

# СОДЕРЖАНИЕ

---

---

Том 76, номер 9, 2021

---

---

**Номер содержит работы по методам разделения и концентрирования.**

**Редакторы-составители: В.П. Колотов, З.А. Темердашев, Г.И. Цизин**

## ОБЗОРЫ

Методы разделения и концентрирования при определении высокотоксичных органических соединений (отравляющих веществ)

*М. А. Ленинский, М. Д. Шачнева, Е. И. Савельева, Н. Л. Корягина* 771

Влияние модификаторов на электрофоретическое разделение и внутрикапиллярное концентрирование биологически активных соединений

*А. В. Кравченко, Л. А. Карцова* 788

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Сравнение аналитических возможностей различных схем хроматомембранной газовой экстракции

*О. В. Родинков, А. С. Бугайченко, Л. Н. Москвин* 797

Микроэмульсионное концентрирование стероидных гормонов из водных растворов и образцов мочи

*Л. А. Карцова, С. А. Соловьева, Е. А. Бессонова* 804

Мицеллярная экстракция активных компонентов из специй и оценка Се(IV)-восстанавливающей способности извлечений

*Г. К. Зиятдинова, Г. К. Будников* 812

Оценка содержания изофлавоноидов в клевере луговом (*Trifolium pratense* L.) из семейства бобовые (*Fabaceae*) в условиях экстракции различными способами

*З. А. Темердашев, Т. К. Чубукина, Е. А. Виноцкая, М. В. Нагалецкий, Н. В. Киселева* 819

Новый сорбент для гидрофильной хроматографии на основе силикагеля, модифицированного по реакции Уги

*Н. Ю. Чикурова, А. О. Шемякина, Д. Э. Брыскина, В. Н. Нуриев, А. А. Комаров, М. А. Статкус, А. Н. Ставрианиди, А. В. Чернобровкина* 832

Разделение рацемата пентанола-2 на хиральной неподвижной фазе на основе гомохиральных кристаллов  $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , полученных в условии созревания Виедмы

*Ю. Ф. Шарафутдинова, А. Ш. Ганиева, В. Ю. Гуськов* 844

Проточное фракционирование во вращающейся спиральной колонке при разработке стандартных образцов природных наночастиц

*М. С. Ермолин, А. И. Иванеев, П. С. Федотов* 850

Экстракционное вымораживание с центрифугированием – новая технология пробоподготовки в химическом анализе на примере органических оснований

*В. Н. Бехтерев* 859

---

---



УДК 543.51,543.054

## МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ И КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ ВЫСОКОТОКСИЧНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ (ОТРАВЛЯЮЩИХ ВЕЩЕСТВ)

© 2021 г. М. А. Ленинский<sup>а</sup>, \*, М. Д. Шачнева<sup>а</sup>, Е. И. Савельева<sup>а</sup>, Н. Л. Корягина<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека Федерального  
медико-биологического агентства России

ст. Капитолово, г. п. Кузьмоловский, Всеволожский район, Ленинградская обл., 188663 Россия

\*e-mail: m.leninskii@yandex.ru

Поступила в редакцию 06.04.2021 г.

После доработки 21.04.2021 г.

Принята к публикации 21.04.2021 г.

В обзоре рассмотрены и обобщены методы разделения и концентрирования при определении токсикантов 1-го класса опасности, а именно отравляющих фосфорорганических веществ нервно-паралитического (группа изомеров Vx, зарин, циклозарин, зоман, табун) и кожно-нарывного действия (сернистый иприт).

**Ключевые слова:** газовая хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография, тандемное масс-селективное детектирование, фосфорорганические отравляющие вещества, сернистый иприт, твердофазная экстракция, дериватизация.

**DOI:** 10.31857/S0044450221090073

Отравляющие вещества (ОВ) или так называемые токсичные химикаты были предназначены для поражения живой силы противника во время военных действий [1]. В соответствии с международной Конвенцией о запрещении химического оружия (ХО) [2] к настоящему времени его запасы преимущественно уничтожены, но действие Конвенции продолжается в направлении контроля неиспользования и нераспространения ХО. Аналитические процедуры, используемые для определения ОВ и продуктов их трансформации, широко представлены в оригинальных статьях и обзорах.

Актуальность высокочувствительного и надежного определения ОВ в объектах окружающей среды и биопробах обусловлена требованиями химической безопасности при перепрофилировании бывших объектов уничтожения химического оружия, верификационной деятельностью в соответствии с Конвенцией о запрещении химического оружия и необходимостью противодействия химическому терроризму.

Процедуры определения ОВ и продуктов их трансформации в объектах окружающей среды и биопробах непрерывно совершенствуются. Основным методическим пособием для лабораторий, специализирующихся на определении ОВ, является сборник рекомендованных операционных процедур (Recommended Operating Proce-

dures, ROP) [3]. Процедуры пробоподготовки, представленные в ROP, прошли апробацию в рамках решения задач международных тренировочных и квалификационных тестов, проводимых Организацией по запрещению химического оружия (ОЗХО), и были успешно применены при расследовании случаев применения ХО. Сборник содержит информацию о методах извлечения, концентрирования и определения ОВ и продуктов их трансформации в матрицах различной природы – воде, почве, полимерных материалах, биопробах и др. Основными методами извлечения аналитов и очистки образцов от матричных компонентов, представленными в ROP, являются: фильтрация, центрифугирование, замена растворителя, твердофазная экстракция (ТФЭ), твердофазная микроэкстракция (ТФМЭ), жидкофазная микроэкстракция. Концентрирование экстрактов, содержащих целевые вещества, предлагается осуществлять в токе азота, в роторных испарителях, а также в центрифужных концентраторах.

Ввиду беспрецедентной чувствительности и селективности для определения ОВ преимущественно применяют хромато-масс-спектрометрические (ХМС) методы. В 2021 г. Рыбальченко с соавт. опубликовал обзор [4], посвященный ХМС-методам определения маркеров и биомаркеров ОВ. В обзоре обсуждены достоинства и недостатки различных вариантов ХМС-анализа для

определения ОВ и продуктов их трансформации, представлена система профессионального тестирования лабораторий ОЗХО. В то же время процедуры разделения и концентрирования, применяемые при определении ОВ в сложных матрицах, в современной литературе обсуждаются значительно реже, чем техника ХМС-анализа, хотя они имеют особое значение в аналитической химии ОВ. Ввиду чрезвычайно высокой токсичности ОВ даже летальные их дозы соответствуют крайне низким концентрациям, а высокая реакционная способность приводит к необратимой сорбции материалами или стремительному разложению в них. В биологических пробах ОВ могут быть обнаружены в виде низкомолекулярных метаболитов или конъюгатов с биомолекулами. В обоих случаях извлечение метаболитов из биоматриц и их концентрирование, как правило, представляют собой комбинации последовательных стадий, на каждой из которых существует опасность потери аналитов. В системе профессиональных тестов ОЗХО лаборатории-участники используют типовое ХМС-оборудование, в то время как применяемые процедуры разделения и концентрирования характеризуются значительным разнообразием. Что касается методов обнаружения ОВ в полевых (onsite) условиях, то при очевидной важности до настоящего времени они не охвачены системой профессионального тестирования ОЗХО.

### КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ ОТРАВЛЯЮЩИХ ВЕЩЕСТВ В ПОЛЕВЫХ УСЛОВИЯХ ИЗ ВОЗДУШНОЙ СРЕДЫ

Известно, что ОВ не только чрезвычайно токсичны, но и способны к быстрому испарению и распространению в воздухе. Наиболее вероятный путь их воздействия как оружия массового поражения – ингаляционный. Технологии обнаружения и идентификации ОВ в воздухе наиболее востребованы в антитеррористических целях. В последние годы разработано большое количество мобильных приборов для обнаружения ОВ в полевых условиях [5]. При использовании большинства детекторов для onsite обнаружения ОВ в потоковом режиме их концентрирование не предусмотрено. При этом, однако, продолжают поиски оптимальных решений для концентрирования ОВ из воздушной среды. Отбор и концентрирование ОВ из воздушных проб осуществляются либо в активном, либо в пассивном режиме. В первом случае отдающая среда принудительно прокачивается через принимающую. Примером могут служить портативные системы для анализа методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС), снабженные приставкой для сорбции и термодесорбции [6]. Такие приборы серийно выпускаются и хорошо себя зарекомендовали, но

сорбционное концентрирование в активном режиме требует специального оборудования и “захлабывается”, если в воздухе много пыли. Концентрирование органических соединений в пассивном режиме за счет диффузии осуществляется на полиуретановых пенах [7], сорбентах, импрегнированных полиуретановыми пенами [8], различных пористых полимерных сорбентах [9]. Наиболее часто используют ТФМЭ для пассивного отбора/концентрирования ОВ из воздушной среды [10]. В полевых условиях хорошо зарекомендовали себя микромеханические сенсорные системы на основе точного измерения массы связанного вещества [11]. Томас и Спизер [12] использовали этот метод для исследования механизма и кинетики адсорбции микроконцентраций ОВ на двусторонних консолях, покрытых нанотрубками с двуокисью титана. Оказалось, что геометрия нанотрубок в значительной степени обуславливает эффективность адсорбции имитаторов фосфорорганических ОВ (ФОВ). Диффузия ФОВ из воздуха в нанотрубки осуществляется последовательно через наружную поверхность, внутренние каналы и мезопоры. Далее происходит адсорбция ФОВ на активных центрах внутренней поверхности микропор нанотрубок. На этой стадии достигается равновесие, и именно она является лимитирующей по времени. Кинетические параметры очень важны, поскольку обнаружение высокотоксичных веществ в воздухе должно быть максимально приближено к режиму реального времени. До настоящего времени нет единого мнения об оптимальной кинетической модели адсорбции органических соединений из воздуха нанотрубками. Кинетическая модель псевдопервого порядка [13] основана на допущении, что скорость адсорбции пропорциональна количеству активных сайтов на сорбирующей поверхности. В рамках модели псевдодвухго порядка [14] предполагается образование химической связи адсорбат–адсорбент, и этот процесс является лимитирующим. В обоих случаях скоростью диффузии молекул адсорбата к активным сайтам адсорбента пренебрегают [15]. Двухэкспоненциальная модель [16], описывающая диффузию и адсорбцию как два процесса, которые могут осуществляться параллельно либо последовательно, наиболее близка к практике.

При разработке новых подходов к анализу воздушной среды в полевых условиях в качестве аналитов рассматриваются заранее неизвестные ОВ, поэтому сорбирующие устройства должны быть универсальными, т.е. применимыми для улавливания и концентрирования в идеале любых летучих и среднетлетучих ОВ. При этом в процессах хемосорбции учитывается, что все они являются сильными электрофилами. Анализ других объектов окружающей среды (вода, воздух, строительные материалы) чаще проводят в стационарных

лабораториях, когда уже предположительно известно, какой тип ОВ мог послужить причиной инцидента. До настоящего времени чрезвычайные ситуации, обусловленные террористическими актами, локальными военными конфликтами или непреднамеренным контактом с захороненным или затопленным ХО, преимущественно были связаны с сернистым ипритом или ФОВ. Эти же вещества были накоплены в качестве ХО, затем подлежали уничтожению в соответствии с Конвенцией о его запрещении и, следовательно, должны были контролироваться в объектах природной и техногенной сред в целях обеспечения химической безопасности. В этой связи в настоящем обзоре рассмотрены методы разделения и концентрирования, применяемые в стационарных лабораториях при определении сернистого иприта и ФОВ, а также продуктов их трансформации.

