных возможностей корней и транспорта питательных веществ в растениях. Разработанный метод пробоподготовки гидратированных образцов очень маленьких и хрупких корней использован для отображения радиального переноса корнями основных питательных веществ, что является необходимым условием для повышения эффективности поглощения питательных веществ в сельскохозяйственных культурах и оптимизации использования природных ресурсов в сельском хозяйстве. Кроме того, более глубокие знания о транспортировке потенциально токсичных микроэлементов, таких как кадмий и мышьяк, повышают безопасность пищевых продуктов. Метод МС-ИСП-ЛА имеет ряд преимуществ, таких как низкие пределы обнаружения, высокая чувствительность для многих элементов и доступность, по сравнению с SIMS и синхротронными рентгеновскими методами.

В обзоре [197] представлены оригинальные исследования по определению 37 элементов в лекарственных растениях и травах, их экстрактах, отварах и настойках методами атомной спектрометрии, такими как пламенная и электротермическая ААС; АЭС-МП и АЭС-ИСП; МС-ИСП.

Атомно-эмиссионная спектрометрия благодаря использованию разных источников возбуждения атомов является одним из наиболее распространенных методов анализа растительных материалов при экологическом мониторинге, оценке качества

растительного сырья для пищевой и фармацевтической отраслей. Методы ПАЭС, АЭС-ИСП и АЭС-МП применяют для анализа растворов растений после разложения и/или экстракции, анализ порошков и непосредственно органов растений проводят АЭС-методиками с дуговым разрядом или лазером. Последние достижения в прямом методе атомно-эмиссионной спектрометрии с лазерным возбуждением (ЛИЭС, англ. LIBS) представлены в обзорах [68, 198–203]. В этих публикациях детально рассмотрены способы подготовки образца к измерению, приемы получения и обработки спектров, особенности градуирования и границы применения ЛИЭС для характеризации и идентификации материалов в пространственно-разрешенных изображениях микробиологических, растительных и животных проб. В работе [32] предложена методика одновременного определения 23 элементов в порошках растений без озоления и кислотного разложения за счет специальных приемов получения и обработки спектров с пределами обнаружения (10⁻⁶-10⁻⁴ мас. %) и повышенной точностью результатов. Однако многие многоэлементные АЭС-методики с дуговой плазмой предусматривают полное [122, 204, 205] или частичное [206] озоление органического вещества растительной матрицы.

Основная проблема применения прямых методов анализа (РФА, ИНАА, АЭС и др.) заключается в необходимости при градуировании использовать достаточно большое число разнообразных референтных образцов (материалов), адекватных по составу анализируемым объектам. При анализе растворов нередко градуирование выполняют по водным моно- и/или мультиэлементным стандартным растворам, также используют водные растворы минеральных кислот или их смеси с гидрофильными органическими растворителями [161, 207]. Однако составы градуировочных растворов и реальных растительных проб нередко существенно отличаются, что снижает достоверность результатов из-за влияния, в первую очередь, матричных эффектов. Поэтому с целью подтверждения качества отдельных этапов анализа (пробоподготовка, измерение и обработка аналитических сигналов) и достоверности результатов в целом одновременно с каждой партией проб анализируют близкие по составу стандартные образцы растительных материалов [32, 159, 172, 208-212], применяют метод стандартных добавок [68, 142, 144, 148] или сравнивают с результатами анализа сертифицированным методом (методикой), основанном на других физикохимических принципах [58, 68, 86, 87, 181, 213-216]. Иногда матрицы ССО, используемые для контроля качества, не являются образцами растений. Например, с этой целью в работе [217] анализировали морской осадок (MESS-3), морские отложения (PACS-2) и сварочную пыль на фильтре (BCR-545). К сожалению, в многочисленных работах по ЛРС, например [104, 106, 107, 109], вообще не приводится информация о результатах валидации методик анализа растений и продуктов из них. Это означает, что авторы работ предполагают отсутствие матричных эффектов при измерениях, хотя экспериментально это не подтверждают.

ПРОИЗВОДИТЕЛИ СТАНДАРТНЫХ ОБРАЗЦОВ РАСТИТЕЛЬНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Большинство из перечисленных выше геохимических и экологических проектов разных стран включали программы разработки сертифицированных стандартных образцов или референтных растительных материалов, обеспечивающих сопоставимость и прослеживаемость (коммутативность) аналитических данных, если количество отобранного и приготовленного растительного материала было достаточным для постоянного использования в течение 20 и более лет [38, 218]. В это же время национальные метрологические институты и организации - координаторы международных научных проектов начали осуществлять разработку матричных стандартных образцов и референтных растительных материалов для обеспечения сопоставимости и согласованности результатов химических измерений.

Первый широко распространенный стандартный образец растительного материала - СО состава листьев капусты – в 1964 г. приготовил Г. Боуэн (H.J.M. Bowen, сельскохозяйственный институт, Англия) для согласования определений микроэлементов в растениях, хотя капуста, безусловно, является пищевой матрицей [38]. Профессор Боуэн обосновал выбор листьев капусты Marrow Stem Kale (*Brassica oleracea*) как стандартного образца, потому что листовые растения обладают способностью почти безбарьерно накапливать микроэлементы. Он описал процедуры приготовления и характеризации этого материала, указал на необходимость соблюдения трех требований при разработке биологического стандарта: (1) количество материала СО должно быть достаточным и доступным для длительного использования (сто и более килограммов); (2) приготовленный материал должен быть однородной смесью; (3) материал должен быть приготовлен таким образом, чтобы обеспечить длительное хранение без разложения. За 20 лет была собрана информация о содержаниях более 60 элементов в материале капусты Боуэна [219]. Эти рекомендации вошли в современные нормативные документы и используются производителями референтных материалов растительного происхождения.

С 1970-х гг. Институт стандартных образцов и технологии США, ранее Национальное бюро стандартов (National Bureau of Standards, NBS),

начал разрабатывать СО растений и пищевых матриц. Первыми ССО с сертифицированными содержаниями 25 элементов, включая Pb, Cd, As, Hg, Se, Cr, Ni, Be, Th и U, стали листья фруктового сада, листья шпината, пшеничная и рисовая мука [220]. К 1988 г. материал садовых листьев закончился, и в 1991 г. были выпущены широко известные и в настоящее время ССО листьев яблони SRM-1515 и листьев персика SRM-1547. в которых аттестованы содержания 24 элементов. В соответствие с требованиями закона США "О пищевых добавках в области здравоохранения и образования" NIST разработал и сертифицировал содержания Cd, Hg, Pb, As и трех специфичных флаваноидов в пищевых ботанических добавках, содержащих G. biloba: SRM-3246 (листья), SRM-3247 (экстракт) и SRM-3248 (таблетки) [221]. В SRM-4359 морских водорослей сертифицированы низкие уровни активности радионуклидов ⁴⁰K, ¹³⁷Cs, ²¹⁰Pb, ²¹⁰Po, ²²⁸Ra, ²³²Th, ²³⁴U, ²³⁵U, ²³⁸U, ²³⁸Pu, ²³⁹Pu, онные значения для 15 изотопов от антропогенных и природных источников.

В 1981 г. Национальным Исследовательским Советом Канады (National Research Council, NRC Canada) был начат канадский сельскохозяйственный проект по разработке стандартных сельскохозяйственных материалов [222]. Совместно с NIST были разработаны первые референтные образцы (PM): стебли и зерно кукурузы, кукурузный крахмал, кукурузные отруби, микрокристаллическая целлюлоза (хлопок), пшеничная клейковина, мука твердых сортов пшеницы, зерно твердой красной яровой пшеницы и мука мягкого сорта озимой пшеницы [223].

В Европе производство СО биологических и экологических материалов под руководством Европейского Союза (BCR/JRC-IRRM/JRC-Geel) началось с реализации Программы международного изучения и сертификации референтных материалов для анализа окружающей среды (ныне Программа стандартов, измерений и испытаний), организованной Бюро Европейской комиссии в 1972 г. в лабораториях Объединенного исследовательского центра (JRC) в Испре (Италия) и с 1984 г. в Институте стандартных образцов и измерений (IRMM) в Гееле (Бельгия) [224, 225]. Хорошо известны и широко используются в химическом анализа сертифицированные образцы, разработанные Европейским Союзом, такие ССО как: BCR-060 состава водного растения (Lagarosiphon major), в котором аттестованы содержания Cd, Cu, Mn, Hg, Pb и Zn и указаны информационные данные для 36 элементов [226]; ССО состава микроэлементов в листьях березы (BCR-100) и еловых иглах [227], в порошке сена и рисовой соломе как кормах для животных (BCR-129) [228], белом клевере (BCR-402) [229],

лишайнике (BCR-482) [230], новом образце капусты [231]. Уникальными являются сертифицированные образцы для измерения размеров наночастиц, которыми представлены элементы в растительных материалах [232], и установления изотопного состава цинка в растениях методом термоионизационной масс-спектрометрии (TIMS) [233].

Международное агентство по атомной энергии МАГАТЭ (International Atomic Energy Agency, ІАЕА) также производит ССО растительных материалов [234, 235]. В ССО клевера (IAIE CRM-156) и травы (IAIE CRM-372) аттестованы активности радионуклидов. В референтном материале для экологического мониторинга IAIE-336 (лишайник) рекомендованы содержания 19 микроэлементов и для 19 даны информационные значения. Водные мхи, в частности лишайник, являются уникальными индикаторами загрязнения окружающей среды, так как поглощение элементов в сосудистых растениях в основном проходит через корни [2, 96, 230]. База образцов МАГАТЭ пополняется также пищевыми матричными образцами [236].

В ходе реализации проектов по созданию СО получили научное обоснование, методическое и теоретическое развитие все этапы работ: отбор, приготовление и гомогенизация материала, исследование однородности распределения элементов и соединений [237, 238]; оценка наименьшей представительной массы; изучение стабильности, условий хранения и установление срока годности вещества [239, 240]; выбор методов анализа, способов обработки и представления аналитических результатов; алгоритмы оценивания метрологических характеристик при аттестации СО (средних значений и их неопределенности), оценивания метрологической прослеживаемости и согласованности новых и ранее разработанных СО [14, 15, 16, 241 и др.]; актуальность аттестации в растениях как органических, так и неорганических загрязнителей [242], а также в целом роль РМ в химической метрологии [17].

Одним из производителей референтных материалов почти 30 лет является Межинститутский Комитет (Comité Inter-Instituts, CII). Это объединение 30 европейских лабораторий, которые на регулярной основе готовят вещество различных растений и поставляют его на Международную биржу анализа растений (IPE) как референтный материал (OC WEPAL-IPE) для реализации Программы непрерывного тестирования квалификации лабораторий. В постоянно действующей Программе, организованной Университетом г. Вагенингена (Wageningen, Нидерланды), участвуют более 230 лабораторий по всему миру [243]. Организаторы изучают влияние гомогенности и стабильности приготовленного растительного

материала на результаты химического анализа [244, 245]. Лаборатории могут предлагать для совместных исследований вещество растений, произрастающих в их странах и представляющих интерес для национальной сельскохозяйственной и пищевой индустрии [246, 247]. Так, совместно с IPE Австралийская национальная аналитическая лаборатория (Australian National Analytical Reference Laboratory, ANARL) разработала СО для контроля содержаний органических загрязнителей и микроэлементов в сельскохозяйственных растениях (рис, пшеница, шпинат) и пищевых продуктах [248]. В небольшом перечне СО, разработанных в этой лаборатории, представлен уникальный образец состава листьев эвкалипта SLE1604RM, содержащий информацию о 61 микроэлементе. В настоящее время широко известны более 100 референтных материалов WEPAL-IPE, такие как банан (семена и мякоть плода), роза, крапива жгучая, картофель (клубень), зерно кукурузы, трава, акация (листья), киви (листья и стебель), масло пальмы, цветы и листья гладиолуса, баклажан (листья и плод), амариллис, подсолнух и др. Состав этих образцов представлен большим числом химических элементов и некоторых токсичных органических соединений.

Среди европейских производителей СО следует указать Институт ядерной химии и технологии (INCT) в Варшаве (Польша) [249], деятельность которого направлена на разработку ССО и РМ состава растений для неорганического анализа. Среди широко известных польских ССО – листья капусты [250], листья чая и смесь польских трав [251], листья табака сортов Basma и Virginia [252]. Возникающие при разработке СО аналитические и методические проблемы изучены и освещены в работах [190, 210, 253].

Белорусский государственный институт метрологии (БелГИМ, Беларусь) известен разработанными ССО удельной активности радионуклидов ¹³⁷Cs, ⁴⁰K и ⁹⁰Sr в зерне пшеницы [254], сои и рапса.

В СССР в 1978 г. первые сертифицированные стандартные образцы растительных веществ зерно пшеницы, злаковая травяная смесь и клубни картофеля — были разработаны Марийским государственным университетом совместно с Центральным институтом агрохимического обслуживания сельского хозяйства (ЦИНАО) [255]. После доаттестации этих ГСО в 1985 г., проведенной совместно Сибирским НИИ земледелия и химизации Сибирского отделения ВАСХНИЛ, ЦИНАО и Свердловским филиалом Всесоюзного НИИ метрологии им. Д.И. Менделеева, в сертификатах для органической матрицы были указаны аттестованные содержания 22 химических элементов, изотопов ⁹⁰Sr и ¹³⁷Cs, а также 5 агрохимических показателей и 17 биохимических соединений [256]. В России многоэлементные стандартные образцы для экологических исследований были приготовлены и аттестованы в 2007 г. в Институте геохимии им. А.П. Виноградова Сибирского отделения Российской академии наук (ИГХ СО РАН, Иркутск). В сертификатах трех ГСО состава водного растения элодеи канадской (Elodea Canadensis Michaux), травосмеси луговой (Herbae pratenses) и листа березы (Betulinus folium) число аттестованных/рекомендованных элементов составляет 34/30, 38/25 и 41/22 соответственно [257]. Для оценки согласованности их составов между собой использован подход Тьюки, метрологическая прослеживаемость установлена относительно четырех ССО растительных материалов Китая GVS-1-4 [258]. В РФ большое число СО растительных материалов представлено отраслевыми стандартными образцами (например, Научно-производственного и аналитического центра "Эколан"), применение которых обеспечивает контроль качества и безопасности сельскохозяйственной продукции и кормов для животных по содержанию проксиматов и 10-12 элементов, в том числе питательных K, Ca, P, N, Mn, Zn, Cu, Fe и токсичных Cd, Hg, Pb, As. В настоящее время в российских ССО растительных материалов (зерновые культуры, овощи и пищевые продукты) преимущественно аттестованы содержания от 1 до 7-12 элементов.

В Индии в 1955-1960-х гг. были начаты исследования по разработке стандартных образцов для контроля качества производства и использования лекарственных средств и фармацевтических препаратов. В 1996 г. проведено Национальное рабочее совещание и организована целевая группа для формирования и реализации Общей национальной программы, направленной на разработку и использование стандартных образцов этой отрасли [259]. В настоящее время изучение лекарственных растений, в первую очередь органических биологически активных соединений и их фармацевтического действия на организм человека, продолжается с использованием современных аналитических методов [212, 260]. Тем не менее данных о содержании ХЭ в органах дикорастущих и культивируемых для фармацевтической индустрии растений очень мало, так как основная доля исследований ЛРС в Индии сосредоточена на определении органических соединений [261].

К крупным производителям ССО растений в Азии относятся указанный выше Институт геофизических и геохимических исследований Китая (Institute of Geophysical and Geochemical Exploration, IGGE) и Национальный метрологический институт (NIM). В ССО (IGGE) состава веток и листьев кустарников NIM-GBW07602 и NIM-GBW07603, листьев черного тополя и чая NIM-GBW07604 и NIM-GBW07605 по данным межлабораторного эксперимента с использованием преимущественно многоэлементных методов анализа (МС-ИСП, АЭС-ИСП, ИНАА и др.) аттестованы содержания 43 элементов и для 6 элементов оценены информационно. Перечень китайских растительных материалов, необходимых для контроля качества и безопасности овощей и фруктов, включает ССО (рис и рисовая мука, чай, табак, листья персика, капуста, кукуруза, пшеница, помидоры и т.д.) и РМ (рис, соя, яблоки, шпинат, лук, морковь и др.) [218, 262].

В Японии матричные СО и ССО разрабатывают Национальный институт по изучению окружающей среды (National Institute for Environmental Studies, NIES) и Национальный метрологический институт Японии (National Metrology Institute of Japan, NMIJ). Задачей первых СО (почва, водоросли, листья перца и др.), разработанных в NIES, было обеспечение сопоставимости данных в экологических исследованиях, позже в перечень образцов были добавлены пищевые продукты растительного происхождения (рис, соя и др.) [263–265].

Корейский институт стандартов и науки (Korea Research Institute of Standards and Science, KRISS), организованный в 1975 г. как национальный метрологический институт, выпускает сертифицированные CO [266], ориентированные на использование для оценки качества традиционных в Корее продуктов питания (рисовая мука, соя, китайская и кимчи капуста, томатная паста, листья чая, порошок женьшеня и др.).

В Бразилии вопросами разработки СО занимается National Institute of Metrology, Standardization and Industrial Quality (INMETRO) в рамках кооперации с NIST (США) по проектам-прогнозам ООН о продовольственной и сельскохозяйственной перспективе (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO). Аналитические методы в аккредитованных лабораториях разных секторов экономики используют международные ССО и РМ. Для пищевой промышленности разрабатываются национальные РМ состава риса и кофе [267], производство чая Yerba mate обеспечивается контролем за безопасностью продукта при экспрессном определении токсичных элементов [69]; для сахаро-энергетического сектора создан инновационный матричный РМ, приготовленный из листьев сахарного тростника [268].

Кроме перечисленных учреждений и организаций, в разных странах над созданием СО работают научные группы и лаборатории национальных метрологических или научно-исследовательских институтов, которые занимаются изучением и охраной окружающей среды, производством сельскохозяйственной продукции, лекарственных и косметических средств.

ИНФОРМАЦИОННОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ АНАЛИТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ДАННЫМИ О СТАНДАРТНЫХ ОБРАЗЦАХ РАСТИТЕЛЬНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Информация о разработанных СО обычно представлена на сайтах производителей стандартных образцов и/или доступна через национальные и международные базы данных. Для составления общего представления о существовавших и ныне используемых СО состава растительных материалов использованы базы "Аршин", "СО-MAR" и "GeoRem". Кроме того, дополнительно использовали информацию с сайтов производителей СО разных стран (BCR, NIST, IPE-WEPAL, национальных метрологических и научно-исследовательских институтов Китая, Японии, Кореи, Австралии и т.д.). Варианты наполнения каждой из упомянутых выше электронных баз данных напрямую зависят от целей их создания, но не всегда обеспечивают согласованность данных между базами и полноту информации от производителей СО. Способы пополнения каждой из рассмотренных электронных баз определяются ее создателями. Это может быть: (1) государственный орган регистрации и учета СО; (2) независимая организация по заявкам производителей СО; (3) независимые пользователи по данным международных публикаций. (1) Например, национальная база Российской Федерации "Аршин", которая содержит информацию только о ГСО, находится в ведении Научно-методического центра Государственной службы стандартных образцов (ГССО) УНИИМ – филиала ФГУП "ВНИИМ им. Д.И. Менделеева". Информацию об ОСО и контрольных пробах (референтных материалах) нужно искать самостоятельно в отраслевых реестрах и каталогах российских производителей СО. (2) Международной базой стандартных образцов "COMAR" управляет секретариат при Федеральном институте по исследованию и тестированию материалов (ВАМ, Германия) [269]. Деятельность "COMAR" осуществляется через назначенные координирующие центры партнеров (обычно это национальные метрологические институты или производители СО), которые взаимодействуют на добровольной основе. Если производитель СО по причине "забывчивости" или незаинтересованности не позаботится о внесении или актуализации СО, то информация не будет доведена до пользователей, что крайне неудобно при поиске международных СО, адекватных по составу исследуемым пробам. (3) В базу "GeoRem" включаются СО, которые фигурируют в англоязычных публикациях. Информация о международных и российских СО из статей на русском языке, в том числе из переводных журналов, не используется. Характерной особенностью базы "GeoRem" является присутствие дублирующих названий одного и того же образца из-за не-



Рис. 1. Количество разработанных стандартных образцов растительных материалов производителями разных стран по данным открытых источников на 01.03.2020 г.

которых "вольностей" авторов англоязычных статей, которые редко считают нужным использовать в текстах полное утвержденное название СО и называют их по своему усмотрению. Однако в случае указания корректных имен стандартных образцов плюс этой базы очевиден для производителей СО и аналитиков. По ссылкам в списке научных публикаций можно найти информацию о результатах валидации и верификации какоголибо метода (методики) при использовании того и иного СО, а также оценить степень успешности его применения.

Количество и доля СО растительных материалов, разработанных организациями-производителями СО из разных стран, представлены по данным на 01.03.2020 г. (рис. 1). Следует отметить, что, несмотря на огромное разнообразие видов растений, общее число СО растений составляет около восьми сотен, что значительно меньше, чем количество СО сырья и продуктов в металлургической промышленности. Распределение образцов на сертифицированные образцы, референтные материалы и образцы для контроля качества по числу в каждой группе указывает, что наибольшее количество разработанных СО представлено в группе референтных материалов при минимальном числе образцов КК (рис. 2). Очевидно, СО (PM) пользуются максимальным спросом. В этой группе доля СО с истекшим сроком годности существенно меньше, чем в группе сертифицированных СО, хотя общие количества ССО и PM отличаются незначительно. Классификация СО по видам растений и потребительским качествам (рис. 3) свидетельствует о высокой пищевой значимости сельскохозяйственных зерновых культур во всех странах мира.

* * *

До 70-х годов прошлого века аналитические лаборатории для поверки и калибровки приборов готовили и использовали собственные моно- и мультиэлементные растворы, задавая концентрации расчетным путем и уточняя их экспериментально. Появление первого ССО (капуста Боуэна) показало, что многие лаборатории способны самостоятельно приготовить в достаточном количестве растительные материалы, определить содержания большого числа элементов и оценить бюджет их неопределенности. Однако эти процедуры трудоемкие, и экономически более выгодно использовать сертифицированные стандартные образцы, изготовленные аккредитованными производителями согласно международным требова-



Рис. 2. Количество стандартных образцов растительных материалов по типу аттестации (информация по открытым данным на 01.03.2020 г.).

ниям. Тем более, что в настоящее время международный характер регулирования качества аналитических работ с целью обеспечения единства выполняемых измерений в соответствии с ISO 17025 предусматривает обязательное применение ССО и PM растений и продуктов из них [17, 18, 64, 242, 262], и для химических элементов и групп химических веществ существует большой список матричных СО разных производителей. По этой причине большинство лабораторий использует общепризнанные коммерческие ССО и PM, для которых метрологические характеристики (установленные содержания и их неопределенности) прописаны в сертификатах. Тем не менее, проблема получения прослеживаемых и належных аналитических результатов продолжает оставаться актуальной. Так, в обзоре за 1990-1996 гг. [110] были рассмотрены 82 научные работы, посвяшенные микроэлементам в пишевых продуктах, и показано, что авторы менее половины статей применяли ССО для оценки достоверности аналитических данных. В обзоре [197] рассмотрены 55 статей, опубликованных после 2000 г., ~30% из которых не содержит информацию по оценке сопоставимости (правильности, точности) результатов анализа лекарственных растений, экстрактов, отваров и настоек из них. Отсутствие таких данных наиболее характерно для российских публикаций по элементному и компонентному составу конкретных видов растений [31, 104 и др.] и для статей, посвященных обработке аналитических результатов с помошью многомерного статистического анализа данных [72, 88]. В настоящее время большинство коммерческих лабораторий аккредитовано, т.е. процедуры обеспечения и контроля качества с использованием СО регулярно выполняются. Однако на примерах проектов Геологической службы Норвегии [270] показано, что существует ряд проблем качества, таких как временные тренды, заражение проб, несопоставимость концентраций между различными партиями из-за использования разных инструментальных методов и чрезмерного округления результатов анализа. Кроме этого, приходится



Рис. 3. Классификация стандартных образцов по типу растительного материала (информация по открытым данным на 01.03.2020 г.).

признать, что в существующих ССО и РМ разнообразие комбинаций свойств и уровня содержания аналита, состава и свойств вещества матрицы не всегда позволяет аналитикам использовать их в полной мере из-за не соответствия анализируемым пробам. В связи с этим для изучения соотношений элементов в природных средах, пищевых и лекарственных продуктах необходима разработка новых матричных СО растительных материалов. Это позволит проверить достоверность (осуществить валидацию) и оценить неопределенность существующих и новых методов анализа, обеспечить их успешное применение для системного контроля качества результатов, проводить сертификационные исследования и квалификационные тесты.

Работа выполнена в рамках государственного задания по проекту IX.127.1.4. № 0350-2019-0005.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kabata-Pendias A. Trace elements in soils and plants. 4th Ed. Taylor and Francis Group, LLC, N.Y., 2011. 505 p.
- Reimann C., Koller F., Frengstad B., Kashulina G., Niskavaara H., Englmaier P. Comparison of the element composition in several plant species and their substrate from a 1500000-km² area in Northern Europe // Sci. Total Environ. 2001. V. 278. № 1–3. P. 87.
- 3. Buck B.J., London S.C., McLaurin B.T., Metcalf R., Mouri H., Selinus O., Shelembe R. The emerging field of medical geology in brief: Some examples // Environ. Earth Sci. 2016. V. 75. № 6. Article 449.
- Markert B. Establishing of "Reference Plant" for inorganic characterization of different plant species by chemical fingerprinting // Water, Air, Soil Pollut. 1992. V. 64. № 3–4. P. 533.
- 6. Васильева И.Е., Шабанова Е.В. Стандартные образцы геологических материалов и объектов окружающей среды: проблемы и решения // Журн. аналит. химии. 2017. Т. 72. № 2. С. 99. (Vasil'eva I.E., Shabanova E.V. Certified reference materials of geological and environmental objects: Problems and solutions // J. Analyt. Chem. 2017. V. 72. № 2. Р. 129.)
- ГОСТ 8.315-97. Государственная система обеспечения единства измерений. Стандартные образцы состава и свойств веществ и материалов. Основные положения. М.: Стандартинформ, 2010. 16 с.
- ISO/IEC Guide 99:2007. International vocabulary of metrology. Basic and general concepts and associated terms (VIM). Geneva: ISO, 2007. 108 p.
- ГОСТ 32934-2014 (ISO Guide 30:1992). Стандартные образцы. Термины и определения, используемые в области стандартных образцов. М.: Стандартинформ, 2015. 19 с.

- 10. ISO Guide 30:2015. Reference materials. Selected terms and definitions. Geneva: BSI, 2015. 18 p.
- ГОСТ 8.531-2002. Государственная система обеспечения единства измерений. Стандартные образцы состава монолитных и дисперсных материалов. Способы оценивания однородности. М.: Изд-во стандартов, 2003. 16 с.
- ГОСТ 8.532-2002. Государственная система обеспечения единства измерений. Стандартные образцы состава веществ и материалов. Межлабораторная метрологическая аттестация. Содержание и порядок работ. М.: Изд-во стандартов, 2002. 10 с.
- ISO GUIDE 31:2015. Reference materials. Contents of certificates, labels and accompanying documentation. Geneva: BSI, 2015. 20 p.
- 14. ISO GUIDE 33:2015. Reference materials. Good practice in using reference materials. Geneva: BSI, 2015. 42 p.
- 15. ISO/IEC Guide 98-3:2008. Uncertainty of measurement. Guide to the expression of uncertainty in measurement. Geneva: ISO, 2008. 130 p.
- ГОСТ ISO Guide 35-2015. Стандартные образцы. Общие и статистические принципы сертификации (аттестации). М.: Стандартинформ, 2017. 65 с.
- 17. *Linsinger T.P.J., Emons H.* The role of reference materials in chemical metrology // Chimia. 2009. V. 63. Nº 10. P. 629.
- Olivares I.R.B., Souza G.B., Nogueira A.R.A., Toledo G.T.K., Marcki D.C. Trends in developments of certified reference materials for chemical analysis -Focus on food, water, soil, and sediment matrices // Trends Anal Chem. 2018. V. 100. P. 53.
- 19. *Hulme N., Hammond J.* Is your spectrophotometer still "pharma compliant"? A review of the new European pharmacopoeia 10th edition // Spectrosc. Eur. 2020. V. 32. № 1. P. 14.
- Об охране окружающей среды: Федер. закон Рос. Федерации 10 января 2002 г. № 7-ФЗ: принят Гос. Думой Федер. Собр. Рос. Федерации 20 декабря 2001 г.: одобрен Советом Федерации Федер. Собр. Рос. Федерации 26 декабря 2001 г.
- Указ Президента РФ от 21 января 2020 г. № 20 "Об утверждении Доктрины продовольственной безопасности Российской Федерации".
- 22. Об обеспечении единства измерений: федер. закон Рос. Федерации 26 июня 2008 г. № 102-ФЗ: принят Гос. Думой Федер. Собр. Рос. Федерации 11 июня 2008 г.: одобрен Советом Федерации Федер. Собр. Рос. Федерации 18 июня 2008 г.
- ГОСТ ISO/IEC 17025-2019. Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий. М.: Стандартинформ, 2019. 32 с.
- 24. May W., Parris R. II, Beck C., Fassett J., Greenberg R., Guinther F., Kramer G., Wise S., Gills T., Colbert J., Gettings R., MacDonald B. Definition of terms and models used at NIST for value-assignment of reference materials for chemical measurements. NIST Spec. Publ. 260-136. Gaithersburg: National Institute of Standards and Technology (NIST), 2000. 16 p.
- 25. *Mengel K., Kirkby E.A., Kosegarten H., Appel T.* Principles of Plant Nutrition. Dordrecht, Springer Science + Business Media, 2001. 849 p.

- 26. *ITRC*. Phytotechnology Technical and Regulatory Guidance Document. ITRC, 2001. 124 p.
- 27. *Maurice P.A.* Environmental Surfaces and Interfaces from the Nanoscale to the Global Scale. N.Y.: Wiley & Sons, 2009. 464 p.
- 28. *Epstein E*. The anomaly of silicon in plant biology // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. № 1. P. 11.
- Hodson M.J., White P.J., Mead A., Broadley M.R. Phylogenetic variation in the silicon composition of plants // Ann. Bot. 2005. V. 96. № 6. P. 1027.
- Кашин В.К. Условно необходимые микроэлементы в лекарственных растениях Забайкалья // Химия в интересах устойчивого развития. 2011. Т. 19. № 3. С. 259. (Kashin V.K. Conditionally essential microelements in the medicinal herbs of Transbaikalia // Chemistry for Sustainable Development. 2011. V. 19. № 3. Р. 237.)
- 31. Решетов Я.Е., Белоусов М.В., Авдеева Е.Ю., Шурупова М.Н. Сравнительное исследование элементного состава и биологически активных веществ растений рода Saussurea // Химия растительного сырья. 2018. № 4. С. 205.
- 32. Васильева И.Е., Шабанова Е.В. Определение микроэлементов в растениях методом дуговой атомно-эмиссионной спектрометрии // Аналитика и контроль. 2019. Т. 23. № 3. С. 298.
- 33. Храмова Е.П., Боярских И.Г., Чанкина О.В., Куценогий К.П. Исследование элементного состава растений в зоне геологической неоднородности // Растительный мир Азиатской России. 2011. Т. 8. № 2. С. 104.
- 34. Зубков Н.В., Зубкова В.М. Накопление сухой массы и распределение в растениях тяжелых металлов при различной концентрации их в почве // Вестник Московского городского педагогического университета. Серия: Естественные науки. 2010. № 2. С. 43.
- 35. Wiggenhauser M., Bigalke M., Imseng M., Keller A., Archer C., Wilcke W., Frossard E. Zinc isotope fractionation during grain filling of wheat and a comparison of zinc and cadmium isotope ratios in identical soil– plant systems // New Phytol. 2018. V. 219. № 1. P. 195.
- 36. Шилова И.В., Барановская Н.В., Мустафин Р.Н., Суслов Н.И. Особенности элементного состава экстракта Alfredia Cernua, обладающего психотропным действием // Химия растительного сырья. 2019. № 4. С. 191.
- 37. *de Mello J.E., Novo D.L.R., Coelho Junior G.S., Scaglioni P.T., Mesko M.F.* A green analytical method for the multielemental determination of halogens and sulfur in pet food // Food Anal. Methods. 2020. V. 13. № 1. P. 131.
- Bowen H.J.M. Comparative elemental analyses of a standard plant material // Analyst. 1967. V. 92 (1091). P. 124.
- 39. Selina M., Drolc A., Selina L., Levei E. Validation and measurement uncertainty evaluation of ICP-OES method for the multi-elemental determination of essential and nonessential elements from medical plants and their aqueous extracts // J. Anal. Sci. Technol. 2014. V. 5. Article 37.

- 40. *Walton J.R.* Bioavailable Aluminum: Its metabolism and effects on the environment / Encyclopedia of Environmental Health / Ed. Nriagu J.O. 2nd ed. Elsevier. 2019. P. 328.
- Chang H.F., Wang S.L., Lee D.C., Hsiao S.S.Y., Hashimoto Y., Yeh K.C. Assessment of indium toxicity to the model plant Arabidopsis // J. Hazard Mater. 2020. V. 387. Article 121983.
- 42. Cassidy N.G. A rational method for recording and comparing concentrations of plant constituents that are water soluble, with particular reference to chloride and potassium // Plant Soil. 1966. V. 25. № 3. P. 372.
- Jeyakumar P., Balamohan T.N. Diagnosis of nutritional disorders. http://www.agritech.tnau.ac.in/agriculture/PDF/Diagnosis%20of%20nutritional%20disorders.pdf (01.04.2020).
- 44. Ягодин Б.А., Жуков Ю.П., Кобзаренко В.И. Агрохимия / Под ред. Ягодина Б.А. М.: Колос, 2002. 584 с.
- 45. *Kovalevskii A.L.* Biogeochemical prospecting for platinum group metals in eastern Siberia // Geochemistry: Explor. Environ. Anal. 2001. V. 1. № 2. P. 143.
- 46. Zimmermann S., Messerschmidt J., Von Bohlen A., Sures B. Determination of Pt, Pd and Rh in biological samples by electrothermal atomic absorption spectrometry as compared with adsorptive cathodic stripping voltammetry and total-reflection X-ray fluorescence analysis // Anal. Chim. Acta. 2003. V. 498. № 1–2. P. 93.
- 47. Dongarrá G., Varrica D., Sabatino G. Occurrence of platinum, palladium and gold in pine needles of *Pinus pinea* L. from the city of Palermo (Italy) // Appl. Geochem. 2003. V. 18. № 1. P. 109.
- 48. *Ravindra K., Bencs L., Van Grieken R.* Platinum group elements in the environment and their health risk // Sci. Total Environ. 2004. V. 318. № 1–3. P. 1.
- Reimann C., Niskavaara H. Regional distribution of Pd, Pt and Au-emissions from the nickel industry on the Kola Peninsula, NW-Russia, as seen in moss and humus samples / Palladium Emissions in the Environment / Eds. Zereini F., Alt F. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2006. P. 53.
- 50. Пшеничкина Ю.А., Пшеничкин А.Я. Биогеохимические особенности накопления платины в Scutellaria baicalensis Georgi (Lamiaceae) // Сибирский экологический журн. 2018. Т. 25. № 2. С. 256. (Pshenichkina Y.A., Pshenichkin A.Y. Biogeochemical features of platinum accumulation in Scutellaria Baicalensis Georgi (Lamiaceae) // Contemporary Problems of Ecology. 2018. V. 11. № 2. Р. 221.)
- Jurkin D., Zgorelec Z., Rinkovec J. Concentrations of Pt, Pd and Rh in soil and vegetation: A review // J. Cent. Eur. Agric. 2019. V. 20. № 2. P. 686.
- 52. Kramer K.J.M., De Haan E.P.M., Groenewoud H.V.H., Dorten W., Kramer G.N., Muntau H., Quevauviller P. Certified reference materials for the quality control of rare earth element determinations in the environment // Trends Anal. Chem. 2002. V. 21. № 11. P. 762.
- 53. *Tyler G*. Rare earth elements in soil and plant systems A review // Plant Soil. 2004. V. 267. № 1–2. P. 191.
- Kovalsky V V. Geochemical ecology and problems of health // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B: Biol. Sci. 1979. V. 288. № 1026. P. 185.

- 55. Ковалевский А.Л. Биогеохимия растений. Новосибирск: Наука, Сиб. отд., 1991. 294 с.
- 56. *Nagajyoti P.C., Lee K.D., Sreekanth T.V.M.* Heavy metals, occurrence and toxity for plants: A review // Environ. Chem. Lett., 2010. № 8. P. 199.
- 57. Шафигуллин Д.Р. Изучение изменений некоторых биохимических показателей сои овощной (*Glycine max* L.) // Теоретические и прикладные проблемы агропромышленного комплекса. 2019. Т. 41. № 3. С. 30.
- García-Delgado C., Cala V., Eymar E. Influence of chemical and mineralogical properties of organic amendments on the selection of an adequate analytical procedure for trace elements determination // Talanta. 2012. V. 88. P. 375.
- 59. *Khan A., Khan S., Khan M.A., Qamar Z., Waqas M.* The uptake and bioaccumulation of heavy metals by food plants, their effects on plants nutrients, and associated health risk: A review // Environ. Sci. Pollut. Res. 2015. V. 22. № 18. P. 13772.
- 60. *Cloquet C., Carignan J., Lehmann M.F., Vanhaecke F.* Variation in the isotopic composition of zinc in the natural environment and the use of zinc isotopes in biogeosciences: A review // Anal. Bioanal. Chem. 2008. V. 390. № 2. P. 451.
- 61. *Bolou-Bi E.B., Vigier N., Brenot A., Poszwa A.* Magnesium isotope compositions of natural reference materials // Geostand. Geoanal. Res. 2009. V. 33. № 1. P. 95.
- Xiao J., Vogl J., Rosner M., Deng L., Jin Z. A validated analytical procedure for boron isotope analysis in plants by MC-ICP-MS // Talanta. 2019. V. 196. P. 389.
- 63. Wolf W.R, Andrews K.W. A system for defining reference materials applicable to all food matrices // Fresenius J. Anal. Chem. 1995. V. 352. № 1. P. 73.
- 64. *Wise S.A., Phillips M.M.* Evolution of reference materials for the determination of organic nutrients in food and dietary supplements A critical review // Anal. Bioanal. Chem. 2019. V. 411. № 1. P. 97.
- 65. Li Y., Wang Y., Gou X., Su Y., Wang G. Risk assessment of heavy metals in soils and vegetables around non-ferrous metals mining and smelting sites, Baiyin, China // J. Environ. Sci. 2006. V. 18. № 6. P. 1124.
- 66. Anunciação D.S., Leao D.J., de Jesus R.M., Ferreira S.L.C. Use of multivariate analysis techniques for evaluation of analytical data – Determination of the mineral composition of cabbage (*Brassica oleracea*) // Food Anal. Methods. 2011. V. 4. P. 286.
- 67. do Carmo Federici Padilha C., de Martin Moraes P., de Arruda Garcia L., Mariane Costa Pozzi C., Pace Pereira Lima, G. Serra Valente J.P., Alves Jorge S.M., de Magalhães Padilha, P. Evaluation of Cu, Mn, and Se in vegetables using ultrasonic extraction and GFAAS quantification // Food Anal. Methods. 2011. V. 4. № 3. P. 319.
- Zivkovic S., Savovic J., Kuzmanovic M., Petrovic J., Momcilovic M. Alternative analytical method for direct determination of Mn and Ba in peppermint tea based on laser induced breakdown spectroscopy // Microchem. J. 2018. V. 137. P. 410.
- 69. Pardinho R.B., Dalla Vecchia P., Mendes A.L.G., Bizzi C.A., Mello P.A., Duarte F.A., Flores E.M.M. Deter-

mination of toxic elements in *Yerba Mate* by ICP-MS after diluted acid digestion under O_2 pressure // Food Chem. 2018. V. 263. P. 37.

