

СОДЕРЖАНИЕ

Том 77, номер 12, 2022

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Определение щелочных и щелочноземельных металлов в водах методом атомно-эмиссионной спектроскопии с микроволновой плазмой с добавлением стабилизирующего элемента
М. А. Васильева, Е. В. Полякова 1065
- Определение стероидных гормонов в слюне человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием
Е. В. Дмитриева, А. З. Темердашев 1073
- Определение фенолов методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии с предварительным сорбционным концентрированием на магнитном гидрофобизированном кремнеземе
Ю. В. Карсакова, А. И. Фролова, Т. И. Тихомирова, Г. И. Цизин 1080
- Сравнительная характеристика до- и послеоперационных профилей летучих органических соединений из выдыхаемого воздуха пациентов с раком легких и с доброкачественными опухолями
Э. М. Гашимова, А. З. Темердашев, В. А. Порханов, И. С. Поляков, Д. В. Перунов 1087
- Сравнение результатов анализа раствора силильных производных высушенных образцов конденсата выдыхаемого воздуха больных бронхиальной астмой, ХОБЛ и здоровых добровольцев методом газовой хроматографии-масс-спектрометрии
А. И. Ревельский, А. С. Самохин, Э. Х. Анаев 1094
- Определение аминспиртов в виде силильных производных с тремя дериватирующими реагентами методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием
И. В. Новикова, Р. И. Новиков, Ж. В. Смирнова, С. С. Алексенко, В. Б. Кондратьев 1102
- Аналитические особенности поликапиллярных газохроматографических колонок с капиллярами 25 мкм
И. И. Науменко, А. П. Ефименко, В. М. Грузнов 1112
- Оценка возможности применения “электронного носа” для мониторинга отклонений при функциональном ожирении детей в условиях стационара. Неинвазивная диагностика без отбора биопроб
Т. А. Кучменко, Е. С. Доровская, Д. А. Менжулина, Т. В. Чубаров 1120
- Определение бензоата натрия в жидкостях пьезоэлектрическим сенсором, модифицированным молекулярно-импринтированным полимером
А. Н. Зяблов, Ву Хоанг Иен 1133
- Соотношения стабильных изотопов (Н, С, О) в образцах меда из разных регионов России
Д. А. Калашикова, Г. В. Симонова 1138
- ## ИСТОРИЯ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ
- О первом издании избранных трудов М.С. Цвета по хроматографии
Е. М. Сенченкова 1147
- ## ХРОНИКА
- Московский семинар по аналитической химии 1154
- Юбилей профессора В.Н. Майстренко 1157
-
-

УДК 543.423.1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЩЕЛОЧНЫХ И ЩЕЛОЧНОЗЕМЕЛЬНЫХ МЕТАЛЛОВ В ВОДАХ МЕТОДОМ АТОМНО-ЭМИССИОННОЙ СПЕКТРОМЕТРИИ С МИКРОВОЛНОВОЙ ПЛАЗМОЙ С ДОБАВЛЕНИЕМ СТАБИЛИЗИРУЮЩЕГО ЭЛЕМЕНТА

© 2022 г. М. А. Васильева^{a, b}, Е. В. Полякова^{a, b, *}^aНовосибирский национальный исследовательский государственный университет
ул. Пирогова, 1, Новосибирск, 630090 Россия^bИнститут неорганической химии им. А.В. Николаева Сибирского отделения Российской академии наук
просп. Академика Лаврентьева, 3, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: e.polyakova.niic@gmail.com

Поступила в редакцию 14.02.2022 г.

После доработки 19.04.2022 г.

Принята к публикации 19.05.2022 г.

В атомно-эмиссионной спектроскопии с азотной микроволновой плазмой интенсивности аналитических линий с низкими энергиями возбуждения увеличиваются в присутствии легкоионизируемых элементов. Для компенсации этого эффекта при определении щелочных и щелочноземельных металлов предложено добавлять в растворы проб и в градуировочные растворы дополнительные матричные элементы с потенциалами ионизации менее 6 эВ (Rb, Ba, Sm, La, Eu, In, Al, Ga). Концентрацию дополнительного элемента выбирали, исходя из постоянства аналитических сигналов аналитов и магниевого отношения $Mg(II)/Mg(I)$; она составила 75–100 мг/л. Такая концентрация недостаточна для значимого изменения температуры или электронной плотности, т.е. добавленный элемент не является спектральным буфером. Прием применен при анализе поровых вод донных отложений озера Б. Баган (солонцеватый тип минерализации), правильность анализа подтверждена способом введено–найденно.

Ключевые слова: АЭС МП, матричные влияния, спектральный буфер, легкоионизируемые элементы.

DOI: 10.31857/S0044450222120179

В последнее время атомно-эмиссионную спектроскопию с микроволновой плазмой (АЭС-МП) все чаще используют для решения аналитических задач [1–3]. Основной проблемой, мешающей распространению метода, на наш взгляд, являются матричные эффекты, в той или иной степени присущие всем вариантам атомно-эмиссионной спектроскопии. Систематические исследования процессов, происходящих в азотной микроволновой плазме атмосферного давления, или механизмов возбуждения тех или иных линий, в литературе не описаны, однако имеются работы, посвященные матричным эффектам [4–6]. В настоящее время известно, что наибольший матричный эффект в микроволновой плазме оказывают элементы с низким первым потенциалом ионизации [6] (в отличие от индуктивно связанной плазмы, где наибольшую роль играет второй потенциал ионизации [7, 8]). Это не только щелочные металлы (большинство исследователей демонстрируют такие эффекты на примере натрия [9, 10]), но и любые элементы с $E_{\text{ион}}$ 4–6 эВ.

Что касается самих аналитических линий, то увеличение интенсивности сигналов наблюдается для линий с энергией возбуждения ($E_{\text{возб}}$) < 4 эВ, а для линий с большей $E_{\text{возб}}$ сигналы, напротив, снижаются. Это также является причиной высоких пределов обнаружения (ПО) в МП таких неметаллов, как Si, P, As, Se, Te, S и др. Аналогичное поведение сигналов примесей наблюдается и в аргонной МП [10].

Природные воды – обширная группа объектов, традиционно считающихся “несложными” для анализа ввиду простой пробоподготовки. Высокие ПО тяжелых металлов не позволяют использовать АЭС-МП для определения качества питьевой воды [11], однако в экологических исследованиях природных вод зачастую требуется определение основных металлов, в частности щелочных и щелочноземельных. Эти элементы с энергией ионизации 4.34 эВ (K)–7.64 эВ (Mg), присутствующие в различных количествах, существенно влияют на аналитические сигналы (АС) друг друга, что приводит к неправильным резуль-

Таблица 1. Выбранные аналитические линии

Элемент, линия	$E_{\text{возб}}$, эВ	$E_{\text{ион}}$, эВ
K(I)769.897	1.61	4.339
K(I)766.491	1.62	
Li(I)670.784	1.85	5.390
Na(I)589.592	2.1	5.138
Na(I)588.995	2.11	
Ba(I)553.548	2.24	5.210
Ba(II)493.408	2.51	
Ba(II)455.403	2.72	
Ca(I)422.673	2.93	6.111
Ca(II)396.847	3.12	
Ca(II)393.366	3.15	
Mg(I)285.213	4.34	7.644
Mg(I)383.829	5.94	
Mg(II)280.271	4.42	
Mg(II)279.553	4.43	

татам даже при разбавлении пробы. Для коррекции матричных влияний в АЭС-анализе используют различные способы:

- Классический прием – использование адекватных образцов сравнения [12, 13] (уравнивание матричного состава проб и градуировочных растворов) – неприменим при анализе природных объектов, где в одной партии образцы могут значительно отличаться по составу;

- Применение внутреннего стандарта в АЭС-МП [14, 15] осложняется необходимостью тщательно подбирать внутренние стандарты по энергиям возбуждения и ионизации, с тем чтобы изменение сигналов в присутствии матричных элементов было одинаковым. Такой способ хорош при определении малых количеств элементов;

- Метод добавок [16] трудоемок, особенно при анализе большой серии образцов, к тому же требует линейного вида градуировочной функции. Для щелочных и щелочноземельных металлов линейный диапазон в МП мал.

- Спектральные буферы традиционно применялись в пламенной атомно-абсорбционной спектроскопии [17] и дуговым варианте АЭС [18–20] для подавления ионизации аналитов, при этом концентрация такой добавки составляла более 1%. В настоящее время использование солей цезия (>1%) в качестве спектрального буфера рекомендовано в том числе и производителями МП-спектрометров [21–23].

Последний способ – наиболее простой, так как растворы буфера и пробы подаются из разных пробирок и смешиваются при помощи Y-образного приспособления перед попаданием в распы-

лительную камеру. Однако высокое содержание цезия в таких растворах не только влияет на срок службы горелки, но и значительно снижает интенсивность ионных линий за счет смещения равновесия атом–ион.

При анализе проб, в которых содержание элементов значительно варьирует, возможно “уравнять” их состав введением элемента, концентрация которого будет выше, чем собственных матричных элементов, но не настолько, чтобы общее содержание солей приблизилось к критическому значению.

Цель данной работы – изучение возможности использования элементов с потенциалами ионизации <6 эВ в качестве дополнительных стабилизирующих элементов в АЭС-МП для определения щелочных и щелочноземельных металлов (Ca, Mg, Ba, K, Na, Li).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Оборудование и реактивы. Работа выполнена на атомно-эмиссионном спектрометре с микроволновой плазмой Agilent 4100 MP-AES (Agilent Technologies, США). Для получения плазмообразующего газа – азота использовали генератор 4107 Nitrogen Generator (Agilent Technologies, США). Мощность плазмы 1 кВт (фиксирована). Давление азота в распылителе и положение просмотра (0 соответствует центру горелки) для всех аналитических линий каждого из определяемых элементов оптимизировали с помощью встроенных в программное обеспечение функций. Выбранное давление составило 240 кПа (возможный диапазон 80–240 кПа), а положение просмотра – 0 для всех элементов (для линий кальция положение просмотра составило 120). Выбранные аналитические линии приведены в табл. 1.

Для приготовления растворов использовали тридистиллированную воду, азотную и соляную кислоты ос. ч. Исходные одноэлементные растворы металлов Ca, Mg, Ba, Na, K с концентрацией 1 г/л (для выбора условий) готовили растворением в тридистиллированной воде: нитрата натрия ч. д. а., хлорида бария ч., хлорида кальция обезвоженного ч., хлорида калия ос. ч., нитрата магния б-водного х. ч.

Растворы для градуировочной серии готовили с использованием стандартных многоэлементных растворов (МЭС) (СКАТ, Новосибирск, Россия): МЭС 1 (Al, Ca, Cd, Cr, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Zn (по 50 мг/л), Li (10 мг/л)) и МЭС 3 (As, Pb, Rb, Sb, Se, Sn, Te (по 50 мг/л), Ba, Sr (по 20 мг/л), Ag, Au, Be (по 10 мг/л), Hg (5.0 мг/л)).

Растворы элементов, используемых в качестве стабилизирующих (Al, Eu, Sm, Rb, Ba, Li, In, Ga, La), с концентрацией 0.4 г/л готовили из: алюминия металлического, оксида европия(III), оксида

самария(III), хлорида рубидия, оксида бария, карбоната лития, индия металлического, галлия металлического, нитрата лантана(III) (все х. ч.).

Оценка матричного эффекта. Для оценки матричного эффекта, вызванного натрием, использовали растворы МЭС с концентрацией 2 мг/л, содержащие дополнительно 0–3000 мг/л натрия, и растворы натрия той же концентрации без примесей. Для учета возможного сигнала примеси в присутствии натрия (результат контрольного опыта) вычитали сигнал “пустой” матрицы без примесей. Матричный эффект рассчитывали как отношение сигнала элемента в присутствии натрия к сигналу элемента в “чистом” растворе 2 М HNO_3 .

Выбор оптимальных концентраций. Для выбора оптимальных условий регистрировали сигналы аналитов при их концентрации 1 и 10 мг/л. Концентрацию азотной кислоты варьировали в диапазоне 0–6 мас. %. Концентрацию стабилизирующих элементов варьировали в диапазоне 25–100 мг/л для In, Ga, Sm, Eu, Li, Ba, Rb, и 25–200 мг/л для La и Al при содержании азотной кислоты 2 мас. %. Для учета возможного вклада контрольного опыта из полученных в присутствии дополнительных элементов или кислоты аналитических сигналов вычитали сигналы от “пустой матрицы” (без добавления аналита).

При выборе концентрации стабилизирующего элемента ориентировались на постоянство АС аналитов и постоянство условий в плазме, оцениваемых по магниевому отношению $\text{Mg(II) } 280.271/\text{Mg(I) } 285.213$ [24, 25]. Магниевое отношение рассчитывали для двух серий растворов (1 и 10 мг/л аналитов) в присутствии каждого изучаемого стабилизирующего элемента.

Анализ поровых вод. Для анализа поровые воды разбавляли в 10, 40 и 100 раз растворами стабилизирующего элемента с концентрацией 75 мг/мл (100 мг/л для Al и 70 мг/л для Ga) в 2%-ной HNO_3 . Градуировочные растворы готовили разбавлением МЭС аналогичным раствором стабилизирующего элемента. Сигналы стабилизирующих элементов при определении концентрации не учитывали.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Матричный эффект, вызываемый щелочными металлами. Одним из наиболее значимых недостатков микроволновой плазмы с конструкцией Хаммера (приборы Agilent) как источника возбуждения спектров является значительный матричный эффект, вызываемый элементами с низкими потенциалами ионизации. На рис. 1 приведены значения интенсивности различных линий элементов в присутствии натрия, нормированные на их интенсивность в “чистом” растворе

2 М HNO_3 без матричного элемента (матричный эффект, $I_{\text{отн}}$). Видно, что как для атомных, так и для ионных линий с энергией возбуждения ниже ~4 эВ при концентрации натрия до 1000 мг/л (часто встречаются в природных водах) происходит увеличение аналитического сигнала. Для сравнения приведен матричный эффект для Zn(I) 213.857 ($E_{\text{возб.}} 5.8$ эВ). Кроме того, горизонтальными пунктирными линиями показан интервал $\pm 10\%$ от начального значения, в котором аналитические сигналы демонстрировали бы постоянство. Как видно из рис. 1, во-первых, подобрать внутренний стандарт проблематично, так как матричные эффекты для линий внутреннего стандарта и аналита должны коррелировать; во-вторых, использование спектрального буфера в высокой концентрации значительно снижает аналитические сигналы линий со средней и высокой энергией возбуждения, что приводит к существенному росту пределов обнаружения.

Выбор концентрации азотной кислоты. В большинстве случаев пробы вод консервируют добавлением азотной кислоты. При использовании готовых многоэлементных стандартных растворов для приготовления градуировочных серий следует учитывать их исходную кислотность. Упомянутые в литературе случаи использования спектральных буферов в АЭС-МП предполагают использование растворов с концентрацией азотной кислоты 2–4%, поэтому изучали диапазон 0–6% HNO_3 .

Для большинства как атомных, так и ионных линий увеличение кислотности раствора приводит к снижению АС (рис. 2), что особенно заметно при концентрации аналита 10 мг/л и подтверждает полученные ранее данные [26]. При условии изменения АС в пределах доверительного интервала оптимальный диапазон содержания азотной кислоты в растворах составил 1–2.5 мас. %. Таким образом, в выбранном диапазоне концентрации азотной кислоты АС не изменяются значимо, что позволяет при необходимости не соблюдать кислотность очень строго.

Выбор стабилизирующего элемента и его концентрации. Для приготовления градуировочных растворов наиболее часто используют коммерческие многоэлементные смеси, поэтому их максимальная концентрация, как правило, ограничена единицами–десятками мг/л. В качестве стабилизирующих матричных элементов тестировали элементы с потенциалами ионизации до 6 эВ: Rb (4.18), Ba (5.21), Li (5.39), Sm (5.60), La (5.61), Eu (5.67), In (5.79), Al (5.98), Ga (6.00). Из литературы следует, что значимое изменение температуры и электронной плотности при добавлении натрия ($E_{\text{ион}} = 5.14$ эВ) происходит при концентрации около 1 мас. %, а индия и галлия – 0.25 мас. % [5, 6]. При этом горелка используемого нами обо-

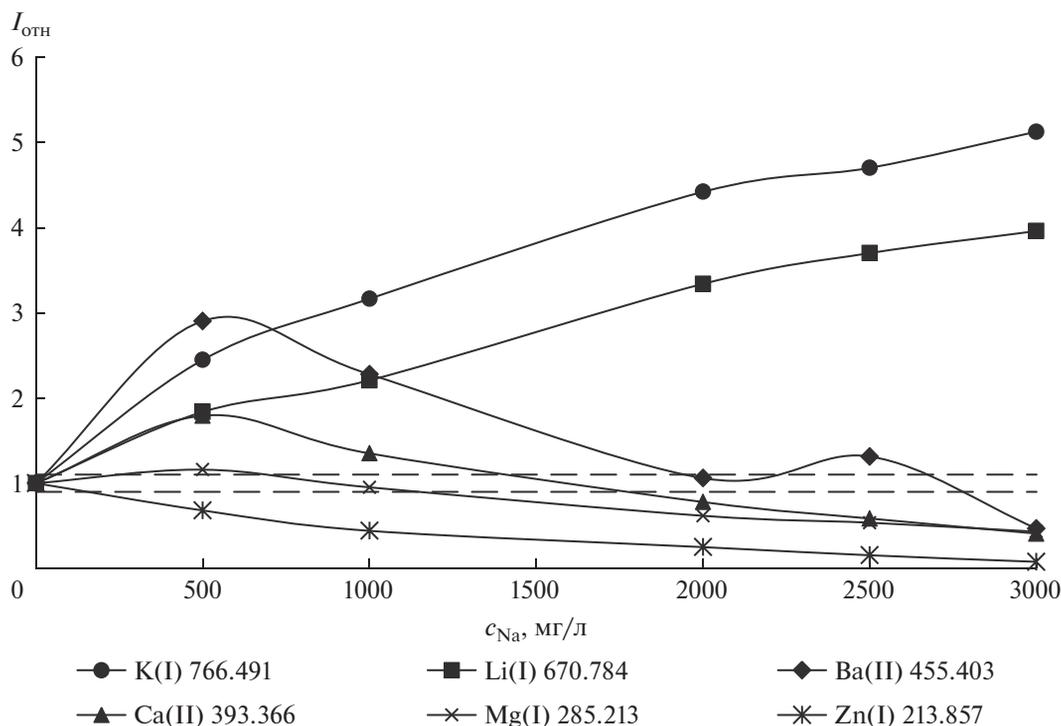


Рис. 1. Матричный эффект ($I_{отн}$) в присутствии натрия для некоторых аналитических линий.

рудования чрезвычайно чувствительна к высоким концентрациям вводимых растворов: возможны ее деформация и выход из строя. Поскольку максимальная концентрация аналитов в градуировочных сериях, приготовленных из коммерческих многоэлементных стандартов, составляла 10 мг/л, представлялось целесообразным использовать не слишком высокую концентрацию стабилизирующих элементов. В качестве оптимальной концентрации стабилизирующего элемента выбирали такую концентрацию, при которой наблюдалось постоянство магниевого отношения и аналитических сигналов. В присутствии лития (рис. 3а, 3б) магниевое отношение значительно снижалось, а аналитические сигналы отличались во всех экспериментальных точках для всех изученных линий, поэтому литий в дальнейших экспериментах не рассматривали.

В присутствии рубидия (рис. 3в, 3г) сигналы щелочных металлов и магния оставались более-менее постоянными, для кальция и бария необходимо использовать ионные линии. В присутствии бария аналитические сигналы всех элементов постоянны до его концентрации 75 мг/л, далее снижаются. В присутствии индия (рис. 3д, 3е) щелочные металлы и магний демонстрируют постоянные сигналы, в то время как для бария и кальция сигналы атомных линий несколько увеличиваются. Самарий, лантан, европий и алюминий (рис. 3ж, 3з) вызывают значительное изменение фона для

атомных линий кальция, что затрудняет обработку сигналов и особенно существенно при его низких концентрациях. Сигналы ионных линий щелочноземельных металлов изменяются меньше, чем атомных. В тоже время сигналы щелочных металлов постоянны. В присутствии галлия сигналы элементов постоянны при их концентрации 10 мг/л, а при концентрации 1 мг/л сигналы снижаются. В целом более стабильные АС при большей концентрации аналита (10 против 1 мг/л) наблюдаются в присутствии большинства стабилизирующих элементов. Таким образом, выбрали оптимально-компромиссные концентрации стабилизирующих элементов, они составили 75 мг/л для Rb, Ba, Sm, La, Eu, In, 100 мг/л для Al и 70 мг/л для Ga.

Анализ поровых вод. В присутствии выбранных количеств стабилизирующих элементов проанализировали пробы поровых вод донных отложений озера Большой Баган (Новосибирская область, солонцеватый тип минерализации, гидрокарбонатный класс [27]).

При анализе без добавления стабилизирующего элемента получены сходящиеся при различных разбавлениях (10, 40 и 100 раз) результаты определения натрия и магния (основные элементы), в то время как для элементов с меньшим содержанием (Ca, Ba, K, Li) при разных разбавлениях результаты различаются, что свидетельствует о наличии матричного эффекта со стороны натрия. В каче-

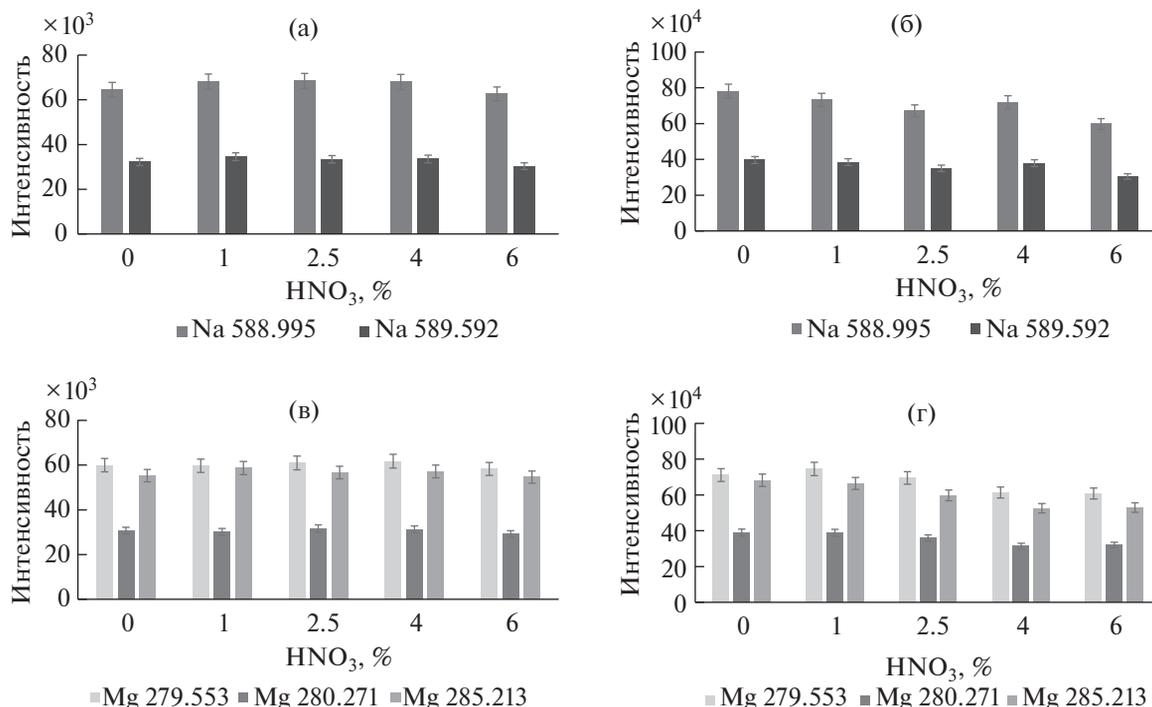


Рис. 2. Влияние концентрации HNO₃ на интенсивности сигналов линий Na ((а) – 1 мг/л, (б) – 10 мг/л) и Mg ((в) – 1 мг/л, (г) – 10 мг/л).

стве примера на рис. 4 приведены результаты определения натрия и калия. В присутствии стабилизирующего элемента (75 мг/л In) результаты анализа сходятся при разных разбавлениях пробы. В качестве примера на рис. 4 приведены также результаты определения Na и K при использовании добавленного индия в качестве внутреннего стандарта. Видно, что различие в энергиях возбуждения и ионизации для линий калия (1.61 и 4.339 эВ соответственно) и индия (3.02 и 5.785 эВ) слишком велико для применения индия в качестве эффективного внутреннего стандарта. Для натрия, несмотря на его более близкие характеристики (2.11 и 5.138 эВ), индий также не подходит в качестве внутреннего стандарта.

Выполнили анализ трех образцов, отличающихся глубиной отбора и содержанием основных элементов (табл. 2), способом введено—найдено при среднем разбавлении пробы, добавка увели-

чивала концентрацию элемента в 1.5–2 раза. Результаты хорошо воспроизводятся для разных проб, открываемость аналитов в основном лежит в диапазоне 90–110% (табл. 3, приведены данные для пробы 1).

Для устранения межэлементных влияний в АЭС-МП среди щелочных и щелочноземельных элементов опробован способ добавления стабилизирующего элемента с $E_{\text{ион}} < 6$ эВ. Концентрация стабилизирующего элемента недостаточна для изменения температуры или электронной плотности, т.е. он не является классическим спектральным буфером. Можно предположить, что стабилизирующий элемент снижает доступную энергию в плазме, а за счет преобладающей концентрации поддерживает одинаковые усло-

Таблица 2. Содержание (мг/л) аналитов в некоторых образцах поровых вод ($n = 4, P = 0.95$, в присутствии Rb)

Проба	Ca	Ba	Mg	Na	Li	K
1	46 ± 2	(21 ± 3) × 10 ⁻²	122 ± 6	(4.7 ± 0.5) × 10 ²	(81 ± 8) × 10 ⁻³	28 ± 2
2	52 ± 3	(15 ± 2) × 10 ⁻²	117 ± 6	(6.3 ± 0.6) × 10 ²	(11 ± 1) × 10 ⁻²	26 ± 2
3	61 ± 3	(18 ± 3) × 10 ⁻²	119 ± 7	(6.7 ± 0.7) × 10 ²	(12 ± 1) × 10 ⁻²	29 ± 2

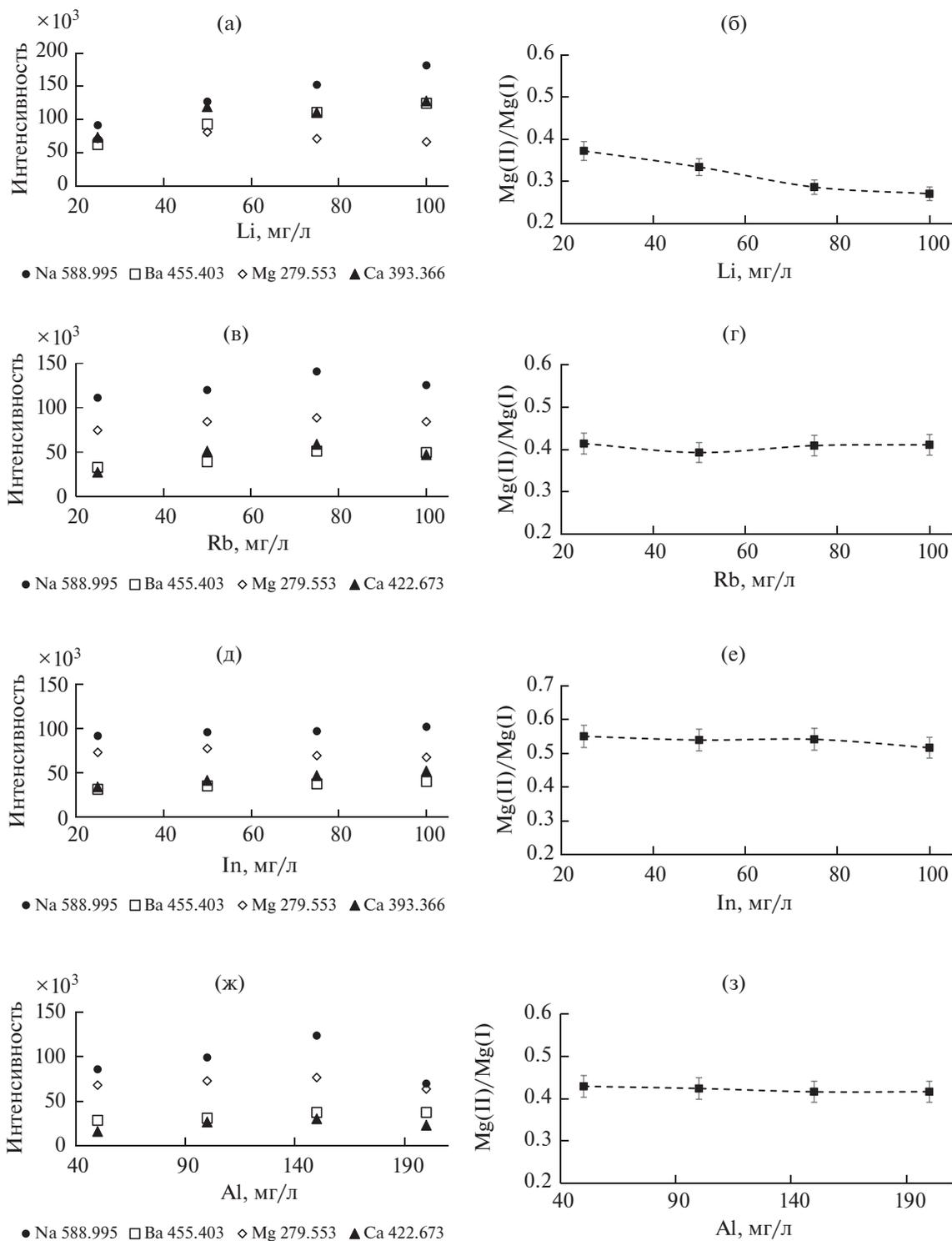


Рис. 3. Изменение интенсивности аналитических сигналов элементов (для концентрации 1 мг/л) и магниевого отношения в присутствии элементов: Li (а, б), Rb (в, г), In (д, е), Al (ж, з).

вия в пробе и в градуировочных растворах, что подтверждается постоянством магниевого отношения. В присутствии стабилизирующих элементов проанализированы пробы поровых вод озера

Б. Баган, правильность результатов подтверждена методом введено—найдено. Наилучшие результаты получены в присутствии Rb, La, In, Ga. Прием может быть рекомендован для определения дру-

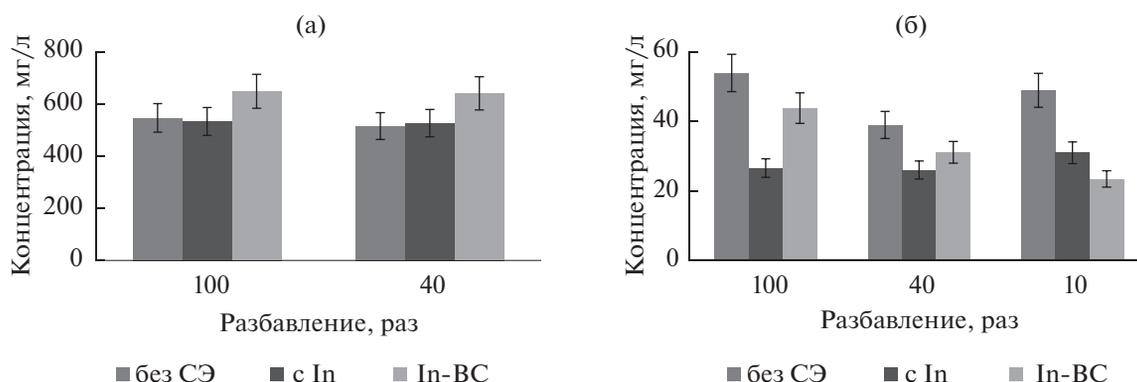


Рис. 4. Результаты определения Na (а) и К (б) в пробе поровых вод при различных разбавлениях без добавления стабилизирующего элемента (СЭ), с добавлением индия в качестве СЭ и при использовании индия в качестве внутреннего стандарта (BC).

Таблица 3. Открываемость (%), рассчитанная в присутствии различных стабилизирующих элементов для разбавленной пробы поровых вод

Определяемый элемент, аналитическая линия		Стабилизирующий элемент							
		Rb	Ba	Sm	La	Eu	In	Al	Ga
Ca	393.366 (II)	104	100	105	104	101	095	106	106
	396.847 (II)	104	99	105	98	98	97	105	102
	422.673 (I)	109	98	105	108	101	96	108	102
Mg	279.553 (II)	100	96	101	99	97	99	102	98
	280.271 (II)	101	98	100	96	98	96	102	98
	285.213 (I)	101	92	101	102	99	96	102	99
	383.829 (I)	101	93	101	99	96	98	104	97
Ba	455.403 (II)	111	—	113	102	107	94	108	107
	493.408 (II)	107	—	113	100	105	91	108	109
	553.548 (I)	110	—	*	109	104	85	108	110
Na	588.995 (I)	105	92	103	113	102	89	104	101
	589.592 (I)	108	92	105	109	100	92	103	99
Li	670.784 (I)	104	96	106	103	96	90	107	*
K	766.491 (I)	101	92	101	102	92	95	101	101
	769.897 (I)	104	91	107	103	91	96	103	99

* Концентрация элемента ниже предела обнаружения.

гих примесных элементов, линии которых имеют низкие и средние энергии возбуждения.

Работа выполнена в рамках государственного задания ИХ СО РАН в области фундаментальных научных исследований, проект № 121031700315-2.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Balaram V. Microwave plasma atomic emission spectrometry (MP-AES) and its applications – A critical review // *Microchem. J.* 2020. V. 159. Article 105483.
2. Müller A., Pozebon D., Dressler V.L. Advances of nitrogen microwave plasma for optical emission spectrometry and applications in elemental analysis: A review // *J. Anal. At. Spectrom.* 2020. V. 35. P. 2113.
3. Williams C.B., Amais R.S., Fontoura B.M., Jones B.T., Nobrega J.A., Donati G.L. Recent developments in microwave-induced plasma optical emission spectrometry and applications of a commercial Hammer-cavity instrument // *Trends Anal. Chem.* 2019. V. 116. P. 151.
4. Serrano R., Grindlay G., Gras L., Mora J. Evaluation of calcium-, carbon- and sulfur-based non-spectral interferences in high-power MIP-OES: Comparison with ICP-OES // *J. Anal. At. Spectrom.* 2019. V. 34. P. 1611.
5. Pelipasov O.V., Polyakova E.V. Matrix effects in atmospheric pressure nitrogen microwave induced plasma

- optical emission spectrometry // *J. Anal. At. Spectrom.* 2020. V. 35. P. 1389.
6. Polyakova E.V., Pelipasov O.V. Plasma molecular species and matrix effects in the Hummer cavity microwave induced plasma optical emission spectrometry // *Spectrochim. Acta B.* 2020. V. 173. Article 105988.
 7. Chan G.C.-Y., Chan W.-T., Mao X., Russo R.E. Investigation of matrix effects in inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy using laser ablation and solution nebulization – Effect of second ionization potential // *Spectrochim. Acta B.* 2001. V. 56. P. 77.
 8. Chan G.C.-Y., Hieftje G.M. Investigation of plasma-related matrix effects in inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry caused by matrices with low second ionization potentials—identification of the secondary factor B // *Spectrochim. Acta B.* 2006. V. 61. P. 642.
 9. Jankowski K., Dreger M. Study of an effect of easily ionizable elements on the excitation of 35 elements in an Ar-MIP system coupled with solution nebulization // *J. Anal. At. Spectrom.* 2000. V. 15. P. 269.
 10. Zhang Z., Wagatsuma K. Matrix effects of easily ionizable elements and nitric acid in highpower microwave-induced nitrogen plasma atomic emission spectrometry // *Spectrochim. Acta B.* 2002. V. 57. P. 1247.
 11. Башилов А., Рогова О. Атомно-эмиссионная спектроскопия микроволновой плазмы: новый метод элементного анализа // *Аналитика.* 2013. № 12. С. 48.
 12. Medvedev N.S., Shaverina A.V., Tsygankova A.R., Saprykin A.I. Comparison of analytical performances of inductively coupled plasma mass spectrometry and inductively coupled plasma atomic emission spectrometry for trace analysis of bismuth and bismuth oxide // *Spectrochim. Acta B.* 2018. V. 142. P. 23.
 13. Лундовская О.В., Цыганкова А.Р., Петрова Н.И., Сапрыкин А.И. Анализ кадмия и его оксида методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой // *Журн. аналит. химии.* 2018. Т. 73. № 9. С. 680. (Lundovskaya O.V., Tsygankova A.R., Petrova N.I., Saprykin A.I. Analysis of cadmium and cadmium oxide by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry // *J. Anal. Chem.* 2018. V. 73. P. 877.)
 14. Williams C.B., Jones B.T., Donati G.L. Naturally occurring molecular species used for plasma diagnostics and signal correction in microwave-induced plasma optical emission spectrometry // *J. Anal. At. Spectrom.* 2018. V. 33. P. 1224.
 15. Silva A.B.S., Higuera J.M., Nogueira A.R.A. Internal standardization and plasma molecular species: signal correction approaches for determination of phosphorus from phospholipids in meat by MIP OES // *J. Anal. At. Spectrom.* 2019. V. 34. P. 782.
 16. Ozbek N., Akman S. Determination of boron in Turkish wines by microwave plasma atomic emission spectrometry // *Food Chem.* 2016. V. 192. P. 295.
 17. Foster W.H., Hume D.N. Mutual cation interference effects in flame photometry // *Anal. Chem.* 1959. V. 31. P. 2033.
 18. Хамдеев М.И., Васильева О.Н., Чистяков В.М., Ерин Е.А. Атомно-эмиссионный спектральный анализ фосфатных концентратов продуктов деления и примесей, получаемых в процессе регенерации облученного ядерного топлива // *Заводск. лаборатория. Диагностика материалов.* 2015. Т. 81. С. 65.
 19. Ахсанова О.Л., Загитов Р.М., Гатиятуллина Л.Я. Определение бора в алюмосиликатном катализаторе методом эмиссионного спектрального анализа // *Заводск. лаборатория. Диагностика материалов.* 2017. Т. 83. С. 26.
 20. Дробышев А.И., Савинов С.С. Дуговой атомно-эмиссионный спектрографический анализ жидких биопроб с использованием МАЭС // *Заводская лаборатория. Диагностика материалов.* 2015. Т. 81. С. 142.
 21. Nelson J., Hopfer H., Gilleland G., Cuthbertson D., Boulton R., Ebeler S.E. Elemental profiling of Malbec wines under controlled conditions using microwave plasma-atomic emission spectroscopy // *Am. J. Enol. Vitic.* 2015. V. 66. P. 373.
 22. Karlsson S., Sjöberg V., Ogar A. Comparison of MPAES and ICP-MS for analysis of principal and selected trace elements in nitric acid digests of sunflower (*Helianthus annuus*) // *Talanta.* 2015. V. 135. P. 124.
 23. Microwave Plasma Atomic Emission Spectroscopy (MP-AES) Application eHandbook/Agilent Tech. Inc. 2016. 5991-7282EN. *Microwave Plasma Atomic Emission Spectroscopy (MP-AES) Application eHandbook (agilent.com)* (31.01.2022).
 24. Mermet J.M. Use of magnesium as a test element for inductively coupled plasma atomic emission spectrometry diagnostics // *Anal. Chim. Acta.* 1991. V. 250. P. 85.
 25. Silva F.V., Trevizan L.C., Silva C.S., Nogueira A.R.A., Nóbrega J.A. Evaluation of inductively coupled plasma optical emission spectrometers with axially and radially viewed configurations // *Spectrochim. Acta B.* 2002. V. 57. P. 1905.
 26. Полякова Е.В., Номероцкая Ю.Н., Сапрыкин А.И. Влияние матричного элемента и кислоты на аналитические сигналы в атомно-эмиссионной спектроскопии с азотной микроволновой плазмой // *Журн. аналит. химии.* 2020. Т. 75. № 4. С. 333. (Polyakova E.V., Nomerotskaya Yu. N., Saprykin A.I. Effect of matrix element and acid on analytical signals in nitrogen microwave-plasma atomic emission spectrometry // *J. Anal. Chem.* 2020. V. 75. P. 474.)
 27. Водно-болотные угодия России: озерная система нижнего течения реки Баган. <http://www.fesk.ru/wetlands/21.html> (31.01.2022).

УДК 543.63+543.544.5.068.7

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ В СЛЮНЕ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С ТАНДЕМНЫМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

© 2022 г. Е. В. Дмитриева^а, *, А. З. Темердашев^а^аКубанский государственный университет
ул. Ставропольская, 149, Краснодар, 350040 Россия

*e-mail: catherine_dmitrieva@outlook.com

Поступила в редакцию 10.02.2022 г.

После доработки 21.02.2022 г.

Принята к публикации 21.02.2022 г.

Разработан способ одновременного определения стероидных гормонов различных классов (андрогенов, прогестин и глюкокортикоидов) в слюне человека с использованием жидкостно-жидкостной экстракции и детектированием методом ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии–тандемной масс-спектрометрии. Установлено, что наиболее подходящим растворителем для извлечения целевых аналитов является метил-*трет*-бутиловый эфир. Объем экстрагента и другие факторы, влияющие на извлечение аналитов из анализируемой матрицы, оптимизировали с применением многофакторного анализа (план Бокса–Бенкена). В оптимальных условиях степени извлечения аналитов составили более 90%, а пределы обнаружения лежали в диапазоне 50–250 пг/мл, что указывает на высокую чувствительность предложенной методики.

Ключевые слова: стероидные гормоны, слюна, определение, жидкостно-жидкостная экстракция, УВЭЖХ-МС/МС.

DOI: 10.31857/S0044450222120027

Содержание стероидных гормонов в биологических жидкостях человека является важным показателем состояния его здоровья. В случае если наблюдается изменение их концентраций, можно предполагать развитие различных заболеваний, поэтому определение стероидных гормонов имеет важную диагностическую ценность.

Стероидные гормоны традиционно определяют в моче и плазме человека. При анализе мочи получают усредненные концентрации стероидных гормонов за несколько часов – сутки, а состав плазмы отражает концентрации данных соединений в реальном времени. Недостатком анализа плазмы является инвазивность отбора проб и наличие болевых ощущений, поэтому в настоящее время в качестве альтернативной матрицы для определения стероидных гормонов все чаще рассматривается слюна. Ее основными преимуществами являются неинвазивность [1] и простота процедуры пробоотбора, стабильность образцов при комнатной температуре, а также отсутствие необходимости привлечения квалифицированного персонала для отбора проб [2].

Проведенные к настоящему времени исследования показывают возможность применения слюны для определения стероидных гормонов. Так, изменение содержания кортизола в слюне позволяет диагностировать синдром Кушинга [3], определение прогестерона позволяет определить фолликулярную и лютеиновую фазы цикла у женщин [2], изменение уровней тестостерона может указать на развитие андрогензависимых заболеваний как у мужчин (дефицит андрогенов, гипогонадизм) [2, 4], так и у женщин (гирсутизм, поликистоз яичников) [3, 5].

Возможность применения слюны в качестве альтернативной матрицы обусловлена высокими корреляциями между концентрациями ряда стероидных гормонов в плазме и слюне [3, 6], что связано с механизмом попадания стероидных гормонов в слюну человека. Установлено [7], что неконъюгированные стероидные гормоны попадают в слюну путем диффузии через клетки слюнных желез ввиду их липофильной природы, и их концентрация не зависит от скорости секреции слюны, а следовательно, может отражать содержание свободных (не связанных с белками) стероидов в плазме [2, 3, 8–10].

Основным недостатком слюны в качестве объекта исследования является необходимость применения высокочувствительных методов для определения данных соединений, поскольку их содержание в слюне значительно ниже по сравнению с плазмой [11]. Наиболее простым способом анализа слюны является иммуноферментный анализ, однако он недостаточно селективен, что может приводить к получению завышенных результатов, особенно на низких уровнях концентраций. Кроме того, данный способ позволяет определять лишь один показатель за анализ, что является его ограничением при определении стероидного профиля. Альтернативный способ – использование хроматографических методов с масс-спектрометрическим детектированием, обладающих высокими чувствительностью и селективностью, особенно с tandemным масс-спектрометрическим детектированием в режиме мониторинга выбранных реакций (MRM).

Учитывая крайне низкие концентрации стероидных гормонов в слюне человека, для их надежного определения необходимо применение концентрирования. Наиболее часто для этого используют жидкостно-жидкостную экстракцию [3]. При

этом большинство исследований направлено на определение ограниченного перечня соединений [3, 4, 8, 10, 12, 13] и не дает полного представления о стероидном профиле человека, применение которого наиболее эффективно при диагностировании заболеваний. Одновременное определение стероидных гормонов различных классов дает более точную информацию о гормональном статусе по сравнению с единичным показателем [14].

Цель данной работы – разработка унифицированной методики определения стероидных гормонов различных классов (андрогенов, прогестинов, глюкокортикоидов) в слюне человека методом ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием (УВЭЖХ-МС/МС).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и методы. Стандартные образцы тестостерона, кортизона, гидрокортизона (кортизола), кортикостерона, прогестерона, 11α -гидроксипрогестерона (схема 1) и метилтестостерона (внутренний стандарт) приобретали у Sigma-Aldrich (США).

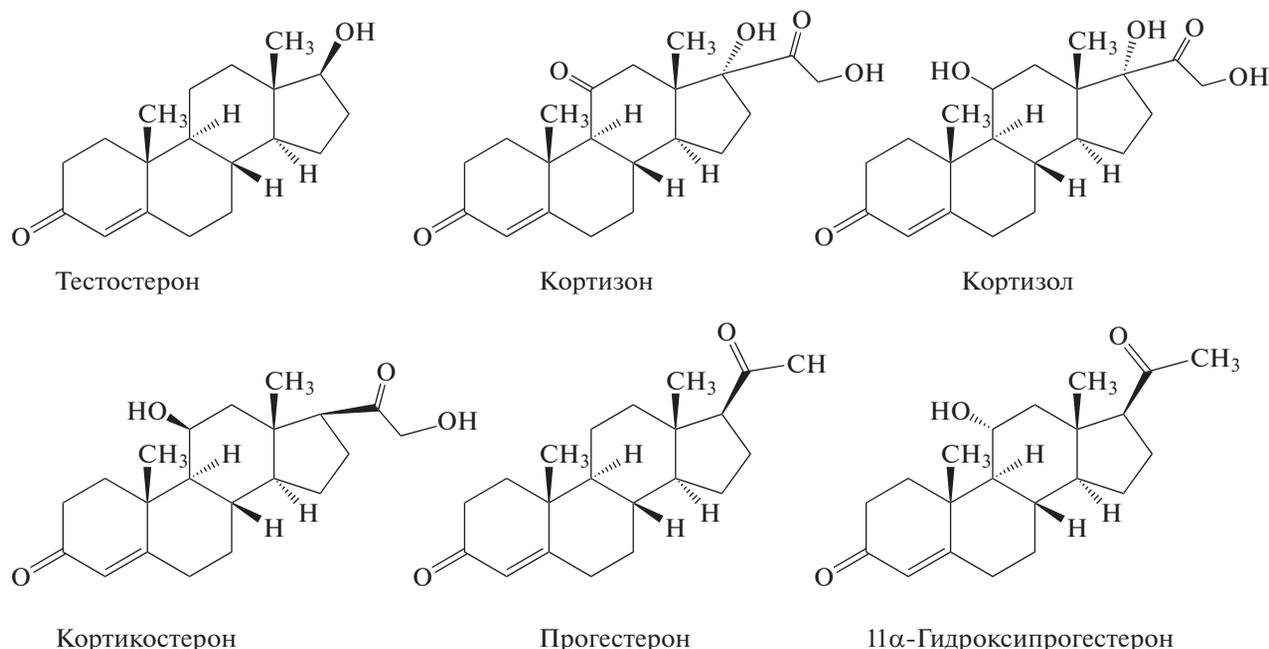


Схема. 1. Структурные формулы определяемых соединений.

Метил-*трет*-бутиловый эфир (для ВЭЖХ-ИК-УФ, 99,9%) и метанол (для ВЭЖХ) приобретали у PanReac (Испания) и J.T. Baker (Великобритания) соответственно. Использовали дихлорметан, трихлорметан и тетрахлорметан, этилацетат, гексан (99%) (ЭКОС-1, Россия), а также дигидрофосфат калия, гидрофосфат натрия,

тетрагидроборат натрия и гидроксид натрия (99%) для приготовления буферных растворов (Вектон, Россия).

Приборы и оборудование. Для УВЭЖХ-МС/МС-анализа использовали систему, состоящую из ультравысокоэффективного жидкостного хроматографа Dionex Ultimate-3000 и тройного

квадрупольного масс-спектрометра Thermo TSQ Access Max (San-Jose, USA). Для разделения анализов применяли аналитическую колонку Phenomenex Kinetex C18 (100 × 2.1 мм, 1.7 мкм), оснащенную соответствующей предохранительной колонкой в режиме градиентного элюирования при температуре термостатирования 40°C (табл. 1).

Для ионизации исследуемых соединений использовали нагреваемый источник ионизации электрораспылением в режиме регистрации положительных ионов (табл. 2). Анализы детектировали в режиме мониторинга выбранных реакций посредством соударительной диссоциации иона-предшественника (газ-мишень аргон, давление 1.5 мТорр) и определения ионов-продуктов (табл. 3). Условия детектирования в режиме мониторинга выбранных реакций оптимизировали путем напуска определяемых веществ в камеру источника ионизации с использованием шприцевого ввода.

Приготовление стандартных растворов. Стандартные растворы стероидных гормонов с концентрацией 1 мг/мл готовили в метаноле и хранили при 4°C в течение месяца. Градуировочные растворы с концентрациями 0.5, 1.0, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 нг/мл готовили последовательным разбавлением стандартных растворов в метаноле и хранили при 4°C в течение месяца. Растворы контроля качества с концентрациями 10, 50 и 250 нг/мл готовили отдельно от градуировочных растворов в метаноле. Рабочий раствор внутреннего стандарта метилтестостерона с концентрацией 200 нг/мл в метаноле хранили в холодильной камере при 4°C.

Фосфатный буферный раствор (рН 8) готовили с использованием 0.067 М растворов дигидрофосфата калия и гидрофосфата натрия. Для приготовления боратного буферного раствора (рН 10) применяли 0.05 М раствор тетрагидробората натрия и 0.1 М раствора гидроксида натрия.

Отбор проб слюны. Образцы смешанной слюны получали естественной секрецией. Перед отбором проб добровольцы (мужчины и женщины в возрасте 20–45 лет) не употребляли еду и воздерживались от курения в течение часа, а за 10 мин ополаскивали рот водой. Анализ образцов проводили сразу после отбора проб. Образцы слюны хранили при –20°C.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор условий отбора проб слюны для анализа. Поскольку результаты анализа зависят от условий отбора проб слюны, предварительно рассмотрели влияние различных факторов на концентрации стероидных гормонов.

Коммерчески доступные контейнеры, такие как Salivette®, являются одними из наиболее ши-

Таблица 1. Условия градиентного элюирования анализов (скорость потока подвижной фазы 0.4 мл/мин)

Время, мин	0.1%-ная муравьиная кислота в воде (элюент А)	0.1%-ная муравьиная кислота в метаноле (элюент Б)
0.0	90	10
1.0	90	10
2.0	50	50
3.2	50	50
5.0	10	90
7.9	10	90
8.0	90	10
9.5	90	10

Таблица 2. Параметры ионизации анализов в нагреваемом электрораспылителем источнике ионизации

Параметр	Значение
Температура испарителя, °С	400
Температура трансферного капилляра, °С	320
Напряжение на источнике ионизации, кВ	4
Расход газа распылителя (азот), усл. ед.	60
Расход вспомогательного газа (азот), усл. ед.	10

роко используемых для получения образцов слюны. Тем не менее исследования показали, что содержащийся в них тампон, пропитываемый слюной при жевании, может влиять на результаты определения гормонов. Так, применение синтетического тампона существенно не влияет на результаты определения кортизола, в то время как концентрации других стероидных гормонов, в частности тестостерона, изменяются при его использовании [1]. Применение хлопкового тампона приводит к сорбции анализов и, соответственно, к искажению результатов, поэтому оптимальным является прямой отбор проб слюны [2].

Прямой отбор проб можно проводить со стимулированием секреции слюны (например, лимонной кислотой, жвачкой без сахара, парафином) или без него. При использовании жвачки наблюдали увеличение концентрации тестостерона и кортизола, что затрудняет ее использование. Стимулирование слюноотделения различными методами приводило к изменению концентрации кортизола, поэтому при определении стероидного профиля оптимальным является отбор нестимулированной слюны в обычные полипропиленовые пробирки [1].

Другим важным требованием является отсутствие крови в слюне из-за механических повреждений в полости рта, например, при чистке зу-

Таблица 3. Условия масс-спектрометрического детектирования в режиме мониторинга выбранных реакций

Аналит	Ион-предшественник, m/z	Ион-продукт, m/z	Энергия соударений, эВ	Напряжение на экстрагирующей линзе, В	t_R , мин
Тестостерон	289.2	79.2	38	82	4.98
		97.2 ^a	22		
		109.2	25		
Кортизон	361.2	105.2	38	79	3.59
		121.1	27		
		163.1 ^a	22		
Кортизол	363.2	121.1 ^a	24	86	3.81
		267.1	17		
		309.1	15		
Кортикостерон	347.2	91.2	48	68	4.47
		121.1 ^a	24		
		293.2	15		
Прогестерон	315.2	79.2	39	76	5.35
		97.2 ^a	21		
		109.2	26		
11 α -Гидроксипрогестерон	331.2	105.2	38	74	4.65
		121.1 ^a	25		
		271.2	16		
Метилтестостерон ^б	303.2	79.2	40	83	5.14
		97.2	25		
		109.2 ^a	27		

^a Ион, используемый для количественной оценки, ^б внутренний стандарт.

бов. Поскольку концентрации стероидных гормонов в слюне значительно ниже по сравнению с содержанием в крови, в случае ее попадания в слюну получаемые результаты будут значительно завышены. В случае присутствия в образце слюны 0.1–0.2% крови она приобретает розовый оттенок, что позволяет визуально оценить загрязнение анализируемого образца [6].

Кроме того, при определении глюкокортикоидов необходимо учитывать влияние фермента 11 β -гидроксистероиддегидрогеназы II, под действием которого в слюнных железах происходит конверсия кортизола в неактивную кетоформу (кортизон) [2]. Это приводит к расхождениям в получаемых результатах, поэтому необходимо определять не только активную форму (кортизол), но и его неактивную кетоформу.

Оптимизация условий жидкостно-жидкостной экстракции. При оптимизации типа экстрагента рассматривали следующие растворители: ди-, три- и тетрахлорметан, этилацетат, гексан и метил-*трет*-бутиловый эфир. К 1 мл модельного образца (дистиллированная вода), содержащего исследуе-

мые соединения с концентрацией 50 нг/мл, добавляли 1 мл экстрагента, перемешивали в течение 30 с на ворткексе, центрифугировали образец 10 мин при 4000 об/мин, шприцем отбирали фазу экстрагента, упаривали ее досуха и вновь растворяли в 150 мкл смеси метанол–вода (1 : 1, по объему).

Этилацетат, хлороформ и метил-*трет*-бутиловый эфир обеспечивали количественное извлечение всех аналитов (>70%). Для дальнейших исследований выбрали метил-*трет*-бутиловый эфир ввиду его невысокой температуры кипения (55°C), а также меньшей токсичности по сравнению с хлорированными растворителями.