### СПОСОБЫ ИЗВЛЕЧЕНИЯ ИЗ МАТРИЦ И КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ СЕРНИСТОГО ИПРИТА И ПРОДУКТОВ ЕГО ТРАНСФОРМАЦИИ ПРИ АНАЛИЗЕ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Извлечение и концентрирование ОВ кожно-нарывного действия, в частности сернистого иприта (далее иприта), из неполярных матриц является сложной задачей в связи с липофильной природой данных ОВ, обуславливающей их сродство к неполярным матрицам. В доступной литературе имеется ограниченное количество публикаций на данную тему [3, 17]. Согласно рекомендациям [3] ТФЭ на силикатных картриджах и экстракция ацетонитрилом являются наиболее часто применяемыми процедурами для извлечения ОВ из образцов с высоким содержанием неполярных органических соединений. При этом отмечается, что сернистый иприт не удерживается эффективно на силикатной поверхности, что приводит к низкой степени его извлечения. В работе [18] исследован механизм сорбции иприта и показано, что на силикатной поверхности происходит его хемосорбция. В цитируемой работе также предложен новый способ эффективной экстракции иприта из неполярных матриц. Для этого был синтезирован сополимер, состоящий из метакриловой кислоты и этиленгликольдиметакрилата, который использовали в качестве сорбента для ТФЭ при извлечении иприта из дизельного топлива. В ряду экстрагентов опробовали дихлорметан, хлороформ, ацетон и этилацетат. Последний выбрали в качестве оптимального, поскольку он обеспечивал степень извлечения иприта с полимерного сорбента на уровне 75–87%, а также наилучший хроматографический профиль при разделении методом газовой хроматографии на капиллярной колонке с неполярной неподвиж-

ной фазой. Промывку картриджей после нанесения образцов осуществляли гексаном. Показано, что 1 мл гексана эффективно удаляет углеводородные матричные компоненты без потери анализа.

В работе [19] для извлечения десяти продуктов деструкции иприта из образцов воды был разработан сорбент на основе углеродного аэрогеля. Углеродный аэрогель является перспективным материалом для ТФЭ ввиду высокой пористости, очень низкой плотности и большой поверхности сорбирующего слоя. Элюирование десяти целевых продуктов деструкции иприта после нанесения образцов воды на картридж для ТФЭ с синтезированным сорбентом осуществляли 2 мл метанола. Степень извлечения анализов составила не менее 83%, а для некоторых достигала 99% и более.

Извлечение ОВ из проб воды в работе [20] осуществляли методом магнитной дисперсионной ТФЭ (magnetic dispersive solid-phase extraction). Принцип метода заключается в диспергировании микро- и наноразмерных магнитных частиц, импрегнированных сорбентом, в воде. Эффективная адсорбция аналита на сорбенте происходит благодаря его большой удельной поверхности. После извлечения частиц сорбента из воды методом магнитной сепарации проводят элюирование аналита органическим растворителем. Магнитный гидрофильно-липофильный сорбент синтезировали из N-винилпирролидона и дивинилбензола в качестве мономеров и наночастиц оксида железа ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) в качестве магнитного материала. Степень извлечения иприта при использовании синтезированного сорбента из образцов водопроводной, дистиллированной, дождевой и озерной воды с добавлением 5% NaCl во все образцы лежала в диапазоне 72–90%. Варьирование соотношения мономеров позволило получить сорбенты с желаемым гидрофильно-липофильным балансом для экстракции ОВ различной полярности. Широко используемыми коммерчески доступными гидрофильно-липофильными сорбентами являются Oasis HLB (Waters) и Supel-Select HLB (Supelco).

Магнитный нанокompозитный сорбент  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-G}$ , синтезированный путем ковалентного связывания покрытого силикатами  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  с графеновыми подложками, применяли в работе [21] для концентрирования ОВ из образцов воды методом дисперсионной ТФЭ. Диспергирование 20 мг сорбента в 200 мл воды с добавлением 30% NaCl проводили в течение 20 мин. Элюирование сорбированного иприта осуществляли смесью метанол-хлороформ. Степень извлечения иприта из образцов дистиллированной, водопроводной и сточной воды составила 95, 90 и

69% соответственно. Предел обнаружения иприта был на уровне 0.11 нг/мл.

Коммерчески доступные микроволокна для ТФМЭ достаточно давно применяются для определения ОВ и продуктов их деструкции в различных матрицах [22–24], однако не всегда удается достичь удовлетворительной эффективности экстракции. С целью повышения селективности извлечения и концентрирования иприта и циклических продуктов его трансформации (схема 1) из образцов воды и донных отложений методом ТФМЭ в работе [25] разработано девять модифицированных типов микроволокон с сорбирующими покрытиями на основе полиакрилатов и полиметакрилатов: полиметилакрилата, полиметилметакрилата, полиэтилакрилата, полиэтилметакрилата, полибутилакрилата, полибутилметакрилата, а также сополимеров полиметилакрила-

та и полиметилметакрилата, полиэтилакрилата и полиэтилметакрилата, полибутилакрилата и полибутилметакрилата. Аналиты определяли методом тандемной газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС/МС) в режиме ионизации электронами (ИЭ). Максимальную степень извлечения иприта и продуктов его трансформации обеспечивало микроволокно на основе полибутилакрилата. Пределы обнаружения аналитов составили 0.008–0.3 нг/г.

В последние годы ОЗХО инициировала исследования, направленные на определение ОВ и продуктов их трансформации в растениях. Байгильдиеву с соавт. [26] удалось продемонстрировать количественное извлечение некоторых продуктов трансформации иприта из гомогенизированных листьев кресс-салата с помощью жидкостной экстракции при ультразвуковом воздействии.

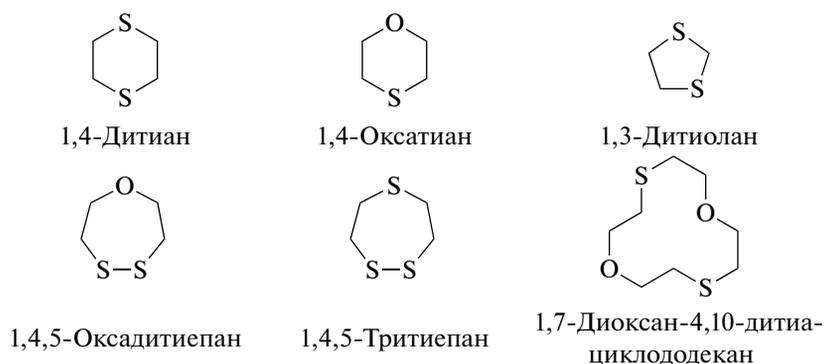


Схема 1. Циклические продукты трансформации сернистого иприта в объектах окружающей среды.

## РАЗДЕЛЕНИЕ И КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ ОТРАВЛЯЮЩИХ ВЕЩЕСТВ В ОБЪЕКТАХ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Как известно, ФОВ чрезвычайно токсичны, средняя летальная доза ( $LD_{50}$ ) для человека при трансдермальном пути поступления составляет: 4000 мг для табуна, 1700 мг для зарина, 300 мг для зомана, 10 мг для VX [27]. По этой причине процедуры определения ФОВ и продуктов их трансформации в объектах окружающей среды должны отвечать требованиям, предъявляемым к ультраследовому анализу. При проведении мониторинга ФОВ в объектах окружающей среды исследователи сталкиваются с чрезвычайным разнообразием анализируемых матриц. Данный аспект усложняет создание универсальной надежной процедуры пробоподготовки, в особенности это касается определения следовых количеств ФОВ. На сегодняшний день основными методами из-

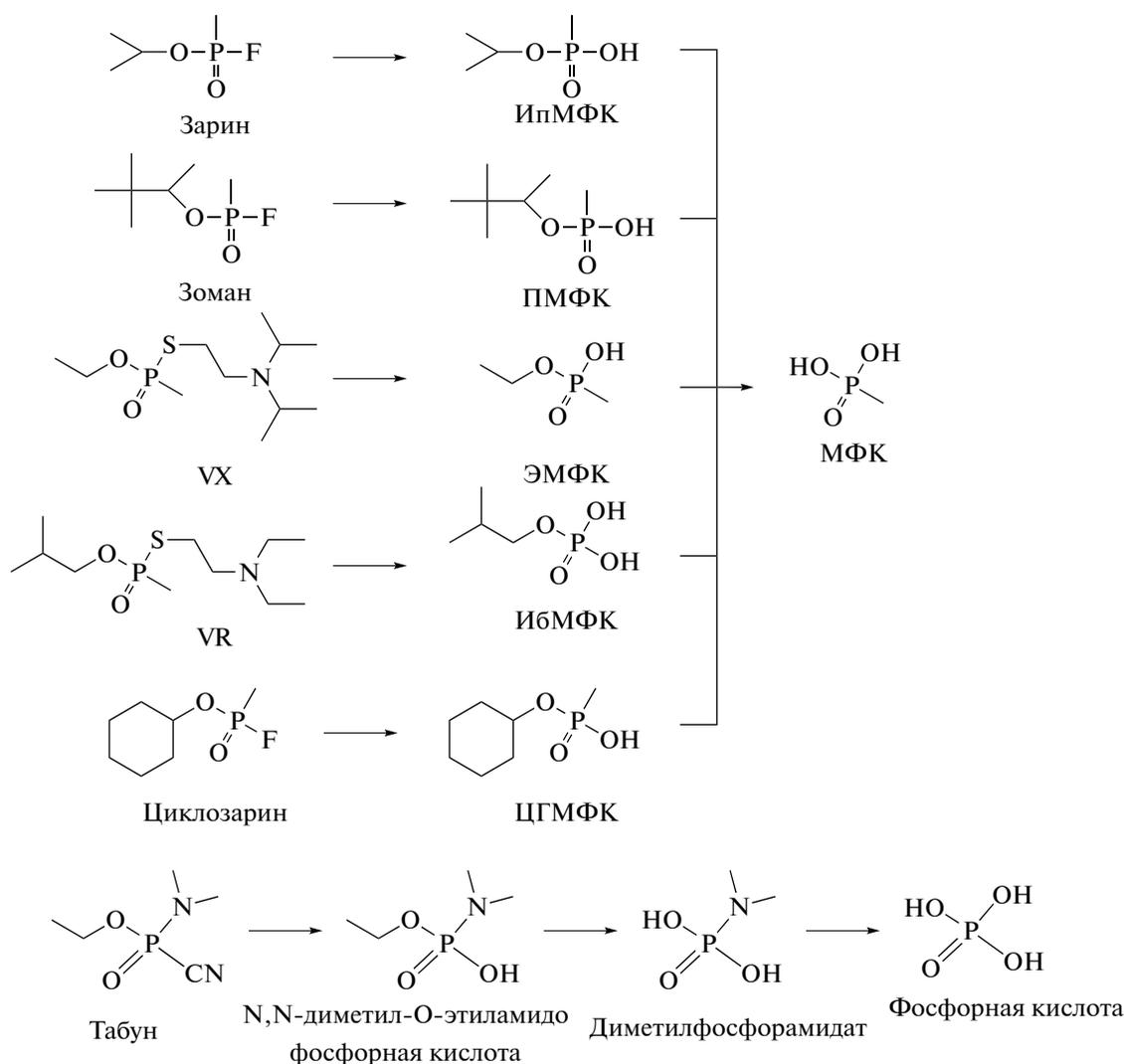
влечения аналитов из образцов объектов окружающей среды, взаимодействовавших с ФОВ, являются фильтрация, дериватизация, центрифугирование, ультразвуковая обработка, жидкостная экстракция, изолирование на ионообменных картриджах, замена растворителей, концентрирование путем удаления растворителя и ТФЭ. Последняя практически повсеместно заменила жидкостную экстракцию ввиду возможности организации анализа в потоковом режиме.

Стоит отметить, что изначально в качестве маркеров воздействия на окружающую среду рассматривались сами интактные ФОВ, их первичные продукты гидролиза, соответствующие алкилметилфосфоновые кислоты (АМФК), и конечный продукт гидролиза – метилфосфоновая кислота (схема 2).

В настоящее время известно, что ФОВ G-типа практически не способны к депонированию в объектах окружающей среды, в то время как ФОВ V-типа могут сохраняться в материалах с пористой тек-

стурой в течение длительного времени [28]. При этом количественное извлечение ФОВ V-типа из матриц, обладающих сорбционной активностью, как правило, не достигается. В работе [29] (2004 г.) достигнута рекордная степень извлечения ФОВ V-типа из почвы, составившая 60% через три месяца после внесения VX в почву. В более поздних работах

этот показатель так и не удалось улучшить. В качестве экстрагента использовали трис-буфер с pH 9, что близко к  $pK_a$  VX. Далее из водного экстракта почвы VX извлекали смесью гексана и дихлорметана 85 : 15 (по объему). Наряду с VX в этих же условиях удалось извлечь основной продукт распада VX в почве – бис(2-диэтиламиноэтил)сульфид.