- 70. Gamela R.R., Costa V.C., Pereira-Filho E.R. Multivariate optimization of ultrasound-assisted extraction procedure for the determination of Ca, Fe, K, Mg, Mn, P, and Zn in pepper samples by ICP OES // Food Anal. Methods. 2020. V. 13. № 1. P. 69.
- Титаренко В.О., Каунова А.А., Темердашев З.А., Попандопуло В.Г. Исследование взаимосвязи между элементным составом винограда и почвой региона его произрастания // Аналитика и контроль. 2016. Т. 20. № 2. С. 138.
- Milićević T., Relić D., Urošević M.A., Vuković G., Škrivanj S., Samson R., Popović A. Integrated approach to environmental pollution investigation – Spatial and temporal patterns of potentially toxic elements and magnetic particles in vineyard through the entire grapevine season // Ecotoxicol. Environ. Safety. 2018. V. 163. № 15. P. 245.
- Rai P.K., Lee S.S., Zhang M., Tsang Y.F., Kim K.H. Heavy metals in food crops: Health risks, fate, mechanisms, and management // Environ. Int. 2019. V. 125. P. 365.
- 74. Barbosa R.M., Batista B.L., Varrique R.M., Coelho V.A., Campiglia A.D., Barbosa F, Jr. The use of advanced chemometric techniques and trace element levels for controlling the authenticity of organic coffee // Food Res. Int. 2014. V. 61. № 7. P. 246.
- 75. Сысо А.И., Сиромля Т.И., Мяделец М.А., Черевко А.С. Эколого-биогеохимическая оценка элементного и биохимического состава растительности антропогенно нарушенных экосистем (на примере Achillea Millefolium L.) // Сибирский экологический журн. 2016. Т. 23. № 5. С. 782. (Syso A.I., Syromlya T.I., Myadelets M.A., Cherevko A.S. Ecological and biogeochemical assessment of elemental and biochemical composition of the vegetation of anthropogenically disturbed ecosystems (based on the example of Achillea Millefolium L.) // Contemporary Problems of Ecology. 2016. V. 9. № 5. Р. 643.)
- 76. Habte G., Hwang I.M., Kim J.S., Hong J.H., Hong Y. S., Choi J.Y., Nho E.Y., Jamila N., Khan N., Kim K.S. Elemental profiling and geographical differentiation of Ethiopian coffee samples through inductively coupled plasma-optical emission spectroscopy (ICP-OES), ICPmass spectrometry (ICP-MS) and direct mercury analyzer (DMA) // Food Chem. 2016. V. 212. P. 512.
- 77. Allan M., Le Roux G., De Vleeschouwer F., Bindler R., Blaauw M., Piotrowska N., Sikorski J., Fagel N. Highresolution reconstruction of atmospheric deposition of trace metals and metalloids since AD 1400 recorded by ombrotrophic peat cores in Hautes-Fagnes, Belgium // Environ. Pollut. 2013. V. 178. P. 381.
- Malea P., Kevrekidis T. Trace element (Al, As, B, Ba, Cr, Mo, Ni, Se, Sr, Tl, U and V) distribution and seasonality in compartments of the seagrass Cymodocea nodosa // Sci. Total Environ. 2013. V. 463–464. P. 611.
- Wu Q., Wang S., Wang L., Liu F., Lin C. J., Zhang L., Wang F. Spatial distribution and accumulation of Hg in soil surrounding a Zn/Pb smelter // Sci. Total Environ. 2014. V. 496. P. 668.

- Shahid M., Dumat C., Khalid S., Schreck E., Xiong T., Niazi N.K. Foliar heavy metal uptake, toxicity and detoxification in plants: A comparison of foliar and root metal uptake // J. Hazard. Mater. 2017. V. 325. P. 36.
- Brooks R.R. Biological Methods of Prospecting for Minerals. N.Y.: Wiley & Sons, 1983. 322 p.
- Krämer U. Metal hyperaccumulation in plants // Annu. Rev. Plant Biol. 2010. V. 61. № 1. P. 517.
- Reeves R.D., Baker A.J.M. Metal-accumulating plants / Phytoremediation of Toxic Metals. Using Plants to Clean up the Environment / Eds. Raskin I., Ensley B.D. Wiley, New York. 2000. P. 193.
- 84. Álvarez E., Fernández M.L., Vaamonde C., Fernández M.J. Heavy metals in the dump of an abandoned mine in Galicia (NW Spain) and in the spontaneously occurring vegetation // Sci. Total Environ. 2003. V. 313. № 1–3. P. 185.
- 86. Nečemer M., Kump P., Ščančar J., Jaćimović R., Simčič J., Pelicon P., Budnar M., Jeran Z., Pongrac P., Regvar M., Vogel-Mikuš K. Application of X-ray fluorescence analytical techniques in phytoremediation and plant biology studies // Spectrochim. Acta B: At. Spectrosc. 2008. V. 63. № 11. P. 1240.
- Kroukamp E.M., Wondimu T., Forbes P.B.C. Metal and metalloid speciation in plants: Overview, instrumentation, approaches and commonly assessed elements // Trends Anal. Chem. 2016. V. 77. P. 87.
- Elshamy M.M., Heikal Y.M., Bonanomi G. Phytoremediation efficiency of *Portulaca oleracea* L. naturally growing in some industrial sites, Dakahlia District, Egypt // Chemosphere. 2019. V. 225. P. 678.
- 89. *Thompson M*. Data quality in applied geochemistry: the requirements, and how to achieve them // J. Geochem. Explor. 1992. V. 44. № 1–3. P. 3.
- 90. *Koval P.V., Burenkov E.K., Golovin A.A.* Introduction to the program "Multipurpose Geochemical Mapping of Russia"// J. Geochem. Explor. 1995. V. 55. № 1–3. P. 115.
- 91. Xie X. Analytical requirements in international geochemical mapping // Analyst. 1995. V. 120. № 5. P. 1497.
- 92. Blaser P., Zimmermann S., Luster J., Shotyk W. Critical examination of trace element enrichments and depletions in soils: As, Cr, Cu, Ni, Pb, and Zn in Swiss forest soils // Sci. Total Environ. 2000. V. 249. № 1–3. P. 257.
- 93. *Wang X., Zhang Q., Zhou G.* National-scale geochemical mapping projects in China // Geostand. Geoanal. Res. 2007. V. 31. № 4. P. 311.
- 94. *Inácio M., Pereira V., Pinto M.* The soil geochemical atlas of Portugal: Overview and applications // J. Geochem. Explor. 2008. V. 98. № 1. P. 22.
- 95. *Korobova E., Romanov S., Silenok A.* Endemic diseases of geochemical origin and methodological approaches toward their prevention and elimination // Environ. Geochem. Health. 2019. Article № 0123456789.

- 96. *Szczepaniak K., Biziuk M.* Aspects of the biomonitoring studies using mosses and lichens as indicators of metal pollution // Environ. Res. 2003. V. 93. № 3. P. 221.
- 97. Aubert D., Le Roux G., Krachler M., Cheburkin A., Kober B., Shotyk W., Stille P. Origin and fluxes of atmospheric REE entering an ombrotrophic peat bog in Black Forest (SW Germany): Evidence from snow, lichens and mosses // Geochim. Cosmochim. Acta. 2006. V. 70. № 11. P. 2815.
- 98. *Lubbe A., Verpoorte R.* Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials // Ind. Crops Prod. 2011. V. 34. № 1. P. 785.
- 99. Баяндина И.И., Загурская Ю.В. Взаимосвязь вторичного метаболизма и химических элементов в лекарственных растениях // Сибирский медицинский журн. (Иркутск), 2014. № 8. С. 107.
- 100. Гусев Н.Ф., Петрова Г.В., Филиппова А.А., Немерешина О.Н. Перспективы использования лекарственных растений в современной России // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2014. № 2(46). С. 167.
- 101. Tinkov A.A., Ajsuvakova O.P., Skalnaya M.G., Popova E.V., Sinitskii A.I., Nemereshina O.N., Skalny A.V. Mercury and metabolic syndrome: A review of experimental and clinical observations // Bio-Metals. 2015. V. 28. № 2. P. 231.
- 102. Rodushkin I., Ödman F., Holmström, H. Multi-element analysis of wild berries from northern Sweden by ICP techniques // Sci. Total Environ. 1999. V. 231. № 1. P. 53.
- 103. Rodushkin I., Engström E., Sörlin D., Baxter D. Levels of inorganic constituents in raw nuts and seeds on the Swedish market // Sci. Total Environ. 2008. V. 392. № 2–3. P. 290.
- 104. Рамазанов А.Ш., Балаева Ш.А., Шахбанов К.Ш. Химический состав плодов и масла расторопши пятнистой, произрастающей на территории республики Дагестан // Химия растительного сырья. 2019. № 2. С. 113.
- 105. Сиромля Т.И., Загурская Ю.В. Элементный химический состав Hypercom perforatum – ненормируемые элементы // Химия растительного сырья. 2019. № 2. С. 179.
- 106. Бакова Е.Ю., Плугатарь Ю.В., Бакова Н.Н., Коновалов Д.А. Минеральный и аминокислотный состав листьев Myrtus communis L. // Химия растительного сырья. 2019. № 3. С. 217.
- 107. Дыленова Е.П., Жигжитжапова С.В., Рандалова Т.Э., Раднаева Л.Д., Ширеторова В.Г., Павлов И.А. Микроэлементы-биофилы и тяжелые металлы в Artemisia Frigida Willd. и Artemisia Jacutica Drob. // Химия растительного сырья. 2019. № 4. С. 199.
- 108. World Health Organization Drug Information. Herbal Medicines. Geneva, 2002. V. 16. № 2. P. 115.
- 109. Антипова Е.А., Лейтес Е.А. Определение содержания ксантонов и элементного состава надземной части и экстракта Iris Lactea Pall // Химия растительного сырья. 2019. № 2. С. 189.
- 110. Jorhem L. Non-use and misinterpretation of CRMs. Can the situation be improved? // Fresenius J. Anal. Chem. 1998. V. 360. № 3–4. P. 370.

- World Health Organization. National policy on traditional medicine and regulation of herbal medicines: Report of a WHO global survey. Geneva, 2005. 168 p.
- Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. М., 2016. https://www.ros-minzdrav.ru/poleznye-resursy/gosudarstvennaya-far-makopeya-rossiyskoy-federatsii-xiii-izdaniya (18.11.2018).
- 113. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М., 2018. http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php (02.07.2020).
- 114. СанПин 2.3.2. 1078-01 от 14.1. 2009. "Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов" (с изменениями и дополнениями 1–14). Разделы "Общие положения", "1.10. Биологически активные добавки к пище", "1.10.7 БАД на растительной основе, в. ч. цветочная пыльца". https://doi.org/1.2001/22.03.02
- Ernst E., Thompson Coon J. Heavy metals in traditional Chinese medicines: A systematic review // Clin. Pharmacol. Ther. 2001. V. 70. № 6. P. 497.
- Ernst E. Heavy metals in traditional Indian remedies // Eur. J. Clin. Pharmacol. 2002. V. 57. № 12. P. 891.
- 117. United States Pharmacopeia. General Chapter <232> Elemental Impurities – Limits: First Supplement of USP 40-NF35, Official December 1, 2017. https://www.usp.org/sites/default/files/usp/document/our-work/chemical-medicines/key-issues/232-40-35-1s.pdf (02.07.2020)
- 118. United States Pharmacopeia. General Chapter ?233? Elemental Impurities – Procedures / Chemical Tests: Second Supplement to USP 38–NF 33. https://www.usp.org/sites/default/files/usp/document/our-work/chemical-medicines/key-issues/c233.pdf (02.07.2020).
- 119. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, 2010.1. IUCN Red List of Threatened Species: Summary Statistics. https://www.iucnredlist.org (02.07.2020).
- 120. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. IUCN 2020. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2020-1. https://www.iucnredlist.org (02.07.2020).
- Plant Analysis Procedures. 2nd Ed. / Eds. Temminghoff E.E.J.M., Houba V.J.G. Dordrecht: Kluwer Academic Publ., 2004. 179 p.
- 122. Карякин А.В., Грибовская И.Ф. Эмиссионный спектральный анализ объектов биосферы. М.: Химия, 1979. 208 с.
- 123. Korhammer S., Herzig R., Schramel P., Kumpulainen J., Markert B., Muntau H., Quevauviller P. The preparation of a cabbage reference material for environmental monitoring and food analysis // Accredit. Qual. Assur. 2000. V. 5. № 6. P. 238.
- 124. Hussain J., Bahader A., Ullah F., Rehman N.U., Khan A.L., Ullah W., Shinwari Z.K. Proximate and nutrient analysis of the locally manufactured herbal medicines and its raw material // J. Am. Sci. 2009. V. 6. № 5. P. 91.
- 125. Медведевских М.Ю., Сергеева А.С., Крашенинина М.П., Шохина О.С. Государственная первич-

ная референтная методика измерений массовой доли золы в пищевых продуктах и продовольственном сырье // Заводск. лаборатория. Диагностика материалов. 2019. Т. 85. № 6. С. 70.

- 126. Hoenig M. Preparation steps in environmental trace element analysis Facts and traps // Talanta. 2001. V. 54. P. 1021.
- 127. Momen A.A., Zachariadis G.A., Anthemidis A.N., Stratis J.A. Optimization and comparison of two digestion methods for multi-element analysis of certified reference plant materials by ICP-AES. Application of Plackett-Burman and central composite designs // Microchim, Acta. 2008. V. 160. № 4. P. 397
- Maichin B., Zischka M., Knapp G. Pressurized wet digestion in open vessels // Anal. Bioanal. Chem. 2003. V. 376. № 5. P. 715.
- 129. Nascentes C.C., Korn M., Arruda M.A. A fast ultrasound-assisted extraction of Ca, Mg, Mn and Zn from vegetables // Microchem. J. 2001. V. 69. № 1. P. 37.
- 130. Domínguez-González R., Moreda-Piñeiro A., Bermejo-Barrera A., Bermejo-Barrera P. Application of ultrasound-assisted acid leaching procedures for major and trace elements determination in edible seaweed by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry // Talanta. 2005. V. 66. № 4. P. 937.
- 131. Santos W.P.C., Castro J.T., Bezerra M.A., Fernandes A.P., Ferreira S.L.C., Korn M.G.A. Application of multivariate optimization in the development of an ultrasound-assisted extraction procedure for multielemental determination in bean seeds samples using ICP OES // Microchem. J. 2009. V. 91. № 2. P. 153.
- 132. De La Calle I., Costas M., Cabaleiro N., Lavilla I., Bendicho, C. Fast method for multielemental analysis of plants and discrimination according to the anatomical part by total reflection X-ray fluorescence spectrometry // Food Chem. 2013. V. 138. № 1. P. 234.
- 133. Орлов С.В., Орлова В.А., Сычев В.Г. Комбинированные методики анализа с автоклавной пробоподготовкой сельхозпродукции и их метрологическая оценка // Плодородие. 2002. № 5(8). С. 25.
- 134. Borkowska-Burnecka J. Microwave assisted extraction for trace element analysis of plant materials by ICP-AES // Fresenius J. Anal. Chem. 2000. V. 368. № 6. P. 633.
- 135. *Baffi C., Bettinelli M., Beone G.M., Spezia S.* Comparison of different analytical procedures in the determination of trace elements in lichens // Chemosphere. 2002. V. 48. № 3. P. 299.
- 136. *Krachler M., Mohl C., Emons H., Shotyk W.* Analytical procedures for the determination of selected trace elements in peat and plant samples by inductively coupled plasma mass spectrometry // Spectrochim. Acta B: At. Spectrosc. 2002. V. 57. № 8. P. 1277.
- 137. Silva M.M., Vale M.G.R., Damin I.C.F., Welz B., Mandaji M., Fett J.P. Method development for the determination of iron in milligram amounts of rice plants (*Oryza Sativa L.*) from cultivation experiments using graphite furnace atomic absorption spectrometry // Anal. Bioanal. Chem. 2003. V. 377. № 1. P. 165.
- 138. *Sucharová J., Suchara I.* Determination of 36 elements in plant reference materials with different Si contents by inductively coupled plasma mass spectrometry:

Comparison of microwave digestions assisted by three types of digestion mixtures // Anal. Chim. Acta. 2006. V. 576. № 2. P. 163.

- 139. Konieczynski P., Wesolowski M. Total phosphorus and its extractable form in plant drugs. Interrelation with selected micro- and macroelements // Food Chem. 2007. V. 103. № 1. P. 210.
- 140. Chen L., Song D., Tian Y., Ding L., Yu A., Zhang H. Application of on-line microwave sample-preparation techniques // Trends Anal. Chem. 2008. V. 27. № 2. P. 151.
- 141. Mesko M.F., Picoloto R.S., Ferreira L.R., Costa V.C., Pereira C.M.P.P., Colepicolo P., Muller E.I., Flores E.M.M.M. Ultraviolet radiation combined with microwave-assisted wet digestion of antarctic seaweeds for further determination of toxic elements by ICP-MS // J. Anal. At. Spectrom. 2015. V. 30. № 1. P. 260.
- 142. Engelsen C., Wibetoe G. Determination of Al, Cu, Li and Mn in spruce seeds and plant reference materials by slurry sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry // Fresenius' J. Anal. Chem. V. 366. № 5. P. 494.
- 143. Sánchez-Moreno R.A., Gismera M.J., Sevilla M.T., Procopio J.R. Direct and rapid determination of ultratrace heavy metals in solid plant materials by ET-AAS ultrasonic-assisted slurry sampling // Phytochem. Anal. 2010. V. 21 № 4. P. 340.
- 144. De Gregori I., Pinochet H., Fuentes E., Potin-Gautier M. Determination of antimony in soils and vegetables by hydride generation atomic fluorescence spectrometry and electrothermal atomic absorption spectrometry. Optimization and comparison of both analytical techniques // J. Anal. At. Spectrom. 2001. V. 16. № 2. P. 172.
- 145. Wang J., Hansen E.H. Coupling sequential injection on-line preconcentration using a PTFE beads packed column to direct injection nebulization inductively coupled plasma mass spectrometry // J. Anal. At. Spectrom. 2002. V. 17. № 10. P. 1278.
- 146. Wang J., Hansen E.H. FI/SI on-line solvent extraction/back extraction preconcentration coupled to direct injection nebulization inductively coupled plasma mass spectrometry for determination of copper and lead // J. Anal. At. Spectrom. 2002. V. 17. № 10. P. 1284.
- 147. Semenova N.V., Leal L.O., Forteza R., Cerdà V. Multisyringe flow injection system for total inorganic selenium determination by hydride generation-atomic fluorescence spectrometry // Anal. Chim. Acta. 2002. V. 486. P. 217.
- 148. *Matusiewicz H., Kopras M.* Simultaneous determination of hydride forming elements (As, Bi, Ge, Sb, Se) and Hg in biological and environmental reference materials by electrothermal vaporization-microwave induced plasma-optical emission spectrometry with their in situ trapping in a graphite furnace // J. Anal. At. Spectrom. 2003. V. 18. № 12. P. 1415.
- 149. Long X., Chomchoei R., Gała P., Hansen E.H. Evaluation of a novel PTFE material for use as a means for separation and preconcentration of trace levels of metal ions in sequential injection (SI) and sequential injection lab-on-valve (SI-LOV) systems: Determination of cadmium(II) with detection by electrothermal

atomic absorption spectrometry (ETAAS) // Anal. Chim. Acta. 2004. V. 523. № 2. P. 279.

- 150. Jaćimović R., Horvat M. Determination of total mercury in environmental and biological samples using k0-INAA, RNAA and CVAAS/AFS techniques: Advantages and disadvantages // J. Radioanal. Nucl. Chem. 2004. V. 259. № 3. P. 385.
- 151. Sun H.-W., Suo R. Enhancement reagents for simultaneous vapor generation of zinc and cadmium with intermittent flow system coupled to atomic fluorescence spectrometry // Anal. Chim. Acta. 2004. V. 509. № 1. P. 71.
- 152. Chen B., Krachler M., Gonzalez Z.I., Shotyk W. Improved determination of arsenic in environmental and geological specimens using HG-AFS // J. Anal. At. Spectrom. 2005. V. 20. № 2. P. 95.
- 153. Long X., Hansen E.H., Miró M. Determination of trace metal ions via on-line separation and preconcentration by means of chelating Sepharose beads in a sequential injection lab-on-valve (SI-LOV) system coupled to electrothermal atomic absorption spectrometric detection // Talanta. 2005. V. 66. № 5. P. 1326.
- 154. Yin J., Jiang Z., Chang G., Hu B. Simultaneous on-line preconcentration and determination of trace metals in environmental samples by flow injection combined with inductively coupled plasma mass spectrometry using a nanometer-sized alumina packed micro-column // Anal. Chim. Acta. 2005. V. 540. № 2. P. 333.
- 155. *Chojnacka K*. The application of multielemental analysis in the elaboration of technology of mineral feed additives based on *Lemna minor* biomass // Talanta 2006. V. 70. № 5. P. 966.
- 156. *Grobecker K. H., Detcheva A.* Validation of mercury determination by solid sampling Zeeman atomic absorption spectrometry and a specially designed furnace // Talanta. 2006. V. 70. № 5. P. 962.
- 157. *Leal L.O., Forteza R., Cerdà V.* Speciation analysis of inorganic arsenic by a multisyringe flow injection system with hydride generation-atomic fluorescence spectrometric detection // Talanta. 2006. V. 69. № 2 (spec. iss.). P. 500.
- 158. Wang Y., Chen M.-L., Wang J.-H. Sequential/bead injection lab-on-valve incorporating a renewable microcolumn for co-precipitate preconcentration of cadmium coupled to hydride generation atomic fluorescence spectrometry // J. Anal. At. Spectrom. 2006. V. 21. № 5. P. 535.
- 159. Frentiu T., Ponta M., Senila M., Mihaltan A. I., Darvasi E., Frentiu M., Cordos E. Evaluation of figures of merit for Zn determination in environmental and biological samples using EDL excited AFS in a new radiofrequency capacitively coupled plasma // J. Anal. At. Spectrom. 2010. V. 25. № 5. P. 739.
- 160. Guo W., Hu S., Wang Y., Zhang L., Hu Z., Zhang J. Trace determination of selenium in biological samples by CH₄-Ar mixed gas plasma DRC-ICP-MS // Microchem. J. 2013. V. 108. P. 106.
- 161. Цизин Г.И., Статкус М.А., Золотов Ю.А. Сорбционное и экстракционное концентрирование микрокомпонентов в проточных системах анализа // Журн. аналит. химии. 2015. Т. 70. № 11. С. 1123. (*Tsizin G.I., Statkus M.A., Zolotov Yu.A.* Adsorption

and extraction preconcentration of trace components in flow analytical systems // J. Analyt. Chem. 2015. V. 70. № 11. P. 1289.)

- 162. Zhang J., Li T., Yang Y.L., Liu H.G., Wang Y.Z. Arsenic concentrations and associated health risks in *Laccaria mushrooms* from Yunnan (SW China) // Biol. Trace Elem. Res. 2015. V. 164. № 2. P. 261.
- 163. Lu X.P., Yang X.A., Liu L., Hu H.H., Zhang W.B. Selective and sensitive determination of As(III) and tAs in Chinese herbal medicine samples using L-cysteine modified carbon paste electrode-based electrolytic hydride generation and AFS analysis // Talanta. 2017. V. 165. P. 258.
- 164. Liu X., Zhu Z., Bao Z., Zheng H., Hu S. Determination of trace cadmium in rice by liquid spray dielectric barrier discharge induced plasma – chemical vapor generation coupled with atomic fluorescence spectrometry // Spectrochim. Acta B: At. Spectrosc. 2018. V. 141. P. 15.
- 165. Smichowski P, Londonio A. The role of analytical techniques in the determination of metals and metalloids in dietary supplements: A review // Microchem. J. 2018. V. 136. P. 113.
- 166. Барановская Н.В., Черненькая Е.В. Особенности накопления химических элементов в чернике обыкновенной (Vccinium mirtillus) на территории Западной Сибири // Фундаментальные исследования. 2015. № 2-2. С. 299.
- 167. Черевко А.С., Сысо А.И. Использование многоэлементного атомно-эмиссионного спектрографического анализа природных объектов в экологоагрохимических исследованиях // Агрохимия. 2010. № 11. С. 70.
- 168. Yangmei Z. Intercomparison and certification of some Chinese and international food and biological matrix CRMs for several uncertified ultratrace elements by NAA // J. Radioanal. Nucl. Chem. 2001. V. 249. № 1. P. 25.
- 169. Рихванов Л.П., Арбузов С.И., Барановская Н.В., Волостнов А.В., Архангельская Т.А., Межибор А.М., Берчук В.В., Жорняк Л.В., Замятина Ю.Л., Иванов А.Ю., Таловская А.В., Шатилова С.С., Язи-ков Е.Г. Радиоактивные элементы в окружающей среде // Известия Томского политехнического университета. 2007. T. 311. № 1. C. 128. (Rikhvanov L.P., Arbuzov S.I., Baranovskaya N.V., Volostnov A.V., Arkhangelskaya T.A., Mezhibor Berchuk V.V., Zhornvak L.V.. A.I., Zamyatina Yu.L., Ivanov A.Yu., Talovskaya A.V., Shatilova S.S., Yazikov E.G. Radioactive elements in the environment // Bulletin of the Tomsk Polytechnic University. 2007. V. 311. № 1. P. 126.)
- 170. *Kučera J., Byrne A.R., Mizera J., Řanda, Z.* Development of a radiochemical neutron activation analysis procedure for determination of rhenium in biological and environmental samples at ultratrace level // J. Radioanal. Nucl. Chem. 2006. V. 269. № 2. P. 251.
- 171. Maihara V.A., Moura P.L., Catharino M.G., Castro L.P., Figueira R.C.L. Arsenic and cadmium content in edible mushrooms from São Paulo, Brazil determined by INAA and GF AAS // J. Radioanal. Nucl. Chem. 2008. V. 278. № 2. P. 395.
- 172. *Mizera J., Řanda Z., Kučera J.* Determination of silver in biological reference materials by neutron activation

analysis // J. Radioanal. Nucl. Chem. 2008. V. 278. № 3. P. 599.

- 173. Greenberg R.R., Bode P., Fernandes E.A.N. Neutron activation analysis: a primary method of measurement / Spectrochim. Acta B: At. Spectrosc. 2011. V. 66. № 3–4. P. 193.
- 174. Робертус Ю.В., Рихванов Л.П., Ситникова В.А., Савенко К.С., Большунова Т.С. Элементный состав лишайника на шифере как биоиндикатор загрязнения атмосферы агломерации г. Горно-Алтайска // Известия Томского политехнического университета. Инжиниринг георесурсов. 2018. Т. 329. № 4. С. 70.
- 175. Scheloske S., Schneider T. BIOPIXE: A new PIXE-data software package to analyse quantitative elemental distributions of inhomogeneous samples // Nucl. Instr. Methods Part B. 2002. V. 189. № 1–4. P. 148.
- 176. *Marguí E., Queralt I., Hidalgo M.* Application of X-ray fluorescence spectrometry to determination and quantitation of metals in vegetal material // Trends Anal. Chem. 2009. V. 28. № 3. P. 362.
- 177. Nikolova E.L., Valcheva R.D., Angelov Ch.V. Essential and toxic element concentrations in medical herbs from Rila and Pirin (Bulgaria) measured using Energy Dispersive X-ray Fluorescence (EDXRF) Analysis // Acta Zool. Bulg. 2018. V. 11. P. 163.
- 178. Vanhoof C., Bacon J.R., Ellis A.T., Fittschen U.E.A., Vincze L. 2019 atomic spectrometry update – a review of advances in X-ray fluorescence spectrometry and its special applications // J. Anal. At. Spectrom. 2019. V. 34. № 9. P. 1750.
- 179. Moor K.L., Chen Y., van de Meene A.M.L., Hughes L., Liu W., Geraki T., Mosselmans F., McGrath S.P., Grovenor C., Zhao F.-J. Combined NanoSIMS and synchrotron X-ray fluorescence reveal distinct cellular and subcellular distribution patterns of trace elements in rice tissues // New Psychologist. 2014. V. 201. № 1. P. 104.
- 180. Reimann C., Fabian K., Flem B., Andersson M., Filzmoser P., Englmaier P. Geosphere-biosphere circulation of chemical elements in soil and plant systems from a 100 km transect from southern central Norway // Sci. Total Environ. 2018. V. 639. P. 129.
- 181. Sapkota A., Krachler M., Scholz C., Cheburkin A.K., Shotyk W. Analytical procedures for the determination of selected major (Al, Ca, Fe, K, Mg, Na, and Ti) and trace (Li, Mn, Sr, and Zn) elements in peat and plant samples using inductively coupled plasma-optical emission spectrometry // Anal. Chim. Acta. 2005. V. 540. № 2. P. 247.
- 182. Michalska-Kacymirow M., Kurek E., Smolis A., Wierzbicka M., Bulska E. Biological and chemical investigation of Allium cepa L. response to selenium inorganic compounds // Anal. Bioanal. Chem. 2014. V. 406. № 15. P. 3717.
- 183. Šerá L., Loula M., Matějková S., Mestek O. Determination of key elements in plant samples by inductively coupled plasma optical emission spectrometry with electrothermal vaporization // Chem. Pap. 2019. V. 73. № 12. P. 3005.
- 184. Мурашкина И.А., Мирович В.М., Гордеева В.В., Чебыкин Е.П. Элементный состав надземных орга-

нов рододендрона золотистого (*Rhododendron Aureum Georgi.*) флоры восточного Саяна // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2019. № 4. С. 53.

- Shotyk W. Trace elements in wild berries from reclaimed lands: Biomonitors of contamination by atmospheric dust // Ecol. Indic. 2020. V. 110. P. 105960.
- 186. Dombovári J., Becker J.S., Dietze H.-J. Multielemental analysis in small amounts of environmental reference materials with inductively coupled plasma mass spectrometry // Fresenius J. Anal. Chem. 2000. V. 367. № 5. P. 407.
- 187. Mattusch J., Wennrich R., Schmidt A.C., Reisser W. Determination of arsenic species in water, soils and plants // Fresenius J. Anal. Chem. 2000. V. 366. № 2. P. 200.
- 188. Ivanova J., Korhammer S., Djingova R., Heidenreich H., Markert B. Determination of lanthanoids and some heavy and toxic elements in plant certified reference materials by inductively coupled plasma mass spectrometry // Spectrochim. Acta B: At. Spectrosc. 2001. V. 56. № 1. P. 3.
- 189. Larivière D., Epov V.N., Evans R.D., Cornett R.J. Determination of radium-226 in environmental samples by inductively coupled plasma mass spectrometry after sequential selective extraction // J. Anal. At. Spectrom. 2003. V. 18. P. 338
- 190. Bulska E., Danko B., Dybczyński R.S., Krata A., Kulisa K., Samczyński Z., Wojciechowski M. Inductively coupled plasma mass spectrometry in comparison with neutron activation and ion chromatography with UV/VIS detection for the determination of lanthanides in plant materials // Talanta. 2012. V. 97. P. 303.
- 191. *Ramos J.C., Borges D.L.G.* Evaluation of electrothermal vaporization as a sample introduction technique for the determination of trace elements in biological samples by inductively coupled plasma mass spectrometry, following dispersive liquid–liquid microextraction // J. Anal. At. Spectrom. 2014. V. 29. № 2. P. 304.
- 192. *Roux P., Lemarchand D., Hughes H.J., Turpault M.P.* A rapid method for determining boron concentration (ID-ICP-MS) and δ11B (MC-ICP-MS) in vegetation samples after microwave digestion and cation exchange chemical purification // Geostand. Geoanal. Res. 2015. V. 39. № 4. P. 453.
- 193. Ni Z., Ren C., Cheng J., Tang F. Determination of rare elements in some flower herb teas and their infusions // J. Braz. Chem. Soc. 2017. V. 28. P. 1960.
- 194. *Begu E., Snell B., Arslan Z.* Simultaneous separation of arsenic and cadmium from interfering salt matrix of multivitamin/mineral supplements by sequential coprecipitation and determination by inductively coupled plasma mass spectrometry // Microchem. J. 2019. V. 145. P. 412.
- 195. Balcaen L., Bolea-Fernandez E., Resano M., Vanhaecke F. Inductively coupled plasma – Tandem mass spectrometry (ICP-MS/MS): A powerful and universal tool for the interference-free determination of (ultra)trace elements – A tutorial review // Anal. Chim. Acta. 2015. V. 894. № 24. P. 7.
- 196. Persson D.P., Chen A., Aarts M.G.M., Salt D.E., Schjoerring J.K., Husted S. Multi-element bioimaging of

Arabidopsis thaliana roots // Plant Physiol. 2016. V. 172. \mathbb{N} 2. P. 835.

- 197. Pohl P., Bielawska-Pohl A., Dzimitrowicz A., Greda K., Jamroz P., Lesniewicz A., Szymczycha-Madeja A., Welna M. Understanding element composition of medicinal plants used in herbalism – A case study by analytical atomic spectrometry // J. Pharm. Biomed. Anal. 2018. V. 159. September 10. P. 262.
- 198. Martin M.Z., Labbé N., André N., Harris R., Ebinger M., Wullschleger S.D., Vass A.A. High resolution applications of laser-induced breakdown spectroscopy for environmental and forensic applications // Spectrochim. Acta B: At. Spectrosc. 2007. V. 62. № 12. P. 1426.
- 199. Braga J.W.B., Trevizan L.C., Nunes L.C., Rufini I.A., Santos D., Krug F.J. Comparison of univariate and multivariate calibration for the determination of micronutrients in pellets of plant materials by laser induced breakdown spectrometry // Spectrochim. Acta B: At. Spectrosc. 2010. V. 65. № 1. P. 66.
- 200. Kaiser J., Novotný K., Martin M.Z., Hrdlička A., Malina R., Hartl M., Adam V., Kizek R. Trace elemental analysis by laser-induced breakdown spectroscopy – Biological applications // Surf. Sci. Rep. 2012. V. 67. № 11–12. P. 233.
- 201. Santos D., Nunes L. C., de Carvalho G.G.A., Gomes M. da S., de Souza P.F., Leme F. de O., dos Santos L.G., Krug F.J. Laser-induced breakdown spectroscopy for analysis of plant materials: A review // Spectrochim. Acta B: At. Spectrosc. 2012. V. 71–72. P. 3.
- 202. Markiewicz-Keszycka M., Cama-Moncunill X., Casado-Gavalda M.P., Dixit Y., Cama-Moncunill R., Cullen P.J., Sullivan C. Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) for food analysis: A review // Trends Food Sci. Technol. 2017. V. 65. P. 80.
- 203. Senesi G.S., Cabral J., Menegatti C.R., Marangoni B., Nicolodelli G. Recent advances and future trends in LIBS applications to agricultural materials and their food derivatives: An overview of developments in the last decade (2010–2019). Part II. Crop plants and their food derivatives // Trends Anal. Chem. 2019. V. 118. P. 453.
- 204. Черевко А.С., Сысо А.И. Атомно-эмиссионное спектрографическое определение микроэлементов в объектах окружающей среды с дуговым аргоновым двухструйным плазмотроном // Журн. аналит. химии. 2009. Т. 64. № 8. С. 828. (Cherevko A.S., Syso A.I. Atomic emission spectrographic determination of trace elements in environmental objects using a two-jet argon arc plasmatron // J. Analyt. Chem. 2009. V. 64. № 8. P. 806.)
- 205. Отмахов В.И., Рабцевич Е.С., Петрова Е.В., Шилова И.В., Шелег Е.С., Бабенков Д.Е. Элементный анализ лекарственных растений Сибири методом дуговой атомно-эмиссионной спектрометрии с многоканальным анализатором эмиссионных спектров // Заводск. лаборатория. Диагностика материалов. 2019. Т. 85. № 1. Ч. II. С. 60.
- 206. Заксас Н.П., Султангазиева Т.Т., Корда Т.М. Использование двухструйного дугового плазматрона для определения микроэлементного состава порошковых биологических проб // Журн. аналит. химии. 2006. Т. 61. № 6. С. 632. (Zaksas N.P., Sultangazieva T.T., Korda T.M. Using a two-jet arc plasmatron for determining the trace element composition of

powdered biological samples // J. Analyt. Chem. 2006. V. 61. № 6. P. 582.)

- 207. Перекотий В.В., Каунова А.А., Петров В.И., Цюпко Т.Г., Темердашев З.А. Особенности подготовки вин для целей мультиэлементного анализа методом ИСП-АЭС // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. 2012. № 5-6(329-330). С. 101.
- 208. *Masson P., Prunet T., Orignac D.* Arsenic determination in plant samples by hydride generation and axial view inductively coupled plasma atomic emission spectrometry // Microchim. Acta. 2006. V. 154. № 3. P. 229.
- 209. *Lee Y.N., Choi H.-S.* Determination of copper(II) in various samples by flame atomic absorption spectro-photometry after column preconcentration onto pulverized Amberlite XAD-4 loaded with N-benzoyl-phenylhydroxylamine // J. Analyt.Chem. 2007. V. 62. N
 ^Q 9. P. 845.
- 210. Chajduk E., Dybczyński R.S. Highly accurate radiochemical neutron activation analysis of arsenic in biological materials involving selective isolation of arsenic by hybrid and conventional ion exchange // Microchim. Acta. 2010. V. 168. № 1–2. P. 37.
- 211. Arnold T., Schönbächler M., Rehkämper M., Dong S., Zhao F.-J., Kirk G.J.D., Coles B.J., Weiss D.J. Measurement of zinc stable isotope ratios in biogeochemical matrices by double-spike MC-ICPMS and determination of the isotope ratio pool available for plants from soil // Anal. Bioanal. Chem. 2010. V. 398. № 7. P. 3115.
- 212. Singh S., Oswal M., Behera B.R., Kumar A., Santra S., Acharya R., Singh K.P. Investigation on major, minor and trace elements in some medicinal plants using Particle Induced X-ray Emission // J. Radioanal. Nucl. Chem. 2020. V. 323. № 3. P. 1443.
- 213. *Maher W.A., Eggins S., Krikowa F., Jagtap R., Foster S.* Measurement of As species in rice by HPLC-ICPMS after extraction with sub-critical water and hydrogen peroxide // J. Anal. At. Spectrom. 2017. V. 32. № 6. P. 1129.
- 214. Trevizan L.C., Santos D., Samad R.E., Vieira N.D., Nunes L.C., Rufini I.A., Krug F.J. Evaluation of laser induced breakdown spectroscopy for the determination of micronutrients in plant materials // Spectrochim. Acta B: At. Spectrosc. 2009. V. 64. № 5. P. 369.
- 215. Weiss D.J., Rausch N., Mason T.F.D., Coles B.J., Wilkinson J.J., Ukonmaanaho L., Arnold T., Nieminen T.M. Atmospheric deposition and isotope biogeochemistry of zinc in ombrotrophic peat // Geochim. Cosmochim. Acta. 2007. V. 71. № 14. P. 3498.
- 216. Navarrete J.M., Longoria L.C., Martínez M.T., Cabrera L. Determination of cobalt, selenium and iodine by NAA in foodstuff by preconcentration of traces // J. Radioanal. Nucl. Chem. 2007. V. 271. № 3. P. 599.
- Owolabi I. A., Mandiwana K.L., Panichev N. Speciation of chromium and vanadium in medicinal plants // South African J. Chem. 2016. V. 69. P. 67.
- 218. Shi C., Gu T., Bu W., Yan W., Liu M., Yan M. Preparation and certification of biogeochemical reference ma-

terials // Geostand. Geoanal. Res. 2008. V. 32. № 3. P. 337.