Оптимальный объем экстрагента, pH и время перемешивания на ворткексе устанавливали с применением многофакторного анализа (план Бокса–Бенкена). Для обработки полученных результатов использовали ПО STATISTICA 10 (Statsoft). Уровни факторов представлены в табл. 4.

Для нахождения оптимальных уровней исследуемых факторов в модельный образец (1 мл, концентрация аналитов 50 нг/мл) добавляли 0.3 мл буферного раствора (pH 8 и 10) или 0.3 мл

Таблица 4. Уровни оптимизируемых факторов (план Бокса–Бенкена)

Фактор	Уровень		
	–1	0	+1
Объем экстрагента, мл	500	1000	1500
pH	6	8	10
Время перемешивания, с	15	30	45

дистиллированной воды (pH 6). Затем в образец добавляли метил-*трет*-бутиловый эфир и перемешивали его на вортексе в течение 30 с. После этого водный слой вымораживали при -35°C и переносили эфир, содержащий аналиты, в пробирку для упаривания на твердотельном нагревателе при 60°C с последующим растворением сухого остатка в 150 мкл смеси метанол–вода (1 : 1, по объему) для анализа.

Все полученные модели оказались значимыми, поскольку скорректированные коэффициенты детерминации (R_{adj}^2) превышали 0.9. Поскольку свойства определяемых соединений отличаются, оптимальные уровни факторов также имели разные значения для исследуемых аналитов. Объем метил-*трет*-бутилового эфира оказывал наибольшее влияние на степени извлечения аналитов: с увеличением объема экстрагента степень извлечения возрастала, поэтому для дальнейших исследований выбрали объем 1.5 мл, который в совокупности с другими факторами обеспечивал высокие степени извлечения аналитов. Время перемешивания также влияет на степени извлечения аналитов, при этом значение 30 с оптимально для всех аналитов. Увеличение pH среды не приводило к получению более высоких степеней извлечения аналитов, поэтому в последующих экспериментах буферный раствор не добавляли.

Таким образом, пробоподготовку проводили в следующих условиях: к 1 мл образца слюны добавляли внутренний стандарт (метилтестостерон с конечной концентрацией 20 нг/мл). Затем вносили 1.5 мл метил-*трет*-бутилового эфира, перемешивали на вортексе в течение 30 с, центрифугировали 10 мин при 4000 об/мин, вымораживали водную фазу при -35°C с последующим переносом органической фазы в другую пробирку и ее упариванием досуха при 60°C с растворением сухого остатка в 150 мкл смеси метанол–вода (1 : 1, по объему). В этих условиях степени извлечения аналитов составляли 91–98%. Степени извлечения рассчитывали как отношение площади пика соединения в растворе, прошедшем через все стадии пробоподготовки, к площади пика этого соединения в модельном растворе.

Валидация разработанного способа. Стероидные гормоны являются эндогенными соединениями, для них отсутствуют матрицы, не содержащие целевых аналитов, поэтому валидацию методики проводили на модельных растворах (дистиллированная вода), а также с использованием метода введено–найденно на реальных образцах с учетом критериев Food and Drug Administration (США) по валидации биоаналитических методик [15].

Градуировочные зависимости строили в диапазоне концентраций 0.05–50 нг/мл (0.05, 0.10, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5, 10, 25, 50 нг/мл). Предел обнаружения соответствовал концентрации, обнаруживаемой при соотношении сигнал/шум, равном 3, в то время как пределу определения соответствовала концентрация аналита, устанавливаемая с погрешностью 15%. Полученные результаты представлены в табл. 5.

Правильность и воспроизводимость контролировали путем анализа растворов контроля качества на трех уровнях концентраций: низком (1 нг/мл), среднем (5 нг/мл) и высоком (25 нг/мл) в течение одного и нескольких дней. Воспроизводимость оценивали с помощью относительного стандартного отклонения (s_r), а правильность с применением уравнения (1):

$$e_r = ((c_{\text{опр}} - c_{\text{теор}}) / c_{\text{теор}}) \times 100, \quad (1)$$

где e_r – относительная погрешность. Полученные результаты представлены в табл. 6.

Стабильность реальных образцов слюны, содержащих исследуемые аналиты, оценивали в течение месяца с проведением двух циклов заморозки (-20°C) и разморозки до комнатной темпе-

Таблица 5. Аналитические характеристики методики

Аналит	Предел обнаружения, нг/мл	Предел определения, нг/мл	Линейный диапазон, нг/мл	R^2
Тестостерон	0.05	0.1	0.1–50	0.999
Кортизон	0.25	0.5	0.5–50	0.995
Гидрокортизон	0.25	0.5	0.5–50	0.999
Кортикостерон	0.25	0.5	0.5–50	0.996
Прогестерон	0.05	0.1	0.1–50	0.999
11 α -Гидроксипрогестерон	0.05	0.1	0.1–50	0.999

Таблица 6. Результаты оценки правильности и воспроизводимости методики способом введено–найдено ($n = 15$, $P = 0.95$)

Аналит	Концентрация раствора контроля качества, нг/мл	В один день		В разные дни	
		$e_r, \%$	$s_r, \%$	$e_r, \%$	$s_r, \%$
Тестостерон	1	8.5	8.3	11.2	12.5
	5	6.1	4.0	7.8	8.6
	25	5.7	3.7	7.2	9.0
Кортизон	1	-10.6	11.8	-12.6	14.1
	5	-5.7	6.7	-7.4	12.3
	25	3.1	6.0	3.9	8.8
Гидрокортизон	1	-13.8	11.9	-14.7	12.4
	5	-9.0	7.3	-8.5	9.6
	25	5.5	6.0	4.3	7.5
Кортикостерон	1	-13.1	11.4	-12.2	14.8
	5	-3.0	5.9	3.4	8.6
	25	2.4	2.8	2.6	5.0
Прогестерон	1	-10.9	11.0	-9.7	11.3
	5	-5.7	8.1	-4.2	10.8
	25	1.1	1.7	3.9	5.4
11 α -Гидроксипрогестерон	1	9.5	11.4	10.3	11.8
	5	4.0	7.5	5.2	8.7
	25	1.3	3.9	2.6	4.4

ратуры. Аналиты сохраняли стабильность в течение этого времени, поскольку полученные результаты отличались менее чем на 15% от первоначальных, что согласуется с результатами [10].

Стабильность растворов в автосамплере оценивали в течение 36 ч при 5°C. Результаты показали, что образцы остаются стабильными в данном временном диапазоне.

Возможность перекрестного загрязнения оценивали путем анализа холостого раствора после анализа образца с концентрацией стероидных гормонов 50 нг/мл. Установили, что на хроматограмме холостого образца отсутствуют пики с MRM-переходами, аналогичными целевым соединениям.

Анализ реальных образцов. Предложенный способ использовали для анализа реальных образцов, полученных от добровольцев. Перед проведением анализа образцы центрифугировали в течение 10 мин при 10000 об/мин. Анализ проводили методом введено–найдено путем добавления растворов контроля качества низкой (1 нг/мл), средней (5 нг/мл) и высокой (25 нг/мл) концентраций. Установили, что матричные компоненты существенно не влияют на получаемые результаты, поскольку погрешность определения составила <15%.

Таким образом, разработан и валидирован простой и чувствительный (пределы обнаружения в диапазоне 0.05–0.25 нг/мл) способ определения стероидных гормонов методом ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием в слюне человека. Возможность одновременного чувствительного определения стероидных гормонов различных классов делает слюну перспективной матрицей для диагностических целей, обладающей большим количеством преимуществ по сравнению с кровью.

Инновационный проект выполнен при финансовой поддержке Кубанского научного фонда в рамках Конкурса научно-инновационных проектов, ориентированных на коммерциализацию № НИП-20.1/4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Büttler R.M., Bagci E., Brand H.S., den Heijer M., Blankenstein M.A., Heijboer A.C. Testosterone, androstenedione, cortisol and cortisone levels in human unstimulated, stimulated and parotid saliva // *Steroids*. 2018. V. 138. P. 26.
<https://doi.org/10.1016/j.steroids.2018.05.013>

2. *Gröschl M.* Current status of salivary hormone analysis // *Clin. Chem.* 2008. V. 54. № 11. P. 1759. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.108910>
3. *Turpeinen U., Hämäläinen E., Haanpää M., Dunkel L.* Determination of salivary testosterone and androstenedione by liquid chromatography–tandem mass spectrometry // *Clin. Chim. Acta.* 2012. V. 413. № 5–6. P. 594. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.11.029>
4. *Shibayama Y., Higashi T., Shimada K., Odani A., Mizokami A., Konaka H., Koh E., Namiki M.* Simultaneous determination of salivary testosterone and dehydroepiandrosterone using LC-MS/MS: Method development and evaluation of applicability for diagnosis and medication for late-onset hypogonadism // *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2009. V. 877. № 25. P. 2615. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.10.051>
5. *Baxendale P.M., Jacobs H.S., James V.H.* Plasma and salivary androstenedione and dihydrotestosterone in women with hyperandrogenism // *Clin. Endocrinol. (Oxf).* 1983. V. 18. № 5. P. 447. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.1983.tb02874.x>
6. *Wood P.* Salivary steroid assays – Research or routine? // *Ann. Clin. Biochem.* 2009. V. 46. P. 183. <https://doi.org/10.1258/acb.2008.008208>
7. *Vining R.F., McGinley R.A., Symons R.G.* Hormones in saliva: mode of entry and consequent implications for clinical interpretation // *Clin. Chem.* 1983. V. 29. № 10. P. 1752.
8. *Macdonald P.R., Owen L.J., Wu F.C., Macdowall W., Keevil B.G.* A liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for salivary testosterone with adult male reference interval determination // *Clin. Chem.* 2011. V. 57. № 5. P. 774. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.154484>
9. *Hofman L.F.* Human saliva as a diagnostic specimen // *J. Nutr.* 2001. V. 131. № 5. P. 1621S. <https://doi.org/10.1093/jn/131.5.1621S>
10. *Matsui F., Koh E., Yamamoto K., Sugimoto K., Sin H.-S., Maeda Y., Honma S., Namiki M.* Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) assay for simultaneous measurement of salivary testosterone and cortisol in healthy men for utilization in the diagnosis of late-onset hypogonadism in males // *Endocr. J.* 2009. V. 56. № 9. P. 1083. <https://doi.org/10.1507/endocrj.k09e-186>
11. *Ellison P.* Human salivary steroids: Methodological considerations and applications in physical anthropology // *Am. J. Phys. Anthropol.* 1988. V. 31. P. 115. <https://doi.org/10.1002/AJPA.1330310507>
12. *Jensen M.A., Hansen A.M., Abrahamsson P., Nørgaard A.W.* Development and evaluation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of salivary melatonin, cortisol and testosterone // *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2011. V. 879. № 25. P. 2527. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.07.005>
13. *Ney L.J., Felmingham K.L., Bruno R., Matthews A., Nichols D.S.* Simultaneous quantification of endocannabinoids, oleoylethanolamide and steroid hormones in human plasma and saliva // *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2020. V. 1152. Article 122252. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122252>
14. *Gomez-Gomez A., Miranda J., Feixas G., Betegon A.A., Crispi F., Gratacós E., Pozo O.J.* Determination of the steroid profile in alternative matrices by liquid chromatography tandem mass spectrometry // *J. Steroid Biochem. Mol.* 2020. V. 197. Article 105520. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.105520>
15. Food and Drug Administration Guidance. Bioanalytical Method Validation. Guidance for Industry. 2018. <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf> (02.02.2022).

УДК 543.544

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕНОЛОВ МЕТОДОМ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ С ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫМ СОРБЦИОННЫМ КОНЦЕНТРИРОВАНИЕМ НА МАГНИТНОМ ГИДРОФОБИЗИРОВАННОМ КРЕМНЕЗЕМЕ

© 2022 г. Ю. В. Карсакова^а, А. И. Фролова^а, Т. И. Тихомирова^{а, *}, Г. И. Цизин^а^аМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет
Ленинские горы, 1, стр. 3, Москва, 119991 Россия

*e-mail: tikhomirova-tatyana@yandex.ru

Поступила в редакцию 28.12.2021 г.

После доработки 15.03.2022 г.

Принята к публикации 23.03.2022 г.

Предложен способ высокочувствительного определения хлор- и нитрофенолов в водных растворах, включающий концентрирование аналитов на магнитном гидрофобизированном кремнеземе и их определение в концентрате методом жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Оптимизированы условия сорбционного концентрирования фенолов в статическом режиме. Градуировочная зависимость линейна в диапазоне концентраций аналитов 2–50 мкг/л. Пределы обнаружения аналитов предложенным способом ниже, чем ПДК фенолов в природных водах. Правильность определения фенолов подтверждена при анализе природной воды методом введено-найденно.

Ключевые слова: сорбция, химически модифицированный кремнезем, наночастицы магнетита, магнитные сорбенты.

DOI: 10.31857/S0044450222100073

Токсичные органические вещества поступают в окружающую среду в первую очередь благодаря промышленной деятельности человека и представляют угрозу жизни людей и животных. Разработка новых, простых и высокочувствительных методов определения таких веществ в водах, почвах, пищевых продуктах и других важнейших объектах остается актуальной задачей. К числу опасных органических загрязнителей относят фенол и более десяти его хлор-, нитро- и метилпроизводных.

Нитрофенолы представляют собой вторичные загрязнители воздуха и присутствуют в окружающем воздухе в малых количествах на уровне нг/м³ [1]. Вследствие высокой растворимости в воде они эффективно удаляются из атмосферы в виде осадков, достигая концентрации на уровне мкг/л в дождевой воде, снеге и тумане [2–6]. Нитрофенолы поступают в окружающую среду с выхлопными газами автомобилей [7] и за счет применения некоторых гербицидов.

Хлорфенолы – стойкие токсичные вещества, которые чаще всего используют при производстве красителей и фармацевтических препаратов

[8]. Содержание, например, 2-хлорфенола не должно превышать 2 мкг/л в питьевой воде [9]. Одним из источников хлорфенолов является производство текстильных изделий [10]. Особую опасность представляет возможность конденсации молекул хлорфенолов в водопроводной сети с образованием диоксинов – более опасных токсикантов, чем сами фенолы.

Содержание фенолов в объектах окружающей среды, как правило, находится на низком уровне, поэтому для их определения требуется концентрирование и использование селективного и чувствительного метода, такого как ВЭЖХ с масс-спектрометрическим (МС) детектированием. Публикации в этой области в основном посвящены определению либо нитрофенолов [11–13], либо хлорфенолов [14–16], в связи с этим в настоящей работе предпринята попытка выбора условий одновременного определения указанных соединений методом ВЭЖХ-МС.

Для определения фенолов часто применяют метод газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС), однако он не лишен недостатков, таких как необходимость

проведения дериватизации для стабилизации аналитов и повышения их летучести [17]. Определение динитрофенолов невозможно методом ГХ-МС, так как они сильно адсорбируются на активных центрах колонки газового хроматографа, что приводит к невоспроизводимости площади хроматографического пика и/или необратимой потере аналитов [18]. При определении хлор- и нитрофенолов методом ВЭЖХ-МС, как правило, дериватизация не требуется.

Несмотря на то, что метод ВЭЖХ-МС характеризуется весьма высокой чувствительностью, на величину аналитического сигнала могут оказывать влияние сопутствующие микро- и макрокомпоненты раствора. Примеры подобного влияния можно найти во многих работах, например, в монографии [19]. Особенно ярко этот эффект проявляется при ионизации электрораспылением. Очевидным способом подавления матричного влияния сопутствующих компонентов представляется проведение концентрирования. В настоящей работе матричные компоненты пробы, особенно неорганические, отделяли концентрированием аналитов на неполярном сорбенте.

Для концентрирования фенолов часто используют сорбционные методы [14, 20]. Среди многих сорбционных материалов особый интерес представляют магнитные нанокompозитные сорбенты, использование которых значительно упрощает стадию пробоподготовки. Такие сорбенты получают относительно просто: или путем сорбции магнитных наночастиц (МНЧ) магнетита на поверхности исходного сорбента или обработкой сорбентов растворами солей железа(II, III) с последующим формированием МНЧ на поверхности. Магнитные сорбенты сочетают сорбционные свойства исходных материалов с возможностью отделять сорбент от матричного раствора при помощи магнита. В зависимости от типа основной матрицы, занимающей большую часть объема нанокompозитного материала, применяют углеродсодержащие или органополимерные магнитные сорбенты, например, на основе сверхсшитого полистирола. Разработан способ получения магнитных сорбентов на основе кремнезёмов, химически модифицированных гексадецильными группами (ХМК-С₁₆), – коммерчески доступных сорбентов, которые эффективно извлекают многие органические соединения [21].

Цель настоящей работы – разработка способа высокочувствительного определения хлор- и нитрофенолов в водных растворах, включающего концентрирование аналитов магнитными сорбентами на основе ХМК-С₁₆ и их определение методом жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты, растворы и сорбенты. В качестве сорбента использовали кремнезём, химически модифицированный гексадецильными группами ХМК-С₁₆-100 ($S_{уд}$ 300 м²/г, диаметр пор 10 нм, размер частиц 60–200 мкм, содержание углерода 16.5 мас. %) (ЗАО “БиоХимМак СТ”, Россия), а также магнитный сорбент на его основе, полученный по методике, приведенной в работе [21]: средний диаметр МНЧ магнетита 16 нм, удельная намагничённость насыщения 1.0 э.м.е./г (emu/g), содержание железа 0.4%. Присутствие железа на поверхности кремнезёмного сорбента подтверждено данными энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии и составило 0.36 мас. % (0.15 ат. %).

Для приготовления растворов фенолов использовали навески 2,4-дихлорфенола (**2,4-ДХФ**), 2,4,6-трихлорфенола (**2,4,6-ТХФ**), 2-хлорфенола (**2-ХФ**), 4-хлор-3-метилфенола (**3-М-4-ХФ**), 2-нитрофенола (**2-НФ**), 4-нитрофенола (**4-НФ**), 2,4-диметилфенола (**2,4-ДМФ**) фирмы “Sigma-Aldrich” (США) с чистотой >98%. Исходные растворы концентратом 1 мг/мл готовили растворением точной навески в метаноле и хранили в темной стеклянной посуде при 4°C. Рабочие растворы готовили разбавлением деионизованной водой в день эксперимента.

Аппаратура. Магнитный сорбент отделяли от раствора, используя Nd-Fe-B-магнит (20 × 20 × 20 мм). Оптическую плотность растворов и молекулярные спектры поглощения фенолов регистрировали на спектрофотометре в стеклянных кюветках длиной 1 см. Для измерения рН растворов использовали рН-метр “Эксперт рН” (Россия) со стеклянным электродом. Пробирки встряхивали на механическом виброресмесителе “ЭКРОС-6500” (Санкт-Петербург, Россия). Навески взвешивали на аналитических весах “Voyager” (ОНАУС, Швейцария) с точностью ± 0.0001 г.

Использовали жидкостной хромато-масс-спектрометр фирмы “Shimadzu” (Япония), состоящий из следующих модулей: квадрупольного масс-спектрометра LCMS-2020 с ионизацией аналитов электрораспылением (ESI), химической ионизацией при атмосферном давлении (APCI) и приставкой DUIS для одновременной ионизации в режимах ESI и APCI; двух ВЭЖХ-насосов LC-20; автосамплера SIL-20AC.

ВЭЖХ-разделение осуществляли на колонке Luna C₁₈ 150 × 4.6 мм, диаметр частиц 5 мкм (Phenomenex, США). Для приготовления подвижной фазы применяли деионизованную воду, полученную на установке Milli-Q (Millipore, США); ацетонитрил степени чистоты HPLC Super gradient (Panreac, Испания), метанол степени чистоты Gradient HPLC Grade (Avantor Performance Materials, Польша). Использовали градиентное разде-

ление аналитов. В качестве компонента А подвижной фазы применяли деионизованную воду, в качестве компонента В — ацетонитрил (MeCN) или метанол (MeOH). Скорость потока подвижной фазы составляла 0.8 мл/мин.

Методика сорбции и десорбции фенолов в статическом режиме. В градуированные пробирки емк. 30 мл вносили растворы фенолов ($c = 10^{-7} - 10^{-4}$ М), доводили объем раствора до 10 мл дистиллированной водой, подкисленной раствором муравьиной кислоты до pH 3. Затем в полученный раствор помещали навеску сорбента (0.10–0.20 г), обработанную небольшим количеством этанола (3–4 порции по 50 мкл). Пробирки встряхивали на вибросмесителе в течение времени, необходимого для установления сорбционного равновесия.

После проведения сорбции раствор декантировали с помощью магнитной сепарации в течение 1–2 мин. Затем добавляли в пробирку 1–2 мл ацетонитрила и встряхивали на вибросмесителе. Элюент фильтровали через мембранный фильтр CHROMAFIL® Xtra PTFE-45/25 для удаления взвешенных частиц. Концентрацию фенолов в элюате определяли методом ВЭЖХ-МС.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оптимизация условий определения фенолов методом ВЭЖХ-МС. Одним из основных параметров, определяющих успех хроматографического разделения аналитов, является состав подвижной фазы. В качестве подвижных фаз использовали смеси MeOH–H₂O и MeCN–H₂O. Фенолы разделяли в режиме градиентного элюирования. Установили составы подвижных фаз, при которых достигается полное разделение фенолов: вода–ацетонитрил (0–8 мин 40% MeCN, 8–17 мин 50% MeCN, 17–25 мин 100% MeCN, 26–33 мин 40% MeCN) или вода–метанол (0–17 мин 60% MeOH, 17–17.1 мин 98% MeOH, 17.1–20 мин 60% MeOH) (рис. 1).

Так как фенолы являются слабыми кислотами, применяли режим регистрации отрицательных ионов. В качестве метода ионизации при определении фенолов ранее применяли электрораспыление, фотоионизацию и химическую ионизацию при атмосферном давлении. Отмечено, что при электрораспылительном способе ионизации чувствительность определения хлорфенолов значительно ниже, чем нитрофенолов, что связано с различной способностью этих веществ образовывать отрицательно заряженные ионы [14]. Метод химической ионизации при атмосферном давлении нивелирует это различие, хотя и в этом случае величина аналитического сигнала нитрофенолов выше, чем при определении хлорфенолов, уменьшаясь в ряду: 4-НФ >

> 2-НФ > 2,4-ДХФ > 2,4,6-ТХФ > 3-М-4-ХФ > 2-ХФ > 2,4-ДМФ.

В режиме SCAN выбрали наиболее интенсивные пики масс-спектра для каждого фенола: 2,4-ДХФ — 161, 3-М-4-ХФ — 141, 2-ХФ — 127, 4-НФ — 138, 2-НФ — 138, 2,4,6-ТХФ — 197, 2,4-ДМФ — 121 а.е.м.

В этих условиях построили градуировочные графики зависимости площади хроматографического пика от концентрации фенолов с использованием подвижных фаз, содержащих ацетонитрил или метанол. Градуировочные графики линейны в диапазоне 15–500 мкг/л для всех фенолов за исключением 3-М-4-ХФ и 2,4-ДМФ, для которых диапазон линейности составлял 50–500 мкг/л.

Установили, что при использовании подвижной фазы ацетонитрил–вода соотношение сигнал/шум ниже, чем в случае метанолсодержащей подвижной фазы. Тангенс угла наклона градуировочных зависимостей также несколько выше при использовании метанола.

Оптимизация условий сорбционного концентрирования фенолов на магнитном гидрофобизированном кремнеземе. Предварительные эксперименты показали, что время установления равновесия при извлечении фенолов на магнитном сорбенте ХМК-С₁₆ составляет 20 мин, а при десорбции ацетонитрилом — 10 мин (рис. 2). Исходная концентрация фенолов составляла 1×10^{-4} М, распределение контролировали спектрофотометрическим методом, определяя равновесную концентрацию фенола в водной фазе; концентрацию фенола в фазе сорбента рассчитывали по разности между начальной концентрацией и равновесной концентрацией в водной фазе.

Чувствительность определения фенолов методом ВЭЖХ-МС в выбранных условиях существенно выше, чем спектрофотометрическим методом, поэтому можно было наблюдать за сорбцией всей группы выбранных фенолов на уровне концентраций $10^{-7} - 10^{-6}$ М. Установили, что с уменьшением концентрации эффективность извлечения аналитов на магнитном сорбенте снижается, что, вероятно, связано с S-образной формой изотермы сорбции.

В статическом режиме на степень извлечения аналитов обычно влияют такие параметры, как масса сорбента и объем анализируемой пробы. Так, для увеличения коэффициента концентрирования стараются извлекать аналиты из максимального объема раствора. Увеличение массы сорбента обычно приводит к увеличению степени извлечения, но при этом может увеличиться объем элюента, необходимый для количественной десорбции.

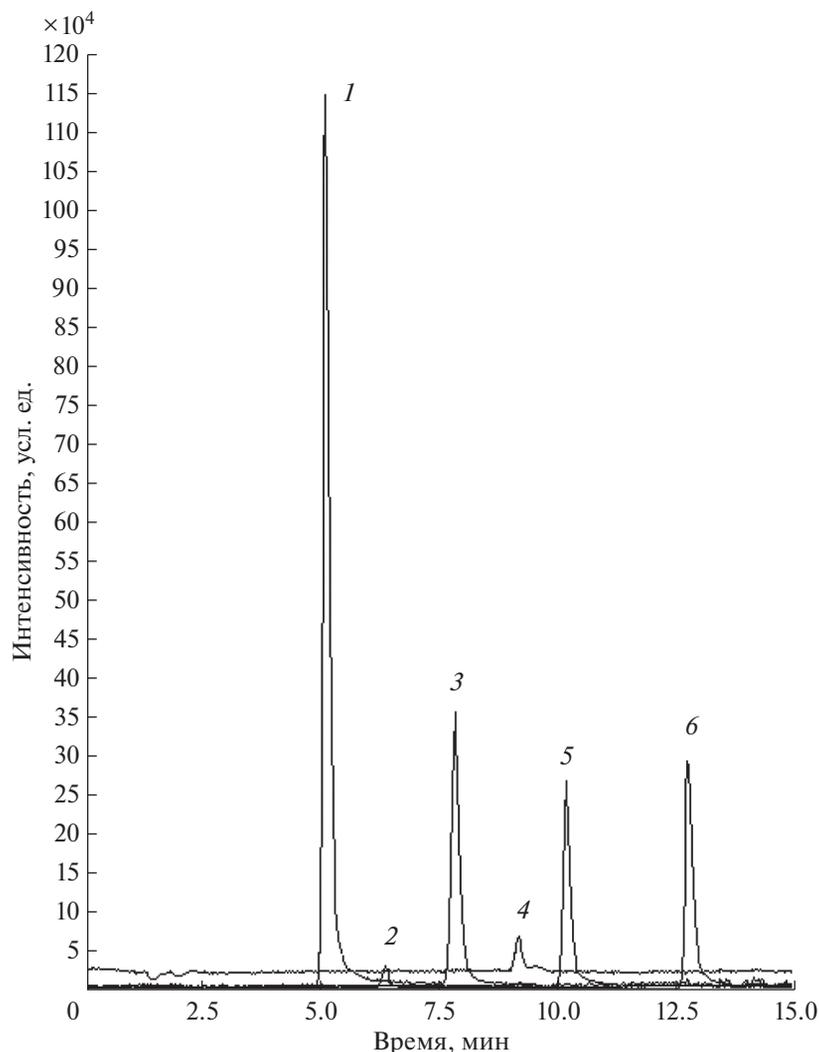


Рис. 1. Хроматограмма, полученная методом ВЭЖХ-МС. $c_{\text{фен}} = 1$ мкг/мл, подвижная фаза MeCN–H₂O. 1 – 4-нитрофенол; 2 – 2-хлорфенол; 3 – 2-нитрофенол; 4 – 3-метил-4-хлорфенол; 5 – 2,4-дихлорфенол; 6 – 2,4,6-трихлорфенол.

Как видно из рис. 3, увеличение навески сорбентов приводит к увеличению степени извлечения, но разница между навесками 0.15 и 0.20 г не столь существенна, поэтому в дальнейшем использовали навеску 0.15 г.

Увеличение объема десорбирующего раствора (ацетонитрила) от 1.0 до 1.5 мл увеличивает степень десорбции аналитов, дальнейшее увеличение до 2.0 мл не отражается на степени десорбции.

Степень извлечения аналитов из 10 и 20 мл раствора одинакова, увеличение объема до 30 мл приводит к небольшому снижению степени извлечения (на 5–7%) ди-, три-хлорфенолов и нитрофенолов. В дальнейших экспериментах фенолы извлекали из 20 мл раствора на сорбенте массой 0.15 г и десорбировали 1.5 мл ацетонитрила. В этих условиях степень извлечения аналитов

остается постоянной в интервале их концентраций 2–50 мкг/л (табл. 1).

Установили, что модифицирование гидрофобизированного кремнезема наночастицами магнетита не влияет на сорбционную способность исходного ХМК-С₁₆. Как видно из рис. 4, степень извлечения фенолов на исходном и магнитном сорбентах практически одинакова.

Определение фенолов методом ВЭЖХ-МС с предварительным сорбционным концентрированием. В выбранных условиях сорбционного извлечения фенолов на магнитном гидрофобизированном кремнеземе построили градуировочные зависимости площадей хроматографических пиков от концентраций фенолов в исходном растворе. Диапазон линейности составил 2–50 мкг/л. Пределы обнаружения, рассчитанные по 3 σ -критерию, приведены в табл. 2. Как видно, их значе-

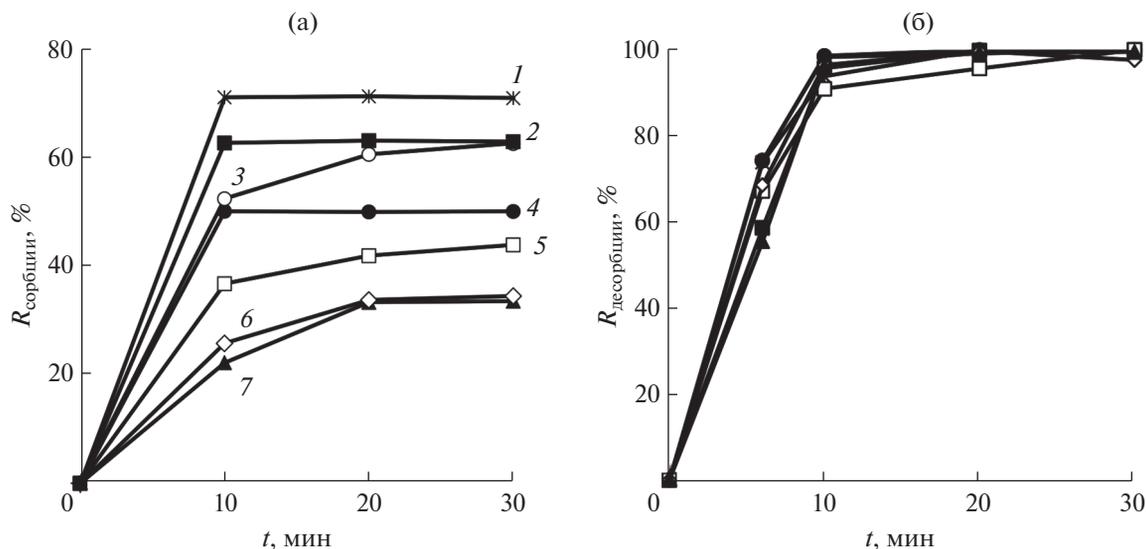


Рис. 2. Зависимости степени извлечения (а) и десорбции (б) фенолов от времени контакта фаз ($m_c = 0.05$ г, $c_{\text{фен}} = 10^{-4}$ М, $V_B = 5$ мл, рН 3, $V_{\text{MeCN}} = 3$ мл). 1 – 3-метил-4-хлорфенол; 2 – 2,4-дихлорфенол; 3 – 2,4-диметилфенол; 4 – 2,4,6-трихлорфенол; 5 – 2-нитрофенол; 6 – 4-нитрофенол; 7 – 2-хлорфенол.

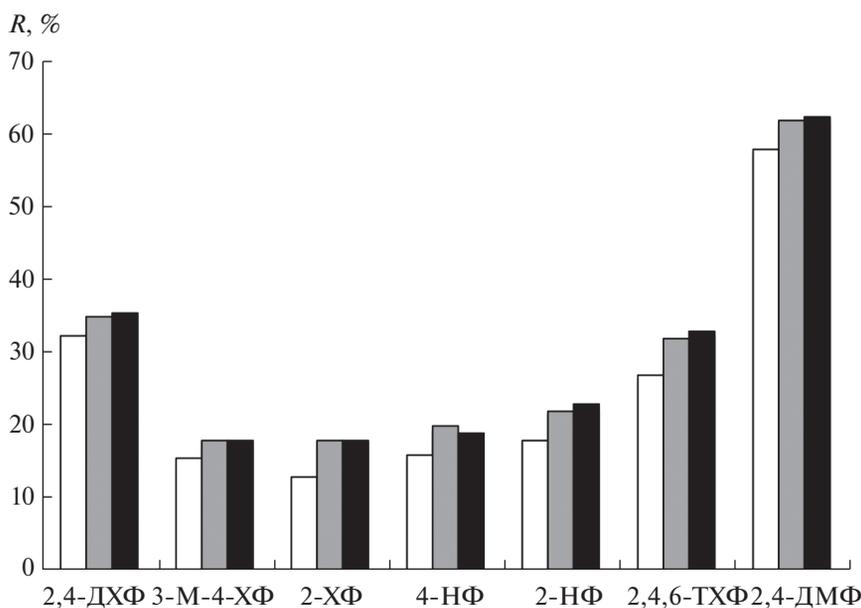


Рис. 3. Степень извлечения фенолов на разных навесках сорбента ХМК-С₁₆-100/Fe₃O₄. m_c : 0.10 г (белый цвет), 0.15 г (серый цвет), 0.20 г (черный цвет); $c_{\text{фен}} = 0.01$ мкг/мл, $V_B = 10$ мл; $V_{\text{элюента}} = 1.5$ мл.

ния намного ниже, чем ПДК фенолов. Предложенный способ апробирован при анализе природной воды (пруд в Царицыно, Москва).

Методика определения фенолов в природной воде. К предварительно отфильтрованной пробе объемом 15 мл добавляют 1.0 мл 1 М раствора дигидрофосфата калия, полученный раствор доводят до рН 3 0.1 М HCl (конечный объем – 20 мл), вносят 0.15 г сорбента ХМК-С₁₆/Fe₃O₄. Перед внесением в раствор навеску сорбента обрабаты-

вают небольшим количеством этанола (3–4 порции по 50 мкл). Пробирки встряхивают на вибросмесителе, отделяют раствор от сорбента методом магнитной сепарации и десорбируют ацетонитилом (1.5 мл). Концентрат фильтруют через мембранный фильтр CHROMAFIL® Xtra PTFE-45/25 для удаления взвешенных частиц. Аликвоту (10 мкл) инжигируют в ВЭЖХ-МС-систему. Содержание фенолов рассчитывают по градуиро-

Таблица 1. Степень извлечения фенолов на магнитном сорбенте ($m_{\text{сорб}} = 0.15$ г, $c_{\text{фен}} = 2-50$ мкг/л, $V_{\text{в}} = 20$ мл, $V_{\text{элюента}} = 1.5$ мл, $n = 4$, $P = 0.95$)

Фенол	R, %
2,4-ДХФ	35 ± 5
3-М-4-ХФ	18 ± 2
2-ХФ	18 ± 3
4-НФ	20 ± 2
2-НФ	22 ± 2
2,4,6-ТХФ	32 ± 4
2,4-ДМФ	62 ± 10

Таблица 2. Пределы обнаружения фенолов с предварительным концентрированием и предельно допустимые концентрации фенолов в природных водах

Фенол	c_{min} , мкг/л	ПДК фенолов в природных водах, мкг/л
2,4-ДХФ	0.3	2
3-М-4-ХФ	0.4	20
2-ХФ	1.0	4
4-НФ	0.2	20
2-НФ	0.5	30
2,4,6-ТХФ	0.2	4
2,4-ДМФ	1.0	10

Таблица 3. Результаты определения фенолов в воде Царицынского пруда ($m_{\text{с}} = 0.15$ г, $V_{\text{в}} = 20$ мл, $V_{\text{элюента}} = 1.5$ мл, $n = 3$, $P = 0.95$)

Фенол	Введено, мкг/л	Найдено, мкг/л
2,4-ДХФ	0	2 ± 1
	10	11 ± 2
4-НФ	0	0
	10	11 ± 2
2-НФ	0	0
	10	10 ± 2
2,4,6-ТХФ	0	0
	10	9 ± 2
3-М-4-ХФ	0	3 ± 2
	10	12 ± 2
2,4-ДМФ	0	2 ± 1
	10	13 ± 2

вочному графику, полученному с предварительным сорбционным концентрированием.

Правильность определения фенолов подтверждали методом введено–найдено (табл. 3).

Таким образом, оптимизированы условия сорбционного извлечения 2,4-дихлорфенола, 2,4,6-трихлорфенола, 2-хлорфенола, 4-хлор-3-метилфенола, 2-нитрофенола, 4-нитрофенола, 2,4-диметилфенола на магнитном гидрофобизи-

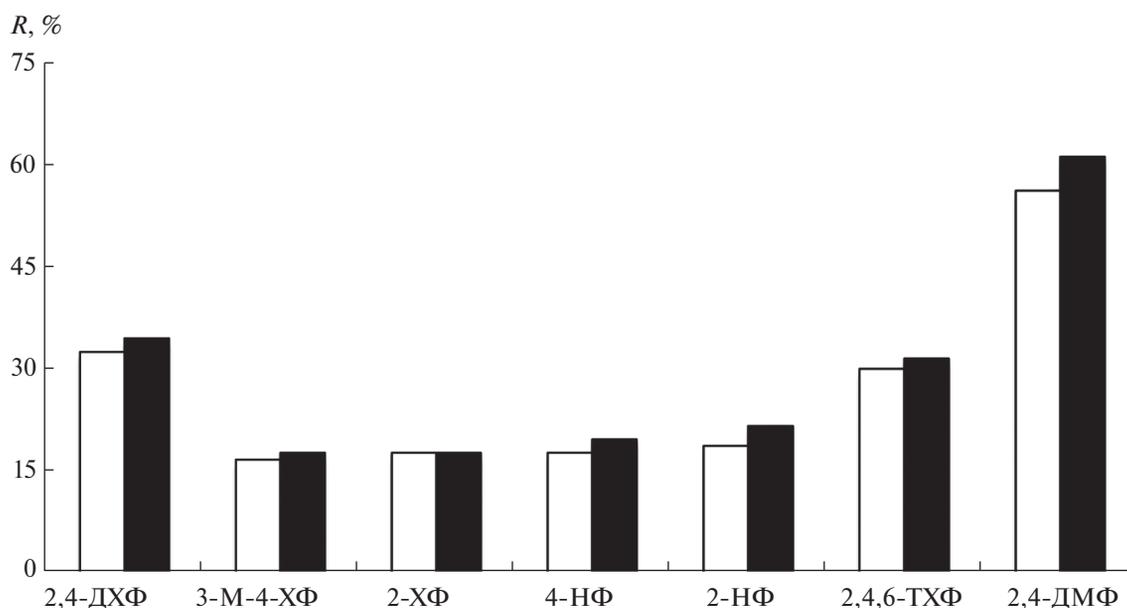


Рис. 4. Степень извлечения фенолов на ХМК-С₁₆-100 (белый цвет) и ХМК-С₁₆-100/Fe₃O₄ (черный цвет). $m_{\text{с}} = 0.15$ г, $c_{\text{фен}} = 0.01$ мкг/мл, $V_{\text{в}} = 20$ мл, $V_{\text{элюента}} = 1.5$ мл.

рованном кремнеземе. Предложен способ определения изученных фенолов в водах с предварительным извлечением методом магнитной твердофазной экстракции и детектированием методом ВЭЖХ-МС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Belloli R., Barletta B., Bolzacchini E., Meinardi S., Orlandi M., Rindone B.* Determination of toxic nitrophenols in the atmosphere by high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* 1999, V. 846. P. 277.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00030-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00030-8)
2. *Lüttke J., Scheer V., Levsen K., Wünsch G., Cape J.N., Hargreaves K.J., Storeton-West R.L., Acker K., Wieprecht W., Jones B.* Occurrence and formation of nitrated phenols in and out of cloud // *Atmos. Environ.* 1997. V. 31. P. 2637.
[https://doi.org/10.1016/S1352-2310\(96\)00229-4](https://doi.org/10.1016/S1352-2310(96)00229-4)
3. *Schüssler W., Nitschke L.* Nitrophenols in precipitation // *Chemosphere.* 2001. V. 42. P. 277.
[https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(00\)00086-2](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(00)00086-2)
4. *Lüttke J., Levsen K., Acker K., Wieprecht W., Möller D.* Phenols and nitrated phenols in clouds at mount brocken // *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 2006. V. 74. P. 69.
<https://doi.org/10.1080/03067319908031417>
5. *Collett Jr J.L., Hoag K.J., Rao X., Pandis S.N.* Internal acid buffering in San Joaquin Valley fog drops and its influence on aerosol processing // *Atmos. Environ.* 1999. V. 33. P. 4833.
[https://doi.org/10.1016/S1352-2310\(99\)00221-6](https://doi.org/10.1016/S1352-2310(99)00221-6)
6. *Richartz H., Reischla A., Trautner F., Hutzing O.* Nitrated phenols in fog // *Atmos. Environ. A: General Topics.* 1990. V. 24. P. 3067.
[https://doi.org/10.1016/0960-1686\(90\)90485-6](https://doi.org/10.1016/0960-1686(90)90485-6)
7. *Tremp J., Mattrel P., Fingler S., Giger W.* Phenols and nitrophenols as tropospheric pollutants: Emissions from automobile exhausts and phase transfer in the atmosphere // *Water, Air, Soil Pollut.* 1993. V. 68. P. 113.
<https://doi.org/10.1007/BF00479396>
8. *Igbiosa E.O., Odjadjare E.E., Chigor V.N., Igbiosa I.H., Emoghene A.O., Ekhaise F.O., Igiehon N.O., Idemudia O.G.* Toxicological profile of chlorophenols and their derivatives in the environment: The public health perspective // *Sci. World J.* 2013. V. 2013. P. 1.
<https://doi.org/10.1155/2013/460215>
9. СанПиН 1.2.3685-21. Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания. Раздел III. Нормативы качества и безопасности воды. Введен 2021-03-01 / Справочная правовая система Гарант [Официальный сайт]. [http://ivo.garant.ru/#/document/400274954/paragraph/37882/document/3642/showentries/0/highlight/нормы%20по%20воде%20в%20соответствии%20санпином%201.-2.-3685-21:2\(01.03.2022\)](http://ivo.garant.ru/#/document/400274954/paragraph/37882/document/3642/showentries/0/highlight/нормы%20по%20воде%20в%20соответствии%20санпином%201.-2.-3685-21:2(01.03.2022)).
10. *Chen X., Ning X., Lai X., Wang Y., Zhang Y., He Y.* Chlorophenols in textile dyeing sludge: Pollution characteristics and environmental risk control // *J. Hazard. Mater.* 2021. V. 416. P. 1.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125721>
11. *Hofmann D., Hartmann F., Herrmann H.* Analysis of nitrophenols in cloud water with a miniaturized light-phase rotary perforator and HPLC-MS // *Anal. Bioanal. Chem.* 2008. V. 391. P. 161.
<https://doi.org/10.1007/s00216-008-1939-6>
12. *Alonso M.C., Puig D., Silgoner I., Grasserbauer M., Barceló D.* Determination of priority phenolic compounds in soil samples by various extraction methods followed by 69 liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* 1998. V. 823. P. 231.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00110-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00110-1)
13. *Puig D., Barceló D.* Off-line and on-line solid-phase extraction followed by liquid chromatography for the determination of priority phenols in natural waters // *J. Chromatogr.* 1995. V. 40. P. 435.
<https://doi.org/10.1007/BF02269909>
14. *Ye X., Kuklenyik Z., Needham L.L., Calafat A.M.* Automated on-line column switching HPLC-MS/MS method with peak focusing for the determination of nine environmental phenols in urine // *Anal. Chem.* 2005. V. 77. P. 5407.
<https://doi.org/10.1021/ac050390d>
15. *Ye X., Tao L.J., Needham L.L., Calafat A.M.* Automated on-line column-switching HPLC-MS/MS method for measuring environmental phenols and parabens in serum // *Talanta.* 2008. V. 76. P. 865.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.04.034>
16. *Ye X., Kuklenyik Z., Needham L.L., Calafat A.M.* Measuring environmental phenols and chlorinated organic chemicals in breast milk using automated on-line column switching-high performance liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. B.* 2006. V. 831. P. 110.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.11.050>
17. *Mußmann P., Eisert R., Levsen K., Wünsch G.* Determination of nitrophenols, diaminitoluenes, and chloroaromatics in ammunition wastewater // *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 1995. V. 23. P. 13.
<https://doi.org/10.1002/ahch.19950230104>
18. *Wennrich L., Efer J., Engewald W.* Gas chromatographic trace analysis of underivatized nitrophenols // *Chromatographia.* 1995. V. 41. P. 361.
<https://doi.org/10.1007/BF02688052>
19. *Ardrey R.E.* Liquid Chromatography—Mass Spectrometry: An Introduction. Huddersfield, UK: Wiley, 2003. 276 p.
<https://doi.org/10.1002/0470867299>
20. *Wissjock R., Rosenberg E., Grasserbauer M.* Comparison of different sorbent materials for on-line solid-phase extraction with liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry of phenols // *J. Chromatogr. A.* 2000. V. 896. P. 159.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00730-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00730-5)
21. *Карсакова Ю.В., Тихомирова Т.И., Цизин Г.И.* Синтез и исследование свойств магнитных сорбентов на основе гидрофобизированных кремнезёмов // *Вест. Моск. ун-та. Сер. 2: Химия.* 2020. Т. 61. С. 369. (*Karsakova I.V., Tikhomirova T.I., Tsysin G.I.* Synthesis and study of the properties of magnetic adsorbents based on hydrophobized silica // *Moscow Univ. Chem. Bull.* 2020. V. 75. P. 293.)
<https://doi.org/10.3103/S0027131420050041>

УДК 543.613;543.544.3;543.51

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДО- И ПОСЛЕОПЕРАЦИОННЫХ ПРОФИЛЕЙ ЛЕТУЧИХ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ ИЗ ВЫДЫХАЕМОГО ВОЗДУХА ПАЦИЕНТОВ С РАКОМ ЛЕГКИХ И С ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫМИ ОПУХОЛЯМИ

© 2022 г. Э. М. Гашимова^{а, *}, А. З. Темердашев^а, В. А. Порханов^б,
И. С. Поляков^б, Д. В. Перунов^б

^аКубанский государственный университет
ул. Ставропольская, 149, Краснодар, 350040 Россия

^бНаучно-исследовательский институт – Краевая клиническая больница № 1 им. С.В. Очаповского
ул. 1 Мая, 167, Краснодар, 350086 Россия

*e-mail: elina.gashimova@yandex.ru

Поступила в редакцию 14.04.2022 г.

После доработки 19.04.2022 г.

Принята к публикации 20.04.2022 г.

Анализ выдыхаемого воздуха – перспективный подход для диагностики рака легких в клинической практике. Исследованы профили летучих органических соединений из выдыхаемого воздуха пациентов со злокачественными и доброкачественными образованиями до и после оперативного вмешательства. Характер изменений качественного состава выдыхаемого воздуха после операции идентичен для доброкачественных и злокачественных опухолей, однако соотношения площадей пиков некоторых компонентов, которые статистически значимо изменялись после операции, отличались у пациентов со злокачественными и доброкачественными образованиями.

Ключевые слова: выдыхаемый воздух, летучие органические соединения, ГХ–МС, рак легких, доброкачественные опухоли.

DOI: 10.31857/S0044450222120039

Высокие темпы прогрессирования рака легких и отсутствие явной симптоматики патологии на ранних стадиях – основные причины большого количества летальных исходов среди пациентов с данным заболеванием [1]. Высокая смертность и тяжелое течение рака легких на запущенных стадиях обуславливают рост интереса ученых к разработке альтернативных способов диагностики, способных выявлять патологию на ранних стадиях. Особенно актуальными являются способы, предполагающие неинвазивный отбор проб, что позволяет проводить тестирование не только в высокоспециализированных клиниках, но и на поликлиническом уровне в режиме скрининга. Среди объектов исследования наиболее перспективным представляется выдыхаемый воздух [2–4].

Первые работы, посвященные выявлению биомаркеров рака легких в профиле летучих органических соединений (ЛОС) в выдыхаемом воздухе, появились еще в конце восьмидесятых годов прошлого столетия [5–7], а к настоящему времени опубликованы результаты целого ряда исследований на эту тему с применением различ-

ных аналитических методов [8–10]. Наиболее широкое распространение получил метод газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ–МС), так как он позволяет получать информацию о качественном и количественном составе пробы [11–17]. Помимо ГХ–МС, для анализа выдыхаемого воздуха применяют и другие варианты масс-спектрометрии: масс-спектрометрию с реакцией переноса протона [18], масс-спектрометрию ионной подвижности [19, 20], масс-спектрометрию выбранных ионов в потоке [21].

В последние годы растет количество публикаций, посвященных применению сенсорных систем типа “электронный нос” [22–24] различных конфигураций для анализа выдыхаемого воздуха в диагностических целях, что обусловлено простотой и высокой скоростью анализа и зачастую отсутствием стадии подготовки проб. Показана возможность использования различных типов коммерчески реализуемых приборов для анализа выдыхаемого воздуха для диагностики рака легких, например Aeonose [25, 26], представляющего

собой сенсорную систему, состоящую из полупроводниковых датчиков на основе оксидов металлов, или “Суганосе 320” [27–29], состоящего из сенсоров на основе проводящих полимеров. Продемонстрирована также возможность применения множества альтернативных сенсорных систем: на основе кварцевых микровесов [30, 31], на основе наночастиц [32, 33], колориметрических [34] и комбинированных сенсорных систем [35, 36].

Несмотря на большое количество исследований, посвященных выявлению биомаркеров рака легких в выдыхаемом воздухе с использованием различных аналитических методов, подобный способ диагностики не внедрен в клиническую практику. Результаты работ различных авторов зачастую разрознены, а перечень предполагаемых биомаркеров в значительной степени варьируется [13–15, 18]. Классическая схема эксперимента представляет собой исследование профилей ЛОС в выдыхаемом воздухе пациентов с раком легких и здоровых людей и построение классификационной модели на основании набора компонентов, наиболее отличающихся в исследуемых группах. Зачастую в исследованиях задействуют только пациентов, еще не проходивших лечения, однако дополнительным подтверждением того, что изменения содержания ЛОС действительно обусловлены заболеванием, может служить информация, полученная в результате исследования профиля ЛОС в выдыхаемом воздухе пациентов с раком легких до и после операции: если изменения в профиле ЛОС в выдыхаемом воздухе обусловлены опухолью, то, вероятно, после удаления опухоли из организма профиль ЛОС будет меняться. С другой стороны, нередко сопоставляют профили ЛОС в выдыхаемом воздухе пациентов с раком легких и здоровых добровольцев без каких-либо легочных патологий, однако некоторые легочные заболевания, например доброкачественные опухоли, невозможно отличить от рака легких при диагностике с помощью компьютерной томографии, поэтому для установления диагноза в большинстве случаев требуется хирургическое вмешательство. В связи с этим особый интерес представляет не только сопоставление групп “норма–патология”, но и групп со злокачественным и доброкачественным образованиями в легких.

В данной работе представлены результаты применения метода ГХ–МС для анализа выдыхаемого воздуха пациентов с раком легких (злокачественной опухолью) и доброкачественными опухолями до и после резекции, исследована изменчивость профилей ЛОС после резекции в зависимости от типа патологии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Участники исследования. В эксперименте участвовали 12 пациентов, которым в результате осмотра торакальным хирургом была назначена операция по удалению опухоли, характер которой был известен только на основании гистологического исследования операционного материала. Пробы “до операции” отбирали перед поступлением пациента в хирургическое отделение НИИ ККБ № 1 им. С.В. Очаповского (Краснодар) на операцию. Пробы “после операции” отбирали перед выпиской пациента, т. е. через 5–10 дней после операции. Пробы отбирали с утра натощак. Проведение клинического исследования одобрено локальным этическим комитетом (протокол № 122 заседания локального этического комитета НИИ ККБ им. С.В. Очаповского министерства здравоохранения Краснодарского края от 19.12.2019 г.).

Материалы и методы. При проведении хроматографического анализа использовали стандартные образцы этанола, бензола, толуола, ацетонитрила, *n*-гексана, *n*-гептана (>95%, Sigma-Aldrich, США), диэтилового эфира (>95%, Acros Organics, Бельгия), ацетона, бутанола-1, бутанола-2, пропанола-2 х.ч. (Вектон, Россия), этилацетата, бутилацетата х.ч. (Компонент-реактив, Россия).

Приборы и оборудование. Пробы отбирали в тедларовые пробоотборные пакеты объемом 5 л (Supelco, Bellefonte, PA, США), которые перед использованием пятикратно кондиционировали азотом. Отбор проб осуществляли после того, как добровольцы минимум в течение 10 мин находились в спокойном состоянии без физических нагрузок. Добровольцы заполняли пробоотборный пакет в следующем режиме: участники исследования задерживали воздух на 10 с и совершали глубокий выдох в пакет для отбора проб, повторяя процедуру до заполнения пакета. Образцы выдыхаемого воздуха концентрировали с применением сорбционных трубок, наполненных сорбентом Тенпах ТА (35/60 меш), (ЗАО СКБ “Хроматэк”, Россия), для чего часть пробы из пробоотборного пакета объемом 0.5 л пропускали со скоростью 200 мл/мин через сорбционную трубку с помощью аспиратора ПВ-2 (ЗАО СКБ “Хроматэк”, Россия). Для каждой пробы параллельно отбирали пробу окружающего воздуха для учета влияния экзогенных компонентов.

Для ГХ–МС-анализа применяли систему, состоящую из двухстадийного термодесорбера ГДС-1 (ЗАО СКБ “Хроматэк”, Россия) и газового хроматографа Хроматэк-Кристалл 5000.2, соединенного с квадрупольным масс-спектрометрическим детектором Хроматэк МСД, оснащенный источником электронной ионизации. Компоненты разделяли на капиллярной колонке Supelco Supel-Q PLOT (30 м × 0.32 мм). Условия концентрирования и анализа проб оптимизированы ра-

Таблица 1. Условия анализа проб выдыхаемого воздуха методом газовой хромато-масс-спектрометрии с термодесорбцией

Параметр	Значение			
	Термодесорбер			
Газ-носитель	Гелий			
Температура крана, °С	150			
Температура переходной линии, °С	180			
Температура десорбции, °С	250			
Начальная температура ловушки, °С	–10			
Конечная температура ловушки, °С	250			
Время десорбции, мин	5			
	Хромато-масс-спектрометр			
Газ-носитель	Гелий			
Температура инжектора, °С	250			
Деление потоком	1 : 10			
Температура источника ионизации, °С	200			
Температура переходной линии, °С	250			
Режим сканирования	Сканирование полного ионного тока			
Диапазон сканирования масс, Да	33–220			
Энергия ионизации, эВ	70			
Температурная программа:				
скорость нагрева, °С/мин	0	10	6	4
<i>t</i> , °С	50	150	220	250
время, мин	0	0	7	0
скорость потока газа-носителя, мл/мин	1.30			

нее [37]. Для управления и обработки полученных данных использовали программное обеспечение “Хроматэк Аналитик” (ЗАО СКБ “Хроматэк”, Россия). Условия разделения и детектирования приведены в табл. 1.