**Схема 2.** Продукты гидролиза фосфорорганических отравляющих веществ (зарин – O-изопропилметилфторфосфонат; зоман – O-пинаколилметилфторфосфонат; VX – O-этил-S-(2-диизопропиламиноэтил)метилтиофосфонат; VR – O-изобутил-S-(2-диэтиламиноэтил)метилтиофосфонат; циклозарин – O-циклогексилметилфосфонат; табун – N,N-диметиламино-O-этилцианфосфат; ИпМФК – O-изопропилметилфосфоновая кислота (продукт гидролиза зарина); ПМФК – O-пинаколилметилфосфоновая кислота (продукт гидролиза зомана); ЭМФК – O-этилметилфосфоновая кислота (продукт гидролиза VX); ИбМФК – O-изобутилметилфосфоновая кислота (продукт гидролиза VR); ЦГМФК – O-циклогексилметилфосфоновая кислота (продукт гидролиза циклозарина); O-этил-N,N-диметиламино фосфат (продукт гидролиза табуна); МФК – метилфосфоновая кислота (универсальный маркер зарина).

Работы, относящиеся к 90-м годам прошлого века и к нулевым нынешнего, преимущественно выполнены с применением метода ГХ-МС на квадрупольных масс-анализаторах в режиме ИЭ [30]. Методами газовой хроматографии (ГХ)

АМФК определяют в виде летучих производных, которые получают при действии различных дериватизирующих агентов [31]. Дериватизацию алкилфосфоновых и алкилметилфосфоновых кислот проводят не только в целях получения летучих

производных для определения методами ГХ. В работе [32] дериватизацию этих соединений *n*-метоксифенацилбромидом проводили в целях повышения чувствительности анализа методом ВЭЖХ с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС).

Для концентрирования аналитов предпринимаются попытки создания высокоселективных сорбентов. Вызывает интерес работа [33], в которой в качестве метода концентрирования применили ТФЭ с молекулярным отпечатком. Данный метод заключается в комплексообразовании в растворе молекулы-шаблона с функциональными мономерами через нековалентные связи с последующей полимеризацией этих мономеров вокруг шаблона с помощью кросс-линкера. По окончании процесса полимеризации молекулы шаблона удаляют путем нарушения взаимодействия между шаблоном и мономерами, что приводит к образованию внутри полимера полостей с пространственным и функциональным распознаванием. В работе [34] с помощью ТФЭ с применением сорбента на основе диоксида циркония удалось достичь пределов определения 8.5–10 нг/мл для АМФК – продуктов гидролиза зарина, зомана, циклозарина и VX при ГХ-МС-детектировании.

На сегодняшний день ВЭЖХ-МС обеспечивает более высокочувствительное определение АМФК в воде [35, 36] и биожидкостях [37] по сравнению с ГХ-МС. В связи с этим в последние годы появилось много работ по определению маркеров ФОВ методом ВЭЖХ-МС. Так, в работе [38] авторы продемонстрировали в рамках одной процедуры возможность определения аналитов с существенно различающимися физико-химическими свойствами (зарин, зоман, VX, VR, циклозарин, табун и продукты их трансформации) в трех объектах: воде, желе (2 мас. % агар) и почве. Достигнуты пределы обнаружения аналитов от 1 до 10 нг/мл методом ВЭЖХ-МС высокого разрешения (ВР). Для концентрирования аналитов использовали улавливание на мембранных фильтрах из политетрафторэтилена (водные образцы), осаждение полисахаридов с последующим упариванием супернатанта (желе), 2-стадийную промывку с последующим концентрированием и перерастворением (почва). С помощью дериватизации 2-[(диметиламино)метил]фенолом [39] удалось достичь предела определения ФОВ G-типа (зарин, зоман, циклозарин) 1 пг/мл для образцов воды при детектировании методом ВЭЖХ-МС/МС.

Всплеск интереса к методам микроэкстракции для концентрирования ФОВ и продуктов их трансформации пришелся на первое десятилетие XXI в. Из наиболее поздних представляет интерес работа [40], в которой представлен метод жидкостно-жидкостно-твердофазной микроэкстракции. По-

ристый полимерный сорбент пропитывали органическим растворителем и помещали в водную среду, содержащую имитаторы ФОВ. Аналиты детектировали методом ИК-Фурье спектроскопии непосредственно на сорбенте. Элюировать аналиты с сорбента для последующего ХМС-анализа, по-видимому, было затруднительно.

До настоящего времени применительно к экстракции продуктов гидролиза ФОВ метод микроТФЭ (MEPS), для осуществления которого используют специальные шприцы со сменными картриджами, не находил широкого применения. Недостатком метода является узкий диапазон типов сорбентов в таких картриджах. Преимущественно это разновидности полидиметилсилоксана, который неэффективен для извлечения высокополярных аналитов и АМФК в частности. В работе [41] для извлечения продуктов гидролиза зарина из водных сред использовали микрокартриджи, изготовленные самими авторами из графитизированного угля, подвергнутого специальной обработке.

Одним из основных направлений в разработке новых методов разделения и концентрирования при подготовке проб к определению ФОВ и продуктов их трансформации является изготовление композитных сорбентов с нанодисперсными включениями. Обобщенная информация о наиболее актуальных методах концентрирования и разделения ФОВ в объектах окружающей среды приведена в табл. 1.

#### МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ И КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ МЕТАБОЛИТОВ СЕРНИСТОГО ИПРИТА В БИОПРОБАХ

Как уже отмечалось, процедура пробоподготовки, в особенности биомедицинских образцов, является критической и лимитирующей стадией химического анализа. Наиболее часто для извлечения и концентрирования всей линейки метаболитов ОВ из различных биологических матриц применяют ТФЭ. В литературе представлен большой объем публикаций по подбору условий ТФЭ и использованию данного способа экстракции для определения метаболитов сернистого иприта и других ОВ в моче и крови [3, 42–48] (табл. 2).

Сорбенты, способные обеспечивать гидрофильно-липофильный баланс (hydrophilic-lipophilic balance, **HLB**) могут удерживать воду, что важно для процесса сорбции, а также широкий спектр органических соединений различной природы. Картриджи для ТФЭ OASIS HLB (Waters) на основе сополимера дивинилбензола и N-винилпирролидона широко применяют для экстракции и концентрирования метаболитов иприта из образцов мочи и плазмы крови. Они подхо-

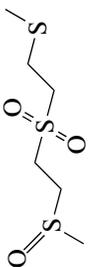
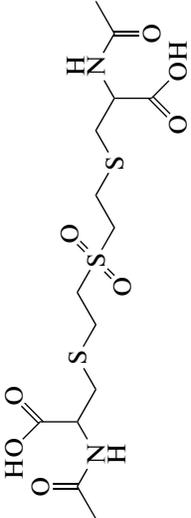
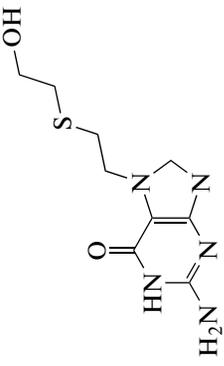
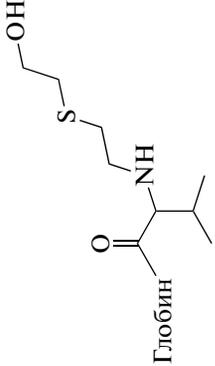
**Таблица 1.** Обобщенная информация о наиболее актуальных методах извлечения и разделения фосфорорганических отравляющих веществ в объектах окружающей среды

Объект анализа	Аналит	Способ извлечения аналитов	Метод анализа	Достигнутые пределы обнаружения	Литература
Почва	VX	Жидкостно-жидкостная экстракция	ГХ-МС	10 мкг/г	[28]
Вода	Продукты гидролиза зарина, зомана и VR	Дериватизация <i>n</i> -метоксифенацилбромидом	ВЭЖХ-МС/МС, ГХ-МС/МС	От 0.02 до 0.2 нг/мл, от 10 до 50 нг/мл	[31]
Вода	Продукты гидролиза зарина, зомана, циклозарина, табуна, VX	ТФЭ (сорбент на основе циркония)	ГХ-МС	От 8.5 до 10.0 нг/мл	[33]
Вода, гель (2 мас. % агара), почва	Зарин, зоман, VX, VR, циклозарин, табун и их продукты гидролиза	Водные образцы – мембранные фильтры из политетрафторэтилена. Агар-агар – осаждение полисахаридов с последующим упариванием супернатанта. Почва – 2-стадийная промывка с последующим извлечением и перерастворением	ВЭЖХ-МС/МС-ВР	От 1 до 10 нг/мл	[37]
Вода/сыворотка плазмы крови	Продукты гидролиза нервно-паралитических агентов	ТФЭ и дериватизация <i>n</i> -бромфенацилом	ВЭЖХ-МС/МС	От 1 до 5 нг/мл	[38]

Таблица 2. Обобщенные сведения о биомаркерах экспозиции сернистым ипритом и методах их извлечения и разделения

Биомаркер	Объект анализа	Метод извлечения	Метод анализа	Литература
<p>S-гидроксиэтилтиоэтилцистеин–пролин (HETE-CP)</p>	Плазма крови	ТФЭ (Oasis HLB)	ВЭЖХ-МС/МС	[44]
<p>S-гидроксиэтилтиоэтилцистеин–пролин–фенилаланин (HETE-CPPF)</p>	Плазма крови	ТФЭ (Oasis HLB)	ВЭЖХ-МС/МС	[43]
<p>1,1'-Сульфонилбис[2-(метилтио)этан] (SBMTЭ)</p>	Моча	ТФЭ (Oasis HLB; Chromabond C8)	ГХ-МС/МС-ИЭ	[46, 47]
<p>Тиодигликоль (ТД)</p>	Моча, плазма крови	ТФЭ (EASY Chromabond; Oasis HLB; картриджи с сорбентом на основе активированных углеродных волокон); ТФМЭ (100 мкм ПДМС)	ВЭЖХ-МС/МС ГХ-МС-ИЭ ГХ-МС/МС-ХИ	[46, 48, 51–53, 58]
<p>1,1'-Сульфонилбис-[2-(метилсульфинил)этан] (SBMSЭ)</p>	Моча	ТФЭ (Oasis HLB; картриджи с сорбентом на основе активированных углеродных волокон, полимерный картридж Елв+) )	ВЭЖХ-МС/МС	[49, 51, 52]

Таблица 2. Окончание

Биомаркер	Объект анализа	Метод извлечения	Метод анализа	Литература
<p>1-Метилсульфонил-2-[2-(метилтио)этилсульфонил]этан (МСМТЭСЭ)</p> 	Моча	ТФЭ (Oasis HLB; картриджи с сорбентом на основе активированных углеродных волокон, полимерный картридж Env+)	ВЭЖХ-МС/МС	[49, 51, 52]
<p>1,1'-Сульфонил-бис[2-S-(N-ацетилцистеинил)этан (СБСНАЭ)]</p> 	Моча	ТФЭ (Oasis HLB; картриджи с сорбентом на основе активированных углеродных волокон; Supelclean ENVI-8)	ВЭЖХ-МС/МС	[50–52, 55]
<p>N7-гидроксиэтилтиоэтилгуанин (N7-НЕТЕГ)</p> 	Моча, цельная кровь	ТФЭ (Supelclean ENVI-8; C18)	ВЭЖХ-МС/МС	[43, 54, 55]
<p>N-(2-гидроксиэтилтиоэтил)-DL-валин (НЕТЕ-Val)</p> 	Эритроциты	ТФЭ (Florisil)	ГХ-МС-ОХИ ГХ-МС/МС-ОХИ ГХ-МС/МС-ИЭ	[56, 57]

Обозначения: ГХ-МС-ХИ – газовая хромато-масс-спектрометрия в режиме химической ионизации; ПДМС – полидиметилсилоксан; ОХИ – отрицательная химическая ионизация.

дят для индивидуального извлечения ТДГ из мочи [49], одновременного извлечения  $\beta$ -лиазных метаболитов [50] и СБСНАЭ [51] из подкисленной мочи. Подкисление мочи до pH ниже 3–4 необходимо для эффективного удерживания СБСНАЭ на картридже HLB, так как способствует возникновению ион-парного взаимодействия между группами –COOH и ацетилированными аминогруппами и приводит к повышению гидрофобности аналита [51]. Авторы работы [52] предложили способ одновременного определения ТДГ, МСМТЭСЭ, СБМСЭ и СБСНАЭ методом ультра ВЭЖХ-МС/МС после концентрирования аналитов из предварительно подкисленных аммонийно-ацетатным буферным раствором образцов мочи методом ТФЭ на картриджах OASIS HLB. Степень извлечения ТДГ, СБСНАЭ, СБМСЭ и МСМТЭСЭ составила 74, 86, 96 и 77% соответственно.