- 219. *Katz S.A.* Bowen's Kale: A brief review dedicated to the late Professor Humphry John Moule Bowen, 1929–2001 // J. Radioanal. Nucl. Chem. 2002. V. 251. N
 1. P. 3.
- 220. Lindstrom R.M., Byrne A.R., Becker D.A., Smodiš B., Garrity K.M. Characterization of the mineral fraction in botanical reference materials and its influence on homogeneity and analytical results // Fresenius J. Anal. Chem. 1990. V. 338. № 4. P. 569.
- 221. Rimmer C.A., Howerton S.B., Sharpless K.E., Sander L.C., Long S.E., Murphy K.E., Porter B.J., Putzbach K., Rearick M.S., Wise S.A., Wood L.J., Zeisler R., Hancock D.K., Yen J.H., Betz J.M., Nguyenpho A., Yang L., Scriver C., Willie S., Sturgeon R., Schaneberg B., Nelson C., Skamarack J., Pan M., Levanseler K., Gray D., Waysek E.H., Blatter A., Reich E. Characterization of a suite of ginkgo-containing standard reference materials // Anal. Bioanal. Chem. 2007. V. 389. № 1. P. 179.
- 222. Steger H.F. The new certification procedure of the Canadian certified reference materials project // Geostandard Newslett. 1981. V. 5. № 2. P. 189.
- 223. *Ihnat M.* Twenty five years of reference material activity at agriculture and agri-food Canada // Anal. Bioanal. Chem. 2001. V. 370. № 2–3. P. 279.
- 224. *Kramer G.N., Muntau H., Maier E., Pauwels J.* The production of powdered candidate biological and environmental reference materials in the laboratories of the Joint Research Centre // Fresenius J. Anal. Chem. 1998. V. 360. № 3–4. P. 299.
- 225. *Quevauviller P.* The BCR framework: 25 Years of quality measurements within the European Union // Trends Anal. Chem. 1999. V. 18. № 5. P. 302.
- 226. *Griepink B., Muntau H., Colinet E.* Certification of the contents of cadmium, copper, manganese, mercury, lead and zinc in two plant materials of aquatic origin and in olive leaves // Fresenius J. Anal. Chem. 1983. V. 315. № 3. P. 193.
- 227. Maier E.A., Muntau H., Griepink B. Certified reference materials beech leaves and spruce needles for the quality control in monitoring damage in forests by acid deposition // Fresenius J. Anal. Chem. 1989. V. 335. № 7. P. 833.
- 228. Maier E.A., Griepink B., Quevauviller P., De Angelis L., Muntau H. Certified reference materials – hay powder (CRM 129) and rye grass (CRM 281) – for the quality control of analysis of animal feed // Mikrochim. Acta. 1990. V. 102. № 1–3. P. 87.
- 229. *Quevauviller P., Vercoutere K., Griepink B.* Certified reference materials for the quality control of trace elements in plants: white clover (CRM 402) // Anal. Chim. Acta. 1992. V. 259. № 2. P. 281.
- 230. Quevauviller P., Herzig R., Muntau H. Certified reference material of lichen (CRM 482) for the quality control of trace element biomonitoring // Sci. Total Environ. 1996. V. 187. № 2. P. 143.
- 231. Herzig R., Rehnert A., Korhammer S., Kumpulainen J., Schramel P., Muntau H., Linsinger T., Quevauviller P. Certification of a new cabbage reference material for the quality control of trace-element determinations

with some considerations on moisture // Trends Anal. Chem. 2002. V. 21. № 11. P. 746.

- 232. Linsinger T.P.J., Roebben G., Solans C., Ramsch R. Reference materials for measuring the size of nanoparticles // Trends Anal. Chem. 2011. V. 30. № 1. P. 18.
- 233. *Ghidan O.Y., Loss R.D.* Accurate and precise elemental abundance of zinc in reference materials by an isotope dilution mass spectrometry TIMS technique // Geostand. Geoanal. Res. 2010. V. 34. № 2. P. 185.
- 234. *Parr R.M., Schelenz R., Ballestra S.* IAEA biological reference materials // Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie. 1988. V. 332. № 6. P. 518.
- 235. Parr R.M., Fajgelj A., Dekner R., Vera Ruiz H., Carvalho F.P., Povinec P.P. IAEA analytical quality assurance programmes to meet the present and future needs of developing countries // Fresenius J. Anal. Chem. 1998. V. 360. № 3–4. P. 287.
- 236. Arunachalam J., Bleise A., Mahwar R.S., Ramadevi P., Iyengar G.V. The natural matrix reference material database of the International Atomic Energy Agency: Reference materials in support of dietary investigations // J. Food Compos. Anal. 2006. V. 19. № 2–3. P. 241.
- Ihnat M. Criteria for the development of biological reference materials // Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie. 1988. V. 332. № 6. P. 568.
- 238. Kramer G.N., Pauwels J., Belliardo J.J. Preparation of biological and environmental reference materials at CBNM // Fresenius J. Anal. Chem. 1993. V. 345. N

 2-4. P. 133.
- 239. *Ihnat M., Dabeka R.W., Wolynetz M.S.* Summary of preparation and homogeneity characterization of ten agricultural food reference materials for elemental composition // Fresenius J. Anal. Chem. 1993. V. 345. Nº 2–4. P. 221.
- 240. Lamberty A., Schimmel H., Pauwels J. The study of the stability of reference materials by isochronous measurements // Fresenius J. Anal. Chem. 1998. V. 360. N
 ^Q 3–4. P. 359.
- 241. Linsinger T.P.J., Bernreuther A., Corbisier P., Dabrio M., Emteborg H., Held A., Lamberty A., Lapitajs G., Ricci M., Roebben G., Trapmann S., Ulberth F., Emons H. Accreditation of reference material producers: the example of IRMM's reference materials unit // Accredit. Qual. Assur. 2007. V. 12. № 3–4. P. 167.
- 242. *Ulberth F.* Certified reference materials for inorganic and organic contaminants in environmental matrices // Anal. Bioanal. Chem. 2006. V. 386. № 4. P. 1121.
- 243. Van Dijk D. Wageningen Evaluating programs for Analytical Laboratories (WEPAL): A world of experiences // Commun. Soil Sci. Plant Anal. 2002. V. 33. N
 № 15–18. P. 2457.
- 244. *Houba V.J.G., Novozamsky I., van der Lee J.J.* Influence of storage of plant samples on their chemical composition // Sci. Total Environ. 1995. V. 176. № 1–3. P. 73.
- 245. *Van Dijk D., Houba, V.J.G.* Homogeneity and stability of materials distributed within the Wageningen evaluating programmes for analytical laboratories // Commun. Soil Sci. Plant Anal. 2000. V. 31. № 11–14. P. 1745.

- 246. Novozamsky I., Houba V.J.G., Daniel R.C. Certification of cabbage and carnation samples and their use in an international proficiency study // Fresenius J. Anal. Chem. 1993. V. 345. № 2–4. P. 198.
- 247. *Houba V.J.G., Uittenbogaard J., Pellen P.* Wageningen Evaluating programs for Analytical Laboratories (WE-PAL), organization and purpose // Commun. Soil Sci. Plant Anal. 1996. V. 27. № 3–4. P. 421.
- 248. Armishaw P., Millar R. A natural matrix (pureed tomato) candidate reference material containing residue concentrations of pesticide chemicals // Anal. Bioanal. Chem. 2001. V. 370. № 2–3. P. 291.
- 249. Polkowska-Motrenko H., Dybczyński R. Activities of the INCT, Warsaw, in the domain of quality assurance for inorganic analysis // J. Radioanal. Nucl. Chem. 2006. V. 269. № 2. P. 339.
- 250. *Hołyńska B., Jasion J., Lankosz M., Ostrowski A.* Cabbage leaves CL-1 certified reference material for the trace analysis of plant materials // Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie. 1987. V. 328. № 7. P. 588.
- 251. *Dybczyński R., Danko B., Polkowska-Motrenko H.* Some difficult problems still existing in the preparation and certification of CRMs // Anal. Bioanal. Chem. 2001. V. 370. № 2–3. P. 126.
- 252. Samczyński Z., Dybczyński R.S., Połkowska-Motrenko H., Chajduk E., Pyszynska M., Danko B., Czerska E., Kulisa K., Doner K., Kalbarczyk P. Two new reference materials based on tobacco leaves: certification for over a dozen of toxic and essential elements // Sci. World J. 2012. V. 2012. Article ID 216380. P. 1.
- 253. Dybczyński R., Danko B., Kulisa K., Chajduk-Maleszewska E., Polkowska-Motrenko H., Samczyński Z., Szopa Z. Preparation and preliminary certification of two new Polish CRMs for inorganic trace analysis // J. Radioanal. Nucl. Chem. 2004. V. 259. № 3. P. 409.
- 254. *Макаревич В.И., Плеснецова О.А.* Разработка двух типов стандартных образцов удельной активности радионуклидов цезия-137, калия-40 и стронция-90 в пшенице // Стандартные образцы. 2008. № 1. С. 45.
- 255. Шафринский Ю.С. К созданию стандартных образцов растительных материалов // Журн. аналит. химии. 1977. Т. 32. № 7. С. 1429.
- 256. Лонцих С.В., Петров Л.Л. Стандартные образцы состава природных сред. Новосибирск: Наука. Сиб. Отделение, 1988. 277 с.
- 257. Kamanoe CO μΓX CO PAH. http://www.igc.irk.ru/ru/component/flexicontent/ item/3412-standartnye-obraztsy-sostava?Itemid=746 (02.06.2020).
- 258. Васильева И.Е., Шабанова Е.В., Суслопарова В.Е., Манохина С.Н. Оценивание согласованности китайских и российских стандартных образцов растений по данным масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой // Стандартные образцы. 2014. № 3. С. 24.
- 259. Mahwar R.S., Verma N.K., Chakrabarti S.P., Biswas D.K. Development and use of reference materials in India – Status and plans // Fresenius J. Anal. Chem. 1998. V. 360. № 3–4. P. 291.

- 260. *Alam Z., Kaur S. Porwal P.K.* Understanding the problems in pharmaceutical procurement with special reference to active pharmaceutical ingredients and excipients // Accred. Qual. Assur. 2018. V. 23. № 6. P. 319.
- 261. Bahl J.R., Bansal R.P., Goel R., Kumar S. Properties of the seed oil of a dwarf cultivar of the pharmaceutical silymarin producing plant Silybum marianum (L.) Gaertn. developed in India // Indian J. Nat. Prod. Resour. 2015. V. 6. № 2. P. 127.
- 262. *Yan M., Cheng Z.* Study and application of geochemical reference materials in the Institute of geophysical and geochemical exploration (IGGE), China // Geostand. Geoanal. Res. 2007. V. 31. № 4. P. 301.
- 263. Okamoto K. Biological reference materials from the National Institute for Environmental Studies (Japan) // Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie. 1988. V. 332. № 6. P. 524.
- 264. *Okamoto K*. Preparation and certification of sargasso seaweed reference material // Mar. Environ. Res. 1988. V. 26. № 3. P. 199.
- 265. Okamoto K., Yoshinaga J., Morita M. Biological and environmental reference materials from the National

Institute for Environmental Studies (Japan) // Mikrochim. Acta. 1996. V. 123. № 1–4. P. 15.

- 266. Certified Reference Materials Catalogue of Korea. Research Institute of Standards and Science. https://www.kriss.re.kr/eng/file/20141215crm.pdf (02.07.2020).
- 267. *Tagliaferro F.S., De Nadai Fernandes E.A., Bacchi M.A.* Quality assessment of organic coffee beans for the preparation of a candidate reference material // J. Radioanal. Nucl. Chem. 2006. V. 269. № 2. P. 371.
- 268. Martínez M.I.V., Zeisler R., De Nadai Fernandes E.A., Bacchi M.A. Innovative reference material for improving the quality control in the sucroenergetic sector// Accred. Qual. Assur. 2018. V. 23. № 6. P. 329.
- 269. *Steiger Th., Pradel R.* Update on COMAR: The internet database for certified reference materials // Accred. Qual. Assur. 2007. V. 12. № 5. P. 265.
- 270. *Eggen O.A., Reimann C., Flem B.* Reliability of geochemical analyses: Deja vu all over again // Sci. Total Environ. 2019. V. 670. P. 138.

УДК 543.423

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ХИМИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ДОБАВОК ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БОРА В ГРАФИТЕ ДУГОВЫМ АТОМНО-ЭМИССИОННЫМ МЕТОДОМ

© 2021 г. Н. И. Золотарева^{*a*, *}, С. С. Гражулене^{*a*}

^а Институт проблем технологии микроэлектроники и особочистых материалов Российской академии наук ул. Академика Осипьяна, 6, Черноголовка, Московская обл., 142432 Россия

> **e-mail: zol@dio.ru* Поступила в редакцию 12.02.2020 г. После доработки 10.04.2020 г. Принята к публикации 19.05.2020 г.

Изучено влияние химически активных добавок AlF₃, ZnF₂ и SrF₂ на характер испарения бора из кратера электрода дуги постоянного тока при анализе графита. Найдено, что введение фторирующих добавок приводит к быстрому, полному и стабильному испарению бора. Показано, что наиболее эффективным из исследуемых соединений является фторид цинка. Использование этой добавки позволило снизить пределы определения бора в графите до 5×10^{-6} мас. % и повысить воспроизводимость результатов в два раза. Использование ZnF₂ позволило также устранить систематическую погрешность, обусловленную различием в характере испарения оксида и карбида бора, что улучшило надежность результатов определения.

Ключевые слова: дуговой атомно-эмиссионный анализ, бор, графит, химически активные добавки, пределы определения, воспроизводимость и правильность результатов.

DOI: 10.31857/S0044450220120166

Графитовый порошок является наиболее подходящим и широко используемым коллектором для предварительного концентрирования микропримесей в дуговом атомно-эмиссионном методе анализа (АЭА) веществ высокой степени чистоты или объектов со сложным эмиссионным спектром, поэтому содержание в нем различных микропримесей должно быть минимальным. Высокую степень чистоты, в том числе относительно микропримесей бора, должны иметь также графитовые стержни, из которых изготавливаются электроды для выполнения анализа. Особенно высокие требования предъявляют к содержанию бора в ядерном графите, поскольку бор является самым мощным поглотителем нейтронов. Графит для атомной промышленности может содержать не более 1×10^{-5} мас. % бора. В связи с этим возможность определения бора в графитовом порошке и графите с низкими пределами определения является актуальной, но достаточно сложной аналитической задачей. Использование для этого таких высокочувствительных методов анализа, как атомно-эмиссионная и масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой проблематично, так как требует разработки специальных методик извлечения бора в раствор. Этот процесс является весьма трудоемким и может сопровождаться частичной потерей бора или внесением дополнительного загрязнения из реактивов. Наиболее подходящим для определения бора в графите представляется метод АЭА в дуге постоянного тока, который характеризуется высокой чувствительностью и незаменим при анализе труднорастворимых объектов. Описание методик определения бора в графите прямым дуговым АЭА с пределами определения ниже 1 × 10⁻⁵ мас. % в литературе отсутствует. Это связано, по-видимому, с образованием в кратере электрода при высокой температуре труднолетучего карбида бора, который испаряется медленно и неравномерно. В результате интенсивность эмиссионных спектральных линий бора, определяющих чувствительность анализа, невысока, а неравномерность испарения приводит к низкой воспроизводимости результатов. Вопросу снижения пределов определения труднолетучих элементов в различных матрицах, в том числе в углероде, методом прямого дугового АЭА посвящено большое число исследований. Известно, что наиболее эффективным способом снижения нижней границы определяемых содержаний труднолетучих элементов является использование химически активной добавки [1-5]. Ее введение в анализируемый объект способствует образованию в кратере электрода дуги легколетучих соединений определяемых элементов и, следовательно, росту интенсивности их спектральных линий и снижению пределов определения. Ранее нами показано, что наиболее эффективными добавками при определении труднолетучих элементов в различных матрицах являются фторирующие соединения [6, 7].

Кроме пределов определения и воспроизводимости результатов анализа, важной метрологической характеристикой является правильность (надежность) определений. Эта величина в дуговом АЭА в значительной степени определяется совпадением форм соединений определяемых элементов в анализируемом объекте и образцах сравнения. К сожалению, не всегда точно известно, в виде какого соединения определяемый элемент находится в анализируемом образце. Кроме того, систематическую погрешность в анализ может вносить образование в кратере электрода за время экспозиции других соединений определяемых элементов, например, как в данном случае, труднолетучих карбидов.

Цель настоящей работы — изучение процесса испарения бора из кратера графитового электрода в присутствии химически активных добавок с целью улучшения метрологических характеристик его определения в графите методом дугового АЭА.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использовали спектрограф PGS-2 с решеткой 651 штр/мм, обеспечивающий обратную линейную дисперсию 0.74 нм/мм. В качестве источника возбуждения спектров служила дуга постоянного тока 10 А. Для регистрации эмиссионных спектров применяли разработанную в нашей лаборатории фотоэлектрическую систему регистрации с использованием линеек приборов с зарядовой связью [8]. Кривые испарения элементов строили по результатам регистрации спектров с экспозициями по 5 с до полного испарения пробы из канала электрода. Пробу набивали в кратер нижнего электрода (анода) типа "рюмка". Кратер "рюмки" имел глубину и диаметр 4 мм, толщину стенок 1 мм, шейку диаметром 1.5 и высоту 4 мм. Конец верхнего электрода был заточен на конус. Расстояние между электродами составляло 4 мм. Использовали трехлинзовую систему освещения щели.

В качестве образцов сравнения использовали стандартные образцы состава графита (комплект COГ-21). В качестве добавок исследовали AlF₃, ZnF₂, SrF₂ и NaCl марки ос. ч. в оптимальных концентрациях 5.0, 2.0, 5.0 и 4 мас. % соответственно. Для нахождения оптимального количества добавки изучали зависимость интенсивности спектральных линий бора от содержания добавки в графитовом порошке. Для определения бора использовали его атомную линию 249.772 нм. Добавку

вводили, тщательно перемешивая ее с графитовым порошком.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Температуры кипения соединений бора, в виде которых он может находиться в анализируемом графите, достаточно высоки и находятся на vpoвне 2000°С для бора и его оксида и 3500°С для карбида. По этой причине полное испарение бора из кратера электрода в дугу постоянного тока происходит медленно и неравномерно и лишь из тех мест электрода, на которые опирается дуга в процессе горения. Все это является причиной недостаточно низких пределов определения бора в графите, а также невысокой воспроизводимости результатов. Анализ термодинамических данных для соединений бора показал [9], что наиболее устойчивыми и в то же время достаточно летучими являются его фториды. В связи с этим в качестве химически активных добавок [6, 7] исследовали фторсодержащие добавки AlF₃, ZnF₂ и SrF₂, имеющие простой спектр, не усложняющий проведение анализа. На рис. 1 приведены кривые испарения бора из графитового порошка без добавок, а также в присутствии оптимального количества этих добавок. Для AlF₃ и SrF₂ оптимальная концентрация составила 5 мас. %, а для ZnF₂ – 2 мас. %. Из рис. 1 видно, что в отсутствие добавки интенсивное поступление бора в плазму дуги происходит в первые несколько секунд ее горения; затем скорость его испарения замедляется, причем интенсивность спектральных линий остается невысокой. На 40-ой секунде, когда стенки электрода достаточно сильно обгорают и создаются условия для испарения труднолетучих соединений бора из нижней части электрода, вновь наблюдается рост интенсивности. Введение SrF₂ приводит лишь к незначительному росту интенсивности спектральных линий бора и уменьшению времени его полного испарения из электрода. Использование ZnF_2 и AlF₃ способствует как значительному росту интенсивности спектральных линий бора, так и уменьшению времени его полного испарения из электрода до 15 с. Эти результаты свидетельствуют о том, что в присутствии добавок фторидов в кратере электрода происходит образование легколетучего фторида бора. При этом наиболее эффективной из добавок является ZnF₂, использование которого способствует максимальному увеличению интенсивности спектральных линий бора. Этот факт может быть объяснён благоприятным сочетанием значений потенциала ионизации цинка и температуры кипения его фторида. Потенциал ионизации бора составляет 8.298 эВ. Оптимальная температура плазмы для возбуждения атомных линий бора, рассчитанная нами по формуле, предложенной в работе [10], составляет 6086°С. Потенциал ионизации цинка достаточно



Рис. 1. Кривые испарения бора из графита в присутствии фторирующих добавок: 1 - 2% ZnF₂, 2 - 5% AlF₃, 3 - 5% SrF₂, 4 - 6ез добавок.

высок и составляет 9.393 эВ, поэтому введение фторида цинка в анализируемый графитовый порошок приводит лишь к незначительному снижению температуры плазмы чистой угольной дуги от 6000 ± 100 до 5800 ± 100 °C, т.е. температура плазмы остается близкой к оптимальной для возбуждения атомных линий бора. Кроме того, высокая температура кипения фторида цинка (~2500°С) не позволяет ему испариться из кратера электрода прежде, чем произойдет реакция фторирования бора. Введение в анализируемый графитовый порошок фторидов алюминия и стронция, потенциалы ионизации металлов в которых составляют всего 5.985 и 5.694 эВ соответственно, вызывает значительное снижение температуры плазмы до $5600 \pm 100^{\circ}$ С, что и объясняет их меньшее влияние на увеличение интенсивности атомных линий бора.

Для сравнения эффективности действия различных добавок исследовали влияние на характер испарения бора из графита добавки NaCl, которая традиционно рекомендуется в качестве химически активной добавки для снижения пределов определения элементов в графите [11]. На рис. 2 приведены кривые испарения бора из графита в присутствии NaCl, ZnF_2 и без добавок. Как видно, кривые испарения с NaCl и без добавок практически совпадают, что свидетельствует об отсутствии химического взаимодействия хлорида натрия с бором и нецелесообразности его применения для снижения пределов определения бора в графите. Полученные результаты совпадают с данными работы [12], в которой авторы также рассматривают роль хлорида натрия по отношению к труднолетучим элементам исключительно как спектроскопического буфера, а не химически активной добавки.

Известно, что чувствительность метода определяется соотношением $I_{\rm n}/I_{\rm p},$ где $I_{\rm n}-$ интенсивность аналитической линии, а I_{ϕ} – интенсивность фона рядом с ней. Использование добавки фторида цинка способствует одновременно росту интенсивности спектральной линии бора и уменьшению интенсивности фона (благодаря уменьшению времени экспозиции), что приводит к значительному снижению предела определения (clim): предел определения бора в графите составил 1 × 10⁻⁴ и 5 × 10⁻⁶ мас. % без добавки и с добавкой ZnF_2 соответственно (n = 10, P = 0.95). Кроме того, быстрое, полное и равномерное испарение бора из электрода в виде легколетучего фторида, образующегося в присутствии ZnF₂, способствует повышению воспроизводимости результатов: значения s_r составили 0.19 и 0.08 при определении бора в графите без добавки и с добавкой ZnF_2 соответственно (n = 10, P = 0.95). Таким образом, использование фторида цинка позволяет снизить предел определения бора в графите почти на два порядка и повысить воспроизводимость результатов в 2.5 раза. Предел определения



Рис. 2. Сравнительные кривые испарения бора из графита с 2% $ZnF_2(1)$, 4% NaCI (2) и без добавок (3).

 (c_{lim}) оценивали по нижней точке градуировочного графика, найденной с приемлемой точностью [13].

В дуговом АЭА выполнить требование идентичности соединений бора в анализируемом гра-

фите и образце сравнения чрезвычайно трудно, поскольку в графите бор может содержаться как в виде оксида, так и в виде карбида. Кроме того, в процессе нагревания в кратере угольного элек-



Рис. 3. Кривые испарения бора в виде различных соединений из графита: $1 - B_2O_3$, $2 - B_4C$.



Рис. 4. Сравнительные кривые испарения оксида (1) и карбида бора (2) из электрода в присутствии ZnF_2 (a) и SrF₂ (б).

трода дуги бор, вероятно, переходит из оксида в труднолетучий карбид. Рис. 3 иллюстрирует несовпадение кривых испарения бора из электрода в виде оксида и карбида. Видно, что испарение бора в виде оксида, имеющего более низкую температуру кипения, происходит быстрее, чем в виде карбида, и интенсивность его спектральных линий для оксида выше, чем для карбида. Следствием указанного различия кривых испарения оксида и карбида бора является систематическая погрешность результатов. Предугадать, в виде какого соединения следует вводить бор в образец сравнения, практически невозможно, поэтому изучили возможность устранения различия между характерами испарения оксида и карбида бора из электрода дуги путем использования фторирующих добавок. Исследование показало, что только использование ZnF_2 позволяет устранить это различие. На рис. 4а, 46 приведены кривые испарения карбида и оксида бора из электрода в при-

сутствии ZnF₂ и SrF₂. Как видно, различие в характере испарения между оксидом и карбидом бора из электрода дуги постоянного тока исчезает только в присутствии добавки ZnF₂. Таким образом, использование фторида цинка позволяет обеспечить идентичность характера испарения бора независимо от формы его нахождения в анализируемом образце. Правильность результатов определения бора в графите проверяли методом введено-найдено в присутствии добавки 2% ZnF₂. В анализируемый образец бор вводили в виде оксида, а в образцы сравнения – в виде карбида. При введении в анализируемый образец 5.0×10^{-5} мас. % бора найдено (4.8 \pm 0.6) \times 10⁻⁵ мас. % бора с s_r = = 0.08 (n = 4, P = 0.95). Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии систематической погрешности определения бора в графите при использовании фторирующей добавки ZnF₂, независимо от его присутствия в анализируемом образце и образце сравнения в виде различных соединений.

Таким образом, использование фторирующих добавок AlF₃, ZnF₂ и SrF₂ приводит к образованию легколетучего фторида бора, о чем свидетельствует рост интенсивности спектральных линий и его более быстрое испарение из электрода в плазму дуги. Показано, что наиболее эффективной добавкой из исследованных является ZnF₂. Применение этой добавки позволяет снизить предел определения (clim) бора в графите почти на два порядка до 5×10^{-6} мас. % и повысить воспроизводимость результатов определения в два раза. Использование фторида цинка позволяет устранить систематическую погрешность, обусловленную различием состава соединений бора в анализируемом и стандартном образцах, и улучшить тем самым правильность результатов определения бора в графите.

Работа выполнена в рамках Госзадания 075-00920-20-00.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Зильберштейн Х.И. Спектральный анализ чистых веществ. Л.: Химия, 1971. С. 138.
- 2. Фришберг А.А. Повышение чувствительности определения при помощи химически активных носителей // Журн. прикл. спектроскопии. 1965. Т. 3. № 2. С. 187.

3. Семенова А.А., Кузяков Ю.Я., Семененко К.А., Гаврилова Н.К. Влияние добавок хлоридов щелочноземельных элементов на спектральное определение титана, циркония и гафния // Журн. аналит. химии. 1979. Т. 34. № 11. С. 2145.

- 4. Золотарева Н.И., Гражулене С.С. Определение вольфрама в оксиде молибдена прямым атомноэмиссионным методом в дуге постоянного тока // Заводск. лаборатория. Диагностика материалов. 2007. Т. 73. № 6. С. 12.
- 5. Карякин А.В., Штепа Е.В. Влияние катиона добавки на интенсивность спектральных линий микроэлементов в атомно-эмиссионном спектральном анализе // Журн. прикл. спектроскопии. 1991. Т. 54. № 1. С. 18. (Karyakin A.V., Shtepa E.V., Influence of carrier cations on the intensity of spectral lines of microelements in atomic-emission spectral analysis. // J. Appl. Spectrosc. 1991. V. 54. № 1. Р. 10.)
- 6. Золотарева Н.И., Хлыстова А.Д, Кузяков Ю.Я., Гражулене С.С. Влияние фторидов цинка, свинца и алюминия на атомно-эмиссионное определение труднолетучих элементов в графитовом порошке // Журн. аналит. химии. 1988. Т. 43. № 7. С. 1199.
- 7. Золотарева Н.И., Гражулене С.С. Использование химически активных добавок для повышения чувствительности определения редкоземельных элементов и тория дуговым атомно-эмиссионным методом // Заводск. лаборатория. Диагностика материалов. 2011. Т. 77. № 9. С. 11.
- 8. Бурмий Ж.П., Золотарева Н.И., Хвостиков В.А., Гражулене С.С. Фотоэлектрическая регистрация эмиссионных спектров на основе приборов с зарядовой связью // Заводск. лаборатория. Диагностика материалов. 2008. Т. 74. № 6. С. 26.
- 9. Верятин У.Д., Маширев В.П. Термодинамические свойства неорганичесих веществ. М.: Атомиздат, 1965. С. 54.
- Гольдфарб В.М., Ильина Е.В. О зависимости интенсивности спектральных линий от состава плазмы дуги постоянного тока / Прикладная спектроскопия. М.: Наука, 1969. Т. 1. С. 172.
- Чанышева Т.А., Шелпакова И.Р. Унифицированный метод атомно-эмиссионного спектрального анализа объектов разной природы // Аналитика и контроль. 2002. Т. 6. № 3. С. 298.
- Домбровская М.А., Лисиенко Д.Г., Гильмуллина Ч.Г., Кубрина Е.Д. Совершенствование атомно-эмиссионной методики анализа графитового коллектора // Заводск. лаборатория. Диагностика материалов. 2017. Т. 83. № 1. Ч. II. С. 51.
- Экспериандова Л.П., Беликов К.Н., Химченко С.В., Бланк Т.А. Еще раз о пределах обнаружения и определения // Журн. аналит. химии. 2010. Т. 65. № 3. С. 229.

———— ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ ——

УДК 543.632.9

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА Е (АЦЕТАТА *а*-токоферола) На поверхности кожи человека методом ик-фурье спектрометрии и изучение некоторых аспектов его трансдермального переноса

© 2021 г. И. Н. Фадейкина^{а, *}, Е. С. Пеункова^а, Б. К. Зуев^b

^аГосударственный университет "Дубна" ул. Университетская, 19, Дубна, Московская обл., 141980 Россия ^bИнститут геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского Российской академии наук ул. Косыгина, 19, Москва, 119991 Россия *e-mail: i.fadeikina@yandex.ru Поступила в редакцию 25.05.2020 г. После доработки 22.07.2020 г. Принята к публикации 18.08.2020 г.

Рассмотрены возможности применения метода ИК-Фурье спектрометрии для определения органических веществ на поверхности кожи человека и изучения некоторых аспектов трансдермального переноса косметических активов с поверхности во внутренние слои кожи. В качестве исследуемого косметического актива выбран витамин Е в форме ацетата альфа-токоферола. Предложена методика определения изменения концентрации витамина Е с течением времени, использован пробоотбор с применением стандартных таблеток бромида калия, получена зависимость, иллюстрирующая уменьшение концентрации косметического актива во времени. Показано, что ИК-Фурье спектрометрию можно применять как простой и экспрессный метод исследования механизмов переноса веществ и изучения трансдермальных свойств кожи.

Ключевые слова: ИК-Фурье спектрометрия, косметический актив, витамин Е, трансдермальные свойства.

DOI: 10.31857/S0044450221020080

Появление и внедрение новых активных компонентов косметических средств требует исследования их свойств, знания эффективной концентрации на поверхности кожи и их действия на кожу человека. Для этого необходимы новые методы обнаружения таких сложных компонентов, как гиалуроновая кислота, пептиды, витамины и т.п., а также разработка способов определения их концентрации и изучения особенностей проникновения в кожу (трансдермальные свойства кожи).

Трансдермальные свойства кожи — один из главных вопросов в косметологии и дерматологии. Подобные исследования нужны для определения характеристик и показателей кожи при выборе стратегии лечения и косметических средств; для изучения механизмов и кинетических параметров переноса активных веществ, нанесенных на кожу; для расчета нормы ввода активных компонентов в состав лекарственных и косметических средств и времени их воздействия. На сегодня разработаны и охарактеризованы методы определения основных характеристик кожи: pH, жирности (липидный баланс), увлажненности

(сухость), пигментации, механических свойств, микроциркуляции и внутренних структур кожи: определен и описан химический состав гидро-липидной мантии и естественных увлажняющих компонентов на поверхности кожи; описано несколько математических моделей, рассматривающих перенос веществ через кожу как через мембрану и как через диффузионную ячейку для некоторых лекарственных препаратов [1-3]. Существующие методы изучения процессов взаимодействия лекарственных и косметических препаратов с кожей являются, как правило, трудоемкими и дорогостоящими. Данные по эффективности проникновения наночастиц серебра через кожу человека, полученные с использованием методов UV-Vis спектроскопии и сканирующей просвечивающей электронной микроскопии, описаны в работе [4]. Методом ВЭЖХ-масс-спектрометрии исследована [5] доставка ацетиласпаргиновой кислоты в глубокие слои кожи в течение 24 ч и получены данные о динамике диффузии in vitro. Атомноабсорбционную спектрометрию применили [6] в исследованиях кожи для определения остаточных концентраций металлов, поступивших из внешней среды. Для определения гиалуроновой кислоты на поверхности кожи человека и получения зависимости проникновения гиалуроновой кислоты в кожу человека от времени использовали метод окситермографии [7—9]. Методика определения поверхностной концентрации гиалуроновой кислоты основана на контроле переноса органического вещества с поверхности кожи на чистую шероховатую поверхность кварцевого пробоотборника. Органическое вещество на поверхности пробоотборника определяли методом окситермографии с использованием воздуха в качестве окислительной среды.

В работе [10] рассмотрены модели человеческой кожи с использованием прототипов в виде целлофановой пленки и кожного покрова уха свиньи. Следует отметить, что в исследовании участвовали липосомальная и микроэмульсионная формы альфа-токоферола.

Классическим методом определения органических веществ является ИК-Фурье спектрометрия [11]. Однако имеется ряд вопросов, связанных с возможностью применения данного метода к такому сложному биологическому объекту, как кожа, со способами пробоотбора органического вещества с поверхности кожи, а также с решением проблем определения низких концентраций веществ. Дополнительные затруднения возникают при учете индивидуального состава смеси веществ на поверхности кожи и индивидуального распределения зон с повышенным содержанием веществ у каждого человека, сложного и меняющегося во времени состава этой смеси, различных механизмов переноса для гидрофильных и липофильных веществ, сложности пробоотбора и разделения компонентов смеси.

Цель данной работы — разработка методики определения косметического вещества (на примере витамина Е), нанесенного в виде тонкой пленки на поверхность кожи человека, с использованием метода ИК-Фурье спектрометрии и построение зависимости изменения концентрации косметического препарата на поверхности кожи человека от времени для характеристики особенностей его трансдермального переноса.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Методика определения косметических веществ на поверхности кожи человека для изучения их трансдермального переноса включала следующие этапы:

 Выбор на поверхности кожи человека однородного участка (без повреждений и избыточного волосяного покрова). 2) Подготовка поверхности кожи перед нанесением косметического актива (очищение и обезжиривание).

3) Равномерное нанесение на поверхность кожи косметического актива в исследуемой форме.

4) Пробоотбор нанесенного органического вещества через определенные промежутки времени с различных участков поверхности кожи.

5) Определение органического вещества на поверхности пробоотборника с использованием метода ИК-Фурье спектрометрии.

6) Построение и анализ зависимости изменения концентрации косметического вещества на поверхности кожи человека от времени.

Данную методику опробовали при изучении трансдермального переноса витамина Е в форме альфа-токоферола ацетата. Витамин Е относится к малоопасным веществам (4 класс опасности согласно ГОСТ 12.1.007-76), поэтому предварительных исследований на животных и модельных объектах не требовалось. Целевая группа исследования: девушки от 18 до 24 лет (живые люди). Область исследования: кожа рук на внутренней поверхности локтевого сустава.

Перед нанесением косметического актива поверхность кожи очищали и обезжиривали 85%ным раствором этанола и высушивали. В качестве пробоотборника использовали стандартные таблетки из кристаллического КВг (для ИК-спектрометрии; Shimadzu, Япония). Таблетки диаметром 1 см, толщиной 2 мм, массой 200 мг готовили прессованием с использованием гидравлического пресса со специальной пресс-формой при давлении 7 атм. Для отбора пробы таблетку прикладывали к анализируемой поверхности в течение фиксированного промежутка времени. Каждый раз для анализа нового участка поверхности кожи использовали новую таблетку КВг.

Органические вещества, перенесенные на поверхность таблетки KBr, определяли с помощью ИК-спектрометра с Фурье-преобразованием IRaffinity-1s (Shimadzu, Япония) в режиме пропускания со специальным держателем для таблеток. Прибор дает возможность получать ИК-спектры в диапазоне 650-4000 см⁻¹. Программное обеспечение IRSolution и LabSolution позволяет регистрировать спектры в режимах пропускания и поглощения с представлением суммарной интенсивности как в процентах, так и в единицах энергии. Кроме того, имеется возможность использовать стандартные подходы при обработке спектров – проводить нормализацию, строить базовую линию, работать с интегральным спектром или с отдельным характеристическим пиком.

Для выбора аналитических линий получили ИК-спектр витамина Е (рис. 1). Наиболее удобными для обработки оказались характеристические линии в спектральных диапазонах 3200– 2700 см⁻¹, 1800–1700 см⁻¹, а также набор полос в области 1500–1000 см⁻¹.

Строили градуировочную зависимость аналитического сигнала от концентрации альфа-токоферола. Градуировочные растворы готовили из жидкого альфа-токоферола ацетата (Тульская фармацевтическая фабрика) разбавлением, в качестве растворителя использовали CCl₄ (чистый для ИК- и УФ-спектрометрии; Вектон, Россия). Исследуемые растворы готовили непосредственно перед проведением измерений. Аликвоты отбирали при помощи набора микропипеток серии "LENPIPET" (диапазоны объемов 5–50, 100– 1000 и 1000–10000 мкл, точность отбора аликвоты ±1.5%).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве аналитической полосы выбрали спектральный лиапазон 1800-1700 см⁻¹ с основным пиком, соответствующим колебаниям связи С=О в исследуемом веществе. Данный диапазон содержит характеристическую полосу поглощения, которая не перекрывается с полосами, соответствующими колебаниям других групп, и позволяет установить четкую зависимость площади или высоты пика от количества вещества на поверхности таблетки KBr. При исследовании кинетики трансдермального переноса рассматривали также характеристические полосы при 2800 см⁻¹, соответствующие валентным колебаниям связи С-Н, и при 1200 см⁻¹, соответствующие колебаниям группы С-О-С, обладающие высокой интенсивностью.

Для количественного определения содержания витамина Е на поверхности таблетки-пробоотборника приготовили шесть градуировочных растворов в CCl₄ с концентрацией витамина Е от 75 до 1.25 мкл/мл. На поверхность таблеток KBr равномерно наносили 20 мкл приготовленного градуировочного раствора. Для получения градуировочной зависимости рассчитанную концентрацию на поверхности пробоотборника сопоставляли с интенсивностью выбранного характеристического пика при 1750 см⁻¹ (табл. 1). В качестве базовой линии рассматривали спектр поглощения пустой таблетки KBr (рис. 1).