При отсутствии стандартных веществ ЛОС, присутствующие в образцах, идентифицировали путем сопоставления полученных масс-спектров с библиотечными (NIST 17). Удовлетворительным признавали результат, при котором фактор подобия спектра превышал 85%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на актуальность и интерес многих исследователей к разработке способа диагностики рака легких по выдыхаемому воздуху, на сегодняшний день ключевым вопросом остается определение исчерпывающего перечня биомаркеров, изменение содержаний в выдыхаемом воздухе которых свидетельствовало бы о наличии либо отсутствии заболевания, а также доказательство того, что изменения содержаний ЛОС действительно обусловлены патологией. Другой не менее важной проблемой остается селективность предполагаемых биомаркеров рака легких по отноше-

нию к другим заболеваниям. Например, в исследовании [16] отмечают, что группы пациентов с раком легких, доброкачественными опухолями и здоровых добровольцев с высокой достоверностью удается дифференцировать лишь по наличию или отсутствию патологии в целом, однако разделить доброкачественную и злокачественную опухоли с высокой точностью не представляется возможным. В работе [38] авторам удалось классифицировать пациентов с раком легких и доброкачественными опухолями с общей точностью, не превышающей 65%.

Одним из косвенных подтверждений причастности опухоли к изменениям в профиле ЛОС в выдыхаемом воздухе может служить изменчивость профиля ЛОС после удаления опухоли из организма, причем интересным представляется рассмотрение как злокачественной, так и доброкачественной опухоли. В работе [39] наблюдали статистически значимое снижение концентраций изопрена и декана после операции у пациентов с раком легких, а в работе [40] подобную зависимость наблюдали для 2-бутанона, 2-гидроксиацетальдегида и 4-гидроксигексеналя.

Ранее опубликована только одна работа [41], в которой рассматривается изменение профиля ЛОС в выдыхаемом воздухе после операции у пациентов со злокачественными и доброкачественными опухолями с применением электронного носа. Показано, что профили ЛОС в выдыхаемом воздухе у пациентов с раком легких изменяются сильнее, чем профили ЛОС в случае доброкачественной опухоли, однако в работе отсутствует информация об изменениях качественного и количественного состава выдыхаемого воздуха до и после операции в случае злокачественной и доброкачественной опухоли.

В настоящем исследовании применяли метод ГХ-МС для сопоставления профилей ЛОС в выдыхаемом воздухе до и после резекции злокачественной и доброкачественной опухолей. Из результатов гистологического исследования операционного материала установлено, что среди пациентов, участвующих в эксперименте, у семи – рак легких, а у пяти – доброкачественная опухоль (три пациента – фибромартозная гамартома, два пациента – хондромартозная гамартома). На первом этапе изучали изменение качественного состава образцов, полученных до и после операции (табл. 2). Как видно из табл. 2, в большинстве случаев после операции не обнаруживали аллилметилсульфид как у пациентов со злокачественной, так и с доброкачественной опухолью. Ранее аллилметилсульфид не относили к биомаркерам рака легких, однако он входил в состав соотношения, статистически значимо отличающегося у пациентов с раком легких разных гистологических типов [42]. Также можно наблюдать уменьшение доли пациентов, у которых после операции наблюдали толуол, этилбензол и гептан. Данные ЛОС неоднократно относили к биомаркерам рака легких [16, 39], однако их присутствие в выдыхаемом воздухе скорее связывают с курением [43, 44]. Стоит отметить, что если изменения качественного состава выдыхаемого воздуха до и после операции наблюдались, то их характер был идентичен как для злокачественных, так и для доброкачественных опухолей.

При статистической обработке полученных данных в качестве параметров использовали площади пиков соединений и их соотношения. Учитывая малый размер выборки, для оценки значимости изменений параметров до и после операции использовали непараметрический критерий Уилкоксона для связанных выборок. Данный критерий использовали только для тех соединений и их соотношений, которые присутствовали в более чем 50% образцов во всех четырех рассматриваемых группах: в группах с доброкачественными или злокачественными опухолями до или после операции, а именно: ацетон, изопрен, диметилсульфид, диметилдисульфид, 1-метилтиопропан,

2-пентанон, 1-метилтиопропен, ацетонитрил и 2,3-бутандион.

В табл. 3 представлены параметры, статистически значимо изменяющиеся до и после операции в группах пациентов со злокачественными и доброкачественными опухолями. Стоит отметить, что площадь пика ни одного из рассматриваемых соединений статистически значимо не отличалась в выдыхаемом воздухе пациентов до и после резекции; такие изменения наблюдались только для соотношений ЛОС. У пациентов с доброкачественной опухолью статистически значимо изменились после операции только соотношения диметилдисульфид/2-пентанон, однако в случае злокачественной опухоли – шесть соотношений (табл. 3). Таким образом, подход, предполагающий рассмотрение в качестве параметров не только соединений, но и их соотношений, более чувствителен и позволяет выявить большее количество взаимосвязей с заболеванием. Данный подход позволяет также выявлять более устойчивые параметры, на которые в меньшей степени влияют возможные мешающие факторы, что продемонстрировано нами ранее [42, 45]. В данной работе найдены соотношения компонентов, значения которых статистически значимо отличаются у пациентов до и после операции, однако среди них нет соотношений, которые рассматривались ранее в качестве потенциальных биомаркеров. В первую очередь, это может быть обусловлено небольшим количеством рассматриваемых соединений ввиду малой выборки данных. Стоит отметить, что в исследованиях, проводимых ранее, в качестве группы сравнения рассматривали здоровых людей без патологий легких, а в данное исследование включены также пациенты с доброкачественными опухолями. В исследовании других авторов [39] наблюдали статистически значимое снижение концентрации изопрена после операции у пациентов с раком легких, однако в данной работе подобную зависимость не обнаружили. Остальные соединения, концентрации которых изменялись после резекции по данным авторов работ [39, 40], не рассматривали ввиду их отсутствия в большинстве образцов. Из полученных результатов видно, что удаление доброкачественной и злокачественной опухоли по-разному сказывается на профиле наиболее часто встречающихся в выдыхаемом воздухе пациентов ЛОС. Для подтверждения полученных результатов необходимо провести анализ выдыхаемого воздуха большего количества пациентов с доброкачественными и злокачественными образованиями. Представляет интерес сопоставление полученных результатов с результатами исследований с участием большого количества пациентов с раком легких и здоровых людей и рассмотрение в качестве параметров не только ЛОС, но и их соотношений.

Таблица 2. Частота появления (%) летучих органических соединений у пациентов с раком легких и доброкачественными опухолями до и после операции

ЛОС	Вся выборка	Рак легких		Доброкачественная опухоль	
		до операции	после операции	до операции	после операции
Ацетон	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Изопрен	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Диметилсульфид	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Диметилдисульфид	95.8	100.0	85.7	100.0	100.0
1-Метилтиопропан	87.5	85.7	100.0	60.0	100.0
2-Пентанон	87.5	100.0	85.7	60.0	100.0
1-Метилтиопропен	83.3	100	85.7	60.0	80.0
Ацетонитрил	83.3	100	71.4	100.0	60.0
2,3-Бутандион	83.3	85.7	85.7	80.0	80.0
Гексан	66.7	71.4	57.1	100.0	40.0
Диметил трисульфид	62.5	85.7	57.1	60.0	40.0
2-Бутанон	54.2	28.5	71.4	40.0	80.0
Аллилметилсульфид	45.8	100.0	14.3	60.0	0.0
Гептан	50.0	71.4	28.5	100.0	0.0
Гексаналь	50.0	71.4	57.1	20.0	60.0
Бензальдегид	45.8	57.1	28.5	20.0	80.0
Толуол	41.7	71.4	0.0	80.0	20.0
Этилбензол	41.7	71.4	0.0	60.0	40.0
Пентаналь	37.5	14.2	42.8	20.0	80.0
Октан	37.5	42.8	28.5	20.0	40.0
1-Пентанол	37.5	42.8	28.5	20.0	40.0
Нонаналь	37.5	42.8	28.5	20.0	60.0
Додекан	37.5	42.8	42.8	0.0	40.0
Октаналь	37.5	42.8	28.5	20.0	40.0
Бутаналь	29.2	14.2	28.5	20.0	60.0
Деканаль	20.8	42.8	14.3	0.0	20.0
<i>m + n</i> -Ксилол	20.8	57.1	0.0	0.0	20.0
<i>o</i> -Ксилол	20.8	57.1	0.0	0.0	20.0
Бензол	20.8	57.1	14.3	0.0	0.0
Пропилбензол	16.7	42.8	0.0	0.0	20.0
Нонан	12.5	14.2	0.0	20.0	20.0
Ундекан	12.5	28.5	0.0	20.0	0.0
Бутилацетат	12.5	28.5	0.0	0.0	20.0
Гептаналь	12.5	14.2	14.3	0.0	20.0

Таблица 3. Параметры, значения которых статистически значимо изменялись после операции в группах пациентов со злокачественными и доброкачественными опухолями

Параметр	p-Уровень
Доброкачественные опухоли	
Диметилдисульфид/2-пентанон	0.043
Злокачественные опухоли	
Диметилдисульфид/ацетон	0.043
1-Метилтиопропан/1-метилтиопропен	0.028
1-Метилтиопропен/диметилсульфид	0.018
1-Метилтиопропен/ацетон	0.028
1-Метилтиопропен/изопрен	0.018
2,3-Бутандион/диметилсульфид	0.046

Исследование выполнено за счет средств гранта Российского научного фонда и Кубанского научного фонда № 22-13-20018 с использованием научного оборудования ЦКП “Эколого-аналитический центр” Кубанского госуниверситета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Huang J., Deng Y., Tin M. S., Lok V., Ngai C. H., Zhang L., Lucero-Prisno D.E., Xu W., Zheng Z.-J., Elcarte E., Withers M., Wong M.C.S. Distribution, risk factors, and temporal trends for lung cancer incidence and mortality: A global analysis // *Chest*. 2022. V. 161. № 4. P. 1101.
- Antoniou S.X., Gaude E., Ruparel M., Schee M.P., Janes S.M., Rintoul R.C. The potential of breath analysis to improve outcome for patients with lung cancer // *J. Breath Res.* 2019. V. 13. № 3. Article 034002.
- Peled N., Fuchs V., Kestenbaum E.H., Oscar E., Bitran R. An update on the use of exhaled breath analysis for the early detection of lung cancer // *Lung Cancer (Auckl)*. 2021. V. 12. P. 81.
- Marzorati D., Mainardi L., Sedda G., Gasparri R., Spaggiari L., Cerveri P. A review of exhaled breath key role in lung cancer diagnosis // *J. Breath Res.* 2019. V. 13. № 3. Article 034001.
- O'Neill H.J., Gordon S.M., O'Neill M.H., Gibbons R.D., Szidon J.P. A computerized classification technique for screening for the presence of breath biomarkers in lung cancer // *Clin. Chem.* V. 34. № 8. P. 1613.
- Preti G., Labows J.N., Kostelc J.G., Aldinger S. Daniele R. Analysis of lung air from patients with bronchogenic carcinoma and controls using gas chromatography-mass spectrometry // *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. App.* 1988. V. 432. P. 1.
- Phillips M., Gleeson K., Hughes J.M.B., Greenberg J., Cataneo R.N., Baker L., McVay W.P. Volatile organic compounds in breath as markers of lung cancer: A cross-sectional study // *Early Report*. 1999. V.353. № 9168. P. 1930.
- Wallace M.A.G., Pleil J.D. Evolution of clinical and environmental health applications of exhaled breath research: Review of methods: Instrumentation for gas-phase, condensate, and aerosols // *Anal. Chim. Acta*. 2018. V. 28. № 152. Article 190011.
- Hashoul D., Haick H. Sensors for detecting pulmonary diseases from exhaled breath // *Eur. Respir. Rev.* 2019. V. 28. № 152. Article 190011.
- Hua Q., Zhu Y., Liu H. Detection of volatile organic compounds in exhaled breath to screen lung cancer: A systematic review // *Future Oncol.* 2018. V. 14. № 16. P. 1647.
- Phillips M., Bauer T.L., Cataneo R.N., Lebauer C., Mundada M., Pass H.I., Ramakrishna N., Rom W.N., Vallieres E. Blinded validation of breath biomarkers of lung cancer, a potential ancillary to chest ct screening // *Plos One*. 2015. V. 10. № 12. Article e0142484.
- Pesesse R., Stefanuto P.H., Schleich F., Louis R., Focant J.F. Multimodal chemometric approach for the analysis of human exhaled breath in lung cancer patients by TD-GC × GC-TOFMS // *J. Chromatogr. B*. 2019. V. 1114–1115. P. 146.
- Zou Y., Wang Y., Jiang Z., Zhou Y., Chen Y., Hu Y., Jiang G., Xie D. Breath profile as composite biomarkers for lung cancer diagnosis // *Lung Cancer*. 2021. V. 154. P. 206.
- Saidi T., Moufid M., Beleño-Saenz K.J., Welearegay T.G., Bari N.E., Jaimes-Mogollon A.L., Ionescu R., Bourkadi J.E., Benamor J., Ftouh M.E., Bouchikhi B. Non-invasive prediction of lung cancer histological types through exhaled breath analysis by UV-irradiated electronic nose and GC/QTOF/MS // *Sens. Actuators B: Chem.* 2020. V. 311. Article 127932.
- Rudnicka J., Kowalkowska T., Buszewski B. Searching for selected VOCs in human breath samples as potential markers of lung cancer // *Lung Cancer*. 2019. V. 135. P. 123.
- Wang M., Sheng J., Wu Q., Zou Y., Hu Y., Ying K., Wan H., Wang P. Confounding effect of benign pulmonary diseases in selecting volatile organic compounds as markers of lung cancer // *J. Breath Res.* 2018. V. 12. № 4. Article 046013.
- Wang C., Long Y., Li W., Dai W., Xie S., Liu Y., Zhang Y., Liu M., Tian Y., Li Q., Duan Y. Exploratory study on classification of lung cancer subtypes through a combined k-nearest neighbor classifier in breathomics // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. № 1. P. 5880.
- Wehinger A., Schmid A., Mechtcheriakov S., Ledochowski M., Grabmer C., Gastl G.A., Amann A. Lung cancer detection by proton transfer reaction mass-spectrometric analysis of human breath gas // *Int. J. Mass Spectrom.* 2007. V. 265. P. 49.
- Handa H., Usuba A., Maddula S., Baumbach J.I., Mine-shita M., Miyazawa T. Exhaled breath analysis for lung cancer detection using ion mobility spectrometry // *Plos One*. 2014. V. 9. № 12. Article e114555.
- Lamote K., Vynck M., Thas O., Cleemput J., Nackaerts, K., Meerbeek J.P. Exhaled breath to screen for malignant pleural mesothelioma: A validation study // *Eur. Respir. J.* 2017. V. 50. № 6. Article 1700919.
- Tsou P.H., Lin Z.L., Pan Y.C., Yang H.C., Chang C.J., Liang S.K., Wen Y.F., Chang C.H., Chang L.Y., Yu K.L., Liu C.J., Keng L.T., Lee M. R., Ko J.C., Huang G.H., Li Y.K. Exploring volatile organic compounds in breath for high-accuracy prediction of lung cancer // *Cancers*. 2021. V. 13. № 6. P. 1431.

22. Swanson B., Fogg L., Julion W., Arrieta M.T. Electronic nose analysis of exhaled breath volatiles to identify lung cancer cases: A systematic review // J. Assoc. Nurses AIDS Care. 2020. V. 31. № 1. P. 71.
23. Hekiem N.L.L., Ralib A.A.M., Hattar M.A.M., Ahmad F.B., Nordin A.N., Rahim R.A., Za'bah N.F. Advanced vapour sensing materials: Existing and latent to acoustic wave sensors for VOCs detection as the potential exhaled breath biomarkers for lung cancer // Sens. Actuators A: Phys. 2021. V. 329. Article 112792.
24. Khanmohammadi A., Aghaie A., Vahedi E., Qazvini A., Ghanei M., Afkhami A., Hajian A., Bagheri H. Electrochemical biosensors for the detection of lung cancer biomarkers: A review // Talanta. 2020. V. 206. Article 120251.
25. Goor R., Hooren M., Dingemans A.M., Kremer B., Kross K. Training and validating a portable electronic nose for lung cancer screening // J. Thorac. Oncol. 2018. V. 13. № 5. P. 676.
26. Kort S., Brusse-Keizer M., Gerritsen J.W., Schouwink H., Citgez E., Jongh F., Maten J., Samii S., Bogart M., Palen J. Improving lung cancer diagnosis by combining exhaled-breath data and clinical parameters // ERJ Open Res. 2020. V. 6. № 1. Article 00221.
27. Dragonieri S., Annema J.T., Schot R., Schee M.P.C., Spanevello A., Carratu P., Resta O., Rabe K.F., Sterk P.J. An Electronic nose in the discrimination of patients with non-small cell lung cancer and COPD // Lung Cancer. 2009. V. 64. № 2. P. 166.
28. Tirzite M., Bukovskis M., Strazda G., Jurka N., Taivans I. Detection of lung cancer with electronic nose and logistic regression analysis // J. Breath Res. 2018. V. 13. № 1. Article 016006.
29. Hubers A.J., Brinkman P., Boksem R.J., Rhodius R.J., Witte B.I., Zwinderman A.H., Heideman D.A.M., Duin S., Koning R., Steenbergen R.D.M., Snijders P.J.F., Smit E.F., Sterk P.J., Thunnissen E. Combined sputum hypermethylation and enose analysis for lung cancer diagnosis // J. Clin. Pathol. 2014. V. 67. № 8. P. 707.
30. D'Amico A., Pennazzab G., Santonico M., Martinelli E., Roscionic C., Galluccioc G., Paolessed R., Natalea C.D. An investigation on electronic nose diagnosis of lung cancer // Lung Cancer. 2010. V. 68. № 2. P. 170.
31. Rocco R., Incalzi R.A., Pennazza G., Santonico M., Pedone C., Bartoli I.R., Vernile C., Mangiameli G., La Rocca A., De Luca G., Rocco G., Crucitti P. BIONOTE E-Nose technology may reduce false positives in lung cancer screening programmes // Eur. J. Cardiothorac. Surg. 2016. V. 49. № 4. P. 1112.
32. Broza Y.Y., Kremer R., Tisch U., Gevorkyan A., Shiban A., Best L.A., Haick H.A. Nanomaterial-based breath test for short-term follow-up after lung tumor resection // Nanomedicine: Nanotechnol. Biol. Med. 2013. V. 9. № 1. P. 15.
33. Peng G., Hakim M., Broza Y. Y., Billan S., Abdah-Bortnyak R., Kuten A., Tisch U., Haick H. Detection of lung, breast, colorectal, and prostate cancers from exhaled breath using a single array of nanosensors // Br. J. Cancer 2010. V. 103. № 4. P. 542.
34. Mazzone P.J., Wang X.F., Lim S., Jett J., Choi H., Zhang Q., Beukemann M., Seeley M., Martino R., Rhodes P. Progress in the development of volatile exhaled breath signatures of lung cancer // Ann. Am. Thorac. Soc. 2015. V. 12. № 5. P. 752.
35. Liu B., Yu H., Zeng X., Zhang D., Gong J., Tian L., Qian J., Zhao L., Zhang S., Liu R. Lung cancer detection via breath by electronic nose enhanced with a sparse group feature selection approach // Sens. Actuators B: Chem. 2021. V. 339. Article 129896.
36. Li W., Liu H., Xie D., He Z., Pi X. Lung cancer screening based on type-different sensor arrays // Sci. Rep. 2017. V. 7. № 1. Article 1969.
37. Гашимова Э.М., Темердашев А.З., Порханов В.А., Поляков И.С., Перунов Д.В., Азарян А.А., Дмитриева Е.В. Оценка возможности газохроматографического определения летучих органических соединений в выдыхаемом воздухе для неинвазивной диагностики рака легких // Журн. аналит. химии. 2019. Т. 74. № 5. С. 365.
38. Corradi M., Poli D., Banda I., Bonini S., Mozzoni P., Pinnelli S., Alinovi R., Andreoli R., Ampollini L., Casalini A., Carbognani P., Goldoni M., Mutti A. Exhaled breath analysis in suspected cases of non-small-cell lung cancer: A cross-sectional study // J. Breath Res. 2015. V. 9. № 2. Article 027101.
39. Poli D., Carbognani P., Corradi M., Goldoni M., Acampa O., Balbi B., Bianchi L., Rusca M., Mutti A. Exhaled volatile organic compounds in patients with non-small cell lung cancer: Cross sectional and nested short-term follow-up study // Respir. Res. 2005. V. 6. № 1. P. 71.
40. Bousamra M., Schumer E., Li M., Knipp R.J., Nantz M.H., Berkel V., Fu X.A. Quantitative analysis of exhaled carbonyl compounds distinguishes benign from malignant pulmonary disease // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 2014. V. 148. № 3. P. 1074.
41. Broza Y.Y., Kremer R., Tisch U., Gevorkyan A., Shiban A., Best L.A., Haick H.A. Nanomaterial-based breath test for short-term follow-up after lung tumor resection // Nanomedicine: Nanotechnol. Biol. Med. 2013. V. 9. № 1. P. 15.
42. Гашимова Э.М., Темердашев А.З., Порханов В.А., Поляков И.С., Перунов Д.В., Осипова А.К., Дмитриева Е.В. Оценка возможности дифференцирования гистологического типа и локализации опухоли у пациентов с раком легких по составу выдыхаемого воздуха // Журн. аналит. химии. 2021. Т. 76. № 8. С. 723.
43. Papaefstathiou E., Stylianou M., Andreou C., Agapiou A. Breath analysis of smokers, non-smokers, and e-cigarette users // J. Chromatogr. B. 2020. V. 1160. Article 122349.
44. Schallschmidt K., Becker R., Jung C., Bremser W., Walles T., Neudecker J., Leschber G., Frese S., Nehls J. Comparison of volatile organic compounds from lung cancer patients and healthy controls — Challenges and limitations of an observational study // J. Breath Res. 2016. V. 10. № 4. Article 046007.
45. Gashimova E., Osipova A., Temerdashev A., Porkhanov V., Polyakov I., Perunov D., Dmitrieva E. Study of confounding factors influence on lung cancer diagnostics effectiveness using gas chromatography–mass spectrometry analysis of exhaled breath // Biomark. Med. 2021. V. 15. № 11. P. 821.

УДК 543.641+543.544.43+543.51

СРАВНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА РАСТВОРА СИЛИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ВЫСУШЕННЫХ ОБРАЗЦОВ КОНДЕНСАТА ВЫДЫХАЕМОГО ВОЗДУХА БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ, ХОБЛ И ЗДОРОВЫХ ДОБРОВОЛЬЦЕВ МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

© 2022 г. А. И. Ревельский^а, *, А. С. Самохин^а, Э. Х. Анаев^б^аМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет
Ленинские горы, 1, стр. 3, Москва, 119991 Россия^бРоссийский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова
ул. Островитянова, 1, Москва, 117997 Россия

*e-mail: sorbent@yandex.ru

Поступила в редакцию 12.01.2022 г.

После доработки 17.02.2022 г.

Принята к публикации 10.03.2022 г.

Конденсату выдыхаемого воздуха (КВВ) как объекту анализа в метаболомных исследованиях по-прежнему уделяется внимание аналитиков. Конденсат выдыхаемого воздуха – это образец, состав которого отражает особенности биохимических процессов в организме, является относительно чистой, по сравнению с кровью, матрицей, в отличие от выдыхаемого воздуха содержит больше полярных компонентов (в том числе нелетучих). Кроме того, пробоотбор КВВ является неинвазивным. Методом газовой хроматографии-масс-спектрометрии с электронной ионизацией изучены продукты силилирования лиофилизатов образцов КВВ здоровых волонтеров и больных бронхиальной астмой (БА), хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ). На хроматограммах по полному ионному току, соответствующих образцам больных БА и ХОБЛ, зарегистрированы силильные производные моно-D-фруктозы и дисахаридов. Выдвинуто предположение о том, что D-фруктоза может быть маркером особенностей биохимических процессов, происходящих в организме пациентов с диагнозами БА и ХОБЛ.

Ключевые слова: конденсат выдыхаемого воздуха, лиофилизация, силилирование, N,O-бис(триметилсилил)трифторацетамид (БСТФА), газовая хроматография-масс-спектрометрия, биомаркеры, бронхиальная астма (БА), хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), D-фруктоза, моносахариды, дисахариды.

DOI: 10.31857/S0044450222110093

Современные исследования в области метаболомного анализа образцов конденсата выдыхаемого воздуха (КВВ) при респираторных заболеваниях направлены [1] на оценку профилей биомаркеров и создание “отпечатков пальцев” заболевания; на идентификацию специфических метаболитов, характеризующих заболевание; на распознавание конкретных заболеваний и их фенотипирование; на выявление возможных метаболитических путей, в том числе с помощью специального программного обеспечения (например, MetaboAnalyst 3.0 [2]).

При сравнении групп здоровых добровольцев и пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) и бронхиальной астмой (БА) часто используют метод ЯМР и различные варианты сочетания хроматографии и масс-спектро-

метрии, в том числе газовой хроматографии-масс-спектрометрии [3].

В метаболомике на основе масс-спектрометрии развиваются нецелевой и целевой анализы. В случае нецелевого анализа исследователи пытаются оценить весь молекулярный (компонентный) состав образцов, чтобы охватить максимальное количество веществ, потенциально отвечающих за особенности физиологических и патологических биохимических процессов. Целевой анализ направлен на обнаружение и определение конкретных метаболитов/классов метаболитов, теоретически (или доказанно) связанным с биологическими механизмами, ответственными за патологию. При этом часто теряется информация о новых (или не рассматриваемых в данном анализе) биомаркерах заболеваний [4]. Это осо-

бенно заметно, если анализ не ретроспективен, например, нет данных, собранных в режиме сканирования полного ионного тока в правильно выбранном диапазоне а.е.м..

Метод газовой хроматографии-масс-спектрометрии (ГХ-МС) обоснованно используют при задачах обнаружения низкомолекулярных органических соединений, как летучих, так и нелетучих (после предварительной дериватизации [5]), причем на уровне следов. В обзоре [5] обращено внимание на обнаружение в образцах КВВ при ХОБЛ и БА низкомолекулярных органических соединений.

В образцах КВВ здоровых добровольцев с применением в качестве способа пробоподготовки твердофазной микроэкстракции (и из паровой фазы над образцом, и непосредственно из жидкой фазы КВВ) обнаружили нормальные и разветвленные углеводороды, спирты, кетоны, альдегиды, карбоновые кислоты [6].

В конденсате выдыхаемого воздуха при астме, по сравнению с образцами здоровых волонтеров, наблюдают повышенные содержания маркера окислительного стресса 8-изопростана, стабильного продукта пероксидного окисления липидов. Определяли производные 8-изопростана методом ГХ-МС с химической ионизацией и регистрацией отрицательных ионов [7].

Другими маркерами окислительного стресса при астме, определяемыми в КВВ, являются малоновый диальдегид, 4-гидроксигексеналь, 4-гидроксиноненаль и насыщенные альдегиды (гексаналь, гептаналь и нонаналь) [8]. Эти же маркеры, за исключением 4-гидроксигексаналя, 4-гидроксиноненала, определяли при ХОБЛ [9]. Медиатор воспалительного процесса – лейкотриен В₄ – определяют в КВВ как больных БА, так и ХОБЛ [10]. К маркерам окислительного стресса относят также тирозин и нитротирозин [11]. Уровень карбоксиметиллизина в КВВ больных БА значительно ниже, чем в образцах КВВ здоровых добровольцев [12].

Жидкостно-жидкостная экстракция среднелетучих органических веществ (из образцов КВВ здоровых волонтеров, больных ХОБЛ и БА) с последующим вводом больших по объему проб в ГХ-МС позволила обнаружить ряд жирных кислот, спирты, альдегиды, в том числе с подтверждением по образцам сравнения [13].

С применением в качестве способа пробоподготовки лиофилизации методом ВЭЖХ определяли аденозин в образцах КВВ больных астмой [14]. Определение концентрации аденозина в образцах КВВ больных ХОБЛ и БА позволило оценить активность воспалительного процесса в бронхолегочной системе и эффективность терапии у пациентов [15].

При мониторинге общего воспаления или воспаления дыхательных путей при респираторных заболеваниях в образцах КВВ астматиков фиксируют повышение в разы (по сравнению с образцами здоровых людей) концентрации 3-нитротирозина. Производные аналита определяют методом ГХ-МС [16].

Из моносахаридов, изменение содержания которых в биологических жидкостях фиксируется при ХОБЛ и БА, можно отметить сиаловые кислоты. Повышение суммарного содержания сиаловых кислот в сыворотке крови пациента с ХОБЛ отражает наличие воспалительных процессов при данном заболевании [17, 18]. Литературные данные, отражающие информацию о содержании этих кислот в КВВ при ХОБЛ и БА, не обнаружены.

Средняя концентрация глюкозы в жидкости, выстилающей дыхательные пути здорового человека, составляет 0.4 мМ. Это примерно в 12 раз ниже, чем средняя концентрация глюкозы в его крови (4.8 мМ) [19]. Из-за высокого градиента концентрации между кровью и жидкостью дыхательных путей предполагают, что перенос глюкозы между этими биологическими жидкостями и установление соответствующего равновесия происходит быстро, что может быть использовано для неинвазивного определения уровня глюкозы, в частности, при анализе конденсата выдыхаемого воздуха [20].

Нарушения метаболизма глюкозы чаще встречаются у пациентов с ХОБЛ, чем у людей, не страдающих этим заболеванием [21, 22]. У обследованных пациентов с обострением ХОБЛ повышенные уровни глюкозы в крови связывали именно с этим диагнозом [23].

В исследованиях, посвященных анализу не КВВ, а образцов других биологических жидкостей дыхательных путей (назальный смыв, мокрота, раствор бронхоальвеолярного лаважа) у пациентов с ХОБЛ, концентрация глюкозы была повышена по сравнению со здоровыми добровольцами [19].

При анализе КВВ, отобранного при других заболеваниях (диабет, муковисцидоз), зафиксировано повышение содержания глюкозы [19], при этом публикации, в которых отражены исследования содержания глюкозы в КВВ больных ХОБЛ и БА, отсутствуют.

Цель данной работы – исследование растворов сильных производных компонентов высушенных образцов КВВ больных БА, ХОБЛ и здоровых добровольцев методом газовой хроматографии-масс-спектрометрии для обнаружения потенциальных низкомолекулярных биомаркеров заболевания.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Образцы КВВ для исследования отбирали с помощью установки ECoScreen (Jaeger, Würzburg, Германия). Благодаря системе клапанов на пути движения вдыхаемого воздуха из окружающей среды и выдыхаемого воздуха в охлаждающее устройство эти потоки не смешивались, и образующаяся слюна не попадала в КВВ. Пациент, сидя, вдыхал и выдыхал воздух через рот при спокойном дыхании (для исключения прохождения воздуха через носовую полость использовали носовой зажим).

В группу здоровых отбирали добровольцев с нормальными показателями функции легких, у которых в анамнезе отсутствовали указания на астению, хронические заболевания легких, других органов и систем, а также острые респираторные симптомы в течении последних двух месяцев. В группу пациентов с ХОБЛ входили больные с ранее подтвержденным диагнозом ХОБЛ 2 и 3 степени [24], в группу пациентов с бронхиальной астмой входили больные с ранее подтвержденным диагнозом БА в соответствии с рекомендациями GINA [24]. Больные, принимающие системные глюкокортикостероиды, страдающие другими болезнями легких, онкологическими заболеваниями, имеющие тяжелую сопутствующую патологию сердечно-сосудистой системы, органов пищеварения, мочеполовой и нервной системы, сахарный диабет, злоупотребляющие алкоголем и наркотиками в анамнезе в исследовании не включали.

Пробоотбор осуществляли в течение 10 мин. Было отобрано 5 образцов КВВ больных БА, 13 образцов КВВ больных ХОБЛ, 2 образца КВВ спортсменов после нагрузки, 5 образцов КВВ здоровых добровольцев (по одному образцу у каждого человека). Собранные образцы КВВ переливали в стеклянные вials объемом 1.5 мл или полипропиленовые пробирки. Далее образцы замораживали для хранения при -20°C . Аликвоты размороженных образцов (образцы не перезамораживали) объемом 0.5–1.0 мл лиофилизировали. К высушенному остатку добавляли 50 мкл N,O-бис(триметилсилил)трифторацетамида (БСТФА), вials с полученными растворами выдерживали при 60°C в течение 30 мин в термостате. Растворы остужали до комнатной температуры и пробу объемом 1 мкл вводили в инжектор газового хроматографа Thermo Scientific Finnigan TRACE GC Ultra (Италия), соединенного с масс-спектрометром Trace DCQ MS, в режиме с делением/без деления потока. Температура инжектора составляла 250°C . Диапазон времени от момента ввода пробы до открытия клапана делителя потока 30 с. Вещества разделяли в кварцевой капиллярной ко-

лонке Restek Rtx-5MS. Длина колонки – 15 м, внутренний диаметр – 0.25 мм. Толщина неподвижной фазы – 0.25 мкм. Поток гелия через колонку $1\text{ см}^3/\text{мин}$. Сконцентрированные на входе в аналитическую колонку компоненты разделяли в условиях программирования температуры термостата, их масс-спектры электронной ионизации с энергией 70 eV регистрировали в режиме полного ионного тока. Термостат колонок нагревали по следующей программе: изотерма 50°C в течение 5 мин, далее нагрев со скоростью $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до 250°C и выдерживание при этой температуре в течение 10 мин. Температура обогреваемого интерфейса между газовым хроматографом и масс-спектрометром 250°C . Диапазон сканирования выбрали от 50 до 700 а.е.м.. Полученные хроматограммы сравнивали между собой. Масс-спектры обнаруженных компонентов сравнивали с библиотечными (NIST).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В данном исследовании предполагали обнаружить неизвестные низкомолекулярные органические вещества – потенциальные маркеры БА и ХОБЛ методом ГХ-МС. Необходимо было выбрать способ пробоподготовки, обеспечивающий возможность обнаружения среднетелучих органических веществ и термостабильных продуктов дериватизации нелетучих низкомолекулярных органических веществ в одинаковых условиях хроматографического разделения на следовом уровне. Лиофилизация образцов с последующим силилированием позволяет решить такую задачу.

Примеры хроматограмм, соответствующих образцам КВВ здорового добровольца, больного БА, больного ХОБЛ, спортсмена после нагрузки представлены на рис. 1–4 соответственно. Сравнение полученных хроматограмм выявило заметные различия между образцами. На хроматограммах по полному ионному току всех образцов КВВ больных БА и ХОБЛ обнаружены две группы хроматографических пиков в диапазонах времен удерживания 12.0–12.2 мин и 15.2–16.0 мин. На хроматограммах спортсменов обнаружены пики только в диапазоне 15.2–16.0 мин. На хроматограммах образцов КВВ здоровых добровольцев пиков в этих диапазонах времен удерживания не обнаружено (или они ниже пределов обнаружения). Сравнив масс-спектры, соответствующие хроматографическим пикам в диапазоне времен удерживания 15.2–16.0 мин, с библиотечными и обратив внимание на характеристические значения m/z в этих спектрах, можно с высокой долей вероятности считать, что речь идет о смеси силильных производных дисахаридов (в том числе, возможно, и сахарозы). На данном этапе исследования

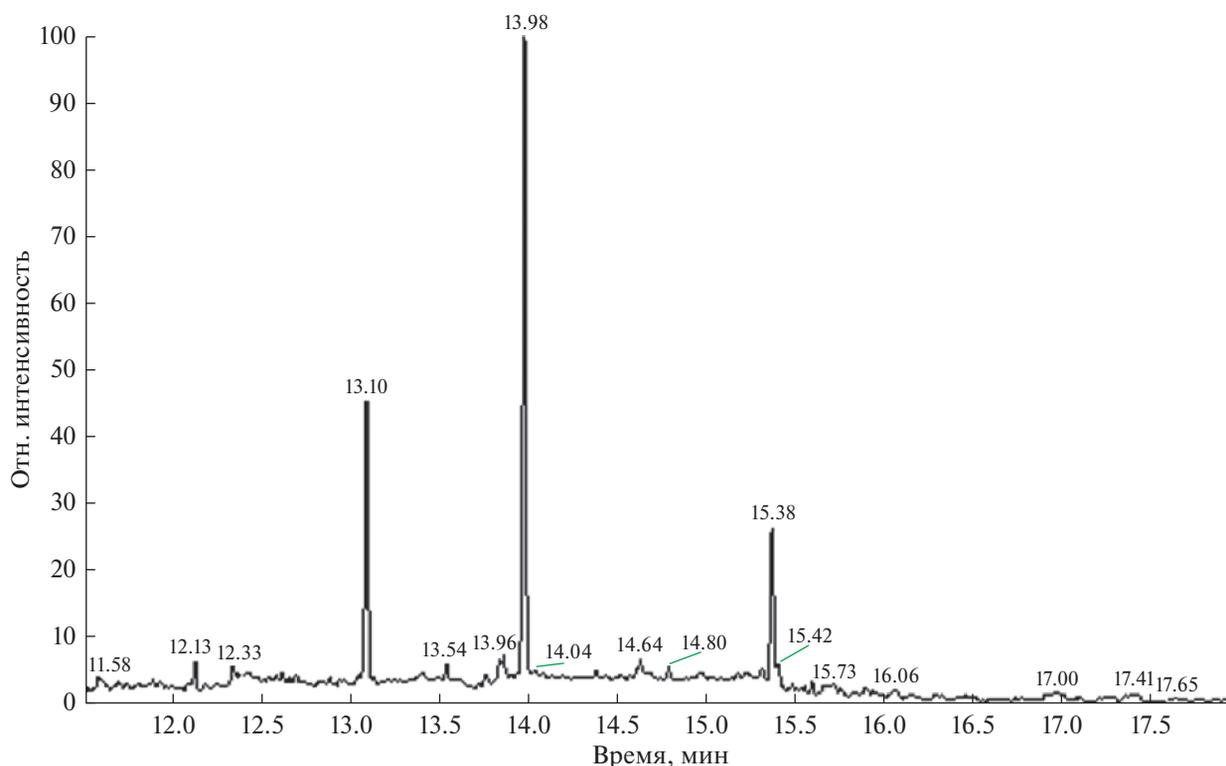


Рис. 1. Хроматограмма продуктов силилирования высушенного образца конденсата выдыхаемого воздуха здорового добровольца.

мы не уделили большего внимания этой группе соединений, хотя эти вещества, безусловно, представляют интерес для выяснения особенностей метаболизма у рассмотренных групп людей. Особое внимание привлекли хроматографические пики с временами удерживания 12.03 и 12.07 мин, зарегистрированные только на хроматограммах силильных производных высушенных образцов КВВ больных астмой и ХОБЛ в диапазоне времен удерживания 12.0–12.2 мин. Сравнение соответствующих масс-спектров со спектрами библиотеки NIST, соотношение характеристичных ионов в масс-спектрах позволило выдвинуть предположение, что эти хроматографические пики соответствуют силильным производным фуранозной и пиранозной форм D-фруктозы. На рис. 5 представлен масс-спектр электронной ионизации, соответствующий хроматографическому пику со временем удерживания 12.07 мин (масс-спектры обоих хроматографических пиков очень похожи), на схеме 1 – структурная формула вещества (силилового эфира D-фруктозы) из масс-спектральной базы данных. Библиотечные масс-спектры силильных производных глюкозы заметно отличаются от масс-спектров зарегистрированного соединения. Хроматографические пики производных глюкозы не были зарегистрированы.

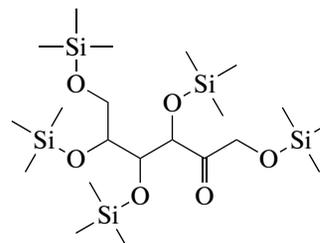


Схема 1. Структурная формула вещества из базы данных масс-спектров NIST, масс-спектр которого с высокой степенью сходимости совпал с масс-спектрами веществ с временами удерживания 12.03 и 12.07 мин (D-fructose, 1,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-C₂₁H₅₂O₆Si₅, MW 540, CAS#19126-98-8).

Далее провели поиск литературы по списку ключевых слов, включающих “exhaled breath condensate”, “fructose”, “COPD/astma”. Не удалось обнаружить публикации, в которых фруктозу как продукт метаболических процессов в организме человека идентифицировали бы в КВВ при ХОБЛ или БА. Однако выявили две публикации, в которых фруктоза в той или иной форме фигурирует в роли биомаркера ХОБЛ [25, 26]. Авторы работы [25] сравнили составы образцов плазмы крови двух групп пациентов с диагнозом ХОБЛ (выживших и умерших в течение двух лет после исследования). Оказалось, что в ограниченный круг компонентов, внесших наибольший вклад в различие таких групп образцов, входит фруктоза (замет-

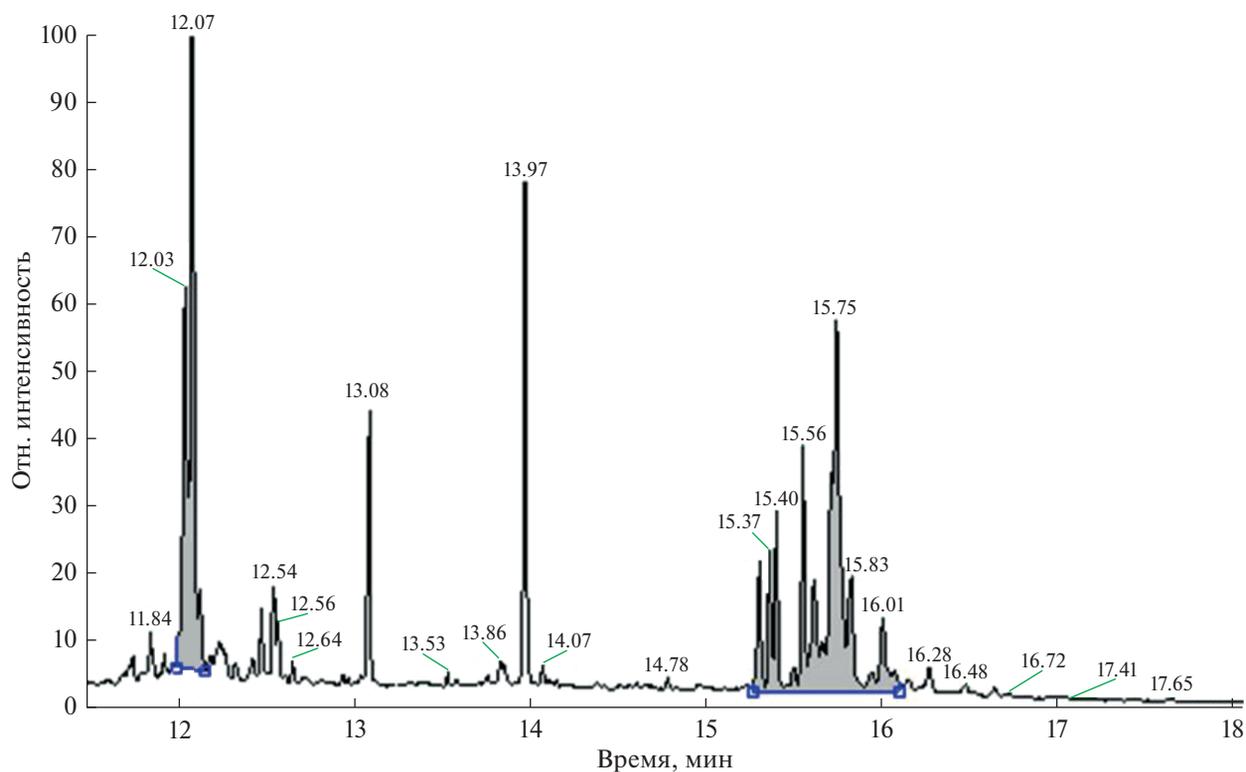


Рис. 2. Хроматограмма продуктов силилирования высушенного образца конденсата выдыхаемого воздуха пациента с диагнозом бронхиальная астма.

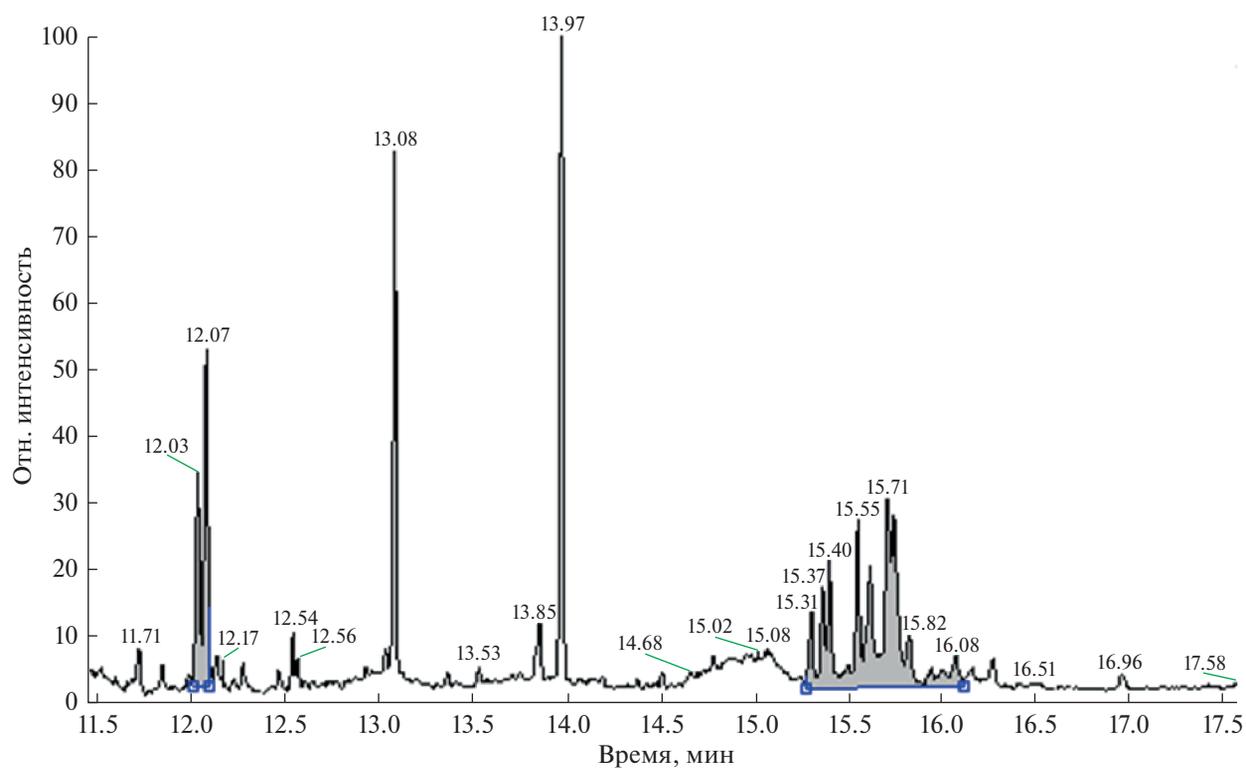


Рис. 3. Хроматограмма продуктов силилирования высушенного образца конденсата выдыхаемого воздуха пациента с диагнозом хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ).

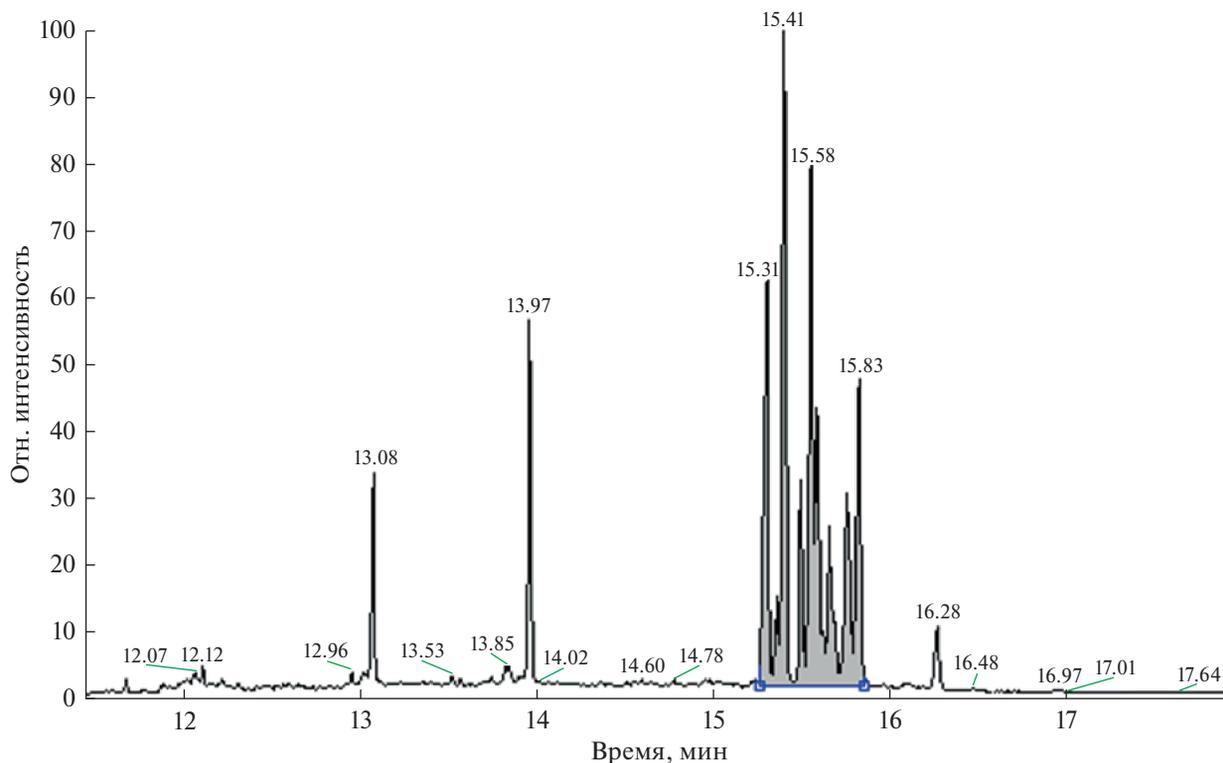


Рис. 4. Хроматограмма продуктов силилирования высушенного образца конденсата выдыхаемого воздуха спортсмена (образец отобран после физической нагрузки).

ный рост содержания этого вещества в образцах плазмы крови умерших пациентов). В этот же круг веществ вошел и лактат, являющийся известным маркером ХОБЛ [27].

При выяснении влияния нарушения мышечного метаболизма на переносимость физических нагрузок при ХОБЛ сравнили содержания веществ в образцах ткани (латеральной широкой мышцы бедра) пациентов с ХОБЛ и здоровых волонтеров того же возраста (отобраны биопсией), расходующихся и образующихся при гликолизе [26]. Анализ экстрактов из образцов ткани методом ВЭЖХ показал, что индуцированное физической нагрузкой образование конечных продуктов гликолиза, таких как лактат и пируват, и промежуточных продуктов гликолиза, таких как глюкозо-6-фосфат, глюкозо-1-фосфат и фруктозо-6-фосфат, а также потребление гликогена выше у пациентов с ХОБЛ. Вероятно, что такое нарушение мышечного метаболизма при нагрузке у больных ХОБЛ (выраженное в том числе повышенным содержанием фруктозо-6-фосфата в мышцах) взаимосвязано с появлением фруктозы в КВВ, обнаруженной в нашем исследовании.

В результате проведенного нами исследования в образцах КВВ пациентов с диагнозами БА и ХОБЛ обнаружены вещества (фруктоза, дисахариды), которые отсутствуют в образцах здоровых добровольцев. Данные о наличии таких веществ в КВВ больных БА и ХОБЛ не представлены в ли-

тературе. Выбранные условия пробоподготовки (лиофилизация и силилирование) и анализа позволили зарегистрировать производные этих потенциальных маркеров заболеваний на хроматограммах по полному ионному току. Это, в свою очередь, позволило провести качественное сравнение (в масс-спектрах веществ видны все или большинство фрагментных ионов) с библиотечными данными (NIST).

Важно отметить, что потенциальные маркеры обнаружены в каждом из 18 образцов больных (5 пациентов с БА, 13 пациентов с ХОБЛ).

Далеко не всегда удается выделить новое вещество, характеризующее особенности биохимических процессов при заболевании и отсутствующее в образцах здоровых добровольцев. Часто содержание вещества-маркера в биологической жидкости больного только повышено/понижено по сравнению с образцом здорового добровольца. Обычно для выявления потенциальных биомаркеров заболевания приходится сравнивать большое количество (часто более 50 на каждую группу) образцов биологических жидкостей здоровых и больных пациентов с последующей математической обработкой полученных данных с введением различных поправок на матричный эффект, на различие концентраций одних и тех же аналитов у разных людей, связанное с естественным разбавлением исследуемых биологических жидкостей. В результате нашего исследования на за-

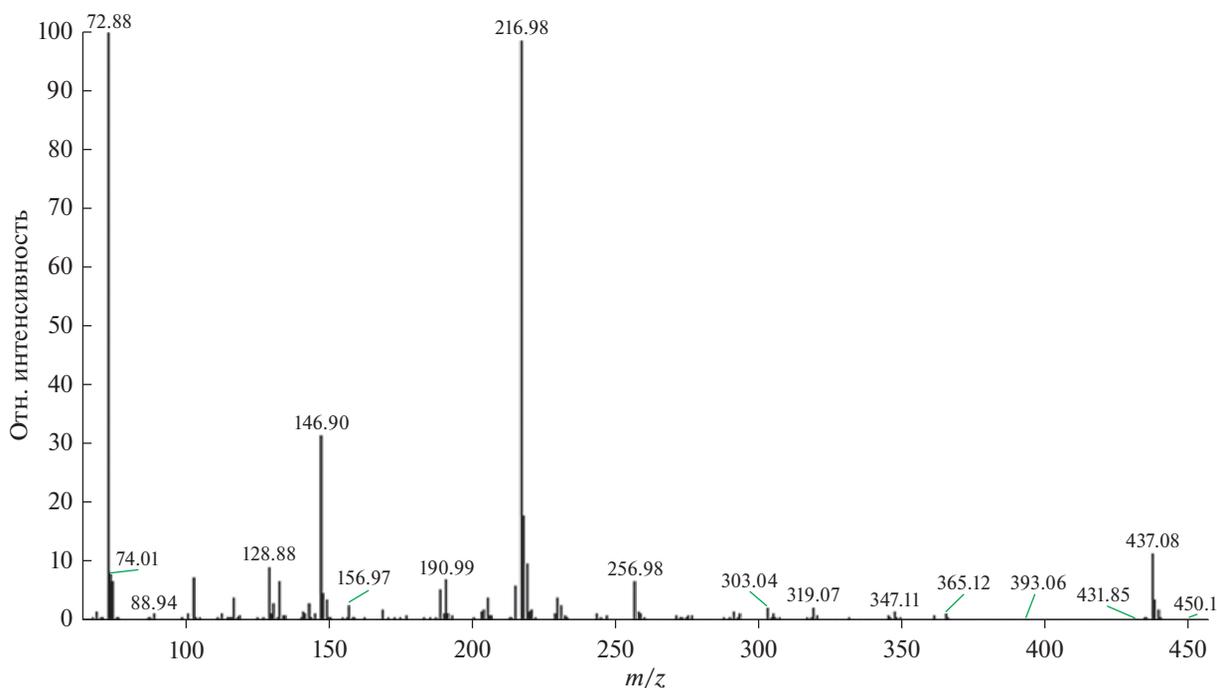


Рис. 5. Масс-спектр компонента со временем удерживания 12.07 мин.