Работа [53] посвящена исследованию и оптимизации процессов извлечения из мочи и концентрирования четырех мочевых метаболитов иприта (ТДГ, МСМТЭСЭ, СБМСЭ и СБСНАЭ) с использованием сорбента на основе активированных углеродных волокон (АУВ). Благодаря микропористой структуре активированного угля и большой удельной площади поверхности АУВ достигается эффективное обратимое удерживание ОВ и их метаболитов. В качестве элюентов авторы исследовали дихлорметан, ацетон и метанол, а также их смеси в различных объемных соотношениях с добавками и без добавок кислот. Оптимальной для элюирования ТДГ и МСМТЭСЭ была смесь дихлорметан–ацетон (9 : 1), а для элюирования СБМСЭ и СБСНАЭ – 3%-ная HCl в метаноле. Анализ проводили методом ВЭЖХ-МС/МС в режиме электрораспылительной ионизации. Предел обнаружения ТДГ составил 5 нг/мл, остальных метаболитов – 1 нг/мл.

Авторы работы [54] определяли ТДГ в плазме крови, отобранной у пострадавших во время локального военного конфликта на Ближнем Востоке в 2015 г., после щелочного гидролиза и процедуры очистки и концентрирования аналита методом ТФЭ на картридже EASY Chromabond (Macherey-Nagel) на основе сополимера полистирола и дивинилбензола. Элюирование ТДГ осуществляли 500 мкл ацетонитрила. После дериватизации гептафтормасляным ангидридом (ГФМА) ТДГ анализировали методом ГХ-МС-ИЭ. В пробах двух пострадавших из семи обнаружили ТДГ.

Для оптимизации условий извлечения и концентрирования четырех аддуктов иприта с ДНК в моче – N7-гидроксиэтилтиоэтилуанина (N7-НЕТЕГ), бис(2-этил-N7-гуанин)тиоэфира (Bis-G), N3-гидроксиэтилтиоэтиладенина (N3-НЕТЕА), O6-гидроксиэтилтиоэтилуанина (O6-НЕТЕГ) – авторы

работы [55] приготовили серию картриджей для ТФЭ, наполненных 0,2, 0,5 и 1 г сорбента C18. Режим элюирования целевых соединений подбирали путем варьирования соотношения вода–метанол–муравьиная кислота. Показано, что степень извлечения аддуктов иприта с ДНК максимальна, а матричный эффект существенно снижен при двухстадийном элюировании аналитов 2 мл смеси 20%-ного метанола и 5%-ной муравьиной кислоты (1 : 1) и 1,5 мл смеси 50%-ного метанола и 5%-ной муравьиной кислоты (1 : 1) с картриджами, наполненными 1 г сорбента C18. Анализ осуществляли методом ультра ВЭЖХ-МС/МС-изотопного разбавления. Пределы обнаружения составили 2–5 пг/мл.

Возможность одновременного определения аддуктов иприта с ДНК (N7-НЕТЕГ) и с ацетилцистеином (СБСНАЭ) в моче, после экспозиции крыс ипритом в условиях терапии скавенджером исследована в работе [56]. Определяемые аналиты обладают разными физико-химическими свойствами, поэтому процедуре подготовки образцов мочи для дальнейшего одновременного определения высокополярного СБСНАЭ и существенно менее полярного N7-НЕТЕГ уделили особое внимание. Были изучены пять типов коммерчески доступных ТФЭ-картриджей для извлечения и концентрирования аналитов (табл. 3). Для элюирования целевых соединений исследовали две системы растворителей (метанол–вода и ацетонитрил–вода) в различных объемных соотношениях. Максимальная эффективность одновременного концентрирования и извлечения N7-НЕТЕГ и СБСНАЭ из образцов мочи достигнута при элюировании аналитов с картриджа на основе силикагеля с привитыми группами C8 (Supelclean ENVI-8) подкисленной смесью ацетонитрил–вода (60 : 40). Анализ осуществляли методом ВЭЖХ-МС/МС-ВР. Авторы указывают на существенный матричный эффект при определении N7-НЕТЕГ. Его снижения не удалось добиться ни изменением условий удерживания аналита на сорбенте, ни подбором условий элюирования. От промывки картриджа после пропускания мочи пришлось отказаться, так как при этом не удалось избежать потерь аналита. Незначительного снижения матричного эффекта достигли лишь при разбавлении готового к анализу образца равным количеством воды. Сильное матричное влияние было характерно для мочи крыс, поскольку даже в холостых образцах регистрировался сигнал иона с массовым числом  $m/z$  256,08, совпадающим с  $m/z$  иона-прекурсора определяемого биомаркера N7-НЕТЕГ. По этой причине данный биомаркер может быть достоверно идентифицирован только по иону-продукту и с использованием внутреннего стандарта. Приведенный пример иллюстрирует необходимость разработки новых подходов к очистке проб от матричных

компонентов без потери целевых аналитов, поскольку путем перебора известных вариантов ТФЭ эту проблему решить далеко не всегда удается.

В работе [57] аддукт иприта с N-терминальным валином в глобине (HETE-Val) определяли в виде производного с пентафторфенилизотиоцианатом и ГФМА. Для оптимизации процедуры очистки и концентрирования методом ТФЭ исследовали два типа картриджей – на основе силикагеля и силанизированного силикагеля (Florisil). Несмотря на то, что картридж на основе силикагеля эффективно устраняет матричные компоненты, степень извлечения аддукта была неудовлетворительной, а при низких концентрациях происходила необратимая сорбция аналита. Подбор оптимального экстрагента осуществляли на картридже Florisil. Исследовали экстракционную способность этилацетата, диэтилового эфира, толуола, анизола, дихлорметана, ацетонитрила и их смесей в различных объемных отношениях. Наилучшая степень извлечения HETE-Val (56%) достигнута при элюировании аналита 2 мл смеси этилацетат–дихлорметан (1 : 9). Анализ проводили методом ГХ-МС в режиме отрицательной химической ионизации (ОХИ), а также методом ГХ-МС/МС в режимах ИЭ и ОХИ [58].

До настоящего времени для эффективного извлечения из биоматриц и концентрирования такого, казалось бы, простого вещества, как ТДГ, оптимального решения не найдено. В работе [59] для извлечения ТДГ из биоматриц применяли метод ТФМЭ после дериватизации аналита ГФМА непосредственно в биообразце. Анализ осуществляли методом ГХ-МС-ИЭ. Исследовали пять коммерчески доступных микроволокон с различной толщиной сорбирующего слоя и полярностью: 30 мкм полидиметилсилоксан (ПДМС), 100 мкм ПДМС, 85 мкм карбоксен/ПДМС, 70 мкм карбовакс/дивинилбензол и 85 мкм полиакрилат. Наиболее эффективным для концентрирования производного ТДГ с ГФМА из образцов плазмы крови и мочи оказалось микроволоконно 100 мкм ПДМС, с помощью которого был достигнут предел обнаружения аналита в исследуемых пробах, сравнимый с эндогенным уровнем ТДГ в биообразцах (1 нг/мл).

Определение метаболитов сернистого иприта в моче и плазме крови предлагалось в качестве задач первого (2016 г.) и шестого (2021 г.) квалификационных тестов ОЗХО по анализу биомедицинских образцов. Разбор результатов шестого теста позволит проследить эволюцию методов разделения и концентрирования, используемых ведущими лабораториями мира при решении этих сохраняющих актуальность, задач.

**Таблица 3.** Картриджи для твердофазной экстракции, используемые для извлечения и концентрирования N7-HETEG и СБСНАЭ [56]

Торговое наименование картриджа (фирма)	Сорбент
OASIS HLB (Waters)	Сополимер дивинилбензола и N-винилпирролидона
Supel-Select HLB (Supelco)	Полистирол с гидрофильными группами
Supelclean ENVI-8 (Supelco)	Силикагель с привитыми октильными группами C8
Supelclean LC18 (Supelco)	Силикагель с привитыми октадецильными группами C18
Sep-Pak C18 (Waters)	Силикагель с привитыми октадецильными группами C18

#### СТАНДАРТНЫЕ И ИННОВАЦИОННЫЕ ПОДХОДЫ К ОПРЕДЕЛЕНИЮ МЕТАБОЛИТОВ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ ОТРАВЛЯЮЩИХ ВЕЩЕСТВ В БИОПРОБАХ

При установлении факта применения ФОВ по результатам анализа биомедицинских проб следует исходить из того, что детектирование интактных ФОВ в неизменном виде практически не представляется возможным ввиду их стремительного метаболизма [60–62]. Гидролитические метаболиты ФОВ (АМФК) с применением процедур концентрирования могут быть обнаружены в организме в течение длительного периода времени, однако даже при воздействии высоких доз их прямое определение в биожидкостях возможно в течение нескольких суток, а чаще нескольких часов после отравления [63]. Опубликовано значительное количество методик определения этих метаболитов в плазме и моче. Выделение АМФК из плазмы или мочи возможно с применением жидкостной экстракции [63] или ТФЭ [64]. Эти соединения определяют с помощью жидкостной или газовой хроматографии. В последнем случае требуется проведение предварительной дериватизации [65]. В настоящее время, благодаря возможностям tandemной масс-спектрометрии, например МС/МС с тройным квадруполом и МС-ВР, возможно обнаружение продуктов гидролиза ФОВ в плазме крови и моче с пределом обнаружения вплоть до нескольких пг/мл [63, 66–68]. Такая высокая чувствительность определения позволяет фиксировать продукты гидролиза ФОВ в период до нескольких недель после воздействия [66].

В рамках ретроспективного анализа оптимальная стратегия, используемая для установления/подтверждения факта применения ФОВ, ос-

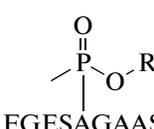
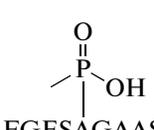
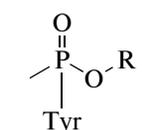
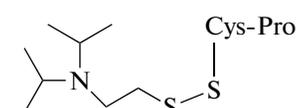
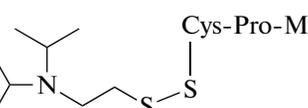
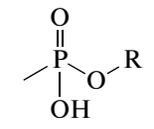
нована на механизме их связывания с белками крови, такими как ацетилхолинэстераза (АХЭ), бутирилхолинэстераза (БХЭ) и сывороточный альбумин (СА). Время жизни конъюгатов ФОВ с биомолекулами сопоставимо с временем жизни этих биомолекул в организме. Так, период полураспада БХЭ составляет примерно 12 дней [69], аддукты с АХЭ эритроцитов потенциально могут сохраняться на протяжении всего времени жизни эритроцитов – до 100 сут [70], сывороточный альбумин – 20–25 сут [71]. Это означает, что аддукты с белками могут служить в качестве ретроспективных биомаркеров воздействия ФОВ. Оптимальными биомаркерами являются аддукты ФОВ с БХЭ и СА, так как они присутствуют в плазме крови, которая является более стабильной матрицей для хранения, транспортировки и обработки образцов, чем цельная кровь. Важным соображением является и то, что концентрация БХЭ примерно в 10 раз выше концентрации АХЭ в крови [72]. Наиболее простым методом обнаружения аддукта ФОВ с БХЭ является реактивация фторид-ионом. Во время инкубации образца плазмы с ионами фтора ФОВ G-типа или фторангидрид ФОВ V-типа высвобождается и может быть экстрагирован ГХ-совместимым растворителем и впоследствии проанализирован с помощью ГХ. Минимальная обнаруживаемая степень ингибирования БХЭ, которая может быть установлена с помощью этого метода, зависит от типа ГХ-детектора. Типичные недорогие детекторы, такие как азотно-фосфорный, пламенно-фотометрический и масс-селективный, показывают абсолютные пределы обнаружения около 1 пг, что означает, что концентрация 1 нг/мл может быть обнаружена при введении в инжектор хроматографа пробы объемом 1 мкл. Основным недостатком метода является то, что не все аддукты ФОВ поддаются реактивации фторид-ионом; наиболее известным примером является состаренный аддукт зомана.