Уравнение полученной градуировочной зависимости имеет вид:

$$y = 1.5117x - 0.1102, R^2 = 0.9923,$$
 (1)

где y — интенсивность линии при 1750 см⁻¹, отн. ед.; x — концентрация витамина Е на поверхности таблетки KBr, мкл/см².

Для определения предела обнаружения витамина Е на поверхности пробоотборника KBr в со-



Рис. 1. ИК-спектры витамина Е на поверхности пробоотборника, использованные для построения граду-ировочной зависимости. Концентрация витамина Е, мкл/см²: *1* – 1.49, *2* – 0.42, *3* – 0.21, *4* – пустая таблетка KBr.

ответствии с рекомендациями [12] использовали 3σ -критерий и коэффициент чувствительности из уравнения (1). Значение предела обнаружения витамина Е на поверхности таблетки KBr составило 0.033 мкл/см².

Для реализации предложенного способа определения витамина Е на поверхности кожи исследовали полноту переноса вещества на поверхность пробоотборника. На зависимость концентрации вещества на поверхности кожи человека от времени влияют трансдермальные свойства кожи и испарение в атмосферу нанесенного вещества с ее поверхности. Для изучения влияния этих факторов провели две серии экспериментов с использованием инертной невпитывающей по-

Таблица 1. Зависимость высоты ИК-пика от поверхностной концентрации витамина Е на таблетке KBr при 1750 см $^{-1}$

Концентрация витамина Е в приготовленных растворах, мкл/мл	Концентрация витамина Е на поверхности таблетки KBr, мкл/см ²	Высота пика, отн. ед.
1.25	0.01	0.000 ± 0.012
7.5	0.10	0.016 ± 0.012
10	0.14	0.035 ± 0.012
15	0.21	0.220 ± 0.011
30	0.42	0.514 ± 0.026
75	1.49	1.49 ± 0.07
Способ пробоотбора	Высота пика (1750 см ⁻¹), отн. ед.	Концентрация, мкл/см ²
----------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------	-----------------------------------
Пробоотбор витамина Е сразу после нанесения на ПЭ-пленку (поверх-	1.03 ± 0.05	1.45 ± 0.07
ностная концентрация 1.53 мкл/см ²)		
Повторный пробоотбор витамина Е с участков поверхности ПЭ-пленки,	0.085 ± 0.004	0.018 ± 0.001
с которых ранее был выполнен пробоотбор		
Пробоотбор витамина Е через 20 мин после нанесения пленки витамина Е на	1.04 ± 0.05	1.45 ± 0.07
ПЭ-пленку (начальная поверхностная концентрация 1.53 мкл/см ²)		
Пробоотбор витамина Е сразу после нанесения на ПЭ-пленку (поверх-	0.59 ± 0.03	0.79 ± 0.04
ностная концентрация 0.92 мкл/см ²)		

Таблица 2. Результаты эксперимента по переносу витамина Е с полиэтиленовой пленки на таблетку КВг для различных способов пробоотбора

лиэтиленовой пленки (ПЭ), закрепленной на упругой поверхности, имитирующей кожу. 200 мкл раствора витамина Е в CCl_4 , содержащего 75 мкл витамина в пересчете на чистое вещество, равномерно наносили на подготовленные поверхности площадью 49 и 81 см². При этом поверхностная концентрация витамина составила соответственно 1.53 и 0.92 мкл/см². Пробоотбор на таблетку KBr проводили с поверхности ПЭ сразу после нанесения пленки витамина Е, а также через 20 мин после первого пробоотбора с нового участка поверхности с нанесенным витамином Е. Кроме того, отбирали пробу повторно с участка поверхности ПЭ, с которого уже проводили пробоотбор ранее.

С помощью ИК-Фурье спектрометра регистрировали ИК-спектры витамина Е, перенесенного на таблетку КВг при различных условиях пробоотбора. Результаты эксперимента по пробоотбору витамина Е с поверхности полиэтиленовой пленки с указанием расширенной неопределенности представлены в табл. 2. Как видно, на чистую поверхность таблетки КВг может перехо-



Рис. 2. Зависимость поверхностной концентрации витамина Е на коже человека от времени, полученная путем измерения высоты характеристического пика при 1750 см⁻¹.

дить практически весь нанесенный на кожу витамин Е в точке пробоотбора. Используя предложенный прием пробоотбора, можно контролировать изменения концентрации витамина на поверхности кожи человека. Как видно, в течение 20 мин после нанесения концентрация витамина Е на невпитывающей поверхности не изменяется, т.е. не происходит его интенсивное испарение в атмосферу. Можно предположить, что основным процессом, определяющим изменение концентрации витамина Е на поверхности кожи, является трансдермальный перенос вещества.

Для изучения скорости изменения поверхностной концентрации витамина Е на коже человека на предварительно обезжиренную путем спиртовой обработки кожу рук на внутренней поверхности локтевого сустава дозатором наносили 200 мкл витамина Е и распределяли равномерно на доступной поверхности кожи, насколько это было возможно в условиях эксперимента. Далее при помощи таблеток KBr с поверхности кожи отбирали витамин Е через определенные промежутки времени и определяли его поверхностную концентрацию методом ИК-Фурье спектрометрии. Таблетки КВг прикладывали к коже на 20 с. С помощью программного обеспечения прибора Iraffinity-1s рассчитывали высоты пиков и строили график зависимости высоты пика, соотносящейся с количеством отобранного вещества, от времени впитывания витамина Е в кожу. На рис. 2 в качестве примера представлена зависимость поверхностной концентрации витамина Е на коже человека от времени для одного из участников исследования. Зависимости для других участников исследования аналогичны. Вопрос о возможности объединения результатов для разных людей пока остается открытым, поскольку предварительно следует оценить влияние увлажненности кожи, типа кожи и других факторов на результаты исследования.

Из зависимости поверхностной концентрации косметического актива от времени видно, что на

разных участках скорость трансдермального переноса витамина Е различается, что соответствует различному порядку переноса и другим кинетическим параметрам процесса. Исследование данных вопросов позволит прояснить механизм впитывания витамина Е и других косметических активов. Оценить погрешность определения поверхностной концентрации витамина Е можно, исходя из экспериментов по пробоотбору с поверхности ПЭ-пленки. Для исследуемых поверхностных концентраций относительная стандартная неопределенность составляет около 0.05.

При определении косметических активов на поверхности кожи следует рассмотреть вопрос влияния органических компонентов себума. В работах [13, 14], например, установлено влияние глицеридов жирных кислот на определение альфа-токоферола. Однако авторы отмечают, что предварительное обезжиривание кожи спиртовым раствором позволяет исключить данный фактор, что подтверждается отсутствием дополнительных полос поглощения в ИК-спектрах проб после отбора с поверхности кожи.

Предложенная методика, по мнению авторов, может быть применена для изучения трансдермального переноса других косметических активов, имеющих характеристические колебательные полосы в приведенном диапазоне волновых чисел и низкую летучесть, таких как пептиды, витамины, некоторые поверхностно-активные вещества, гиалуроновая кислота и т.д. При выбранном подходе ИК-Фурье спектрометрия имеет существенные преимущества по сравнению с хроматографическими метоликами количественного определения веществ на поверхности кожи и аппаратными методами, дающими скорее качественные, нежели количественные характеристики. Предложенный авторами подход позволяет быстро описать качественный и количественный состав косметического актива. Однако при использовании пробоотборника на основе KBr могут возникнуть трудности, если косметический актив содержится в водной среде. В случае исследования водных растворов и эмульсий возможен вариант применения приставки нарушенного полного внутреннего отражения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Задымова Н.М. Жидкофазные дисперсные системы как основа микрогетерогенных полимерных матриц для трансдермальной доставки лекарств. Дис. ... докт. хим. наук. М.: Моск. гос. ун-т им. М.В. Ломоносова, 2014. 273 с.
- Рыжикова В.А. Трансдермальная терапевтическая система бромокаинана основе биосовместимой микроэмульсионной композиции. Дис. ... канд.

биол. наук. М.: Федер. науч. центр трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова, 2015. 106 с.

- Flynn G.L. Physiochemical determinants of skin absorption / Principles of Route-toroute Extrapolation for Risk Assessment / Eds. Gerity T.R., Henry C.J. Amsterdam: Elsevier Science Publishing Co. Inc., 1990. P. 93.
- Domeradzka-Gajda K., Nocun M., Roszak J., Janasik B., Quarles C.D., Wasowicz W. A study on the in vitro percutaneous absorption of silver nanoparticles in combination with aluminum chloride, methyl paraben or din-butyl phthalate // Toxicol. Lett. 2017. V. 272. P. 38.
- Duracher L., Visdal-Johnsen L., Mavon A. In vitro and in vivo dermal absorption assessment of acetyl aspartic acid: a compartmental study // Int. J. Cosmetic Sci. 2015. V. 37. P. 34.
- Zeiner M., Cindric I.J., Kandler W., Stingeder G. Trace determination of skin-irritating metals in tea tree oil by GFAAS // Microchem. J. 2018. V. 136. P. 101.
- 7. Зуев Б.К., Филоненко В.Г., Нестерович Д.С., Поликарпова П.Д. Определение гиалуроновой кислоты в водных растворах с использованием воздуха как окислителя // Журн. аналит. химии. 2018. Т. 73. № 10. С. 763.
- Пеункова Е.С., Зуев Б.К., Моржухина С.В. Изучение распределения органических веществ на поверхности лица методом окситермографии / Семьдесят первая всероссийская научно-техническая конференция студентов, магистрантов и аспирантов высших учебных заведений с международным участием / Под ред. Канакотиной М.А. Ярославль: Издательский дом ЯГТУ, 2018. Ч. 1. С. 253.
- 9. Зуев Б.К., Филоненко В.Г., Коротков А.С., Сараева А.Е., Поликарпова П.Д. Пробоотбор и определение гиалуроновой кислоты на имитаторе кожи человека методом окситермографии // Журн. аналит. химии. 2019. Т. 74. № 4. С. 315. (Zuev B.K., Filonenko V.G., Korotkov A.S., Saraeva A.E., Polikarpova P.D. Sampling and determination of hyaluronic acid on a human skin imitator by oxithermography // J. Analyt. Chem. 2019. V. 74. № 4. P. 410.)
- Karunaratne D.N., Dassanayake A.C., Geethi K Pamunuwa K.M., Karunaratne V., Improved skin permeability of Dl-α-tocopherol in topical macroemulsions // Int. J. Pharm. Pharm Sci., 2014.V. 6. № 6. P. 53.
- Преч Э., Бюльман Ф., Аффольтер К. Определение органических соединений / Пер. с англ. Тарасевич Б.Н. М.: Мир; Бином. Лаборатория знаний, 2006. С. 438.
- Основы аналитической химии. В 2-х тт. Т. 1. Учеб. для студ. учреждений высш. проф. образования / Под ред. Золотова Ю.А. М.: Академия, 2012. С. 384.
- Valasi L., Arvanitaki D., Mitropoulou A., Georgiadou M., Pappas Ch. Study of the quality parameters and the antioxidant capacity for the FTIR-chemometric differentiation of Pistacia Vera oils // Molecules. 2020. V. 25. P. 1614.
- Silva S.D. Rosa N.F., Ferreira A.E., Boas L.V., Bronze M.R. Rapid determination of α-tocopherol in vegetable oils by fourier transform infrared spectroscopy // Food Anal. Methods. 2009. V. 2. P. 120.

ЖУРНАЛ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ том 76 № 2 2021

УДК 543.54:543.421/424

ОПРЕЛЕНИЕ КАРОТИНОИДОВ ПЛОДОВ ТОМАТОВ РАЗЛИЧНОЙ ОКРАСКИ

© 2021 г. В. И. Дейнека^{а, *}, Т. Г. Буржинская^а, Л. А. Дейнека^а, И. П. Блинова^а

^аБелгородский государственный национальный исследовательский университет, Институт фармации, химии и биологии ул. Победы, 85, Белгород, 308015 Россия

*e-mail: deineka@bsu.edu.ru Поступила в редакцию 19.05.2020 г. После доработки 01.06.2020 г. Принята к публикации 02.07.2020 г.

Предложен способ определения состава каротиноидов плодов томатов различной окраски с использованием комбинации спектрофотометрического и хроматографического методов. Впервые предложено объяснение последовательности элюирования моно *цис*-изомеров ликопина в условиях обращенно-фазовой хроматографии на традиционных "мономерных" обращенных C18-фазах. Установлено, что для проликопина, (7Z, 9Z, 7'Z, 9'Z)-ликопина, обеспечивающего оранжевую окраску плодов, существует почти незаметный при обычном просмотре переход в электронно-колебательной структуре электронного спектра поглощения с наименьшей энергией, $\lambda_{max}(1) = 486.2$ нм. Определены основные каротиноиды плодов томатов различной окраски: *транс*-ликопин и его *цис*-изомеры для плодов красной и розовой окрасок, протоликопин и другие каротины, предшествующие его биосинтезу, для плодов оранжевой окраски, а каротиноидный состав томатов желтой окраски отличается от томатов первых двух окрасок значительным накоплением лютеина. Для количественной оценки содержания каротиноидов с различающимися хромофорами предложена система расчета, позволяющая определить вклад каждого из компонентов сложных смесей.

Ключевые слова: каротиноиды томатов, проликопин, электронные спектры поглощения, обращенно-фазовая ВЭЖХ, спектрофотометрия, внутренняя нормировка.

DOI: 10.31857/S0044450220120063

В последнее время отмечен заметный интерес к природным каротиноидам, не обладающим провитаминной А активностью. Установлено, что ксантофиллы лютеин и зеаксантин отвечают за профилактику возрастной макулярной дистрофии [1, 2]. Астаксантин оказался эффективным агентом в дерматологии [3, 4]. Ликопин в ряде исследований проявил активность в борьбе с онкологическими заболеваниями и в профилактике сердечно-сосудистых заболеваний [5, 6].

Как и все каротиноиды, не синтезирующиеся в организме человека, ликопин входит в состав растительных продуктов, употребляемых в пищу. Важнейшими растительными источниками полностью *транс*-ликопина для типичной диеты являются плоды томатов привычного красного цвета и продукты их переработки (томатные пасты, томатный сок и пр.) [7]. Однако ликопин, как и ряд других каротиноидов, относится к соединениям с невысокой биологической доступностью. Более того, в некоторых исследованиях [8, 9] концентрация *цис*-изомеров в сыворотке крови оказалась более высокой, чем полностью *транс*-ликонина. Ликопин лучше усваивается после термической обработки, которая приводит к появлению *цис*-изомеров [8]. В этом отношении особый интерес представляет тетра-*цис*-изомер ликопина – (7Z, 9Z, 7'Z, 9'Z)-ликопин или проликопин – изомер с высокой биодоступностью. В связи с этим неудивительны рекомендации [9] по употреблению в пищу предпочтительно сортов томатов, обогащенных *цис*-изомерами ликопина.

Первоначально для проликопина была предложена структура, содержащая семь *цис*-двойных связей (5Z, 9Z, 13Z, 15Z, 13'Z, 9'Z, 5'Z) (схема 1) [10]. При ее построении исключили стерически неблагоприятную из-за большого перекрывания сфер с ван-дер-ваальсовыми радиусами атомов водорода метиновой и метильной групп конфигурацию (схема 1, вариант (б)), т.е. фактически *цис*концигурацию по связям 7, 11, 11' и 7'. Однако выполненные позднее ЯМР-спектроскопические исследования [11] позволили уточнить строение проликопина, в котором в двух частях молекулы все-таки имеются приведенные на схеме 1 (вариант (б)) напряжения.



I



Схема 1. Строение проликопина по данным работ [10] (I) и [11] (II).

Ранее для разделения и определения проликопина и других изомеров ликопина широко использовали тонкослойную хроматографию [10, 12]. В настоящее время при разделении каротиноидов чаще применяют обращенно-фазовую ВЭЖХ [13], причем для более эффективного разделения цис- и транс-изомеров разработаны специальные "полимерные" обращенные фазы. На традиционной С18 стационарной фазе [14] проликопин элюируется сразу после полностью транс- и обычных цис-изомеров ликопина. При разделении каротиноидов на "полимерной" обращенной фазе С30 с элюированием в градиентном режиме от метанола до *трет*-бутилметилового эфира [15] для идентифицированных веществ удерживание возрастает в ряду (в скобках приведено время удерживания, мин): лютеин (14.3) < β-каротин (20.3) < проликопин (20.6) < δ-каротин (22.3) < γкаротин (23.5) < *цис*-ликопин (25.1) < *транс*-ликопин (26.4).

При качественном и количественном определении проликопина (как и для многих каротиноидов) используют параметры электронного спектра поглощения. Так, в работе [9] отмечено, что максимум поглощения проликопина (438 нм) существенно гипсохромно смещен относительно максимума поглощения полностью *транс*-ликопина (470 нм); при этом различаются и молярные коэффициенты поглощения: 102900 и 184000 м²/моль

соответственно. Однако в работе [16], на которую ссылаются авторы работы [9], для проликопина приведены несколько иные спектральные характеристики: 461 (плечо, 70000), 437 (105000) и 417 (плечо, 90000), где в скобках указан молярный коэффициент поглощения с размерностью л/(моль см); плечо — это перегиб спектральной линии. Впрочем, молярный коэффициент поглощения 102900 использован и в работе [17]. Наконец, в ряде работ при определении каротиноидного состава сложных смесей, содержащих ликопин и *цис*-изомеры, включая проликопин, используют площади пиков на хроматограмме без поправок на молярные коэффициенты поглощения [8, 18].

Цель настоящей работы — разработка методики определения проликопина в томатах оранжевой окраски с использование обращенно-фазовой ВЭЖХ на традиционных С18-фазах.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты и аппаратура. Использовали ацетон для УФ-ИК-ВЭЖХ-ГПХ, ацетонитрил для УФ-ИК-ВЭЖХ-ГПХ (Panreac, Германия) и *н*-гексан для ВЭЖХ (Компонент-Реактив, Россия).

Электронные спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре Shimadzu UV 2550 в кварцевых кюветах (l = 1 см). Общее содержание

Nº*	Название	λ, нм	€, л/(моль см)	t _R ,	Уровень накопления (мкг/г) для томатов различной окраски			
		[1/]	[17]	мип	красная	розовая	оранжевая	желтая
1	Лютеин	445	145100	1.83	0.5	2.2	0.8	1.7
2	<i>транс</i> -Ликопин (с <i>цис</i> -изоме-	472	185200	5.19	50.2	43.3	4.0	0.6
	рами)							
3	Проликопин	434	102900	6.02	< 0.1	< 0.1	38.3	< 0.1
4	β-Каротин (с <i>цис</i> -изомерами)	448	139200	8.83	3.6	6.4	2.8	2.5
5	Нейроспорин	435	134500	6.33	< 0.1	< 0.1	5.0	< 0.1
6	Пронейроспорин	430	83900	6.80	< 0.1	< 0.1	15.1	< 0.1
7	ξ-Каротин (с <i>цис</i> -изомерами)	399	135200	7.80	< 0.1	< 0.1	19.0	< 0.1

Таблица 1. Индивидуальные каротиноиды плодов томата с различной окраской

* Нумерация как на рис. 3.

каротиноидов в пересчете на главный компонент смеси определяли по уравнению:

$$c(i) = \frac{A(i)V(i)k(i)M(i) \times 100}{\epsilon_{\lambda}(i)m(i)}, \text{ M}\Gamma/\Gamma, \qquad (1)$$

где A(i) — оптическая плотность экстракта при заданной дине волны, λ , нм; V(i) — объем экстракта; k(i) — кратность разбавления исходного экстракта перед измерением, M(i) — молярная масса основного компонента, г/моль; $\varepsilon_{\lambda}(i)$ — молярный коэффициент поглощения компонента при заданной длине воны; m(i) — масса навески лиофильно высушенного образца, г; 1000 — коэффициент перевода результатов в мг/г. Длины волн, коэффициент молярного поглощения и молярные массы приведены в табл. 1.

Для контроля видового состава и определения площадей пиков каротиноидов использовали хроматографическую систему Agilent 1260 Infinity с диодно-матричным детектором. Хроматографическую колонку: 150×4.6 мм. Reprosil-Pur C18-AO, 3.5 мкм с предколонкой 10 × 4.6 мм Кгоmasil 100-5С18 использовали при температуре термостата колонки 30°С. Подвижную фазу состава 30 об. % ацетонитрила в ацетоне подавали со скоростью 0.8 мл/мин в изократическом режиме. Хроматограммы записывали при длине волны детектора, настроенной на определение конкретных основных каротиноидов, см. табл. 1. Хроматограммы записывали, хранили и обрабатывали, используя программное обеспечение Agilent ChemStation.

Пробоподготовка. С приобретенных на рынке томатов различной окраски снимали тонкую кожицу и мезокарпий гомогенизировали, замораживали в морозильной камере (-20°С) с последующей лиофилизацией на лиофильной сушилке FreeZone 6L Labconco, продукт растирали в порошок в фарфоровой ступке. Порошок хранили в холодильнике.

ЖУРНАЛ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ том 76 № 2 2021

Экстракт готовили растиранием навески (m) порошка, смоченного небольшим количеством воды, под слоем h-гексана. Порции экстракта отбирали из ступки и переносили на воронку с фильтровальной бумагой. К твердому остатку добавляли новую порцию экстрагента и экстракцию повторяли. Повторение экстракции продолжали до получения практически бесцветной порции экстракта. Все порции экстракта объединяли, и растворитель удаляли на вакуумном ротационном испарителе. Остаток растворяли в известном объеме (V) подвижной фазы для ВЭЖХ-определения каротиноидов. Полученный раствор фильтровали через насадочный фильтр в виалы, перенося их в ячейки автодозатора хроматографа.

Расчетные методы. Для обработки площадей пиков по методу внутренней нормировки использовали два способа.

Способ 1 применяли только для оценки вклада основного компонента в суммарное поглощение при выбранной длине волны детектирования:

$$\alpha^*(i) = \frac{S(i)}{\sum_{i} S(j)},\tag{2}$$

где $\alpha^*(i)$ — доля компонента *i* (ликопина или проликопина) в сумме каротиноидов, на который проводится пересчет общего содержания, найденного по данным спектрофотометрического анализа (формула (1)); *S*(*i*) — площадь пика основного компонента; *S*(*j*) — сумма площадей все пиков на хроматограмме. При этом исправленное на индивидуальный компонент содержание компонента *i* (*c**(*i*)) определяли по формуле:

$$c^{*}(i) = \alpha^{*}(i)c(i).$$
 (3)

Способ 2 использовали для определения истинных долей компонентов в сумме каротиноидов анализируемой смеси. Для этого электронный спектр поглощения каждого вещества (запи-



Рис. 1. Структура β-каротина, определенная стерическими напряжениями типов (а) и (б).

санный в кювете детектора) экспортировали в Excel. Затем по спектрам находили $A(\lambda_{\max}(i))$ — оптическую плотность пика в характеристическом для вещества *i*-том максимуме поглощения и $A(\lambda_{det}(i))$ — оптическую плотность этого же кароиноида при длине волны записи хроматограммы и, используя приведенные в литературе значения молярных коэффициентов поглощения $\epsilon(\lambda_{\max}(i))$ при характеристической для каждого компонента длине волны, рассчитывали:

$$\alpha(i) = \frac{S(i)/\epsilon(\lambda_{\max}(i)) A(\lambda_{\max}(i))/A(\lambda_{\det}(i))}{\sum_{j} S(j)/\epsilon(\lambda_{\max}(j)) A(\lambda_{\max}(j))/A(\lambda_{\det}(j))}, \quad (4)$$

где $\alpha(i)$ — исправленные доли видов каротиноидов в смеси; S(i) — площади пиков соответствующих компонентов на хроматограмме; Σ — сумма таких величин для всех компонентов. При этом концентрации всех остальных каротиноидов (кроме определенной ранее по формуле (3) концентрации основного компонента) ($c^*(j)$) рассчитывают по формуле:

$$c^*(j) = c^*(i)\frac{\alpha(j)}{a(i)}.$$
(5)

Оптимизацию геометрии β -каротина проводили по методу MM2 в программе Chem3D пакета ChemOffice2016 (PerkinElmer, GB).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование электронных спектров поглощения. Напряжения типа (а) на схеме 1 достаточны для искажения линейной формы полиеновой цепи изопреновых фрагментов до S-образной формы, что можно продемонстрировать структурой, энергия которой минимизирована в программе MM2 (рис. 1). Планарная центральная часть молекулы (между иононовыми кольцами) искажается в плоскости S-образно из-за стерических напряжений типа (а). Такая изогнутая структура в этой части сохраняется для всех каротиноидов. Однако два стерических напряжения типа (б) выводят двойные связи колец из полного сопряжения с полиеновой системой средней части. Это приводит к тому, что у β -каротина по сравнению с ликопином при одинаковой длине цепи сопряжения (по 11 С=С-связей) максимумы полос абсорбции смещены гипсохромно на 27 нм: длины волн для первых (по энергии) переходов электрона равны 478 и 505 нм для β -каротина и для ликопина соответственно [19], т.е. они различаются на 27 нм. Для 7,7'-ди-*цис*-ликопина гипсохромный сдвиг оказывается относительно небольшим – лишь около 9 нм, в то время как для 9,9'-ди-*цис*-ликопина он несколько больше – 12 нм [16]. В таком случае уменьшение длины волны для такого же (первого) перехода для проликопина (7,9,7',9'тетра-*цис*-ликопина) на 41 нм объяснить трудно.

Можно предположить, что в спектре проликопина имеется еще один малозаметный перегиб. Для подтверждения предположения о существовании еще одного (именно первого) перехода электрона провели разложение суммарного спектра на индивидуальные полосы. Разложение выполняли гауссовыми функциями в спектрах с измененными координатами – вместо шкалы длин волн (нм) использовали энергетическую шкалу (эВ). При этом для полностью *транс*-ликопина найдены пять первых полос переходов с длинами волн 503.8, 472.9, 445.5, 421.1 и 399.2 нм. Между полосами обнаружен одинаковый энергетический интервал 0.161 эВ, характерный для переходов на различные колебательные состояния возбужденного электронного состояния (рис. 2а). В случае проликопина длины волн пяти первых полос переходов 485.2, 464.7, 441.5, 420.6 и 401.5 нм (при одинаковом энергетическом интервале 0.140 эВ, рис. 2) включают переход, который практически невозможно обнаружить на спектре. Разность между длинами волн первых переходов для полностью *транс*-ликопина и проликопина составляет 18.6 нм, что уже не вызывает вопросов.

Разделение и количественное определение каротиноидов разноцветных томатов. Экстракты томатов красной, розовой, оранжевой и желтой окраски исследовали методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на традиционной "мономерной" С18-фазе



Рис. 2. Разложение электронно-колебательных спектров поглощения ликопина (а) и проликопина (б) на составляющие.

(рис. 3). Каротиноиды идентифицировали по их электронным спектрам поглощения с учетом изменения хроматографической подвижности. При этом установлено, что ликопин удерживается существенно сильнее по сравнению с лютеином, что соответствует снижению липофильности аналитов при добавлении гидроксильных групп. Проликопин удерживается сильнее ликопина. На этот факт следует обратить особое внимание. Так, по литературным данным для *транс*-β-каротина и *транс*-ликопина и их моно *цис*-изомеров времена удерживания для "мономерных" обращенных C18-фаз возрастают в ряду [20]: $t_{\rm R}$ (*транс*-ликопин) $< t_{\rm R}$ (9-*цис*-ликопин) $< t_{\rm R}$ (13-*цис*-ликопин) $< t_{\rm R}$ (15-*цис*-ликопин). Для объяснения такого порядка следует учесть, что удерживание *транс*-ликопина по нашим данным уменьшается при замене C18-фазы на фазу с меньшей длиной привитых алкильных групп (C8 и C4), что указывает на внедрение молекул внутрь привитой фазы. По



Рис. 3. Разделение каротиноидов плодов томатов красной (а), розовой (б), оранжевой (в) и желтой (г) окраски. Каротиноиды: *1* – лютеин, *2* – полностью *транс*-ликопин, *3* – проликопин, *4* – β-каротин, *5* – нейроспорин, *6* – пронейроспорин, *7* – ξ-каротин.

ЖУРНАЛ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ том 76 № 2 2021



Рис. 4. Упрощенная схема сорбции полностью *транс*-ликопина (а) и 15-*цис*-ликопина (б) на "мономерной" обращенной С18-фазе.

предложенному ранее варианту строения привитой фазы [21] между алкильными группами привитой фазы могут свободно разместиться алкильные группы аналита нормального строения. Но молекулы большей длины по сравнению с толщиной привитой фазы должны сорбироваться либо горизонтально, либо под углом к поверхности основания, а длина молекулы ликопина примерно вдвое больше толщины привитого С18-слоя. В таком случае очевидно следующее. Во-первых, чем длиннее внедряемая (горизонтально по отношению к привитой фазе) молекула, тем меньше вероятность того, что пустоты между привитыми радикалами выстраиваются в линейный ряд. Погружение молекулы внутрь такой фазы связано с изменением конформации привитых радикалов для создания таких пустот, в таком случае выигрыш энергии при сорбции уменьшается, и время удерживания также должно уменьшиться. Вовторых, возникающие при этом стерические напряжения внутри привитого слоя тем сильнее, чем ближе внедряемая молекула к месту крепления радикала к силикагелевой основе. В случае 15-*цис*-ликопина изгиб молекулы будет способствовать сорбции из-за удаления концов молекулы от силикагелевой основы (рис. 4), что объясняет усиление сорбции аналита. При переходе от 15-*цис*-ликопина к другим изомерам длина одной из частей молекулы (с полностью *транс*-связями) увеличивается, что соответствует относительно меньшему удерживанию.



Рис. 5. 3D хроматограмма каротиноидов плодов томатов оранжевой окраски.

Рост времен удерживания в ряду ликопин – нейроспорин – ξ -каротин (табл. 1), как и дальнейший переход к фитофлуину, является следствием последовательного увеличения липофильности молекул при замене C=C-связи на две метиленовые группы.

Как следует из представленных хроматограмм, томаты красного цвета накапливают в качестве основных каротинов полностью *транс*-ликопин с *цис*-изомерами (около 90%) и β -каротин (немногим более 6%). В томате розового цвета найдены такие же каротины в несколько отличающемся соотношении. В томате желтого цвета на β -каротин приходится около половины от всех каротиноидов, и примерно треть от всех каротиноидов занимает ксантофилл – лютеин.

Наиболее сложным оказывается каротиноидный состав плодов томатов оранжевого цвета: при небольших долях лютеина, *транс*-ликопина, обычных простых *цис*-изомеров и β -каротина основной пик на хроматограмме представлен проликопином (45% от суммы каротиноидов), которому сопутствует группа каротинов, предшествующих проликопину с цепи биосинтеза [14]. То, что небольшому пику ξ -каротина на хроматограмме на рис. Зв соответствует значительная доля (22.4%) среди всех каротиноидов объясняется особенностью детектирования при 440 нм – в области с небольшим поглощением веществ с сильно гипсохромно смещенными полосами. На 3D хроматограмме (рис. 5) заметен и трудно отделяющийся от β -каротина пик фитофлуина (δ), который невозможно обнаружить при обычных длинах волн, используемых при записи хроматограмм каротиноидов. Таким образом, использование площадей пиков без поправочных коэффициентов может привести к очень большим погрешностям в определении долей каротиноидов в сложной смеси, поэтому предложенный способ расчета по уравнению (3) для контроля состава каротиноидов следует считать обязательным.

Для определения уровня накопления каротиноидов в сложных смесях можно предложить подход, комбинирующий спектрофотометрический и хроматографический методы. По предлагаемому методу следует записать электронный спектр смеси каротиноидов и определить оптическую плотность при длине волны, рекомендуемой для определения основного компонента обычно это второй (по энергии) максимум в спектрах индивидуальных каротиноидов, например 472 нм для ликопина. Затем записать хроматограмму с детектированием при той же длине волны и выполнить расчеты как указано в "Экспериментальной части".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Корнеева А.В. Лютеин-зеаксантиновый комплекс: выбор офтальмологов // Российский медицинский журн. Клиническая офтальмология. 2019. Т. 19. С. 54.

- Tan B.L., Norhaizan M.E. Carotenoids: How effective are they to prevent age-related diseases? // Molecules. 2019. V. 24. P. 1801.
- 3. *Olaizola M.* Ch. 13. The production and health benefits of astaxanthin / Marine Nutraceuticals and Functional Foods. 1st. Ed. / Eds. Barrow C., Shahidi F. Boca Raton, London, N.Y.: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2007. P. 322.
- Davinelli S., Nielsen M.E., Scapagnini G. Astaxanthin in skin health, repair, and disease: A comprehensive review // Nutrition. 2018. V. 10. P. 522.
- Story E.N., Kopec R.E., Schwartz S.J., Harris G.K. An update on the health effects of tomato lycopene // Ann. Rev. Food Sci. Technol. 2010. V. 1. P. 189.
- Clinton S.K. Lycopene: Chemistry, biology, and implications for human health and disease // Nutr. Rev. 1998. V. 56. № 2. P. 35.
- 7. Белокурова Е.С., Панкина И.А. Сравнительный анализ концентрированных томатопродуктов на содержание каротиноидов // Техника и технология пищевых производств. 2018. Т. 48. № 2. С. 162.
- Burri B.J., Chapman M.H., Neidlinger T.R., Seo J.S., Ishida B.K. Tangerine tomatoes increase total and tetracis-lycopene isomer concentrations more than red tomatoes in healthy adult humans // Int. J. Food Sci. Nutr. 2009. V. 60(S1). P. 1.
- Unlu N.Z., Bohn T., Francis D. Clinton S.K., Scwartz S.J. Carotenoid absorption in humans consuming tomato sauces obtained from tangerine or high-β-carotene varieties of tomatoes // J. Agric. Food Chem. 2007. V. 55. P. 1597.
- Zechmeister L., Lerosen A.L., Went F.W., Pauling L. Prolycopene, a naturally occurring stereoisomer of lycopene // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1941. V. 27. P. 468.
- Clough J.M., Pattenden G. Stereochemical assignment of prolycopene and other poly-Z-Isomeric carotenoids in fruits of the tangerine tomato *Lycopersicon esculentum* var. "Tangella" // J. Chem. Soc. Perkin Trans. I. 1983. P. 3011.
- 12. Johjima T. Determination of *cis* and *trans* carotenes of tangerine and yellowish tangerine tomatoes by micro-

thin-layer chromatography // J. Japan. Soc. Hort. Sci. 1993. V. 62. P. 567.

- Daood H.G., Bencze G., Palotás G, Pék Z., Sidikov A., Helyes L. HPLC analysis of carotenoids from tomatoes using cross-linked C18 column and MS detection // J. Chromatogr. Sci. 2014. V. 52. P. 985.
- 14. *Isaacson T., Ohad I., Beyer P., Hirschberg J.* Analysis *in vitro* of the enzyme CRTISO establishes a poly-*cis*-carotenoid biosynthesis pathway in plants // Plant Physiol. 2004. V. 136. P. 4246.
- Yoo H.J., Park W.J., Lee G.-M., Oh C.-S., Yeam I., Won D.-C., Kim C.K., Lee J.M. Inferring the genetic determinants of fruit colors in tomato by carotenoid profiling // Molecules. 2017. V. 22. P. 764.
- Hengartner U., Bernhard K., Meyer K., Englert G., Glinz E. Synthesis, isolation, and NMR-spectroscopic characterization of fourteen (Z)-isomers of lycopene and of some acetylenic didehydro- and tetradehydrolycopenes // Helv. Chim. Acta. 1992. V. 75. P. 1848.
- Hirota S., Watanabe K., Arinobu T., Tsuyuki H. Relationship of carotene and xanthophyll production in tomato strains and their progeins // Food Sci. Technol. Int. 1996. V. 2. P. 150.
- Takehara M., Nishimura M., Kuwa T., Inoue Y., Kitamura C., Kumagai T., Honda M. Characterization and thermal isomerization of (all-E)-lycopene // J. Agric. Food Chem. 2014. V. 62. P. 264.
- Amorim A.G.N., Souza J.M.T., Santos R.C., Gullón B., Oliveira A., Santos L.F.A., Virgino A.L.E., Mafud A.C., Petrilli H.M., Mascarenhas Y.P., Delerue-Matos C., Pintado M.E., Leite J.R.S.A. HPLC-DAD, ESI–MS/MS, and NMR of lycopene isolated from P. guajava L. and its biotechnological applications // Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2018. V. 120. № 3. Article 1700330.
- Stah W., Sundquist A.R., Hanusch M., Schwarz W., Sies H. Separation of 13-carotene and lycopene geometrical isomers in biological samples // Clin. Chem. 1993. V. 39. P. 810.
- Дейнека В.И., Нгуен Ань Ван, Дейнека Л.А. Модель привитой обращенной фазы на основе силикагеля // Журн. физ. химии. 2019. Т. 93. № 12. С. 1860.

———— ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ ——

УДК 543

ИЗУЧЕНИЕ МЕТАБОЛИЗМА НОВОГО НООТРОПНОГО ПРЕПАРАТА – УНИФИРАМА МЕТОДОМ УЛЬТРА ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ–МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ

© 2021 г. А. З. Темердашев^{а, *}, М. О. Зорина^а, Е. В. Дмитриева^а, А. А. Азарян^а

^аКубанский государственный университет ул. Ставропольская, 149, Краснодар, 350040 Россия *e-mail: TemerdashevAZ@gmail.com Поступила в редакцию 09.06.2020 г. После доработки 27.06.2020 г. Принята к публикации 17.08.2020 г.

Рассмотрен метаболизм нового ноотропного препарата — унифирама, который предположительно обладает существенно большей активностью по сравнению с пирацетамом и проходит клинические испытания в качестве средства для улучшения памяти, предотвращения болезни Альцгеймера, синдрома дефицита внимания и различных форм деменции. Предложены структуры двух потенциальных метаболитов унифирама. На основе интерпретации полученных масс-спектров ионов-прекурсоров и ионов-продуктов показано применение методологии нецелевого скрининга с использованием ультра высокоэффективной жидкостной хроматографии—масс-спектрометрии высокого разрешения в целях их обнаружения. Установлено, что определение предполагаемых метаболитов унифирама возможно только с применением ферментативного гидролиза, в то время как минеральный гидролиз приводит к полному разрушению как самого унифирама, так и предполагаемых метаболитов. Использование предложенных условий хроматографирования и масс-спектрометрического детектирования делает возможным обнаружение метаболитов унифирама в течение шести дней после однократного употребления 10 мг вещества.

Ключевые слова: ноотропы, УВЭЖХ–МСВР, метаболиты, нецелевой скрининг. **DOI:** 10.31857/S0044450221020134

Унифирам (DM232) (схема 1) относится к новому поколению ноотропов, для которых заявленная эффективность существенно превышает широко распространенный пирацетам [1–5]. Минимальная эффективная доза для унифирама в условиях индуцированной скополамином амнезии составляет всего 0.001 мг/кг [1], в то время как для пирацитама это значение составляет 30 мг/кг.



Схема 1. Структурная формула унифирама.

Помимо влияния унифирама на улучшение памяти, он относится к ряду перспективных препаратов для предотвращения болезни Альцгеймера, синдрома дефицита внимания и различных форм деменции. При проведении реальных испытаний и в клинической практике используют большие дозировки унифирама (0.3–10 мг/кг), в ряде случаев в сочетании с другим перспективным ноотропным препаратом – сунифирамом [2].

Помимо сведений об эффективности препаратов, применяемых для лечения заболеваний центральной нервной системы, а также для улучшения памяти и концентрации внимания, интерес представляет изучение их метаболизма в организме человека.