метно отличающемся от предела обнаружения уровне зарегистрированы аналитические сигналы новых потенциальных биомаркеров во всех исследованных образцах пациентов, отсутствующие в образцах здоровых добровольцев. Когда удастся выяснить механизм появления фруктозы в образцах КВВ при БА и ХОБЛ и взаимосвязь с содержанием дисахаридов, потребуется оптимизация условий количественного анализа, выяснение варьирования концентрации фруктозы внутри выборок образцов пациентов и между ними. Для этой цели имеет смысл применять более доступные по части аппаратного оформления методы анализа, чем ГХ-МС. Кроме того, используемый в данной работе способ пробоподготовки хорошо подходит для нецелевого скрининга низкомолекулярных органических веществ, но для количественного определения сахаров у него есть ограничения. Одному исходному аналиту соответствует ряд образующихся силильных производных (это особенно заметно для дисахаридов). Соотношение этих пиков может меняться в зависимости от количества исходного вещества, что может отрицательно сказаться на результатах количественного анализа.

* * *

В лиофилизатах образцов КВВ больных ХОБЛ и БА после силилирования обнаружены силильные производные моно- и дисахаридов, отсутствующие в образцах КВВ здоровых добровольцев. Моносахаридом с высокой долей вероятности является D-фруктоза. Представляет интерес дальнейшее исследование

образцов КВВ пациентов с указанными диагнозами на содержание моно- и дисахаридов, результаты которого могут помочь при выявлении взаимосвязи содержания обнаруженных веществ в образцах КВВ с особенностями биохимических процессов в организме человека, а также при диагностике протекания болезни.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в соответствии с исследовательским проектом № 20-03-00894.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Maniscalco M., Fuschillo S., Paris D., Cutignano A., Sanduzzi A., Motta A. Clinical metabolomics of exhaled breath condensate in chronic respiratory diseases // *Adv. Clin. Chem.* 2019. V. 88. P. 121. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2018.10.002>
2. Xia J., Wishart D.S. Using MetaboAnalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis // *Curr. Protoc. Bioinformatics.* 2016. P. 14.10.1.
3. Maniscalco M., Paris D., Melck D.J., Molino A., Fuschillo S., Motta A. Metabolomics of exhaled breath condensate by nuclear magnetic resonance spectroscopy and mass spectrometry: A methodological approach // *Curr. Med. Chem.* 2020. V. 27. P. 2381. <https://doi.org/10.2174/0929867325666181008122749>
4. Maniscalco M., Fuschillo S., Paris D., Cutignano A., Sanduzzi A., Motta A. Clinical metabolomics of exhaled breath condensate in chronic respiratory diseases // *Adv. Clin. Chem.* 2019. V. 88. P. 121. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2018.10.002>
5. Rahimpour E., Khoubnasabjafari M., Jouyban-Gharamaleki V., Jouyban A. Non-volatile compounds in exhaled breath condensate: review of methodological as-

- pects // *Anal. Bioanal. Chem.* 2018. V. 410. P. 6411. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1259-4>
6. *Aksenov A.A., Zamuruyev K.O., Pasamontes A., Brown J.F., Schivo M., Foutouhi S., Weimer B.C., Kenyon N.J., Davis C.E.* Analytical methodologies for broad metabolite coverage of exhaled breath condensate // *J. Chromatogr. B.* 2017. V. 1061–1062. P. 17. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.06.038>
 7. *Carraro S., Cogo P.E., Isak I., Simonato M., Corradi M., Carnielli V.P., Baraldi E.* EIA and GC/MS analysis of 8-isoprostane in EBC of children with problematic asthma // *Eur. Respir. J.* 2010. V. 35. P. 1364. <https://doi.org/10.1183/09031936.00074909>
 8. *Corradi M., Folesani G., Andreoli R., Manini P., Bodini A., Piacentini G., Carraro S., Zanconato S., Baraldi E.* Aldehydes and glutathione in exhaled breath condensate of children with asthma exacerbation // *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 2003. V. 167. P. 395. <https://doi.org/10.1164/rccm.200206-507OC>
 9. *Corradi M., Rubinstein I., Andreoli R., Manini P., Cagliari A., Poli D., Alinovi R., Mutti A.* Aldehydes in exhaled breath condensate of patients with chronic obstructive pulmonary disease // *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 2003. V. 167. P. 1380. <https://doi.org/10.1164/rccm.200210-1253OC>
 10. *Montuschi P., Martello S., Felli M., Mondino C., Barnes P.J., Chiarotti M.* Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of exhaled leukotriene B₄ in asthmatic children // *Respir. Res.* 2005. V. 6. Article 119. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-6-119>
 11. *Syslova K., Kačer P., Kuzma M., Novotny P., Pelcova D.* Determination of biomarkers in exhaled breath condensate: A perspective way in bronchial asthma diagnostics / *Bronchial Asthma – Emerging Therapeutic Strategies* / Ed. Sapey E. Rijeka, Croatia: InTech, 2012. P. 37. <https://doi.org/10.5772/28350>
 12. *Tochino Y., Kanazawa H., Ichimaru Y., Asai K., Kyoh S., Hirata K.* N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine, a major advanced glycation end product in exhaled breath condensate as a biomarker of small airway involvement in asthma // *J. Asthma.* 2007. V. 44. № 10. P. 861. <https://doi.org/10.1080/02770900701752573>
 13. *Родионов А.А., Ревельский А.И., Ревельский И.А., Анохина Т.Н., Анаев Э.Х.* Хроматомасс-спектрометрическое определение среднелетучих органических веществ в конденсате выдыхаемого воздуха // *Масс-спектрометрия.* 2007. Т. 4. № 2. С. 143. (*Rodionov A.A., Revelsky A.I., Revelsky I.A., Anokhina T.N., Anaev E.Kh.* Determination of semivolatiles organic compounds in exhaled breath condensate by gas chromatography-mass spectrometry // *J. Anal. Chem.* 2014. V. 69. P. 1330.) <https://doi.org/10.1134/S1061934814140081>
 14. *Huszár É., Vass G., Vizi É., Csoma Z., Barát E., Molnár-Világos G., Herjavec I., Horváth I.* Adenosine in exhaled breath condensate in healthy volunteers and in patients with asthma // *Eur. Respir. J.* 2002. T. 20. № 6. С. 1393.
 15. *Асиятилова А.М.* Аденозин как показатель эффективности проводимой терапии у больных бронхиальной астмой и хронической обструктивной болезнью легких // *Перспективы науки.* 2011. № 6 (21). С. 22.
 16. *Ryberg H., Caidahl K.* Chromatographic and mass spectrometric methods for quantitative determination of 3-nitrotyrosine in biological samples and their application to human samples // *J. Chromatogr. B.* 2007. V. 851. P. 160. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.02.001>
 17. *Rajendiran K.S., Ananthanarayanan P.H., Sathesh S., Rajappa M.* Elevated levels of serum sialic acid and high-sensitivity c-reactive protein: Markers of systemic inflammation in patients with chronic heart failure // *Brit. J. Biomed. Sci.* 2014. V. 71. P. 29. <https://doi.org/10.1080/09674845.2014.11669959>
 18. *Qaisar R., Karim A., Muhammad T.* Circulating biomarkers of handgrip strength and lung function in chronic obstructive pulmonary disease // *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 2020. V. 15. P. 311. <https://doi.org/10.2147/COPD.S225765>
 19. *Tankasala D., Linnes J.C.* Noninvasive glucose detection in exhaled breath condensate // *Trans. Res.* 2019. V. 213. P. 1. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2019.05.006>
 20. *Baker E.H., Clark N., Brennan A.L., Fisher D.A., Gyi K.M., Hodson M.E., Philips B.J., Baines D.L., Wood D.M.* Hyperglycemia and cystic fibrosis alter respiratory fluid glucose concentrations estimated by breath condensate analysis // *J Appl. Physiol.* 2007. V. 102. P. 1969. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01425.2006>
 21. *Mirrahimov A.E.* Chronic obstructive pulmonary disease and glucose metabolism: A bitter sweet symphony // *Cardiovasc. Diabetol.* 2012. V. 11. Article 132. <https://doi.org/10.1186/1475-2840-11-132>
 22. *Kaźmierczak M., Ciebiada M., Pēkala-Wojciechowska A., Pāwłowski M., Nielepkowicz-Goździńska A., Antczak A.* Evaluation of markers of inflammation and oxidative stress in COPD patients with or without cardiovascular comorbidities // *Heart. Lung Circ.* 2015. V. 24. № 8. P. 817. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2840-11-132>
 23. *Baker E.H., Janaway C.H., Philips B.J., Brennan A.L., Baines D.L., Wood D.M., Jones P.W.* Hyperglycaemia is associated with poor outcomes in patients admitted to hospital with acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease // *Thorax.* 2006. V. 61. P. 284. <https://doi.org/10.1136/thx.2005.051029>
 24. Глобальная стратегия диагностики, лечения и профилактики хронической обструктивной болезни легких / Под ред. Чучалина А.Г. Пересмотр 2006: Пер. с англ. М.: Атмосфера, 2007.
 25. *Pinto-Plata V., Casanova C., Divo M., Tesfaigzi Y., Calhoun V., Jing Sui J., Polverino F., Priolo C., Petersen H., Torres J.P., Marin J.M., Owen C.A., Baz R., Cordova E., Celli B.* Plasma metabolomics and clinical predictors of survival differences in COPD patients // *Respir. Res.* 2019. V. 20. Article 219. <https://doi.org/10.1186/s12931-019-1167-y>
 26. *Saey D., Lemire B.B., Gagnon P., Bombardier E., Tupling A.R., Debigaré R., Côté C.H., Maltais F.* Quadriceps metabolism during constant workrate cycling exercise in chronic obstructive pulmonary disease // *J. Appl. Physiol.* 2011. V. 110. P. 116. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00153.2010>
 27. *Jackson T.C., Zhang Y.V., Sime P.J., Phipps R.P., Kottmann R.M.* Development of an accurate and sensitive method for lactate analysis in exhaled breath condensate by LC MS/MS // *J. Chromatogr. B.* 2017. V. 1061–1062. P. 468. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.07.041>

УДК 543.544

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОСПИРТОВ В ВИДЕ СИЛИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ С ТРЕМЯ ДЕРИВАТИЗИРУЮЩИМИ РЕАГЕНТАМИ МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

© 2022 г. И. В. Новикова^а, Р. И. Новиков^а, Ж. В. Смирнова^а,
С. С. Алексенко^а, *, В. Б. Кондратьев^а

^аГосударственный научно-исследовательский институт органической химии и технологии (ГосНИИОХТ)
шоссе Энтузиастов, 23, Москва, 111024 Россия

*e-mail: dir@gosniokht.ru

Поступила в редакцию 25.11.2021 г.

После доработки 09.12.2021 г.

Принята к публикации 09.12.2021 г.

Разработаны подходы к разделению и идентификации одиннадцати β-аминоспиртов – маркеров азотсодержащих токсичных химикатов (V-газов, азотистых ипритов и VZ) методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием в виде триметил-(ТМС) и *трет*-бутилдифенилсилильных производных. Оптимизированы условия совместного силилирования β-аминоспиртов реагентами 1,1,1,3,3,3-гексаметилдисилазаном (ГМДС), N,O-бис(триметилсилил)трифторацетамидом (БСТФА) и *трет*-бутилдифенилхлорсиланом (ТБДФС). Для дериватизации β-аминоспиртов реагент ТБДФС предложен впервые. Показано, что оптимальными для обеспечения протекания дериватизации смеси всех β-аминоспиртов с ГМДС являются температура 40°C и время реакции 15 мин, с БСТФА – 60°C и 30 мин, с ТБДФС – 80°C и 45 мин. При этом в случае ГМДС необходимо введение активирующей добавки 0.02% иода, а для ТБДФС N-метилимидазола в соотношении 1 : 2. Реакционная способность β-аминоспиртов по отношению к силилирующим реагентам уменьшается в ряду N,N-диалкиламиноэтанола – N-алкилдиэтанолamines – триэтанол-амин – 3-хинуклидиол. Разделение структурных изомеров метилпропил- и метилизопропилэтанол-амин возможно только в виде ТБДФС-производных на неподвижной фазе средней полярности (VF–1701 MS). Пределы обнаружения β-аминоспиртов в виде ТМС-производных лежат в интервале 0.05–0.5 мкг/мл, а ТБДФС-производных – 0.2–0.8 мкг/мл. Полученные результаты позволяют достоверно идентифицировать β-аминоспирты в смеси в концентрациях >1 мкг/мл.

Ключевые слова: газовая хроматография, масс-спектрометрия, β-аминоспирты, маркеры токсичных химикатов, силилирование, дериватизация, N,O-бис(триметилсилил)трифторацетамид, 1,1,1,3,3,3-гексаметилдисилазан, *трет*-бутилдифенилхлорсилан.

DOI: 10.31857/S0044450222120131

В Приложение по химикатам Конвенции о запрещении разработки, производства, накопления и применения химического оружия и о его уничтожении (далее – Конвенция) [1] включены β-аминоспирты (рис. 1), которые являются прекурсорами и продуктами трансформации азотсодержащих токсичных химикатов (ТХ). Они способны сохраняться в окружающей среде в неизменном виде продолжительное время и выступают в качестве маркеров ТХ – V-газов, азотистых ипритов и VZ. Задача определения β-аминоспиртов возникает при проведении химико-аналитических исследований по выявлению и расследованию случаев нелегальной деятельности в области производства, применения и хранения ТХ. Кроме того, аминосспирты широко ис-

пользуются в производстве моющих средств, эмульгаторов, косметических и лекарственных препаратов, в качестве поглотителей кислых газов, что обуславливает необходимость контроля их содержания в производственном процессе, при утилизации продукции, а также в объектах окружающей среды.

Высокая полярность, термолабильность и низкие значения молекулярных масс затрудняют определение микроколичеств β-аминоспиртов методами высокоэффективной жидкостной хроматографии и особенно газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС). Один из путей решения проблемы состоит в дериватизации аминосспиртов, которая

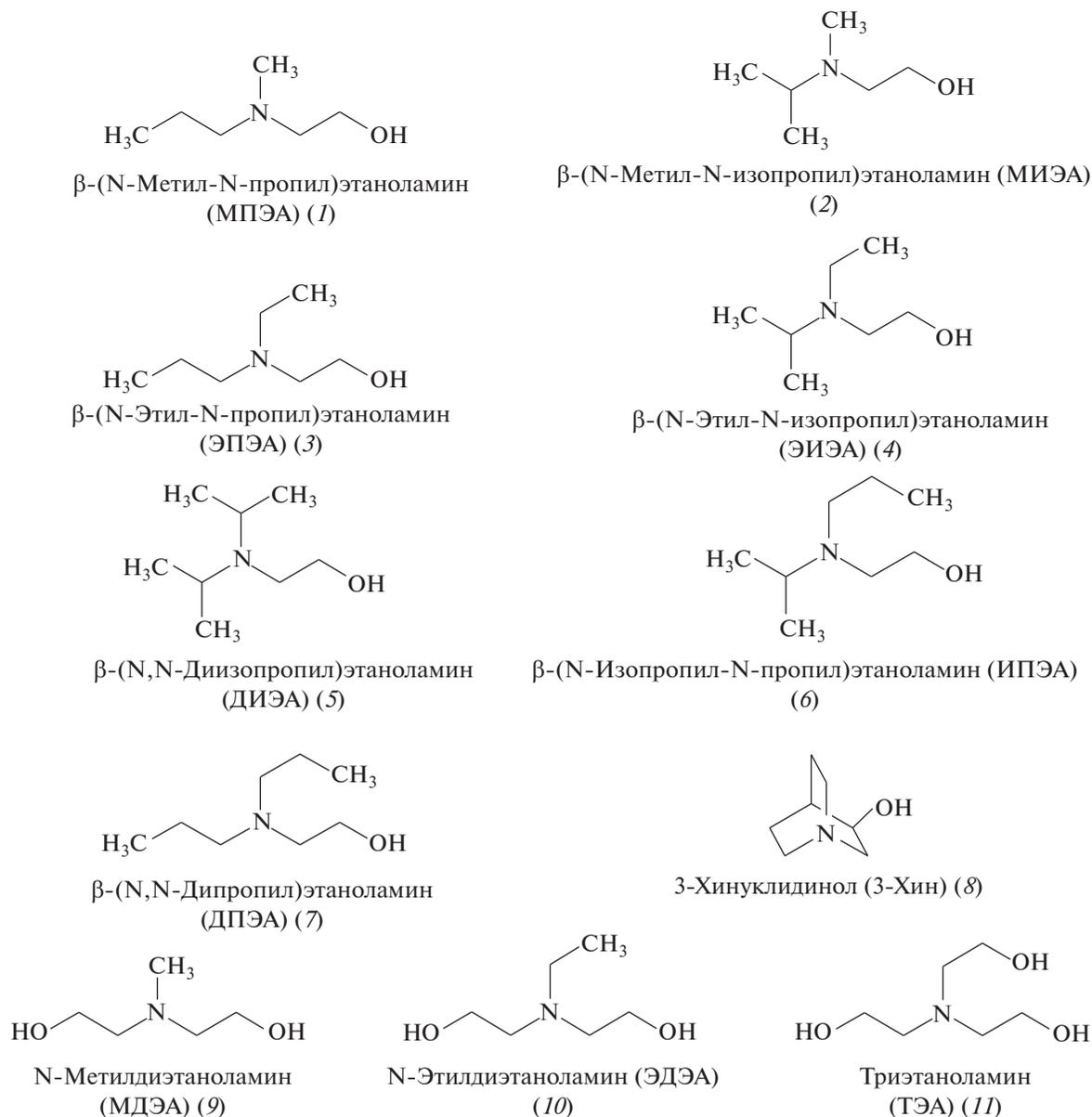


Рис. 1. Структурные формулы β -аминоспиртов – прекурсоров и продуктов деструкции азотсодержащих токсичных химикатов.

позволит перевести их в производные, обладающие достаточной летучестью, термической стабильностью и характеристичными направлениями фрагментации молекулярных ионов, однозначно соответствующими исходному соединению при идентификации масс-спектрометрическим детектором [2]. При этом выбранная реакция должна быть проста в экспериментальном исполнении, характеризоваться быстрой протеканием и высокой селективностью. Различные способы дериватизации ТХ и продуктов их деструкции представлены в обзорах [3–5]. Для химической модификации β -аминоспиртов в большинстве случаев применяют реакции силилирования [6–18] и ре-

же – ацилирования [16, 19–22]. При этом, по мнению авторов, эти две группы реакций представляют собой равноправные направления и имеют свои достоинства и недостатки. Несмотря на распространенность процедуры силилирования при определении β -аминоспиртов методом ГХ, возможности силилирующих реагентов недостаточно изучены. Так, N,O-бис(триметилсилил)трифторацетамид (БСТФА), часто используемый для дериватизации продуктов трансформации ТХ, содержащих OH- и COOH-группы, во всех известных случаях применяют для некоторых β -аминоспиртов (от одного до шести соединений) Приложения по химикатам Конвенции,

что ограничивает возможности химико-аналитического контроля. Определяемые концентрации β -аминоспиртов, как правило, находятся на уровне 0.050–0.50 мкг/мл при сканировании при полном ионном токе [6]. Триметилсилильные (ТМС) производные с помощью БСТФА получают при температуре от 25°C [12] до 70°C [6], времени термостатирования – от 15 мин [12] до 60 мин [17]. В рекомендованных процедурах по стратегии проведения анализа для обнаружения ТХ в объектах окружающей среды дериватизацию полярных продуктов трансформации ТХ с помощью БСТФА предложено проводить в среде ацетонитрила при 60°C в течение 30 мин [23]. В качестве растворителей используют ацетонитрил [6, 9, 13, 17], хлороформ [12] и дихлорметан [18]. Несмотря на то, что дихлорметан является одним из наиболее распространённых растворителей, используемых для извлечения ТХ, их прекурсоров и продуктов деструкции в экологическом анализе, существуют данные о его взаимодействии с аминами [24, 25] и 3-хинуклидиолом [26] при комнатной температуре, что может ограничивать его использование в качестве экстрагента.

Дериватизация другим ТМС-регентом – 1,1,1,3,3,3-гексаметилдисулазаном (ГМДС) к настоящему времени описана только для четырех исследуемых β -аминоспиртов: β -(N,N-диизопропил)этанолamina (ДИЭА), N-этилдиэтанолamina (ЭДЭА), триэтанолamina (ТЭА) и 3-хинуклидинола (3-Хин). При этом реакцию проводят как в дихлорметане при 40°C в присутствии иода [15], так и в ацетонитриле при 70°C без добавления катализатора [7]. С целью получения силильных производных с высокими значениями индексов удерживания в качестве реагентов могут служить хлорсиланы с объемными радикалами, например фенильными, *трет*-бутильными и др. Описаны способы дериватизации N-метил-N-(*трет*-бутилдиметилсилил)трифторацетамидом N-метилдиэтанолamina (МДЭА), ДИЭА, ЭДЭА и ТЭА [10, 12]. При этом отмечается сложность получения *трет*-бутилдиметилсилильного производного 3-Хин вследствие стерических затруднений. Другой реагент с объемным заместителем – диметилфенилхлорсилан – использовали для силилирования некоторых диалкилэтанолamines и алкилдиэтанолamines [14]. Отмечается, что реакцию проводили в присутствии N-метилимидазола без нагревания. Перспективным силилирующим реагентом является *трет*-бутилдифенилхлорсилан (ТБДФС), однако сведения по дериватизации им β -аминоспиртов в литературе отсутствуют.

Несмотря на большое число публикаций и, казалось бы, достаточную изученность вопроса силилирования β -аминоспиртов, в упомянутых работах не описана возможность групповой дериватизации с использованием силилирующих реагентов и не оп-

тимизированы условия определения всех контролируемых β -аминоспиртов при их совместном присутствии. Актуальность разработки такого способа связана с проблемой надежной идентификации любого из возможных продуктов трансформации азотсодержащих ТХ в ходе одного определения на уровне ≥ 1 мг/л. Решение данной задачи связано с необходимостью подбора реагента, оптимизации условий проведения дериватизации смеси одиннадцати β -аминоспиртов, их последующего разделения и идентификации методом ГХ-МС.

Цель настоящей работы – изучение возможности определения группы β -аминоспиртов в виде триметил- и *трет*-бутилдифенилсилильных производных и выбор оптимальных условий дериватизации и ГХ-детектирования, позволяющих идентифицировать максимальное число соединений в ходе одного определения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Растворы и реактивы. В работе использовали ДИЭА, МДЭА, ЭДЭА, ТЭА, 3-Хин (Aldrich, США); β -(N-изопропил-N-пропил)этанолamin (ИПЭА), β -(N,N-дипропил)этанолamin (ДПЭА), β -(N-этил-N-изопропил)этанолamin (ЭИЭА), β -(N-этил-N-пропил)этанолamin (ЭПЭА), β -(N-метил-N-изопропил)этанолamin (МИЭА), β -(N-метил-N-пропил)этанолamin (МПЭА) синтезировали по стандартным методикам, описанным в работах [27, 28]. Для подтверждения структуры и определения чистоты синтезированных соединений использовали метод ЯМР-спектроскопии. Применяли следующие растворители: ацетонитрил, N-метилимидазол, пиридин (Aldrich, США), иод кристаллический ч. д. а. В качестве силилирующих реагентов использовали БСТФА, ГМДС, ТБДФС (Aldrich, США).

Приготовление растворов. Исходные растворы β -аминоспиртов (1.0 мг/мл) готовили растворением точной навески в ацетонитриле. Рабочий раствор смеси β -аминоспиртов с концентрацией каждого компонента 10 мкг/мл готовили путем смешивания и последовательного разбавления исходных растворов. Исходный раствор иода (1.0 мг/мл) готовили растворением 10 мг иода в 10 мл ацетонитрила с последующим разбавлением ацетонитрилом для получения серии растворов с концентрациями 10, 50, 100, 250 и 500 мкг/мл. Растворы хранили при 4°C.

Дериватизация. К 0.5 мл рабочего раствора, содержащего смесь одиннадцати β -аминоспиртов, добавляли 50 мкл силилирующего реагента. В случае проведения реакции с ГМДС или ТБДФС вносили раствор иода или N-метилимидазол соответственно. Растворы встряхивали и помещали в термостат. Условия проведения реакций (тем-

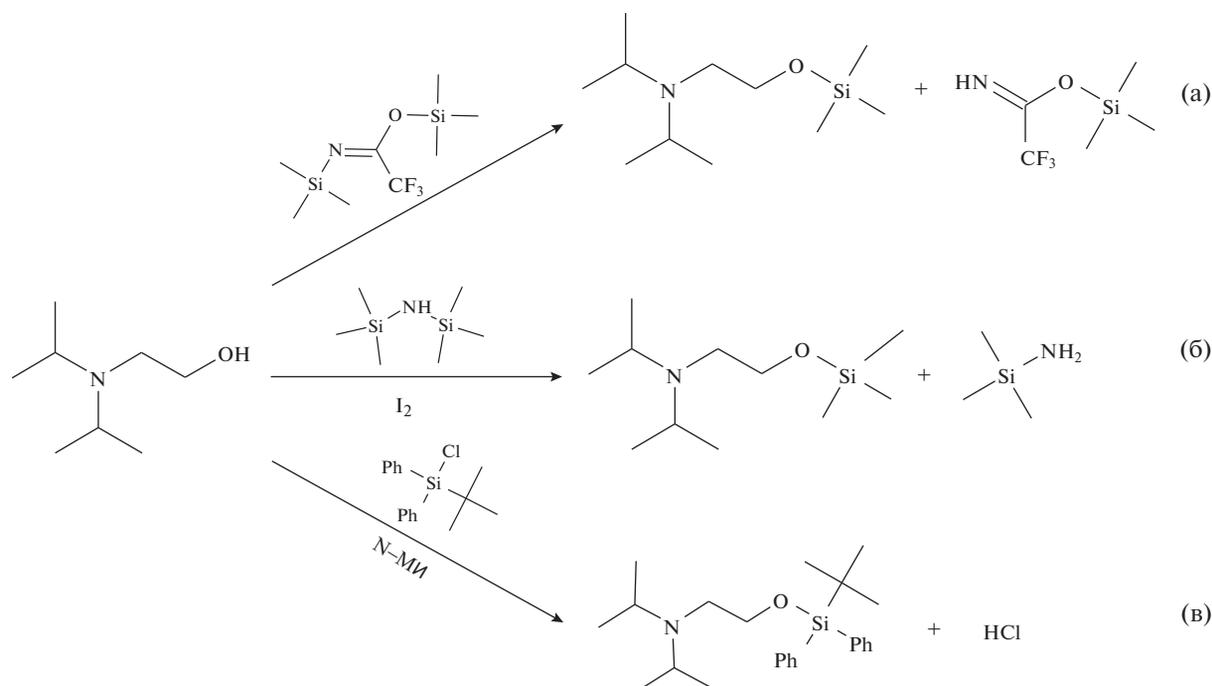


Рис. 2. Схема реакции N,N-диизопропилэтанолamina с реагентами БСТФА (а), ГМДС (б) и ТБДФС (в).

пература, время термостатирования, количество введенных реагентов) указаны ниже в разделе “Результаты и их обсуждение”. Схема реакций получения силиловых эфиров на примере N,N-диизопропилэтанолamina представлена на рис. 2.

Оборудование и условия определения. Использовали газовый хроматограф 7890 А в сочетании с моноквадрупольным масс-спектрометрическим детектором 5975 С (Agilent Technology, США). Хроматографическое разделение проводили на кварцевой капиллярной колонке HP-5MS (30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм) и VF-1701 MS (30 м × 0.25 мм × 1.0 мкм). Объем вводимой пробы для всех измерений составлял 1 мкл. Температура испарителя 260°C, ввод пробы с делением потока 1/10, расход газа-носителя гелия 1.0 мл/мин, температура интерфейса 280°C. Программа градиентного изменения температуры для производных аминспиртов с реагентами БСТФА и ГМДС: 50°C с последующим подъемом со скоростью 10°C/мин до 135°C, далее подъем со скоростью 15°C/мин до 210°C, подъем со скоростью 25°C/мин до 280°C (2 мин); продолжительность анализа 18.3 мин. Для разделения смеси ТБДФС-производных аминспиртов использовали следующий градиент нагрева термостата колонки: 150°C с последующим подъемом со скоростью 10°C/мин до 280°C (1 мин), далее подъем со скоростью 20°C/мин до 290°C (30 мин); продолжительность анализа 44.5 мин.

Масс-спектрометрическое детектирование проводили в режиме электронной ионизации, энергия

ионизации 70 эВ, температура источника ионов 230°C, диапазон сканируемых масс от 33 до 550 *m/z*, в случае ТБДФС от 50 до 900 *m/z*. Экспериментальные данные регистрировали и обрабатывали с помощью программного пакета ChemStation (Agilent Technology, США). При оптимизации условий определения относительную площадь пика соединения рассчитывали как отношение площади *i*-ого производного пика в *j*-ом эксперименте к максимальной площади пика *i*-ого производного в рамках всего эксперимента однопараметрической оптимизации.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Триметилсилильные производные β-аминоспиртов. Для выбора оптимальных условий реакции совместного получения одиннадцати триметилсилильных производных β-аминоспиртов с БСТФА в среде ацетонитрила изучили влияние ряда факторов на площади хроматографических пиков. Влияние температуры на выход продуктов реакции дериватизации рассматривали в интервале 25–80°C при термостатировании реакционной смеси в течение 30 мин. Как видно из рис. 3а, повышение температуры в большей степени приводит к увеличению площадей пиков 3-Хин, группы алкилдиэтанолamines (АДЭА) и ТЭА, достигая максимального значения при 60°C. Подобная зависимость может быть связана со стерическими затруднениями и большими энергозатратами ре-

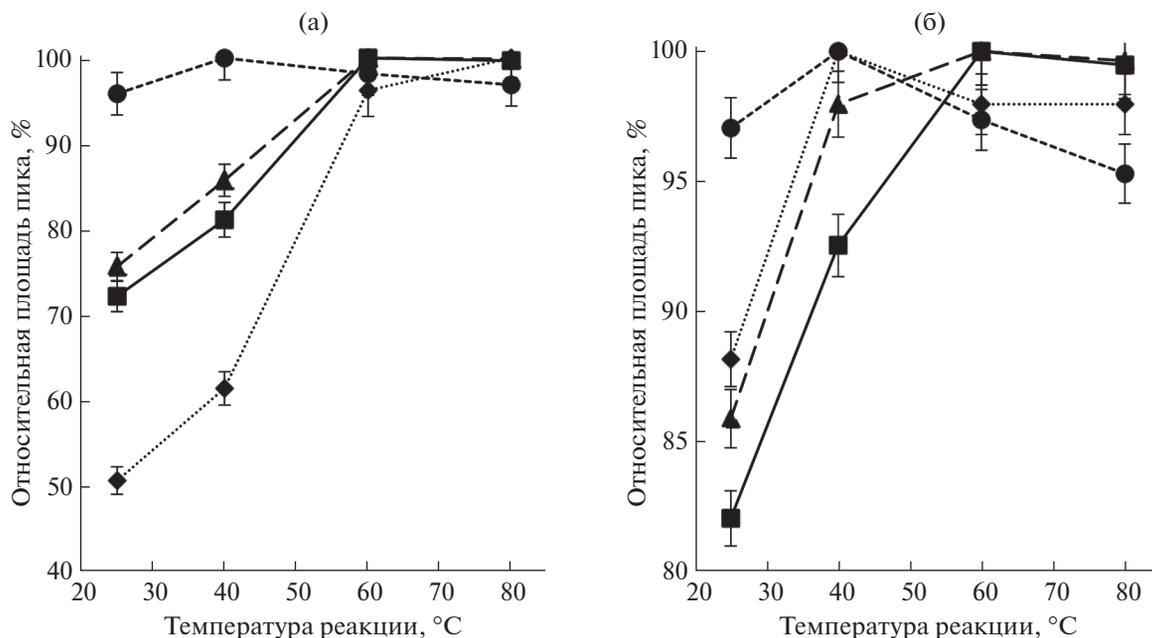


Рис. 3. Влияние температуры на величины площадей пиков производных β -аминоспиртов (а) с БСТФА и (б) с ГМДС ($n = 3$, $P = 0.95$). (●) – ДАЭА-ТМС (1–7), (◆) – 3-Хин-ТМС (8), (▲) – АДЭА-(ТМС)₂ (9, 10), (■) – ТЭА-(ТМС)₃ (11). Номера 1–11 исходных соединений β -аминоспиртов см. рис. 1.

акции БСТФА при получении дериватов с 3-Хин, β -аминоспиртами с двумя гидроксогруппами и ТЭА, в отличие от процесса получения монозамещенных диалкилэтаноламинов (ДАЭА).

Для оптимизации значений использовали также статистический показатель D_n [29–31], который рассчитывали по формуле:

$$D_n = \sqrt[n]{\prod_{i=1}^n d_i},$$

где D_n – общая относительная площадь пиков продуктов реакции, %; d_i – отношение площади пика i -ого производного в j -ом эксперименте к максимальной площади пика i -ого производного в рамках всего эксперимента однопараметрической оптимизации; n – количество соединений в смеси.

Данный коэффициент позволяет выбрать такое значение оптимизируемого параметра, при котором наибольшее число дериватов имеют максимальную площадь пика. Чем выше значение данного показателя, тем предпочтительнее условия реакции [29]. Значения коэффициента D_n , рассчитанные по результатам силилирования реагентом БСТФА для температур в диапазоне 25–80°C, показали, что при 25°C D_n составил 86%, при 40°C – 92%, а при 60°C и выше – 98–99%. Дальнейшие эксперименты с БСТФА проводили при температуре реакции 60°C.

Влияние времени реакции дериватизации на площади пиков производных β -аминоспиртов оценивали для диапазона 15–60 мин. Найдено, что D_n при проведении дериватизации БСТФА в течение 15 мин составляет 93%, а в течение 30 мин и более – 98–99%. Лимитирующим являлся только процесс образования ТМС-производного с 3-Хин, который требовал более длительного нагревания.

Таким образом, оптимальными условиями силилирования одиннадцати β -аминоспиртов реагентом БСТФА являются температура реакции 60°C, продолжительность термостатирования 30 мин. Хроматограмма смеси, полученная в этих условиях, представлена на рис. 4а. Идентификацию каждого компонента проводили по временам удерживания производных индивидуальных соединений и их масс-спектрам. Структурные изомеры, образованные МПЭА и МИЭА, в виде производных с БСТФА не разделяются.

В случае реакции с ГМДС условия, оптимальные для реакции с БСТФА, не приводят к полной конверсии β -аминоспиртов в соответствующие триметилсилиловые эфиры. Так, на хроматограмме смеси (рис. 4б) наряду с пиками полностью замещенных ТМС-дериватов детектируются непрореагировавшие или частично замещенные β -аминоспирты в виде несимметричных затаянутых пиков. Интенсивность пиков ТМС-

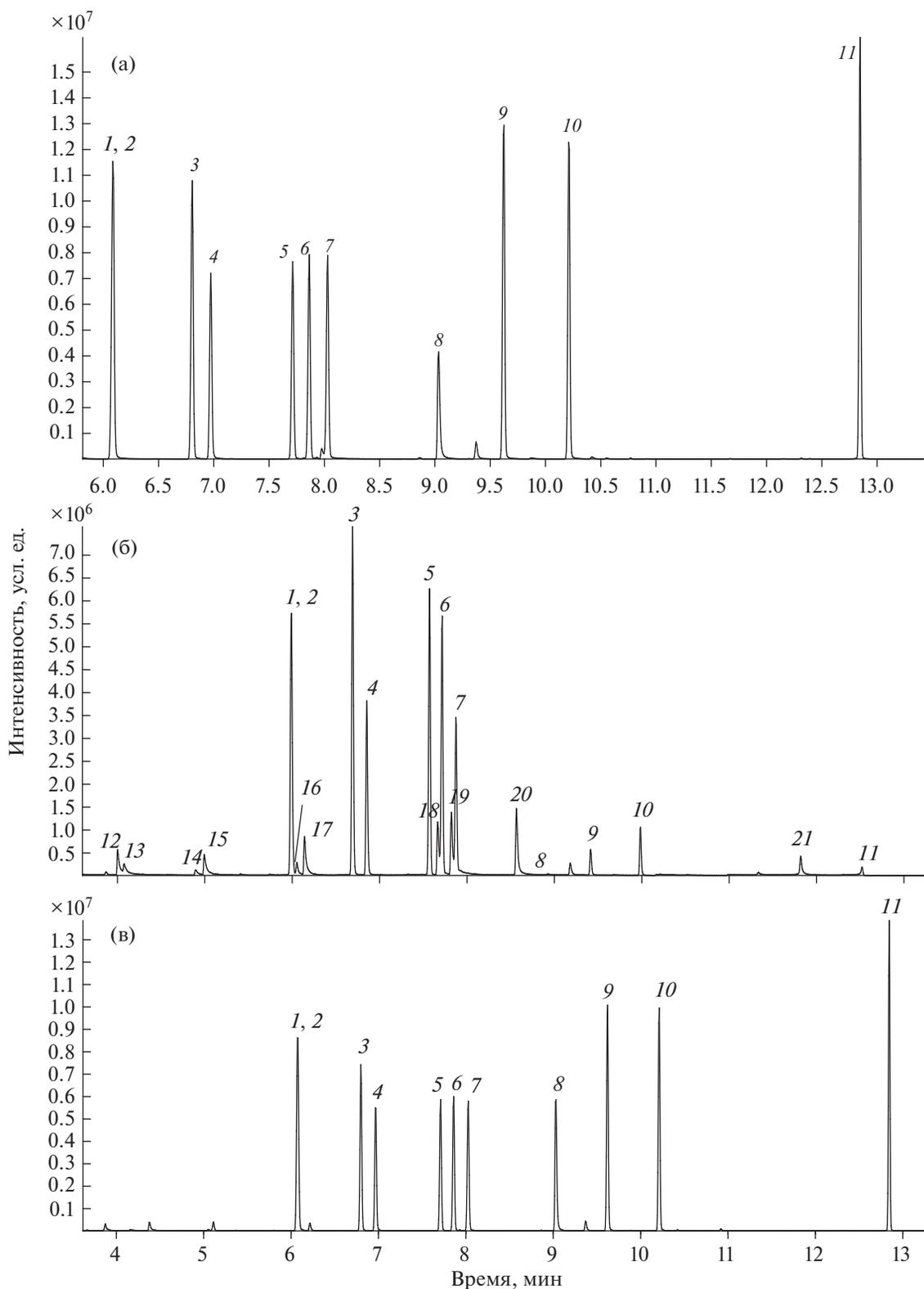


Рис. 4. Хроматограммы смесей ТМС-эфиров β -аминоспиртов ($c = 10$ мкг/мл) после дериватизации реагентами (а) БСТФА, (б) ГМДС без добавки иода, (в) ГМДС с добавкой иода. 1 – МПЭА-ТМС, 2 – МИЭА-ТМС, 3 – ЭИЭА-ТМС, 4 – ЭПЭА-ТМС, 5 – ДИЭА-ТМС, 6 – ИПЭА-ТМС, 7 – ДПЭА-ТМС, 8 – 3-Хин-ТМС, 9 – МДЭА-(ТМС)₂, 10 – ЭДЭА-(ТМС)₂, 11 – ТЭА-(ТМС)₃, 12 – МПЭА, 13 – МИЭА, 14 – ЭИЭА, 15 – ЭПЭА, 16 – ДИЭА, ИПЭА, 17 – ДПЭА, 18 – МДЭА, 19 – 3-Хин, 20 – ЭДЭА, 21 – ТЭА-(ТМС)₂.

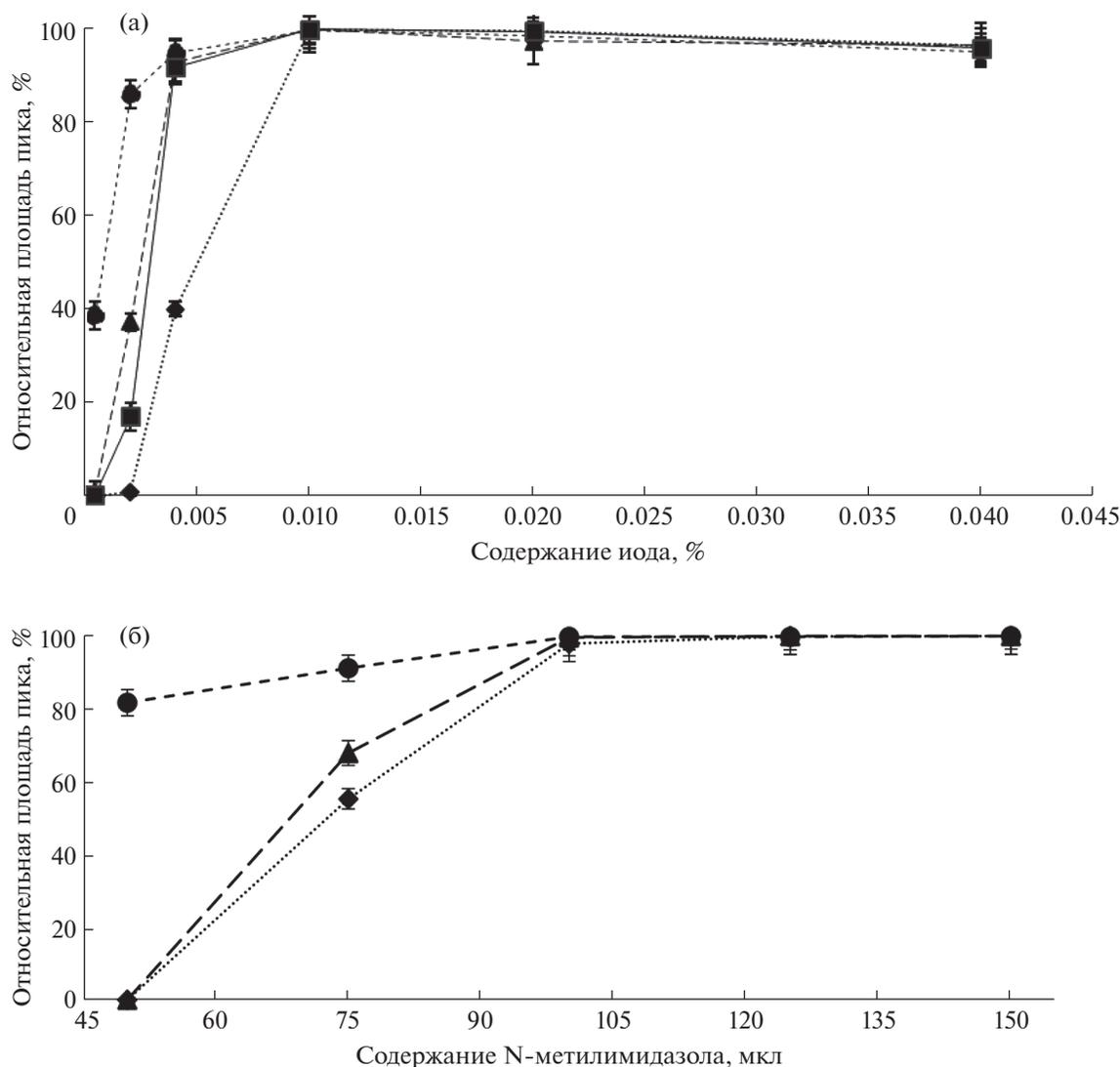


Рис. 5. Зависимости площадей пиков производных β -аминоспиртов ($c = 10$ мкг/мл) после дериватизации (а) реагентом ГМДС от содержания иода; (б) реагентом ТБДФС от содержания N-метилимидазола в реакционной смеси объемом 0.5 мл ($n = 3$, $P = 0.95$). Условия: (а) 80°C , время реакции 30 мин; (б) 80°C , время реакции 45 мин. (а): (●) – ДАЭА-ТМС (1–7), (◆) – 3-Хин-ТМС (8), (▲) – АДЭА-(ТМС)₂ (9, 10), (■) – ТЭА-(ТМС)₃ (11); (б): (●) – ДАЭА-ТБДФ, (◆) – 3-Хин-ТБДФ, (▲) – АДЭА-(ТБДФ)₂.

производных, полученных по реакции с ГМДС, по сравнению с таковыми для БСТФА значительно ниже, особенно для 3-Хин и производных группы АДЭА.

Известно, что повысить реакционную способность реагента ГМДС позволяет добавление триметилхлорсилана, сульфоновых кислот, хлорида цинка, иода. Действительно, введение в реакционную смесь иода в диапазоне концентраций 0.0004–0.04% привело к резкому изменению хроматограммы (рис. 4в). Как видно из рис. 5а, выход одиннадцати производных ГМДС с полным замещением гидроксильных на ТМС-группы максимален при концентрации иода в смеси $\geq 0.01\%$.

При этом кратность увеличения площадей пиков составила для группы производных ДАЭА 2–4 раза, МДЭА, ЭДЭА и ТЭА 71, 130 и 350 раз соответственно, а 3-хинуклидинола $> 4 \times 10^6$ раз по сравнению со значениями без добавки иода.

Предположительно механизм активирующего действия иода может быть связан с взаимодействием с ГМДС и образованием следовых количеств HI или триметилиодсилана, которые катализируют дальнейший процесс силилирования. С другой стороны, иод может способствовать поляризации связи Si-N в молекуле реагента и тем самым увеличивать его реакционную способность [15, 32].

Зависимости площадей хроматографических пиков производных β -аминоспиртов при дериватизации реагентом ГМДС от температуры представлены на рис. 3б. При выборе оптимальных значений температуры (в диапазоне 20–80°C) и времени проведения реакции (15–60 мин) пользовались расчетным показателем D_n . Результаты показали, что с ГМДС дериватизация протекает полностью уже при 40°C ($D_n = 99\%$). При этом требуется меньшее время термостатирования для завершения силилирования по сравнению с реагентом БСТФА. Так, значение D_n для времени реакции, начиная с 15 мин и более, составило 98–99%.

Стоит отметить, что, помимо более мягких условий проведения реакции, достоинством применения ГМДС является образование в качестве побочного продукта аммиака, легко удаляющегося из реакционной среды и не оказывающего влияние на элюирование других компонентов смеси при ГХ-определении. Это отличает данный реагент от БСТФА, для которого регистрируются различные артефакты при проведении реакции силилирования и последующем хроматографировании смеси [33]. Однако, как и в случае БСТФА, структурные изомеры МПЭА и МИЭА с ГМДС не разделяются (рис. 4в).

Производные β -аминоспиртов с *трет*-бутилдифенилхлорсиланом. Увеличение объема молекулы за счет введения ароматических структур и/или разветвленного алкильного радикала при атоме кремния, как правило, приводит к затруднению процесса силилирования. Предварительные результаты показали, что реакция дериватизации *N*-алкилдиэтанолламинов и 3-хинуклидинола с реагентом ТБДФС не идет даже при нагревании до 80°C. Для получения производных всех β -аминоспиртов в реакционную смесь вводили добавку *N*-метилимидазола. Зависимости площадей пиков ТБДФС-производных β -аминоспиртов от количества органического основания в реакционной смеси представлены на рис. 5б. Так, внесение *N*-метилимидазола в объемном соотношении к реагенту 0.5 : 1 недостаточно для активации процесса, а при соотношении 2 : 1 и выше реакция протекает с наибольшим выходом производных. Авторы работы [14] считают, что взаимодействие спирта с алкилхлорсиланами может ускоряться имидазолами за счет образования реакционно-способного промежуточного комплекса азотистого основания с реагентом. Кроме того, действие *N*-метилимидазола может сводиться и к связыванию выделяющегося продукта реакции хлороводорода, а также способствовать диссоциации силилируемого соединения.

При выборе времени термостатирования реакционной смеси (в диапазоне 30–85 мин) с помощью показателя D_n установили, что при проведении реакции в течение 30 мин, значение D_n составило 86%. Увеличение времени нагрева в интервале 45–85 мин не повлияло на количество получаемых производных ($D_n = 96–97\%$).

На рис. 6 представлена хроматограмма смеси продуктов реакции β -аминоспиртов с ТБДФС. Отсутствие пика *N,N,N*-трис[(2-*трет*-бутилдифенилсилилокси)этил]амин (производное ТЭА) может быть обусловлено низкой летучестью деривата и/или его необратимой сорбцией на колонке.

Для разделения изомеров производных МПЭА и МИЭА использовали колонку с более полярной неподвижной фазой (VF-1701 MS) по сравнению с HP-5MS, при этом удалось получить приемлемые результаты для пары МПЭА–МИЭА только в случае производных МПЭА–ТБДФС и МИЭА–ТБДФС (рис. 6). Силильные производные МПЭА–ТМС и МИЭА–ТМС на колонке VF-1701 MS не разделяются.

Пределы обнаружения детектируемых компонентов при отношении сигнал/шум, равном трем, для ТМС-производных составили 0.1–0.2 мкг/мл в случае *N,N*-диалкилэтанолламинов, 0.05–0.08 мкг/мл для *N*-алкилдиэтанолламинов и ТЭА и 0.5 мкг/мл для 3-хинуклидинола. Пределы обнаружения для ТБДФС-производных составили 0.2–0.4 мкг/мл в случае *N,N*-диалкилэтанолламинов, 0.6 мкг/мл для *N*-алкилдиэтанолламинов (ТЭА не хроматографируется) и 0.8 мкг/мл для 3-хинуклидинола.

Таким образом, реагенты БСТФА, ГМДС, ТБДФС обеспечивают эффективное и количественное силилирование одиннадцати β -аминоспиртов, относящихся к Спискам Приложения по химикатам Конвенции, что является быстрым и удобным способом получения производных для хромато-масс-спектрометрического определения на уровне 1 мкг/мл. Оптимизированы температуры и времена реакций с использованием расчетного показателя D_n . Показано, что при дериватизации реагентами ГМДС, и ТБДФС необходимо добавление активирующих добавок иода и *N*-метилимидазола соответственно. Разделение десяти ТМС- и ТБДФС-производных β -аминоспиртов достигается на колонке с неполярной фазой HP-5MS. Структурные изомеры МПЭА и МИЭА разделяются только в виде производных МПЭА–ТБДФС и МИЭА–ТБДФС на неподвижной фазе средней полярности VF-1701 MS.