В 2002 г. в работе [73] описан метод, основанный на ВЭЖХ-МС/МС-определении фосфонированного нонапептида, полученного после ферментативного гидролиза пепсином БХЭ, ингибированной ФОВ. Оптимальным методом определения фосфонированного нонапептида является ВЭЖХ-МС/МС с использованием режима мониторинга заданных реакций (selected reaction monitoring, SRM). Масса исходного иона зависит от массы фрагмента ФОВ, конъюгированного с пептидом [74]. В процессе фрагментации сначала удаляется фосфильная часть ФОВ. Характеристичными ионами-продуктами являются ионы с массовыми числами  $m/z$  778, 673 и 602, соответствующие фрагментам нативного пептида. Ионы-продукты фосфонированного нонапептида могут быть успешно идентифицированы в пределах отклонения от теоретических

массовых чисел 5 ppm. Фиддер с соавт. [73] описали процедуру извлечения БХЭ из плазмы с использованием самодельных прокаинамидных гелей. В последние несколько лет процедура пробоподготовки для выделения БХЭ из плазмы была еще более усовершенствована. В работе [75] продемонстрирована эффективность использования магнитных шариков, покрытых антителами, для выделения БХЭ из плазмы, что привело к лучшей очистке образца и повышению возможностей автоматизации метода. Метод иммуномагнитной сепарации оптимизирован [76] для количественного определения аддукта и повышения производительности анализа [77]. В 2019 г. опубликована работа [78], авторы которой использовали метод аффинной хроматографии для очистки БХЭ в качестве альтернативы выделению БХЭ с помощью антител. Анализ образующихся после фрагментирования ингибированной ФОВ БХЭ нонапептидов в настоящее время также применяется для биомониторинга воздействия на организм других ингибиторов холинэстеразы. Например, в работах [79] и [80] использовали аналогичный пептид для диагностики воздействия три-*o*-крезилфосфата, нейротоксический эффект которого обусловлен его метаболизмом в печени с образованием продукта биотрансформации 2-(*o*-крезил)-4Н-1,3,2-бензодиоксафосфоран-2-он (салингенинфосфат), ингибирующего БХЭ.

Другой подход представлен в работе [81]. Выделенный фосфонированный сериновый остаток ингибированной ФОВ БХЭ может быть превращен в щелочных условиях в дегидроаланиновый остаток, который впоследствии может вступать в типовые реакции, образуя универсальный для всех ФОВ биомаркер. Сывороточный альбумин также является целевым белком для ФОВ, особенно при тирозине-411, но с более низким сродством к ФОВ, чем БХЭ. В этом случае проводят протеолиз с применением проназы, далее тирозиновый аддукт определяют с помощью ВЭЖХ-МС. Аддукты ФОВ с альбумином являются неподверженными старению биомаркерами воздействия ФОВ и пестицидов [82, 83]. В случае интоксикации VX уходящей группой при связывании с белками является диизопропиламиноэтантол (ДИПАЭТ). Это соединение настолько специфично для VX, что может служить репрезентативным биомаркером воздействия VX. Свободная тиольная группа поддается реакции с белками, такими как альбумин, и связывается с различными цистеиновыми остатками с образованием дисульфидной связи. В работах [84, 85] сообщалось об определении аддукта ДИПАЭТ с альбумином в виде дипептида цистеин–пролин–ДИПАЭТ и трипептида метионин–пролин–цистеин–ДИПАЭТ, полученных в результате ферментативного гидролиза проназой. Эти биомаркеры являются наиболее специфичными для ФОВ V-типа.

**Таблица 4.** Обобщенные сведения о биомаркерах экспозиции фосфорорганических отравляющих веществ и методах их извлечения и разделения (метод анализа – ВЭЖХ-МС/МС)

Биомаркер	Метод извлечения	Литература
Объект анализа – плазма крови		
 FGESAGAAS Нонапептид, модифицированный по серину остатком ФОВ (FGES(AlkylMPA)AGAAS)	Ферментативный гидролиз пепсином БХЭ, ингибированной ФОВ	[72]
	Иммуно-магнитная сепарация для выделения БХЭ из плазмы, ультрамикрофльтрация	[76]
 FGESAGAAS Деалкилированный нонапептид, модифицированный по серину метил фосфоновой кислотой (МФК) (FGES(MPA)AGAAS) (F – фенилаланин, G – глицин, E – глутаминовая кислота, S – серин, A – аланин)	Выделение аддуктов АХЭ с использованием регенерируемого аффинного сорбента на основе хуприна (Hupresin)	[77]
 Тирозин, модифицированный ФОВ (AlkylMPA-Тир)	Протеолиз с применением проназы, ТФЭ на картриджах Strata SDB-L (стирол дивинилбензол)	[82]
 Дипептид, модифицированный по цистеину диизопропламиноэтанттиолом (цистеин–пролин–ДИПАЭТ)	Протеолиз с применением проназы, ультрамикрофльтрация	[84]
 Трипептид, модифицированный по цистеину диизопропламиноэтанттиолом (метионин–пролин–цистеин–ДИПАЭТ)		
Объект анализа – моча		
 Алкилметилфосфоновые кислоты (АМФК)	Фильтрация на мембранном фильтре и разбавление деионизованной водой	[36]

При использовании технологий определения биомаркеров ОВ, представляющих собой фрагменты биомолекул, модифицированных остатками ОВ (табл. 4), наиболее сложной является стадия извлечения целевых аналитов и их очистки от коэлюируемых примесей.

\* \* \*

Для извлечения и концентрирования ОВ и продуктов их трансформации из водных сред, включая вытяжки из почвы и донных отложений, а также биопробы, наибольшие перспективы дальнейшего развития имеет метод ТФЭ с применением гидрофильно-липофильных полимерных сорбентов, которые могут быть использованы в широком диапазоне рН загружаемых растворов и элюентов и способны обратимо удерживать вещества с существенно различающимися физико-химическими свойствами. При общей тенденции к упрощению процедур подготовки маркеров ОВ к инструментальному анализу определение фрагментированных аддуктов ОВ с биомолекулами даже при использовании высокоселективных методов ГХ-МС/МС и ВЭЖХ-МС/МС-ВР требует выделения из биоматриц, концентрирования и очистки аналитов. Различные варианты хромато-масс-спектрометрического анализа для идентификации ОВ и продуктов их трансформации, определяются типом используемого оборудования, в то время как процедуры разделения и концентрирования, применяемые разными лабораториями, часто основаны на оригинальных разработках и представляют большой научный интерес.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Франке З. Химия отравляющих веществ. Пер. с нем. М.: Химия, 1973. 440 с.
2. Convention on the Prohibition of the Development, Stockpiling and Use of Chemical Weapons and on their Destruction. Technical Secretariat of the Organisation for Prohibition of Chemical Weapons, The Hague, 1997. <http://www.opcw.org>. (21.03.2021).
3. Recommended Operating Procedures for Analysis in the Verification of Chemical Disarmament / Ed. Vaninen P. Helsinki: The Ministry for Foreign Affairs of Finland, 2017. 809 p. <http://www.helsinki.fi/verification/bluebook>. (13.04.2021).
4. Рыбальченко И.В., Байгильдиев Т.М., Родин И.А. Хромато-масс-спектрометрические методы определения маркеров и биомаркеров отравляющих веществ // Журн. аналит. химии. 2021. Т. 76. № 1. С. 32. (Rybal'chenko I.V., Baigil'diev T.M., Rodin I.A. Chromatography–mass spectrometry analysis for the determination of the markers and biomarkers of chemical warfare agents // J. Anal. Chem. 2021. V. 76. № 1. P. 26.)
5. Handbook of the Toxicology of Chemical Warfare Agents. 3rd Ed. / Ed. Gupta R.C. Amsterdam: Elsevier, 2020. 983 p.
6. Contreras J.A., Murray J.A., Tolley S.E., Oliphant J.L., Tolley H.D., Lammert S.A., Lee E.D., Later D.W., Lee M.L. Hand-portable gas chromatograph-toroidal ion trap mass spectrometer (GC-TMS) for detection of hazardous compounds // J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2008. V. 19. P. 1425.
7. Shoeib M., Harner T. Characterization and comparison of three passive air samplers for persistent organic pollutants // Environ. Sci. Technol. 2002. V. 36. № 19. P. 4142.
8. Genualdi S., Lee S.C., Shoeib M., Gawor A., Ahrens L., Harner T. Global pilot study of legacy and emerging persistent organic pollutants using sorbent impregnated polyurethane foam disk passive air samplers // Environ. Sci. Technol. 2010. V. 44. № 14. P. 5534.
9. Zhang X., Barnes J., Lei Y.D., Wania F. Semivolatile organic contaminants in the Hawaiian atmosphere // Environ. Sci. Technol. 2017. V. 51. № 20. P. 11634.
10. Bryant C.K., LaPuma P.T., Hook G.L., Houser E.J. Chemical agent identification by field-based attenuated total reflectance infrared detection and solid-phase microextraction // Anal. Chem. 2007. V. 79. P. 2334.
11. Yaminsky I., Gorelkin P., Kiselev G. Concurrence of intermolecular foci in monolayers // Jpn. J. Appl. Phys. 2006. V. 45. № 3B. P. 2316.
12. Thomas G., Spitzer D. Double-side microcantilevers as a key to understand the adsorption mechanisms and kinetics of chemical warfare agents on vertically-aligned TiO<sub>2</sub> nanotubes // J. Hazard. Mater. 2021. V. 406. P. 124672.
13. Viegas R.M., Campinas M., Costa H., Rosa M.J. How do the HSDM and Boyd's model compare for estimating intraparticle diffusion coefficients in adsorption processes // Adsorption. 2014. V. 20. P. 737.
14. Soltani R., Marjani A., Shirazian S. Facile one-pot synthesis of thiolfunctionalized mesoporous silica submicrospheres for Tl(I) adsorption: Isotherm, kinetic and thermodynamic studies // J. Hazard. Mater. 2019. V. 371. P. 146.
15. Simonin J.-P. On the comparison of pseudo-first order and pseudo-second order rate laws in the modeling of adsorption kinetics // Chem. Eng. J. 2016. V. 300. P. 254.
16. Tosun I. Ammonium removal from aqueous solutions by clinoptilolite: determination of isotherm and thermodynamic parameters and comparison of kinetics by the double exponential model and conventional kinetic models // Int. J. Environ. Res. Public Health. 2012. V. 9. P. 970–984.
17. Pardasani D., Palit M., Gupta A., Shukya P., Sekhar K., Dubey D. Sample preparation of organic liquid for off-site analysis of chemical weapons convention related compounds // Anal. Chem. 2005. V. 77. P. 1172.
18. Roy K., Goud D., Chandra B., Dubey D. Efficient extraction of sulfur and nitrogen mustards from nonpolar matrix and an investigation on their sorption behavior on silica // Anal. Chem. 2018. V. 90. № 14. P. 8295.
19. Joul P., Vaheer M., Kuhtinskaja M. Evaluation of carbon aerogel-based solid-phase extraction sorbent for the