Среди ноотропов наибольшее распространение и популярность получил пирацетам, который согласно литературным данным практически полностью выводится из организма в нативном виде [6–15]. В отношении унифирама известно, что он выводится в нативном виде частично и имеет очень узкое окно обнаружения [16].

На сегодняшний день данные о потенциальных метаболитах унифирама отсутствуют, что обусловливает актуальность их поиска на основе, в частности, эмпирических и полуэмпирических

1	4	4
---	---	---

Таблица 1. Условия градиентного элюирования

Время, мин	Подвижная фаза А (5 мМ водный раствор формиата аммония с 1% метанола и 0.05% муравьиной кислоты), %	Подвижная фаза В (5 мМ метанольный раствор формиата аммония и 0.05% муравьиной кислоты), %	Скорость потока подвижной фазы, мл/мин
0.0	96.0	4.0	0.20
0.1	96.0	4.0	
1.0	81.7	18.3	
2.5	50.0	50	0.22
14.0	0.1	99.9	0.40
16.0	0.1	99.9	0.48
16.1	96.0	4.0	
19.0	96.0	4.0	
19.1	96.0	4.0	0.20
20.0	96.0	4.0	

данных о метаболизме ксенобиотиков в организме человека [17].

Цель настоящей работы – поиск метаболитов унифирама в моче путем нецелевого скрининга с применением ультра высокоэффективной жид-костной хроматографии-масс-спектрометрии высокого разрешения (УВЭЖХ-МСВР), ферментативного гидролиза и метода "разбавил и вколол".

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объект исследования. В эксперименте участвовал доброволец (возраст 21 год), давший информированное устное согласие после ознакомления с планом и условиями исследования. До употребления унифирама образцы мочи собирали в течение двух дней (утром и вечером), после чего доброволец однократно употреблял 10 мг унифирама. Затем образцы мочи собирали в течение 10 дней (утром и вечером). Обязательными условими при выполнении эксперимента являлись отсутствие заболеваний, требующих употребления медикаментов, минимизация факторов стресса и соблюдение диеты на протяжении эксперимента, что позволяло снизить вариативность данных.

Реактивы и реагенты. Стандартный образец унифирама приобретали у "Shanghai Soyoung Biotech. Inc." (Китай). Метанол "для ВЭЖХ" приобретали у "J.T. Baker" (США). Воду сопротивлением 18.2 МОм см получали с использованием системы Milli-Q Simplicity (Millipore, Франция). Ацетат аммония ч. д. а. и муравьиную кислоту х. ч. для подвижной фазы приобретали у компаний "Вектон" (Россия) и "Acros Organics" (США) соответственно. Гидролиз проб проводили с использованием глюкуронидазы *Е. Coli* и *Н. Ротаtia*, приобретенными у компаний "Roche" (Германия) и "Sigma-Aldrich" (США), для минерального гидролиза применяли соляную кислоту х. ч. (Вектон, Россия).

Условия УВЭЖХ-МСВР-анализа. Для поиска вероятных метаболитов использовали квадруполь-времяпролетный масс-спектрометр Bruker MaXis Impact, оснащенный источником электрораспылительной ионизации, соединенный УВЭЖХ-системой Bruker Elute под управлением обеспечения Bruker программного Compass HyStar 4.1. Полученные данные анализировали с использованием программного обеспечения Bruker Data Analysis 4.4. Для хроматографического разделения применяли аналитическую колонку Bruker Intensity Solo-2 C_{18} (75 × 2.1 мм, 2.6 мкм), термостатируемую при 40°С и оснащенную предохранительной колонкой с идентичным сорбентом. Условия масс-спектрометрического детектирования и градиентного элюирования приведены в табл. 1, 2.

Подготовленные к анализу образцы термостатировали в автоматическом дозаторе при 5°С.

Пробоподготовка. Подготовку проб к анализу проводили путем простого разбавления проб, а также ферментативного и минерального гидролиза, используя ферменты E. coli и H. pomatia. Известно, что после ферментативного гидролиза с использованием E. coli происходит деконъюгация исключительно глюкуронидов, в то время как применение *H. pomatia* позволяет деконъюгировать как глюкурониды, так и сульфаты благодаря наличию арилсульфатазы, однако эффективность фермента сильно зависит не только от температуры инкубации проб после его добавления, но и от значения рН образца. Так, оптимальное значение pH для фермента E. coli лежит в диапазоне 6.5-6.8, в то время как наибольшая активность H. pomatia достигается при pH 4.5. В обоих случаях для поддержания необходимого значения

Параметр	Значение
Источник ионизации	Электрораспылительная ионизация
Полярность	Положительная
Напряжение на капилляре, В	3500
Напряжение на экстрагирующей линзе, В	400
Температура источника ионизации, °С	200
Давление газа-распылителя, МПа	0.2
Расход газа-осушителя, л/мин	8
Диапазон сканирования масс, Да	140–600
Скорость сканирования, Гц	2
Газ-мишень	Азот
Давление газа-мишени, мТорр	1.5
Энергия соударительной диссоциации, эВ	20

Таблица 2	2.	Условия	детектирования	унифирама и его	потенциальных	метаболитов
			~r	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		

рН используют буферные растворы — фосфатный и ацетатный соответственно. Для реализации этого подхода к аликвоте пробы мочи объемом 3 мл добавляли 1 мл буферного раствора и 30 мкл фермента, тщательно перемешивали, после чего инкубировали при 50°С в течение 1 ч, охлаждали до комнатной температуры, отбирали 1 мл гидролизата и центрифугировали в течение 10 мин в пробирке типа Эппендорф емк. 1.5 мл при 10000 об/мин, после чего супернатант переносили в стеклянные виалы для последующего анализа.

Минеральный гидролиз позволяет разрушать практически все возможные виды конъюгатов, что является его несомненным преимуществом, однако ферментативные способы являются гораздо более мягкими и щадящими как по отношению к образцу, так и к прибору (при дальнейшем анализе полученных проб). Минеральный гидролиз проводили следующим образом: аликвоту мочи объемом 3 мл помещали в стеклянную пробирку с завинчивающейся крышкой, добавляли 500 мкл конц. HCl, герметично закрывали, перемешивали, после чего инкубировали при 80°С в течение 1 ч, затем отбирали 1.5 мл гидролизата, переносили в пробирку типа Эппендорф через воронку, заполненную гидрокарбонатом натрия (для нейтрализации кислоты), и центрифугировали в течение 10 мин при 10000 об/мин с последующим переносом супернатанта в стеклянную виалу для анализа.

Для разбавления проб использовали смесь 0.1%-ный раствор муравьиной кислоты в воде ацетонитрил (50 : 50, v/v) следующим образом: 200 мкл пробы мочи помещали в пробирку типа Эппендорф и добавляли 800 мкл разбавителя, перемешивали на вортексе в течение 1 мин, после чего центрифугировали в течение 10 мин при 10000 об/мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Учитывая среднюю полярность унифирама, применение обращено-фазовой УВЭЖХ является оптимальным решением. Кроме того, исходя из структуры нативного вещества и базируясь на известных особенностях протекания метаболизма в организме человека, можно предположить структуры некоторых метаболитов (рис. 1).

Наши предположения о структурах метаболитов основаны как на описанных в работе [17] закономерностях протекания основных стадий метаболизма ксенобиотиков, так и на расчетах с применением программно-аппаратных комплексов, таких как MetWorks (Thermo Scientific) [18] и GLORY (Hamburg University) [19]. Следует отметить, что, несмотря на постоянное совершенствование подобных программных продуктов, их точность по-прежнему остается относительно невысокой. Кроме того, описанные выше подходы зачастую позволяют сделать предположение лишь о наиболее очевидных метаболитах. В связи с этим применение метода in vitro по-прежнему остается наиболее надежным способом решения подобных задач. Тем не менее применение программных продуктов для прогнозирования путей метаболизма представляет интерес из-за отсутствия в ряде случаев возможности проведения экспериментов с использованием клеточных культур. Однако такой подход требует ряда дополнительных предосторожностей для снижения риска возникновения ложноположительного результата. Срели них – требования к отсутствию пиков эндогенных соединений с близкими к предполагаемым метаболитам значениями параметров удерживания, а также минимизация погрешности определения масс (менее 5 ррт для режима сканирования ионов-прекурсоров и не более 10 ррт в режиме сканирования ионов-продуктов). Дополнительным и немаловажным способом проверки корректности



Рис. 1. Теоретически возможные пути метаболизма унифирама.

первичных выводов является также оценка изотопного распределения, особенно для таких соединений, как унифирам, имеющих несколько разных гетероатомов в исходной структуре.

Исходя из описанных выше соображений, пробы мочи анализировали до и после употребления унифирама с использованием нескольких режимов сканирования: автоматического выбора ионов-прекурсоров с последующим получением спектра ионов продуктов (auto MS/MS), сканирования полного спектра ионов-прекурсоров (full MS), а также с применением режима широкополосного пропускания ионов с последующей соударительной диссоциацией (bbCID) с привлечением библиотек Target Screener, содержащих спектры ряда ксенобиотиков и их метаболитов и пестицидов для минимизации возникновения ложноположительных результатов. После анализа хроматограмм (рис. 2) с применением описанных выше критериев удалось выделить два потенциальных метаболита унифирама (рис. 3). Анализируя полученные ионы-прекурсоры и соответствующие им ионы-продукты, можно сделать вывод о том, что образование дефтордигидроксилированного метаболита (М1) происходит указанным на рис. 3 путем, а не за счет замещения атома фтора на гидроксильную группу, о чем свидетельствует наблюдаемая фрагментация (рис. 4, 5). Положение гидроксильных групп в приведенной схеме фрагментации является допущением и приведено в целях удобства расчета масс.

Исходя из точной массы второго потенциального метаболита и закономерностей протекания метаболизма ксенобиотиков можно сделать вывод о том, что это моногидроксилированный метаболит или сформировавшийся в результате деалкилирования и карбонилирования метаболит.



Рис. 2. Хроматограмма образца мочи (четвертый день после употребления унифирама), содержащего предполагаемые метаболиты, по выделенным протонированным молекулярным ионам (M1 – *m/z* 313.0853, M2 – *m/z* 315.0809).

В пользу последнего варианта свидетельствует наблюдаемая фрагментация (рис. 6, 7).

Все предположения базируются на соотнесении наблюдаемых и теоретических масс и их изотопного распределения (табл. 3).

Полученные результаты справедливы в отношении проб после ферментативного гидролиза. Образцы, подвергшиеся минеральному гидролизу, исключили из рассмотрения ввиду их деградации в процессе инкубирования с соляной кислотой, вероятно, приводившей к разрушению аналитов. В ряде случаев не представлялось возможным обнаружить даже стероидные гормоны, также склонные к деградации в условиях высокотемпературного и продолжительного минерального гидролиза.

К сожалению, зачастую применение массспектрометрии не позволяет установить точное положение заместителя (в частности, гидроксильной группы), а достоверное подтверждение возможно исключительно лишь после препаративного выделения предполагаемых метаболитов в достаточных количествах с дальнейшим описанием методами ЯМР- и ИК-спектроскопии (помимо масс-спектрометрии) или путем встречного синтеза предполагаемых метаболитов и сопоставления их параметров удерживания и масс-спектральных характеристик с наблюдаемыми в образце.

Методология нецелевого поиска метаболитов в данном случае построена на постепенном увеличении элюирующей силы подвижной фазы при использовании хроматографического разделения с быстрой регистрацией спектра ионов-прекурсоров и ионов-продуктов. Для повышения экспрессности анализа, а также уменьшения ширины хроматографических пиков помимо градиента по составу подвижной фазы (**ПФ**) возможно также изменение скорости ее подачи. Подобная плавная развертка градиента позволяет уменьшить количество коэлюирующихся соединений и обеспечить лучшую работу масс-спектрометра в целях нецелевого поиска соединений ввиду меньшего гашения ионизации, для чего в случае массспектрометрии высокого разрешения оптимальным выбором является режим auto MS/MS. В случае применения этого режима особое внимание следует уделить критериям выбора ионовпрекурсоров и условиям их динамического исключения. Для проведения экспериментов в рамках поставленной нами задачи было принято решение использовать семь наиболее интенсивных ионов-прекурсоров с их динамическим исключением после трех циклов сканирования и возможностью повторного сканирования при выполнении одного или всех следующих условий: интенсивность иона возрастает до 1 млн имп/с или по прошествии 30 с после последнего сканирования



Рис. 3. Предполагаемые метаболиты унифирама.



Рис. 4. Масс-спектр ионов-продуктов, полученный для предполагаемого метаболита унифирама М1.



Рис. 5. Предлагаемая интерпретация зарегистрированного масс-спектра вероятного метаболита унифирама M1 (TM – теоретическая масса, HM – наблюдаемая масса, OOM – ошибка определения массы).

данного иона. Весь цикл сканирования ионовпродуктов и ионов-прекурсоров осуществлялся за 2 с, что при оптимизации метода на быстрое разделение могло бы привести к возникновению ложноотрицательных результатов из-за низкой скорости сканирования, в то время как ее существенное повышение привело бы к значительному падению интенсивности сигналов. Применение режима сканирования full MS, в свою очередь, часто позволяет добиться максимальной чувствительности для QTOF-систем (ввиду отсутствия потерь в процессе соударительной ионизации), что немаловажно при оценке временных окон обнаружения потенциальных метаболитов после употребления нативного вещества после подтверждения их структуры.



Рис. 6. Масс-спектр ионов-продуктов, полученный для предполагаемого метаболита унифирама М2.



Рис. 7. Предлагаемая интерпретация зарегистрированного масс-спектра вероятного метаболита унифирама M2 (TM – теоретическая масса, HM – наблюдаемая масса, OOM – ошибка определения массы).

В то же время градиент по скорости подачи подвижной фазы может негативно сказаться на чувствительности анализа, поскольку параметры температуры источника ионизации, напряжения на капилляре и расхода газов на распыление и осушение напрямую зависят от скорости ее потока. При оптимизации условий качественного и количественного анализа уточнение окон обнаружения, как правило, проводят рутинным для лаборатории методом. В предложенных нами условиях определение нативного унифирама в моче возможно в течение до трех суток с момента

Компонент	Элементная композиция	Теоретическая масса протонированного иона, <i>m/z</i>	Наблюдаемая масса протонированного иона, <i>m/z</i>	Ошибка определения массы, ppm	Время удерживания, мин
Унифирам	C ₁₃ H ₁₅ FN ₂ O ₃ S	299.0860	299.0865	-1.67	5.23
M1	$C_{13}H_{16}N_2O_5S$	313.0853	313.0854	-0.32	3.65
M2	$C_{13}H_{15}FN_2O_4S$	315.0809	315.0805	1.27	4.82

Таблица 3. Теоретические и наблюдаемые массы унифирама и предполагаемых метаболитов, полученные с применением УВЭЖХ—МСВР с электрораспылительной ионизацией в режиме регистрации положительных ионов

его однократного употребления с использованием процедуры разбавления проб мочи. Обнаружение M2 возможно с третьих по пятые сутки, M1 с третьего по шестой день после применения ферментативного гидролиза.

Исследования проводили при поддержке проектов Госзадания Минобрнауки РФ (проект FZEN-2020-0022) и РФФИ, проект № 19-43-230004 р_а, с участием специалистов ЦКП "Эколого-аналитический центр" Кубанского государственного университета, уникальный идентификатор центра RFMEFI59317X0008.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Guandalini L., Martino M.V., Di Cesare Mannelli L., Bartolucci G., Melani F., Malik R., Dei S., Floriddia E., Manetti D., Orlandi F., Teodori E., Ghelardini C., Romanelli M.N. Substituted piperazines as nootropic agents: 2- or 3-phenyl derivatives structurally related to the cognition-enhancer DM235 // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2015. V. 25. № 8. P. 1700.
- Martini E., Norcini M., Ghelardini C., Manetti D., Dei S., Guandalini L., Melchiorre M., Pagella S., Scapecchi S., Teodori E., Romanelli M.N. Design, synthesis and preliminary pharmacological evaluation of new analogues of DM232 (unifiram) and DM235 (sunifiram) as cognition modulators // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2008. V. 16. № 23. P. 10034.
- Martino M.V., Guandalini L., Di Cesare Mannelli L., Menicatti M., Bartolucci G., Dei S., Manetti D., Teodori E., Ghelardini C., Romanelli M.N. Piperazines as nootropic agents: new derivatives of the potent cognition-enhancer DM235 carrying hydrophilic substituents // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2017. V. 25. № 6. P. 1795.
- Mondadori C., Ducret T., Häusler A. Elevated corticosteroid levels block the memory-improving effects of nootropics and cholinomimetics // Psychopharmacology. 1992. V. 108. № 1–2. P. 11.
- Galeotti N., Ghelardini C., Pittaluga A., Pugliese A.M., Bartolini A., Manetti D., Romanelli M.N., Gualtieri F. AMPA-receptor activation is involved in the antiamnesic effect of DM232 (unifiram) and DM235 (sunifiram) // Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 2003. V. 368. № 6. P. 538.
- 6. *Mondadori C*. In search of the mechanism of action of the nootropics: new insights and potential clinical implications // Life Sci. 1994. V. 55. № 25–26. P. 2171.

- Malik R., Gupta R., Srivastava S., Choudhary B.S. Design, synthesis and biological evaluation of selected 3-[3-(amino) propoxy] benzenamines as acetylcholinesterase inhibitors // J. Biomol. Struct. Dyn. 2016. V. 35. № 11. P. 2382.
- 8. *Giurgea C., Salama M.* Nootropic drugs // Prog. Neuro-Psychopharm. 1977. V. 1. № 3-4. P. 235.
- Gouliaev A.H., Senning A. Piracetam and other structurally related nootropics // Brain Res. Rev. 1994. V. 19. № 2. P. 180.
- Schindler U. Pre-clinical evaluation of cognition enhancing drugs // Prog. Neuro-Psychopharm. Biol. Psychiatry. 1989. V. 13. P. S99.
- 11. Romanelli M.N., Galeotti N., Ghelardini C., Manetti D., Martini E., Gualtieri F. Pharmacological characterization of DM232 (unifiram) and DM235 (sunifiram), new potent cognition enhancers // CNS Drug Rev. 2006. V. 12. № 1. P. 39.
- Mondadori C., Petschke F., Häusler A. The effects of nootropics on memory: New aspects for basic research // Pharmacopsychiatry. 1989. V. 22. P. 102.
- Mondadori C. The pharmacology of the nootropics; New insights and new questions // Behav. Brain Res. 1993. V. 59. № 1–2. P. 1.
- 14. *Malik R., Sangwan A., Saihgal R., Jindal D. P., Piplani P.* Towards better brain management: Nootropics // Curr. Med. Chem. 2007. V. 14. № 2. P. 123.
- Gualtieri F. Unifi nootropics from the lab to the web: A story of academic (and industrial) shortcomings // J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 2015. V. 31. № 2. P. 187.
- 16. Дмитриева Е.В., Темердашев А.З., Азарян А.А., Гашимова Э.М. Применение УВЭЖХ-МС/МС для определения в моче некоторых анаболических агентов и ноотропов // Аналитика и контроль. 2018. Т. 22. № 1. С. 28.
- 17. *Peters F.T., Meyer M.R.* In vitro approaches to studying the metabolism of new psychoactive compounds // Drug Test. Anal. 2011. V. 3. № 7–8. P. 483.
- Wank J., Wagner-Redeker W., Taylor A., Herbold R., Lassahn Paul-Gerhard. High-resolution, accurate mass measurements and metabolite identification: an automated approach using fragment prediction in combination with fragment ion search (FISh) / Thermo Fisher Scientific Application. Note 537, 2016. P. 1.
- De Bruyn Kops C., Stork C., Šícho M., Kochev N., Svozil D., Jeliazkova N., Kirchmair J. GLORY: Generator of the structures of likely cytochrome P450 metabolites based on predicted sites of metabolism // Front Chem. 2019. V. 7. № 402. P. 1.

—— ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ ——

УДК 543.544.5.068.7+632.954

ОПТИМИЗАЦИЯ СОВОКУПНОСТИ ПРОЦЕДУР И УСЛОВИЙ ОДНОВРЕМЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМИКАРБАЗОНА И ЕГО МЕТАБОЛИТОВ В ОБЪЕКТАХ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ И РАСТИТЕЛЬНЫХ МАТРИЦАХ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С УФ-ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

© 2021 г. Т. Д. Черменская^{а, *}, Е. Ю. Алексеев^а

^аВсероссийский научно-исследовательский институт защиты растений июссе Подбельского, 3, Санкт-Петербург-Пушкин, 196608 Россия *e-mail: tchermenskaya@yandex.ru Поступила в редакцию 13.07.2020 г. После доработки 05.08.2020 г. Принята к публикации 18.08.2020 г.

Показана возможность определения амикарбазона и его двух метаболитов в одной анализируемой пробе методом ВЭЖХ с УФ-детектированием в воде, почве, зерне, масле и зеленой массе кукурузы. Установлено, что после извлечения аналитов из образцов ацетонитрилом и очистки способом твердофазной экстракции при использовании комбинации сорбентов C18EC и активированного угля и патрона Диапак С степень извлечения всех аналитов составляет 81–90% с погрешностью 1.1–2.5%. Предел количественного определения 0.05 мг/кг. Для извлечения веществ из образцов воды использовали патроны для твердофазной экстракции Диапак С16. Разработанная методика применима для определения амикарбазона и его метаболитов в объектах окружающей среды и сельскохозяйственной продукции.

Ключевые слова: амикарбазон, триазолины, метаболиты, ВЭЖХ, УФ-детектор, QuEChERS, объекты окружающей среды, кукуруза.

DOI: 10.31857/S0044450221020031

Ежегодно на рынке средств защиты растений появляются препараты на основе новых действующих веществ, способных к проявлению пестицидной активности. Однако каким бы привлекательными ни был препарат в плане биологической эффективности, он должен соответствовать требованиям экотоксикологической безопасности. По этой причине изучение и определение остаточных количеств пестицидов в продукции растениеводства и объектах окружающей среды имеет важное значение при разработке и внедрении новых средств защиты растений [1]. Безопасными для здоровья потребителя принято считать продукты, которые или не содержат токсических веществ, или содержат их в количествах, допустимых санитарными нормами и гигиеническими нормативами.

Амикарбазон является селективным гербицидом, который действует путем ингибирования фотосинтеза. Он используется для предпосевной, предвсходовой или послевсходовой обработки кукурузы в поле для избирательного контроля широколиственных сорняков [2]. Амикарбазон — это триазолиноновый гербицид, разработанный для замены атразина на мировом рынке. Впервые зарегистрирован Агентством по охране окружающей среды США (ЕРА) в 2005 году. Входит в состав препаратов Amitron 700WG, содержащий 700 г/кг амикарбазона, Amicarbazone DF, Xonerate и Dinamic 70% (США). US EPA установлены максимально допустимые уровни (МДУ) содержания амикарбизона в кукурузе (кукуруза (фураж) – 0.80 мг/кг, зерне – 0.05 мг/кг, соломе – 1.0 мг/кг [3]. В России препарат с действующим веществом амикарбазон в настоящее время проходит регистрационные испытания и МДУ пока не установлены.

Амикарбазон является умеренно стойким в аэробной почве, он устойчив к прямому фотолизу, гидролизу и анаэробному водному метаболизму [4, 5]. При лабораторных и полевых исследованиях идентифицированы три основных метаболита амикарбазона (**AM3**), образующихся в почве – дезамино амикарбазон (**ДА**), N-метил-дезамино амикарбазон и декарбоксамид, также обладающие высокой мобильностью. Показано, что быстрее всех в почве разлагается AM3 и с наименьшей скоростью ДА. Дезамино амикарбазон также образуется в водных системах в результате непрямого фотолиза. В растениях основными метаболитами амикарбазона считаются дезамино амикарбазон и изопропил-2-гидрокси-дезамино амикарбазон (изопр-2-OH-ДА) [6, 7].

Первые способы выделения амикарбазона и метаболитов из сои предусматривали экстракцию либо водой, либо 0.05%-ной H_3PO_4 , либо смесью ацетонитрил—0.1%-ная уксусная кислота (4 : 1) при 150°С под давлением 1500 рзі в присутствии оксида алюминия с последующими очисткой на катриджах для твердофазной экстракции (**ТФЭ**) и определением методом ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием (предел определения 0.01 ррт, полнота извлечения 85–97% с погрешностью 2–6%) [2].

В настоящее время возможно одновременное определение AM3, ДА и изопр-2-OH-ДА в почве [6, 8], а также в зерне (рис, пшеница, гречка), соевых бобах, кукурузе с применением метода ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием [9, 10].

Описана методика анализа готовых форм препаратов, содержащих в качестве действующего вещества амикарбазон, методом ВЭЖХ с УФ-детектированием (ВЭЖХ-УФ) [11–13].

Сведения об использовании метода ВЭЖХ-УФ для одновременного определения амикарбазона, дезамино амикарбазона и изопропил-2-ОН-дезамино амикарбазона в объектах окружающей среды и растительных матрицах в литературе отсутствуют.

Данное исследование посвящено созданию более доступного для широкого использования способа одновременного определения амикарбазона и его метаболитов в объектах окружающей среды и растительных матрицах с применением ВЭЖХ-УФ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты и материалы. Стандартные растворы амикарбазона и его метаболитов готовили из аналитических стандартов с чистотой 99.6% (амикарбазон); 99.6% (дезамино амикарбазон); 99.9% (изопропил-2-гидрокси-дезамино амикарбазон) (Arysta Lifescience, Япония).

Для выделения определяемых веществ применяли ацетонитрил (сорт 5), гексан сорт 3 (Криохром, Россия), дихлорметан х. ч., ацетон ос. ч., метанол х. ч., этилацетат х. ч., NaCl ч. д. а., Na₂SO₄ безводный ч. д. а. (Вектон, Россия), NaOH х. ч. (Реахим, Россия), MgSO₄ безводный 97%, натрий цитрат двузамещенный сесквигидрат 99%, натрий цитрат трехзамещенный дигидрат 98% (Sigma-Aldrich, США).

Для очистки экстрактов использовали сорбенты на основе силикагеля с привитыми эндкепированными октадецильными группами (С18Е) и с привитыми пропиламинными группами (CH₂)₃NH₂ (PSA) (Agilent Technologies, CШA), флорисил 60-100 меш (Sigma-Aldrich, США), оксид алюминия, нейтральный по Брокманну II (Reanal, Венгрия), силикагель 60 (40-63 мкм) (Merck, Германия), уголь активированный (0.5-1.5 мм) (Вектон, Россия) и патроны для ТФЭ – Диапак С16 (гидрофобный сорбент с привитыми гексадецильными группами, 3 мл, 63-200 мкм, 100 Å), Диапак С (гидрофильный слабокислотный сорбент с постоянной активностью, 3 мл, 40-63 мкм, 60 Å) и Диапак Амин (слабоосновный анионообменник с привитыми аминогруппами, 3 мл, 63–200 мкм, 100 Å) (БиоХимМак СТ, Россия).

Для приготовления подвижной фазы использовали ацетонитрил (сорт 0, Криохром, Россия), воду (бидистиллированную, деионизированную), кислоту ортофосфорную х. ч. (Вектон, Россия).

Аппаратура. Применяли высокоэффективный жидкостный хроматограф Alliance с УФ-детектором, хроматографическую колонку Sun Fire C18 (250 × 4.6 мм, 5.0 мкм) (Waters, CША); аппарат для встряхивания Multi Reax (Heidolph, Германия); центрифугу 5810 (Eppendorf AG, Германия); ротационный вакуумный испаритель R-205 (Buchi, Швейцария), вакуумный манипулятор для работы с патронами для твердофазной экстракции (Waters, CША) с мембранным насосом V-850 (Buchi, Швейцария).

Приготовление стандартных растворов. Исходный стандартный раствор амикарбазона и метаболитов с концентрацией 0.5 мг/мл готовили растворением аналитических стандартов амикарбазона, дезамино амикарбазона и изопропил-2-гидроксидезамино амикарбазона по 50.0 ± 0.5 мг в ацетонитриле в мерной колбе емк. 100 мл. Градуировочные растворы с концентрациями 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 и 1.0 мкг/мл готовили последовательным разбавлением, используя подвижную фазу. Градуировочную кривую строили по серии стандартных растворов, содержащих от 0.05 до 1.0 мкг/мл амикарбазона и метаболитов в подвижной фазе.

Условия определения амикарбазона и метаболитов методом ВЭЖХ-УФ. Подвижная фаза — смесь ацетонитрила и 0.005 М H_3PO_4 (40 : 60). Скорость потока элюента 1.0 мл/мин, рабочая температура колонки 25°С, рабочая длина волны 220 нм, объем вводимой пробы 20 мкл.

В методе ВЭЖХ-УФ использовали метод абсолютной градуировки. На каждом из 5 уровней концентраций амикарбазона и метаболитов в диапазоне 0.05-1.0 мкг/мл проводили по 3 измерения. Градуировочные графики были линейны с коэффициентами корреляции (R^2) 0.999538 (амикарбазон), 0.999490 (дезамино амикарбазон) и 0.999553 (изопропил-2-гидрокси-дезамино амикарбазон). Степень извлечения амикарбазона и его метаболитов определяли на четырех уровнях концентраций в пяти повторностях.

Пробоподготовка. Для выделения амикарбазона и метаболитов из воды образец воды (50 мл) вносили на патрон Диапак С16, предварительно промытый 2.5 мл ацетонитрила, затем 3 мл воды. Патрон с нанесенным образцом промывали 5 мл смеси ацетонитрил—вода (1:9, по объему), элюировали аналиты 6 мл смеси ацетонитрил—вода (2:1, по объему). Элюат упаривали досуха при температуре не выше 40°С, сухой остаток растворяли в 1 мл подвижной фазы и 20 мкл вводили в хроматограф.

Для выделения амикарбазона и метаболитов из почвы к образцу почвы (10 г), помещенному в полипропиленовую центрифужную пробирку емк. 50 мл, добавляли в качестве экстрагента 20 мл ацетона. Продолжительность экстракции с помощью аппарата для встряхивания составляла 10 мин с последующим центрифугированием в течение 10 мин при 4000 об/мин. Из экстракта отбирали аликвоту 4 мл, соответствующую 2 г почвы, которую упаривали при температуре бани не выше 40°С. Сухой остаток растворяли в 1 мл подвижной фазы и 20 мкл пробы вводили в хроматограф.

Для выделения амикарбазона и его метаболитов из зерна и масла кукурузы к 10 г образца анализируемого материала (измельченных зерна или зеленой массы) или масла в полипропиленовой центрифужной пробирке емк. 50 мл последовательно добавляли 10 мл ацетонитрила, 4 г безводного сульфата магния, 1 г хлорида натрия, 1 г цитрата натрия (трехзамещенный дигидрат) и 0.5 г цитрата натрия (двузамещенный сесквигидрат). К образцам зерна дополнительно добавляли 7 мл воды, к образцам масла – 3 мл воды. Экстракцию проводили с помощью аппарата для встряхивания в течение 10 мин с последующим центрифугированием в течение 10 мин при 4000 об/мин.

Для очистки экстракта 5 мл верхнего ацетонитрильного слоя переносили в центрифужную пробирку емк. 15 мл, содержащую 125 мг активированного угля, 250 мг сорбента С18Е и 750 мг безводного сульфата магния. Содержимое пробирки встряхивали в течение 10 мин, затем центрифугировали в течение 10 мин при 4000 об/мин. 2 мл экстракта (из верхнего ацетонитрильного слоя) упаривали досуха при температуре бани не выше 40°С. Сухой остаток растворяли в 1 мл подвижной фазы и подготовленную пробу (20 мкл) вводили в хроматограф.

Выделение амикарбазона и его метаболитов из зеленой массы осуществляли описанным выше способом, но сухой остаток, полученный после очистки экстракта с помощью активированного угля и сорбента С18Е, дополнительно очищали на патронах Диапак С. Для этого его растворяли в 1 мл смеси гексан-этилацетат (1 : 1, по объему), наносили на патрон, предварительно промытый 2 мл метанола, 2.5 мл этилацетата и затем 3 мл смеси гексан-этилацетат (1:1, по объему). Колбу ополаскивали еще 1 мл смеси гексан-этилацетат (1:1, по объему) и также наносили на патрон. Патрон с нанесенным образцом промывали 5 мл смеси гексан-этилацетат (1:1, по объему). Амикарбазон и метаболиты элюировали 5 мл этилацетата и 6 мл смеси этилацетат-метанол (1 : 1, по объему), элюаты объединяли и упаривали досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре бани не более 40°С. Сухой остаток растворяли в 1 мл подвижной фазы и 20 мкл пробы вводили в хроматограф.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При разработке способа определения амикарбазона и его двух метаболитов одновременно в одной анализируемой пробе методом ВЭЖХ-УФ необходимо было установить оптимальные условия хроматографирования и идентификации аналитов, их экстракции и очистки, обеспечивающие максимальную степень извлечения для каждого из веществ из объектов окружающей среды и растений.

Условия определения амикарбазона, дезамино амикарбазона и изопропил-2-OH-дезамино амикарбазона методом ВЭЖХ-УФ. При оптимизации условий хроматографирования и идентификации амикарбазона и его двух метаболитов с целью обеспечения максимальной чувствительности и хорошего разделения всех трех компонентов варьировали длину волны, тип колонки и соотношение компонентов подвижной фазы.

Для решения задачи совместного определения трех веществ в одной пробе в первую очередь необходимо определить длину волны, обеспечивающую наибольшую чувствительность при определении всех трех соединений. В УФ-спектре поглощения аналитических стандартов AM3, ДА и изопр-2-ОН-ДА имеется только один максимум при 219.7 нм. При использовании ультраэффективного хроматографа с диодной матрицей и колонкой с фазой C18 (50 × 2.1 мм, 1.7 мкм) разделить аналиты не получилось. На данной колонке АМЗ и изопр-2-ОН-ДА выходят практически в мертвом объеме. Изменение соотношения ацетонитрила и 0.005 М H₃PO₄ с 60 : 40 на 40 : 60 приводит к увеличению времени удерживания с 0.72 мин до 1.05 мин для AM3 и с 0.63 мин до 0.76 мин для изопр-2-ОН-ДА соответственно, но пики деформируются.

Хорошее разделение АМЗ, ДА и изопр-2-ОН-ДА достигнуто при использовании высокоэффектив-



Рис. 1. Хроматограмма стандартного раствора амикарбазона и его метаболитов (по 50 нг/мл).

ного жидкостного хроматографа Alliance с давлением, не превышающим 4000 psi, и колонкой C18 длиной 250 мм при составе подвижной фазы 40% ацетонитрила и 60% 0.005 М H_3PO_4 . При длине волны 220 нм нижняя граница определяемых содержаний составила 0.05 мкг/мл (рис. 1).

Отметим, что в известных методиках нижняя граница определяемых содержаний амикарбазона методом ВЭЖХ-УФ при длинах волн 270 нм [11], 230 нм [12] и 223 нм [13] при соотношении компонентов подвижной фазы 60% ацетонитрила и 40% воды составляет 0.2–0.3 мкг/мл.

Выделение амикарбазона, дезамино амикарбазона и изопропил-2-OH-дезамино амикарбазона из воды. Амикарбазон и его метаболиты относятся к триазолинонам (табл. 1). Амикарбазон достаточно хорошо растворяется в воде, лучше всего — в ацетоне, ацетонитриле и дихлорметане — более 250 ppm, в этилацетате — 140 ppm, неплохо растворяется в спиртах, практически нерастворим в гексане — 0.07 ppm. Метаболиты слабо растворимы в диметилсульфоксиде и метаноле [2, 4].

Исходя из химических свойств амикарбазона и его метаболитов, для их извлечения из воды опробованы экстракцию органическими растворителями, в том числе из проб воды с разными значениями рН, и ТФЭ на патроне Диапак С16 (табл. 2). Как видно, экстракция органическим растворителем не обеспечивает достаточной степени извлечения каждого из аналитов при их сов-

Название	Структурная формула	Молекулярная масса и брутто-формула
Амикарбазон (AM3)	$H_{3}C \xrightarrow{O} H_{3}C \xrightarrow{H} N^{-}N \xrightarrow{CH_{3}} H_{3}C \xrightarrow{H} O \xrightarrow{V} O \xrightarrow{V} O \xrightarrow{H} O \xrightarrow{V} O \longrightarrow{V} O \xrightarrow{V} O \to{V} O \xrightarrow{V} O \to{V} O \xrightarrow{V} O \xrightarrow$	M = 241.3 $C_{10}H_{19}N_5O_2$
Дезамино амикарбазон (ДА)	$H_{3}C \xrightarrow{O} H_{3}C \xrightarrow{H_{3}C} N^{-N} \xrightarrow{H_{3}C} H_{0} \xrightarrow{H_{0}} \xrightarrow{N-N} \xrightarrow{CH_{3}} H_{C}H_{3}$	M = 226.3 $C_{10}H_{18}N_4O_2$
Изопропил-2-гидрокси- дезамино амикарбазон (изопр-2-ОН-ДА)	$H_{3}C \xrightarrow{O} H_{3}C \xrightarrow{H_{3}C} N^{-N} \xrightarrow{N-N} H_{3}C \xrightarrow{H_{3}C} N^{-N} \xrightarrow{CH_{3}} H_{1}CH_{3}$	M = 242.3 $C_{10}H_{18}N_4O_3$

Таблица 1. Основные характеристики амикарбазона и его метаболитов

Экстрагент		Степень извлечения, %				
		AM3	ДА	изопр-2-ОН-ДА		
Дихлорметан		79.4	100	19.3		
Этилацетат при	pH 3	66.7	100	61.0		
	pH 7	58.4	83.3	63.1		
	pH 9	34.3	45.0	10.0		

Таблица 2. Экстракция амикарбазона, дезамино амикарбазона и изопропил-2-гидрокси-дезамино амикарбазона (0.5 мкг) из воды (50 мл)

местном выделении. Максимальная степень извлечения всех определяемых веществ (90–100%) достигнута при ТФЭ на патроне Диапак С16. Так как вещества элюировались последовательно при разных соотношениях ацетонитрила и воды в подвижной фазе с уменьшением ее полярности, элюат состава ацетонитрил—вода (2 : 1) в достаточном количестве позволил извлечь все три компонента (рис. 2).

Выделение амикарбазона, дезамино амикарбазона и изопропил-2-OH-дезамино амикарбазона из почвы. При подготовке проб почвы для количественного анализа исследовали экстракцию органическими растворителями, повторную экстракцию из водных остатков при разных значениях рН и метод QuEChERS, включающий экстракцию и очистку на сорбенте (табл. 3).

При использовании в качестве экстрагента метанола получили отрицательные результаты (степень извлечения менее 1%). Наиболее подходящим экстрагентом оказался ацетон, использование которого позволило не только извлечь амикарбазон и метаболиты из почвы с хорошим выходом (75– 85%), но и анализировать полученный экстракт без дополнительной очистки. Увеличение количества экстрагента (ацетона) позволило увеличить степени извлечения до 80–89% в зависимости от соединения (рис. 3). Высокие степени извлечения АМЗ и ДА (88.1 и 93.5% соответственно) достигнуты при экстракции из образцов почвы смесью метанол—5%-ная уксусная кислота при нагревании до 100°С и давлении 1500 psi в течение 10 мин [6] и при экстракции АМЗ, ДА и изопр-2-ОН-ДА из почвы (84— 96%), с помощью модифицированного метода QuEChERS [4]. В обоих случаях использовали хроматографию с масс-спектрометрическим детектором, что обеспечило низкий предел количественного определения 0.01 мг/кг.