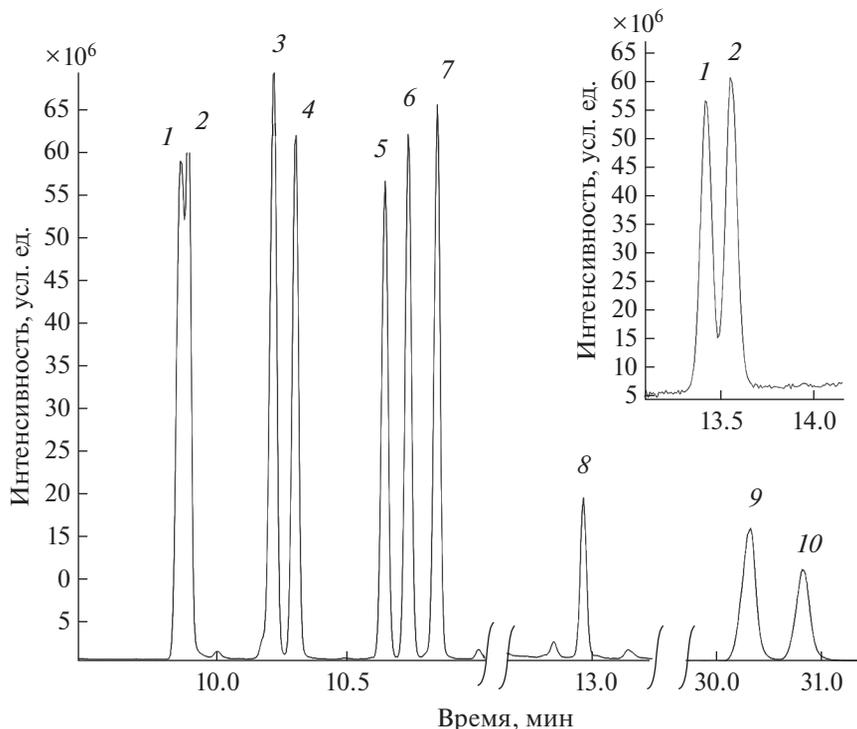


Рис. 6. Хроматограмма смеси *tert*-бутилдифенилсилиловых эфиров β -аминоспиртов (80°C, 45 мин). Условия: колонка HP-5 MS, колонка VF-1701 MS (вставка). Обозначения пиков производных, соответствующих исходным β -аминоспиртам, см. рис. 1.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Convention on the Prohibition of the Development, Stockpiling and Use of Chemical Weapons and on their Destruction. Technical Secretariat of the Organization for Prohibition of Chemical Weapons. The Hague, 1997. <http://www.opcw.org> (22.05.2020).
- Zenkevich I.G. Derivatization of analytes in chromatography: general aspects / Encyclopedia of Chromatography / Ed. Cazes J. New York: Taylor & Francis, 2010. V. 1. P. 562.
- Black R.M., Muir B. Derivatisation reactions in the chromatographic analysis of chemical warfare agents and their degradation products // J. Chromatogr. A. 2003. V. 1000. P. 253.
- Valdez C.A., Leif R.N., Hok S., Hart B.R. Analysis of chemical warfare agents by gas chromatography-mass spectrometry: Methods for their direct detection and derivatization approaches for the analysis of their degradation products // Rev. Anal. Chem. 2018. V. 37. № 1. <https://doi.org/10.1515/revac-2017-0007>
- Witkiewicz Z., Neffe S., Sliwka E., Quagliano J. Analysis of the precursors, simulants and degradation products of chemical warfare agents // Crit. Rev. Anal. Chem. 2018. V. 48. № 5. P. 337. <https://doi.org/10.1080/10408347.2018.1439366>
- Kanaujia P.K., Tak V., Pardasani D., Gupta A.K., Dubey D.K. Application of cation-exchange solid-phase extraction for the analysis of amino alcohols from water and human plasma for verification of Chemical Weapons Convention // J. Chromatogr. A. 2008. V. 1185. P. 167.
- Singh V., Garg P., Chinthakindi S., Tak V., Dubey D.K. Extraction and derivatization of chemical weapons convention relevant aminoalcohols on magnetic cation-exchange resins // J. Chromatogr. A. 2014. V. 1329. P. 10.
- Byrd G.D., Paule R.C., Sander L.C., Sniegoski L.T., Bausum H.T. Determination of 3-quinuclidinyl benziolate (QNB) and its major metabolites in urine by isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry // J. Anal. Toxicol. 1992. V. 16. P. 182.
- Kenar L., Alp O. Determination of nitrogen mustard hydrolysis products in rat urine samples using GC-MS // J. Chromatogr. Sci. 2011. V. 49. P. 361.
- Ohsawa I., Seto Y. Determination of nitrogen mustard hydrolysis products, ethanolamines by gas chromatography-mass spectrometry after *tert*-butyldimethyl-silyl derivatization // J. Chromatogr. A. 2006. V. 1122. P. 242.
- Новикова И.В., Смирнова Ж.В., Новиков Р.И., Курьгина Л.П. Определение β -аминоспиртов в почве методом газовой хромато-масс-спектрометрии // Химия и технология органических веществ. 2020. № 2. С. 57.
- Lee H.S.N., Sng M.T., Basheer C., Lee H.K. Determination of basic degradation products of chemical warfare agents in water using hollow fibre-protected liquid-phase microextraction with in-situ derivatisation fol-

- lowed by gas chromatography–mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* 2008. V. 1196–1197. P. 125.
13. *Kenar L., Alp O.* Comparison of organic solvents used for the determination of mustard gas hydrolysis products in urine samples using gas chromatography–mass spectrometry // *Anal. Lett.* 2010. V. 43. P. 417.
 14. *Valdez C.A., Leif R.N., Hart B.R.* Rapid and mild silylation of β -amino alcohols at room temperature mediated by N-methylimidazole for enhanced detectability by gas chromatography/electron ionization mass spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2014. V. 28. P. 2217.
 15. *Chinthakindi S., Purohit A., Singh V., Dubey D.K., Pardasani D.* On-matrix derivatization extraction of chemical weapons convention relevant alcohols from soil // *J. Chromatogr. A.* 2013. V. 1311. P. 170.
 16. *Garg P., Purohit A., Tak V.K., Dubey D.K.* Enhanced detectability of fluorinated derivatives of N,N-dialkyl-aminoalcohols and precursors of nitrogen mustards by gas chromatography coupled to Fourier transform infrared spectroscopy analysis for verification of chemical weapons convention // *J. Chromatogr. A.* 2009. V. 1216. P. 7906.
 17. *Chinthakindi S., Purohit A., Singh V., Tak V., Dubey D.K., Pardasani D.* Magnetic graphene – polystyrene sulfonic acid nano composite: A dispersive cation exchange sorbent for the enrichment of aminoalcohols and ethanolamines from environmental aqueous samples // *J. Chromatogr. A.* 2015. V. 1423. P. 54. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.10.087>
 18. *Chandra B., Roy S.K., Shaik M., Waghmare C., Palit M.* Mass spectral studies of silyl derivatives of partially hydrolyzed products of nitrogen mustards: Important markers of nitrogen mustard exposure // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2020. V. 34. № 3. <https://doi.org/10.1002/rcm.8586>
 19. *Новикова И.В., Смирнова Ж.В., Петрунин В.А. Новиков Р.И., Курьгина Л.П.* Перфторацилирование β -аминоспиртов для их анализа методом газовой хромато-масс-спектрометрии // *Химия и технология органических веществ.* 2019. № 3. С. 55.
 20. *Mazumder A., Kumar A., Purohit A.K., Dubey D.K.* Application of high performance liquid chromatography coupled to on-line solid-phase extraction-nuclear magnetic resonance spectroscopy for the analysis of degradation products of V-class nerve agents and nitrogen mustards // *J. Chromatogr. A.* 2010. V. 1217. P. 2887.
 21. *Palit M., Mallard G.* Dispersive derivatization liquid–liquid extraction of degradation products/precursors of mustards and V-agents from aqueous samples // *J. Chromatogr. A.* 2011. V. 1218. P. 5393.
 22. *Chandra B., Roy K.S., Shaik M., Waghmare C., Palit M.* Mass spectral fragmentation of perfluoroacyl derivatives of half nitrogen mustards for their detection by gas chromatography/mass spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2020. V. 34. <https://doi.org/10.1002/rcm.8777>
 23. Recommended operating procedures for analysis in the verification of chemical disarmament / Ed. Vanninen P. The Ministry for Foreign Affairs of Finland, University of Helsinki, 2017. 809 p. <http://www.helsinki.fi/verification/bluebook> (12.12.2019)
 24. *Rudine A.B., Walter M.G., Wamser C.C.* Reaction of dichloromethane with pyridine derivatives under ambient conditions // *J. Org. Chem.* 2010. V. 75. P. 4292.
 25. *Nevstad G.O., Songstad J.* Solvent properties of dichloromethane. II. The reactivity of dichloromethane toward amines // *Acta Chem. Scandinav. B.* 1984. V. 38. P. 469.
 26. *Кондратьев В.А., Юдина И.А., Куткин А.В., Новикова И.В., Новиков Р.И., Смирнова Ж.В.* Препаративный метод синтеза галогенидов 1-(галогенметил)-(\pm)-3-хиноклидинолов // *Журн. общ. химии.* 2016. Т. 86. № 9. С. 1573. (*Kondrat'ev V.A., Yudina I.A., Kutkin A.V., Novikova I.V., Novikov R.I., Smirnova Zh.V.* Preparative method of synthesis of 1-(halomethyl)-(\pm)-3-quinclidinol halides // *Russ. J. Gen. Chem.* 2016. V. 86. № 9. P. 2135.)
 27. *Hartman W.W.* β -Diethylaminoethyl alcohol // *Org. Synth.* 1934. V. 14. P. 28.
 28. *Kalszyner A., Galun A.B.* N-methylation of amino alcohols and amino mercaptans // *J. Org. Chem.* 1961. V. 26. № 9. P. 3536.
 29. *Байгильдиев Т.М., Вокуев М.Ф., Орешкин Д.В., Браун А.В., Годовиков И.А., Рыбальченко И.В., Родин И.А.* *p*-Метоксифенацилбромид – универсальный реагент для определения алкилфосфоновых и алкилметилфосфоновых кислот методами высокоэффективной жидкостной и газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием // *Масс-спектрометрия.* 2019. Т. 16. № 3. С. 180. (*Baygildiev T.M., Vokuev M.F., Oreshkin D.V., Braun A.V., Godovikov I.A., Rybalchenko I.V., Rodin I.A.* *p*-Methoxyphenacyl bromide as a versatile reagent for the determination of alkylphosphonic and alkylmethylphosphonic acids by high-performance liquid and gas chromatography with mass spectrometric detection // *J. Anal. Chem.* 2020. V. 75. № 13. P. 1708.)
 30. *Laric Z.R.* Design of Experiments in Chemical Engineering. A practical guide. Weinheim: John Wiley & Sons, 2004. P. 157.
 31. *Sarvin B., Fedorova E., Shpigun O., Titova M., Nikitin M., Kochkin D., Rodin I., Stavrianidi A.* LC-MS determination of steroidal glycosides from *Dioscorea deltoidea* Wall cell suspension culture: Optimization of pre-LC-MS procedure parameters by Latin Square design // *J. Chromatogr. B.* 2018. V. 1080. P. 64.
 32. *Karimi B., Golshani B.* Mild and highly efficient method for the silylation of alcohols using hexamethyldisilazane catalyzed by iodine under nearly neutral reaction conditions // *J. Org. Chem.* 2000. V. 65. P. 7228.
 33. *Little J.L.* Artifacts in trimethylsilyl derivatization reactions and ways to avoid them // *J. Chromatogr. A.* 1999. V. 844. № 1–2. P. 1.

УДК 543.544

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПОЛИКАПИЛЛЯРНЫХ ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ КОЛОНОК С КАПИЛЛЯРАМИ 25 МКМ

© 2022 г. И. И. Науменко^{а, *}, А. П. Ефименко^б, В. М. Грузнов^{а, с, д}

^аИнститут нефтегазовой геологии и геофизики им. А.А. Трофимука
Сибирского отделения Российской академии наук
просп. Академика Коптюга, 3, Новосибирск, 630090 Россия

^бООО “Мультхром”
ул. Арбузова, 4а, к. 1, Новосибирск, 630117 Россия

^сНовосибирский национальный исследовательский государственный университет
ул. Пирогова, 1, Новосибирск, 630090 Россия

^дНовосибирский государственный технический университет
просп. К. Маркса, 2, Новосибирск, 630073 Россия

*e-mail: mail@mcc-chrom.com

Поступила в редакцию 22.02.2022 г.

После доработки 17.03.2022 г.

Принята к публикации 20.04.2022 г.

Прямые поликапиллярные колонки (ПКК) с капиллярами 40 мкм применяют в портативных газоанализаторах. С целью повышения эффективности и скорости газохроматографического разделения изготовлены прямые ПКК с диаметром капилляров 25 мкм длиной 200–250 мм с неподвижной фазой OV-5 (толщина пленки 0.1–0.2 мкм) и определены их основные хроматографические характеристики. Показано, что максимальная удельная эффективность ПКК составила 25600 теоретических тарелок (т.т.)/м, а скорость разделения достигла величины 630 т.т./с., что существенно превышает соответствующие значения для ПКК 40 мкм. Исследуемые ПКК сохраняют высокую эффективность разделения в широком диапазоне потоков газа-носителя: для аргона и азота при потоках 30–170 см³/мин, а для гелия при 120–420 см³/мин. Однако для обеспечения одинакового потока газа-носителя через ПКК 25 мкм требуется примерно в два раза более высокое давление в сравнении с колонками 40 мкм. Уменьшение диаметра каналов ПКК с 40 до 25 мкм позволяет при сохранении эффективности колонки уменьшить ее длину примерно на 1/3.

Ключевые слова: поликапиллярные колонки 25 мкм, эффективность колонки, скорость газа-носителя, давление газа-носителя.

DOI: 10.31857/S0044450222120118

Короткие прямые поликапиллярные колонки (ПКК) длиной до 250 мм с диаметром отдельных капилляров 40 мкм в основном применяются в портативных газовых хроматографах (ГХ), а также в составе специализированных переносных и стационарных газоанализаторов с различными типами детектирующих устройств. Самым первым портативным ГХ с ПКК стал прибор ЭХО-М, разработанный еще в 1988 г. и предназначенный для поиска взрывчатых веществ (ВВ) [1]. В настоящее время семейство приборов типа ЭХО (ИНГГ СО РАН, Новосибирск) с различными типами детекторов используют для обнаружения следов взрывчатых веществ в антитеррористическом контроле [2], при определении ароматических углеводородов при поиске залежей нефти и газа [3], в медицинской диагностике [4] и для решения других аналитических задач. Поликапил-

лярный портативный ГХ ГХС-02П для определения следов ВВ и наркотических веществ выпускает ООО “Сибел” (Новосибирск) [5], а хроматограф Шпинат М1 [6] (СПО “Аналитприбор”, Смоленск) предназначен для определения следовых количеств органических веществ, в том числе и взрывчатых.

Показано успешное применение ПКК совместно со спектрометром приращения ионной подвижности для определения следовых количеств ВВ и наркотиков [7]. В серии работ [8–13] исследована возможность использования ПКК со спектрометром ионной подвижности (СИП) в качестве детектора и представлены портативные ГХ на их основе, отличающиеся компактностью, экспрессностью разделения и высокой селективностью как за счет хроматографической колонки, так и благодаря селекции ионов на СИП. Иссле-

дована возможность применения таких инструментов для определения легколетучих веществ в выдыхаемом воздухе для ранней диагностики больных раком легких, гортани, рта и пищевода. Кроме того, ПКК совместно с СИП использованы для определения качества продуктов питания [14, 15], загрязнений окружающей среды [16, 17], в том числе ароматическими углеводородами [17].

Используемые в портативных газоанализаторах прямые ПКК длиной 200–250 мм имеют эффективность 2500–4200 т.т., что достаточно для решения многих мониторинговых задач. Время разделения на этих ПКК в зависимости от аналита составляет от 10 с до нескольких минут. В настоящее время колонки с капиллярами 40 мкм, в основном благодаря усилиям ООО “Мультихром” (Новосибирск), стали коммерчески доступными [18].

Известно, что эффективность капиллярных колонок повышается с уменьшением диаметра капилляра [19], поэтому с целью повышения эффективности и скорости ГХ-разделения была рассмотрена возможность приготовления ПКК с меньшим диаметром капилляров (25 мкм) по сравнению с применяемыми ПКК с капиллярами 40 мкм.

Целью данной работы является определение основных хроматографических характеристик приготовленных ПКК с диаметром капилляров 25 мкм, в том числе максимальной эффективности (в т.т.), оптимальной линейной скорости газа-носителя для различных газов, скорости разделения и ряда других.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и реагенты. В качестве исходного материала для изготовления ПКК использовали многоканальные трубки (МКТ) с диаметром капилляров 25 ± 1 мкм из электровакуумного стекла марки С89-1, количество капилляров в пучке составляло 3967, диаметр МКТ 2.2 мм (по апофеме). Отбор МКТ из партии проводили на стенде “Метан” [20], считая годными поликапилляры с относительным среднеквадратичным отклонением диаметров менее 0.75%. Начальная длина МКТ была 0.28–0.3 м, после каждой технологической операции их обрезали с обеих сторон на 2–3 мм, конечная длина ПКК составляла 240–250 мм. В работе использовали следующие газы в баллонах: азот ос. ч., аргон высокой чистоты и гелий марки А.

Приготовление поликапиллярных колонок. Перед нанесением неподвижной фазы (НФ) МКТ подвергали обработке минеральной кислотой, затем промывали 40 мл дистиллированной воды под давлением аргона, помещали в термостат хроматографа и высушивали в потоке аргона (40–

60 см³/мин) в режиме программирования температуры от 40 до 260°C и выдерживали при конечной температуре 1 ч. Нанесение пленки НФ OV-5 на МКТ и последующее кондиционирование ПКК проводили по технологии, применяемой для МКТ 40 мкм [21], степень заполнения МКТ раствором НФ составляла 91–95%. При этом испарение растворителя при нанесении пленки НФ занимало примерно 1 ч. Максимальная температура кондиционирования колонок составляла 250°C. Качество приготовленных ПКК определяли хроматографированием теста Гроба при 100°C.

Приборы и оборудование. Для определения относительного среднеквадратичного отклонения диаметров МКТ использовали стенд “Метан”, управляемый программой “Изида” (ООО “Мультихром”, Новосибирск). В работе использовали два модернизированных хроматографа Цвет-500М. Один из них был снабжен серийным пламенно-ионизационным детектором, оригинальным устройством быстрого ввода пробы, разработанным нами ранее [22], и оригинальным электрометрическим усилителем с постоянной времени 5 мс. Время ввода пробы составляло 5–50 мс в зависимости от аналита и потока газа-носителя через ПКК. Управление вводом пробы, запись и обработку хроматограмм на персональном компьютере осуществляли с помощью программы “Хромкод” (ООО “Мультихром”). На этом хроматографе провели все газохроматографические исследования.

Разделение смеси ВВ выполняли на втором хроматографе, который содержал устройство ввода пробы с делением потока, оригинальный детектор электронного захвата (ДЭЗ) с внутренним объемом 0.5 см³ и электрометр с постоянной времени 0.1 с. Управление анализом и обработку хроматограмм на персональном компьютере осуществляли с помощью программы “Хром” (ООО “Сибел”, Новосибирск). Присоединение ПКК к испарителю и детектору обоих хроматографов осуществляли с помощью гибких кварцевых капилляров с миниатюрными фитингами, герметизирующими колонку к капилляру.

При исследовании зависимости потока газа-носителя от давления на входе в ПКК величину давления задавали регулятором РД10м-1 (завод “Хроматограф”, Москва) и контролировали образцовым манометром, модель 1227. Поток газов измеряли расходомером ADM1000 (J&W, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Образцы ПКК 25 мкм с НФ OV-5 с толщиной пленки 0.1–0.2 мкм изготовили по модифицированному статическому методу нанесения НФ на МКТ [23] путем экспериментального подбора параметров техпроцессов. Суть метода заключается в следующем: в многоканальную трубку закачи-

вают раствор НФ в режиме вязкого течения не на полную длину поликапилляра с последующим испарением растворителя. Экспериментально определяли следующие параметры технологии: скорость заполнения МКТ раствором НФ, температуру и время испарения растворителя НФ и условия кондиционирования пленки НФ.

Вследствие разницы скоростей закачки НФ в капилляры с различным сечением, в более широких капиллярах формируется более длинный участок с НФ. Очевидно, такие колонки являются несимметричными, так как один из концов колонки имеет капилляры с непокрытыми НФ участками (“коррелированный конец”). Несимметричность подтвердили экспериментально. При присоединении непокрытого пленкой НФ конца колонки к устройству ввода эффективность ПКК при газохроматографическом тестировании была выше примерно в 1.5 раза, чем при присоединении наоборот. Кроме того, факторы удерживания при этом также заметно различались, в первом случае они были меньше. На рис. 1 приведены хроматограммы теста Гроба на одной из ПКК в одних и тех же условиях при различных способах присоединения. Видна заметная разница ширины пиков и времени удерживания одних и тех же веществ. При присоединении “коррелированным концом” к устройству ввода эффективность по *n*-додекану составляла 5133 т.т. с фактором удерживания пика 23.6, при обратном присоединении указанные величины составляли 3387 т.т. и 24.3 соответственно.

Такая зависимость характеристик колонки от направления движения потока газа-носителя не отмечена для коротких прямых ПКК с капиллярами диаметром 40 мкм, но наблюдается для спиральных ПКК длиной 1 м и теоретически обоснована в работе [24]. Разница характеристик ПКК в зависимости от способа присоединения к аналитическому тракту тем больше, чем больше перепад давления на колонке, выше вязкость газа-носителя и меньше длина заполнения раствором МКТ НФ при ее нанесении [24].

Отличительной особенностью ПКК является сильная зависимость эффективности колонки от фактора удерживания вещества-аналита [24, 25], связанная с коррелированным нанесением НФ. Нами экспериментально исследована зависимость эффективности *N* от фактора удерживания *k* веществ гомологического ряда углеводородов для ПКК с капиллярами 25 мкм. Результаты исследований представлены в табл. 1, из которой следует, что с ростом фактора удерживания примерно до 10–15 эффективность ПКК быстро нарастает, а затем медленно увеличивается с дальнейшим ростом *k*. Поэтому при оптимизации разделений необходимо учитывать, что эффек-

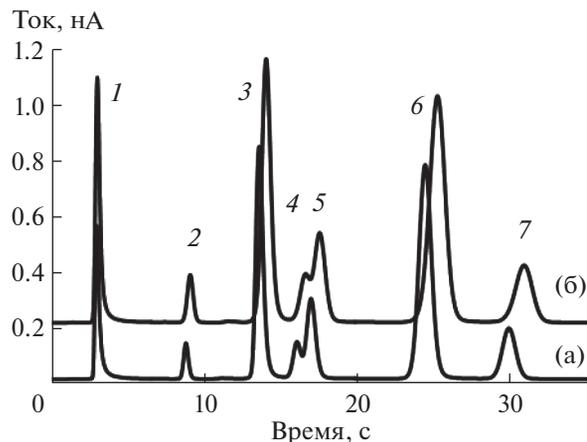


Рис. 1. Хроматограммы теста Гроба при 100°C на поликапиллярной колонке длиной 220 мм с НФ OV-5 (0.1 мкм) при присоединении к испарителю “коррелированным участком” (а) и наоборот (б). Газ-носитель – аргон (35 см³/мин), время ввода пробы 16 мс. Цифрами обозначены: 1 – 2,3-бутандиол, 2 – *n*-декан, 3 – 1-октанол, 4 – 2,6-диметилфенол, 5 – *n*-ундекан, 6 – 2,6-диметиланилин, 7 – *n*-додекан.

тивность колонки по веществам с *k* < 10 будет понижена.

Важной эксплуатационной характеристикой хроматографической колонки является давление газа-носителя на входе в колонку, необходимое для создания требуемого потока. Источником давления газа-носителя в портативных полевых хроматографах являются либо встроенный газовый баллон, либо компрессор с системой очистки атмосферного воздуха [26, 27]. В любом случае желательно применение более низкого входного давления для уменьшения неизбежных утечек в аналитическом тракте, а также для снижения энергопотребления компрессора. С целью оценки величины давления, необходимого для создания требуемого потока газа-носителя через ПКК

Таблица 1. Зависимость эффективности *N* по *n*-углеводородам от фактора удерживания *k* для поликапиллярной колонки с неподвижной фазой OV-5 (0.1 мкм) длиной 220 мм при 100°C (расход газа-носителя аргона 46 см³/мин)

Компонент	<i>k</i>	<i>N</i> , т.т.
Гексан	0.38	497
Октан	1.73	1520
Нонан	3.44	2600
Декан	6.71	3430
Ундекан	12.85	4320
Додекан	24.62	5060
Тридекан	46.65	5370
Тетрадекан	87.94	5440

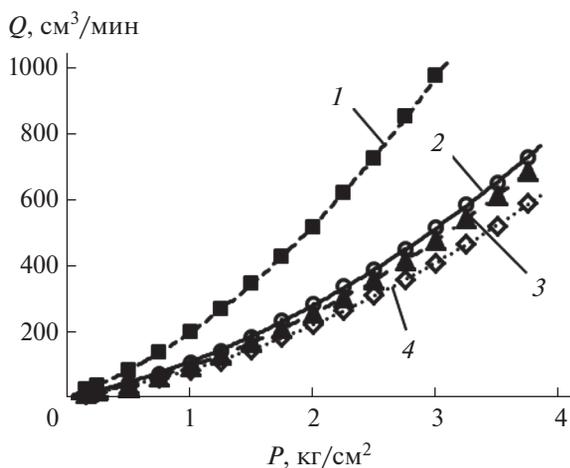


Рис. 2. Зависимость расхода газа-носителя через многоканальные трубки длиной 220 мм от давления газа на входе в поликапилляр с капиллярами 40 мкм для аргона (1) и с капиллярами 25 мкм для азота (2), гелия (3) и аргона (4).

с капиллярами 25 мкм, исследовали зависимость потока газа-носителя Q через МКТ 25 мкм от давления на входе P для трех различных газов: гелия, азота и аргона. Работу выполняли с МКТ длиной 220 мм при 20°C. Результаты измерений в графическом виде представлены на рис. 2. Для сравнения приведена также аналогичная зависимость для МКТ 40 мкм длиной 220 мм (количество капилляров 1387) с использованием аргона.

Из рис. 2 видно, что для создания одинаковых потоков газов через МКТ 25 и 40 мкм в первом случае требуется примерно в два раза большее избыточное давление (на примере аргона). Повышенное давление на входе в колонку не является препятствием для применения ПКК в составе стационарных хроматографов, однако для полевых приборов применение давления более 1 кг/см² нежелательно из экономических и ресурсных соображений. Характерная величина потока газа через исследуемые МКТ 25 мкм при избыточном давлении 1 кг/см² равна 80–100 см³/мин в зависимости от используемого газа. При одном и том же давлении на входе в МКТ величина потока газа убывает в ряду азот–гелий–аргон, что объясняется увеличением вязкости газов в этом ряду. При температуре колонки, отличной от комнатной, поток газа-носителя легко пересчитать из вязкости газа-носителя при данной температуре (справочная величина).

Основным отличием ПКК от колонок других типов является сохранение высокой эффективности в широком диапазоне линейных скоростей газа-носителя. Зависимость высоты, эквивалентной теоретической тарелке (ВЭТТ), от средней линейной скорости газа-носителя (кривая Ван-

Деемтера) для ПКК с капиллярами 40 мкм изучена в ряде работ. Так, Кук [28] показал, что на спиральной ПКК длиной 1 м с НФ SE-54 минимальная ВЭТТ остается практически неизменной в диапазоне линейных скоростей газа-носителя ~80–210 см/с. На аналогичной ПКК с НФ SE-30 величина ВЭТТ по органометаллическим веществам также почти не изменялась при линейных скоростях в диапазоне 80–280 см/с [29, 30], а для спиральной ПКК с НФ SE-54 – в пределах 70–240 см/с [31]. Все эти результаты получены при использовании в качестве газа-носителя гелия. При применении для этих целей азота на прямой ПКК длиной 160 мм показано, что на кривой Ван-Деемтера наблюдается широкий минимум при средней линейной скорости 12–70 см/с или потоке газа-носителя 10–60 см³/мин соответственно [8]. Таким образом, во всех работах продемонстрировано сохранение минимальной ВЭТТ ПКК в широком интервале скоростей газа-носителя, что позволяет эксплуатировать ПКК при высоких расходах газа-носителя без потери их эффективности и проводить при этом быстрые хроматографические разделения.

С целью оценки скоростных характеристик ПКК с капиллярами 25 мкм экспериментально получили зависимость ВЭТТ (H) от линейной скорости газа-носителя U . Исследования выполняли на прямой ПКК с НФ OV-5 (0.1 мкм) длиной 234 мм, хроматографирование проводили при 100°C, анализ – *n*-додекан. В качестве газа-носителя в данной работе использовали гелий и азот, а также аргон, обычно применяемый при работе с ДЭЗ.

Среднюю линейную скорость газа-носителя U_i при каждом измерении рассчитывали по уравнению: $U_i = L/t_{0i}$, где L – длина колонки, t_{0i} – время удерживания несорбирующегося вещества, в качестве которого использовали метан. Полученные в результате зависимости ВЭТТ по *n*-додекану от линейной скорости газа-носителя U представлены на рис. 3. Как видно, для гелия минимальная ВЭТТ составляет около 0.05 мм, и при этом она незначительно изменяется в диапазоне линейных скоростей газа-носителя от 50 до 105 см/с, что соответствует диапазону потоков газа-носителя 120–420 см³/мин. Минимальная ВЭТТ для азота и аргона составляет около 0.04 мм при скоростях газа-носителя 30 и 25 см/с соответственно и постепенно повышается до 0.09 и 0.12 мм соответственно при линейных скоростях более 60 см/с. При этом в интервале линейных скоростей газа-носителя 20–60 см/с или соответственно потоков 28–170 см³/мин для аргона и 30–200 см³/мин для азота ВЭТТ не превышает 0.05 мм, т.е. меняется незначительно, поэтому указанные интервалы расхода газов-носителей могут быть рекомендованы к использованию. Таким образом, показа-

но, что для ПКК 25 мкм, как и для ПКК 40 мкм высокая эффективность колонок сохраняется в достаточно широком для практики диапазоне потоков газа-носителя.

Объяснить полученные результаты для различных газов можно следующим образом. Если пренебречь внеколоночным размыванием хроматографического пика, то ВЭТТ ПКК H можно представить в виде суммы $H = H_{mc} + H_1$, где H_{mc} – ВЭТТ пучка капилляров, отражающая различие капилляров в пучке, H_1 – ВЭТТ отдельного капилляра [24]. Из расчетов по уравнениям, приведенным в работе [24], следует, что H_{mc} плавно уменьшается с ростом отношения давлений на входе и выходе ПКК и, соответственно, с ростом скорости потока газа. Поэтому в зависимость ВЭТТ ПКК от скорости газа-носителя вносит вклад в основном ВЭТТ единичного капилляра. Действительно, видно, что экспериментально полученные нами графические результаты согласуются с видом кривых Ван-Деемтера для капиллярных колонок при применении различных газов-носителей [19]. А именно: в газах с малой плотностью (гелий, водород) минимальное значение H_1 достигается при значительно больших значениях линейной скорости газа-носителя, чем для более плотных газов (воздух), и при дальнейшем повышении линейной скорости газа-носителя характер роста ВЭТТ для них является более пологим.

Известно, что при высоких скоростях газа-носителя повышение перепада давления на капиллярной колонке будет приводить к росту ВЭТТ [19]. Возможно, по этой причине мы наблюдали относительно быстрое увеличение ВЭТТ ПКК с ростом линейной скорости в области выше 60 см/с для аргона ввиду того, что создание необходимого потока самого вязкого из применяемых газов-носителей требует установки на входе в колонку более высокого давления как за счет гидродинамического сопротивления самой колонки, так и соединительных кварцевых капилляров.

Достигнутая в этих экспериментах максимальная эффективность колонки по *n*-додекану при оптимальной скорости газа-носителя (аргон) составила ~6000 т.т., что соответствует удельной эффективности ~25600 т.т./м. Эта величина на 25–30% превышает аналогичное значение для ПКК 40 мкм [25]. На основании полученных экспериментальных данных построили также зависимость скорости разделения на ПКК от средней линейной скорости газа носителя. Скорость разделения V (т.т./с) вычисляли по уравнению: $V_i = N_i/t_i$, где N_i и t_i соответственно число т.т. и время удерживания для пика *n*-додекана при каждой линейной скорости U_i . Полученные зависимости скорости разделения от линейной скорости газа носителя U приведены на рис. 4. Как видно, при

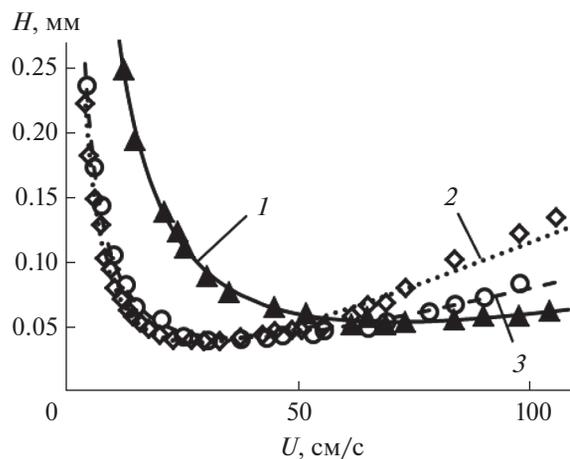


Рис. 3. Зависимость ВЭТТ (H) от линейной скорости газа-носителя (U) для поликапиллярной колонки с капиллярами 25 мкм с неподвижной фазой OV-5 (0.1 мкм) по *n*-додекану для гелия (1), аргона (2) и азота (3).

использовании аргона или азота зависимости V от U имеют выраженные максимумы, в которых значения V равны 406 и 497 т.т./с соответственно, при линейных скоростях, равных примерно 56 и 69 см/с, или потоке примерно 170 и 220 см³/мин соответственно. Для гелия зависимость имеет вид плавно нарастающей кривой, при этом максимально возможное значение скорости разделения V , по-видимому, лежит в области более высоких линейных скоростей газа-носителя, чем удалось создать в данной работе. Таким образом, максимальная скорость разделения при использовании гелия, достигнутая в данном исследовании, составляет величину 630 т.т./с, но, по-видимому, может быть увеличена за счет применения более высокой линейной скорости газа-носителя (более 105 см/с). Необходимо подчеркнуть, что среднюю линейную скорость газа-носителя, при которой наблюдается максимальная величина параметра V , автор работы [32] определяет как *максимальную практическую линейную скорость* газа-носителя. Экспериментальные значения этого параметра для ПКК 25 мкм для азота и аргона приведены выше.

Следует отметить некоторые особенности ПКК 25 мкм, которые необходимо учитывать при работе с ними. Поскольку измеренное в работе минимальное значение ВЭТТ для них очень мало (~0.04 мм), процесс хроматографирования на этих ПКК критичен к объему и времени ввода пробы ввиду того, что необходимо сформировать очень узкую ширину зоны пробы в потоке газа-носителя. Эффективность колонок будет зависеть также от наличия мертвых объемов в аналитическом тракте, быстродействия детектора и регистрирующей системы. Ввиду меньшего диаметра

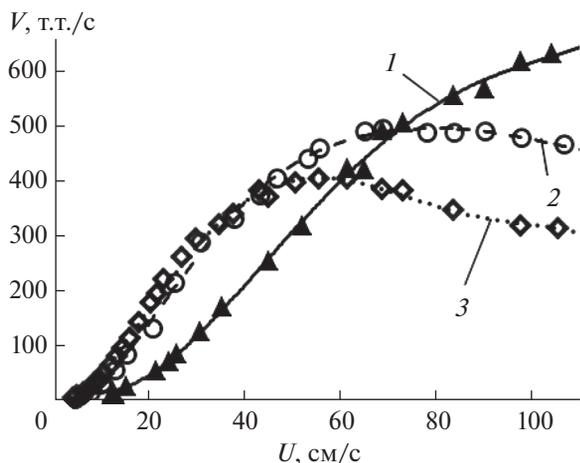


Рис. 4. Зависимость скорости разделения (V) от линейной скорости газа-носителя (U) для поликапиллярной колонки с капиллярами 25 мкм с неподвижной фазой OV-5 (0.1 мкм) по n -додекану для гелия (1), азота (2) и аргона (3).

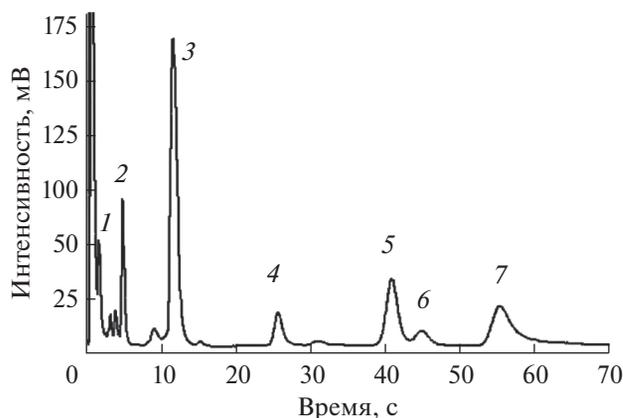


Рис. 5. Хроматограмма смеси взрывчатых веществ на поликапиллярной колонке 25 мкм длиной 150 мм с неподвижной фазой OV-5 (0.125 мкм) при 140°C. Расход аргона около 100 см³/мин. Цифрами обозначены: 1 – трипероксид ацетона, 2 – нитроглицерин, 3 – 2,4-динитротолуол, 4 – 2,4,6-тринитротолуол, 5 – тетрапентаэритрит (ТЭН), 6 – примесь ТЭН, 7 – гексоген.

капилляров исследуемых ПКК по сравнению с ПКК 40 мкм для обеспечения одинакового расхода газа-носителя для них требуется существенно большее давление на входе в колонку. Для создания минимального расхода газа-носителя ~30 см³/мин для азота и аргона, необходимого для обеспечения высокой эффективности ПКК, требуется давление газа-носителя около 0.4–0.5 кг/см², а для гелия такой минимальный расход равен ~120 см³/мин, что соответствует давлению гелия на входе 1.2 кг/см² (для этих газов для ПКК 40 мкм достаточно избыточного давления 0.2–0.25 кг/см²).

Для использования ПКК 25 мкм в составе портативных хроматографов, учитывая их высокую эффективность, имеет смысл уменьшить их длину. Показано, что уменьшение длины одной из экспериментальных колонок до 150 мм привело к уменьшению ее эффективности (по n -додекану) до ~4000 т.т., что сравнимо с максимальным числом т.т. применяемых в портативных газовых хроматографах ПКК длиной 220 мм с 40-микронными капиллярами. При этом необходимое давление на входе в ПКК при потоке аргона 100 см³/мин уменьшается до приемлемых для портативных приборов значений, равных 0.7–0.75 кг/см². В качестве примера возможностей укороченных ПКК с капиллярами 25 мкм на рис. 5 приведена хроматограмма разделения смеси наиболее распространенных ВВ, полученная на хроматографе с ДЭЗ. Видно, что пики ВВ отделяются друг от друга и симметричны (кроме гексогена). Время разделения смеси, содержащей как легколетучие, так и тяжелые компоненты (тетранитропентаэритрит (ТЭН) и гексоген), составляет около 1 мин.

Таким образом, применение модифицированного статического метода нанесения НФ [23] обеспечивает приготовление высокоэффективных газохроматографических прямых ПКК с диаметром капилляров 25 мкм длиной 200–250 мм с НФ OV-5. Показано, что для таких ПКК характерны повышенные аналитические характеристики по сравнению с ПКК с капиллярами 40 мкм. На примере анализа смеси взрывчатых веществ показана их высокая селективность. С учетом приемлемых эксплуатационных характеристик эти ПКК пригодны для применения в портативных газовых хроматографах. Их использование обеспечит существенное совершенствование аналитических характеристик портативных газовых хроматографов, включая разрабатываемую нами серию приборов ЭХО широкого назначения [33].

Работа выполнена при финансовой поддержке Комплексной программы фундаментальных исследований СО РАН (проекты № 0385-2018-0014, № 0331-2019-0029, № 0331-2018-0009).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Грузнов В.М., Шишмарев А.Т., Филоненко В.Г., Балдин М.Н., Науменко И.И. Экспрессный анализ объектов окружающей среды с применением портативных газовых хроматографов и поликапиллярных колонок // Журн. аналит. химии. 1999. Т. 54. № 9. С. 957. (Gruznov V.M., Shishmarev A.T., Filonenko V.G., Baldin M.N., Naumenko I.I. Rapid analysis of environmental samples using portable gas chromatographs and polycapillary columns // J. Anal. Chem. 1999. V. 54. № 9. P. 850.)

2. Балдин М.Н., Грузнов В.М. Портативный газовый хроматограф с воздухом в качестве газа-носителя для определения следов взрывчатых веществ // Журн. аналит. химии. 2013. Т. 68. № 11. С. 1117. (Baldin M.N., Gruznov V.M. A portable gas chromatograph with air carrier gas for the determination of explosive traces // J. Anal. Chem. 2013. V. 68. № 11. P. 1002.)
<https://doi.org/10.7868/S0044450213110029>
3. Грузнов В.М., Балдин М.Н., Науменко И.И., Карташов Е.В., Прямов М.В. Портативная газовая хроматография с пассивными концентраторами для экспрессной геохимической съемки по ароматическим углеводородам / Химический анализ в геологии и геохимии / Под ред. Аношина Г.Н. Новосибирск: "Гео", 2016. С. 555.
4. Малышева А.О., Балдин М.Н., Грузнов В.М., Блинова Л.В. Внелабораторный экспрессный газохроматографический способ анализа выдыхаемого человеком воздуха с автоматизированной градуировкой // Аналитика и контроль. 2018. Т. 22. № 2. С. 177. (Malysheva A.O., Baldin M.N., Gruznov V.M., Blinova L.V. Non-laboratory express gas-chromatographic method of human breath analysis with automated graduation // Analitika i Kontrol. 2018. V. 22. № 2. P. 177.)
<https://doi.org/10.15826/analitika.2018.22.2.007>
5. Переносной газовый хроматограф ГХС-02П. URL: <http://www.sibel.info/ru/gas-chromatographs/gcs-02f.html> (февраль 2022).
6. Изделие "Шпинат-М1". Руководство по эксплуатации. Смоленск: издательство ФГУП "СПО "Аналитприбор", 2006. 10 с.
7. Buryakov I.A. Express analysis of explosives, chemical warfare agents and drugs with multicapillary column gas chromatography and ion mobility increment spectrometry // J. Chromatogr. B. 2004. V. 800, P. 75.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2003.10.064>
8. Baumbach J.I., Eiceman G.A., Klockow D., Sielemann St., Irmer A.V. Exploration of a multicapillary column for use in elevated speed gas chromatography // Int. J. Environ. Anal. Chem. 1997. V. 66. № 4. P. 225.
<https://doi.org/10.1080/03067319708028366>
9. Sielemann St., Baumbach J.I., Schmidt H. IMS with non radioactive ionization sources suitable to detect chemical warfare agent simulation substances // Int. J. Ion Mobility Spectrom. 2000. V. 5. № 3. P. 143.
10. Aguilera-Herradora E., Cardenas S., Ruzsanyi V., Sielemann St., Valcarcel M. Evaluation of a new miniaturized ion mobility spectrometer and its coupling to fast gas chromatography multicapillary columns // J. Chromatogr. A. 2008. V. 1214. P. 143.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.10.050>
11. Jünger M., Bödeker B., Baumbach J.I. Peak assignment in multi-capillary column-ion mobility spectrometry using comparative studies with gas chromatography-mass spectrometry for VOC analysis // Anal. Bioanal. Chem. 2010. V. 396. P. 471.
<https://doi.org/10.1007/s00216-010-3798-1>
12. Perl T., Bödeker B., Jünger M., Nolte J., Vautz W. Alignment of retention time obtained from multicapillary column gas chromatography used for VOC analysis with ion mobility spectrometry // Anal. Bioanal. Chem. 2010. V. 397. P. 2385.
<https://doi.org/10.1007/s00216-010-3798-1>
13. Hauschild A.-C., Schneider T., Pauling J., Rupp K., Jang M., Baumbach J.I., Baumbach J. Computational methods for metabolomic data analysis of ion mobility spectrometry data – Reviewing the state of the art // Metabolites. 2012. V. 2. P. 733.
<https://doi.org/10.3390/metabo2040733>
14. Garrido-Delgado R., Dobao-Prieto M. del Mar, Arce L., Valcarcel M. Determination of volatile compounds by GC-IMS to assign the quality of virgin olive oil // Food Chem. 2015. V. 187. P. 572.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.082>
15. Márquez-Silleroa I., Cárdenasa S., Sielemann St., Valcárcela M. On-line headspace-multicapillary column-ion mobility spectrometry hyphenation as a tool for the determination of off-flavours in foods // J. Chromatogr. A. 2014. V. 1333. P. 99.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.01.062>
16. Xie Z., Sielemann St., Schmidt H., Baumbach J.I. Ion mobility spectrometry coupled to multi capillary column // Int. J. Ion Mobility Spectrom. 2000. V. 4. № 1. P. 77.
17. Baumbach J.I., Sielemann St., Xie Z., Schmidt H. Detection of the gasoline components methyl tert-butyl ether, benzene, toluene, and m-xylene using ion mobility spectrometers with a radioactive and uv ionization source // Anal. Chem. 2003. V. 75. P. 1483.
<https://doi.org/10.1021/ac020342i>
18. Range of Products. URL: <http://mcc-chrom.com/catalogue> (февраль 2022)
19. Sacks R.D. High-speed gas chromatography / Modern Practice of Gas Chromatography. 4th Ed. / Eds. Grob R.L., Barry E.F. Wiley & Sons, 2004. P. 229.
20. Науменко И.И., Ефименко А.П. Измерение относительной дисперсии диаметров капилляров многоканальных трубок хроматографическим методом // Заводск. лаборатория. Диагностика материалов. 2016. Т. 82. № 4. С. 73.
21. Науменко И.И., Соболева В.К. Приготовление поликапиллярных колонок с полиметилфенилсилоксановыми неподвижными фазами // Сорбционные и хроматографические процессы. 2016. Т. 16. № 5. С. 591.
22. Науменко И.И., Ефименко А.П., Балдин М.Н., Грузнов В.М. Система ускоренного ввода пробы в хроматографическую колонку // Датчики и системы. 2013. № 11. С. 51.
23. Солдатов В.П., Ефименко А.П., Науменко И.И., Чертилина Л.Н. Способ нанесения неподвижной фазы на внутреннюю поверхность капиллярной колонки А.с. СССР № 1659838. Заявка 4156673/25 от 04.12.1986, опубл. 30.06.1991.
24. Ефименко А.П., Науменко И.И., Соболева В.К. Эффективность поликапиллярных колонок // Журн. физ. химии. 2007. Т. 81. № 3. С. 1. (Efimenko A.P., Naumenko I.I., Soboleva V.K. Efficiency of multicapillary columns // Russ. J. Phys. Chem. 2007. V. 81. P. 410.)
<https://doi.org/10.1134/S003602440703020X>

25. Сидельников В.Н., Патрушев Ю.В. Поликапиллярная хроматография // Рос. хим. журн. 2003. Т. XLVII. № 1. С. 23.
26. Яшин Я.И., Яшин А.А. Миниатюризация газохроматографических приборов // Журн. аналит. химии. 2001. Т. 56. № 9. С. 794.
27. Балдин М.Н., Горохов А.Ф., Киле А.Н., Рыболовлев В.Г. Фильтр для очистки газа. Патент РФ № 2207563 Заявка 2001121951/28 от 03.08.2001, опубл. 27.06.2003.
28. Cooke W.S. Multicapillary columns: An idea whose time has come // Today Chemist At Work. 1996. V. 5. № 1. P. 16.
29. Pereira I.R., Schmitt V.O., Lobinski R. Elemental speciation analysis by multicapillary gas chromatography with microwave-induced plasma atomic spectrometric detection // Anal. Chem. 1997. V. 69. № 23. P. 4799. <https://doi.org/10.1021/ac970410e>
30. Lobinski R., Sidelnikov V., Patrushev Y., Rodriguez I., Wasik A. Multicapillary column gas chromatography with element-selective detection // Trends Anal. Chem. 1999. V. 18. № 7. P. 449. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(99\)00119-3](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(99)00119-3)
31. Rosenkranz B., Bettmer J. Rapid separation of elemental species by multicapillary GC // Anal. Bioanal. Chem. 2002. V. 373. P. 461. <https://doi.org/10.1007/s00216-002-1331-x>
32. Hinshaw J.V. Practical gas chromatography // LC GC Asia Pac. 2013. V. 16. № 4. P. 22. https://www.researchgate.net/publication/286655912_Practical_Gas_Chromatography
33. Грузнов В.М., Балдин М.Н., Макасы А.Л., Титов Б.Г. Развитие в России методов обнаружения взрывчатых веществ // Журн. аналит. химии. 2011. Т. 66. № 11. С. 1236. (Gruznov V.M., Baldin M.N., Makas A.L., Titov B.G. Progress in methods for the identification of explosives in Russia // J. Anal. Chem. 2011. V. 66. № 11. P. 1121.) <https://doi.org/10.1134/S1061934811110074>

УДК 543.07:61.616-7

ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ “ЭЛЕКТРОННОГО НОСА” ДЛЯ МОНИТОРИНГА ОТКЛОНЕНИЙ ПРИ ФУНКЦИОНАЛЬНОМ ОЖИРЕНИИ ДЕТЕЙ В УСЛОВИЯХ СТАЦИОНАРА. НЕИНВАЗИВНАЯ ДИАГНОСТИКА БЕЗ ОТБОРА БИОПРОБ

© 2022 г. Т. А. Кучменко^{a, b, *}, Е. С. Доровская^a, Д. А. Менжулина^c, Т. В. Чубаров^c^aВоронежский государственный университет инженерных технологий
просп. Революции, 19, Воронеж, 394036 Россия^bИнститут геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского Российской академии наук
ул. Косыгина, 19, Москва, 119991 Россия^cВоронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко
ул. Студенческая, 10, Воронеж, 394000 Россия

*e-mail: tak1907@mail.ru

Поступила в редакцию 24.02.2022 г.

После доработки 29.03.2022 г.

Принята к публикации 30.03.2022 г.

Портативный “электронный нос – диагност” применен для исследования особенностей состава смеси летучих соединений, выделяемых кожей предплечий у детей с ожирением и иными сопутствующими нарушениями метаболизма. В условиях стационара оценены различия и особенности профилей летучих соединений (приоритетно органических) кожи на левом и правом предплечьях у детей с ожирением и зависимость профиля от приема пищи, лекарственных средств, сопутствующих заболеваний и особенностей организма. Проанализировано более 300 профилей пациентов в течение двух лет, в том числе в динамике при повторных плановых госпитализациях. По результатам исследования положительно оценена возможность проведения анализа и сравнения состава газовой смеси соединений, выделяемой кожей на предплечье рук, без предварительного разделения и отбора при помощи массива восьми пьезосенсоров “электронного носа – диагноста”. Оценена корреляция данных электронного носа и результатов стандартных клинических лабораторных исследований. Установлены параметры массива сенсоров и клинических исследований, тесно связанные между собой, в том числе с уровнями мочевины, щелочной фосфатазы, глюкозы. Положительно оценена возможность подхода, основанного на сканировании летучего профиля кожи на предплечье в течение 3–6 мин, для ранжирования детей с ожирением на группы, связанные с важнейшими социально значимыми заболеваниями и состояниями: “норма”, “ожирение с вероятностью развития сахарного диабета 2 типа” и “сахарный диабет 1 типа”. С помощью методов хемометрики оптимизирована методика проведения анализа, обозначены условия исследования и точки контроля. Наиболее информативным является состав летучего метаболома кожи на правом предплечье, сканируемый натошак. Правильность отличия проблемных групп от нормы составляет 100%, правильность ранга внутри патологических групп – 80%. Доля ложных отнесений растет при наличии воспалений в организме любого типа. Перспективность методики оценена в условиях стационара.

Ключевые слова: диагностика, ожирение, экспресс-методы, сенсоры, “электронный нос”, летучие биомолекулы, кожа.

DOI: 10.31857/S0044450222120088

По оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в мире лишний вес имеют более миллиарда человек. Проблема ожирения актуальна даже для стран, в которых большая часть населения постоянно голодает, а в промышленно развитых странах она уже давно стала серьезным аспектом общественного здоровья [1]. Диагноз ожирение объединяет наследственные и приобретенные заболевания, связанные с избыточным

накоплением жировой ткани в организме. Избыточный вес и ожирение у детей и молодых людей являются основными факторами риска развития хронических заболеваний и связаны с повышенным риском ожирения у взрослых [2] и преждевременной смертностью [3, 4]. Всемирная организация здравоохранения признает, что избыточная масса тела и ожирение у детей достигли

масштабов эпидемии в большинстве промышленно развитых стран [5].

Согласно отчету группы Европейской инициативы ВОЗ по эпидемиологическому надзору за детским ожирением (COSI) [6] по анализу тенденций развития избыточного веса и ожирения у детей младшего школьного возраста, основной причиной ожирения является малоподвижный образ жизни. Однако еще одна причина ожирения кроется в наличии сложных метаболических нарушений в организме, приводящих к накоплению и отложению избыточного количества жира [7]. Многолетними исследованиями ученых всего мира установлено, что на фоне ожирения способны развиваться ряд опасных заболеваний, такие как сахарный диабет 2 типа, сердечно-сосудистые заболевания, болезни печени и желчевыводящих путей, толстой кишки и патологии пищевода. Еще с 80-х годов прошлого столетия разрабатывались различные методики оценки ожирения и прогноза ожирения населения, начиная с младенчества [8]. Последние два года отличаются объективным снижением активности населения, повышением рисков набора веса из-за стресса и неуверенности в завтрашнем дне. В связи с этим возрастает актуальность быстрого выявления групп риска для детей с развитием ожирения из-за метаболических нарушений, дифференциация их от нарушений веса из-за снижения подвижности. Особенно важно обеспечить доступными средствами и методиками распознавания причин и групп риска участковых педиатров, хотя и для стационаров эндокринологического профиля такие разработки представляют интерес для более раннего выявления групп риска с выбором верного пути лечения и профилактики развития социально значимых заболеваний.

Социальная значимость проблемы ожирения определяется угрозой инвалидизации пациентов молодого возраста и снижением общей продолжительности жизни в связи с частым и ранним развитием тяжелых осложнений.

Выделяют нейрогенные, эндокринные и метаболические механизмы возникновения ожирения. Эндокринные механизмы ожирения – лептиновый, гипотиреоидный, надпочечниковый и инсулиновый. Инсулиновый механизм развития ожирения развивается вследствие прямой активации инсулином липогенеза в жировой ткани [9]. Считают, что основные повреждения при этом типе ожирения находятся на уровне клеточных мишеней. Они связаны с уменьшением числа рецепторов для инсулина, обуславливающим резистентность к инсулину и компенсаторный гиперинсулинизм [10].

Всем пациентам с ожирением рекомендованы биохимические исследования: липидограмма крови, уровни ферментов (АлАТ, АсАТ) в сочета-

нии с ультразвуковым исследованием печени. Для диагностики нарушений липидного обмена у всех определяют уровень общего холестерина, уровни холестерина липопротеинов высокой и низкой плотности, триглицеридов в крови. Определение ферментов печени (АлАТ и АсАТ) в сочетании с ультразвуковым исследованием печени рекомендовано всем пациентам с ожирением для скрининга неалкогольной жировой болезни печени. Жировой гепатоз имеют 25–45% подростков с ожирением; с длительностью ожирения может прогрессировать и поражение печени: стеатогепатит, фиброз, цирроз [11]. По результатам изучения распространенности дислипидемии у детей с инсулинозависимым сахарным диабетом (ИЗСД) и ее связи с гликемическим контролем установлено, что аномалии циркулирующих липидов часто встречаются у молодых людей с ИЗСД, но в значительной степени исчезают, если концентрация глюкозы в крови находится под разумным контролем [12].

На сегодняшний день актуальна разработка доступных и быстрых неинвазивных способов диагностики состояния. Это может позволить существенно сузить круг поиска проблем при диагностике на ранних этапах и привести к ускорению процесса лечения. Одним из таких способов может стать диагностика по выделяющимся соединениям – химическому профилю легколетучих биомолекул.

Метаболом, или метаболический профиль, представляет собой совокупность всех низкомолекулярных метаболитов (<1500 Да) биологического образца, являясь уникальным химическим “отпечатком пальцев”, специфичным для процессов, протекающих в живых клетках [13].

Исследования метаболического профиля выполняют, как правило, с использованием гибридного метода анализа – сочетания газовой или жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии, спектроскопии ядерного магнитного резонанса. Данные методы имеют ряд ограничений: высокая стоимость и громоздкость приборного оснащения, необходимость привлечения высококвалифицированного персонала, затраты на обеспечение рабочего состояния. Альтернативным решением может стать применение электронного носа как многообещающего диагностического инструмента будущего.

При анализе динамики изменения количества публикаций на тему применения электронного носа в диагностике установили значимый рост интереса к данной тематике на протяжении последних 20 лет (рис. 1а).

С помощью электронного носа на сегодняшний день уже анализируют такие биопоробы, как выдыхаемый воздух, урина, кровь, пот, слюна, цервикальная слизь [14–18]. Анализируя данные

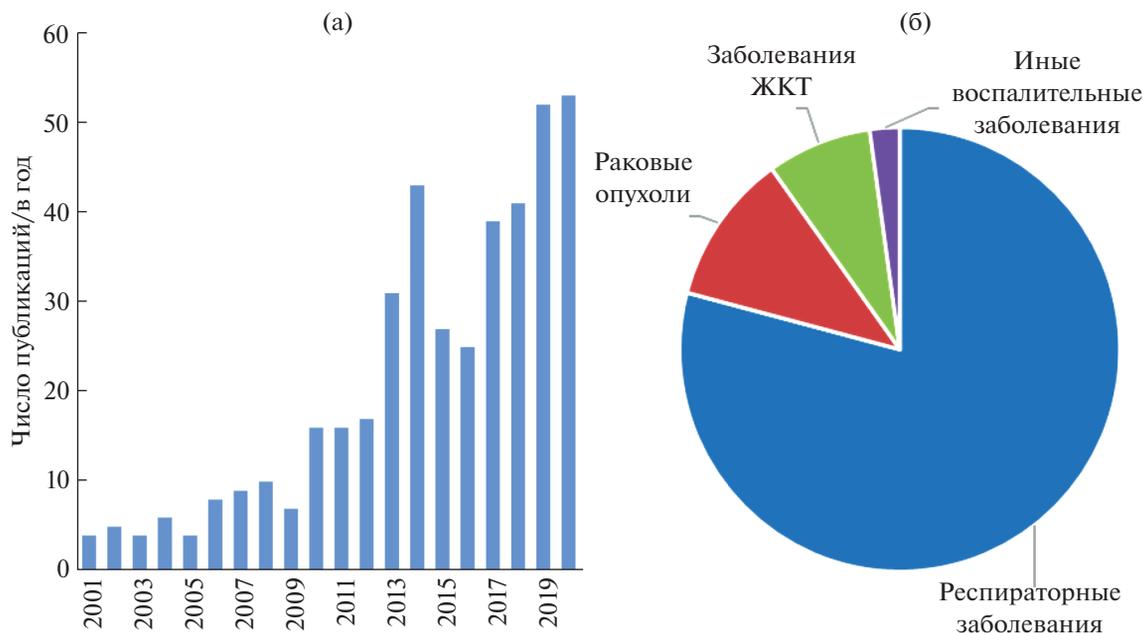


Рис. 1. Изменение количества публикаций по применению систем “электронный нос” в диагностике (а) и заболевания, которые возможно диагностировать с их помощью (б).

пробы, специалисты в основном диагностируют заболевания желудочно-кишечного тракта, раковые опухоли, респираторные, а также иные воспалительные заболевания (рис. 1б) [19–22].

Диагностика состояния человека по легколетучим соединениям, основана на регистрации маркеров состояния сенсорами. В табл. 1 приведены некоторые маркеры патологических процессов организма, которые с высокой вероятностью могут быть определены при выделении самым большим и постоянно функционирующим органом выделения – кожей.

Изучение смеси газов, выделяемых кожей, может сделать диагностику полностью неинвазивной и практически мгновенной. Исходя из всего описанного выше, на сегодняшний день очень важна и актуальна разработка нового аналитического решения, которое позволит за короткое время на приеме у специалиста определить, имеет ли ожирение пациента связь с первоначальными эндокринными нарушениями, или же оно связано в большей степени с неправильным пищевым и динамическим поведением. Основой разработки такого подхода может стать применение газовых сенсоров для установления наличия/отсутствия легколетучих маркеров патогенных процессов организма человека, а также детектирование или фиксирование индивидуального профиля газов с установлением отклонений в нем, связанных с нарушениями метаболизма.