- analysis of sulfur mustard degradation products in environmental water samples // *Chemosphere*. 2018. V. 198. P. 460.
20. *Singha V., Purohita A., Chinthakindia S., Taka R., Pardasania D., Shrivastava A., Dubey D.* Magnetic hydrophilic–lipophilic balance sorbent for efficient extraction of chemical warfare agents from water samples // *J. Chromatogr. A*. 2018. V. 1434. № 19. P. 39.
  21. *Chinthakindi S., Purohit A., Singh V., Tak V., Goud D., Dubey D., Pardasani D.* Iron oxide functionalized graphene nano-composite for dispersivesolid phase extraction of chemical warfare agents from aqueoussamples // *J. Chromatogr. A*. 2015. V. 1394. P. 9.
  22. *Gregory L. Kimm, Gary L. Hook, Philip A. Smith.* Application of headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry for detection of the chemical warfare agent bis(2-chloroethyl) sulfide in soil // *J. Chromatogr. A*. 2002. V. 971. P. 185.
  23. *Creek J., McAnoy A., Brinkworth C.* Rapid monitoring of sulfur mustard degradation in solution by headspace solid-phase microextraction sampling and gas chromatography mass spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2010. V. 24. P. 3419.
  24. *Popiel S., Sankowska M.* Determination of chemical warfare agents and related compounds in environmental samples by solid-phase microextraction with gas chromatography // *J. Chromatogr. A*. 2011. V. 1218. P. 8457.
  25. *Nawata J., Czuprynski K., Popiel S., Dziedzic D., Bełdowski J.* Development of the HS-SPME-GC-MS/MS method for analysis of chemical warfare agent and their degradation products in environmental samples // *Anal. Chim. Acta*. 2016. V. 933. P. 103.
  26. *Baygildiev T., Vokuev M., Braun A., Rybalchenko I., Rodin I.* Monitoring of hydrolysis products of mustard gas, some sesqui- and oxy-mustards and other chemical warfare agents in a plant material by HPLC-MS/MS // *J. Chromatogr. B*. 2021. V. 1162. P. 122452.
  27. *Vital de Oliveira O., Cuya Correa Ferreira E., da Silva Gonçalves A.* Theoretical investigations of human acetylcholinesterase inhibition efficiency by neurotoxic organophosphorus compounds // *Chem. Phys. Lett.* 2018. V. 706. P. 82.
  28. *Савельева Е.И., Ленинский М.А., Васильева И.А., Каракашев Г.В., Самченко Н.А.* Определение следовых количеств О-изобутил-S-[(2-диэтиламино)этил] метилфосфонотиоата и токсичного продукта его гидролиза методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием // *Аналитика и контроль*. 2021. Т. 25. № 1. С. 43.
  29. *Montauban C., Bégos A., Bellier B.* Extraction of nerve agent VX from soils // *Anal. Chem.* 2004. V. 76. № 10. P. 2791.
  30. *Meyers R.* Applications, theory, and instrumentation in encyclopedia of analytical chemistry. V. 2. West Sussex, UK: John Wiley & Sons Ltd., 2000. P. 1055.
  31. *Rohrbaugh D., Sarver E.* Detection of alkyl methylphosphonic acids in complex matrices by gas chromatography-tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr.* 1998. V. 809. № 1–2. P. 141.
  32. *Байгильдиев Т.М., Вокуев М.Ф., Орешкин Д.В., Браун А.В., Годовиков И.А., Рыбальченко И.В., Родин И.А.* *n*-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.)
  33. *Le Moullec S., Begos A., Pichon V., Bellier B.* Selective extraction of organophosphorus nerve agent degradation products by molecularly imprinted solid-phase extraction // *J. Chromatogr. A*. 2006. V. 1108. P. 7.
  34. *Kanaujia P., Pardasani D., Tak V., Purohit A., Dubey D.* Selective enrichment of the degradation products of organophosphorus nerve agents by zirconia based solid-phase extraction // *J. Chromatogr. A*. 2011. V. 1218. № 38. P. 6612.
  35. *Родин И.А., Браун А.В., Ставрианиди А.Н., Шпигун О.А., Рыбальченко И.В.* Обнаружение маркеров нервно-паралитических отравляющих веществ методом ультра-высокоэффективной жидкостной хроматографии–тандемной масс-спектрометрии // *Аналитика и контроль*. 2012. Т. 16. № 3. С. 254.
  36. *Родин И.А., Браун А.В., Байгильдиев Т.М., Ананьева И.А., Шпигун О.А., Рыбальченко И.В.* Определение продуктов гидролитической трансформации отравляющих веществ VX и VR в природных водах методом жидкостной хроматомасс-спектрометрии // *Масс-спектрометрия*. 2015. Т. 12. № 2. С. 100. (*Rodin I.A., Braun A.V., Baygildiev T.M., Anan'eva I.A., Shpigun O.A., Rybalchenko I.V.* Determination of the hydrolysis products of nerve agents in natural waters by liquid chromatography–mass spectrometry // *J. Anal. Chem.* 2015. V. 70. № 14. P. 1671.)
  37. *Корягина Н.Л., Савельева Е.И., Хлебникова Н.С., Уколов А.И., Уколова Е.С., Каракашев Г.В., Радилов А.С.* Хроматомасс-спектрометрическое определение алкилметилфосфоновых кислот в моче // *Масс-спектрометрия*. 2015. Т. 12. № 4. С. 236. (*Koryagina N.L., Savel'eva, E.I., Khlebnikova, N.S., Ukolov A.I., Ukolova E.S., Karakashev G.V., Radilov A.S.* Chromatography–mass spectrometry determination of alkyl methylphosphonic acids in urine // *J. Anal. Chem.* 2016. V. 71. № 14. P. 1309.)
  38. *Zhang M., Liu Y., Chen J., Liu H., Lu X., Wu J., Xie J.* Sensitive untargeted screening of nerve agents and their degradation products using liquid chromatography–high resolution mass spectrometry // *Anal. Chem.* 2020. V. 92. № 15. P. 10578.
  39. *Weissberg A., Madmon M., Elgarisi M., Dagan S.* Determination of trace amounts of G-type nerve agents in aqueous samples utilizing “in vial” instantaneous derivatization and liquid chromatography–tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. A*. 2017. V. 1512. P. 71.

40. Garg P., Purohit A., Tak V., Kumar A., Dubey D. Liquid-liquid-solid microextraction and detection of nerve agent simulants by on-membrane Fourier transform infrared spectroscopy // *Anal. Chim. Acta.* 2012. V. 751. P. 71.
41. Li B., Wei J., Kong J., Qin M., Yang L., Li C. Rapid detection of Sarin hydrolysis products based on microextraction by packed sorbent combined with Nano-ESI mass spectrometry // *Int. J. Mass Spectrom.* 2021. V. 461. P. 116513.
42. Witkiewicz Z., Neffe S. Chromatographic analysis of chemical warfare agents and their metabolites in biological samples // *Trends Anal. Chem.* 2020. V. 130. P. 115960.
43. Chenga X., Liub C., Yang Y., Liang L., Chenb B., Yub H., Xiab J., Liub S., Li Y. Advances in sulfur mustard-induced DNA adducts: Characterization and detection // *Tox. Lett.* 2021. V. 344. P. 46.
44. Pantazides B., Crow B., Garton J., QuiñonesGonzález J., Blake T., Thomas J., Johnson R. A Simplified method for quantifying sulfur mustard adducts to blood proteins by ultra-high pressure liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry // *Chem. Res. Toxicol.* 2015. V. 28. № 2. P. 256.
45. John H., Siegert M., Gandor F., Gawlik M., Kranawetvogl A., Karaghiosoff K., Thiermann H. Optimized verification method for detection of an albumin-sulfur mustard adduct at Cys34 using a hybrid quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometer after direct plasma proteolysis // *Tox. Lett.* 2016. V. 244. P. 103.
46. Rodin I.A., Braun A.V., Savelieva E.I., Rybalchenko I.V., Ananieva I.A., Shpigun O.A. Rapid method for the detection of metabolite of sulfur mustard 1,1'-sulfonylbis[2-s-(n-acetylcysteiny)ethane] in plasma and urine by liquid chromatography-negative electrospray-tandem mass spectrometry // *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2011. V. 34. № 16. P. 1676.
47. Boyer A., Ash D., Barr D., Young, C., Driskell W., Whitehead R., Ospina M., Preston K., Woolfitt A., Martinez R., Silks L., Barr J. Quantitation of the sulfur mustard metabolites 1,1'-sulfonylbis[2-(methylthio)ethane] and thiodiglycol in urine using isotope-dilution gas chromatography-tandem mass spectrometry // *J. Anal. Toxicol.* 2004. V. 28. № 5. P. 327.
48. Eyison R., Sezigen S., Ortatli M., Kenar L. Optimized gas chromatography-tandem mass spectrometry for 1,1'-sulfonylbis[2-(methylthio) ethane] quantification in human urine // *J. Chromatogr. Sci.* 2019. V. 57. № 5. P. 397.
49. Riches J., Read R.W., Black R.M. Analysis of the sulphur mustard metabolites thiodiglycol and thiodiglycol sulphoxide in urine using isotope-dilution gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. B.* 2007. V. 845. P. 114.
50. Read R.W., Black R.M. Analysis of beta-lyase metabolites of sulfur mustard in urine by electrospray liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *J. Anal. Toxicol.* 2004. V. 28. P. 346.
51. Read R.W., Black R.M. Analysis of the sulfur mustard metabolite 1,1'-sulfonylbis[2-S-(N-acetylcysteiny)ethane] in urine by negative ion electrospray liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *J. Anal. Toxicol.* 2004. V. 28. P. 352.
52. Liu C., Liu S., Xi H., Yu H., Zhou S., Huang G., Liang L., Liu J. Simultaneous quantification of four metabolites of sulfur mustard in urine samples by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry after solid phase extraction // *J. Chromatogr. A.* 2017. V. 1492. P. 41.
53. Lee J., Lee Y. Solid-phase extraction of sulfur mustard metabolites using an activated carbon fiber sorbent // *J. Anal. Toxicol.* 2016. V. 40. P. 64.
54. John H., Koller M., Worek F., Thiermann H., Siegert M. Forensic evidence of sulfur mustard exposure in real cases of human poisoning by detection of diverse albumin-derived protein adducts // *Arch. Toxicol.* 2019. V. 93. P.1881.
55. Zhang Y., Yue L., Nie Z., Chen J., Guo L., Wu B., Feng J., Liu Q., Xie J. Simultaneous determination of four sulfur mustard-DNA adducts in rabbit urine after dermal exposure by isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. B.* 2014. V. 961. P. 29.
56. Орлова О.И., Каракашев Г.В., Савельева Е.И. Совместное определение аддуктов сернистого иприта с гуанином и ацетилцистеином в моче методом высокоэффективной жидкостной хроматографии-танDEMной масс-спектрометрии высокого разрешения // *Журн. аналит. химии.* 2020. Т. 75. № 8. С. 714. (Orlova O.I., Karakashev G.V., Savelieva E.I. Simultaneous determination of sulfur mustard adducts with guanine and acetylcysteine in urine by high-resolution high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *J. Anal. Chem.* 2020. V. 75. № 8. P. 1011.)
57. Nie Z., Liu Q., Xie J. Improvements in monitoring the N-terminal valine adduct in human globin after exposure to sulfur mustard and synthesis of reference chemicals // *Talanta.* 2011. V. 85. P. 1154.
58. Корягина Н.Л., Шачнева М.Д., Уколов А.И., Савельева Е.И., Хлебникова Н.С., Радиллов А.С. Усовершенствованный способ обнаружения глобинового аддукта сернистого иприта методом танDEMной газовой хроматомасс-спектрометрии // *Масс-спектрометрия.* 2017. Т. 14. № 4. С. 266. (Koryagina N.L., Shachneva M.D., Ukolov A.I., Savel'eva E.I., Khlebnikova N.S., Radilov A.S. An improved procedure for the gas chromatography-tandem mass spectrometry detection of the globin adduct of sulfur mustard // *J. Anal. Chem.* 2018. V. 73. № 13. P. 1269.)
59. Корягина Н.Л., Савельева Е.И., Хлебникова Н.С., Радиллов А.С. Определение тиодигликоля и его оксида в биообразцах методом газовой хроматомасс-спектрометрии // *Масс-спектрометрия.* 2017. Т. 14. № 2. С. 124. (Koryagina N.L., Savelieva E.I., Khlebnikova N.S., Radilov A.S. Determination of thiodiglycol and its oxide in biomedical samples by gas chromatography-mass spectrometry // *J. Anal. Chem.* 2018. V. 73. № 13. P. 1209.)
60. Somani S., Lukey B.J., Romano J.A., Jr., Romano J.A., Salem H. *Chemical Warfare Agents: Toxicity at Low Levels.* Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 2001. 464 p.
61. Romano J.A., Lukey B.J., Salem H. *Chemical Warfare Agents, Chemistry, Pharmacology, and Therapeutics,* 2nd Ed. Boca Raton, FL, USA: CRC Taylor & Francis, 2007. 752 p.