Выделение амикарбазона, дезамино амикарбазона и изопропил-2-OH-дезамино амикарбазона из растительных матриц. Экстракты растительных матриц, как правило, требуют предварительной очистки от сопутствующих примесей перед анализом, особенно в случае использования ультрафиолетового детектора. Метаболиты амикарбазона содержат в своей структуре подвижный атом водорода в положении 4 триазольного кольца, что способствует образованию водородных связей с различными реагентами. Кроме того, наличие свободной гидроксильной группы у изопр-2-OH-ДА может приводить к образованию достаточно прочных водородных связей с сорбентами.

Для изучения поведения AM3, ДА и изопр-2-OH-ДА на сорбентах разных типов, в том числе на патронах для ТФЭ, использовали стандартные растворы определяемых веществ (табл. 4).



Рис. 2. Хроматограмма экстракта воды с добавкой амикарбазона и его метаболитов по 0.002 мг/л.

ЖУРНАЛ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ том 76 № 2 2021

ЧЕРМЕНСКАЯ, АЛЕКСЕЕВ

		Степень извлечения, %			
Экстрагент, процедура	AM3	ДA	изопр-2-ОН-ДА		
10 мл ацетонитрила*	68.5	42.3	16.4		
10 мл 1%-ной муравьиной кислоты в ацетонитриле (pl	H 3)	67.0	58.5	39.0	
QuEChERS (набор для пробоподготовки для фруктовощей)**	75.0	46.0	2.0		
40 мл этилацетата, 4 мл экстракта упаривают досуха творяют в подвижной фазе	67.0	51.0	37.0		
40 мл 50%-ного водного ацетона, 20 мл упаривают					
до воды, повторно экстрагируют этилацетатом при	pH 3	34.4	0	41.0	
	pH 7	55.6	70.8	49.6	
	pH 9	73.0	0	35.0	
10 мл ацетона, 1 мл экстракта упаривают досуха и рарит в подвижной фазе	84.6	81.2	75.5		
20 мл ацетона, 1 мл экстракта упаривают досуха и р ряют в подвижной фазе	89.0	87.5	79.8		

Таблица 3.	Условия выделения	амикарбазона,	дезамино а	микарбазона	и изопропил	 -2-гидрокси- 	дезамино	ами
карбазона ((10 мкг) из почвы (10	г)						

* Экстракцию осуществляют встряхиванием в течение 10 мин, экстракт отделяют центрифугированием при 4000 об/мин в течение 10 мин. В вариантах, где экстрагируют ацетонитрилом, перед анализом к 0.5 мл экстракта добавляют 0.5 мл 0.005 М H₃PO₄.

** QuEChERS (набор для пробоподготовки для фруктов и овощей): 10 мл ацетонитрила + 5 мл воды + 4 г MgSO₄ + 1 г NaCl + + 0.5 г цитрата натрия двузамещенного сесквигидрата + 1 г цитрата натрия трехзамещенного дигидрата, 5 мл экстракта подвергают очистке на сорбенте PSA.

Оценка способности разных сорбентов (полярных и неполярных) адсорбировать изучаемые соединения показала, что наименьшей адсорбционной способностью обладают сорбент C18E и активированный уголь. При использовании силикагеля, оксида алюминия и PSA приемлемые степени извлечения получили только для амикарбазона. Это может частично объяснить нашу неудачу при попытке использовать QuEChERS для извлечения аналитов из почвы.

Адсорбция амикарбазона и его метаболитов максимальна при использовании сорбентов Диапак С16 и Диапак С. При выбранных оптимальных условиях промывки и элюирования аналитов достигнута высокая степень извлечения (86–100%). Значительно меньшей эффективностью обладает Диапак Амин.

Для одновременного выделения, идентификации и количественного определения амикарбазона и его метаболитов в растительных матрицах исследовали разные способы извлечения определяемых веществ из образцов кукурузы и очистку экстрактов разными сорбентами (табл. 5). Проверка способов выделения АМЗ, ДА и изопр-2-ОН-ДА из образцов растительных матриц с использованием разных вариантов экстракции и очистки экстрактов на сорбентах показала неудовлетворительные результаты при экстракции аце-



Рис. 3. Хроматограмма экстракта почвы с добавкой амикарбазона и его метаболитов по 0.05 мг/кг.

Тип сорбанта	Степень извлечения, %			
Типсороента	AM3	ДА	изопр-2-ОН-ДА	
Сорбенты (50 мг на 1 мл раствора ам	икарбазона и метаболи	итов с концентрацией в	по 0.5 мкг/мл)	
Силикагель	81.9	21.7	_	
Оксид алюминия	90.4	_	—	
Флорисил	50.8	_	_	
C18E	100	100	100	
PSA	100	37.0	—	
Активированный уголь	82.9	83.1	80.3	
	Патроны для ТФЭ			
Диапак С16	86.1	100	90.6	
Диапак С	100	98.0	97.5	
Диапак Амин	82.1	74.5	17.9	
Комбин	ации для очистки экст	рактов*		
Активированный уголь + Диапак С16	73.7	81.5	77.4	
С18Е + активированный уголь	91.5	96.9	89.1	
Диапак С+ Диапак С16	52.5	85.0	57.1	
С18Е + активированный уголь + Диапак С	88.6	83.8	83.1	

Таблица 4. Сравнение степени извлечения амикарбазона, дезамино амикарбазона и изопропил-2-гидрокси-дезамино амикарбазона при использовании разных сорбентов

* К 10 г образцов растительных матриц добавляли по 10 мкг AM3, ДА и изопр-2-OH-ДА. Экстракцию органическими растворителями и очистку на сорбентах C18CE и активированном угле осуществляли встряхиванием в течение 10 мин, экстракт отделяли центрифугированием в течение 10 мин при 4000 об/мин. Условия промывки и элюирования на патронах для ТФЭ приведены в "Экспериментальной части". Очищенные пробы перед анализом методом ВЭЖХ-УФ упаривали досуха, остаток растворяли в 1 мл подвижной фазы.

тоном или ацетонитрилом и очистке на патронах для $T\Phi$ Э. При экстракции ацетонитрилом экстракты чище, чем в случае ацетона, но очистки на патронах недостаточно, чтобы адекватно оценить степень извлечения аналитов. Так как каждый сорбент в отдельности не обеспечивает достаточной степени чистоты независимо от использованного экстрагента, изучали комбинации сорбентов (табл. 4).

Установлено, что экстракция ацетонитрилом по метолу OuEChERS и очистка на сорбентах С18СЕ + активированный уголь достаточны для достижения высокой степени извлечения одновременно всех аналитов и необходимой чистоты пробы при при анализе образцов зерна и масла методом ВЭЖХ-УФ. Для обеспечения чистоты проб зеленой массы, необходимой для более точного количественного анализа, требуется дополнительная очистка адсорбционной ТФЭ на патроне Диапак С. Хотя в большинстве случаев для определения пестицидов используют QuEChERS с масс-спектрометрическим детектированием [14], этот метод может отвечать требованиям к чистоте проб и при анализе методом ВЭЖХ-УФ [15].

В результате детального изучения условий, методов и материалов, необходимых для определе-

ния амикарбазона и его метаболитов, разработали способы одновременного определения AM3, ДА и изопр-2-OH-ДА в разных объектах окружающей среды и растительных матрицах методом ВЭЖХ-УФ (см. "Экспериментальную часть"). Предложенные способы апробированы при анализе разнообразных матриц (табл. 6, рис. 4).

Описан [10] способ одновременного определения остаточных количеств амикарбазона и его метаболитов в кукурузе с использованием модифицированного метода QuEChERS, который включает экстракцию ацетонитрилом, очистку дисперсионной твердофазной экстракцией с графитизированным черным углеродом (GCB) и сорбентом октадецилсиланом C18 и последующее определение методом жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Степень извлечения в этом способе варьирует в пределах 85.1—111.0% с относительными стандартными отклонениями в диапазоне 2.3—11.0%. Предел количественного определения 5 мкг/кг.

Предлагаемый нами способ одновременного определения АМЗ, ДА и изопр-2-ОН-ДА методом ВЭЖХ с УФ-детектированием в зерне, масле и зеленой массе кукурузы с использованием для очистки дисперсионной твердофазной экстракцией комбинации сорбентов C18EC + активиро-

Объект анализа	Экстрагент или способ экстракции	Ouverree	Степень извлечения, %		
		Очистка	AM3	ДА	изопр-2-ОН-ДА
Зеленая масса	Ацетон (40 мл)	Диапак С16	65.0	25.0	_
Зеленая масса	Ацетон (40 мл)	Диапак С	64.0	47.5	—
Зеленая масса	Ацетонитрил (40 мл)	Диапак С16	65.0	25.0	—
Зерно			69.0	80.0	65.0
Масло			27.5	60.0	32.5
Зеленая масса	Ацетонитрил (40 мл)	Диапак С	61.0	50.0	_
Зерно			52.5	85.0	30.0
Масло			34.0	27.5	40.0
Зерно	QuEChERS*	Активированный уголь 125 мг + + 750 мг MgSO ₄	83.0	58.0	66.0
Зеленая масса	QuEChERS*	С18СЕ 250 мг + активированный	89.5	90.9	68.2
Зерно		уголь 125мг + 750 мг MgSO ₄	94.4	91.2	94.4
Масло			100	80.0	78.9
Зеленая масса	QuEChERS*	С18ЕС 250 мг + активированный	88.6	83.8	83.0
Зерно		уголь 125мг + 750 мг MgSO ₄ + Диа-	86.4	87.7	81.2
Масло		пак С	86.1	83.2	85.6

Таблица 5. Условия выделения амикарбазона, дезамино амикарбазона и изопропил-2-гидрокси-дезамино амикарбазона из растительных матриц кукурузы

* QuEChERS: 10 мл ацетонитрила + 5 мл воды + 4 г MgSO₄ + 1 г NaCl + 0.5 г цитрата натрия двузамещенного сесквигидрата + 1 г цитрата натрия трехзамещенного дигидрата, 5 мл экстракта подвергают очистке на сорбенте.

Таблица 6. Степени извлечения амикарбазона, дезамино амикарбазона и изопропил-2-гидрокси-дезамино амикарбазона (*n* = 20, *P* = 0.95)

Объект анализа	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг (мг/л)	Степень извлечения, X ср $\pm \Delta X$, %			
oobeki anamsa		AM3	ДА	изопр-2-ОН-ДА	
Вода	(0.002-0.02)	87.7 ± 1.4	84.9 ± 1.5	80.9 ± 1.1	
Почва	0.05-0.5	88.5 ± 2.2	89.3 ± 1.8	82.4 ± 1.5	
Зеленая масса кукурузы	0.05-0.5	86.2 ± 1.5	83.7 ± 1.3	80.9 ± 1.6	
Зерно кукурузы	0.05-0.5	87.6 ± 2.5	84.9 ± 1.7	81.6 ± 1.5	
Масло кукурузы	0.05-0.5	89.5 ± 2.0	87.9 ± 2.4	84.1 ± 2.0	

ванного угля и дополнительно адсорбционной твердофазной экстракции на патроне Диапак С при анализе зеленой массы обеспечивает высокую степень извлечения всех аналитов (81–90%) с погрешностью 1.1–2.5% и достаточно низкий предел количественного определения 0.05 мг/кг.

Все известные способы определения амикарбазона и его метаболитов в биологических объектах с использованием ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием отличаются высокими чувствительностью и селективностью. Однако при их применении необходимо учитывать наличие матричного эффекта, который в значительной степени зависит от применяемой аппаратуры, способа подготовки образца к анализу, типа матрицы.

* * *

Таким образом, оптимизированный нами способ одновременного определения амикарбазона и его метаболитов в воде, почве, зеленой массе, зерне и масле кукурузы методом ВЭЖХ-УФ является надежным, статистически достоверным и



Рис. 4. Хроматограмма экстрактов кукурузы с добавкой амикарбазона и его метаболитов по 0.05 мг/кг: (a) – зеленая масса, (б) – зерно, (в) – масло.

точным, не требует использования дорогостоящего оборудования и доступен для широкого использования при анализе сельхозпродукции и мониторинге окружающей среды на остаточные количества гербицидов, содержащих амикарбазон.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Петрова М.О., Черменская Т.Д. Развитие исследований в аналитической лаборатории ВИЗР по оценке остаточных количеств пестицидов // Вестник защиты растений. 2020. Т. 103. № 2. С. 93.
- Amicarbazone (MKH 3586). Summary of analytical chemistry and residue data. United States Environmental Protection Agency / HED Records Center Series 361 Science Reviews. File R110166. 2005. 306 p.

- 3. Amicarbazone. Scoping document and draft human health risk assessment / Registration Review. DP Number 426602. 2015. 53 p.
- 4. *The pesticide manual* / Ed. Tomlin C. Surrey: Brit. Crop. Prot. Council, 2009. 1457 p.
- Griffiths M., Münks K.-W., Müller K.-H. Photosynthesis inhibitors: regulatory aspects, re-registration in Europe, market trends, and new products. Ch. 12 / Eds: Krämer W., Schirmer U., Jeschke P., Witschel M. / Modern Crop Protection Compounds. 3 Volume Set. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012. P. 510.
- Dong M., Han W., Ediage E.N., Fan L., Tang H., Wang W., Han L., Zhao Z., Song W., Han Z. Dissipation kinetics and degradation mechanism of amicarbazone in soil revealed by a reliable LC–MS/MS method // Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 2015. V. 22. P. 17518.
- 7. Amicarbazone: HED human health risk assessment for new food use / United States Environmental Protection

Agency / HED Records Center Series 361 Science Reviews. File R112623. 2005. 86 p.

- Bauer M.R. Analytical method for the determination of residues of MKH 3586 and three metabolites in soil by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). Bayer Report N 109105. 1999. 63 p.
- 9. Dong M., Nie D., Tang H., Rao Q., Qu M., Wang W., Han L., Song W., Han Z. Analysis of amicarbazone and its two metabolites in grains and soybeans by liquid chromatography with tandem mass spectrometry // J. Sep. Sci. 2015. V. 38. № 13. P. 2245.
- 10. Dong M.-F., Bai B., Tang H.-X., Wang W.-M., Zhao Z.-H., Zheng H., Song W.-G. Determination of amicarbazone and its metabolites in corn and its plant with a modified QuEChERS by liquid chromatography tandem mass spectrometry // Chin. J. Anal. Chem. 2015. V. 43. № 5. P. 663.
- 11. *Rodzinak K.J.* Method Validation for Determination of Amicarbazone. Final Report. 2013. 11 p.

- Jiang Y., Wu J., Zhang A. Analytical method of amicarbazone 70% WG by HPLC // Pest. Sci. Admin. 2015. № 4. P. 44.
- 13. *Li X., Zhao Q., Wu T., Wang Y., Tang X.* Analysis method of amicarbazone technical by HPLC // Chem. Ent. Manag. 2017. № 21. P. 1.
- Петрова М.О., Черменская Т.Д. Поиск остаточных веществ пестицидов в сельскохозяйственной продукции – путь к безопасному продовольствию // Биосфера. 2019. Т. 11. № 1. С. 40.
- 15. Комарова А.С., Черменская Т.Д., Человечкова В.В. Определение аметоктрадина в растительных остатках и объектах окружающей среды методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектором // Журн. аналит. химии. 2017. Т. 72. № 10. С. 904. (Komarova A.S., Chermenskaya T.D., Chelovechkova V.V. Determination of ametoctradin in plant residues and environmental samples by HPLC with an UV Detector // J. Analyt. Chem. 2017. V. 72. № 10. Р. 1077.)

УДК 543.544

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗОЛЕДРОНОВОЙ КИСЛОТЫ И КРЕАТИНИНА МЕТОДОМ ГИДРОФИЛЬНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

© 2021 г. Л. А. Карцова^{а, *}, В. Д. Сомова^а, Е. А. Бессонова^а

^аСанкт-Петербургский государственный университет Университетский просп., 26, Петродворец, Санкт-Петербург, 198504 Россия *e-mail: kartsova@gmail.com Поступила в редакцию 20.07.2020 г. После доработки 24.08.2020 г.

Принята к публикации 24.08.2020 г.

Предложен вариант совместного определения золедроновой кислоты и креатинина в образцах сыворотки и плазмы крови методом гидрофильной хроматографии (HILIC). Установлены факторы, влияющие на определение золедроновой кислоты: состав и концентрация буферного раствора, природа стационарной фазы, наличие в элюенте винной кислоты в качестве конкурирующего агента для предотвращения процессов комплексообразования золедроновой кислоты с ионами металлов. Установлены линейные диапазоны концентраций для золедроновой кислоты и креатинина и пределы обнаружения этих аналитов. Найдены условия хроматографического анализа: амидная стационарная фаза; 5 мМ фосфатный буферный раствор, 2 мМ винная кислота (pH 7.0)/CH₃CN, градиентный режим 90–70% CH₃CN.

Ключевые слова: гидрофильная хроматография, амидная стационарная фаза, золедроновая кислота, креатинин, комплексообразование, винная кислота.

DOI: 10.31857/S0044450221020109

Золедроновая кислота — лекарственный препарат, ингибирующий действие остеокластов и резорбцию кости, относится к классу бифосфонатов и представляет собой азотсодержащую бисфосфоновую кислоту, широко используемую для профилактики или лечения остеопороза (схема 1).



Схема 1. Структура золедроновой кислоты.

Синтезированные в XIX веке бифосфонаты первоначально использовали в качестве умягчителей воды [1]. Потенциальная возможность предотвращения растворения гидроксиапатита, а значит и прекращение потери костной массы, обусловили первые медицинские исследования по изучению действия бифосфонатов при костных заболеваниях. Препараты на основе золедроновой кислоты подавляют активность остеокластов, которые при злокачественных новообразованиях и метастазировании разрушают здоровые клетки костей, используют для лечения остеопороза и различных заболеваний, характеризующихся хрупкостью костей. Одно из возможных побочных действий — нарушение работы почек, что контролируется содержанием сывороточного креатинина [2].

Традиционными методами определения бифосфонатов являются ион-парная [3, 4] и обращенно-фазовая ВЭЖХ-УФ или ВЭЖХ-МС/МС с предварительной дериватизацией для снижения полярности аналитов [5]. Однако большинство этих методов имеют ограничения в связи со способностью бифосфонатов к образованию прочных хелатных комплексов с ионами металлов, например магнием или железом(III) (схема 2), содержащимися в следовых количествах в хроматографической системе [6, 7]:



Схема. 2. Образование комплекса бифосфонатов с магнием [7].

Для предотвращения комплексообразования при ВЭЖХ-определении золедроновой кислоты в состав подвижной фазы добавляют фосфаты или пирофосфаты, а в раствор анализируемой пробы комплексообразующие агенты, например этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА) или лимонную кислоту [3, 8].

Другой путь улучшения чувствительности ВЭЖХ–МС/МС-определения – использование аппаратного обеспечения, не содержащего металлов. Так в работе [6] хроматографическое разделение метилированных производных аледроната и внутреннего стандарта достигнуто на колонке, не содержащей металлов, с линейным градиентным элюированием.

Для определения высокополярной золедроновой кислоты и креатинина предпочтительно использовать гидрофильную хроматографию (hydrophilic interaction liquid chromatography, **HILIC**). В настоящей работе предложен вариант одновременного определения креатинина и золедроновой кислоты в биологических жидкостях методом HILIC с градиентным элюированием.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и реагенты. Стандарты определяемых аналитов: креатинин (>99.0%, Sigma, Германия), фармацевтическая субстанция золедроновой кислоты (standards USP). Для приготовления подвижных фаз и проведения пробоподготовки использовали ацетонитрил для ВЭЖХ, метанол для ВЭЖХ (Acros organics, США), муравьиную кислоту х. ч. (Реахим, Россия), ацетат аммония (Sigma, Германия), дигидрат дигидрофосфата натрия, дигидрат гидрофосфата натрия (AppliChem, Германия), ортофосфорную кислоту х. ч. (Реахим, Россия), воду деионизированную Milli Q Synthesis, гидрокисид натрия х. ч. (Реахим, Россия), лимонную кислоту, винную кислоту (Sigma, Германия), ЭДТА (AppliChem, Германия), пероксид водорода (Вектон, Россия).

Готовый буферный раствор фильтровали через фильтр под вакуумом водоструйного насоса, помещали в чистый стеклянный сосуд емк. 200 (500) мл, который герметически закрывали и хранили в холодильнике при +4°C.

Оборудование. Хроматографический анализ выполняли на жидкостном хроматографе LC-30 Nexera с диодно-матричным детектором. В качестве неподвижных фаз испытаны колонки с амидными, диольными и аминными фазами: XBridge Amide 150 × 2 мм, 3.5 мкм; YMC-Triat Diol HILIC 150 × 2 мм, 5 мкм; Luna NH₂ 250 × 4.6 мм, 5 мкм. Для обработки результатов анализа использовали программное обеспечение "LCsolution". Деионизованную воду получали с помощью системы деионизации воды Деионизатор D-301 (Аквилон, Россия). pH буферных растворов для ВЭЖХ контролировали стационарным pH-метром S20-K SevenEasy (Mettler Toledo, Швейцария). Буферные растворы фильтровали под вакуумом водоструйного насоса через фильтры Nylon 66 Membranes 0.45 мкм × 47 мм (Supelco, США).

Приготовление стандартных и тестовых растворов золедроновой кислоты и креатинина. Для приготовления раствора стандарта золедроновой кислоты с концентрацией 1 мг/мл на микроаналитических весах отбирали точную навеску фармацевтической субстанции (1 мг), помещали в сухие чистые микропробирки емк. 1.5 мл и растворяли в 300 мкл деионизованной воды, затем добавляли 20 мкл 2 М раствора NaOH и 680 мкл ацетонитрила. Тестовые растворы с меньшей концентрацией (100 мкг/мл, 10 мкг/мл) получали разбавлением 60%-ным раствором ацетонитрила. Микропробирки с полученными растворами хранили при 4°C.

Тестовый раствор креатинина с концентрацией 1-2 мг/мл готовили растворением точной навески 1-2 мг аналита в водно-ацетонитрильном растворе (70 : 30, по объему) и хранили в морозильной камере до хроматографического анализа при -16° С. Рабочие растворы аналита (10, 1, 0.1 мкг/мл) готовили путем последовательного разбавления тестового раствора ацетонитрилом с помощью автоматического дозатора и хранили при $+4^{\circ}$ С в течение месяца.

Условия определения золедроновой кислоты и креатинина методом гидрофильной хроматографии. Варьировали природу буферного раствора (фосфатный, ацетатный; pH 3.0 и 7.0); хелатообразующего агента (ЭДТА, лимонная и винная кислоты) и его концентрацию (1, 2, 5, 10 мМ), режим элюирования (градиентный или изократический).

После серии предварительных экспериментов найдены требуемые хроматографические условия: колонка XBridge Amide (150 × 2 мм, 3.5 мкм); 5 мМ фосфатный буферный раствор (pH 7.0); 2 мМ винная кислота/CH₃CN; градиентный режим 90–70% CH₃CN; объем вводимой пробы – 20 мкл; УФ-детектирование, 205 нм.

Исследование окислительной деградации золедроновой кислоты. Отбирали 450 мкл раствора золедроновой кислоты, добавляли 50 мкл 3%-ного раствора пероксида водорода и в течение 30 мин выдерживали при комнатной температуре.

Для креатинина и золедроновой кислоты методом разбавления пробы найдены линейные диапазоны концентраций и пределы обнаружения. Предел обнаружения оценивали, как концентрацию аналита, дающую сигнал, равный утроенному уровню шума (отношение сигнал/шум 3 : 1) Линейный рабочий диапазон концентраций для креатинина 0.5–32 мкг/мл, для золедроновой кислоты – 50–800 мкг/мл. Пробоподготовка образцов плазмы крови для хроматографического анализа. Лекарственные препараты определяли в плазме крови человека, содержащей гепарин в качестве антикоагулянта. 100 мкл плазмы крови помещали в микропробирку Эппендорфа емк. 1.5 мл, добавляли 300 мкл ацетонитрила, перемешивали в течение 2 мин. Затем пробу центрифугировали на центрифуге Ерреndorf 5430 (Eppendorf, Германия) в течение 10 мин со скоростью 10000 об/мин при 4°С, отбирали надосадочную жидкость и проводили хроматографический анализ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Золедроновая кислота — препарат, подавляющий активность остеокластов, которые при злокачественных новообразованиях и метастазировании разрушают здоровые клетки костей. Лекарства на ее основе увеличивают срок жизни онкологических больных, снимают болевой синдром, препятствуют распространению метастазов. Одно из побочных действий — возможное нарушение работы почек, что контролируется содержанием сывороточного креатинина.

Для определения высокополярных соединений в настоящее время активно востребована гидрофильная хроматография, представляющая собой вариант жидкостной хроматографии с полярной неподвижной фазой и водно-органической подвижной с небольшим (≤20%) содержанием воды. HILIC сочетает характерные особенности нормально-фазовой (полярная стационарная фаза), обращенно-фазовой (полярная подвижная фаза) и ионообменной (возможность ионообменных взаимодействий) жидкостной хроматографии [9]. Процесс формирования адсорбированного водного слоя у поверхности сорбента, благодаря которому реализуется режим гидрофильной хроматографии, определяется конкретными функциональными группами стационарной фазы [10]. Удерживание аналитов в HILIC обусловлено как распределительным механизмом между подвижной фазой и слоем воды, адсорбированным у поверхности полярного сорбента, так и адсорбционным, где важную роль могут играть электростатические взаимодействия и водородные связи. Вклад каждого из механизмов зависит от типа неподвижной фазы, pH элюента, природы и концентрации органического растворителя в подвижной фазе, а также от физико-химических свойств определяемых аналитов [11, 12]. Функциональные группы стационарной фазы в HILIC принято подразделять на нейтральные, заряженные и цвиттер-ионные [13, 14].

Несмотря на сложность механизма разделения, метод HILIC имеет ряд преимуществ по сравнению с нормально-фазовой (**HФ**) и обращенно-фазовой (**OФ**) ВЭЖХ при разделении высокополярных водорастворимых веществ, которые в условиях ОФ и НФ ВЭЖХ либо элюируются с мертвым объемом, либо плохо растворимы в неполярных органических растворителях. Кроме того, при разделении аналитов методом HILIC не требуется введение ион-парных агентов в состав элюента. Это, в свою очередь, позволяет использовать масс-спектрометрическое детектирование.

В качестве подвижных фаз в гидрофильной хроматографии обычно используют полярные органические растворители, хорошо смешиваюшиеся с водой [13]. Режим градиентного элюирования в гидрофильной хроматографии отличается от ОФ ЖХ и характеризуется постепенным увеличением содержания воды. Факторы удерживания определяемых соединений тем выше, чем больше их гидрофильность [15]. Другой параметр, который приходится учитывать, – наличие буферных солей в составе элюента, снижающих электростатические взаимодействия между аналитами и активными центрами стационарной фазы [16]. Наиболее часто используют ацетаты и формиаты аммония (от 5 до 30 мМ), поскольку они достаточно летучие и не мешают масс-спектрометрическому детектированию.

Поскольку при хроматографическом определении бифосфонатов серьезным осложнением является их взаимодействие с ионами металлов с образованием прочных комплексов, провели серию экспериментов с добавлением в состав подвижной фазы конкурирующих комплексообразующих агентов (ЭДТА, винной и лимонной кислот). Наиболее эффективной оказалась добавка винной кислоты, поскольку константа устойчивости ее комплекса с железом(III), находящимся в следовых количествах в хроматографической системе, на несколько порядков выше по сравнению с лимонной кислоты по сравнению с винной существенно выше поглощающий фон (рис. 1).

При введении хелатирующих добавок (винной, лимонной кислот, ЭДТА) непосредственно в пробу идентифицировать золедроновую кислоту не удалось. Результат достигнут лишь при введении комплексообразующего агента в состав подвижной фазы. Обнаружено, что с увеличением концентрации винной кислоты фактор селективности возрастает, однако увеличивается и уровень фона за счет ее поглощения при 205 нм (рис. 2).

Важными факторами, влияющими на определение золедроновой кислоты, являются состав и концентрация буферного раствора, а также природа стационарной фазы [17, 18]. Установлено, что возможно определение золедроновой кислоты при использовании фосфатного буферного раствора в связи с образованием фосфатных комплексов железа(III) и предотвращением образования комплекса железа(III) с золедроновой кис-



Рис. 1. Хроматограмма фармацевтической субстанции золедроновой кислоты в присутствии винной (*1*) и лимонной кислоты (*2*) в составе подвижной фазы. Условия: 5 мМ фосфатный буфер, 5 мМ лимонной кислоты (5 мМ винной кислоты) (pH 7.0)/CH₃CN, градиентный режим 90–50% CH₃CN, 205 нм.

лотой. Однако при концентрации фосфатного буферного раствора, превышающей 6.4 мМ, в подвижной фазе с большим содержанием ацетонитрила фосфат железа(III) выпадает в осадок. В дальнейшем использовали концентрацию фосфатного буферного раствора 5 мМ.

Испытаны различные стационарные фазы: амидная, диольная и аминная. Установлено, что золедроновая кислота практически не удерживается на неподвижной фазе с аминогруппами. При использовании диольной стационарной фазы, наоборот, золедроновая кислота хемосорбируется за счет образования водородных связей с сорбентом. Положительный результат достигнут на амидной неподвижной фазе в сочетании с фосфатным буферным раствором, содержащим 2 мМ винной кислоты в градиентном режиме элюирования. Амидная группа не заряжена в диапазоне рН элюентов, используемых в HILIC. Ионообменные взаимодействия с полярными аналитами на таких фазах практически отсутствуют, что уменьшает риск их необратимой адсорбции.

Определен линейный рабочий диапазон концентраций золедроновой кислоты (50–800 мкг/мл) и креатинина (0.5–32 мкг/мл). Пределы обнаружения составили 50 мкг/мл для золедроновой кислоты и 500 нг/мл для креатинина.

Для оценки возможности образования побочных продуктов при длительном хранении на воздухе активной фармацевтической субстанции золедроновой кислоты ее обычно подвергают стресс-



Рис. 2. Хроматограмма фармацевтической субстанции золедроновой кислоты с добавкой винной кислоты в элюент. Условия: XBridge Amide (150×2 мм, 3.5 мкм), п.ф.: 5 мМ фосфатный буферный раствор (pH 7.0), 2 мМ (*1*) и 10 мМ (*2*) винная кислота/CH₃CN, градиентный режим 90–70% CH₃CN, 205 нм.

тестам с использованием 3%-ного пероксида водорода. На рис. 3 представлена хроматограмма золедроновой кислоты до и после проведения тестов. Видно, что образуются несколько продуктов деградации, которые не мешают обнаружению золедроновой кислоты и могут быть независимо определены.

В найденных условиях HILIC проанализированы образцы сыворотки крови в присутствии золедроновой кислоты и креатинина (рис. 4).



Рис. 3. Хроматографическое определение золедроновой кислоты до (серый цвет) и после (черный цвет) деградации. Остальные условия см. в подписи к рис. 2.



Рис. 4. Хроматограмма сыворотки крови в присутствии креатинина и золедроновой кислоты методом HILIC. Условия: XBridge Amide (150 × 2 мм, 3.5 мкм), п.ф.: 5 мМ фосфатный буферный раствор, 2 мМ винная кислота (pH 7.0)/CH₃CN, градиентный режим 90–70% CH₃CN, 205 нм.

* * *

Предложен вариант одновременного определения креатинина и золедроновой кислоты в биологических жидкостях методом гидрофильной хроматографии с УФ-детектированием с использованием амидной стационарной фазы и градиентного режима элюирования. Установлена необходимость введения в состав элюента 2 мМ винной кислоты в качестве конкурирующего комплексообразующего агента.

Работа выполнена при финансовой поддержке проекта РФФИ 18-53-80010 BRICS_t. Выражаем благодарность Ресурсному Центру МАСВ "Научный парк СПбГУ" за предоставленное оборудование.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zacharis C., Tzanavaras P.D. Determination of bisphosphonate active pharmaceutical ingredients in pharmaceuticals and biological material: A review of analytical methods // J. Pharm. Biomed. Anal. 2008. V. 48. P. 483.
- 2. *Miller P.D.* The kidney and bisphosphonates // Bone. 2011. V. 49. P. 77.
- Reddy L.M., Reddy K.J., Reddy P.R. A simple RP-HPLC method for related substances of zoledronic acid in pharmaceutical products // Arabian J. Chem. 2017. V. 10. P. 196.
- 4. Warnke M., Breitbach Z.S., Dodbiba E., Crank J.A., Payagala T., Sharma P., Wanigasekara E., Zhang X., Armstrong D.W. Positive mode electrospray ionization mass spectrometry of bisphosphonates using dicationic

and tricationic ion-pairing agents // Anal. Chim. Acta. 2009. V. 633. P. 232.

- Veldboer K., Vielhaber T., Ahrens H., Hardes J., Streitbürger A., Karst U. Determination of zoledronic acid in human urine and blood plasma using liquid chromatography/electrospray mass spectrometry // J. Chromatogr. B. 2011. V. 879. P. 2073.
- Yamada M., Lee X., Fujishiro M., Iseri K., Watanabe M., Sakamaki H., Uchida N., Matsuyama T., Kumazawaa T., Takahashi H., Ishii A., Sato K. Highly sensitive determination of alendronate in human plasma and dialysate using metal-free HPLC–MS/MS // Legal Medicine. 2018. V. 30. P. 14.
- Freire E., Vega D.R., Baggio R. Zoledronate complexes. III. Two zoledronate complexes with alkaline earth metals: [Mg(C₅H₉N₂O₇P₂)₂(H₂O)₂] and [Ca(C₅H₉N₂O₇P₂)₂(H₂O)]_n // Acta Crystallogr. 2010. V. 66. P. 166.
- Tanga Q., Jiangab S., Jiaa W., Shen D., Qiu Y., Zhao Y., Xue B., Lia C. Zoledronic acid, an FPPS inhibitor, ameliorates liver steatosis through inhibiting hepatic de novo lipogenesis // Eur. J. Pharm. Sci. 2017. V. 814. P. 169.
- 9. *McCalley D.V.* Understanding and manipulating the separation in hydrophilic interaction liquid chromatography // J. Chromatogr. A. 2017. V. 1523. P. 49.
- Карцова Л.А., Бессонова Е.А., Сомова В.Д. Гидрофильная хроматография // Журн. аналит. химии. 2019. Т. 74. №. 5. С. 323. (Kartsova L.A., Bessonova E.A., Somova V.D. Hydrophilic interaction chromatography // J. Analyt. Chem. 2019. V. 74. № 5. P. 415.)
- Shi X., Qiao L., Xu G. Recent development of ionic liquid stationary phases for liquid chromatography // J. Chromatogr. A. 2015. V. 1420. P. 1.
- Kowalska S., Krupczyńska K., Buszewski B. The influence of the mobile phase pH and the stationary phase type on the selectivity tuning in high performance liquid chromatography nucleosides separation // J. Sep. Sci. 2005. V. 28. P. 1502.
- Olsen B.A., Pack B.W. Hydrophilic Interaction Chromatography: A Guide for Practitioners. Hoboken, NJ: Wiley, 2013. 336 p.
- Qiao L., Shi X., Xu G. Recent advances in development and characterization of stationary phases for hydrophilic interaction chromatography // Trends Anal. Chem. 2016. V. 81. P. 23.
- Alvareóz-Segura T., Retention X. pH profiles of acids and bases in hydrophilic interaction liquid chromatography // Anal. Chim. Acta. 2019. V. 1050. P. 176.
- Alpert A.J. Effect of salts on retention in hydrophilic interaction chromatography // J. Chromatogr. A. 2018. V. 1538. P. 45.
- Qiao L., Lv W., Chang M., Shi X., Xu G. Surface-bonded amide-functionalized imidazolium ionic liquid as stationary phase for hydrophilic interaction liquid chromatography // J. Chromatogr. A. 2018. V. 1559. P. 141.
- 18. Jandera P., Janas P. Recent advances in stationary phases and understanding of retention in hydrophilic interaction chromatography. A review // Anal. Chim. Acta. 2017. V. 967. P. 12.

ЖУРНАЛ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ том 76 № 2 2021

— ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ ——

УДК 543.544.5.068.7:543.51:677.042.2

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕИОНОГЕННЫХ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ МЕТОДОМ УЛЬТРА ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ

© 2021 г. В. Г. Амелин^{а, b,} *, Д. С. Большаков^b

^а Владимирский государственный университет имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых ул. Горького, 87, Владимир, 600000 Россия ^bФедеральный центр охраны здоровья животных мкр. Юрьевец, Владимир, 600901 Россия *e-mail: amelinvg@mail.ru Поступила в редакцию 26.04.2020 г. После доработки 10.05.2020 г. Принята к публикации 02.06.2020 г.

Предложена методика идентификации и определения неионогенных поверхностно-активных веществ (НПАВ) в природных водах методом ультра-ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием высокого разрешения. Установлены основные аналитические характеристики определения наиболее распространённых НПАВ – алкилфенолэтоксилатов и алкилоксиэтоксилатов – по предложенной методике. Рассмотрены основные аддукты полимергомологов определяемых ПАВ, образующихся в условиях ионизации электраспылением. Для извлечения аналитов из образцов природных вод использован метод дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции смесью трихлорметан—ацетонитрил. Рассмотрена возможность определения НПАВ при непосредственном электрораспылении подготовленного образца в масс-спектрометр. Пределы определения ПАВ в выбранных условиях варьировали от 0.1 до 0.5 нг/мл, диапазон определяемых содержаний составил от 1 до 1000 нг/мл. Относительное стандартное отклонение результатов анализа не превышает 0.15. Продолжительность идентификации компонентов проб составила 30 мин, определение обнаруженных аналитов занимает 1 ч.

Ключевые слова: неионогенные поверхностно-активные вещества, алкилфенолэтоксилаты, алкилоксиэтоксилаты, природная вода, ультра высокоэффективная жидкостная хроматография, массспектрометрия высокого разрешения.

DOI: 10.31857/S0044450220120026

Подавляющая часть неионогенных поверхностно-активных веществ (**HIIAB**) представляет собой продукты присоединения оксида этилена к веществам, имеющим подвижный атом водорода (фенолам, спиртам, кислотам, аминам, амидам). Общая формула этих соединений $R-X-(CH_2-CH_2O)_mH$, где R – алкильный или алкиларильный радикал; X = -O-, -COO-, -CONH и др. Общим для этой группы НПАВ является присутствие полиоксиэтиленовой цепи [1].

Причиной появления НПАВ в природных водах являются главным образом сбросы неочищенных сточных вод, некоторое количество НПАВ может поступать с грунтовыми водами, а также с атмосферными осадками. Содержание НПАВ в воде нормируется. Поскольку НПАВ представляют собой большую группу оксиэтилированных соединений различных классов, значения предельно допустимых концентраций (ПДК) для индивидуальных веществ имеют достаточно большой разброс. Например, для водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового назначения ПДК синтанолов и оксиэтиленалкилфенолов составляет 0.1 мг/л, неонолов – 0.1–0.3 мг/л, стеароксов – 0.5–1 мг/л. Для водных объектов рыбохозяйственного назначения ПДК различных синтанолов колеблется от 0.0005 до 0.002 мг/л, неонолов – от 0.0001 до 0.3 мг/л. При определении суммарной концентрации НПАВ в водах условно принято считать ПДК равной 0.1 мг/л [1].