Цель работы – разработка способа изучения летучего метаболического профиля у детей с ожирением, выделяемого кожей, с применением массива химических сенсоров и оценка его информативности.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Пьезокварцевое микровзвешивание. Одним из высокочувствительных и простых методов исследования газовых смесей является метод пьезокварцевого микровзвешивания, который позволяет регистрировать изменения частоты механических колебаний чувствительного элемента – пьезокристалла, вызванные незначительными изменениями массы, наблюдаемыми при адсорбции на тензочувствительной области. С помощью данного метода можно детектировать большой набор легколетучих биомолекул, например спиртов, кетонов, органических кислот, аминокислот и др. [38].

Для детектирования газового профиля кожи применяли портативный “электронный нос – диагност” (ЭНД) Bio-8 [39] (ООО “Сенсорика-Новые технологии (СНТ)”, Россия) (рис. 2а, 2б). Аналитическая информация ЭНД “Bio-8” представлена в виде: хроночастотограмм; “визуальных отпечатков” максимальных сигналов пьезосенсоров (рис. 2в); кинетических “визуальных отпечатков” (рис. 2г). Перед началом каждого нового измерения контролировали стабилизацию

Таблица 1. Некоторые газообразные биомолекулы, выделяемые человеком, и их диагностическая значимость

Аналиты	Характеристика диагностической функции	Орган, отвечающий за синтез	Биопробы для определения	Количество	Литература
Бензиламин, вода, циклопентанон	Маркер нормального метаболизма	—*	—	(—)**	[23]
Этандиаль	Развитие хронических клинических осложнений, связанных с сахарным диабетом, ретинопатией, спазм желчных протоков	—	Моча, кровь	(—)	[24]
Пропандиаль	Язвенный колит, болезнь Крона, неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП)	—	Спинальная жидкость, экскременты, слюна	(—)	[25]
Ацетальдегид	Язвенный колит, болезнь Крона, НАЖБП	Надпочечники, эпидермис, почка, печень, поджелудочная железа и др.	Кровь, экскременты, слюна, пот, моча и др.	(—)	[25]
Этиламинол	Раковые заболевания, язвенный колит	Мозг, поджелудочная железа	Моча, слюна, экскременты, кровь и др.	(—)	[26–29]
Этанол	Заболевания почек, печени, хронический панкреатит	Мочевой пузырь, печень, поджелудочная железа, сердце, почка, жировая ткань и др.	Моча, слюна, экскременты, кровь, пот, спинномозговая жидкость, эпидермис	90 мкмоль	[30]
Бутанол-1	Сахарный диабет 2 типа	Селезенка, печень, почка, поджелудочная железа	Эпидермис, экскременты, слюна, кровь	До 2.43×10^{-6} моль	[31, 32]
Бутанол-2	Повышается у больных сахарным и инсулинозависимым диабетом		Экскременты, слюна	(—)	
Пентанол-1	Инфекционное заболевание, НАЖБП, колит		Экскременты, слюна	(—)	[26, 31]
Масляная кислота	Гипогликемия, болезнь Крона, язвенный колит, кишечные инфекции, НАЖБП	Толстая кишка, простата, почка	Моча, слюна, экскременты, кровь, мозговая жидкость	$(20.5 \pm 16.5) \times 10^{-5}$ моль	[25, 32–35]
Триметил-амин	Рак поджелудочной железы, язвенный колит, болезнь Крона, НАЖБП, заболевания почек	Эпидермис, скелетные мышцы	Кровь, спинномозговая жидкость, экскременты, слюна, моча	1.5 ± 0.5 мкмоль	[36, 25]
Метиламин	Сахарный диабет, хроническая болезнь почек	—	Слюна, моча, экскременты, кровь, пот	(—)	[33, 37]

* Нет данных, ** не определено.

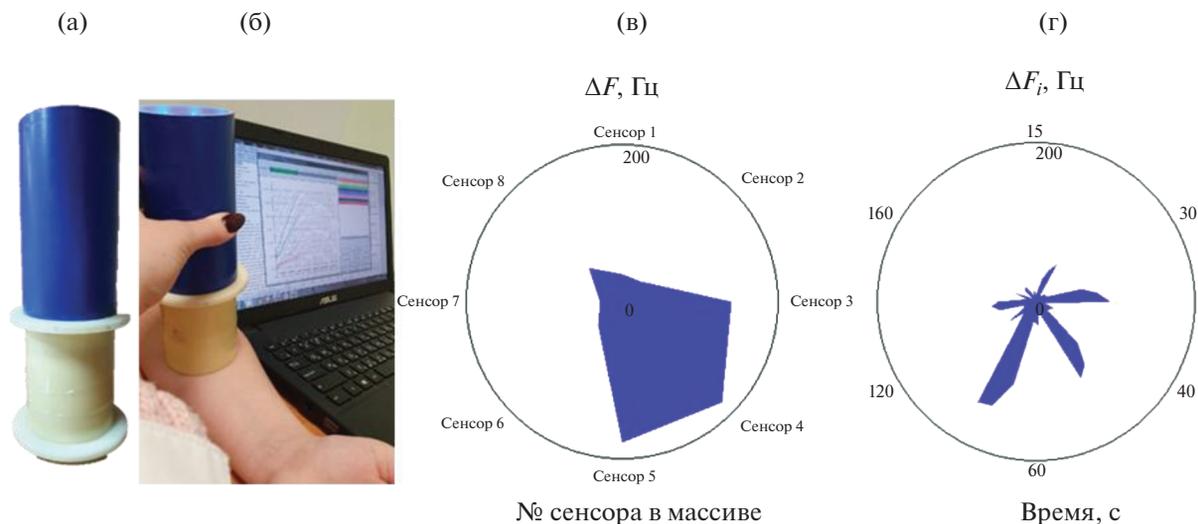


Рис. 2. “Электронный нос – диагност” Bio-8 (а), методика сканирования летучих молекул кожи (б), интегральные отклики массива сенсоров в виде “визуальных отпечатков” максимальных (в) и кинетических (г) сигналов сенсоров.

цию базовой линии каждого сенсора, дрейф должен изменяться не более чем на ± 1 Гц/с.

Для обеспечения надежности детектирования летучих соединений кожи в течение длительного времени эксперимента применяли два уровня контроля стабильности массива сенсоров “электронного носа-диагноста”:

1) согласно инструкции пользователя прибора применяли внутреннюю стандартизацию массива по стандартным веществам (пропанол-2, этилацетат). Определенный объем паров вносили в прибор, фиксировали аналитический сигнал и сопоставляли полученную форму интегрального аналитического сигнала для каждого из веществ и представленную в инструкции. Допускается для массива отличие сигнала от стандартного значения не более чем на 15%. Режим и периодичность контроля определяются и связаны с интенсивностью измерений и природой объектов анализа.

2) Так как сенсоры в массиве являются микровесами, изменение массы модификаторов на каждом из них определяют повторяемость измерений и контролируются в программном обеспечении (ПО) прибора. Перед эксплуатацией в ПО вносятся значения базовых частот каждого сенсора с допустимым разбросом значений для каждого типа модификатора индивидуально (\pm (от 100 до 500 Гц)). При превышении допустимых установленных разбросов базовой частоты сенсор подвергают дополнительной регенерации. При критическом отклонении базовой частоты от паспортной сенсоры заменяются с повторной стандартизацией по п. 1.

Количественные параметры микровзвешивания рассчитываются сразу после измерения в ПО прибора (MAGSoft):

- максимальный аналитический сигнал сенсора (ΔF_{\max} , Гц), характеризующий эффективность сорбции органических соединений на фазах сорбентов;
- площадь под хроночастотограммой i -го сенсора (S_i , Гц с) для оценки вклада откликов каждого пьезосенсора в суммарный аналитический интегральный сигнал ЭНД;
- площадь “визуального отпечатка” сигналов массива сенсоров ЭНД ($\Sigma S_{v.o.}$, Гц с). Определяется суммарной массой адсорбированных фазами модификаторов легколетучих органических веществ за время измерения;
- доля веса сенсора в массиве $\omega(1-8)$ (%) характеризует вклад сигналов отдельного сенсора в суммарный аналитический сигнал ЭНД.

Качественные параметры микровзвешивания:

- параметр эффективности сорбции $A_{i/j}$ – отношение максимальных сигналов отдельных пьезосенсоров $\Delta F_i/\Delta F_j$ (где i, j – различные покрытия электродов) – позволяет оценить соотношение в пробе концентраций различных классов соединений, идентичен для разбавленных смесей паров коэффициенту селективности – отношению чувствительностей микровзвешивания веществ двумя пленками [40]. Минимаксные значения параметров эффективности сорбции индивидуальных паров являются их качественными характеристиками.

Для расчета корреляции со стандартными клиническими показателями и построения прогнозирующей модели применяли совокупность информационных параметров ЭНД:

Количественные параметры (25):	Качественные расчетные параметры (30):
Сигналы всех сенсоров (8 шт.): ΔF_{\max} (1–8), Гц	Параметры сорбции веществ массивом сенсоров A_{ij} (28 шт.)
Вклад сигналов отдельного сенсора в суммарный аналитический сигнал (доля веса), ω (1–8), % (8 шт.)	Кинетические параметры сорбции на сенсоре с фазой гидроксипатита (2 шт.): $\alpha_{120/60}$, $\alpha_{60/80}$
S_j , $\Sigma S_{B.O.}$, Гц с	
Итого 55 параметров	

Измерительными элементами являются химические сенсоры с базовыми частотами колебания кварца ЭНД равными 10 ± 1 МГц (ООО “Пьезо”, Москва).

В качестве модификаторов пьезосенсоров выбрали фазы карбоксилированных углеродных нанотрубок (МУНТ_{соон}), нитрата оксида циркония, наноструктурированного биогидроксипатита $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ (ГА), полиэтиленгликоль сукцината (ПЭГСк), дициклогексан-18-краун-6 (ДЦГ18К6) в составе коммерческого набора Bio[®] (ООО “СНТ”, Россия).

Считали, что функционирование всех сенсоров с сорбентами подчиняется модели Зауэрбрея, поэтому массу сорбата и покрытия оценивали по основному уравнению модели:

$$\Delta m = \frac{\Delta F \times 0.2}{2.27 \times 10^{-6} F_0^2},$$

где ΔF – изменение частоты колебаний кварцевой пластины резонатора при нанесении фазы или сорбции паров, Гц; 2.27×10^{-6} – градуировочная константа пьезоэлектрических микровесов K_f при н.у, см²/г; F_0 – базовая частота колебаний кварцевой пластины пьезокварцевого резонатора (ПКР), МГц; 0.2 – площадь электродов ПКР, см².

Характеристика объектов исследования. Исследование проводило на базе Воронежской детской клинической больницы ВГМУ им. Н.Н. Бурденко с 09.01.2020 по 26.06.2021.

С помощью прибора “электронный нос – диагност” Bio-8 и выбранного массива сенсоров измеряли содержания 380 летучих соединений, выделяемых кожей в области предплечья у детей в разном состоянии с различными заболеваниями в период прохождения ими стационарного обследования и лечения в эндокринологическом отделении.

Каждое измерение длилось 200 с, в течение 80 с производилась нагрузка сенсоров путем поднесения прибора к коже пациента в области предплечья на внутренней стороне, а по истечении данного времени происходило наблюдение за самопроизвольной десорбцией летучих биомолекул из открытой ячейки с продолжением фиксирования их откликов (рис. 2б).

Для правильной оценки состояния и маркировки профиля летучих молекул кожи пациента использовали диагноз врача и результаты обследования медицинской лаборатории. Для каждого человека измеряли летучий профиль на левом и правом предплечьях натошак, после приема пищи, после приема лекарств. Изучен метаболический профиль 35 пациентов в возрасте от 5 до 17 лет с различными эндокринными нарушениями, в том числе 14 – с ожирением и 20 человек добровольцев в возрасте от 7 до 17 лет без нарушений. В общей сложности проведено 380 измерений в группе испытуемых, имеющих отклонения в работе эндокринной системы, при этом для каждого пациента получено от 10 до 20 легколетучих профилей состояния организма в контролируемых временных точках в момент прохождения стационарного лечения. Для трех пациентов исследования проводили с периодичностью 1 год (2019, 2020 и 2021 гг.). Для каждого человека из группы добровольцев без установленных нарушений легколетучий профиль измеряли на каждой руке с 3-кратным повторением в разных состояниях (до, после приема пищи).

Коммерческий набор сенсоров Bio[®] предварительно обучали по индивидуальным веществам, которые могут свидетельствовать о нарушениях согласно табл. 1, а также учитывали характеристики чувствительности и селективности, установленные ранее для других биопроб [41].

Исследования поддержаны этическим комитетом ВГМУ им. Бурденко и родителями детей при их госпитализации в письменных согласиях в ВДКБ. Добровольцы также подписывали соглашение о добровольном участии в эксперименте.

Стандартные клинические лабораторные исследования. Всем испытуемым на базе клинической лаборатории ВДКБ ВГМУ им. Н.Н. Бурденко проводили стандартные исследования: получали биохимические показатели крови на анализаторе BS-120, выполняли общий анализ мочи и общий анализ крови, проводили глюкозотолерантный тест, определяли половые гормоны и гормоны, вырабатываемые щитовидной железой.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе эксперимента полученные данные электронного носа – диагноста для летучего профиля соединений кожи детей, страдаю-

Таблица 2. Результаты корреляционного анализа аналитической информации “электронного носа – диагноста” и стандартных клинических лабораторных исследований

Сравниваемые параметры	Левое предплечье		Правое предплечье	
	коэффициент корреляции	коэффициент детерминации R^2	коэффициент корреляции	коэффициент детерминации R^2
$\alpha_{120/60}$ и уровень мочевины	0.79	0.62	0.47	0.22
$\alpha_{60/80}$ и уровень мочевины	-0.81	0.65	-0.64	0.42
$A_{1/2}$ и уровень щелочной фосфатазы	-0.82	0.64	-0.81	0.66
$A_{1/6}$ и уровень щелочной фосфатазы	-0.74	0.54	-0.92	0.84
$A_{5/6}$ и уровень глюкозы	0.82	0.67	0.82	0.66
$A_{5/7}$ и уровень глюкозы	0.75	0.53	0.80	0.63

щих ожирением, проверяли на возможную корреляцию с результатами стандартных клинических методов исследования. Для этого создали базу данных для 14 детей с ожирением, исследуемых в течение двух лет во время плановых госпитализаций. В базу включили различные параметры электронного носа, характеризующие сорбцию на массиве восьми сенсоров, и результаты лабораторных исследований. Газовый профиль кожи детей изучали на левом и правом предплечьях, которые связаны с сердечно-сосудистой системой и органами с левой стороны тела (левая рука) и органами, расположенными справа, в частности, приоритетно – с желчным пузырем, печенью, кишечником, двенадцатиперстной кишкой. Корреляцию параметров ЭНД и результатов клинических исследований оценивали с учетом данных особенностей по 52 параметрам носа-диагноста и 23 различным показателям клинических исследований. В качестве новых параметров, отражающих особенность природы летучих молекул, предложено применять кинетические параметры процесса сорбции и десорбции для конкретного сенсора в наборе с фазой гидроксипатита – $\alpha_{120/60}$, $\alpha_{60/80}$ [42]. С физической точки зрения параметры показывают во сколько раз изменяется скорость сорбции для нагрузки в течение 60 и 80 с и при самопроизвольной десорбции через 120 с от начала исследования.

При помощи программного обеспечения THE UNSCRAMBLER X V.10.4 оценили результаты оценки корреляции (табл. 2). Установили, что при детектировании летучего профиля кожи на левой руке наиболее значимая корреляция наблюдается между кинетическими параметрами сорбции на модификаторе пьезосенсора с чувствительным слоем ГА $\alpha_{120/60}$, $\alpha_{60/80}$ и уровнем мочевины в крови, полученным биохимическим методом анализа. При детектировании летучего профиля кожи на правой руке пациентов установлена максимальная корреляция между качественными параметрами сорбции $A_{1/2}$, $A_{1/6}$, которые

рассчитывали по максимальным сигналам сенсоров с МУНТ_{соон} разной массы (сенсоры 1 и 7), нитратом оксида циркония (сенсор 2), ПЭГСк (сенсор 6), и уровнем щелочной фосфатазы (обратная сильная корреляционная связь). Кроме того, установлена корреляция между параметрами $A_{5/6}$, $A_{5/7}$ (соответственно учитывали отклики сенсора с ГА – сенсор 5) и уровнем глюкозы в крови, полученным при биохимическом анализе крови (прямая сильная корреляционная связь). Это позволило судить о качественной связи между информацией электронного носа – диагноста и некоторыми стандартными клинико-диагностическими лабораторными исследованиями. Установили, что нельзя количественно определить уровень мочевины, щелочной фосфатазы и глюкозы в крови по сигналам электронного носа, поскольку установленный коэффициент корреляции не соответствует критериям проведения количественного анализа, можно установить только качественную зависимость. Такие связи являются значимыми для получения первичной информации об изменениях этих показателей в условиях стационара в течение суток, при этом расчет всех показателей осуществляется по одному–двум измерениям в течение 5 мин без забора крови.

На втором этапе исследования осуществляли моделирование данных и оценку возможности ранжирования проб (пациентов) на классы диагнозов по информации электронного носа с набором сенсоров Bio[©].

Для классификации проб в соответствии с диагнозом разбили их на две группы: обучающая выборка (197 измерений) и проверочная выборка (77 измерений), в которые вошли данные о сканировании летучих соединений кожи пациентов без ожирения и с диагнозами ожирение, сахарный диабет (СД) 1 и 2 типа эндокринологического отделения.

Пробы обучающей выборки разбили на три группы с метками: “Норма”, “Ожирение с груп-

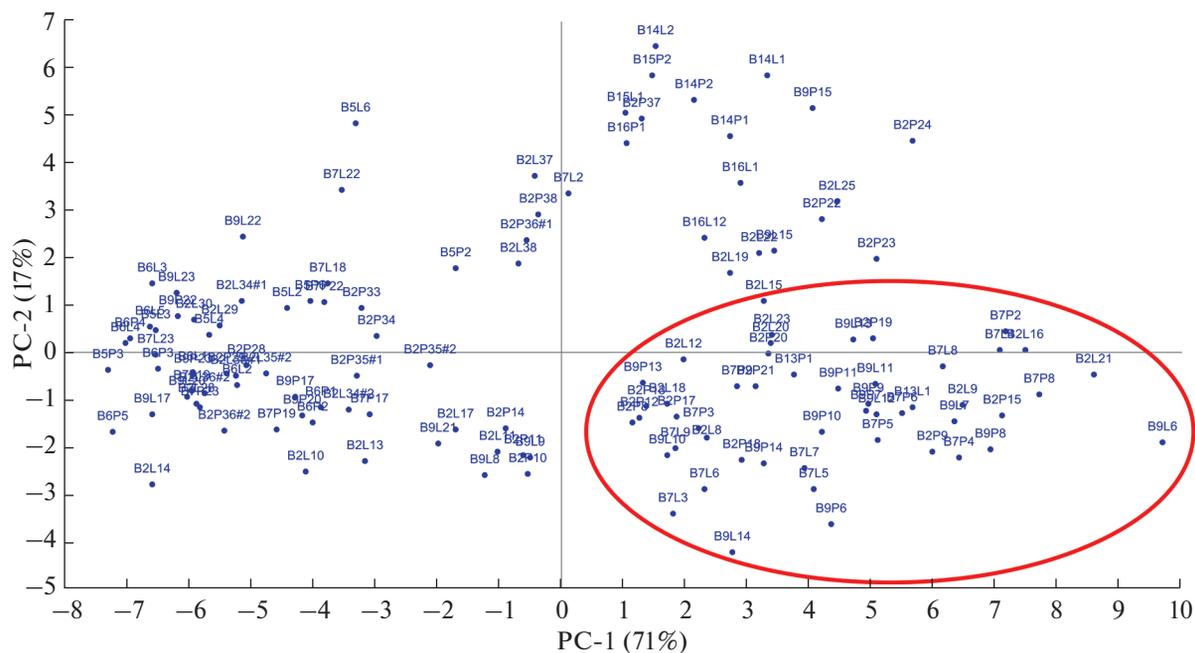


Рис. 3. График счетов проб всей обучающей выборки (132 пробы) без учета времени принятия пищи и точки измерения (левое/правое предплечье).

пой риска развития СД 2 типа” и “СД 1 типа”. При этом в выборку не включали данные при экстремальном отклике организма в момент измерения, когда человеку было жарко, и когда он испытывал волнение, стресс.

Построили МГК-модель по всем 34 параметрам электронного носа — диагноста (рис. 3). По графику счетов видно, что пробы делятся на две группы: пробы газового профиля пациентов в первой половине стационарного лечения и пробы во второй половине лечения (рис. 3). Для диагностических целей важна именно область первой половины стационарного лечения, поэтому построили МГК-модель именно для этой части проб выборки, а также установили наиболее информативные параметры электронного носа, которые смогут ранжировать пробы на установленные ранее классы.

В ходе оптимизации МГК-модели для более четкого деления проб на группы по схожим признакам установили, что наибольшее влияние на ранжирование проб оказывают параметры, рассчитанные по всем сигналам сенсоров в массиве Bio[®]: $A_{1/5}$, $A_{1/8}$, $A_{2/5}$, $A_{2/6}$, $A_{2/8}$, $A_{3/5}$, $A_{4/5}$, $A_{6/8}$, $A_{7/8}$, ω_3 , ω_4 , ω_5 , ω_8 .

Согласно основному диагностическому правилу для исключения влияния пищи на результаты анализа практически для всех исследований биопробы отбираются натощак, поэтому из выборки всех данных исключили результаты сканирования газового профиля кожи, полученные после еды. Также учитывали ранжирование отдель-

но для левого и правого предплечий с учетом их связи с внутренними органами и системами организма (рис. 4а, 4б).

Из графиков счетов, полученных при ранжировании результатов на группы натошак, видно, что разделение на группы лучше происходит по профилю соединений правого предплечья (рис. 4б). С высокой надежностью разделены группы “Норма”, “СД 1 типа” и “Ожирение с группой риска по развитию СД 2 типа”.

Аналогичные модели для иных состояний пациентов (после еды и принятия медикаментов) не позволяют получить надежного ранжирования результатов на группы. Пробы попадают в группу “норма”, потому что перед измерением пациенты получили медикаменты (таблетки, капли), которые компенсировали состояние, метаболические сбои и приблизили их к условной норме, в другую группу вместе попали результаты для пациентов с сахарным диабетом 1 типа и пациента с гормональным расстройством. Выбор стороны сканирования (левая/правая) не улучшил ситуацию. Таким образом, наилучшее ранжирование проб на группы происходит при исследовании газового состава смеси молекул, выделяемых кожей на правом предплечье, натощак или спустя 2–3 ч после приема пищи.

Для проверки полученной модели использовали другую выборку данных. Для каждой группы ранжирования создали МГК-модель и осуществили прогнозирование возможного диагноза у пациентов методом SIMCA (табл. 3). В ходе про-

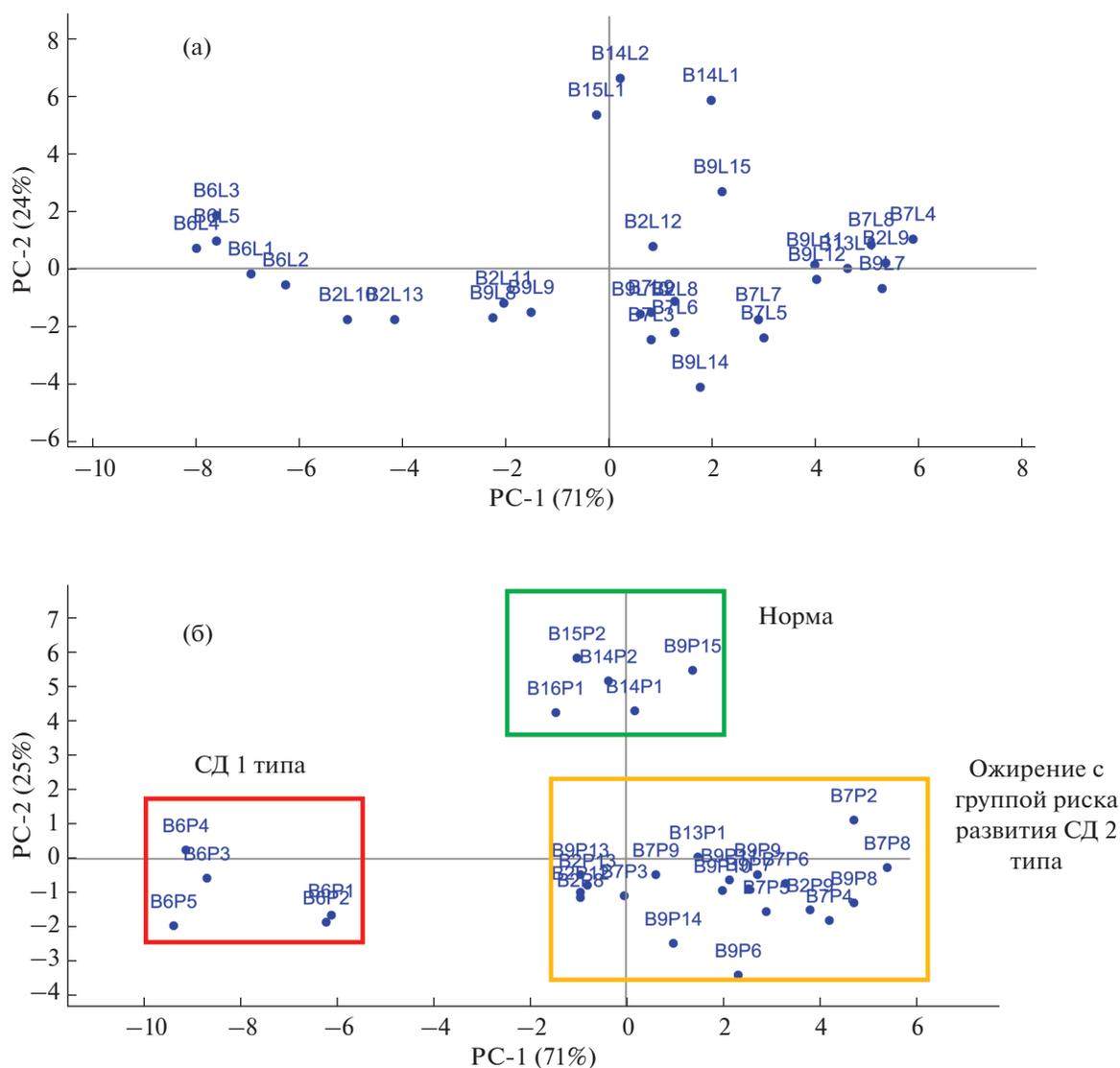


Рис. 4. Графики счетов для параметров “электронного носа – диагноста” при сканировании летучих соединений кожи на левом (а) и правом (б) предплечье, выполненном натощак.

верки полученной модели установили, что все пациенты, имеющие отклонения в протекании метаболических процессов организма, не попали в группу “норма”. Нет ложноотрицательных результатов, что очень важно для диагностических методов, так как такие ошибки могут привести к тяжелым последствиям и позднему обнаружению проблемы, когда помочь человеку уже сложнее. При этом не решена задача как можно более ранней диагностики отклонений (превентивная диагностика). Доля ложноположительных результатов ранжирования составляет 20%. Ошибка связана с небольшой проверочной выборкой и вызвана сильным влиянием на отнесение к группе воспалительного процесса в организме двух пациентов из выборки. При этом в группу “СД 1 типа” отнесены профили пациентов с отсутстви-

ем этого диагноза, но со сложным нарушением метаболического пути (ожирение 3 степени, риск развития СД 2 типа). Это, строго говоря, не является ошибкой с точки зрения установления функциональных нарушений и их тяжести и может объясняться наличием в пробах одинаковых летучих биомолекул, выделяемых кожей (неспецифические маркеры).

Определили летучие соединения – маркеры состояния, которые способны выделяться при различных отклонениях в работе организма. Для этого спроецировали данные по сорбции паров тест-веществ на построенную МГК-модель обучающей и проверочной выборки (рис. 5). Так, надежно установили, что у пациента В6 выделяется этандиаль (глиоксаль). При этом его выделение фиксируется практически во всех точках испыта-

Таблица 3. Результаты ранжирования на группы результатов сканирования летучих соединений кожи пациентов из проверочной выборки методом SIMCA

№	Шифр	Наиболее вероятное нарушение, предсказанное по модели	Диагноз по результатам клинических исследований
1	B1	Ожирение с группой риска по развитию СД 2 типа	Ожирение 2 степени, группа риска по развитию СД 2 типа
2	B8	Ожирение с группой риска по развитию СД 2 типа	Ожирение 2 степени, группа риска по развитию СД 2 типа
3	B4P4	СД 1 типа	Ожирение 3 степени, группа риска по развитию СД 2 типа
4	B4P7	СД 1 типа	Ожирение 3 степени, группа риска по развитию СД 2 типа
5	B4P10	СД 1 типа	Ожирение 3 степени, группа риска по развитию СД 2 типа
6	B4P11	СД 1 типа	Ожирение 3 степени, группа риска по развитию СД 2 типа
7	B10P2	СД 1 типа	Ожирение 3 степени, группа риска по развитию СД 2 типа
8	B10P4	СД 1 типа	Ожирение 3 степени, группа риска по развитию СД 2 типа
9	B10P9	СД 1 типа	Ожирение 3 степени, группа риска по развитию СД 2 типа
10	B3P5	Ожирение с группой риска по развитию СД 2 типа	Ожирение 2 степени, группа риска по развитию СД 2 типа
11	B3P11	Ожирение с группой риска по развитию СД 2 типа	Ожирение 2 степени, группа риска по развитию СД 2 типа

ния и чаще, чем у других пациентов, что согласуется с поставленным диагнозом пациента В6 и результатами стандартных клинических исследований: диагностирован сахарный диабет 1 типа, маркером которого является, в том числе этандиаль (глиоксаль).

В табл. 4 представлены качественные параметры для веществ-маркеров и газового профиля людей, относящихся к разным группам: сахарный диабет 1 типа, ожирение 3 степени и группа риска по развитию сахарного диабета 2 типа, условная норма. Глиоксаль и молочная кислота, маркеры нарушений углеводного обмена, наиболее часто и с высокой вероятностью выделяются у пациента В6, у которого установлен диагноз – сахарный диабет 1 типа, реже и менее надежно выделение этих маркеров фиксируется у пациента В7 с ожирением 3 степени и находящимся в группе риска по развитию сахарного диабета 2 типа, в группе условной нормы присутствие данных маркеров надежно не зафиксировано.

* * *

Положительно оценена возможность качественного анализа газовой смеси соединений,

выделяемой кожей на предплечье рук, без предварительного разделения и отбора при помощи массива восьми пьезосенсоров “электронного носа – диагноста” (портативная модель). Оценена корреляция информации ЭНД и результатов стандартных клинических лабораторных исследований. Установлены коррелирующие параметры массива сенсоров и клинических исследований, тесно связанные между собой: $\alpha_{120/60}$, $\alpha_{60/80}$ и уровень мочевины, $A_{1/2}$, $A_{1/6}$ и уровень щелочной фосфатазы, $A_{5/6}$, $A_{5/7}$ и уровень глюкозы. Показана возможность применения подхода, основанного на сканировании летучего профиля кожи на предплечье в течение 3–6 мин, для ранжирования детей с ожирением на группы, связанные с важнейшими социально значимыми заболеваниями и состояниями с вероятностью развития сахарного диабета 2 типа и диагнозом сахарный диабет 1 типа. С помощью методов хемометрики оптимизирована методика анализа, обозначены условия исследования и точки контроля. Особенно важной задачей в условиях стационара является неинвазивный и безболезненный, быстрый мониторинг изменений. Для этого может быть исполь-

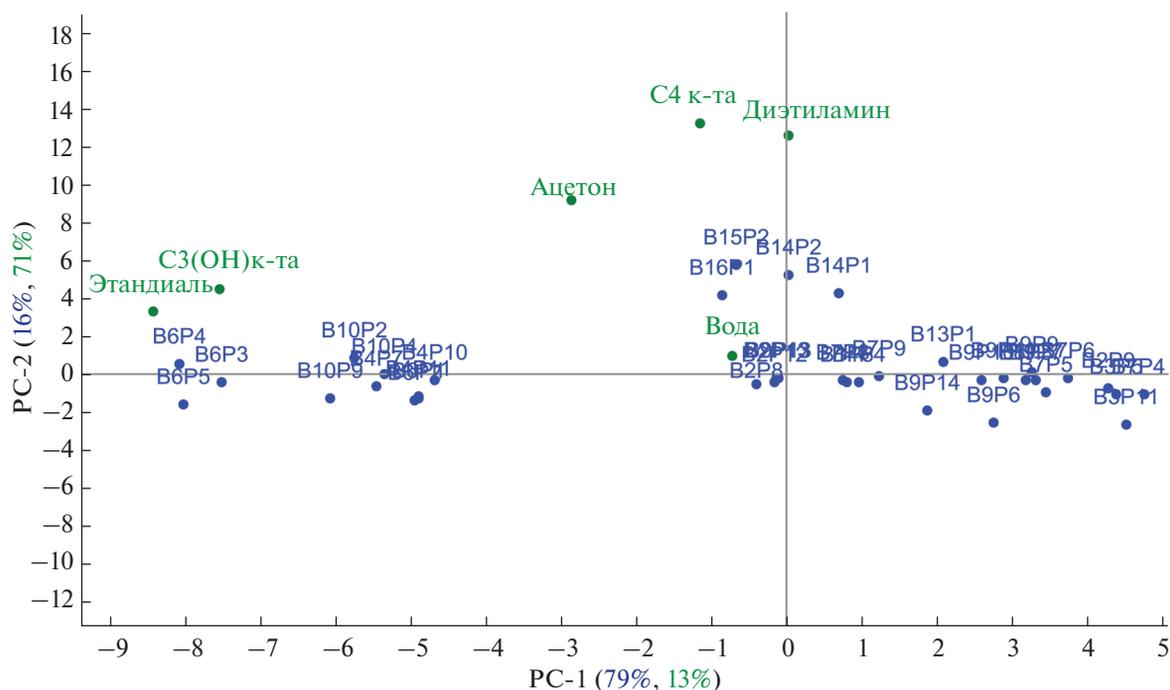


Рис. 5. График счетов, который отображает ранжирование биопроб на группы и возможные летучие органические соединения, выделяемые кожей пациентов.

Таблица 4. Примеры параметров “электронного носа – диагноста” проб

Название пробы	Группа здоровья	Параметры “электронного носа”										
		$A_{1/5}$	$A_{1/8}$	$A_{2/6}$	$A_{2/8}$	$A_{3/5}$	$A_{6/8}$	$A_{7/8}$	ω_3	ω_4	ω_5	ω_8
Глиоксаль		0.18	0.50	0.93	0.70	0.51	0.75	0.40	15.3	18.0	30.0	10.9
Ацетон		0.31	0.56	0.50	0.56	0.63	1.11	1.22	12.9	14.3	20.8	11.7
Пентанол-1		0.62	0.27	0.24	0.12	0.31	0.51	0.93	6.8	11.9	21.5	49.6
Масляная кислота		0.39	0.48	0.65	0.60	0.68	0.92	1.32	11.5	12.0	17.0	13.7
Молочная кислота		0.20	0.50	0.80	0.67	0.52	0.83	0.50	14.9	17.3	28.5	11.2
B6P1	Сахарный диабет 1 типа	0.14	0.48	1.14	0.66	0.65	0.57	0.43	19.7	22.9	30.1	8.70
B6P2		0.14	0.48	1.05	0.64	0.65	0.61	0.41	19.5	23.1	30.1	8.6
B6P3		0.13	0.42	1.02	0.61	0.55	0.59	0.38	17.5	21.8	31.7	9.6
B6P4		0.13	0.41	0.96	0.58	0.55	0.60	0.36	17.3	20.8	31.8	10.1
B6P5		0.11	0.42	0.91	0.61	0.54	0.67	0.39	17.7	22.3	32.7	8.8
B7P1	Ожирение 3 ст., группа риска, сахарный диабет 2 типа	0.13	0.30	1.26	0.37	0.75	0.30	0.21	20.9	24.5	27.7	12.2
B7P2		0.23	0.44	1.05	0.57	1.07	0.54	0.32	21.9	26.5	20.5	10.7
B7P3		0.22	0.62	0.90	0.67	0.85	0.74	0.41	20.9	24.5	24.7	8.6
B7P4		0.25	0.67	0.94	0.70	1.03	0.74	0.49	22.2	26.7	21.7	8.1
B13P1	Условная норма	0.24	0.60	1.0	0.66	0.90	0.66	0.40	20.7	24.8	23.1	9.4
B14P1	Условная норма	0.27	0.49	1.3	0.42	0.87	0.33	0.36	20.3	22.8	23.4	12.8
B14P2		0.27	0.48	1.3	0.43	0.85	0.33	0.35	20.0	21.8	23.5	13.3
B15P2	Условная норма	0.26	0.44	1.3	0.44	0.81	0.33	0.33	19.2	21.4	23.8	14.0
B16P1	Условная норма	0.25	0.41	1.2	0.41	0.79	0.35	0.33	19.7	22.5	24.8	13.1
$\pm \Delta$		0.02	0.02	0.02	0.03	0.03	0.02	0.02	2.0	2.0	2.0	1.0

зован летучий профиль кожи, чему будет посвящена наша следующая статья.

Работа частично выполнена в рамках гранта “УМНИК-2019” з/к №15477ГУ/2020 от 04.07.2020 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Всемирная организация здравоохранения. Вопросы и темы здравоохранения. URL: <https://www.euro.who.int/ru/health-topics> (дата обращения 31.01.2022).
2. *Branca F., Nikogosian H., Lobstein T.* The challenge of obesity in the WHO European Region and the strategies for response. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe, 2007, P. 76.
3. *Dietz W.H.* Health consequences of obesity in youth: Childhood predictors of adult disease // *Pediatrics*. 1998. V. 101. P. 518.
4. *Elgar F.J.* Validity of self-reported height and weight and predictors of bias in adolescents // *J. Adolesc. Health*. 2005. V. 37. P. 371.
5. *Eisenberg M.E., Neumark-Sztainer D., Story M.* Associations of weight-based teasing and emotional well-being among adolescents // *JAMA Pediatrics*. 2003. V. 157. P. 733.
6. Подростковое ожирение и связанное с ним поведение: тенденции и социальные неравенства в Европейском регионе ВОЗ, 2002–2014 годы: наблюдения по итогам совместного межнационального исследования ВОЗ “Поведение детей школьного возраста в отношении здоровья” (HBSC). URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/329418> (дата обращения 14.02.2022).
7. *Раков А.Л.* Глобальная эпидемия ожирения // Новая аптека. Аптечный ассортимент. 2008 № 6. С. 11.
8. *Wilkinson P.W., Parkin J.M.* Fat cells in childhood obesity // *The Lancet*. 1974. p. 1522. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(74\)90266-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(74)90266-9)
9. *Литвицкий П.Ф.* Патофизиология: Учебник: 2-е изд., испр. и доп. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2003 г. Т. 1. С. 739.
10. *Зайко Н.Н., Быць Ю.В., Атаман А.В.* Патологическая физиология: Учебник для студентов мед. вузов / Под ред. Зайко Н.Н., Быць Ю.В. 3-е изд. М.: МЕДпресс-информ, 2002. С. 644.
11. *Giorgio V., Graziano F., Nobili V.* Pediatric nonalcoholic fatty liver disease: Old and new concepts on development, progression, metabolic insight and potential treatment targets // *BMC Pediatr*. 2013. V. 13. P. 40.
12. *Azad K., Parkin J.M., Court S., Laker M.F., Alberti K.G.* Circulating lipids and glycaemic control in insulin dependent diabetic children // *Arch. Dis. Child*. 1994. V. 71. P. 108. <https://doi.org/10.1136/adc.71.2.108>
13. *Daviss B.* Growing pains for metabolomics // *The Scientist*. 2005. V. 19. № 8. P. 25.
14. *Максимова Е.Н., Марков В.Ф., Бездетнова А.Е., Шашмурин Ю.Г., Маскаева Л.Н., Дьяков В.Ф.* Использование химических сенсоров для экспресс-диагностики заболеваний по выдыхаемому воздуху // Бултеровские сообщения. 2019. Т. 60. № 12. С. 25.
15. *Протошак В.В., Андреев Е.А., Карпущенко Е.Г., Слепцов А.В., Овчинников Д.В., Алентьев С.А., Лазуткин М.В., Мамаенко А.В., Мамаенко Т.В.* Рак предстательной железы и обоняние собак: возможности неинвазивной диагностики // *Урология*. 2019. № 5. С. 22.
16. *Балашова Л.М., Колесниченко И.И., Кантаржи Е.П., Коробкова Н.О., Черкашина Е.Л.* Экспресс-скрининг сыворотки крови, слезы и жидкости передней камеры глаза методом мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии в офтальмологии // *Пролиферативный синдром в биологии и медицине*. 2016. С. 95.
17. *Карпищенко С.А., Джагацян И.Э., Лавренова Г.В., Малай О.П., Малышева М.И., Дуйкова М.В., Худяков Е.С., Семенова А.И., Волчек А.О.* Диагностика халитоза у больных хроническим тонзиллитом с помощью мультисенсорного газоанализатора // *Folia ORL et PR*. 2020. Т. 26. № 4. С. 74.
18. *Арсеньев А.В., Нефедов А.О., Ганеев А.А., Новиков С.Н., Нефедова А.В., Барчук А.А., Гагуа К.Э., Тарков С.А., Аристов Н.Ю.* Возможности диагностики рака легких с помощью прямого анализа выдыхаемого воздуха с использованием газовых сенсоров полупроводникового электронного носа // *Исследования и практика в медицине*. 2019. Т. 6. № 5. С. 50.
19. *Агейкин А.В., Колесова Е.В., Пронин И.А., Темников В.А.* “Электронный нос” как прорыв в неинвазивной диагностике заболеваний // *Молодой ученый*. 2015. № 23. С. 308.
20. *Обходский А.В., Попов А.С., Сачков В.И., Обходская Е.В.* Использование нейронных сетей и технологии электронного носа для диагностики онкологических заболеваний / Молодежь и современные информационные технологии / Сборник трудов XVII Международной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, Томск, 17–20 февраля 2020 года. Томск: Национальный исследовательский Томский политехнический университет, 2020. С. 174.
21. *Родионов Е.О., Тузинов С.А., Миллер С.В., Кульбакин Д.Е., Чернов В.И.* Методы ранней диагностики рака легкого // *Сибирский онкологический журнал*. 2020. Т. 19. № 4. С. 112.
22. *Синицына О.В., Мешков Г.Б., Яминский И.В.* “Электронный нос” для медицинских приложений: поиск новых материалов для сенсорных элементов // *Медицина и высокие технологии*. 2016. № 2. С. 40.
23. *Wishart D.S., Tzur D., Knox C.* HMDB: The human metabolome database // *Nucl. Acids Res*. 2007. V. 35. P. 521.
24. *Dhananjayan K., Irrgang F., Muncha G.* Determination of glyoxal and methylglyoxal in serum by UHPLC coupled with fluorescence detection // *Anal. Biochem*. 2019. V. 8. P. 241.
25. *Raman M., Ahmed I., Gillevet P.M., Probert C.S., Ratcliffe N.M., Smith S., Greenwood R.* Fecal microbiome and volatile organic compound metabolome in obese humans with nonalcoholic fatty liver disease // *Clin. Gastroenterol. Hepatol*. 2013. V. 11. P. 868.
26. *Brown D.G., Rao S., Weir T.L., O'Malia J., Bazan M., Brown R.J., Ryan E.P.* Metabolomics and metabolic pathway networks from human colorectal cancers, ad-

- jacent mucosa, and stool // *Cancer Metab.* 2016. V. 6. P. 4.
27. *Sinha R., Ahn J., Sampson J.N., Shi J., Yu G., Xiong X., Hayes R.B., Goedert J.J.* Fecal microbiota, fecal metabolome, and colorectal cancer interrelations // *PLoS One.* 2016. V. 25. P. 1.
 28. *Goedert J.J., Sampson J.N., Moore S.C., Xiao Q., Xiong X., Hayes R.B., Ahn J., Shi J.* Fecal metabolomics: Assay performance and association with colorectal cancer // *Carcinogenesis.* 2014. V. 35. P. 2089.
 29. *Sugimoto M., Wong D.T., Hirayama A., Soga T., Tomita M.* Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles // *Metabolomics.* 2010. V. 6. P. 78.
 30. *Liebich H.M., Woll J.* Serum volatile substances: Profile analysis and quantification // *J. Chromatogr.* 1977. V. 11. № 142. P. 505.
 31. *Garner C.E., Smith S., de Lacy Costello B., White P., Spencer R., Probert C.S., Ratcliffe N.M.* Volatile organic compounds from feces and their potential for diagnosis of gastrointestinal disease // *FASEB J.* 2007. V. 21. P. 1675.
 32. *Ahmed I., Greenwood R., Costello B., Ratcliffe N., Probert C.S.* Investigation of faecal volatile organic metabolites as novel diagnostic biomarkers in inflammatory bowel disease // *Aliment Pharmacol. Ther.* 2016. V. 43. P. 596.
 33. *Marchesi J.R., Holmes E., Khan F., Kochhar S., Scanlan P., Shanahan F., Wilson I.D., Wang Y.* Rapid and noninvasive metabonomic characterization of inflammatory bowel disease // *J. Proteome Res.* 2007. V. 6. P. 546.
 34. *Walton C., Fowler D.P., Turner C., Jia W., Whitehead R.N., Griffiths L., Dawson C., Waring R.H., Ramsden D.B., Cole J.A., Cauchi M., Bessant C., Hunter J.O.* Analysis of volatile organic compounds of bacterial origin in chronic gastrointestinal diseases // *Inflamm. Bowel Dis.* 2013. V. 19. P. 2069.
 35. *Bjerrum J.T., Wang Y., Hao F., Coskun M., Ludwig C., Gunther U., Nielsen O.* Metabonomics of human fecal extracts characterize ulcerative colitis, Crohn's disease and healthy individuals // *Metabolomics.* 2015. V. 11. P. 122.
 36. *Bain M.A., Faull R., Milne R.W., Evans A.M.* Oral L-carnitine: Metabolite formation and hemodialysis // *Curr. Drug Metab.* 2006. V. 7. P. 811.
 37. *Azario I., Pievani A., Del Priore F., Antolini L., Santi L., Corsi A., Cardinale L.* Neonatal umbilical cord blood transplantation halts skeletal disease progression in the murine model of MPS-I // *Sci. Rep.* 2017. V. 25. № 7. P. 73.
 38. *Kuchmenko T.A., Lvova L.B.* A Perspective on recent advances in piezoelectric chemical sensors for environmental monitoring and foodstuffs analysis // *Chemosensors.* 2019. V. 7. № 3. P. 39.
 39. *Кучменко Т.А., Доровская Е.С., Менжулина Д.А., Умарханов Р.У.* Мобильное устройство на основе массива сенсоров для анализа биопроб малого объема. Патент на изобретение 2764964 С1 РФ, 24.01.2022. Заявка № 2021110885 от 16.04.2021.
 40. *Кучменко Т.А., Шуба А.А., Умарханов Р.У., Черницкий А.Е.* Оценка корреляции сигналов “электронного носа” для носовой слизи и конденсата выдыхаемого воздуха телят с клиническими и лабораторными показателями // *Аналитика и контроль.* 2019. Т. 23. № 4. С. 557.
<https://doi.org/10.15826/analitika.2019.23.4.014>
 41. *Кучменко Т.А., Доровская Е.С., Босикова Ю.Н., Сметанкина А.В., Битюкова В.В.* Применение “электронного носа” на пьезосенсорах для сканирования летучих соединений гинекологических проб // *Журн. аналит. химии.* 2021. Т. 76. № 7. С. 634. (*Kuchmenko T.A., Dorovskaya E.S., Bosikova Y.N., Smetankina A.V., Bitjukova V.V.* Application of an electronic nose based on piezoelectric sensors for scanning volatile compounds of gynecological tests // *J. Anal. Chem.* 2021. V. 76. № 7. P. 868.)
 42. *Кучменко Т.А., Умарханов Р.У., Менжулина Д.А.* Биогидроксипатит – новая фаза для селективного микровзвешивания паров-маркеров воспаления в носовой слизи телят и человека. Сообщение 2. Анализ реальных объектов // *Сорбционные и хроматографические процессы.* 2021. Т. 21. № 2. С. 216.
<https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2021.21/3355>

УДК 543.63

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕНЗОАТА НАТРИЯ В ЖИДКОСТЯХ ПЬЕЗОЭЛЕКТРИЧЕСКИМ СЕНСОРом, МОДИФИЦИРОВАННЫМ МОЛЕКУЛЯРНО-ИМПРИНТИРОВАННЫМ ПОЛИМЕРом

© 2022 г. А. Н. Зяблов^{а, *}, Ву Хоанг Иен^{а, б}^аВоронежский государственный университет, химический факультет
Университетская пл., 1, Воронеж, 394018 Россия^бПищевой промышленный университет Хошмина, факультет пищевой технологии
Ле Чонг Тан, 140, Хошимин, 72009 Вьетнам

*e-mail: alex-n-z@yandex.ru

Поступила в редакцию 19.10.2021 г.

После доработки 14.07.2022 г.

Принята к публикации 14.07.2022 г.

Пьезоэлектрический сенсор модифицировали селективным материалом на основе молекулярно-импринтированного полимера (МИП) с отпечатком бензоата натрия (E211). Для оценки способности распознавать целевые молекулы рассчитали величины импринтинг-фактора и коэффициента селективности сенсора с МИП-E211. Сравнили результаты определения бензоата натрия в жидкостях пьезоэлектрическим сенсором и методом ВЭЖХ. Относительное стандартное отклонение результатов определения не превышает 10%. Предел обнаружения бензоата натрия МИП-сенсором составил 2 мг/л. Методом добавок установили отсутствие влияния состава матрицы на величину аналитического сигнала пьезосенсора на основе МИП. С помощью пьезосенсора на основе МИП определили содержание бензоата натрия в безалкогольных напитках (Yes! Fruit, Чай холодный зеленый, AQUA minerale “Мята-Лайм”).

Ключевые слова: бензоат натрия, полиимид, молекулярно-импринтированный полимер (МИП).

DOI: 10.31857/S0044450222120192

Консерванты широко используются в качестве добавок в пищевых продуктах, косметике, фармацевтике и др. для предотвращения или замедления роста микробов (дрожжей, плесневых грибов, бактерий и др.) или протекания нежелательных химических изменений, тем самым увеличивая срок хранения этих продуктов [1]. К наиболее часто применяемым в пищевых продуктах консервантам относятся сахар, соль, бензойная и сорбиновая кислоты и их соли, нитраты и нитриты и др. Эти соединения обладают эффективным противомикробным действием в пищевых продуктах с низким значением рН и практически неэффективны в пищевых продуктах со значениями рН, близкими к 7 [2, 3].

Поскольку консерванты могут негативно воздействовать на организм человека, их содержание в пищевых продуктах регламентировано Таможенным союзом [4]. Так, предельно допустимая концентрация (ПДК) бензойной кислоты и ее солей в безалкогольных напитках составляет 150 мг/л. Следует также отметить, что бензойная кислота и ее соли являются аллергенами и могут

вызывать у чувствительных людей кожную сыпь, астму и др. [5, 6].

Для определения консервантов в пищевых продуктах применяют, как правило, спектральные, хроматографические и электрохимические методы. Однако они требуют сложной пробоподготовки, применения громоздкого и дорогостоящего оборудования и занимают длительное время. В некоторых случаях анализ проводят во внелабораторных условиях, поэтому актуальна разработка и совершенствование экспресс-методов. В связи с этим перспективными являются сенсорные системы и, в частности, пьезосенсоры, характеризующиеся низким пределом обнаружения, миниатюрностью, простотой эксплуатации, экономичностью и не требующие специальной подготовки оператора [7]. Для создания селективных сенсоров поверхность их электродов модифицируют различными материалами [8], среди которых особый интерес представляют молекулярно-импринтированные полимеры (МИП) [9]. Пьезосенсоры, модифицированные такими полимерами, способны распознавать в многокомпонентном растворе молекулы того вещества, ко-

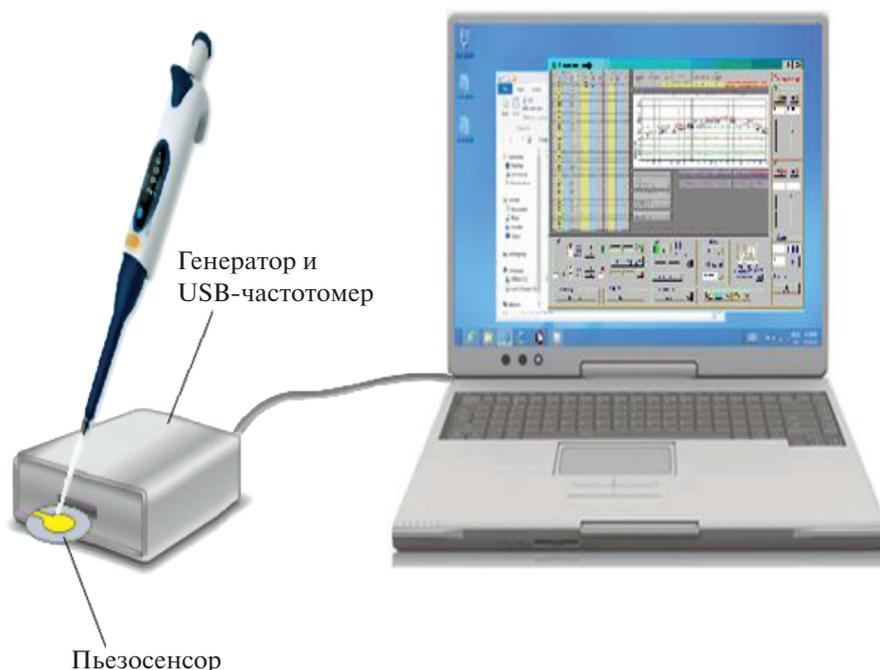


Рис. 1. Схема установки для определения бензоата натрия.

торое использовали в качестве шаблона при синтезе МИП [10–15].

Цель работы – создание селективного пьезосенсора на основе молекулярно-импринтированного полимера и его апробация при определении бензоата натрия в безалкогольных напитках.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использовали пьезоэлектрические кварцевые резонаторы АТ-среза с серебряными электродами диаметром 5 мм (ОАО “Пьезокварц”, Москва) с номинальной резонансной частотой 4.608 МГц. Поверхность электродов модифицировали молекулярно-импринтированным полимером с отпечатком бензоата натрия (МИП-Е211). Для этого на поверхность электродов наносили предполимеризационную смесь, содержащую сополимер диангирида 1,2,4,5-бензолтетракарбоновой кислоты с 4,4'-диаминодифенилоксидом (ОАО МИПП НПО “Пластик”, Москва) и темплат – бензоат натрия в смеси вода–этанол (2 : 1). Далее проводили термоимидизацию полученной смеси в сушильном шкафу в два этапа: при 80°C в течение часа, затем в течение 30 мин при 120°C. После этого сенсоры охлаждали до комнатной температуры, экстрагировали темплат из полимерной пленки дистиллированной водой и сушили сенсоры в течение часа при 50°C. В аналогичных условиях, но без добавления темплата получали чистый полиимид – полимер сравнения [16, 17]. Масса полученных пленок на электродах составляла 22.88 ± 2.79 мкг.

Установка для определения бензоата натрия в жидких средах состояла из USB-частотомера MP732, портативного генератора и пьезоэлектрического сенсора (рис. 1) [18].