62. *Lukey B.J., Romano J.A., Jr., Salem H.* Chemical Warfare Agents: Biomedical and Psychological Effects, Medical Countermeasures, and Emergency Response. Boca Raton, FL: CRC Press, 2019. 848 p.
63. *Barr J., Driskell W., Aston L.* Quantitation of metabolites of the nerve agents sarin, soman, cyclohexylsarin, VX and russian VX in human urine using isotope-dilution gas chromatography-mass spectrometry // *J. Anal. Toxicol.* 2004. V. 28. P. 372.
64. *Hamelin E., Schulze N., Shaner R.* Quantitation of five organophosphorus nerve agent metabolites in serum using hydrophilic interaction liquid chromatography and tandem mass spectrometry // *Anal. Bioanal. Chem.* 2014. V. 406. № 21. P. 5195.
65. *Black R., Muir J.* Derivatisation reactions in the chromatographic analysis of chemical warfare agents and their degradation products // *J. Chromatogr. A.* 2003. V. 1000. P. 253.
66. *Riches J., Morton I., Read R.W.* The trace analysis of alkyl alkylphosphonic acids in urine using gas chromatography-ion trap negative ion tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. B.* 2005. V. 816. № 1–2. P. 251.
67. *Evans R., Jakubowski E., Muse W.* Quantification of sarin and cyclosarin metabolites isopropyl methylphosphonic acid and cyclohexyl methylphosphonic acid in minipig plasma using isotope-dilution and liquid chromatography- time-of-flight mass spectrometry // *J. Anal. Toxicol.* 2008. V. 32. № 1. P. 78.
68. *Hamelin E., Schulze N., Shaner R.* Quantitation of five organophosphorus nerve agent metabolites in serum using hydrophilic interaction liquid chromatography and tandem mass spectrometry // *Anal. Bioanal. Chem.* 2014. V. 406. № 21. P. 5195.
69. *Hall G., Wood G., Paterson J.* Half-life of plasma cholinesterase // *Br. J. Anaesth.* 1984. V. 56. P. 903.
70. *Мурашко Е.А., Дубровский Я.А., Бабаков В.Н.* Аддукты фосфорорганических отравляющих веществ с белками крови как маркеры отравления (обзор) // *Медицина экстремальных ситуаций.* 2019. Т. 21. № 1. С. 124.
71. *Schaller J., Gerber S., Kämpfer U., Lejon S., Trachsel Ch.* Human Blood Plasma Proteins: Structure and Function. John Wiley & Sons, Ltd., 2008. 538 p.
72. *Myers D.* Studies on cholinesterase. Determination of the molar concentration of pseudo-cholinesterase in serum // *Biochem. J.* 1952. V. 51. P. 303.
73. *Fidder A., Hulst A., Noort D.* Retrospective detection of exposure to Organophosphorous anti-cholinesterases: Mass spectrometric analysis of phosphorylated human butyrylcholinesterase // *Chem. Res. Toxicol.* 2002. V. 15. P. 582.
74. *Корягина Н.Л., Савельева Е.И., Каракашев Г.В., Бабаков В.Н., Дубровский Я.А., Уколова Е.С., Хлебникова Н.С., Мурашко Е.А., Конева В.Ю., Уколов А.И., Копейкин В.А., Радиллов А.С.* Определение конъюгированных с белками метаболитов фосфорорганических отравляющих веществ в плазме крови // *Журн. аналит. химии.* 2016. Т. 71. № 8. С. 883. (*Koryagina N.L., Savel'eva E.I., Karakashev G.V., Babakov V.N., Dubrovskii Ya.A., Ukolova E.S., Khlebnikova N.S., Murashko E.A., Koneva V.Y., Ukolov A.I., Kopeikin V.A., Radilov A.S.* Determination of protein adducts of organophosphorus nerve agents in blood plasma // *J. Anal. Chem.* 2016. V. 71. № 8. P. 849.)
75. *Sporty J., Lemire S., Jakubowski E.* Immunomagnetic separation and quantification of butyrylcholinesterase nerve agent adducts in human serum // *Anal. Chem.* 2010. V. 82. № 15. P. 6593.
76. *Carter M., Crow B., Pantazides B.* Direct quantitation of methyl phosphonate adducts to human serum butyrylcholinesterase by immunomagnetic-UHPLC-MS/MS // *Anal. Chem.* 2013. V. 85. № 22. P. 11106.
77. *Knaack J., Zhou Y., Abney C., Jacob J., Prezioso S., Hardy K.* A high-throughput diagnostic method for measuring human exposure to organophosphorus nerve agents // *Anal. Chem.* 2012. V. 84. № 21. P. 9470.
78. *Schopfer L., Lockridge O., David E.* Purification of human butyrylcholinesterase from frozen Cohn fraction IV-4 by ion exchange and Hupresin affinity chromatography // *PLoS One.* 2019. V. 14. № 1.
79. *Schopfer L., Furlong C., Lockridge O.* Development of diagnostics in the search for an explanation of aerotoxic syndrome // *Anal. Biochem.* 2010. V. 404. № 1. P. 64.
80. *Johnson D., Carter M., Crow B.* Quantitation of orthocresyl phosphate adducts to butyrylcholinesterase in human serum by immunomagnetic-UHPLC-MS/MS // *J. Mass Spectrom.* 2015. V. 50. № 4. P. 683.
81. *Noort D., Fidder A., Van der Schans M.* Verification of exposure to organophosphates: generic mass spectrometric method for detection of human butyrylcholinesterase adducts // *Anal. Chem.* 2006. V. 78. № 18. P. 6640.
82. *Van der Schans M., Hulst A., Van der Riet-van Oeveren D.* New tools in diagnosis and biomonitoring of intoxications with organophosphorothioates: Case studies with chlorpyrifos and diazinon // *Chem. Biol. Interact.* 2013. V. 203. № 1. P. 96.
83. *Crow B., Pantazides B., Quinones-Gonzalez J.* Simultaneous measurement of tabun, sarin, soman, cyclosarin, VR, VX, and VM adducts to tyrosine in blood products by isotope dilution UHPLC-MS/MS // *Anal. Chem.* 2014. V. 86. № 20. P. 10397.
84. *Kranawetvogl A., Kupperts J., Gutschow M.* Identification of novel disulfide adducts between the thiol containing leaving group of the nerve agent VX and cysteine containing tripeptides derived from human serum albumin // *Drug Test Anal.* 2017. V. 9. № 8. P. 1192.
85. *Kranawetvogl A., Kupperts J., Siegert M.* Bioanalytical verification of V-type nerve agent exposure: simultaneous detection of phosphorylated tyrosines and cysteine-containing disulfideadducts derived from human albumin // *Anal. Bioanal. Chem.* 2018. V. 410. № 5. P. 1463.

УДК 543.545

## ВЛИЯНИЕ МОДИФИКАТОРОВ НА ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ И ВНУТРИКАПИЛЛЯРНОЕ КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

© 2021 г. А. В. Кравченко<sup>а</sup>, \*, Л. А. Карцова<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Санкт-Петербургский государственный университет

Университетский просп., 26, Петродворец, Санкт-Петербург, 198504 Россия

\*e-mail: [kravchenko161216@gmail.com](mailto:kravchenko161216@gmail.com)

Поступила в редакцию 07.04.2021 г.

После доработки 19.04.2021 г.

Принята к публикации 19.04.2021 г.

Применение модификаторов при электрофоретическом разделении многокомпонентных смесей позволяет существенно расширить аналитические возможности метода капиллярного электрофореза. Различные по природе и свойствам, модификаторы электрофоретических систем могут выполнять различные функции: формировать стационарные и псевдостационарные фазы, предотвращать сорбцию определяемых соединений на стенках кварцевого капилляра, способствовать снижению пределов обнаружения аналитов в процессе концентрирования и т.д. В представленном обзоре рассмотрены различные варианты применения модификаторов для электрофоретического разделения и концентрирования аналитов различной природы на примере имидазолиевых ионных жидкостей, которые могут выступать в качестве стационарной и псевдостационарной фаз, а также принимать непосредственное участие в онлайн-концентрировании аналитов гидрофильной и гидрофобной природы.

**Ключевые слова:** капиллярный электрофорез, капиллярная электрохроматография, мицеллярная электрокинетическая хроматография, модификаторы, онлайн-концентрирование, имидазолиевые ионные жидкости.

**DOI:** 10.31857/S0044450221090061

Метод капиллярного электрофореза (КЭ) позволяет оценивать аналитические возможности различных модификаторов при их применении в качестве стационарных и псевдостационарных фаз, способных регулировать эффективность и селективность разделения аналитов, а также предлагать новые пути внутрикапиллярного концентрирования с их участием. Достижения органического синтеза, существенно расширили спектр соединений, способных выполнять роль таких модификаторов. Для этой цели востребованы поверхностно-активные вещества (ПАВ) [1, 2], гидрофильные и гидрофобные полимеры [3–6], дендритные [7] и молекулярно-импринтированные полимерные материалы, связанные с наночастицами [8, 9], наночастицы [10], ионные жидкости [11–14] и др. Выбор того или иного модификатора в существенной степени обусловлен природой определяемых аналитов [15]. При введении в состав фонового электролита (ФЭ) модификаторы могут выполнять различные функции: предотвращать сорбцию определяемых соединений, изменять скорость и направление электроосмотического потока (ЭОП), регулировать се-

лективность разделения за счет дополнительных взаимодействий с аналитами, способствовать реализации различных режимов капиллярного электрофореза (мицеллярная электрокинетическая хроматография, капиллярная электрохроматография, микроэмульсионная электрокинетическая хроматография, лигандообменный капиллярный электрофорез), участвовать в процессах внутрикапиллярного концентрирования. Наиболее часто для этих целей используют анионные и катионные ПАВ (додецилсульфат натрия, ДДСН; цетилтриметиламмоний бромид, ЦТАБ) в концентрации выше критической концентрации мицеллообразования (ККМ), а также циклодекстрины (ЦД) и их производные. Проникновение аналитов в гидрофобную полость мицелл или макроциклов обеспечивает дополнительный вклад в селективность разделения и лежит в основе некоторых широко применяемых методов концентрирования.

Одним из наиболее универсальных и эффективных вариантов электрофоретического онлайн-концентрирования заряженных и ней-

тральных соединений является свипинг (*sweeping*), в основе которого лежит концентрирование аналитов псевдостационарной фазой (мицеллами), проникающей в зону образца, не содержащую мицелл. Факторы концентрирования достигают значений 1000–5000. В клинической медицине именно свипинг предпочтителен при определении следовых количеств биологически активных веществ в моче, сыворотке и плазме крови. Наряду с ДДСН [2] и ЦТАБ [1], в формировании псевдостационарных фаз и процессах внутрикапиллярного концентрирования успешно применяют и более сложные ПАВ, такие как “гемини” [16] и диалкиламещенные ПАВ [17], для которых характерна более высокая стабильность и меньшее значение ККМ. Производные ЦД в условиях мицеллярной электрокинетической хроматографии могут одновременно выполнять роль концентрирующих агентов и хиральных селекторов [18, 19]. В работе [18] применение сульфо- $\beta$ -ЦД в качестве хиральной псевдостационарной фазы обеспечило разделение энантиомеров хлорфенамина с одновременным его концентрированием в 190 раз.

В последние годы успешно зарекомендовали себя методы онлайн-концентрирования нейтральных соединений, основанные на разрушении мицелл (*analyte focusing by micelle collapse*, AFMC) [13, 20, 21]. В отличие от процедуры классического свипинга, мицеллы при таком подходе добавляют в раствор пробы с высокой проводимостью. В качестве фонового электролита используют разбавленный буферный раствор с низкой проводимостью, не содержащий мицелл. Мицеллы переносят нейтральные аналиты в кварцевый капилляр. На границе с ФЭ концентрация ПАВ становится ниже их ККМ. В результате мицеллы разрушаются и аналиты высвобождаются. Повторный перенос и разрушение мицелл приводит к концентрированию аналитов. Аналогичный подход к внутримолекулярному концентрированию разработан и для заряженных аналитов (*micelle to solvent stacking*, MSS) [14]. В этом случае мицеллы в растворе анализируемой пробы должны иметь заряд, противоположный заряду определяемых аналитов. В фоновый электролит добавляют органический растворитель, либо его вводят в капилляр перед дозированием пробы. Как и в предыдущем случае, ионогенные аналиты переносятся мицеллами в кварцевый капилляр под действием приложенного напряжения. Внутри капилляра они встречаются с зоной органического растворителя, что приводит к изменению ККМ и разрушению или уменьшению концентрации мицелл в растворе. Свободные аналиты электрофоретически мигрируют обратно в зону мицелл, вновь взаимодействуя с ними. Процесс повторяется до тех пор, пока все мицеллы в пробе не разрушатся. Это, в свою очередь,

приводит к эффективному концентрированию ионов пробы.