Помимо классических стандартизованных методов группового определения НПАВ [1–3], в последнее время получило распространение использо-

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕИОНОГЕННЫХ

ьекты ализа грица)	Пробоподготовка	Метод анализа	Метод детектирования	С _{мин}	Л pa
методы с	определения НПАВ				

Таблица 1. Хроматографические Т

Аналиты	Объекты анализа (матрица)	Пробоподготовка	Метод анализа	Метод детектирования	С _{мин}	Лите- ратура
Алкилфенолэтоксилаты, оксоалкогольэтоксилаты (этоксилаты жирных спиртов) Этоксилаты жирных спир- тов, нонилфенолэтокси-	Стандартные образцы, модельные рас- творы природ- ной воды Донные отло- жения и при-	Вода: упаривание, растворение осадка в хлороформе или тет- рахлорметане Вода: фильтрование, предварительное	жх	MC (электрон- ная ионизация, химическая ионизация изо- бутаном) MC (химиче- ская иониза-	— Вода: 0.01—0.20 мкг/л;	[4]
латы, диэтаноламиды жирных кислот кокосо- вого масла, нонилфенок- симонокарбоксилаты, нонилфенол, октилфенол и линейные алкилбен- золсульфонаты	брежные воды	концентрирование ТФЭ. Донные отло- жения: экстракция УЗ смесью метанол— дихлорметан (7:3, об.), ТФЭ		ция при атмосферном давлении/ ионизация электрораспы- лением)	донные отложения: 0.5—10 мкг/кг	
Полиэтоксилированные жирные спирты, поли- этоксилированные нонил- фенолы, алкилбензолсульфонаты	Поверхност- ные и сточные воды	ЖЖЭ смесью дихлорметан—изо- пропанол	ПИА	MC (химиче- ская иониза- ция при атмосферном давлении; ион- ная ловушка)	93—797 пг	[6]
Линейные алкилбен- золсульфонаты, алкил- этоксисульфаты, алкил- алкилсульфаты, нонилфе- нолполиэтоксилаты, алко- голыполиэтоксилаты (полиэтоксилаты жирных спиртов) и их карбоксили- рованные метаболиты (сульфофенилкарбоновые кислоты и алкилфенол- этоксикарбоксицаты)	Вода и осадки	ТФЭ (вода), жид- костная экстракция под давлением (осадки)	жх	МС (иониза- ция электро- распылением)	0.05—0.5 нг/мл (вода), 1—10 нг/г (осадки)	[7]
Алкилфенолы, алкилфе- нолэпоксилаты, алкилфе- нолэтоксикарбоксилаты, бисфенол А	Сточные воды, природные воды	ТФЭ	ВЭЖХ	MC (иониза- ция электро- распылением, тройной квад- руполь)	0.1—10 мкг/л (400 мл пробы, 0.5 мл экс- тракта)	[8]
Алифатические этоксили- рованные спирты, нонил- фенолполиэтоксилаты	Сточные, питьевые, реч- ные воды	ТФЭ	ЖХ	MC (иониза- ция электро- распылением)	0.0002—0.6 мкг/л	[9]
Алкилфенолполиэтокси- латы, этоксилаты жирных спиртов	Осадки сточ- ных вод	Экстракция в точке помутнения	ЖХ	MC	0.09—0.38 мг/кг	[10]
Линейные алкилбен- золсульфонаты, алкоголь- этоксисульфаты, алкилфенолэтоксилаты, алкогольэтоксилаты, алкилфенолы	Вода объектов окружающей среды	ТФЭ	ЖХ	МС (иониза- ция электро- распылением)	40—200 нг/л; 90—440 нг/л; 0.4—2 мкг/л (в зависимости от матрицы)	[11]

Обозначения: ЖХ – жидкостная хроматография; ТФЭ – твердофазная экстракция; ЖЖЭ – жидкостно-жидкостная экстракция; ПИА – проточно-инжекционный анализ.

вание хроматографических методов анализа с массспектрометрическим детектированием (табл. 1).

В работе [4] рассмотрено применение метода жидкостной хроматографии с квадрупольным масс-спектрометрическим детектированием (ЖХ-МС) в режиме электронной и химической ионизации и изобутана в качестве реакционного газа для определения НПАВ класса алкилфенолэтоксилатов $C_n H_{2n+1} C_6 H_4 O(CH_2 CH_2 O)_m H$ и этоксилатов жирных спиртов $C_n H_{2n+1} O(CH_2 CH_2 O)_m H$. Аналитами являлись октилфенолэтоксилат (Тритон Х-100). нонилфенолэтоксилат (Akopal N060) и цетилэтоксилат (Brij 56). Разделение проводили в режиме градиентного элюирования на колонке с привитыми аминопропиловыми группами. В результате получена информация о распределении гомологов и наличии примесей в чистых препаратах. Отмечено, что метод может быть использован для изучения первичной биодеградации НПАВ в воде (на примере модельных растворов загрязненных образцов природной воды) (табл. 1).

Для определения этоксилатов жирных спиртов, нонилфенолэтоксилатов, диэтаноламидов жирных кислот кокосового масла, нонилфеноксимонокарбоксилатов, нонилфенола, октилфенола и линейных алкилбензолсульфонатов в донных отложениях и образцах воды предложено использовать метод ЖХ-МС с химической ионизацией при атмосферном давлении/электрораспылительной ионизацией в сочетании с пробоподготовкой методом твердофазной экстракции (ТФЭ) [5]. Методика позволила установить достаточно высокие концентрации нонилфенолэтоксилата и нонилфенола рядом с местами сброса промышленных и городских сточных вод. Нонилфенол обнаружен в 47% проб воды и в 77% всех проанализированных образцов донных отложений. Концентрации нонилфенола варьировали от 0.15 до 4.1 мкг/л в морской воде и от 8 до 1050 мкг/кг в донных отложениях. Концентрации диэтаноламидов жирных кислот кокосового масла в отложениях (в которых преобладают гомологи С₁₁-С₁₅) варьировали в диапазоне от 30 до 2700 мкг/кг, в морской воде концентрации определяемого компонента составляли до 24 мкг/л. Установлено, что этоксилаты жирных спиртов накапливаются в донных отложениях, и поэтому они были обнаружены во всех проанализированных образцах. Диапазон определяемых содержаний этоксилатов жирных спиртов составил от 37 до 1300 мкг/кг.

Описан экспресс-метод определения анионных (АПАВ), катионных ПАВ и НПАВ в воде методом проточно-инжекционного анализа в сочетании с масс-спектрометрическим детектированием с электрораспылительной ионизацией [6]. Для извлечения и концентрирования аналитов использовали метод жидкостно-жидкостной экстракции (ЖЖЭ) смесью дихлорметан—изопропанол (90: 10, по объему). Количественный анализ проводили с использованием изотопно меченного триэтоксилированного нонилфенола и дибутилнафталинсульфоната натрия в качестве внутренних стандартов. Анализ осуществляли путем чередования положительного и отрицательного режимов ионизации, что позволило одновременно определить наиболее распространенные ПАВ за короткое время. Пределы обнаружения варьировали от 93 до 797 пг (табл. 1). Метод отличается высокой экспрессностью, поскольку не требует хроматографического разделения подготовленного экстракта. Однако в некоторых случаях для достоверной идентификации аналитов необходим дополнительный анализ методом масс-спектрометрии дочерних ионов.

В работе [7] описана методика одновременного определения в объектах окружающей среды основных АПАВ и НПАВ: линейных алкилбензолсульфонатов, алкилэтоксисульфатов, алкилсульфатов, нонилфенолполиэтоксилатов, алкогольполиэтоксилатов (полиэтоксилатов жирных спиртов) и их карбоксилированных метаболитов (сульфофенилкарбоновых кислот и алкилфенолэтоксикарбоксилатов). Аналиты экстрагировали из проб воды и осадков методом ТФЭ и жидкостной экстракции под давлением. Илентификацию и оценку количественного содержания целевых соединений проводили методом ЖХ-МС с электрораспылительной ионизацией при чередовании положительного и отрицательного режимов. Степень извлечения большинства аналитов изменялась от 70 до 107%. Пределы обнаружения составили 0.05-0.5 нг/мл для воды и 1-10 нг/г для осадков. Разработанную методику использовали для одновременного определения ПАВ в пробах, отобранных из различных водных экосистем. Во всех образцах обнаружены аналиты различного происхождения. Самые высокие концентрации метаболитов ПАВ в воде составили 149.6 мкг/л для сульфофенилкарбоновых кислот и 3.9 мкг/л для алкилфенолэтоксикарбоксилатов.

Предложена методика определения алкилфенолов, алкилфенолэтоксилатов, алкилфенолэтоксикарбоксилатов и бисфенола А в поверхностных водах методом ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием (тройной квадруполь) [8]. Для концентрирования проб и очистки полученных экстрактов применяли метод ТФЭ. Для разделения алкилфенолов и алкилфенолэтоксикарбоксилатов использовали градиентный режим элюирования без добавления буферных растворов. Применение системы ацетонитрил-вода в качестве подвижной фазы способствовало увеличению достоверности определения за счет уменьшения числа аддуктов фрагментации, имеющих одинаковые значения *m/z*. Нонилфенолэтоксилаты (m = 1 - 17) определяли отдельно в режиме положительной ионизации при использовании по-
движной фазы, содержащей ацетат аммония. Проанализированы сбросы предприятий текстильной промышленности, соответствующие стоки с очистных сооружений и воды рек. Среди определяемых веществ нонилфенолэтоксикарбоксилаты и нонилфенолэтоксилаты показали самые высокие концентрации в пробах воды: до 4.5 мкг/л в сточных водах и 3.6 мкг/л в водах рек.

Анализ литературы показал, что наиболее часто используют в промышленности и определяют в различных объектах оксиэтилированные алкилфенолы и оксиэтилированные жирные спирты. Для концентрирования проб различного происхождения и очистки полученных экстрактов используют преимущественно методы ТФЭ и ЖЖЭ, которые характеризуются значительным расходом реагентов и длительностью. Более современным и экологичным методом извлечения загрязняющих веществ различных классов из водных образцов является дисперсионная жидкостно-жидкостная микроэкстракция (ДЖЖМЭ [12–14]. Кроме того, современные системы массспектрометрии позволяют проводить непосредственный ввод образца природных вод при ионизации электрораспылением, минуя стадию хроматографического разделения подготовленного экстракта. Новые возможности метода существенно упрощают мониторинговые исследования объектов окружающей среды на содержание НПАВ.

Цель данной работы заключалась в создании и апробации способа идентификации и определении НПАВ в природных водах, основанного на сочетании методов ДЖЖМЭ и ультра-ВЭЖХ (УВЭЖХ)-квадруполь времяпролетной массспектрометрии высокого разрешения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Аппаратура. Использовали ультра высокоэффективный жидкостной хроматограф UltiMate 3000 (Thermo Scientific, США) в сочетании с квадруполь-времяпролетным масс-спектрометрическим детектором maXis 4G и электрораспылительную ионизацию в устройстве ionBooster (Bruker Daltonics, Германия). Разделение проводили на колонке ACQUITY UPLC® BEH C18 (30 × 2.1 мм, 1.7 мкм) (Waters, США) в режиме градиентного элюирования.

Применяли весы аналитические Sartorius TE214S специального класса точности с пределом взвешивания 0.1 мг (Sartorius, Германия), центрифугу MPW-260R (MPW Med. Instruments, Польша), микродозаторы Biohit с переменным объемом 10–100 мкл, 100–1000 мкл, 1000–5000 мкл и пределом допускаемой погрешности измерения не более ±2%; фильтры мембранные политет-

рафторэтиленовые 0.20 мкм диаметром 25 мм (Corning Incorporated, Германия).

Реактивы. Использовали стандартные образцы НПАВ ОП-10 и ОП-7 (ГОСТ 8433-81), Тритон X-100 (Sigma-Aldrich, США), ОС-20 (ГОСТ 10730-82) и Brij 35 (Sigma-Aldrich, США). Исходные стандартные растворы (1 мг/мл) готовили растворением точной навески препарата в метаноле. Рабочие растворы готовили разбавлением исходного деионированной водой (15–18 МОм см, ОСТ 11 029.003-80). Использовали метанол (Fisher Scientific UK, Великобритания), ацетонитрил, изопропиловый спирт (Scharlab S.L., Испания), муравьиную кислоту, формиат натрия (Sigma-Aldrich, США).

Идентификация и определение. Идентификацию НПАВ по полученным хроматограммам проводили с использованием программного продукта DataAnalysis-4.1, TargetAnalysis (Bruker Daltonics, Германия), составление картины изотопного распределения аналита – с использованием IsotoреPattern (Bruker Daltonics, Германия). Неизвестную концентрацию аналита в пробе (*c*_x) рассчитывали методом стандартной добавки по формуле:

$$c_x = c_{\text{доб}} / [(S_{x + \text{доб}} / S_x) - 1],$$

где $c_{\text{доб}}$ — концентрация добавки в пробе, нг/мл (нг/г); S_x , $S_{x + \text{доб}}$ — площади пиков m/z в исследуемом растворе и в растворе с добавкой аналита соответственно.

Условия хроматографического разделения и детектирования [15]. Подвижная фаза состояла из 0.1%-ной муравьиной кислоты в воде (элюент А) и 0.1%-ной муравьиной кислоты в ацетонитриле (элюент В). Осуществляли градиентное элюирование: 0 мин – 5% В, 0.5 мин – 5% В, 2 мин – 50% В, 5 мин – 100% В, 6 мин – 5% В, 8 мин – 5% В. Скорость потока подвижной фазы 0.4 мл/мин. Оптимальная температура хроматографической колонки 50°С, объем вводимой пробы 50 мкл. Температура термостата автоматического дозатора 10°С.

Использовали ионизацию электроспреем в устройстве ionBooster (Bruker Daltonics, Германия). Установлены следующие оптимальные значения параметров ионизации: напряжение на щите капилляра 400 В, напряжение на капилляре 1000 В, давление газа-распылителя азота 4.76 атм, поток газа-осушителя азота 6 л/мин, температура газаосушителя азота 200°С, поток газа-испарителя азота 250 л/ч, температура газа-испарителя азота 250°С.

Проводили регистрацию ионов в диапазоне значений m/z 100 до 1200. Для калибровки масс использовали раствор формиата натрия 10 мМ в смеси вода—изопропиловый спирт (1 : 1). Масс-спектр калибранта получали в интервале времен хроматографирования от 9.5 до 10 мин.

Пробоподготовка. Отбирали 10 мл исследуемой пробы, подкисляли ее добавлением 0.1 мл конц. НСІ и впрыскивали микрошприцем 1 мл смеси хлороформа (250 мкл) и ацетонитрила (750 мкл); полученную эмульсию встряхивали и центрифугировали 5 мин при 2000 об/мин. Отбирали нижний слой экстракта в пенициллиновый флакон и упаривали досуха в токе азота при 30°С. Сухой остаток растворяли в смеси 50 мкл метанола и 950 мкл воды, перемешивали, раствор фильтровали через мембранный фильтр 0.20 мкм в микрофлакон и хроматографировали.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Аналитические характеристики НПАВ. Среди всего ассортимента НПАВ наиболее широкое распространение в различных отраслях промышленности и народном хозяйстве получили алкилфенолэтоксилаты и алкилоксиэтоксилаты (этоксилаты жирных спиртов). Алкилфенолэтоксилаты представляют собой смесь полимергомологов $C_nH_{2n+1}C_6H_4O(C_2H_4O)_mH$. К ним следует отнести оксиэтилированные полиэфиры ОП-10 и ОП-7. Среди зарубежных аналогов можно выделить Emulgen 931, Noigen EA-190A, IGEPAL, Тритон X-100 и др. Алкилоксиэтоксилаты – смесь полимергомологов $C_nH_{2n+1}O(C_2H_4O)_mH$. Среди отечественных продуктов к ним относятся синтанолы (например, OC-20). Зарубежные аналоги: Brij 35, Brij 56, Emulgen 105 и др. (схема 1).

Данные НПАВ различаются по числу гомологов (*n*) и по степени этоксилирования (*m*). Для установления этих различий в работе использовали метод УВЭЖХ в сочетании с квадруполь времяпролетной масс-спектрометрией высокого разрешения. При выбранных оптимальных условиях хроматографического разделения [15] получены и проанализированы хроматограммы и масс-спектры водных растворов НПАВ с концентрацией 100 нг/мл.



Оксиэтилированный полиэфир ОП-10. На рис. 1 представлен масс-спектр водного раствора ОП-10, в котором можно выделить две группы сигналов в диапазонах значений *m/z* 250–550 и 550– 900. Такое распределение ионов по молекулярным массам характерно для полимергомологов с различным количеством мономерных звеньев в цепи. Установлено, что для ОП-10 характерны го-



Рис. 1. Масс-спектр полимергомологов ОП-10 $[C_9H_{19}C_6H_4O(C_2H_4O)_mH + Ca, Mg]^{2+}, [C_9H_{19}C_6H_4O(C_2H_4O)_mH + K, Na, NH_4]^+$ (числом обозначена степень этилирования).

мологи $C_7 - C_{11}$ (аддукты с ионами аммония, калия и натрия) (рис. 2а), степень этоксилирования (*m*) для преобладающих гомологов составила от 6 до 19. В спектре также обнаруживаются сигналы,

соответствующие по значению m/z аддуктам ОП-10 с ионами щелочных (диапазон значений m/z 600–900) и щелочноземельных (диапазон значений m/z 250–550) металлов. Так, в диапазо-



Рис. 2. Масс-хроматограммы полимергомологов ОП-10 (m = 10) (а) и Тритон X-100 (m = 10) (б). (а): $C7 - [C_7H_{15}C_6H_4O(C_2H_4O)_{10}H + NH_4]^+$; $C8 - [C_8H_{17}C_6H_4O(C_2H_4O)_{10}H + NH_4]^+$; $C9(1) - [C_9H_{19}C_6H_4O(C_2H_4O)_{10}H + NH_4]^+$; $C9(2) - [C_9H_{19}C_6H_4O(C_2H_4O)_{10}H + Na]^+$; $C9(3) - [C_9H_{19}C_6H_4O(C_2H_4O)_{10}H + K]^+$; $C10 - [C_{10}H_{21}C_6H_4O(C_2H_4O)_{10}H + NH_4]^+$; $C11 - [C_{11}H_{23}C_6H_4O(C_2H_4O)_{10}H + NH_4]^+$; (6): $C8(1) - [C_8H_{17}C_6H_4O(C_2H_4O)_{10}H + NH_4]^+$; $C9(2) - [C_8H_{17}C_6H_4O(C_2H_4O)_{10}H + NH_4]^+$; $C8(3) - [C_8H_{17}C_6H_4O(C_2H_4O)_{10}H + K]^+$; $C9(3) - [C_8H_{17}C_6H_4O(C_2H$



Рис. 3. Масс-хроматограммы (а) и масс-спектр (б) полимергомолога ОП-10 $[C_{10}H_{21}C_6H_4O(C_2H_4O)_mH + Ca]^{2+}$ (*m* = 12–25).

не значений m/z 550–900 в спектре имеется пик с максимальной интенсивностью при m/z 683.4328, который соответствует аддукту состава $[C_9H_{19}C_6H_4O(C_2H_4O)_{10}H + Na]^+$, слева от него расположены сигналы аддуктов с m = 8-9, справа с m = 11-15 и разницей в значении m/z 44, соответствующей оксиэтильному фрагменту ($-C_2H_4O-$). В спектре установлено также наличие аддуктов полимергомологов ОП-10 с ионами калия и аммония $[C_9H_{19}C_6H_4O(C_2H_4O)_{10}H + K]^+$, $[C_9H_{19}C_6H_4O(C_2H_4O)_{10}H + NH_4]^+$ (рис. 1).

При хроматографическом разделении в условиях градиентного элюирования с увеличением длины углеводородного радикала увеличивается и время удерживания алкилфенолэтоксилатов с 5.5 до 6.2 мин (рис. 2). Однако для аддукта $[C_{10}H_{21}C_6H_4O(C_2H_4O)_{10}H + NH_4]^+$ время удерживания составило 5.7 мин, что может свидетельствовать о существовании изомеров, имеющих меньшее время удерживания. Об изомерных формах алкилфенолэтоксилатов свидетельствуют их

несимметричные хроматографические пики (рис. 2а), а также данные работы [4], в которой проведено разделение и изучение изомерных форм.

На рис. 3 представлены масс-хроматограммы и масс-спектры двухзарядных ионов $[C_{10}H_{21}C_6H_4O(C_2H_4O)_mH + Ca]^{2+}$ при максимальной степени этоксилирования m = 15-16. Как видно, времена удерживания этоксилатов с различной степенью этоксилирования различаются и увеличиваются с увеличением степени этоксилирования (рис. 3а). Это может свидетельствовать об образовании аддуктов оксиэтилированных алкилфенолов до ионизации электрораспылением, а именно в исходном растворе или в процессе хроматографирования.

Установлено, что в процессе электраспылительной ионизации этоксилированных алкилфенолов на масс-хроматограммах и в масс-спектрах регистрируются аддукты с ионами аммония, натрия и калия, причем преобладают в основном



Рис. 4. Масс-хроматограммы (а) и масс-спектр (б) полимергомолога ОП-10 $[C_{10}H_{21}C_6H_4O(C_2H_4O)_mH + NH_4]^+$ (*m* = 9–20).

аддукты с ионом аммония (рис. 4). На рис. 4 представленны масс-спектры полиэфира ОП-10 в виде аддуктов с ионами аммония для полимергомолога C_{10} . На масс-хроматограмме имеются два несимметричных пика, которые могут свидетельствовать о наличии изомерных форм в исходном продукте ОП-10.

Особенностью применяемого приборного обеспечения является возможность непосредственного ввода пробы в масс-спектрометр высокого разрешения (**MCBP**) с использованием устройства ionBooster (Bruker Daltonics, Германия) (рис. 5).

Непосредственное электрораспыление пробы в масс-спектрометр удобно для мониторинговых экспресс-исследований, это позволяет идентифицировать интересующие компоненты без хроматографического разделения подготовленного экстракта. В данных условиях в масс-спектре полимергомологов ОП-10 преобладают однозарядные аддукты с ионами щелочных металлов [M + K(Na)]⁺.

ЖУРНАЛ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ том 76 № 2 2021

Оксиэтилированный полиэфир ОП-7. Установлено, что препарат ОП-7 представляет собой смесь полимергомологов от C₄ до C₇ с преобладанием C₆ [C₆H₁₃C₆H₄O(C₂H₄O)₆H + K]⁺и максимальной степенью этоксилирования m = 6 (рис. 6).

На рис. 6б представлены масс-хроматограммы гексилфенолэтоксилата. Как видно, времена удерживания для каждого полимергомолога различаются и составляют от 3.4 до 3.8 мин, что может свидетельствовать об образовании аддуктов уже в исходном растворе, до процесса хроматографирования.

Оксиэтилированный полиэфир Тритон X-100 представляет собой смесь гомологов C_8-C_{10} (преимущественно C_8) с максимальной степенью этоксилирования m = 8-9 (рис. 26, рис. 7). В спектре полиэфира регистрируются аддукты с ионами натрия, калия и аммония (рис. 8). Как видно из рис. 7, 8, на масс-хроматограммах имеются симметричные пики, что свидетельствует об отсутствии изомеров в препарате Тритон X-100.



Рис. 5. Масс-спектр полимергомолога ОП-10 $[C_9H_{19}C_6H_4O(C_2H_4O)_mH + K, Na]^+$ (*m* = 6–16), полученный непосредственным вводом раствора с концентрацией 100 нг/мл.

Оксиэтилированные спирты (синтанолы, OC-20, Brij 35). Данные НПАВ представляют собой этоксилированные спирты с различной степенью этоксилирования. На рис. 9 представленны массхроматограммы $[C_5H_{11}O(C_2H_4O)_mH + Na]^+$ для оксиэтилированного спирта OC-20. Видно, что степень этоксилирования составляет от 8 до 19. Гомологов и изомеров для данного препарата не обнаружено.

Оксиэтилированный спирт Brij-35 представляет собой лаурилоксиэтоксилат со степенью этоксилирования m = 14-27 (рис. 10). В данном случае отмечено образование как двухзарядных инов $[C_{12}H_{25}O(C_2H_4O)_mH + 2NH_4]^{2+}$, так и однозарядных $[C_{12}H_{25}O(C_2H_4O)_mH + NH_4]^+$, а также аддуктов с ионами натрия и калия.

Идентификационные параметры. Картина распределения ионов-аддуктов по молекулярным массам для каждого НПАВ очень индивидуальна и характеризует определенный аналит. Хроматографический профиль НПАВ дает существенную информацию о характере молекулярно-массового распределения гомологов идентифицируемого соединения, наличии изомеров, длине полиоксиэтиленовой цепи (степени этоксилирования). Все эти характеристики служат для подтверждения наличия конкретного соединения в анализируемой пробе (табл. 2), исходя из которых дальнейшую количественную оценку можно проводить по заранее выбранным характеристическим ионам-аддуктам (m/z) (табл. 3, 4). Идентификацию НПАВ проводили по полученным масс-хроматограммам с использованием программы TargetAnalysis-1.3 (Bruker Daltonics, Германия), созданной базы данных (табл. 2) и идентификационным параметрам, которыми служили времена удерживания соединений и точность масс ионов-аддуктов.







Рис. 7. Масс-хроматограммы (а) и масс-спектр (б) полимергомолога Тритона X-100 $[C_8H_{17}C_6H_4O(C_2H_4O)_mH + NH_4]^+$ (*m* = 4–16).

Определение НПАВ в природных водах. Для извлечения НПАВ из природных вод использовали метод ДЖЖМЭ. В качестве экстрагента использовали хлороформ (250 мкл), в качестве диспергирующего растворителя — ацетонитрил (750 мкл). Условия микроэкстракционного концентрирования аналитов оптимизировали в соответствии с данными работ [12, 13]. В табл. 3 и 4 приведены аналитические характеристики методики определения НПАВ в природных водах методом УВЭЖХ—МСВР и МСВР для характеристических ионов-аддуктов ОП-10 и Тритона X-100, в качестве которых выбрали полимергомологи C_{10} и C_8 соответственно. Их производные с ионами щелочных и щелочноземельных металлов дают наиболее интенсивные пики в

176



Рис. 8. Масс-хроматограммы (а) и масс-спектры (б) аддуктов Тритона Х-100.

масс-спектре определяемых алкилфенолэтоксилатов.

При апробации методики анализировали природные воды рек Клязьма, Судогда, Колокша и Колпь (Владимирская область). Пробы отбирали на глубине 30 см на расстоянии 1 м от берега в мае 2019 г. На рис. 11 в качестве примера приведена масс-хроматограмма экстракта природной воды из р. Клязьма. Идентифицированы НПАВ класса оксиэтилированных полиэфиров, содержащие индивидуальные соединения с длиной углевородородного радикала C_8 , C_9 и C_{10} со степенью этоксилирования m = 9, 10 и 16.

В табл. 5 приведены результаты идентификации НПАВ в различных водах. Отражены относительные (нормированные) концентрации идентифицированных компонентов. В процессе хроматографического разделения и ионизации электрораспылением полимергомологи образуют аддукты с различными ионами, наличие которых позволяет избежать ошибок при идентификации НПАВ.

Для количественного анализа использовали метод добавок на уровне 5 нг/мл НПАВ (рис. 11). Полученные результаты представлены в табл. 6.

* * *

Таким образом, в анализируемых пробах природных вод обнаружены оксиэтилированные алкилфенолы с длиной углеводородного радикала C_8 , C_9 , C_{10} и степенью этоксилирования m = 9 и 16. Оценка содержаний с использованием метода стандартной добавки позволяет сделать вывод, что обнаруженные НПАВ с углеводородным радикалом C_9 и со степенью этоксилирования m = 9присутствуют в пробах всех рек, кроме р. Клязьма, и НПАВ с углеводородном радикалом C_{10} и степенью этоксилирования m = 16 в присутствуют р. Колокша в количествах, превышающих

Ион	Моно-изотопная масса, <i>m/z</i>	Δ, м. д.	t _R	с _{мин} , нг/мл					
НПАВ –	- оксиэтилированные з	фиры алкилфено	ола						
$[C_4H_9C_6H_4O(C_2H_4O)_5H + NH_4]^+$	388.2694	3	3.6	0.1					
$[C_4H_9C_6H_4O(C_2H_4O)_7H + K]^+$	497.2511	3	3.6	0.1					
$[C_6H_{13}C_6H_4O(C_2H_4O)_5H + K]^+$	437.2300	4	3.6	0.1					
$[C_8H_{17}C_6H_4O(C_2H_4O)_9H + NH_4]^+$	620.4368	4	5.6	0.1					
$[C_8H_{17}C_6H_4O(C_2H_4O)_9H + Na]^+$	625.3922	3	5.6	0.1					
$[C_9H_{19}C_6H_4O(C_2H_4O)_{12}H + Ca]^{2+}$	394.2294	2	3.8	0.1					
$[C_9H_{19}C_6H_4O(C_2H_4O)_{13}H + Ca]^{2+}$	416.2425	4	3.8	0.1					
$[C_9H_{19}C_6H_4O(C_2H_4O)_{12}H + Mg]^{2+}$	386.2406	3	3.8	0.1					
$[C_9H_{19}C_6H_4O(C_2H_4O)_{13}H + Mg]^{2+}$	408.2537	5	3.8	0.1					
$[C_9H_{19}C_6H_4O(C_2H_4O)_9H + Na]^+$	639.4078	3	5.8	0.2					
$[C_9H_{19}C_6H_4O(C_2H_4O)_9H + K]^+$	655.3818	5	5.8	0.2					
$[C_9H_{19}C_6H_4O(C_2H_4O)_9H + NH_4]^+$	634.4524	4	5.8	0.2					
$[C_9H_{19}C_6H_4O(C_2H_4O)_{10}H + NH_4]^+$	678.4787	5	5.9	0.2					
$[C_{10}H_{21}C_6H_4O(C_2H_4O)_{12}H + Na]^+$	785.5021	5	6.0	0.5					
$[C_{10}H_{21}C_6H_4O(C_2H_4O)_{12}H + K]^+$	801.4761	5	6.0	0.5					
$\left[C_{10}H_{21}C_{6}H_{4}O(C_{2}H_{4}O)_{12}H + NH_{4}\right]^{+}$	780.5467	4	6.0	0.5					
$[C_{10}H_{21}C_6H_4O(C_2H_4O)_{16}H + Ca]^{2+}$	489.3159	4	3.9	0.5					
$[C_{10}H_{21}C_6H_4O(C_2H_4O)_{15}H + Ca]^{2+}$	467.3027	5	3.9	0.5					
$[C_{10}H_{21}C_6H_4O(C_2H_4O)_{16}H + Mg]^{2+}$	481.3009	5	3.8	0.2					
$[C_{10}H_{21}C_6H_4O(C_2H_4O)_{15}H + Mg]^{2+}$	459.2878	4	3.8	0.2					
НПАВ – оксиэтилированные спирты									
$[C_5H_{11}O(C_2H_4O)_8H+Na]^+$	463.2878	5	5.9	0.3					
$[C_{12}H_{25}O(C_2H_4O)_{21}H+2NH_4]^{2+}$	573.4083	5	6.0	0.5					
$[C_{12}H_{25}O(C_2H_4O)_{21}H+NH_4]^+$	1128.7827	8	6.0	0.5					

Таблица 2. Идентификационные параметры НПАВ, определяемых методом масс-спектрометрии высокого разрешения



Рис. 9. Масс-хроматограммы полимергомолога OC-20 $[C_5H_{11}O(C_2H_4O)_mH + Na]^+$ (*m* = 8–19).

Таблица 3. Аналитические характеристики определения НПАВ в природных водах методом ультра-ВЭЖХ-масс-спектрометрия высокого разрешения

Аналит	Ион	m/z	Δ, м. д.	t _R	с _{мин} , нг/мл	с _н , нг/мл	ДОС, нг/мл	Уравнения градуировочной зависимости	r ²
ОП-10	$[C_{10}H_{21}C_6H_4O(C_2H_4O)_{15}H + Ca]^{2+}$	467.3027	5	3.9	0.5	1	1-1000	y = 6031.9c + 173476	0.9919
	$[C_{10}H_{21}C_6H_4O(C_2H_4O)_{16}H + Ca]^{2+}$	489.3159	5	3.9	0.5	1	1-1000	y = 6068.3c + 169442	0.9985
Тритон X-100	$[C_8H_{17}C_6H_4O(C_2H_4O)_8H + NH_4]^+$	576.4106	2	5.6	0.3	1	1-100	$y = (7.7 \pm 0.6) \times 10^4 c - (2.3 \pm 0.3) \times 10^5$	0.9978
	$[C_8H_{17}C_6H_4O(C_2H_4O)_9H + NH_4]^+$	620.4368	3	5.6	0.3	1	1-100	$y = (8.4 \pm 0.6) \times 10^4 c - (3.3 \pm 0.4) \times 10^5$	0.9969



Рис. 10. Масс-хроматограммы Brij 35 $[C_{12}H_{25}O(C_2H_4O)_mH + 2NH_4]^{2+}$ (а) и масс-спектр $[C_{12}H_{25}O(C_2H_4O)_mH + 2NH_4]^{2+}$, $[C_{12}H_{25}O(C_2H_4O)_mH + NH_4]^+$ (б) (числом обозначена степень этилирования).

Таблица 4. Аналитические характеристики определения НПАВ в природных водах методом масс-спектрометрии высокого разрешения

Аналит	Ион	m/z	Д, м. д.	с _{мин} , нг/мл	с _н , нг/мл	ДОС, нг/мл	Уравнение градуировочной зависимости	r ²
ОП-10	$[C_{10}H_{21}C_6H_4O(C_2H_4O)_{15}H + Ca]^{2+}$	467.3027	5	0.5	1	1-1000	y = 1577.5c + 50293	0.9899
	$[C_{10}H_{21}C_6H_4O(C_2H_4O)_{16}H + Ca]^{2+}$	489.3159	5	0.5	1	1-1000	y = 1386.3c + 45890	0.9906
Тритон X-100	$[C_8H_{17}C_6H_4O(C_2H_4O)_9H + Na]^+$	625.3922	4	0.1	1	1-100	y = 102.1c - 657.83	0.9950
	$[C_8H_{17}C_6H_4O(C_2H_4O)_9H + K]^+$	641.3662	5	0.1	1	1-100	y = 1054.4c - 2231	0.9868



Рис. 11. Масс-хроматограммы экстракта природной воды без добавки (*1*–*8*) и с добавкой НПАВ ОП-10 до концентрации 100 нг/мл (*1a*–*8a*): *1* – [C₁₀H₂₁C₆H₄O(C₂H₄O)₁₅H + Cal²⁺, *2* – [C₁₀H₂₁C₆H₄O(C₂H₄O)₁₆H + Cal²⁺, *3* – [C₈H₁₇C₆H₄O(C₂H₄O)₉H + NH₄]⁺, *4* – [C₈H₁₇C₆H₄O(C₂H₄O)₉H + Nal⁺, *5* – [C₉H₁₉C₆H₄O(C₂H₄O)₉H + NH₄]⁺, *6* – [C₉H₁₉C₆H₄O(C₂H₄O)₁₀H + NH₄]⁺, *7* – [C₉H₁₉C₆H₄O(C₂H₄O)₉H + Nal⁺, *8* – [C₉H₁₉C₆H₄O(C₂H₄O)₉H + NH₄]⁺.

Таблица 5. Результаты идентификации НПАВ в природных водах (*n* = 3, *P* = 0.95)

Ofmontraum to house	Название реки и относительные (нормированные) концентрации							
Обнаруженные ионы	Колокша	Судогда	Клязьма	Колпь				
$[C_8H_{17}C_6H_4O(C_2H_4O)_9H + NH_4]^+$	2.24	2.04	1.00	1.55				
$[C_8H_{17}C_6H_4O(C_2H_4O)_9H + Na]^+$	2.68	2.11	1.00	1.04				
$[C_9H_{19}C_6H_4O(C_2H_4O)_9H + Na]^+$	1.36	3.87	_	1.00				
$[C_9H_{19}C_6H_4O(C_2H_4O)_9H + K]^+$	3.54	2.99	_	1.00				
$[C_9H_{19}C_6H_4O(C_2H_4O)_9H + NH_4]^+$	13.97	52.35	1.00	14.80				
$[C_9H_{19}C_6H_4O(C_2H_4O)_{10}H + NH_4]^+$	13.88	49.39	1.00	138.62				
$[C_{10}H_{21}C_6H_4O(C_2H_4O)_{15}H + Ca]^{2+}$	2.57	1.45	3.03	1.00				
$[C_{10}H_{21}C_6H_4O(C_2H_4O)_{16}H + Ca]^{2+}$	2.63	1.40	2.18	1.00				

АМЕЛИН, БОЛЬШАКОВ

Обнаруженные НПАВ	Название реки и содержание НПАВ в нг/мл (s _r)									
	Колокша	Судогда	Клязьма	Колпь						
$C_8H_{17}C_6H_4O(C_2H_4O)_9H$	33 ± 8 (0.10)	$15 \pm 5 (0.12)$	8 ± 3 (0.15)	21 ± 6 (0.09)						
$C_9H_{19}C_6H_4O(C_2H_4O)_9H$	$143 \pm 21 \ (0.06)$	288 ± 32 (0.04)	$40 \pm 9 \; (0.08)$	$140 \pm 18 \ (0.06)$						
$C_{10}H_{21}C_6H_4O(C_2H_4O)_{16}H$	$122 \pm 17 (0.05)$	$21 \pm 5 (0.08)$	63 ± 9 (0.05)	75 ± 11 (0.15)						

Таблица 6. Результаты определения НПАВ в природных водах (n = 3, P = 0.95)

нормативные значения ПДК (0.1 мг/л) (рассчитанные значения концентрации НПАВ изменялись от 0.12 до 0.29 мг/л).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. РД 52.24.439-2007. Массовая концентрация неионогенных синтетических поверхностно-активных веществ и полиэтиленгликолей в водах. Методика выполнения измерений экстракционно-фотометрическим методом. Ростов н/Д.: Росгидромет, 2007, 24 с.
- ПНД Ф 14.1:2.247-07. Количественный химический анализ вод. Методика выполнения измерений массовых концентраций неионогенных синтетических поверхностно-активных веществ (СПАВ) в пробах природных и сточных вод нефелометрическим методом. М.: ФГБУ "ФЦАО", 2016, 12 с.
- ПНД Ф 14.1:2:4.194-2003. Количественный химический анализ вод. Методика измерений массовой концентрации неионогенных поверхностно-активных веществ (НПАВ) в пробах питьевых, природных и сточных вод экстракционно-фотометрическим методом в присутствии анионоактивных ПАВ (АПАВ). М.: ФГБУ "ФЦАО", 2012, 14 с.
- Levsen K., Wagner-Redeker W., Schafer K.H., Dobberstein P. On-line liquid chromatography-mass spectrometry analysis of non-ionic surfactants // J. Chromatogr. A. 1985. V. 323. P. 135.
- Petrovic M., Fernandez-Alba A.R., Borrull F., Marce R.M., Mazo E.G., Barcelo D. Occurrence and distribution of nonionic surfactants, their degradation products, and linear alkylbenzene sulfonates in coastal waters and sediments in Spain // Environ. Toxicol. Chem. 2002. V. 21. № 1. P. 37.
- Barco M., Planas C., Palacios O., Ventura F., Rivera J., Caixach J. Simultaneous quantitative analysis of anionic, cationic, and nonionic surfactants in water by electrospray ionization mass spectrometry with flow injection analysis // Anal. Chem. 2003. V. 75. P. 5129.
- Lara Martin P.A., Gomez-Parra A., Gonzalez-Mazo E. Development of a method for the simultaneous analysis of anionic and non-ionic surfactants and their carboxylated metabolites in environmental samples by mixed-

mode liquid chromatography-mass spectrometry // J. Chromatogr. A. 2004. V. 1137. P. 188.