Определение проводили методом градуировочного графика. Для этого готовили стандартный раствор бензоата натрия (99%, Ningbo Wanglong Tech, Китай) по точной навеске, а затем из стандартного раствора методом последовательного разбавления получали серию растворов с концентрациями 0.5, 1, 5, 50, 100, 250 и 500 мг/л.

Методика измерения: сенсор фиксировали в горизонтальном положении, регистрировали показания частотомера на воздухе (исходные значения частоты колебаний сенсора без нагрузки), затем на поверхность электрода наносили 1 мкл холостой пробы (дистиллированной воды), регистрировали частоту колебаний сенсора (f_1 , Гц), удаляли воду фильтровальной бумагой, ожидали 5–10 с до стабилизации показаний сенсора на воздухе, после чего наносили 1 мкл анализируемого раствора и регистрировали сигнал (f_2 , Гц). Сигнал считывали через каждую секунду, регистрируя 10 значений, после чего раствор удаляли фильтровальной бумагой и сенсор промывали дистиллированной водой. В случае стандартных растворов измерения проводили, начиная с минимальных концентраций.

Относительный сдвиг частоты Δf вычисляли по уравнению:

$$\Delta f = f_1 - f_2, \quad (1)$$

где f_1 – частота колебаний сенсора с дистиллированной водой, кГц; f_2 – частота колебаний сенсора с анализируемым раствором, кГц.

После измерения сенсор промывали дистиллированной водой и сушили в сушильном шкафу при 50°C в течение часа для возвращения частоты колебания пьезосенсора к исходным значениям [19].

Для оценки способности распознавать молекулы-шаблоны пьезосенсоров с МИП рассчитывали значение импринтинг-фактора (IF):

$$IF = \frac{\Delta f_{\text{МИП}}}{\Delta f_{\text{ПС}}}, \quad (2)$$

где $\Delta f_{\text{МИП}}$ – сигнал пьезосенсора на основе МИП, кГц; $\Delta f_{\text{ПС}}$ – сигнал пьезосенсора на основе полимера сравнения, кГц.

Коэффициент селективности (k) определяемого консерванта по отношению к родственным соединениям рассчитывали по уравнению:

$$k = \frac{\Delta f_{\text{МИП1}}}{\Delta f_{\text{МИП2}}}, \quad (3)$$

где $\Delta f_{\text{МИП1}}$ – разностная частота колебаний сенсора с отпечатками бензоата натрия в растворе постороннего консерванта, кГц; $\Delta f_{\text{МИП2}}$ – разностная частота колебаний сенсора с отпечатком бензоата натрия в его растворе, кГц.

Для оценки влияния матрицы объекта (сока) на величину аналитического сигнала использовали метод добавок [20]. Неизвестную концентрацию определяемого консерванта рассчитывали по формуле:

$$c_x = \frac{\Delta f_x V_{\text{доб}} c_{\text{доб}}}{\Delta f_{x+\text{доб}} V_{\text{доб}} + (\Delta f_{x+\text{доб}} - \Delta f_x) V_x}, \quad (4)$$

где Δf_x , $\Delta f_{x+\text{доб}}$ – разностная частота колебаний сенсора при контакте с анализируемым раствором и анализируемым раствором с известной добавкой бензоата натрия соответственно; $V_{\text{доб}}$, $c_{\text{доб}}$ – соответственно объем и концентрация добавленного раствора бензоата натрия; V_x – объем анализируемого раствора.

Апробацию полученного сенсора проводили на безалкогольных негазированных напитках “Yes! Fruit” со вкусом персика (ООО “Лидер”), “Чай холодный зеленый” (ООО “Здоровые продукты”), “AQUA minerale” со вкусом мяты и лайма (ООО “Пепсико Холдинг”).

В качестве референтного выбрали метод ВЭЖХ. Использовали прибор Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, CA, USA); колонку Zorbax Extend-C18 (Rapid Resolution HT 2.1 × 50 мм, 1.8 мкм) в комплексе Agilent 1260 Infinity. В качестве подвижной фазы применяли смесь ацетонитрила и 1%-ного формиатного буферного раствора (30 : 70) при pH 4.3. Для определения бензоата натрия использовали УФ-детектор при $\lambda = 227$ нм. Температура термостата коло-

нок 25°C. Объем ижектируемой пробы 1 мкл. Скорость потока 0.4 мл/мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получили линейные градуировочные графики с высоким коэффициентом детерминации. Градуировочный график для сенсора с МИП-E211 описывается уравнением $\Delta f_{\text{МИП}} = -(0.1156 \pm 0.0133)c + (0.4102 \pm 0.0078)$, $R^2 = 0.98$. Для сенсора с полимером сравнения линейная зависимость не наблюдается. Для построения градуировочного графика оценили коэффициенты a , b по критерию Стьюдента ($n = 5$, $P = 0.95$), относительное стандартное отклонение s_r не превышало 10%.

При синтезе молекулярно-импринтированных полимеров возникают полости, комплементарные молекуле-шаблону по размеру, форме и расположению функциональных групп, поэтому одной из характеристик МИПов является их способность распознавать целевые молекулы [9].

Для оценки избирательности полученных сенсоров с МИП рассчитали величины импринтинг-фактора и коэффициенты селективности. Импринтинг-фактор сенсора с МИП-211 имеет значение $IF = 4.5$, что свидетельствует о его более высокой избирательности к бензоату натрия, чем у полимера сравнения. Установлены высокие значения коэффициента селективности для сенсора с МИП при определении бензоата натрия, который использовали в качестве шаблона при синтезе МИП. При этом коэффициент селективности сенсора с МИП-E211 по отношению к бензойной кислоте (E210) равен 0.22, сорбату калия (E202) – 0.17, сорбиновой кислоте (E200) – 0.18, что свидетельствует об избирательности сенсора с МИП к бензоату натрия.

Установили метрологические характеристики способа определения бензоата натрия сенсорами на основе МИП: диапазон определяемых концентраций составил 5–500 мг/л, предел обнаружения (c_{min}) бензоата натрия – 2 мг/л, относительное стандартное отклонение не превышает 10%.

Правильность определения бензоата натрия в модельных растворах пьезосенсором, модифицированным МИП-E211, контролировали методом введено–найдено (табл. 1).

Таблица 1. Результаты (мг/л) определения бензоата натрия в модельных растворах методом введено–найдено сенсором с МИП-E211 ($n = 5$, $P = 0.95$)

Введено	Найдено	s_r , %
25.0	25.3 ± 2.1	6.5
50.0	51.8 ± 4.3	6.6
100.0	100.2 ± 4.7	3.8

Таблица 2. Определение бензоата натрия в безалкогольных напитках методом ВЭЖХ и разработанным сенсором ($n = 5$, $P = 0.95$)

Напиток	ВЭЖХ		Сенсор МИП-E211	
	c , мг/л	s_r , %	c , мг/л	s_r , %
Yes! Fruit	127.7 ± 7.1	4.5	134.5 ± 4.0	2.4
Чай холодный зеленый	143.0 ± 2.2	1.2	146.4 ± 5.5	3.0
AQUA minerale “Мята-Лайм”	134.9 ± 3.6	2.1	129.4 ± 8.5	5.3

Таблица 3. Сравнение средних значений двух серий данных по определению бензоата натрия методом ВЭЖХ и пьезосенсорным способом по критериям Фишера и Стьюдента [21] ($n = 5$, $P = 0.95$, $F_{\text{табл}} = 6.39$, $t_{\text{табл}} = 2.306$)

Метод определения	c , мг/л	s^2	F	s_p	$t \pm$
Yes! Fruit					
ВЭЖХ	127.7 ± 7.1	32.97	3.26	4.64	2.298
Сенсор МИП-E211	134.5 ± 4.0	10.12			
Чай холодный зеленый					
ВЭЖХ	143.0 ± 2.2	3.12	6.21	3.35	1.603
Сенсор МИП-E211	146.4 ± 5.5	19.36			
AQUA minerale “Мята-Лайм”					
ВЭЖХ	134.9 ± 3.6	8.35	5.60	5.25	1.656
Сенсор МИП-E211	129.4 ± 8.5	46.73			

Сенсор с МИП-211 апробировали при определении бензоата натрия в безалкогольных напитках (табл. 2). Результаты, полученные сенсором с МИП-211 и методом ВЭЖХ, хорошо согласуются. С использованием критерия Фишера (F -тест) [21] (табл. 3) установили, что воспроизводимости результатов, полученных этими двумя методами, не имеют значимого различия ($F < F_{\text{табл}}$), т.е. их случайные погрешности являются величинами одного порядка. Сравнение средних значений двух серий данных, проведенное с использованием модифицированного теста Стьюдента (t -тест) [21] (табл. 3), показало, что систематическая погрешность при определении бензоата натрия пьезосенсорным способом отсутствует ($t \pm < t_{\text{табл}}$). Таким образом, сенсор с МИП-211 может быть рекомендован для определения бензоата натрия в

безалкогольных напитках. В табл. 4 представлены результаты определения бензоата натрия в безалкогольных напитках, полученные методом добавок. Как видно, состав матрицы напитков не влияет на величину аналитического сигнала пьезосенсора.

Таким образом, пьезоэлектрические сенсоры на основе молекулярно-импринтированных полимеров с отпечатком бензоата натрия обладают хорошей избирательностью при определении бензоата натрия в безалкогольных напитках. Содержание бензоата натрия в напитках “Yes! Fruit”, “Чай холодный зеленый”, “AQUA minerale “Мята-Лайм” составляет 134, 146.4 и 129.3 мг/л соответственно.

* * *

Таблица 4. Результаты определения бензоата натрия (E211) в безалкогольных напитках методом добавок сенсором на основе МИП-E211 ($n = 5$, $P = 0.95$)

Объект анализа	c^* , мг/л	c_x , мг/л	s_r , %
Модельный раствор	100.0	101.7 ± 3.9	3.1
Yes! Fruit	127.7 ± 7.1	137.4 ± 5.9	3.5
Чай холодный зеленый	143.0 ± 2.2	149.1 ± 4.4	2.4
AQUA minerale “Мята-Лайм”	134.9 ± 3.6	130.0 ± 4.4	2.7

* Концентрация установлена методом ВЭЖХ.

Получен пьезосенсор на основе молекулярно-импринтированного полимера с отпечатком бензоата натрия. Показано, что сенсор на основе МИП-E211 имеет высокое значение импринтинг-фактор и коэффициента селективности. Для сенсора на основе МИП-E211 установлено, что диапазон определяемых концентраций составляет 5–500 мг/л, предел обнаружения бензоата натрия равен 2 мг/л. Полученный сенсор апробирован при определении бензоата натрия в безалкогольных напитках. Показано, что содержание консерванта в напитках не превышает ПДК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Silva I M.M., Lidon F.C.* Food preservatives – An overview on applications and side effects // *Emirates J. Food Agricult.* 2016. V. 28. № 6. P. 366.
2. *Qi P., Hong H., Liang X., Liu D.* Assessment of benzoic acid levels in milk in China // *Food Control.* 2009. V. 20. P. 414.
3. *Tfouni S.A.V., Toledo M.C.F.* Determination of benzoic and sorbic acids in Brazilian food // *Food Control.* 2002. V. 13. P. 117.
4. Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств: технический регламент Таможенного союза ТР ТС 029/2012 от 20.07. 2012 г., № 58.
5. *Kumar H., Jha A., Taneja K.K., Kabra K., Sadiq H.M.* A study on consumer awareness, safety perceptions & practices about food preservatives and flavouring agents used in packed/canned foods from South India // *Natl. J. Community Med.* 2013. V. 4. № 3. P. 402.
6. *Inetianbor J.E., Ykubu J.M., Ezeonu S.C.* Effects of food additives and preservatives on man – A review // *Asian J. Sci. Technol.* 2015. V. 6. № 2. P. 1118.
7. *Peter G.* Chemical sensor: An Introduction for Scientists and Engineers. Berlin: Springer, 2007. 273 p.
8. *Лисичкин Г.В., Фадеев А.Ю., Сердан А.А., Нестеренко П.Н., Мингалев П.Г., Фурман Д.Б.* Химия привитых поверхностных соединений. Москва: Физматлит, 2003. 592 с.
9. *Дмитриенко С.Г., Ирха В.В., Кузнецова А.Ю., Золотов Ю.А.* Использование полимеров с молекулярными отпечатками в процессах разделения и концентрирования органических соединений // *Журн. аналит. химии.* 2004. Т. 59. № 9. С. 902.
10. *Malik M.I., Shaikh H., Mustafa G., Bhangar M.I.* Recent applications of molecularly imprinted polymers in analytical chemistry // *Sep. Purif. Rev.* 2018. P. 1. <https://doi.org/10.1080/15422119.2018.1457541>
11. *Зяблов А.Н., Говорухин С.И., Дуванова О.В., Селемнев В.Ф., Нгуен Ань Тьен.* Проточно-инжекционное определение валина пьезокварцевым сенсором, модифицированным полимером с молекулярными отпечатками // *Аналитика и контроль.* 2014. Т. 18. № 4. С. 438. <https://doi.org/10.15826/analitika.2014.18.4.010>
12. *Karaseva N.A., Pluhar B., Beliaeva E.A., Ermolaeva T.N., Mizaiikov B.* Synthesis and application of molecularly imprinted polymers for trypsin piezoelectric sensors // *Sens. Actuators B: Chem.* 2019. V. 280. P. 272. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.10.022>
13. *Sroysee W., Suticha Chunta S., Amatongchai M., Lieberzeit P.A.* Molecularly imprinted polymers to detect profenofos and carbofuran selectively with QCM sensors // *Phys. Med.* 2019. V. 6. P. 1. <https://doi.org/10.1016/j.phmed.2019.100016>
14. *Као Ньят Линь, Дуванова О.В., Зяблов А.Н., Нгуен Ань Тьен.* Применение пьезосенсоров на основе молекулярно-импринтированного полиимида для определения кофеина в чае // *Химия растительного сырья.* 2021. № 2. С. 173. <https://doi.org/10.14258/jcprpm.2021028239>
15. *Дуванова О.В., Зяблов А.Н., Фалалеев А.В.* Проточно-инжекционное определение олеиновой и пальмитиновой кислот модифицированными пьезоэлектрическими сенсорами // *Сорбционные и хроматографические процессы.* 2014. Т. 14. № 4. С. 691.
16. *Зяблов А.Н., Дуванова О.В., Володина Л.В., Селемнев В.Ф., Дьяконова О.В.* Патент РФ № 137946. Заявка от 03.10.2013, опубликован 27.02.2014.
17. *Зяблов А.Н., Дуванова О.В., Володина Л.В., Селемнев В.Ф., Дьяконова О.В.* Патент РФ № 1138636. Заявка от 03.10.2013, опубликован 20.03.2014.
18. *Меренкова А.А., Жужукин К.В., Зяблов А.Н., Бельчинская Л.И.* Определение формальдегида в производственных растворах пьезоэлектрическими сенсорами // *Аналитика и контроль.* 2021. Т. 25. № 2. С. 140.
19. *Дуванова О.В., Кривоносова И.А., Зяблов А.Н., Фалалеев А.В., Селемнев В.Ф., Соколова С.А.* Применение пьезоэлектрических сенсоров для определения олеиновой и пальмитиновой кислот в растительных маслах // *Заводск. лаборатория. Диагностика материалов.* 2017. Т. 83. № 2. С. 18.
20. *Дворкин В.И.* Метрология и обеспечение качества количественного химического анализа. М.: Химия, 2001. 263 с.
21. *Дерффель К.* Статистика в аналитической химии. М.: Мир, 1994. 267 с.

УДК 543.51/54.027/638.166

СООТНОШЕНИЯ СТАБИЛЬНЫХ ИЗОТОПОВ (Н, С, О) В ОБРАЗЦАХ МЕДА ИЗ РАЗНЫХ РЕГИОНОВ РОССИИ

© 2022 г. Д. А. Калашникова^а, *, Г. В. Симонова^а^аИнститут мониторинга климатических и экологических систем Сибирского отделения Российской академии наук
просп. Академический, 10/3, Томск, 634055 Россия

*e-mail: terrezaprk@mail.ru

Поступила в редакцию 20.01.2022 г.

После доработки 09.02.2022 г.

Принята к публикации 09.02.2022 г.

Представлены результаты анализа соотношений стабильных изотопов водорода, кислорода и углерода в образцах меда, отобранных в регионах России с различными климатическими условиями. Значения изотопного состава во всех исследуемых образцах меда варьировали для углерода от -29.5 до -24.2% , для водорода от -116.6 до -34.5% , для кислорода от $+12.7$ до $+25.7\%$. Показано, что величины изотопного состава углерода ($\delta^{13}\text{C}$), водорода ($\delta^2\text{H}$) и кислорода ($\delta^{18}\text{O}$) в меде можно использовать для установления географического происхождения меда. Обнаружено, что средние величины $\delta^2\text{H}$ и $\delta^{18}\text{O}$ в меде в значительной степени коррелируют со средними величинами $\delta^2\text{H}$ и $\delta^{18}\text{O}$ в атмосферных осадках в регионах происхождения меда. На изотопный состав углерода влияет климат. Выявлены три зоны “изотопного ландшафта” для регионов России: самые низкие значения величин $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^2\text{H}$ и $\delta^{18}\text{O}$ характерны для сибирских образцов меда, промежуточные значения соответствовали образцам меда из европейской части России, а самые высокие значения зафиксированы для образцов меда Черноморского региона.

Ключевые слова: изотопная масс-спектрометрия, изотопный состав углерода ($\delta^{13}\text{C}$), изотопный состав водорода ($\delta^2\text{H}$), изотопный состав кислорода ($\delta^{18}\text{O}$), фальсификация меда, географическое происхождение меда.

DOI: 10.31857/S0044450222120076

Мед как продукт натурального происхождения пользуется особым статусом среди потребителей не только как источник энергии, но и благодаря своим свойствам, способствующим укреплению здоровья. Однако в погоне за прибылью недобросовестные пчеловоды и продавцы подделывают натуральный мед дешевыми добавками, вводя в заблуждение потребителей, которые считают, что покупают чистый мед из определенного географического региона. Для подделки меда в основном используют замену или добавление основных компонентов меда, т.е. воды и сахара. В более сложных поддельных образцах меда могут применяться сахарные сиропы, искусственный мед, а также неправильная маркировка в отношении ботанического или географического происхождения [1]. Обычно для установления ботанического и географического происхождения меда определяют физико-химические показатели (например, диастазное число и массовую долю воды), органолептические параметры (например, аромат и вкус), а также проводят пылецевой анализ (меллссопалинологический анализ) [2]. Однако эти методы не позволяют обнаружить незначитель-

ные фальсификации, а в случае контроля географического происхождения они неприменимы, например, когда исследуется уже отфильтрованный мед. В последние годы изотопная масс-спектрометрия становится все более важным инструментом идентификации подлинности пищевых продуктов [3], так как этот метод позволяет выявить фальсификацию или подмену пищевых продуктов даже тогда, когда фальсифицированная продукция по своим физико-химическим свойствам оказывается идентичной оригинальному продукту. Стабильные изотопы в составе пищи являются средством регистрации условий окружающей среды в зоне происхождения продуктов питания [4], поэтому изотопный анализ биоэлементов (Н, С, О, N, S) приобретает все большее значение в определении географического происхождения продуктов питания.

Исследованию изотопного состава меда посвящено много публикаций за рубежом [5, 6]. В рамках Европейского проекта TRACE-006942 “Отслеживание продовольственных товаров в Европе” проведен анализ стабильных изотопов углерода, азота, серы и водорода в белковой фракции

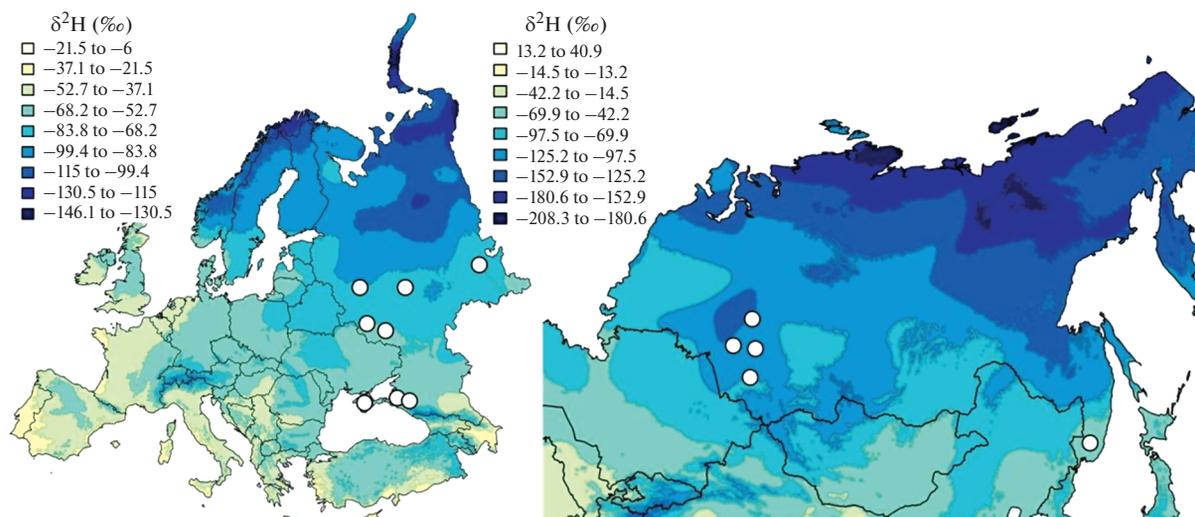


Рис. 1. Зоны отбора образцов меда в ходе данного исследования на карте прогнозируемых среднегодовых значений изотопного состава водорода атмосферных осадков для европейской (справа) и азиатской (слева) частей России [11].

меда, отобранного в 20 регионах Европы [7]. Перспективность использования стабильных изотопов водорода для определения региона происхождения меда при анализе воска, отобранного из меда в сотах, проиллюстрирована в работе американских исследователей [8]. В России подобные исследования единичны [9, 10].

Цель нашего исследования заключалась в проведении комплексного изотопного анализа соотношений изотопов углерода ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$), водорода ($^2\text{H}/^1\text{H}$) и кислорода ($^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) в образцах меда для подтверждения региона его происхождения, опираясь на предположение, что соотношение изотопов водорода и кислорода в растительном нектаре, собранном пчелами, отражает изотопный состав воды, так как растения используют местную воду для производства нектара, изотопный состав которого затем регистрируется непосредственно в меде. Чтобы проверить эту гипотезу, была проанализирована взаимосвязь между изотопным составом образцов меда из регионов России с разными климатическими условиями и регионом происхождения, представленным изотопным составом локальных метеорных вод. Для исключения из исследования поддельных медов, фальсифицируемых добавлением сахаров, полученных из растений с C_4 типом фотосинтеза, предварительно провели изотопный анализ углерода меда и его белковой фракции.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В период с 2019 по 2021 гг. отобрали 98 образцов меда, приобретенных как на медовых ярмарках, так и непосредственно на пасеках, располагающихся в регионах России (рис. 1) с различны-

ми климатическими условиями. Были отобраны монофлерные меда (липовый, рапсовый, акациевый, гречишный), разнотравный мед и мед неизвестного цветочного происхождения. Отобранные образцы меда помещали во флаконы с ограниченным свободным пространством с целью минимизации обмена с парами воды из атмосферы окружающей среды.

Изотопный анализ проводили методом изотопной масс-спектрометрии с использованием изотопного масс-спектрометра DELTA V Advantage (Thermo Fisher Scientific, Германия), совмещенного с элементным анализатором Flash 2000. Приборы предоставлены ТомЦКП СО РАН. Определение изотопного состава общего углерода в меде основано на мгновенном сгорании пробы в окислительно-восстановительном реакторе в потоке гелия при добавлении кислорода (180 мл/мин). Перед измерением образец меда перемешивали до однородности, взвешивали навеску массой 0.45–0.55 мг в оловянном тигле. Запакетованные в тигли образцы в автоматическом режиме с помощью автосамплера попадали в окислительно-восстановительный реактор (рабочая температура 1020°C), где происходило окисление пробы до простых газов (NO_x , CO_2) и воды. В реакторе в потоке гелия (70 мл/мин) продукты разложения проходили через восстановленную медь, при этом оксиды азота превращались в N_2 , а избыток кислорода удалялся. Образовавшиеся газы проходили через ловушку для удаления воды – стеклянную полую трубку, заполненную осушителем (перхлорат магния), попадали в хроматографическую колонку, где выполнялось разделение смеси газов на CO_2 и N_2 ,

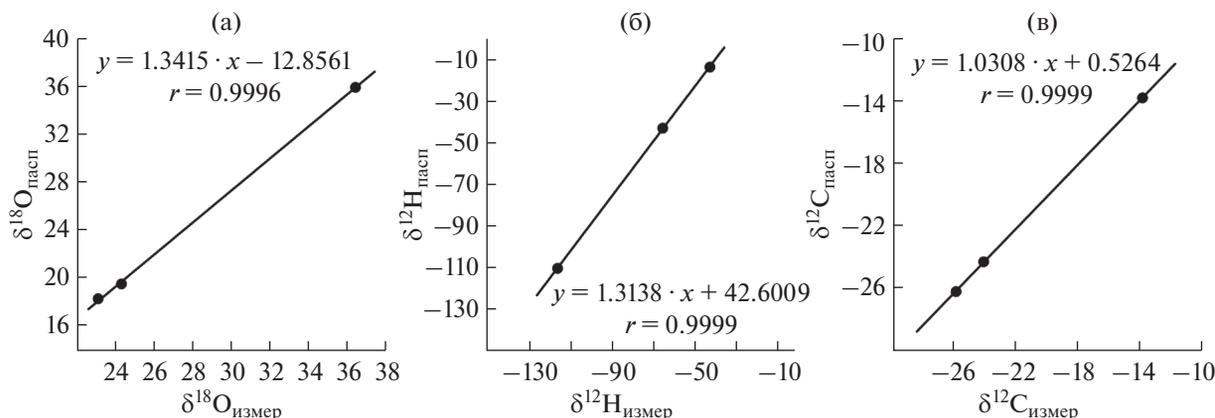


Рис. 2. Примеры градуировочных графиков с уравнениями для стабильных изотопов: кислорода (а), водорода (б) и углерода (в).

которые затем поступали в масс-спектрометр через газораспределительную систему Conflo II.

Для определения величин $\delta^2\text{H}$ и $\delta^{18}\text{O}$ навески меда массой 0.2–0.3 мг взвешивали в серебряных тиглях. Пробы сжигали в пиролизическом реакторе без подачи кислорода при 1350°C. Температуру печи устанавливали 90°C, скорость потока газа-носителя (He) составляла 70 мл/мин. Продукты пиролиза в потоке гелия попадали через хроматографическую колонку в газораспределительную систему (Conflo II) и далее в ионный источник масс-спектрометра. Результаты измерения рассчитывали автоматически с помощью программного комплекса управления прибором и обработки данных.

Изотопный состав δ измеряется в промилле (‰) и определяется по формуле:

$$\delta^{\text{X}} = \left[\frac{R_{\text{образец}} - R_{\text{стандарт}}}{R_{\text{стандарт}}} \right] \times 1000, \quad (1)$$

где $^{\text{X}}$ — это изотопы ^{13}C , или ^2H , или ^{18}O , $R_{\text{образец}}$ и $R_{\text{стандарт}}$ — отношение тяжелого изотопа к легкому в исследуемом образце и стандарте соответственно.

Измеренные величины изотопного состава углерода, кислорода и водорода пересчитывали с использованием градуировочных графиков для определения истинного значения изотопного состава. Для получения уравнения градуировочного графика $y = kx + b$ определяли изотопный состав углерода, кислорода и водорода в международных стандартах меда и муки Геологической службы США (USGS) [12]: USGS82 — международный стандарт тропического Вьетнамского меда со значениями $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = -24.31 \pm 0.08\text{‰}$, $\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}} = +19.44 \pm 0.36\text{‰}$ и $\delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}} = -43.1 \pm 3.7\text{‰}$; USGS83 — международный стандарт меда из прерий Канады со значениями $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = -26.20 \pm$

$\pm 0.08\text{‰}$, $\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}} = +18.13 \pm 0.11\text{‰}$ и $\delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}} = -10.5 \pm 3.5\text{‰}$; USGS90 — международный стандарт пшеничной муки из Тосканы (Италия) со значениями $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = -13.78 \pm 0.06\text{‰}$, $\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}} = +35.90 \pm 0.29\text{‰}$ и $\delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}} = -13.9 \pm 2.4\text{‰}$. На графиках (рис. 2) по оси Y нанесены паспортные значения изотопного состава, а по оси X — измеренные значения. По методу наименьших квадратов определяли величину наклона линии k (“наклон”) и величину свободного члена b — “отрезок”, а также коэффициент детерминации r .

Воспроизводимость результатов изотопного анализа двух повторных измерений составляла: для углерода не более 0.2‰; для кислорода не более 0.6‰; для водорода не более 2‰.

Для статистической обработки данных использовали пакет “Анализ данных” в Microsoft Excel. Основная описательная статистика включала среднее значение (среднее арифметическое), стандартное отклонение (σ), минимум, максимум и размах выборки. Для анализа измеренных значений величин $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^2\text{H}$ и $\delta^{18}\text{O}$ применяли линейный регрессионный анализ.

Для обнаружения подделки меда с помощью растительных сахаров, получаемых из растений с C4 типом фотосинтеза, использовали официально принятый Ассоциацией аналитической химии метод обнаружения с применением изотопной масс-спектрометрии [13], основывающийся на сравнении величин $\delta^{13}\text{C}$ чистого меда и экстрагированной из него белковой фракции. Методика экстрагирования белковой фракции из меда подробно описана в работе [14].

Взаимосвязь между изотопным составом водорода и кислорода метеорных вод и соотношением изотопов водорода и кислорода меда анализировали с помощью интерполированных величин $\delta^2\text{H}$ и $\delta^{18}\text{O}$ метеорных вод, ранее полученных по

Таблица 1. Результаты изотопного анализа меда из разных регионов России

Регион	$\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}, \text{‰}$			$\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}, \text{‰}$			$\delta^{18}\text{O}_{\text{V-SMOW}}, \text{‰}$		
	среднее	σ	<i>N</i>	среднее	σ	<i>N</i>	среднее	σ	<i>N</i>
Томская область	-27.0	0.7	39	-97.6	13.8	9	18.2	0.9	8
Алтайский край	-27.6	1.0	16	-95.8	17.7	9	17.7	2.4	9
Кемеровская область	-27.1	0.5	5	-95.3	12.4	2	14.1	2.0	2
Новосибирская область	-28.2	—	1	-81.7	—	1	14.8	—	1
Республика Башкортостан	-26.5	1.1	7	-67.2	21.3	6	21.7	3.2	6
Калужская область	-27.4	0.1	2	-69.0	8.6	2	20.1	0.1	2
Приморский край	-25.6	0.7	3	-65.2	4.7	3	20.0	2.8	3
Краснодарский край	-25.5	0.8	10	-47.8	16.5	9	23.8	1.2	9
Белгородская область	-25.0	0.1	2	-41.0	7.3	2	25.3	0.6	2
Курская область	-27.4	—	1	-58.3	—	1	21.8	—	1
Республика Адыгея	-25.7	1.3	3	-67.7	17.1	3	21.7	3.8	3
Республика Мордовия	-26.8	—	1	-70.4	—	1	21.2	—	1
Республика Крым	-25.2	—	1	-43.2	—	1	24.8	—	1

сети GNIP (Global Network of Isotopes in Precipitation) для сопредельных территорий с использованием онлайн-калькулятора, размещенного на портале Waterisotopes Database [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 1 представлены измеренные средние значения величин $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^2\text{H}$ и $\delta^{18}\text{O}$ меда со стандартным отклонением и количеством образцов (*N*).

Изотопный состав углерода. Изотопный состав углерода в меде зависит от природных условий, в которых произрастает медоносное растение, от его вида и пути фотосинтеза. Пчелы предпочитают медоносные растения с С3 типом фотосинтеза и очень редко используют растения с С4 и САМ типом фотосинтеза [16]. Диапазон значений величины $\delta^{13}\text{C}$ составляет от -32 до -21‰ для растений с С3 типом фотосинтеза и от -19 до -10‰ для растений с С4 типом фотосинтеза. Эти различия в диапазонах значений изотопного состава углерода используют для обнаружения меда, сфальсифицированного добавлением сахарных сиропов, полученных из сахарного тростника и кукурузы (растения с С4 типом фотосинтеза) [17]. Разница в соотношении стабильных изотопов углерода между медом и его белковой фракцией позволяет выявить фальсификацию меда с использованием растительных сахаров, получаемых из растений с С4 типом фотосинтеза. Для исключения из последующих анализов поддельных медов из всех образцов меда выделили белковую фракцию и проанализировали ее изотопный состав углерода. Для чистого (неподдельного) меда значения величины $\delta^{13}\text{C}$ варьировались от -29.5

до -24.2‰ , а для его белковой фракции от -29.1 до -24.3‰ . Значения величины $\delta^{13}\text{C}$ всех образцов чистого меда $< -23\text{‰}$; разница величин $\delta^{13}\text{C}$ между медом и экстрагированной из него белковой фракцией менее 1‰ . В то же время для фальсифицированного меда величина $\delta^{13}\text{C}$ варьировалась от -28.7 до -22.3‰ , а диапазон значений величины $\delta^{13}\text{C}$ для белковой фракции составил от -30.5 до -24.2‰ . Разница величин $\delta^{13}\text{C}$ между поддельным медом и экстрагированной из него белковой фракцией варьировалась от 1.1 до 2.5‰ . Процент содержания сахара, полученного из растений с С4 типом фотосинтеза, составил от 6.4 до 13.1% . Таким образом, из 98 образцов меда 7 образцов оказались поддельными и были исключены из дальнейшего анализа.

Изотопный состав углерода в меде позволяет не только определить фальсификацию меда с использованием сахарных сиропов, полученных из растений с С4 типом фотосинтеза, но и выявить неправильную маркировку в отношении географического происхождения меда. Легкий изотопный состав углерода в меде можно ожидать для регионов с низкими средними температурами и более высокой влажностью воздуха, а с уменьшением влажности и ростом температуры происходит утяжеление изотопного состава углерода в растениях [18] и, как следствие, в нектаре медоносных растений и меде.

На рис. 3 представлены результаты определения изотопного состава углерода в меде из разных регионов России. Измеренные значения величины $\delta^{13}\text{C}$ изменялись от -29.5 до -24.4‰ . Наибольший разброс значений величины $\delta^{13}\text{C}$ (3.2‰) зафиксирован в образцах Алтайского меда, что

можно объяснить большим количеством разных видов меда с разными сроками сбора и, следовательно, с разными диапазонами температур атмосферного воздуха в период сбора нектара, ведущими к разным значениям величины $\delta^{13}\text{C}$. Также широкий разброс значений величины $\delta^{13}\text{C}$ образцов меда из одного географического региона обусловлен разными климатическими условиями даже на небольших расстояниях. Например, в Алтайском крае на расстоянии всего в 200–300 км расположены степная зона с сухим и засушливым климатом и предгорья Алтая с более прохладным климатом. Несмотря на эти вариации мезоклимата, разница в “глобальном” климате России достаточно заметна, что и продемонстрировали вариации величины $\delta^{13}\text{C}$ в образцах меда. Самые высокие значения, как и ожидалось, обнаружены для образцов меда из регионов с теплым морским климатом: вблизи Черного моря со значениями $\delta^{13}\text{C}$ от -26.4 до -24.2‰ (крымский, туапсинский, краснодарский мед) и в Приморском крае ($\delta^{13}\text{C} = -25.6 \pm 0.7\text{‰}$). Образцы меда, отобранные в регионах с умеренными климатическими условиями, имели промежуточные значения $\delta^{13}\text{C}$ от -26.8 до -26.1‰ (Республики Башкортостан и Мордовия). Сибирский мед (алтайский, томский, кемеровский и новосибирский) показал самые низкие значения величины $\delta^{13}\text{C}$ от -29.5 до -25.9‰ . Средние значения величины $\delta^{13}\text{C}$ приведены в табл. 1.

Изотопный состав водорода и кислорода. Известно, что фракционирование изотопов водорода и кислорода в осадках в значительной степени зависит от климатических условий и преобладающего региона — источника атмосферной влаги [19]. Значения величин $\delta^2\text{H}$ и $\delta^{18}\text{O}$ изменяются предсказуемым образом: уменьшаются с увеличением расстояния до моря, с увеличением высоты и снижением средней температуры в конкретном регионе [20], т.е. более низкие значения величин $\delta^2\text{H}$ и $\delta^{18}\text{O}$ соответствуют высокогорным, внутренним и прохладным климатическим регионам, а более высокие значения — низкорным, прибрежным и теплым климатическим регионам. Это связано с тем, что более легкие изотопологи воды быстрее испаряются по сравнению с более тяжелыми, которые испаряются медленнее и имеют тенденцию в большей степени выпадать в виде осадков. Результаты исследования [7] подтверждают, что эти явления, наблюдаемые в гидросфере, передаются через ассимиляцию растений. Поэтому данные о содержании стабильных изотопов кислорода и водорода можно использовать для понимания потенциальных регионов происхождения растений, а, следовательно, нектара, отобранного медоносными пчелами с растений, и, как следствие, меда.

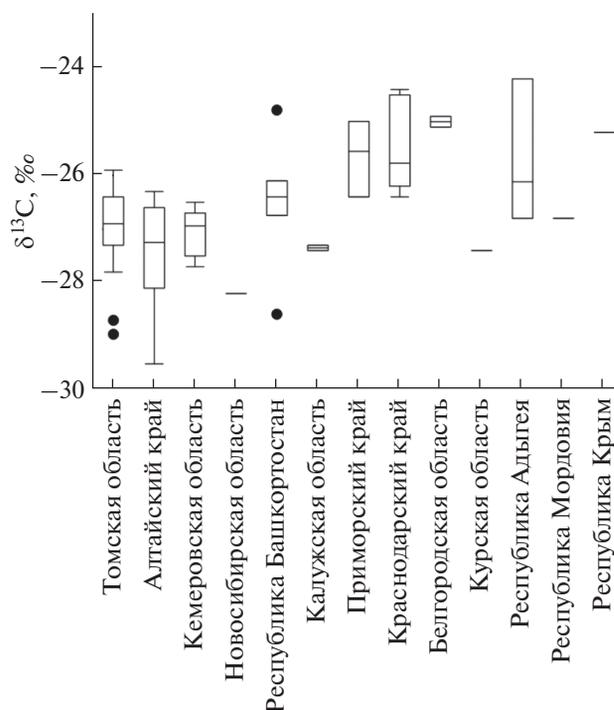


Рис. 3. Диаграмма значений величины $\delta^{13}\text{C}$ в меде из разных регионов России: диапазон между первым и третьим квартилем распределения заключен в рамку, вертикальные линии (“усы”) на нижнем и верхнем концах оси рамки представляют минимальные и максимальные значения, которые не считаются экстремальными значениями, вертикальная линия в рамке — среднее значение распределения; точками обозначены экстремальные значения.

На рис. 4 представлены результаты определения изотопного состава водорода и кислорода в меде из разных регионов России. Диапазон значений величины $\delta^2\text{H}$ во всех образцах меда колеблется от -116.6‰ (образец из Алтайского края, Краснодарский район) до -34.5‰ (образец меда из Кабардинки). Самые высокие значения были обнаружены в Черноморском регионе России с теплым морским климатом (кабардинский и туапсинский мед со значениями величины $\delta^2\text{H}$ -34.5 и -41.4‰ соответственно). Образцы меда, отобранные в регионах с умеренными климатическими условиями, такими как Калужская область (среднее значение величины $\delta^2\text{H}$ составило $-69.0 \pm 8.6\text{‰}$), республика Башкортостан (среднее значение величины $\delta^2\text{H}$ равно $-67.2 \pm 21.3\text{‰}$) показали промежуточные средние значения. Мед из Уссурийска (Приморский край с умеренным муссонным климатом) показал среднее значение величины $\delta^2\text{H}$ $-65.2 \pm 4.7\text{‰}$. Самые низкие значения зафиксированы для образцов из Сибирского региона: для Томской области среднее значение величины $\delta^2\text{H}$ равно $-97.6 \pm 13.8\text{‰}$, для образцов меда из Кемеровской области и Алтайского края сред-

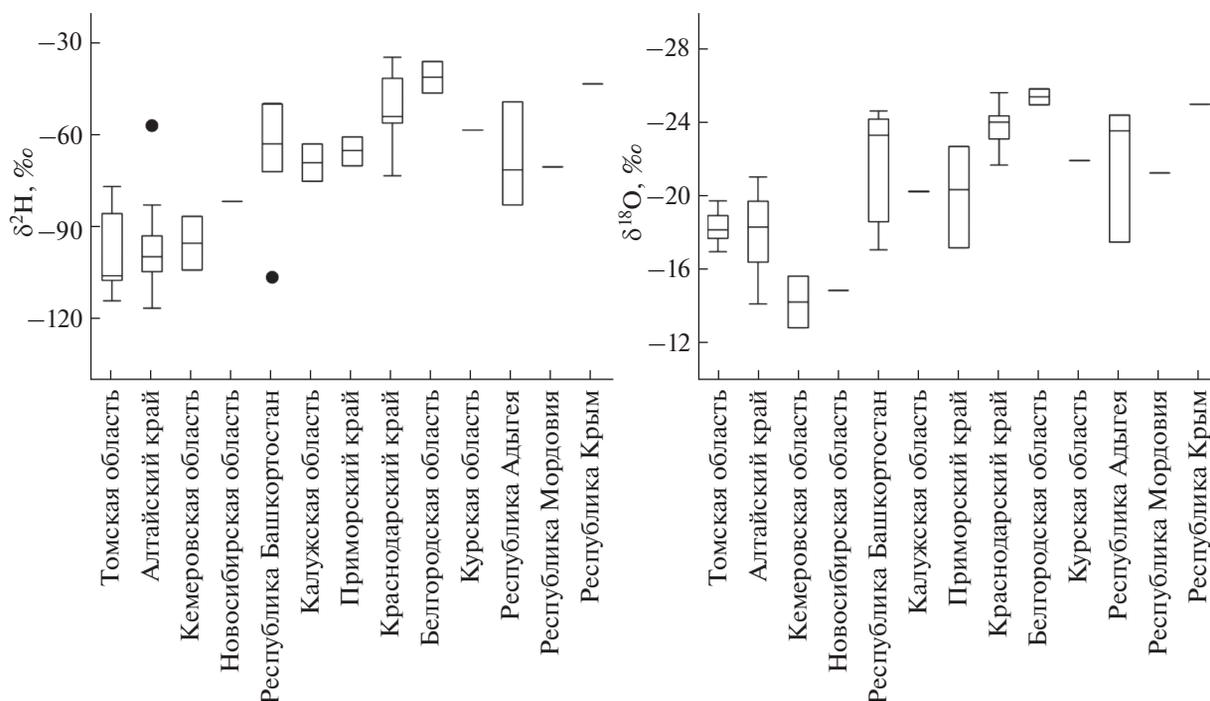


Рис. 4. Диаграмма значений величин $\delta^2\text{H}$ и $\delta^{18}\text{O}$ в меде из разных регионов России: диапазон между первым и третьим квартилем распределения заключен в рамку, вертикальные линии (“усы”) на нижнем и верхнем концах оси рамки представляют минимальные и максимальные значения, которые не считаются экстремальными значениями, вертикальная линия в рамке – среднее значение распределения; точками обозначены экстремальные значения.

ние значения величины $\delta^2\text{H}$ составили $-95.3 \pm 12.4\text{‰}$ и $-95.8 \pm 17.7\text{‰}$ соответственно.

Измеренные значения величины $\delta^{18}\text{O}$ в меде варьировались от $+12.7$ до $+25.7\text{‰}$. Картина распределения значений изотопного состава кислорода в меде аналогична распределению значений изотопного состава водорода по климатическим зонам. Самое высокое среднее значение зафиксировано в Черноморском регионе ($+23.4 \pm 2.2\text{‰}$), промежуточное значение ($+22.0 \pm 2.7\text{‰}$) для Европейских регионов России, а самое низкое среднее значение – в Сибири ($+17.4 \pm 2.1\text{‰}$).

Сравнение результатов определения изотопного состава водорода и кислорода в 48 образцах меда из нашего исследования и в 38 образцах меда, отобранных в 16 штатах США [8], показало, что для образцов американского меда диапазон значений величин $\delta^2\text{H}$ (от -110 до -10‰) и $\delta^{18}\text{O}$ (от $+22$ до $+37\text{‰}$) имеет более высокую верхнюю границу значений и шире, чем диапазон для образцов российского меда, для которого величина $\delta^2\text{H}$ меняется от -116.6 до -34.5‰ , а величина $\delta^{18}\text{O}$ – от $+12.7$ до $+25.7\text{‰}$. Более тяжелый изотопный состав образцов американского меда обусловлен климатическими факторами, так как большая часть образцов американского меда была отобрана в южных штатах с субтропическим климатом, в зоне тропиков Флориды и в при-

брежных районах Калифорнии со средиземноморским климатом.

Анализ взаимосвязи между изотопным составом водорода и кислорода в метеорных водах и изотопным составом меда. Измеренные значения величин $\delta^2\text{H}$ и $\delta^{18}\text{O}$ меда сравнивали со значениями величин $\delta^2\text{H}$ и $\delta^{18}\text{O}$ атмосферных осадков (метеорных вод), выпадающих в регионах отбора образцов меда. Величину $\delta^2\text{H}$ метеорных вод рассчитывали посредством изотопного онлайн-калькулятора, размещенного на портале Waterisotopes Database с использованием интерполированных данных значений величины $\delta^2\text{H}$ метеорных вод, полученных ранее по сети GNIP для сопредельных территорий. Анализ данных (табл. 2) демонстрирует хорошую корреляцию между соотношением изотопов водорода и кислорода в метеорной воде и меде. Коэффициент корреляции значений величины $\delta^2\text{H}$ в меде и осадках равен 0.87 , а для величины $\delta^{18}\text{O}$ – 0.83 (рис. 5).

Как и предполагалось, медоносные растения фиксируют соотношения изотопов водорода и кислорода местных атмосферных осадков, и эта “запись” сохраняется в меде, хотя и с некоторой трансформацией из-за процессов фракционирования, происходящих при превращении нектара в мед.

Таблица 2. Средние значения величин $\delta^2\text{H}$ и $\delta^{18}\text{O}$ в меде и среднегодовые интерполированные значения величин $\delta^2\text{H}$ и $\delta^{18}\text{O}$ метеорных вод в регионах отбора образцов меда

Регион	$\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}}, \text{‰}$		$\delta^{18}\text{O}_{\text{V-SMOW}}, \text{‰}$	
	мед	метеорные воды	мед	метеорные воды
Томская область	-97.6 ± 13.8	-109	18.2 ± 0.9	-15.1
Алтайский край	-95.8 ± 17.7	-98	17.7 ± 2.4	-13.8
Кемеровская область	-95.3 ± 12.4	-100	14.1 ± 2.0	-14.1
Новосибирская область	-81.7	-106	14.8	-14.8
Республика Башкортостан	-67.2 ± 21.3	-71	21.7 ± 3.2	-10.6
Калужская область	-69.0 ± 8.6	-77	21.0 ± 0.1	-10.1
Приморский край	-65.2 ± 4.7	-54	20.0 ± 2.8	-7.5
Краснодарский край	-47.8 ± 16.5	-56	23.8 ± 1.2	-7.9
Белгородская область	-41.0 ± 7.3	-61	25.3 ± 0.6	-8.1
Курская область	-58.3	-65	21.8	-8.5
Республика Адыгея	-67.7 ± 17.1	-60	21.7 ± 3.8	-9
Республика Мордовия	-70.4	-81	21.2	-11.3
Республика Крым	-43.2	-60	24.8	-8.8

Анализа данных по стабильным изотопам С, Н и О. На рис. 6 представлены графики зависимости между изотопными составами углерода, водорода и кислорода в 48 образцах меда. Наибольшая корреляционная связь с коэффициентом корреляции 0.71 наблюдается между изотопами водорода и кислорода. Коэффициент корреляции для изотопов водорода и углерода составляет 0.68. Между изотопами кислорода и углерода коэффициент корреляции равен 0.66. Несмотря на умеренные коэффициенты корреляции, на графиках хорошо прослеживается “изотопный ландшафт”,

соответствующий определенному географическому региону происхождения меда.

Совместное определение изотопного состава углерода, водорода и кислорода позволило выявить образцы поддельных медов по географической принадлежности. Так, гречишный мед из Республики Башкортостан (географическое происхождение указано на товарной этикетке меда), приобретенный на медовой ярмарке, показал значения изотопного состава трех элементов ($\delta^{13}\text{C} = -28.6\text{‰}$, $\delta^2\text{H} = -106.5\text{‰}$ и $\delta^{18}\text{O} = +17.0\text{‰}$),

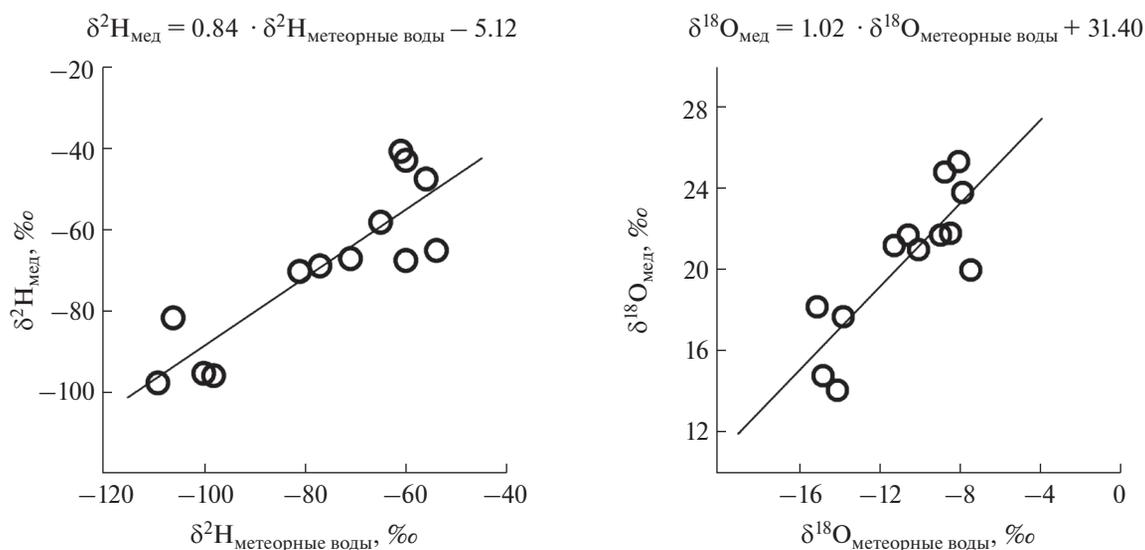


Рис. 5. Сопоставление измеренных значений величин $\delta^2\text{H}$ и $\delta^{18}\text{O}$ меда с интерполированными данными для $\delta^2\text{H}$ и $\delta^{18}\text{O}$ метеорных вод в регионах отбора образцов меда.

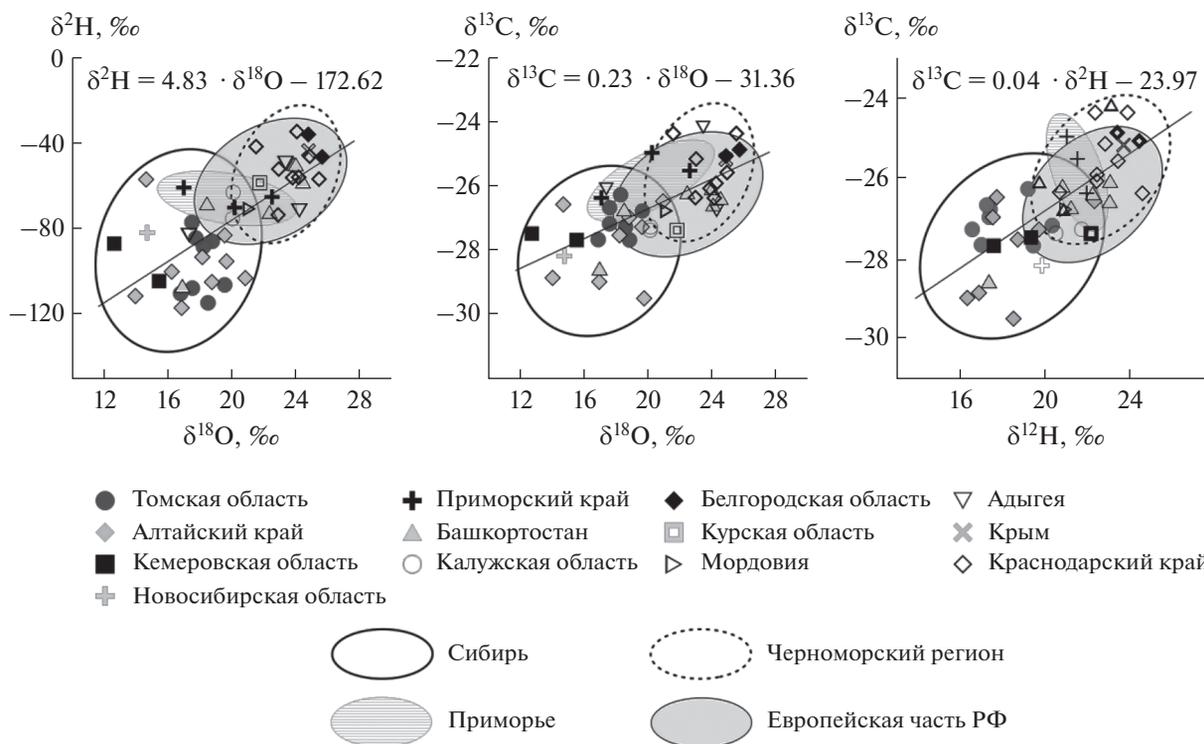


Рис. 6. Взаимозависимости изотопного состава водорода, кислорода и углерода в образцах меда, отобранных в разных климатических регионах России.

соответствующие образцам меда из Сибирского региона. А для образца алтайского меда были определены значения изотопного состава углерода ($\delta^{13}\text{C} = -26.6\text{‰}$) и водорода ($\delta^2\text{H} = -56.9\text{‰}$), соответствующие Европейскому региону России.

Определение стабильных изотопов углерода является признанным методом обнаружения фальсификации меда. Наше исследование расширило его применение, включив в него возможность определения региона происхождения меда с использованием изотопов водорода и кислорода. Продемонстрирована перспективность использования стабильных изотопов С, О, Н для определения региона происхождения меда из разных климатических зон. Показано, что не только изотопы водорода и кислорода в меде связаны с осадками и климатом, но и на изотопы углерода в меде также влияют климатические параметры. Сравнение значений изотопного состава углерода в 98 образцах Российского меда и их белковой фракции позволило выявить 7 образцов поддельного меда, сфальсифицированного сахарными сиропами, приготовленными из растений с С4 типом фотосинтеза. Однако обнаружение фальсификации меда сахарными сиропами, полученными из растений с С3 типом фотосинтеза (например, сахарная свекла), по-прежнему пред-

ставляет собой серьезную проблему, поэтому необходимо совершенствовать методы, сочетающие изотопную масс-спектрометрию с газовой и жидкостной хроматографией, развивать референсную базу аутентичных продуктов пчеловодства с целью “прогнозирования” изотопных сигнатур в продуктах пчеловодства из конкретной географической зоны. Впервые совместное исследование изотопных сигнатур водорода, кислорода и углерода в образцах меда показало возможность использования изотопных данных для четкого определения трех климатических зон регионов происхождения меда в Российской Федерации: 1 зона – Черноморский регион с теплым морским климатом ($\delta^{13}\text{C} = -25.6 \pm 0.9\text{‰}$, $\delta^2\text{H} = -55.2 \pm 14.3\text{‰}$ и $\delta^{18}\text{O} = +23.4 \pm 2.2\text{‰}$); 2 зона – Европейская часть России с умеренно континентальным климатом ($\delta^{13}\text{C} = -26.5 \pm 1.1\text{‰}$, $\delta^2\text{H} = -62.7 \pm 18.1\text{‰}$ и $\delta^{18}\text{O} = +22.0 \pm 2.7\text{‰}$) и 3 зона – Сибирь с континентальным климатом ($\delta^{13}\text{C} = -27.2 \pm 0.8\text{‰}$, $\delta^2\text{H} = -95.9 \pm 14.8\text{‰}$ и $\delta^{18}\text{O} = +17.4 \pm 2.1\text{‰}$).

Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-90016 и государственного задания ИМКЭС СО РАН №121031300154-1.

Авторы признательны за помощь ООО “МС-АНАЛИТИКА” в лице В.С. Файнберга за консуль-

тации при выполнении анализов и за предоставленные стандартные образцы меда для построения градуировочных графиков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fairchild G.H., Nichols J.P., Capps O. Jr. Observations on economic adulteration of high-value food products: The honey case // J. Food Distrib. Res. 2003. V. 34. P. 38.
2. Anklam E. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey // Food Chem. 1998. V. 63. P. 549.
3. Longobardi F., Casiello G., Sacco D., Tedone L., Sacco A. Characterisation of the geographical origin of Italian potatoes, based on stable isotope and volatile compound analyses // Food Chem. 2011. V. 124. P. 1708.
4. Gremaud G., Hilker A. Isotopic-Spectroscopic Technique: Stable Isotopic Ratio Mass Spectrometry (IRMS), Modern Techniques for Food Authentication / Ed. Sun D.-W. Elsevier, 2008. P. 269.
5. Tosun M. Detection of adulteration in honey samples added various sugar syrups with $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope analysis method // Food Chem. 2013. V. 138. P. 1629.
6. Wang S., Guo Q., Wang L., Lin L., Shi H., Cao H., Cao B. Detection of honey adulteration with starch syrup by high performance liquid chromatography // Food Chem. 2015. V. 172. P. 669.
7. Schellenberg A., Chmielus S., Schlicht C., Camin F., Perini M., Bontempo L., Heinrich K., Kelly S.D., Rossmann A., Thomas F., Jamin E., Horacek M. Multielement stable isotope ratios (H, C, N, S) of honey from different European regions // Food Chem. 2010. V. 121. P. 770.
8. Chesson L.A., Tipple B.J., Erkkila B.R., Cerling T.E., Ehleringer J.R. B-HIVE: Beeswax hydrogen isotopes as validation of environment. Part I: Bulk honey and honeycomb stable isotope analysis // Food Chem. 2011. V. 125. P. 576.
9. Талибова А., Колеснов А. Оценка качества и безопасности пищевой продукции методом изотопной масс-спектрометрии // Аналитика. 2011. № 1. P. 44.
10. Калашникова Д.А., Симонова Г.В. Отношения стабильных изотопов $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ и $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ в образцах подмора пчел и в продуктах их жизнедеятельности // Журн. аналит. химии. 2021. Т. 76. № 4. С. 359. (Kalashnikova D.A., Simonova G.V. Ratios of stable isotopes $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ in samples of dead honey bees and beekeeping products // J. Anal. Chem. 2021. V. 76. № 4. P. 526.)
11. Global and regional maps of isotope ratios in precipitation. <https://wateriso.utah.edu/waterisotopes/index.html> (16.12.2021 г.).
12. Reference Materials and Calibration Services. <https://isotopes.usgs.gov/lab/referencematerials.html> (22.11.2021 г.).
13. AOAC Official Methods of Analysis, Method 998.12: C-4 Plant Sugars in Honey. Internal Standard Stable Carbon Isotope Ratio Method, AOAC International, 1998.
14. Ветрова О.В., Калашникова Д.А., Мелков В.Н., Симонова Г.В. Выявление фальсификации меда сахарными сиропами методом масс-спектрометрии стабильных изотопов // Журн. аналит. химии. 2017. Т. 72. № 7. С. 645. (Vetrova O.V., Kalashnikova D.A., Melkov V.N., Simonova G.V. Detection of honey adulterations with sugar syrups by stable isotope mass spectrometry // J. Anal. Chem. 2017. V. 72. № 7. P. 756.)
15. Bowen G.J. The Online Isotopes in Precipitation Calculator, version 3.1., 2017. <https://wateriso.utah.edu/waterisotopes/index.html> (14.12.2021 г.).
16. Luo D., Luo H., Dong H., Xian Y., Guo X., Wu Y. Hydrogen ($^2\text{H}/^1\text{H}$) combined with carbon ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) isotope ratios analysis to determine the adulteration of commercial honey // Food Anal. Methods. 2016. V. 9. P. 255.
17. Padovan G.J., Jong D.D., Rodrigues L.P., Marchini J.S. Detection of adulteration of commercial honey samples by the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotopic ratio // Food Chem. 2003 V. 82. P. 633.
18. Jonasson S., Medrano H., Flexas J. Variation in leaf longevity of *Pistacia lentiscus* and its relationship to sex and drought stress inferred from leaf delta $\delta^{13}\text{C}$ // Funct. Ecol. 1997. V. 11. №. 3. P. 282.
19. Craig H., Isotopic variations in meteoric waters // Science. 1961. V. 133. P. 1702.
20. Bowen G.J., Ehleringer J.R., Chesson L.A., Stange E., Cerling T.E. Stable isotope ratios of tap water in the contiguous United States // Water Resour. Res. 2007. V. 43. Article W03419.

О ПЕРВОМ ИЗДАНИИ ИЗБРАННЫХ ТРУДОВ М.С. ЦВЕТА ПО ХРОМАТОГРАФИИ

© 2022 г. Е. М. Сенченкова*

*Институт истории естествознания и техники им. С.И. Вавилова Российской академии наук
Балтийская ул., 14, Москва, 125315 Россия*

**e-mail: emsench@yandex.ru*

Поступила в редакцию 15.12.2021 г.

После доработки 10.01.2022 г.

Принята к публикации 17.02.2022 г.

В год 75-летия первого издания избранных работ М.С. Цвета освещен ряд эпизодов необычной истории рождения и реализации в 1946 г. замысла публикации данного издания при почти полной неизвестности русскоязычному читателю как включенных в него четырех работ создателя хроматографии, так и их автора. Названы причины неизвестности этих работ химикам нашей страны до середины 1940-х гг., а также действия академика С.И. Вавилова и профессора Е.Н. Гапона по подготовке тогда хроматографистов для изучения и использования метода хроматографического анализа в научных и практических целях. Обращено внимание на отдельные сложности публикации названного издания и на их преодоление. Сопоставлены некоторые характеристики со вторым изданием избранных трудов М.С. Цвета (2013).

Ключевые слова: история хроматографии, М.С. Цвет, С.И. Вавилов, Е.Н. Гапон, хроматографический метод.

DOI: 10.31857/S0044450222100140

В преддверии 150-летия со дня рождения создателя хроматографии М.С. Цвета (1872–1919) вспомним об одном парадоксальном событии, связанном с его творческим наследием и развитием хроматографии в нашей стране. Речь идет о первом издании избранных работ ученого в 1946 г. [1], которое вышло спустя более четверти века после его кончины. Уникальность этого издания заключалась в мотивации его быстрой подготовки и появления сразу после окончания войны, а парадоксальность – в почти полной безвестности для нашей науки середины 1940-х гг. включенных в него четырех публикаций. Обычно издание трудов какого-либо автора обусловлено его уже сложившейся известностью, но в данном случае этого нельзя было сказать ни о появлявшихся у нас публикациях первого хроматографиста, ни о нем самом.

Так какова же причина такой парадоксальности, и в чем особенность тех четырех работ, которые были выбраны из 68 прижизненных публикаций М.С. Цвета в первый сборник его трудов? Примечательно, что эти избранные работы дают возможность их читателю ознакомиться не только с результатами исследований ученого, но и с доскональным описанием той методики хроматографического анализа, при помощи которой они были получены, чтобы и другие могли ее исполь-

зовать. Да и сам автор будто бы стремился к тому же, судя по заголовкам и содержанию работ, включенных в издание.

Первой такой публикацией был доклад “О новой категории адсорбционных явлений и о применении их к биохимическому анализу”, прочитанный 8/21 марта 1903 г. в Варшавском обществе естествоиспытателей при Варшавском университете. Два следующих сообщения “Физико-химические исследования хлорофилла. Адсорбция” и “Адсорбционный анализ и хроматографический метод. Применение к химии хлорофилла”, сделанные в Немецком ботаническом обществе, были переданы соответственно 21 июня и 21 июля 1906 г. в “доклады” этого Общества, где и появились в печати в тот же год [2, 3]. Четвертая работа была извлечением из докторской диссертации М.С. Цвета “Хромофиллы в растительном и животном мире” (Варшава. 1910. 380 с.). Так, через 36 лет основная часть той диссертации, а именно “Методология”, составила основу избранных работ ее автора.

Возникает вопрос, почему названные работы были неизвестны советским ученым середины 1940-х гг.? Во многом причиной этому был комплекс неудачных обстоятельств, сопровождавших почти всю творческую жизнь М.С. Цвета. Достаточно заметить, что самое первое упомина-

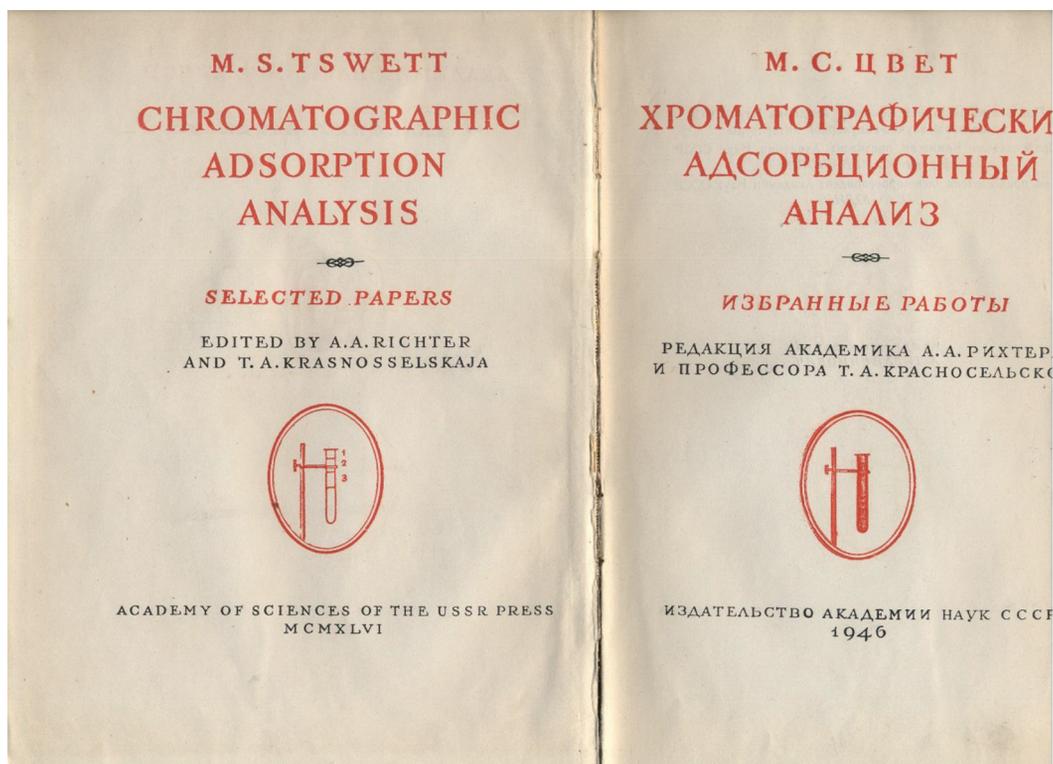


Фото 1. Титульный лист первого издания трудов М.С. Цвета.



Фото 2. М.С. Цвет. СПб. Портрет сделан и подарен академику А.С. Фаминцыну в 1900 г.

ние о предложенном им методе адсорбционного анализа можно найти в тезисах доклада “Методы и задачи физиологического исследования хлорофилла”, прочитанного 30 декабря 1901 г. на XI съезде русских естествоиспытателей и врачей в Санкт-Петербурге. Тезисы занимали одну небольшую страничку в “Дневнике съезда” (СПб, 1902, с. 523) и, в отличие от основного доклада, никем не были замечены ни тогда, ни позже [подробнее см. 4, с. 113, 252]. Ныне с этими тезисами и докладом в силу их трудной доступности проще ознакомиться в новых избранных трудах ученого [5, с. 235].

Во многом более обстоятельным было сообщение М.С. Цвета о своем методе в марте 1903 г. Но и тут его преследовал злой рок – мятежные события 1903–1904 гг. в Варшаве, в ходе которых университетская типография не работала. “Труды и протоколы заседаний Варшавского Общества естествоиспытателей при Варшавском университете. Отделение биологии” за 1903 г. со статьей М.С. Цвета (т. 14, с. 1) появились с пометкой на титульном листе о том, что данный том издан в Варшаве в 1905 г. Это разъяснение о соответствии 14 тома 1903 году издания “Трудов”, а также указание там же даты прочтения доклада (8/21 марта 1903 г.) позволяют точно датировать первое обстоятельное публичное изложение основных методических и теоретических положений хроматографии 1903 годом [5, с. 241].

В 1905 г. эта публикация не стала доступнее даже для русскоязычной научной общественности по причине малоизвестности издания и ограниченности его тиража, а также тех революционных волнений, которые охватили основные центры России и совсем не способствовали научным контактам. Поэтому М.С. Цвет попытался привлечь внимание на свои исследования зарубежной аудитории. После защиты магистерской диссертации (Казань, 1901) он работал ассистентом кафедры анатомии и физиологии растений Варшавского университета и в каникулярный период нередко брал командировки в Берлин, где посещал научные библиотеки и заседания Немецкого ботанического общества, что способствовало публикации его статей в немецких журналах, а также подготовке докторской диссертации. В период студенческих волнений и даже прекращения занятий в Варшаве посещения Берлина даже участились. В итоге летом 1906 г. были напечатаны две названные выше публикации М.С. Цвета [2, 3], а 28 июня 1907 г. он выступил перед коллегами в Немецком ботаническом обществе и при сообщении результатов своих научных изысканий показал и разъяснил им действие своего метода. в

Эти первые зарубежные сообщения о методике хроматографического анализа, который позже стали называть хроматографией, заметили преимущественно авторы руководств по практической химии и с немецкой педантичностью включили ее в ряд других методик физиологической химии для изучения растительных пигментов и производимых на их основе красителей. Появилось даже несколько статей коллег М.С. Цвета по Женевскому университету с описанием использования его методики при изучении различных пигментов, но затем новые методические сообщения заслонили ее, и она на четверть века как бы ушла в анабиоз, чтобы возродиться в начале 1930-х гг., о чем особо пойдет речь ниже. В России же названные немецкие публикации Цвета за исключением некоторых ботаников не были известны вплоть до их переиздания в избранных работах, но уже в переводе на русский язык. Причин такого неведения немало, но прежде всего это — те напряженные отношения, которые сложились между Россией и Германией в связи с русско-японской войной, а затем с Первой мировой войной. Еще менее вероятен в те годы интерес наших химиков к зарубежным ботаническим сообщениям.

Иные возможности давал самый обстоятельный четвертый труд, включенный в избранные работы М.С. Цвета, — его докторская диссертация “Хромофиллы в растительном и животном мире” [5, с. 271]. Она была завершена в 1908 г., но опубликована лишь весной 1910 г. по причине отсутствия средств на издание объемного сочинения к тому же с цветной иллюстрацией. Лишь общими финансовыми усилиями Вар-

шавский университет, Варшавский политехнический институт и Варшавское общество естествоиспытателей смогли одолеть эту трудность, и 27 ноября 1910 г. состоялась защита диссертации в Варшавском университете. Книга, изданная ограниченным тиражом типографией Варшавского учебного округа, уже тогда была библиографической редкостью, так как попала лишь в те библиотеки и к тем коллегам, которым М.С. Цвет сам ее передавал. Так, самый главный труд его жизни — докторская диссертация в современной Москве сохранилась лишь в Российской Государственной библиотеке, библиотеке МГУ и Музеи-квартире К.А. Тимирязева.

К.А. Тимирязеву свою диссертацию М.С. Цвет подарил в 1911 г., когда приезжал из Варшавы в Москву, чтобы принять участие в конкурсе на занятие должности профессора по физиологии растений в Московском университете, которую оставил Тимирязев. Последний приложил усилия, чтобы эта должность перешла его ученику Ф.Н. Крашенинникову, и М.С. Цвету не суждено было стать московским профессором. Тимирязев не признавал утверждений М.С. Цвета о неоднородности зеленого пигмента растений хлорофилла и об оценке энергетических особенностей различных частей спектра солнечного света при фотосинтезе растений, считая их ложными. О том красноречиво свидетельствуют резкие замечания на полях книги, подаренной ему М.С. Цветом. Так как Тимирязев никогда не ссылался на работы варшавского коллеги и не обсуждал их, невозможно судить об аргументации отрицательной позиции Тимирязева в отношении хроматографии. Ясно то, что он знал немецкие публикации М.С. Цвета 1906 г., так как по воспоминаниям одного из студентов в 1908 г. по заданию Тимирязева этот студент в лаборатории физиологии растений воспроизвел опыт по разделению пигментов вытяжки из зеленых листьев на колонке адсорбента по методике, описанной Цветом в его статье. Результаты опытов соответствовали тем описаниям [4, с. 327].

Если российские физиологи более или менее знали об исследованиях М.С. Цвета и его методе при изучении растительных пигментов, то наши химики тех лет не имели представления о возможностях использования того же метода в аналитических и препаративных целях относительно других органических соединений. А ведь они могли бы ознакомиться хотя бы с выступлением М.С. Цвета на II Менделеевском съезде по общей и прикладной химии и физике в 1912 г. [6, 5, с. 502]. Однако и оно не привлекло их внимание ни тогда, ни в последующие десятки лет.

Между тем успехи биохимии конца 1920-х — начала 1930-х годов по открытию и изучению свойств таких групп биологически активных ве-

ществ, как ферменты, витамины, гормоны и других сложных органических соединений побудили зарубежных химиков активировать, как они тогда называли, “метод Цвета” и использовать его для получения химически чистых компонентов из ряда смесей высокомолекулярных соединений, в частности названных групп веществ. Методику хроматографического анализа исследователи брали из отмеченных выше двух немецких статей М.С. Цвета за 1906 г. в немецком ботаническом журнале. К середине 1930-х гг. появились десятки сообщений таких исследований и столь плодотворных, что венгерские химики Л. Цехмейстер и Л. Чолноки в 1937 г. обобщили их и издали первую монографию о хроматографии с описанием двух названных публикаций ее создателя. Там же они показали, какие первые модификации хроматографической установки М.С. Цвета предприняли его последователи. Успех книги был столь велик, особенно среди химиков-органиков, что в следующем 1938 г. она была переиздана в большем объеме и большим тиражом [7]. Использование метода Цвета позволило уже в 1937–1939 гг. получить четыре Нобелевских премии химикам-органикам П. Карреру (1889–1971), Р. Куну (1900–1967), А. Бутенандту (1903–1995) и Л. Ружичке (1887–1976), которые отдавали должное автору метода, позволившему им получить тогда важные сведения о составе и природе ряда витаминов и гормонов.

Позже один из нобелевских лауреатов английский химик Р.Л.М. Синг (1914–1994) пишет: “Цвет был таким же хорошим физикохимиком, как и настоящим ботаником, и он выдвинул очень ясные идеи о принципах и механизме хроматографии” [8, с. 176]. Так, спустя многие годы после кончины М.С. Цвета, он уже перестал восприниматься многими химиками, особенно немецкой школы Р. Вильшгеттера, как “белая ворона” из ботанического сада, а воспринимался на равных. Достаточно вспомнить, что при завершении XX в. именно химики включили имя М.С. Цвета и его открытие в десятку лучших достижений химии минувшего столетия.

Совсем иное положение было в химической науке предвоенных и последующих лет в нашей стране. То ли из-за пресловутого “железного занавеса”, то ли из-за нападков на “буржуазную науку” в химии царил молчание как о хроматографии, так и о ее создателе. Конечно, разрыву научных контактов с зарубежьем во многом способствовала Великая Отечественная война. Одна из первых наших хроматографистов Татьяна Борисовна Гапон (1917–1995) рассказала мне о весьма необычном пути получения нашими химиками сразу по окончании войны сведений об успехах хроматографии.

Весной 1945 г. ее муж, заведующий кафедрой физической и коллоидной химии Тимирязевской с.-х. академии профессор Евгений Никитич Гапон (1904–1950) был направлен в Кенигсберг для определения судьбы библиотечных фондов разрушенного университета и других учебных заведений. Знакомясь с книгохранилищами города, Е.Н. Гапон, свободно ориентировавшийся в иностранной научной литературе, не мог не обратить внимания на публикации, связанные с его собственными научными интересами о коллоидных и адсорбционных свойствах почвы. Так он познакомился с названной выше монографией Л. Цехмейстера и Л. Чолноки о хроматографическом адсорбционном анализе (ныне она хранится у меня с экслибрисом Е.Н. Гапона). Ее авторы сокрушались о том, что ничего не знают и не могут сообщить о жизни создателя этого метода [7, S. IV].

Чтобы ликвидировать резкое отставание нашей науки в этой области, Е.Н. Гапон обратился в правительственные инстанции с предложением создать в ТСХА научно-организационный центр по проведению и координированию хроматографических исследований. Сам он со своими учениками уже стал осваивать данную методику и внедрять ее не только в химических лабораториях, но и на кафедрах физики и почвоведения ТСХА. Ничего подобного у нас тогда не было нигде, даже в АН СССР. Однако путь реализации этих предложений оказался весьма тернистым [9], тем более что в 46 лет Е.Н. Гапон скончался.

Ни в годы войны, ни в первые послевоенные годы наши ученые не знали, что с использованием ионообменной хроматографии, разработанной в 1939–1941 гг. в лаборатории Г. Шваба (1899–1984), в Германии с 1942 г. проводились работы по созданию атомного оружия. В начале весны 1945 г. Гитлер был в двух шагах от создания бомбы требуемой мощности; задержка была лишь в отсутствии нужного количества высокообогащенного урана. Такой уран немцы переправляли из Норвегии в Японию подводной лодкой, когда ее капитан получил приказ о передаче этого груза американцам, у которых тогда также буксовали аналогичные проекты по причине отсутствия нужного количества обогащенного урана и плутония. В обмен на предоставление свободы рейхслайтеру М. Борману и генералу СС Г. Камлеру, курировавшему все секретные работы Третьего рейха, американцы решили свою проблему – получили требуемый уран и смогли взорвать бомбы в Японии [10].

На следующий день после взрыва в Хиросиме академик С.И. Вавилов (1891–1951), только что избранный президентом АН СССР, записал в своем дневнике: “Вчера ночью радио – об урановых бомбах. Начало совсем новой фазы человеческой истории (...) Возможности необъятны. Перелеты на другие миры. Гораздо дальше Ж. Верна.

Но неужели горилла с урановой бомбой? Ум, совесть, добродушие и такт – достаточно ли всего этого у людей. В такой момент я в Академии. Просто страшно (...). Что делать. Прежде всего, усиление ядерного исследования” [11, с. 254]. Его беспокойство и особая ответственность за развитие этой научной проблемы чувствовались и в других подобных записях, одна из которых кончалась словами: “В теперешнем состоянии наука совсем не то, что искусство и футбол. Ее роль такая же, как армии” [11, с. 262].

Между тем после победного завершения войны советские ученые без должной материальной и кадровой базы не были способны покорять атом, как это делалось в США. О том свидетельствуют и материалы конференции, которую провели в ноябре 1946 г. совместно физики и химики Нью-Йоркской Академии наук, посвятив ее 40-летию создания М.С. Цветом хроматографии. В некоторых сообщениях шла речь и об успехах этой методики при осуществлении в США Манхэттенского проекта по созданию атомной бомбы. Эти материалы были опубликованы в журнале Американского химического общества [12].

Ряд статей из названного журнала был переведен на русский язык. В сборниках “Хроматография” (М., 1949) и “Хроматографический метод разделения ионов” (М., 1949) впервые в нашей печати появились сведения о том, каким образом хроматография причастна к получению редкоземельных металлов и выделению в чистом виде продуктов атомного расщепления. При знакомстве с этими сборниками поражает та открытость, с какой тогда публиковались некоторые доклады той конференции по вопросам, ранее полностью закрытым для печати. Вероятно, вместе со взрывами в Японии это делалось для демонстрации лидерства США

Будучи физиком и главой Академии наук, С.И. Вавилов не мог не знать этих материалов и не понимать важности освоения хроматографии как для фундаментальной науки, так и для использования в народном хозяйстве и в военной промышленности. Знал он и работы М.С. Цвета, одним из первых высоко оценив их на I Всесоюзной конференции по фотосинтезу (22 октября 1946 г.) и на сессии Академии наук, посвященной истории отечественной науки (5 января 1949 г.). Для расширения знаний о хроматографии и ее использования требовалось срочное освоение этого метода, а значит, и соответствующее методическое руководство. Можно было бы, конечно, быстро напечатать русский перевод названной выше книги Цехмейстера и Чолноки уже в дополненном американском издании 1943 г. [13]. Однако в тот период подъема послевоенного патриотизма в нашей стране и особого внимания к отече-

ственным приоритетам С.И. Вавилов предпочел использовать труды самого М.С. Цвета.

Такое решение было целесообразным уже потому, что наши физики и химики, не знавшие этих трудов, даже при желании не могли с ними ознакомиться. Так, Е.Н. Гапон, пожелав изучить самый обстоятельный труд М.С. Цвета по хроматографии, т.е. его докторскую диссертацию, не нашел ее ни в библиотеке ТСХА, ни в одной из академических библиотек Москвы. Не менее труднодоступными были также русские и тем более зарубежные публикации М.С. Цвета начала XX в.

С.И. Вавилов всегда проявлял интерес к истории науки, а став президентом АН СССР, принимал участие во многих мероприятиях, связанных с историей нашей науки [14, с. 89, 91, 96 и др.]. Именно ему принадлежала инициатива создания в Академии наук книжной серии “Классики науки” (1944), первыми книгами которой в 1946 г. стали “Лекции по оптике” И. Ньютона в переводе с латинского языка и с комментариями С.И. Вавилова и названные избранные работы М.С. Цвета). Если имя автора первой книги было хорошо известно всем еще со школьных лет, и его труды изучались уже не одну сотню лет, то об авторе второй книги, как мы в том убедились, у нас знал в основном лишь небольшой круг ботаников. Поэтому подготовкой издания этой книги, предназначенной в основном для химиков и физиков, занимались физиологи растений академик А.А. Рихтер и профессор Т.А. Красносельская. Им принадлежал в ней также очерк “Роль М.С. Цвета в создании хроматографического адсорбционного анализа”.

Однако данное издание предназначалось не столько для расширения историко-научного кругозора его читателей, сколько для освоения практических приемов и теоретических основ хроматографии, а также для понимания больших возможностей ее использования. Тому способствовала включенная в издание обстоятельная статья физика Б.Я. Свешникова “Современное состояние хроматографического анализа”. Статья знакомила с высокими оценками “метода Цвета” зарубежными химиками и с различными задачами, которые решались с его помощью. Тут же были названы новые для того времени модификации хроматографии, а также основные зарубежные публикации по данной проблеме. Так, почти через сорок лет любой наш читатель мог, наконец, ознакомиться с основными работами и с открытием М.С. Цвета, а также понять их высокую значимость. Сам же С.И. Вавилов одним из первых понял это, когда говорил, что “физики, химики и биологи в неоплатном долгу перед этим ученым” [15].

Возможно, организаторы издания хотели привлечь внимание к нему также и зарубежного

читателя, когда в начале книги дали два титульных листа — на русском языке и на латинице (фото 1). Иностранцы могли увидеть в этой книге две ранее неизвестные им русские публикации М.С. Цвета о его методе, притом более обстоятельные, чем описания в немецких статьях. Кроме того, они могли убедиться в том, что открытие хроматографии следует связывать с русским сообщением 1903 г., а не немецкими публикациями 1906 г., как до того считалось за рубежом.

Хотя обсуждаемое издание и способствовало знакомству с трудами и методом М.С. Цвета, но оно не прибавило знаний о нем самом. Даже солидные научные труды той поры и позже не знали года его рождения, а дату кончины называли неточно (например, [16]). У составителей того издания до последнего момента не было ни одного портрета М.С. Цвета, умершего в годы гражданской войны профессором только что зарождавшегося Воронежского университета и неизвестно где похороненного.

Теперь, наверное, я единственный свидетель того, как те издатели пытались найти такой портрет. К середине 1940-х гг. была известна лишь одна публикация швейцарского биохимика растений Ш. Деро [17] с двумя групповыми фотографиями студента М.С. Цвета и одна его фотография как выпускника Женевского университета. Правда, там же был любительский снимок М.С. Цвета в лодке на Женевском озере, когда тот посетил альма-матер в 1912 г. На снимке — яркий солнечный день, на глаза человека надвинута панамка, так что видна лишь нижняя часть лица [5, вклейка, л. 27, рис. сверху]. Издатели решили использовать это фото, а почти неразличимую верхнюю часть лица дорисовать.

Спустя много лет мне довелось столкнуться с этим фотомонтажом в фотоархиве издательства “Наука” при иллюстрировании книги “История биологии: С начала XX в. до наших дней” (М.: Наука, 1975. 659 с.), которую готовил к печати ИИЕТ РАН. На обороте фотонОВОДЕЛА значилось: “М.С. Цвет. Избранные работы. Фронтиспис”. К тому времени я уже знала, как выглядел М.С. Цвет на всех этапах его жизни, но находила некоторое сходство со снимком лишь нижней части лица. Верхняя же часть лица принадлежала какому-то иному человеку с нездоровыми воспаленным взглядом [5, вклейка, л. 29, рис. сверху]. Вероятно, почуствовав то же, несостоявшийся фронтиспис издатели забраковали и решили издавать книгу без него.

Лишь в последний момент в фонде академика А.С. Фаминцына (Архив АН СССР, Ленинград) был обнаружен альбом с портретами тех, кто считал себя его учеником и подарил их своему учителю в день его чествования в связи с 65-летием со дня рождения и 40-летием научной деятельности

в 1900 г. Там была и фотография М.С. Цвета, когда тот с разрешения Фаминцына продолжил в его личной лаборатории от Академии наук свои опыты, начатые в Женевском университете, и по привычке расписался не по-русски (фото 2). А на обратной стороне портрета написал: “Глубокоуважаемому Андрею Сергеевичу в день сорокалетия его действительно бескорыстной и славной учёной деятельности. 14 октября 1900 г.”. Это фото и было передано в типографию. Тот портрет молодого ученого затем четверть века тиражировался во всех изданиях, где шла речь об открытии М.С. Цвета, хотя он и относился к самому началу его научной жизни после университета. Каким же М.С. Цвет стал в расцвете своих творческих сил и в последующие годы не было известно до 1971 г.

В 1960-х гг. большой известностью пользовались устные рассказы И.Л. Андроникова. Среди них особо выделялся рассказ “Загадка Н.Ф.И.” о разгадке этих инициалов и поиске портрета возлюбленной М.Ю. Лермонтова Натальи Федоровны Ивановой. Читая эту маленькую увлекательную книжечку из серии “Библиотека журнала “Огонек””, я и думать не могла, что мне самой доведется провести подобный поиск. В 1970 г. профессор Н.А. Фигуровский рассказал мне о своей встрече мимоходом с племянницей М.С. Цвета, о которой он запомнил лишь то, что она по профессии пчеловод и ее фамилия созвучна Лысенко. Мне потребовалось около года, чтобы найти Елизавету Алексеевну Лященко в лаборатории пчеловодства ТСХА, а у нее увидеть целую иконотеку семьи Цветов и ее знаменитого дяди, о чем я рассказала позже на юбилее Н.А. Фигуровского [18]. Таким образом, в силу провидения моя находка стала своеобразным подарком памяти М.С. Цвета как раз к празднованию его 100-летия со дня рождения в 1972 г., когда удалось продемонстрировать часть этих портретов. Еще большее их число включено теперь в новое издание его трудов [5].

Первое издание избранных трудов М.С. Цвета стало своего рода хроматографическим букварем для тех советских химиков, которые не имели возможности постичь хроматографию еще и с помощью зарубежных публикаций. От этого издания пошли широко расходящиеся круги интереса к хроматографии не только в среде химиков, но и физиков, биологов и других специалистов нашей страны. Ныне, более чем через полвека, ее положение изменилось кардинально. Разнообразные хроматографические методики стали неотъемлемой частью аналитической химии, химической технологии, биохимии, геохимии и все глубже проникают в медицину, фармацевтическую, пищевую и атомную промышленность, сельское хозяйство, очищение воды, гидрометаллургию, теплоэнергетику, криминалистику, космические исследования и другие сферы деятельности человека. Ныне понятие *хроматография* стало также

синонимом обозначения самостоятельного научного направления со своей научной терминологией и институтоаилизацией в статусе журнала, лаборатории, институтской кафедры и других организаций, связанных с хроматографией [19, с. 42].

Неудивительно, что жизнь и деятельность М.С. Цвета стала интересовать многих в большем объеме, чем это могло дать издание его трудов середины прошлого века. Тогда авторы краткой биографической справки об ученом черпали сведения в основном из названного выше очерка Ш. Деро. Так же как их швейцарский коллега, они завершали свою справку словами “О последних годах жизни Цвета (т.е. после начала Первой мировой войны. — *Е.С.*), к сожалению, почти ничего не известно” [1, с. 231]. Теперь ликвидирован и этот пробел. Неизвестную информацию в полной мере можно получить из второго издания избранных трудов М.С. Цвета (2013).

Следует иметь в виду, что объем нового издания в три раза больше предшествующих избранных работ. число включенных в него публикаций увеличилось до 17, из которых в переводе на русский язык даны три немецких и одна французская. На порядок увеличилось и число иллюстраций, их стало более шестидесяти. В четыре раза расширилась хронология трудов М.С. Цвета с семи (1903—1910 гг.) до двадцати лет (1896—1916 гг.). Теперь от студенческой работы (1896) до докторской диссертации (1910) можно четко проследить интерес автора к изучению различных проявлений адсорбционных процессов вначале у растений, а затем и более широко в живой и неживой природе. Все это позволяет полнее представить развитие научных интересов создателя хроматографии от фитофизиологических исследований до раскрытия физико-химических основ изучаемого им явления адсорбции, позволивших ему открыть существование в природе адсорбционной хроматографии, а затем и других ее видов. При отсутствии какого-либо памятника и даже места захоронения ученого ныне эти два издания — самые существенные памятные знаки творчества талантливого исследователя с удивительной и трагической судьбой, ушедшего из недолгой жизни в 47 лет.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Цвет М.С.* Хроматографический адсорбционный анализ. Избранные работы / Под ред. Рихтера А.А., Красносельской Т.А. Л.: Изд-во АН СССР, 1946. 274 с.
2. *Tswett M.* Physikalisch-chemische Studien über das Chlorophyll. Die Adsorptionen // *Berichte der Deutschen botanischen Gesellschaft.* 1906. Bd. 24. S. 316.
3. *Tswett M.* Adsorptionsanalyse und chromatographische Methode. Anwendung auf die Chemie des Chlorophylls // *Berichte der Deutschen botanischen Gesellschaft.* 1906. Bd. 24. S. 384.
4. *Сенченкова Е.М.* М.С. Цвет — создатель хроматографии. М.: Янус-К, 1997. 440 с.
5. *Цвет М.С.* Избранные труды / Сост., автор очерков и комментариев Сенченкова Е.М. / Под ред. Золотова Ю.А. М.: Наука, 2013. 680 с.
6. *Цвет М.С.* Современное состояние химии хлорофилла // *Журнал Русского физико-хим. об-ва. Часть хим.* 1912. Т. 44. С. 449.
7. *Zechmeister L., Cholnoky L.* Die chromatographische Adsorptionsmethode. Wien, 1937. 231 S. (auch — 1938, 2 Aufl. — 354 S.)
8. *Synge R.L.M.* A retrospect on liquid chromatography / *British Biochemistry Past and Present* / Ed. Goodwin T.W. Biochemical society. Symposium № 30. London, 1970. P. 175.
9. *Сенченкова Е.М.* Рождение Комиссии АН СССР по хроматографии. 1945—1953 гг. // *Сорбционные и хроматографические процессы.* 2003. Т. 3. № 2. С. 122.
10. *Sasser Ch.W.* Hitler's A-bomb. HC US, 2008. 320 p.
11. *Вавилов С.И.* Дневники. 1909—1951. Кн. 2. М.: Наука, 2012. 605 с.
12. *J. Am. Chem. Soc.* 1947. V. 69. № 11.
13. *Zechmeister L., Cholnoky L.* Principles and Practice of Chromatography. N.Y., 1943. 378 p.
14. *Илизаров С.С.* Отечественная историография истории науки и техники. Хроника. 1901—2011. М.: Янус-К, 2012. 467 с.
15. Личное сообщение профессора И.Е. Амлинского Е.М. Сенченковой об оценке С.И. Вавиловым трудов М.С. Цвета.
16. *Тимирязев К.А.* Собр. соч. В 10-ти томах. М.: Сельхозгиз, 1940. Т. 10. С. 435.
17. *Dhéré Ch. Michel Tswett.* Le créateur de l'analyse chromatographique par adsorption. Sa vie, ses travaux sur les pigments chlorophylliens // *Candollea.* 1943. V. 10. P. 23.
18. *Сенченкова Е.М.* Некоторые штрихи к портрету Н.А. Фигуровского / *История химии: область науки и учебная дисциплина. К 100-летию профессора Н.А. Фигуровского* / Под ред Лунина В.В., Орла В.М. М.: Изд-во Моск. ун-та, 2001. С. 17.
19. *Сенченкова Е.М.* История создания хроматографии и ее научных основ в трудах М.С. Цвета. Дис. ... докт. хим. наук. М.: ИФХ РАН, 2000. 55 с.

МОСКОВСКИЙ СЕМИНАР ПО АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ

DOI: 10.31857/S0044450222120052

В июне 2021 г. возобновил работу Московский семинар по аналитической химии. Семинар существует в Институте геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского с 1963 г., его руководителями были ведущие химики-аналитики – с 1965 г. в течение 20 лет им руководил Ю.А. Золотов, председателями также были Н.М. Кузьмин, Г.М. Варшал, Б.К. Зуев, Э.М. Седых, В.П. Колотов. Для возобновления работы семинара немало усилий приложили председатель Центрального отделения НСАХ РАН д.х.н. Г.И. Цизин и председатель НСАХ РАН академик РАН Ю.А. Золотов. Решено было проводить заседания семинаров на базе трех организаций – Института геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского РАН, Института общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН и химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Первое заседание состоялось 9 июня 2021 г. в конференц-зале ГЕОХИ РАН. С приветственным словом выступил академик РАН Ю.А. Золотов. Он сказал примерно следующее.

“После перерыва, связанного в значительной степени с коронавирусной инфекцией, возобновляет работу Московский семинар по аналитической химии, возобновляет в новом формате. Председатель Центрального отделения Научного совета РАН по аналитической химии Григорий Ильич Цизин провел подготовительную работу. Семинар, являющийся органом совета, будет работать в трех местах – в ГЕОХИ, в ИОНХе и на химфаке МГУ. У семинара, соответственно, теперь три председателя: Петр Сергеевич Федотов (ГЕОХИ), Александр Вадимович Иванов (ИОНХ) и Павел Николаевич Нестеренко (МГУ). Заседания семинара будут проходить поочередно в названных учреждениях.

Семинар имеет большую историю. Его истоки – в далеком от нас периоде, когда советская наука была на самом крутом взлете. Период этот был непродолжительным, 10–15 лет, начиная приблизительно с 1954 г., т.е. в хрущевское время и в начале брежневского. Тогда создавались многие институты, существующие энергично заполнялись выпускниками вузов, возникали новые научные журналы, стало возможным посещение других стран, мировые издательства бросились переводить наши книги, перенимать наш опыт подготовки кадров, к нам зачастили иностранные

коллеги. Эта эпоха отмечена первым спутником и полетом Гагарина (правда, и “кузькиной матерью” – водородной бомбой мощностью в 70 миллионов тонн тротилового эквивалента; на Хиротиму было сброшено всего-то 20 тысяч).

Вот и семинар родился на этой волне. У него был предшественник: в 1950-х гг. в ГЕОХИ работал семинар по органическим аналитическим реагентам, который вел заведующий соответствующей лабораторией доктор химических наук Виталий Иванович Кузнецов, человек творческий, прекрасный химик, но не очень легкий человек. Идея создать семинар широкий, не только в смысле тематики, но и в отношении охвата участников, появилась в институте в 1963 г. Ее реализовали заместитель директора института доктор химических наук Дмитрий Иванович Рябчиков и член профкома Сергей Борисович Саввин, в то время уже автор широко известного реагента арсеноза III. Руководителем семинара назначили доктора химических наук Августу Константиновну Лаврухину. Она занималась радиохимией, радиометрией, происхождением элементов, аналитическая химия не была главным делом ее научной жизни. И она сама, и другие быстро поняли, что сильно вкладываться в семинар она не будет. И через два года, в 1965 г., председателем семинара назначили 33-летнего доктора наук, только что защитившего диссертацию, по фамилии Золотов. Я руководил семинаром 20 лет. Заседания проходили примерно раз в месяц, в год 8–10 заседаний. Иногда зал института едва вмещал участников.

Замечательный секретарь семинара Евгения Касьяновна Корчемная публиковала в “Журнале аналитической химии” хроники о заседаниях, включавшие тезисы представленных докладов. А потом эти хроники собирала, систематизировала и переплетала, получались как бы книжки в нескольких экземплярах, отражавшие деятельность семинара. С 1985 г. семинаром приблизительно лет десять руководил доктор химических наук трудолюбивый и ответственный Николай Михайлович Кузьмин. Его сменила Галина Моисеевна Варшал, энергичный, во все вникающий человек. Семинар продолжал активно функционировать. Уже на памяти и молодых коллег семинаром руководил дуэт – Эвелина Максимовна Седых и Борис Константинович Зуев, а в по-

следнее время – член-корреспондент РАН Владимир Пантелеймонович Колотов.

Семинар, как и научные конференции, выполняет несколько функций. Он, конечно, источник актуальной информации, отчасти средство обмена опытом, но еще и в хорошем смысле тусовка, он обеспечивает возможность живого общения.

Возрожденному семинару я желаю больших успехов.”

На первом заседании был заслушан доклад д.х.н. А.Т. Лебедева (химический факультет МГУ) на тему “Целевой и нецелевой анализ объектов окружающей среды современными методами масс-спектрометрии”. В докладе рассмотрены подходы к решению природоохранных задач методами масс-спектрометрии, в частности, вопросы чувствительности, экспрессности, информативности и надежности анализов. В последнее время все больше внимания уделяется нецелевому анализу, когда *a priori* неизвестно, что может оказаться в анализируемом образце, и задача аналитика – попытаться идентифицировать и оценить количественно все обнаруженные соединения. Особое значение имеет переход к масс-спектрометрии высокого разрешения и стыковка как с жидкостными, так и с газовыми хроматографами. Очень полезную комплементарную информацию предоставляют альтернативные методы ионизации, включая регистрацию отрицательных ионов. Все растет разнообразие методов масс-спектрометрии с ионизацией на открытом воздухе. Они дают возможность устранить процедуры пробоподготовки. Масс-спектрометрия сверхвысокого разрешения наряду с тандемной газовой хроматографией в стыковке с масс-спектрометрией высокого разрешения позволяют работать с очень сложными смесями соединений, включая нефть, лигнины, гуминовые вещества. Все более востребованными становятся программы математической обработки результатов (*big data analysis*). Когда речь идет о нескольких тысячах идентифицированных соединений в десятках образцов, эти подходы позволяют выделить сходства и различия, выяснить источники поступления экотоксикантов в окружающую среду. Все теоретические аспекты доклада проиллюстрированы результатами анализа объектов окружающей среды из Арктики, Москвы, Чукотки, Франции, Чили и других стран и регионов.

С сообщением о приборном парке фирмы “Thermo Fisher Scientific”, выпускаемом для контроля качества воды, выступила Анна Богданова, представитель фирмы в России.

Следующее, второе заседание семинара состоялось в ГЕОХИ 22 февраля 2022 г. – длительный перерыв в работе был вызван эпидемиологической обстановкой (COVID 19). Заседание прово-

дилось в смешанном формате – очно в конференц-зале института и дистанционно в телекоммуникационной программе Zoom. Семинар был посвящен современным вариантам жидкостно-жидкостной хроматографии (или же жидкостной хроматографии со свободной неподвижной фазой, ЖХСНФ), которой в течение ряда лет занимаются научные группы в ГЕОХИ и ИОНХ РАН. Особенностью этого вида хроматографии является использование жидкой неподвижной фазы вместо традиционных частиц сорбента; разделение аналитов происходит главным образом вследствие многоступенчатого экстракционного процесса. В докладе д.х.н. Т.А. Марютиной (ГЕОХИ) “Жидкостная хроматография со свободной неподвижной фазой в аналитической химии” отмечены основные вехи развития ЖХСНФ для решения аналитических задач и совершенствование аппаратного оформления. Описаны те возможности метода ЖХСНФ во вращающихся спиральных колонках, которые выгодно выделяют его в ряду других хроматографических методов – создание градиента концентрации реагента в неподвижной фазе, использование водно-полимерных систем и возможность концентрирования элементов, включая серу, из нефтяного сырья. Доклад д.т.н. А.Е. Костянина (ИОНХ) был посвящен другим вариантам метода – циклической противоточной жидкостно-жидкостной хроматографии, процессам хроматографического разделения смесей в замкнутом контуре с рециклом подвижной фазы, способам выделения концентрированных фракций целевых компонентов. Продемонстрированы математические подходы к описанию процессов разделения в циклической жидкостно-жидкостной хроматографии.

Третье заседание Московского семинара прошло 22 марта 2022 г. также в смешанном очно-дистанционном формате на базе ГЕОХИ РАН и было посвящено применению масс-спектрометрии для анализа микро- и наноразмерных объектов. В докладе А.Е. Каменщикова (ООО “НКЦ “ЛАБТЕСТ”) “Времяпролетные масс-спектрометры с индуктивно связанной плазмой (TOF-ICP-MS) в элементном и изотопном анализе микро- и наночастиц. Преимущества и возможности” было отмечено, что времяпролетная масс-спектрометрия в XXI веке стала одним из самых бурно развивающихся направлений анализа. Большую популярность для элементного и изотопного анализа микро- и наночастиц приобретают масс-спектрометры TOF-ICP-MS благодаря уникальному сочетанию ИСП как источника ионов и масс-спектральной системы, обеспечивающей высокоскоростную и практически одновременную регистрацию изотопов, а также высокое разрешение. Описание наночастиц (состав, концентрации, размерность) имеет решающее значение в токсич-

кологических, экологических и других исследованиях. Анализ одноэлементных наночастиц считается вполне решенной задачей с использованием масс-спектрометрии с ИСП в режиме единичных частиц (SP-ICP-MS). Для анализа многоэлементных наночастиц, составляющих значительную часть природных и изготовленных материалов, необходим селективный и высокочувствительный метод анализа, каким и является TOF-ICP-MS. Были приведены примеры успешного использования TOF-ICP-MS для решения разнообразных задач, связанных с определением микро- и наночастиц. В докладе М.С. Ермолина (ГЕОХИ РАН) “Масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой в режиме анализа единичных частиц (МС-ИСП-ЕЧ): новые возможности для исследования наночастиц окружающей среды” было показано, что МС-ИСП-ЕЧ позволяет анализировать сильноразбавленные суспензии наночастиц и определять концентрацию и размер наночастиц. В настоящее время МС-ИСП-ЕЧ широко используют для обнаружения и характеристики синтетических наночастиц при решении исследовательских задач в различных областях науки. Метод МС-ИСП-ЕЧ также активно используют для обнаружения и изучения поведения синтетических наночастиц в объектах окружающей среды. Рассмотрены основы метода МС-ИСП-ЕЧ, его возможности и ограничения при определении наночастиц окружающей среды. Приведены полученные авторами этим методом результаты исследований наночастиц вулканического пепла и городской пыли. В сообщении А.Е. Каменщикова (ООО “НКЦ “ЛАБТЕСТ”) “TOF-ICP-MS в сочетании с лазерной абляцией для картирования поверхности геологических образцов и биологических объектов” продемонстрировано, что масс-спектрометрию с индуктивно связанной плазмой в сочетании с лазерной абляцией широко используют в аналитических лабораториях. Появление новых материалов и технологий привело к созданию более совершенных и надёжных лазеров, эффективных ячеек для размещения образцов, более качественных оптических систем. Интересным и перспективным для решения самых разнообразных задач является комбинирование лазерной абляции с TOF-ICP-MS. Такое сочетание позволяет в десятки раз ускорить сканирование поверхности образца и при этом получить распределение одновременно любого количества изотопов.

Четвертое заседание семинара было проведено в конференц-зале ИОНХ РАН 26 апреля 2022 г. в смешанном формате, трансляция заседания велась в программе Яндекс-телемост. Семинар был посвящен центрам коллективного пользования и научно-образовательным центрам, позволяющим расширить круг аналитических задач или повысить квалификацию персонала. О создании и принципах развития Центра коллективного пользования ИОНХ РАН, основных прикладных

задачах, направлениях фундаментальных исследований и используемом аналитическом и диагностическом оборудовании сделала обзорный доклад “Аналитическая химия в ЦКП ИОНХ РАН: от академических исследований к прикладным задачам” д.х.н. В.Б. Барановская. Доклад был посвящен новому этапу развития ЦКП Института общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН. Центр сформирован на основе принципа “триады диагностических параметров: состав, структура, свойства” и оснащен современным аналитическим и диагностическим оборудованием. Нестереотипность аналитических задач, междисциплинарный характер исследований, уникальные перспективные материалы бросают вызов традиционным подходам к определению химического состава. Академические исследования, проводимые совместно с создателями новых химических соединений и материалов, направлены на расширение возможностей спектральных, в том числе рентгеноспектральных, и масс-спектрометрических методов. Подчеркивалось, что прикладная аналитическая химия имеет ряд особенностей, которые наряду с опорой на результаты фундаментальных исследований, требуют разработки серии обязательных процедур, обеспечивающих достоверность, стабильность и надежность аналитического контроля. Показана необходимость корреляции методической деятельности и метрологического обеспечения методик химического анализа с международной практикой.

В сообщении Е.В. Рыбаковой (ООО “Аналитек”) “Курсы повышения квалификации химиков по ВЭЖХ и ионной хроматографии с учетом приборного оснащения и аналитических задач участников. Опыт организации и проведения” были обозначены проблемы переподготовки специалистов-химиков с высшим образованием и повышения их квалификационного потенциала в целом, а также в области аналитической химии, в частности. Отражены особенности (в том числе психологические) профессионального обучения состоявшихся специалистов-химиков; дана информация о юридических и практических аспектах организации курсов повышения квалификации химиков-аналитиков; обоснован авторский подход к содержательной и методологической части курса повышения квалификации по хроматографическим методам; представлено содержание авторского курса по хроматографии по этапам.

Доклады на всех проведенных семинарах вызвали живой интерес, о чем можно судить по множеству заданных вопросов и дискуссии после каждого выступления. В качестве пожелания можно сказать, что для аспирантов, специализирующихся в области аналитической химии, посещение таких семинаров было бы крайне полезно.

А.В. Иванов, П.С. Федотов

ЮБИЛЕЙ ПРОФЕССОРА В.Н. МАЙСТРЕНКО

DOI: 10.31857/S0044450222120106



8 сентября 2022 г. исполнилось 75 лет заведующему кафедрой аналитической химии Башкирского государственного университета, доктору химических наук, профессору Валерию Николаевичу Майстренко. Он родился в п. Новиковка Аургазинского района Башкирской АССР. В 1970 г. Валерий Николаевич закончил химический факультет Башкирского государственного университета и поступил в аспирантуру при Казанском университете. В 1975 г. защитил кандидатскую диссертацию. В 1971–1972 гг. проходил службу в Вооруженных Силах. С 1975 г. и по настоящее время работает в Башкирском государственном университете в должностях ассистента, доцента, профессора. С 1989 по 1993 гг. был деканом химического факультета. В 1990 г. защитил докторскую диссертацию, с 1992 г. профессор.

После основания в Уфе НИИ безопасности жизнедеятельности в 1993 г. Валерия Николаевича,

на тот момент уже известного в стране химика-аналитика, пригласили присоединиться к разработке программ “Диоксин”, “Экология Башкортостана”, “Предупреждение и ликвидация последствий чрезвычайных ситуаций” и др. В 1993–1996 гг. он работал заместителем директора по науке, а в 1996–2009 гг. — директором указанного НИИ. Под его руководством институт стал одним из ведущих научных центров в области аналитической химии объектов окружающей среды, экологии и безопасности жизнедеятельности. В институте была создана одна из лучших в России лабораторий по контролю содержания диоксинов и других стойких органических загрязнителей в объектах окружающей среды.

Начиная с 2012 г. Валерий Николаевич заведует кафедрой аналитической химии БашГУ. За 10 лет была полностью обновлена материальная база кафедры, создано новое направление в области вольтамперометрии — хиральные электрохимические сенсоры, воспитана целая плеяда учеников, существенно повышен уровень научных работ. Научные интересы В.Н. Майстренко: сенсорные системы типа “электронный язык” на базе методов вольтамперометрии и импедансной спектроскопии для распознавания лекарственных средств, напитков, технических жидкостей, энантиоселективные сенсоры и мультисенсорные системы для определения биологически активных соединений, развитие хемометрических методов обработки многомерных данных. Прикладные аспекты деятельности В.Н. Майстренко связаны с разработкой методов определения токсичных металлов, стойких органических загрязнителей и других органических веществ в природных и промышленных объектах, их аттестацией и внесением в Госреестр РФ.

В.Н. Майстренко является председателем Комиссии по электрохимическим методам анализа Научного совета РАН по аналитической химии, членом бюро совета, председателем Научного совета АН РБ по экологии и природопользованию, членом ряда диссертационных советов. Как специалист по аналитической химии объектов окружающей среды он участвовал в работе международных комиссий по экологическим экспертизам в Киргизии и на Украине. Является членом редколлегии “Журнала аналитической химии”, жур-

налов “Безопасность в техносфере” и “Вестник Башкирского университета”.

В.Н. Майстренко подготовил трех докторов наук и 21 кандидата наук в области аналитической химии и химической экологии. Активно участвовал в подготовке и проведении более 10 всероссийских конференций по проблемам аналитической химии объектов окружающей среды и электрохимического анализа. Он является автором 10 монографий, учебника для вузов, 2 учебных пособий. За достигнутые успехи в области науки и образования В.Н. Майстренко присвоено почетное звание “Заслуженный деятель науки и техники Республики Башкортостан” (2001 г.), дважды ему присуждалась стипендия Президента РФ для ведущих ученых России (1997–2000 гг., 2001–

2003 гг.). Он – член-корреспондент Академии наук Республики Башкортостан, многократно награждался почетными грамотами и благодарностями руководства Башкирии.

Валерий Николаевич является одним из самых известных и авторитетных специалистов в области электрохимических методов анализа в стране. Его ценят и уважают коллеги, на его жизненный пример равняется младшее поколение химиков-аналитиков.

Редакция “Журнала аналитической химии” и коллектив кафедры аналитической химии БашГУ сердечно поздравляют юбиляра и желают ему новых успехов и достижений на благо российской науки.