- Loos R., Hanke G., Umlauf G., Eisenreich S.J. LC– MS–MS analysis and occurrence of octyl- and nonylphenol, their ethoxylates and their carboxylates in Belgian and Italian textile industry, waste water treatment plant effluents and surface waters // Chemosphere. 2006. V. 66. P. 690.
- Crescenzi C., Di Corcia A., Samperi R. Determination of nonionic polyethoxylate surfactants in environmental waters by liquid chromatography/electrospray mass spectrometry // Anal. Chem. 1995. V. 67. P. 1797.
- Cantero M., Rubio S., Perez-Bendito D. Determination of non-ionic polyethoxylated surfactants in sewage sludge by coacervative extraction and ion trap liquid chromatography-mass spectrometry // J. Chromatogr. A. 2004. V. 1046. P. 147.
- Gomez V., Ferreres L., Pocurull E., Borrull F. Determination of non-ionic and anionic surfactants in environmental water matrices // Talanta. 2011. V. 84. P. 859.
- Амелин В.Г., Большаков Д.С., Третьяков А.В. Дисперсионная жидкостно-жидкостная микроэкстракция и твердофазная экстракция при извлечении полярных пестицидов из природных вод и определении их методом мицеллярной электрокинетической хроматографии // Журн. аналит. химии. 2013. Т. 68. № 5. С. 430.
- Амелин В.Г., Лаврухин Д.К., Третьяков А.В. Дисперсионная жидкостно-жидкостная микроэкстракция при определении гербицидов – производных мочевины в природных водах методом ВЭЖХ // Журн. аналит. химии. 2013. Т. 68. № 9. С. 908.
- 14. Большаков Д.С., Амелин В.Г., Третьяков А.В. Определение гербицидов и их метаболитов в природных водах методом капиллярного зонного электрофореза в сочетании с дисперсионной жидкостножидкостной микроэкстракцией и on-line концентрированием // Журн. аналит. химии. 2014. Т. 69. № 1. С. 77.
- 15. Амелин В.Г., Большаков Д.С., Андоралов А.М. Скрининг и определение пестицидов различных классов в природной воде без пробоподготовки методом ультра ВЭЖХ–квадруполь-времяпролетной масс-спектрометрии высокого разрешения // Журн. аналит. химии. 2018. Т. 73. № 3. С. 220.

— ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ —

УДК 547-326:543.572.3:543.544.43

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ СКАНИРУЮЩАЯ КАЛОРИМЕТРИЯ КАК МЕТОД КОНТРОЛЯ ПОДЛИННОСТИ РАСТИТЕЛЬНЫХ МАСЕЛ

© 2021 г. О. Б. Рудаков^{а, *}, И. А. Саранов^{ь, **}, Нгуен Ван Ань^с, Л. В. Рудакова^d, К. К. Полянский^e

^аВоронежский государственный технический университет ул. 20-летия Октября, 84, Воронеж, 394006 Россия ^bВоронежский государственный университет инженерных технологий просп. Революции, 19, Воронеж, 394036 Россия ^cБелгородский государственный национальный исследовательский университет ул. Победы, 85, Белгород, 308015 Россия ^dВоронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко ул. Студенческая, 10, Воронеж, 394000 Россия ^eВоронежский филиал Российского экономического университета им. Г.В. Плеханова ул. Карла Маркса, 67А, Воронеж, 394030 Россия *e-mail: robi57@mail.ru **e-mail: mr.saranov@mail.ru

Поступила в редакцию 09.07.2020 г. После доработки 20.08.2020 г. Принята к публикации 29.08.2020 г.

Методом дифференциальной сканирующей калориметрии (**ДСК**) изучены теплофизические свойства жидких при комнатной температуре растительных масел амаранта, кукурузы, льна, подсолнечника, рапса, расторопши, рыжика и тыквы. Установлены характеристические тепловые эффекты этих масел – температуры максимумов эндотермических пиков и их площади на термограммах ДСК. В качестве идентификационных показателей обсуждены эндотермические пики разной интенсивности на кривых плавления жидких растительных масел в диапазонах от -40 до -15° С, от -25 до -8° С, от -19 до $+6^{\circ}$ С и от -10 до $+4^{\circ}$ С. Координаты максимумов этих пиков по оси абсцисс (T_i) и их площади (S_i) значимо коррелируют с содержанием основных жирных кислот и триацилглицеринов (W_i , %), определенных методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. Показана возможность эффективно контролировать методом ДСК подлинность растительных масел.

Ключевые слова: жидкие растительные масла, дифференциальная сканирующая калориметрия, кривые плавления, обращенно-фазовая ВЭЖХ, триглицеридный состав. **DOI:** 10.31857/S0044450221020110

Теплофизические свойства твердых жиров, таких как молочный жир, масло какао, пальмовое и кокосовое масло, а также целого спектра заменителей молочного жира и масла какао изучены методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) достаточно подробно [1-4], поскольку для пищевой технологии и потребления сведения о температурах плавления и кристаллизации жиров имеют важное значение. Кроме того, молочный жир и масло какао относятся к категории дорогостоящих продуктов. Для снижения стоимости масложировой и кондитерской продукции и оптимизации технологии молочный жир и масло какао частично или полностью заменяют искусственными комбинированными жирами. Термический анализ применяют и для жидких растительных масел [5–7]. В работе [1], пожалуй, наиболее детально изучены методом ДСК теплофизические свойства 17 пищевых жиров, в том числе типичных растительных масел (РМ). Для интерпретации кривых кристаллизации и плавления в качестве подтверждающих методов использованы газожидкостная хроматография (ГЖХ) и ВЭЖХ (данные о жирнокислотном и триглицеридном составе жиров), а также химическое определение иодного числа, учтено распределение фракций триацилглицеринов (ТАГ): триненасыщенных, диненасыщенных, мононасыщенных и тринасыщенных ТАГ. В работе [1] сопоставлены данные ДСК разных РМ, однако не выполнен корреляционный анализ изменения температур максимумов и их площадей на термограммах в зависимости от химического состава РМ. Обычно для исследования РМ методом ДСК используют кривые кристаллизации, однако они хуже воспроизводятся, чем кривые плавления [2, 4].

В работах [3, 5] применяют так называемую "быструю" ДСК с градиентом температур 10-20 град/мин. При быстром нагреве пики, характеризующие тепловые эффекты, сливаются, снижается информативность термограмм, поэтому стандартная скорость нагрева или охлаждения составляет 5 град/мин. Часто в исследованиях РМ методом ДСК не приводятся хроматографические данные для подкрепления сделанных выводов, делается акцент на том, что ДСК – самодостаточный метод идентификации жиров, который не требует больших затрат времени, реактивов и растворителей, сложного оборудования, высокой квалификации персонала. Демонстрируя высокую чувствительность термограмм к изменениям жирнокислотного и триглицеридного состава, авторы цитируемых работ не обсуждают вариативность химического состава РМ, обусловленную генотипическими и фенотипическими факторами. Наконец, в работах [1-7] не предложен понятный и простой алгоритм идентификации, например, с использованием контрольных карт, визуализирующих цифровую информацию, содержащую несколько параметров термограмм [8].

Цель настоящей работы — изучение теплофизических свойств некоторых жидких растительных масел, полученных из выращенного в России сырья, с использованием кривых плавления ДСК и контрольных карт, учитывающих вариативность химического состава, для проверки подлинности этих масел.

В качестве объектов изучения выбрали подсолнечное, кукурузное, рапсовое и рыжиковое масла как недорогие сорта, и амарантовое, льняное, тыквенное и масло расторопши как масла, используемые преимущественно в качестве биологически активных добавок (БАД). БАДы на основе дорогих натуральных РМ могут фальсифицироваться или разбавляться недорогими РМ, которые в 10–20 раз дешевле.

Приоритетными методами контроля качества и подлинности жиров и масел являются капиллярная ГЖХ жирных кислот (ЖК) и обращеннофазовая ВЭЖХ триацилглицеринов, входящих в состав жировой фазы [8-18]. Триацилглицерины рассматриваемых жидких РМ содержат в сумме от 75 до 90% ненасыщенных ЖК (олеиновой, линолевой и линоленовой), 5-20% насыщенных ЖК (пальмитиновой и стеариновой) и различное количество минорных насыщенных и/или ненасыщенных ЖК [8, 9]. Покомпонентная идентификация ТАГ в различном растительном сырье методом ВЭЖХ позволила получить большую базу хроматографических данных [8–18], которую использовали в настоящей работе при интерпретации хроматограмм. В первую очередь использовали инкрементный подход, разработанный Дейнекой с соавт. [10-15] и основанный на идее аддитивности вкладов (инкрементов) функциональных групп в удерживание сорбата [15]. Этот подход не позволяет различить изомеры положения и отдельные аналогичные по хроматографическим свойствам ТАГ, но в целом он зарекомендовал себя продуктивным и хорошо согласующимся с данными других работ.

В отличие от покомпонентного анализа методами ГЖХ и ВЭЖХ, в методе ДСК в качестве идентификационных параметров и аналитических сигналов служат геометрические параметры кривых ДСК – экстремумы температур плавления или кристаллизации, площади эндо- и экзотермических пиков и их соотношения [1-4]. Преимуществом метода ДСК является простота пробоподготовки и высокая чувствительность теплофизических характеристик к составу жировой фазы. Например, ДСК смесей молочного жира и пальмового масла позволяет обнаружить 2-10% добавки последнего в молочный жир [2–4]. Аналогичные результаты получены при анализе методом ДСК смесей оливкового масла с другими более дешевыми РМ [5, 6]. По характерному профилю термограмм ДСК можно проверить не только аутентичность образца масла, но также географическое происхождение и сорт масличного растения, из которого оно выделено [6].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Образцы масел (образцы сравнения) произведены в лабораторных условиях в ФГБОУ ВО "ВГУИТ" и в ООО "Русская Олива" методом холодного отжима с применением шнекового пресса. Для проведения термического анализа использовали прибор синхронного термического анализа STA 449 F3 Jupiter® фирмы "NETZSCH" (Германия). Для анализа отбирали навески образцов РМ массой 15–22 мг. Теплофизические свойства измеряли в диапазоне температур от –150 до +20°С, скорость нагрева 5 град/мин. Систему охлаждали жидким азотом. Измерения выполняли в атмосфере гелия (расход продувочного газа 10 мл/мин, расход защитного газа 10 мл/мин). Точность измерения температуры составляла ±0.3°С.

Состав РМ анализировали методом ВЭЖХ на хроматографе Shimadzu L20 с рефрактометрическим детектором Shimadzu RID-10A (Япония). Колонка: 250 × 4.6 мм, Kromasil 100-5C18, 35°С. Элюент – смесь ацетонитрил–ацетон (15 : 85, по объему), расход 0.8 мл/мин. Идентификацию ТАГ и ЖК проводили с применением инкрементного расчета [15].

Для повышения информативности термограмм, полученных методом ДСК, использовали программное разделение суперпозиции пиков тепловых эффектов, накладывающихся друг на друга, в программе NETZSCH Peak Separation по алгоритму General.

Триацилглицерины обозначали по общепринятой схеме — буквами указывали тип ЖК с указанием их числа в ТАГ с помощью подстрочного индекса без дифференциации положения радикалов в молекуле. Буквенные обозначения кислот, входящих в состав изучаемых РМ: А — арахиновая, В — бегеновая, Е — эйкозеновая, Е'' — эруковая, L — линолевая, L'' — линоленовая, О олеиновая, Р — пальмитиновая, S — стеариновая кислота. Например, L₂O обозначает ТАГ, образованный двумя радикалами линолевой и одним радикалом олеиновой кислоты.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 и 2 приведены кривые плавления ДСК образцов РМ и хроматограммы ТАГ. На термограммах плавления ДСК масел можно выделить от 2 до 4 характеристичных эндотермических максимумов, которые имеют различную амплитуду и геометрию, расположены на различных расстояниях по оси температур; пики имеют отличающиеся по величине площади (S_i), которые также несут в себе идентификационные признаки.

Для более точного определения T_i слабо выраженных термических эффектов, так называемых "плеч" на основных пиках, применяли вторые производные от ДСК по времени (см. пример на рис. 2д). Наиболее интенсивный пик, а точнее суперпозиция неразделенных пиков, на термограммах ДСК, имеющий ассиметричную форму, расположен в диапазоне примерно от -30 до -20° С, окончание плавления происходит в диапазоне от -10 до $+5^{\circ}$ С. В связи с плохим разделением суперпозиции пиков эндотермических эффектов РМ их программно разделяли на 2-4 пика и рассчитывали относительные площади S_i (%). На рис. 3 приведены примеры программного разделения пиков на термограммах ДСК плавления.

В табл. 1 приведены установленные величины теплофизических характеристик исследуемых образцов РМ – T_i и S_i . В табл. 2 представлены результаты идентификации ТАГ, а в табл. 3 – обнаруженные ЖК. Отметим, что в табл. 2 и 3 приведены наши данные, полученные для конкретных образцов РМ, теплофизические свойства которых определяли в данной работе. Это важно, так как теплофизические свойства масел чутко реагируют на химический состав жиров, который может заметно варьировать даже для РМ одного и того же вида растений в зависимости от генотипа и фенотипа [8, 9]. Хроматографические данные находятся в типичных диапазонах содержания ЖК, нормируемых или установленных ранее для рассматриваемых видов РМ [8, 9], отсутствуют данные о ЖК, содержание которых <1%. Детальную интерпретацию кривых ДСК осложняет наличие полиморфизма, взаимной растворимости различных фракций ТАГ, образующиеся эвтектики. Однако как показал корреляционный анализ для взятой выборки РМ, между химическим составом РМ и эндотермическими эффектами прослеживаются значимые корреляции. В работе [1] показано, что жидкие пищевые РМ, содержащие в своем составе 61-81% триненасыщенных ТАГ (UUU) и 35-17% диненасыщенных, мононасыщенных ТАГ (UUS), такие как оливковое, каноловое масло и др., имеют на кривых плавления ДСК ярко выраженный эндотермический пик в области от -42 до $+6^{\circ}$ С, на плечах которого слева и справа можно выделить как минимум еще два пика. В указанном диапазоне температур наблюдаются основные тепловые эффекты и в исследуемых нами PM, у которых сумма ТАГ (UUU) составляет от 84 до 44%, а ТАГ (UUS) - 16-40%. Кроме этих ТАГ, в РМ присутствует несколько процентов мононенасыщенных, динасыщенных ТАГ (USS) и незначительное или следовое количество тринасыщенных ТАГ (SSS), которые имеют более высокие температуры плавления, чем ТАГ (UUU) и ТАГ (UUS) (табл. 2).

Следует отметить индивидуальный характер сочетания температур максимумов (T_i) и площадей (S_i) на кривых РМ, что позволяет использовать эти теплофизические параметры для качественной идентификации.

Триглицеридный состав РМ в табл. 2 ранжирован по величине эквивалентного углеродного числа NEC, который в первом приближении прогнозирует диапазон плавления и хроматографического поведения ТАГ [18]. Чем ниже величина NEC, тем ниже температура плавления ТАГ, тем меньше его время удерживания при обращеннофазовой ВЭЖХ. В табл. 4 приведены обнаруженные значимые линейные корреляции (1)-(32) между теплофизическими свойствами РМ и химическим составом (коэффициенты парной корреляции R > 0.50). Конечно, наблюдаемые частные тренды (1)–(32) нельзя считать репрезентативными для больших баз данных по свойствам РМ, вместе с тем установленные тенденции позволяют интерпретировать теплофизические свойства РМ и помогают проверить их подлинность.

Максимум при T_1 . Как видно из табл. 1, максимум пика при T_1 слабо варьирует от $-39 \text{ до} -33^{\circ}$ С, его относительная площадь S_1 также изменяется в зависимости от вида РМ незначительно в области 12-16%, асимбатно уменьшаясь при увеличении суммы ТАГ (UUS) и симбатно возрастая с увеличением в РМ доли L_3 (табл. 4). Таким образом, этот пик можно отнести прежде всего к фракции ТАГ (UUU) с наименьшими температурами плавления и NEC ≤ 41.4 .



Рис. 1. Термограммы ДСК плавления и хроматограммы ВЭЖХ растительных масел из рыжика (а), расторопши (б), рапса (в), подсолнечника (г).

Максимум при T_2 . Второй пик с максимумом при T_2 от -28.5 до -21.5° С имеет наибольшую площадь S_2 , которая варьирует от 32 до 72%. Его формирует смесь фракций ТАГ (UUU) и ТАГ (UUS). Площадь S_2 растет при увеличении в РМ доли линолевой кислоты и ТАГ, в которых присутствует остаток этой кислоты – L_3 , L_2O , LOP, при этом возрастание доли LOP приводит к смещению максимума пика в область более высоких температур. Увеличение всей суммы ТАГ (UUS) в целом снижает площадь S_2 за счет включения в состав ТАГ остатков стеариновой и других насы-



Рис. 2. Термограммы ДСК плавления и хроматограммы ВЭЖХ растительных масел из льна (а), амаранта (б), тыквы (в), кукурузы (г); вторая производная кривой ДСК плавления кукурузного масла (д).

щенных ЖК. NEC этих ТАГ находится, как правило, в области от 41.6 до 45.6.

Максимум при T_3 смещается от -19 до -6° С. Его площадь (S_3) для жидких РМ может изменяться в зависимости от вида РМ в самом широком диапазоне — от 6 до 77.5%. Он формируется смесью, содержащей преимущественно ТАГ (UUS), но с примесью ТАГ (UUU) и ТАГ (USS). Увеличение доли олеиновой, пальмитиновой и стеариновой кислот и суммы ТАГ (USS) смещает максимум пика в область более высоких температур. Площадь S_3 симбатно растет при увеличении в ТАГ доли оле-





Рис. 3. Термограммы ДСК плавления с компьютерным разделением пиков: (а) – льняное масло; (б) – масло расторопши.

иновой и пальмитиновой кислот (O₃, LP₂) и асимбатно уменьшается при увеличении доли линолевой и линоленовой кислот в составе ТАГ. Эту область плавления можно отнести к фракции ТАГ, для которых характерны значения NEC от 45.8 до 48.8.

Максимум при T_4 . Этот пик образуют прежде всего фракции ТАГ (USS) и ТАГ (SSS). Если этот пик находится в области положительных температур, то в нем преобладают ТАГ (SSS), содержащие пальмитиновую и стеариновую кислоты. Площадь S_4 растет симбатно сумме ТАГ (USS) и ТАГ (SSS). Для ТАГ, формирующих этот пик, характерны значения NEC от 48 до 52.

Анализ реальных проб рассматривали на примере масла расторопши. В качестве образца сравнения использовали полученный нами образец масла (ВГУИТ). Один образец, полученный под контролем авторов, предоставлен ООО "Русская олива". Третий образец приобрели в торговой сети. Кроме этого, из третьего образца приготовили две смеси с 10% подсолнечного и кукурузного масел. Результаты определения теплофизических характеристик приведены в табл. 1. Для визуализации и анализа данных построили контрольные карты (**КК**) с нормализованными параметрами T_i и S_i в виде диаграмм, на оси ординат которых отложены нормализованные значения T_i и S_i (рис. 4):

$$X_{\rm H} = (X - X_{\rm MUH})/(X_{\rm MAKC} - X_{\rm MUH}),$$

а ось абсцисс является осью категорий, на которой обозначены контролируемые параметры. Известно, что натуральный состав РМ варьирует в достаточно широких пределах в зависимости от генотипических и фенотипических факторов [8, 9], что несколько усложняет контроль подлинности продукции. В связи с этим, учитывая типичный



Рис. 4. Контрольные карты для масла расторопши: 1 – нормализованные значения T_i (а) и S_i (б), образец сравнения; 2 – образец ООО "Олива"; 3 – образец из торговой сети; 4 – образец 3 с подсолнечным маслом (9 : 1); 5 – образец 3 с кукурузным маслом (9 : 1).

r								
Растительное масло	T_1	T_2	T_3	T_4	S_1	S_2	S_3	S_4
Амарант	-39.3*	-22.6	-6.3*	4.2*	12.1	55.0	29.4	3.5
Лён	-38.2*	-28.5	-19.1*	-7.4	14.1	60.2	21.0	4.8
Подсолнечник	-36.4	-27.4	-18.8*	-10.7	15.3	71.8	8.4	4.5
Рапс	_	-23.0*	-15.4	_	_	22.5	77.5	_
Рыжик	-34.6	-23.8*	-12.8	_	14.1	21.3	64.6	_
Тыква	-36.6	-23.1	-16.3*	3.8*	16.1	50.4	5.8	16.1
Кукуруза	-33.2	-21.5	-7.0*	_	12.9	32.1	55.0	_
Расторопша (ВГУИТ), образец 1	-35.7	-24.9	-18.2*	-6.2*	13.5	35.2	33	18.4
Расторопша (ООО "Русская олива", образец 2	-34.8	-21.7	-15.1*	-5.8*	11.9	40.5	28.5	21.0
Расторопша (торговая сеть), образец 3	-38.3	-26.6	-20*	-3.7*	14.3	12.1	49.6	23.9
Расторопша, образец 3 + подсолнечник (9 : 1)	-40.3	-21.4	-10.5*	0.4*	19.3	28.5	7.8	14.3
Расторопша, образец 3 + кукуруза (9:1)	-35.5	-28.1	-22.5*	-13.3*	7.8	3.6	64.4	24.2

Таблица 1. Температуры максимумов (T_i , °C) и площади (S_i , %) характеристичных пиков кривых плавления ДСК растительных масел

*Значения температур определены по второй производной от ДСК по времени.

разброс в химическом составе РМ, который будет влиять на вид кривых ДСК, в КК выделили коридор допустимых значений, составляющий ±15% от значений T_i и S_i, характерных для образца сравнения. В нормализованном виде минимально допустимое значение равно 0, максимальное -1, идеальное совпадение соответствует 0.5. Как видно из рис. 4, в коридор допустимых значений от 0 до 1 попадает только образец 2. В образце 3 заметно ниже коридора находятся значения T_4 и S_3 , и завышено значение S_2 . Добавка к этому образцу подсолнечного масла приводит к занижению значения T_3 , выравниванию до нормы S_2 и резкому снижению T_4 при завышенном значении S_1 и заниженном значении S_3 . Внесение кукурузного масла приводит к дополнительному падению нормализованных значений T₄ и S₃ и завышению величины S₂ относительно допустимого уровня. В самом общем виде такие изменения кривых ДСК для образца 3 и его смесей с подсолнечным и кукурузным маслами можно интерпретировать завышенной по сравнению с натуральным маслом расторопши долей в них ТАГ (UUU), в частности L_3 , и заниженной долей ТАГ (SSS). Сопоставление полученных данных позволяет предположить, что образец масла расторопши, приобретенный в розничной сети, содержал добавку около 5% кукурузного масла.

Таким образом, современные разработки в области термического анализа растительных масел методом ДСК демонстрируют его широкие возможности в идентификации и контроле качества растительных масел. Метод ДСК позволяет характеризовать теплофизические свойства образцов масла, важные в технологии их получения и применения в фармацевтической, пищевой и технической отраслях. Выполненные исследования подтверждают тот факт, что жировая фаза каждого растительного масла имеет свое неповторимое соотношение теплофизических характеристик, которое взаимосвязано с определенным фракционным составом триацилглицеринов. Метод идентификации растительных масел по термограммам плавления ДСК отличается простотой пробоподготовки и хорошей воспроизводимостью, предоставляет дополнительную информацию о происхождении сырья к полученной с помощью хроматографических методов, и может быть самостоятельным методом идентификации и контроля качества жировой фазы.

* * *

Авторы выражают благодарность канд. биол. наук Мирошниченко Л.А. (ООО "Русская Олива") за предоставленные образцы растительных масел.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта № МК-590.2020.8.

Таблица 2. Триглицеридный состав образцов растительных масел

Триглицерид	NEC*	Рыжик	Лён	Рапс	Подсолнечник	Амарант	Тыква	Расторопша	Кукуруза
L'' ₃	35.4	4.6	22.6	1.2	0	0	0	0	0
L''2L	37.4	4.5	11.4	1	0	0	0	0	0
L"L ₂	39.4	3.1	3.7	3.8	0	0	0	0	3.7
L''20	39.4	4.9	13.9	7.7	0	0	0	0	1.9
L''_P	39.6	3.0	7.0	0.6	0	0	0	0	0
L ₃	41.4	3.3	1.5	1.4	33.0	12.0	14.2	15.6	30.7
L"LO	41.4	12.7	5.4	6.5	0	0	0	0	5.7
L' ₂ E	41.4	9.8	0	0	0	0	0	0	0
L"LP+L" ₂ S	41.6	4.1	8.5	1.2	0	0	0	0	0
L ₂ O	43.4	2.5	2	9.1	26	16.4	19.6	20.5	15
L"O ₂	43.4	3.2	6.9	8.9	0	0	0	0	0
L"LE	43.4	4.9	0	0	0	0	0	0	0
$L'LS + L_2P$	43.6	4.2	0	1.2	0	0	0	0	0
L"OP	43.6	1.8	3.6	2	0	0	0	0	0
L"P ₂	43.8	2.7	0	0	0	0	0	0	0
L ₂ P	43.6	0	0	0	9.8	15.8	14.3	8.4	0
LO ₂	45.4	6.2	2.5	18.7	9.3	10.2	10.7	11.6	12
L_2E	45.4	3.9	0	0	0	0	0	1.6	0
L_2S	45.6	3.9	2.7	0	4.8	3.7	5.2	7.1	5.7
LOP	45.6	2.3	0	3.7	4.3	11.4	10.3	6.7	5.9
LOP + L''OS	45.6	0	4	0	0	0	0	0	0
LP ₂	45.8	2.3	0.9	0	0.8	6.4	3.8	1.8	2
L"OE	45.4	2	0	0	0	0	0	0	0
L"OA	47.6	0	0	1.6	0	0	0	0	0
LPS	45.8	0	0	0	0	3.2	4.0	0	0
O ₃	47.4	5.2	2.4	24.2	6.5	5	3.9	8.1	7.8
LOS	47.4	0	0	0	1.9	3.1	5.3	5.8	2.5
O ₂ P	47.6	1.5	1	3.9	2.0	4.0	2.6	1.7	2.6
P ₃	48.0	0	0	0	0.9	1.3	1.3	1.6	0.3
OP2	48.8	0	0	0	0	2.1	1.2	0	2.8
LS ₂	49.8	0	0	0	0	2.0	0	0	0
OPS	49.8	0	0	0	0	2.3	1.2	0.9	0.5
O ₂ E	49.4	0	0	1.5	0	0	0	1.7	0
O ₂ S	50.4	0	0	1.8	0.7	1.1	2.4	2.0	0.9
O ₂ E"	51.4	3.4	0	0	0	0	0	0	0
LOB	51.6	0	0	0	0	0	0	2.2	0
S ₂ O	51.8	0	0	0	0	0	0	0.9	0
LPB	51.8	0	0	0	0	0	0	0.6	0
PS ₂	52.0	0	0	0	0	0	0	1.2	0
ΣΤΑΓ (UUU)		72.2	72.3	84.0	74.8	43.6	48.4	59.1	76.8
ΣΤΑΓ (UUS)		20.8	26.8	16	23.5	39.1	40.1	33.9	17.6
ΣΤΑΓ (USS)		7	0.9	0	0.8	16	10.2	4.1	5.3
ΣΤΑΓ (SSS)		0	0	0	0.9	1.3	1.3	2.9	0.3

*NEC = NC – 2.0ND – 0.2NAl, где NC – общее количество атомов углерода в остатках ЖК, ND – общее количество двойных связей входящих в структуру ТАГ, а NAl – количество ненасыщенных ЖК в молекуле [18].

ЖК	Амарант	Лён	Подсолнечник	Кукуруза	Рапс	Расторопша	Рыжик	Тыква
Пальмитиновая (С16:0)	17.9	8.3	6.5	12.3	4.4	9.7	9.0	13.3
Стеариновая (С18:0)	5.3	1.4	2.8	2.0	1.4	6.1	2.8	6.4
Олеиновая (С18:1)	25.2	18.7	23.3	27.8	58.6	28.3	20	27.7
Линолевая (С18:2)	49.1	16.9	66.4	54.1	20.1	50.4	21.6	52.6
α-Линоленовая (С18:3)	1.3	54.6	—	1.9	11.6	—	32.3	—
Арахиновая (С20:0)	—	—	—	-	_	1.7	1.3	—
Эйказеновая (С20:1)	—	—	—	-	_	1.0	11.1	—
Бегеновая (С22:0)	—	—	—	—	_	1.6	_	_

Таблица 3. Состав жирных кислот исследуемых образцов растительных масел (W, %)

Таблица 4. Значимые корреляции между теплофизическими свойствами растительных масел и содержанием фракций триацилглицеринов и отдельных жирных кислот: $T_i = ax + b$ и $S_i = ax + b$ (n = 8, P = 0.95)

Тренд	R	x/y	Тренд	R
y = -0.6x + 69.2(1)	-0.96	O_3/S_3	y = 2.6x + 13.6(17)	0.71
y = -0.3x + 27.0 (2)	-0.85	$L3 + L_2O/S_2$	y = 0.6x + 31.2 (18)	0.60
y = 0.4x - 5.3 (3)	0.69	$L3 + L2O/S_3$	y = -0.9x + 56.1 (19)	-0.64
y = -0.4x + 29.3 (4)	-0.57	$LP_{2} + O_{3}/S_{3}$	y = 2.8x + 5.4 (20)	0.69
y = -2.0x + 89.9(5)	-0.66	P/T_3	y = 0.9x - 26.6 (21)	0.92
y = 1.0x - 27.9 (6)	0.53	P/T_4	y = 1.0x - 18.4 (22)	0.77
y = 0.7x - 17.4(7)	0.73	S/T_3	y = 1.5x - 22.7 (23)	0.69
y = 0.8x - 6.8 (8)	0.76	S/T_4	y = 1.7x - 14.6 (24)	0.67
y = 0.5x - 17.1 (9)	0.64	S/S_4	y = 1.6x + 3.7 (25)	0.53
y = 0.8x - 8.1 (10)	0.83	O/T_3	y = 0.7x - 32.9 (26)	0.57
y = 4.5x - 7.5 (11)	0.69	O/S_3	y = 1.2x - 0.7 (27)	0.60
y = 3.8x + 5.8 (12)	0.58	O/S_4	y = 1.4x - 24.2 (28)	0.77
y = 0.3x + 11.6 (13)	0.58	L/S_2	y = 0.6x + 22.9 (29)	0.59
y = 0.9x + 33.6 (14)	0.63	L/S_3	y = -1.0x + 72.1 (30)	-0.59
y = -1.6x + 52.5 (15)	-0.65	L"/ <i>T</i> ₂	y = -0.2x - 22.8 (31)	-0.73
y = 0.5x - 26.6 (16)	0.69	L''/T_3	y = -0.2x - 8.2 (32)	-0.90
	Тренд y = -0.6x + 69.2 (1) y = -0.3x + 27.0 (2) y = 0.4x - 5.3 (3) y = -0.4x + 29.3 (4) y = -2.0x + 89.9 (5) y = 1.0x - 27.9 (6) y = 0.7x - 17.4 (7) y = 0.8x - 6.8 (8) y = 0.5x - 17.1 (9) y = 0.8x - 8.1 (10) y = 4.5x - 7.5 (11) y = 0.3x + 11.6 (13) y = 0.9x + 33.6 (14) y = 0.5x - 26.6 (16)	Тренд R $y = -0.6x + 69.2 (1)$ -0.96 $y = -0.3x + 27.0 (2)$ -0.85 $y = 0.4x - 5.3 (3)$ 0.69 $y = -2.0x + 89.9 (5)$ -0.66 $y = 1.0x - 27.9 (6)$ 0.53 $y = 0.7x - 17.4 (7)$ 0.73 $y = 0.5x - 17.1 (9)$ 0.64 $y = 4.5x - 7.5 (11)$ 0.69 $y = 0.3x + 11.6 (13)$ 0.58 $y = 0.5x - 26.6 (16)$ 0.69	Тренд R x/y $y = -0.6x + 69.2 (1)$ -0.96 O_3/S_3 $y = -0.3x + 27.0 (2)$ -0.85 $L3 + L_2O/S_2$ $y = 0.4x - 5.3 (3)$ 0.69 $L3 + L2O/S_3$ $y = -0.4x + 29.3 (4)$ -0.57 $LP_2 + O_3/S_3$ $y = -2.0x + 89.9 (5)$ -0.66 P/T_3 $y = 1.0x - 27.9 (6)$ 0.53 P/T_4 $y = 0.7x - 17.4 (7)$ 0.73 S/T_3 $y = 0.5x - 17.1 (9)$ 0.64 S/S_4 $y = 0.8x - 6.8 (8)$ 0.76 S/T_4 $y = 0.5x - 17.1 (9)$ 0.64 S/S_4 $y = 0.3x + 11.6 (13)$ 0.58 L/S_2 $y = 0.9x + 33.6 (14)$ 0.63 L/S_3 $y = 0.5x - 26.6 (16)$ 0.69 L''/T_3	ТрендR x/y Тренд $y = -0.6x + 69.2 (1)$ -0.96 O_3/S_3 $y = 2.6x + 13.6 (17)$ $y = -0.3x + 27.0 (2)$ -0.85 $L3 + L_2O/S_2$ $y = 0.6x + 31.2 (18)$ $y = 0.4x - 5.3 (3)$ 0.69 $L3 + L2O/S_3$ $y = -0.9x + 56.1 (19)$ $y = -0.4x + 29.3 (4)$ -0.57 $LP_2 + O_3/S_3$ $y = 2.8x + 5.4 (20)$ $y = -2.0x + 89.9 (5)$ -0.66 P/T_3 $y = 0.9x - 26.6 (21)$ $y = 1.0x - 27.9 (6)$ 0.53 P/T_4 $y = 1.0x - 18.4 (22)$ $y = 0.7x - 17.4 (7)$ 0.73 S/T_3 $y = 1.5x - 22.7 (23)$ $y = 0.8x - 6.8 (8)$ 0.76 S/T_4 $y = 1.6x + 3.7 (25)$ $y = 0.8x - 8.1 (10)$ 0.83 O/T_3 $y = 0.7x - 32.9 (26)$ $y = 0.3x + 11.6 (13)$ 0.58 L/S_2 $y = 0.6x + 22.9 (29)$ $y = 0.9x + 33.6 (14)$ 0.63 L/S_3 $y = -1.0x + 72.1 (30)$ $y = 0.5x - 26.6 (16)$ 0.69 L''/T_3 $y = -0.2x - 8.2 (32)$

*n = 3.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. *Tan C.P., Cheman Y.B.* Differential scanning calorimetric analysis of edible oils: comparison of thermal properties and chemical composition // J. Am. Oil Chem. Soc. 2000. V. 77. № 2. P. 143.
- 2. *Tomaszewska-Gras J.* Rapid quantitative determination of butter adulteration with palm oil using the DSC technique // Food Control. 2016. V. 60. № 2. P. 629.
- 3. Верещагин А.Л., Резниченко И.Ю., Бычин Н.В. Термический анализ в исследовании качества шоколада и кондитерских изделий // Техника и технология пищевых производств. 2019. Т. 49. № 2. С. 289.
- 4. *Рудаков О.Б., Саранов И.А., Полянский К.К.* Контроль содержания пальмового масла в смесях с молочным жиром методом ДСК // Аналитика и контроль. 2019. Т. 23. № 1. С. 127.

- 5. Van Wetten I.A., Van Herwaarden A.W., Splinter R., Boerrigter-Eenling R., Van Ruth S.M. Detection of sunflower oil in extra virgin olive oil by fast differential scanning calorimetry // Thermochim. Acta. 2015. V. 603. № SI. P. 237.
- Chatziantoniou S.E., Triantafillou D.J., Karayannakidis P.D., Diamantopoulos E. Traceability monitoring of Greek extra virgin olive oil by Differential Scanning Calorimetry // Thermochim. Acta. 2014. V. 576. P. 9.
- Zhang Zhen-Shan, Li Dong, Zhang Li-Xia, Liu Yu-Lan, Wang Xue-De. Heating effect on the DSC melting curve of flaxseed oil // J. Therm. Anal. Calorim. 2014. V. 117. № 3. P. 2129.
- 8. Рудаков О.Б., Пономарев А.Н., Полянский К.К., Любарь А.В. Жиры. Химический состав и экспертиза качества. М.: ДеЛи Принт, 2005. 312 с.

- О'Брайен Р. Жиры и масла. Производство, состав и свойство, применение. СПб: Профессия, 2007. 752 с.
- 10. Дейнека В.И., Туртыгин А.В., Дейнека Л.А. Сопоставление эффективности методов ГЖХ и ВЭЖХ при дифференциации растительных масел, содержащих изомеры октадекатриеновых кислот // Аналитика и контроль. 2016. Т. 20. № 4. С. 314.
- 11. Ань В.Н., Дейнека В.И., Хиен Ч.Т.Н., Дейнека Л.А., Рудаков О.Б. Установление подлинности сыров методом обращенно-фазовой ВЭЖХ // Сорбционные и хроматографические процессы. 2018. Т. 18. № 6. С. 816.
- Ань Ван Нгуен, Дейнека В.И., Лонг Куок Фам, Фыонг Лан Доан, Дейнека Л.А., Ань Тхи Нгок Ву, Тхуи Тхи Тху Динь. Определение триацилглицеринов и жирнокислотного состава масла семян Momordica cochinchinensis и некоторых других растений данного рода // Химия растительного сырья. 2019. № 3. С. 53.
- 13. *Нгуен А.В., Попова А.А., Дейнека В.И., Дейнека Л.А.* Определение триацилглицеринов масла манкетти методом обращенно-фазовой ВЭЖХ // Журн. аналит. химии. 2017. Т. 72. № 9. С. 854. (*An Nguen Van, Popova A.A., Deineka V.I., Deineka L.A.* Determination of triacylglycerols of manketti oil by reversed-phase HPLC // J. Analyt. Chem. 2017. V. 72. № 9. Р. 1007.)

- Дейнека В.И., Дейнека Л.А., Анисимович И.П., Перистый В.А., Туртыгин А.В. Использование обращенно-фазовой ВЭЖХ в установлении подлинности жиров и масел // Заводск. лаборатория. 2008. Т. 74. № 3. С. 15.
- 15. Дейнека В.И., Староверов В.М., Фофанов Г.М., Балятинская Л.Н. Инкрементный подход при определении состава триглицеридов // Химико-фармацевтический журнал. 2002. Т. 36. № 7. С. 50. (Deineka V.I., Staroverov V.M., Fofanov G.M., Balyatinskaya L.N. An increment approach to the HPLC analysis of triglycerides // Pharm. Chem. J. 2002. V. 36. № 7. С. 392.)
- 16. Andrikopoulos N.K. Chromatographic and spectroscopic methods in the analysis of triacylglycerol species and regiospecific isomers of oils and fats // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2002. V. 42. № 5. P. 473.
- 17. Jabeur H., Zribi A., Makni J., Rebai A., Abdelhedi R., Bouaziz M. Detection of chemlali extra-virgin olive oil adulteration mixed with soybean oil, corn oil, and sunflower oil by using GC and HPLC // J. Agric. Food Chem. 2014. V. 62. № 21. P. 4893.
- Podlaha O., Toregerd B. System for identification of triglycerides in reversed phase HPLC chromatograms based on equivalent carbon numbers // J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun. 1982. V. 5. P. 553.