Причиной разрушения мицелл может стать и взаимодействие с ЦД (*micelle to cyclodextrin stacking*, MCDS) [22, 23], что реализовано при концентрировании катионных (с использованием мицелл ДДСН), анионных (с использованием мицелл ЦТАБ) [22] и нейтральных аналитов [23] (рис. 1). Последовательно в капилляр вводят образец с мицеллами ДДСН и аналитами, а затем *пробку* из нейтрального ЦД в растворе фонового электролита. Под действием напряжения аналиты, связанные с отрицательно заряженными мицеллами, мигрируют к границе с ЦД, где формируются комплексы включения макроцикла с ДДСН. Количество свободного ДДСН становится недостаточным для образования мицелл, что приводит к высвобождению аналитов на границе раздела. Далее сконцентрированные аналиты мигрируют по направлению к аноду за счет собственных электрофоретических подвижностей.

Интересный вариант свипинга, обеспечивший увеличения чувствительности в 25–30 раз при электрофоретическом определении 16 аминокислот, предложен в работе [24] (рис. 2). Введенные в фоновый электролит ионы меди(II), обладающие большей по сравнению с аминокислотами электрофоретической подвижностью, “догоняют” аналиты, и за счет процессов комплексообразования ( $[Cu(AK)_n]^{+2}$ ) способствуют их эффективно концентрированию [24, 25].

Подобный подход применен и при электрофоретическом определении ионов тяжелых металлов (Pb, Cd, Cu) с участием ЭДТА в качестве комплексообразователя (*динамическое хелатирование*) с достигнутыми факторами концентрирования 33–100 [26].

Модификатор может не только вводиться в ФЭ и выполнять роль псевдостационарной фазы и концентрирующего агента, но и быть ковалентно связанным или адсорбированным на поверхности кварцевого капилляра [27], что влияет на скорость и направление электроосмотического потока и обеспечивает дополнительный резерв селективности разделения аналитов с реализацией режима капиллярной электрохроматографии. Различные типы модификаторов, используемых для формирования покрытий и предотвращающих сорбцию аналитов на стенках капилляра, подробно описаны в работе [15].

В последние годы отмечается рост интереса к применению новых модификаторов и мицеллообразующих агентов при электрофоретическом разделении и внутрикапиллярном концентрировании гидрофильных и гидрофобных аналитов. Это в существенной степени относится к имидазолиевым ионным жидкостям (ИЖ), применение которых оказалось весьма перспективным в про-

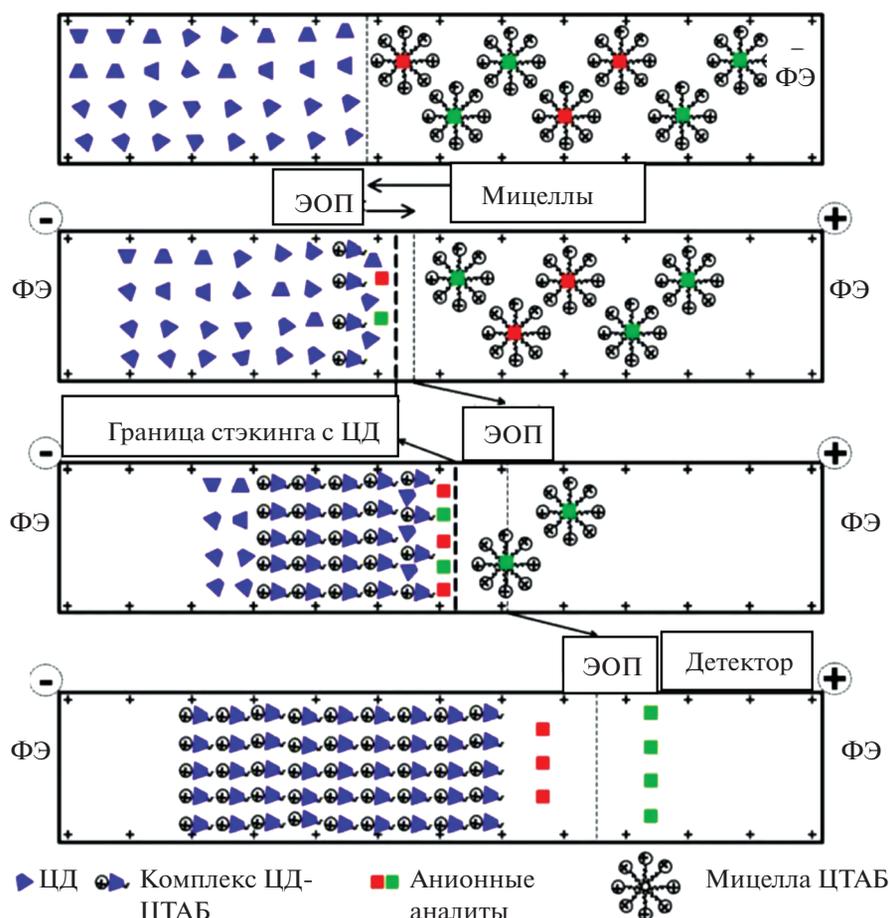


Рис. 1. Схема концентрирования анионных аналитов при разрушении мицелл с участием циклодекстрина [22].

цессах формирования динамических и ковалентных покрытий [28–32], псевдостационарных фаз для реализации режима свипинга [33] и техники концентрирования с разрушением мицелл [13, 14, 33]. Так, в работе [33] описан пример трехэтапного концентрирования анионных аналитов с использованием имидазолиевой ионной жидкости в качестве катионного ПАВ для формирования мицелл и положительно заряженного динамического покрытия: ионселективный стэкинг, свипинг и разрушение мицелл (MSS) (рис. 3). Капилляр заполняют положительно заряженной мицеллярной фазой, далее осуществляют электрокинетический ввод анализируемого образца и затем вводят метанольную пробку. При наложении напряжения мицеллы проникают в матрицу пробы и взаимодействуют с аналитами. Образующиеся ассоциаты типа *мицелла-аналит* мигрируют к границе матрицы пробы с метанолом. Изменение гидрофобно-гидрофильного баланса на границе приводит к разрушению мицелл и высвобождению отрицательно заряженных аналитов. Наличие положительно заряженного покрытия кварцевого капилляра и его

тип влияют на факторы концентрирования. Среди исследуемых катионных модификаторов (поли(диаллилдиметиламмоний) хлорид, гексадиаметрин бромид, 1-додецил-3-метилимидазолия гидросульфат и др.) именно применение имидазолиевых ИЖ позволило достичь максимальных факторов концентрирования (1167–2424) при разделении методом КЭ и онлайн-концентрировании органических кислот [33].

Введение в фоновый электролит ИЖ с небольшим алкильным радикалом и объемным каркасным заместителем не приводит к заметной модификации стенок кварцевого капилляра: скорость ЭОП снижается лишь на 20–25%. Напротив, в случае длинноцепочечных имидазолиевых ИЖ генерируется сильный анодный ЭОП, что свидетельствует о формировании динамического покрытия. Максимальное значение скорости ЭОП ( $-62.7 \times 10^{-9} \text{ м}^2/(\text{В с})$ ) наблюдается при концентрации ионной жидкости  $\text{C}_{12}\text{MImCl}$  в ФЭ, близкой к критической концентрации мицеллообразования ИЖ (12–15 мМ) [28]. Тем не менее наличие в фоновом электролите ИЖ  $\text{C}_4\text{MImCl}$

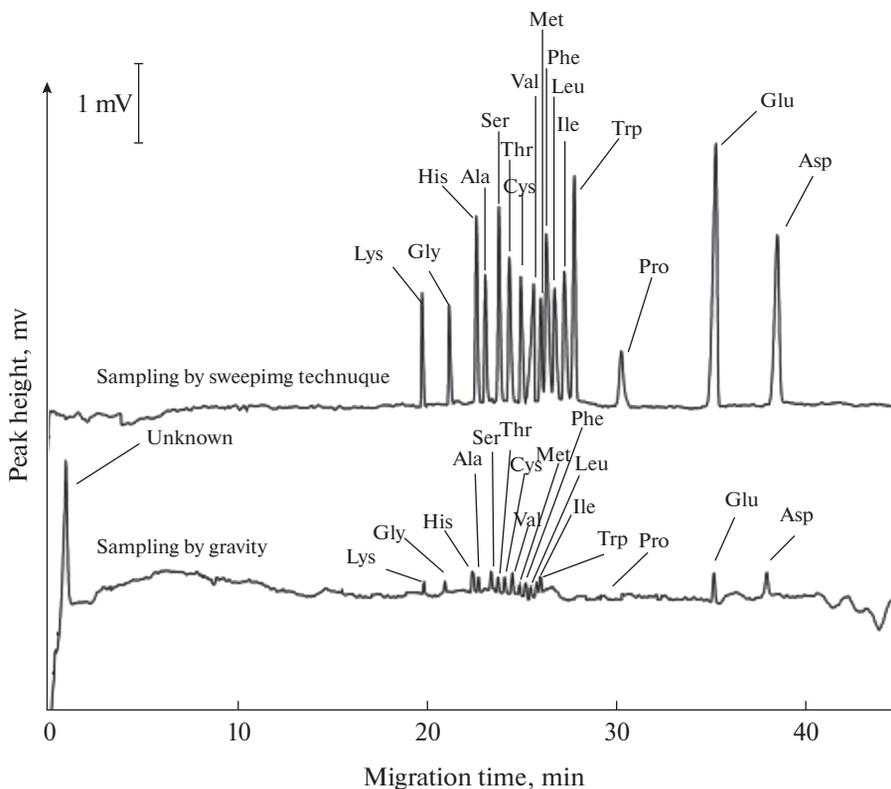


Рис. 2. Электрофореграммы аминокислот до и после свипинга [24].

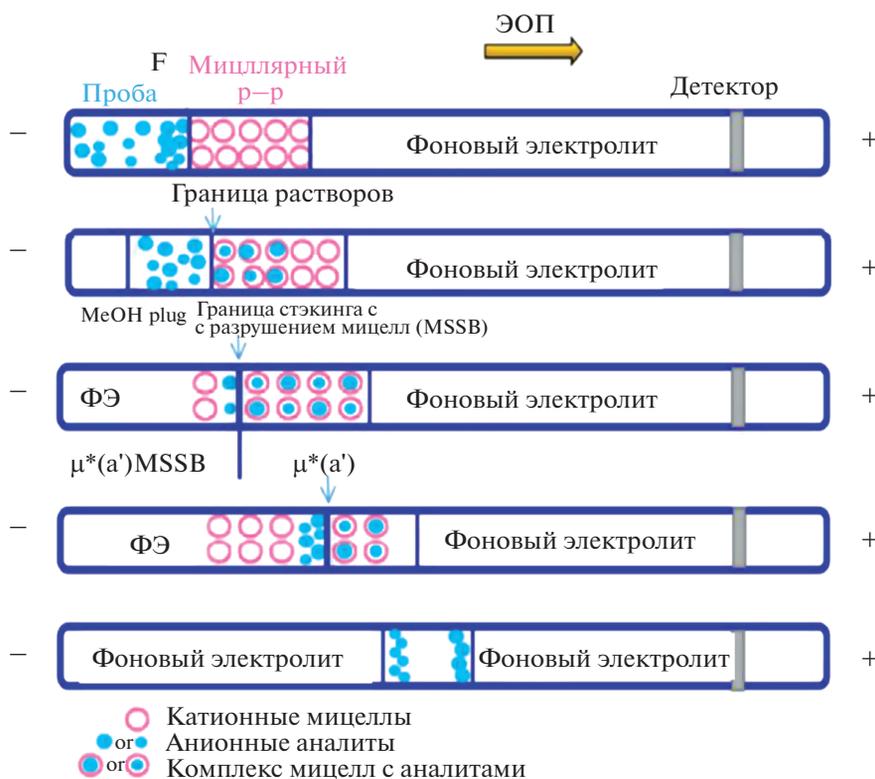


Рис. 3. Схема процесса трехэтапного концентрирования с использованием положительно заряженных динамических покрытий [33].

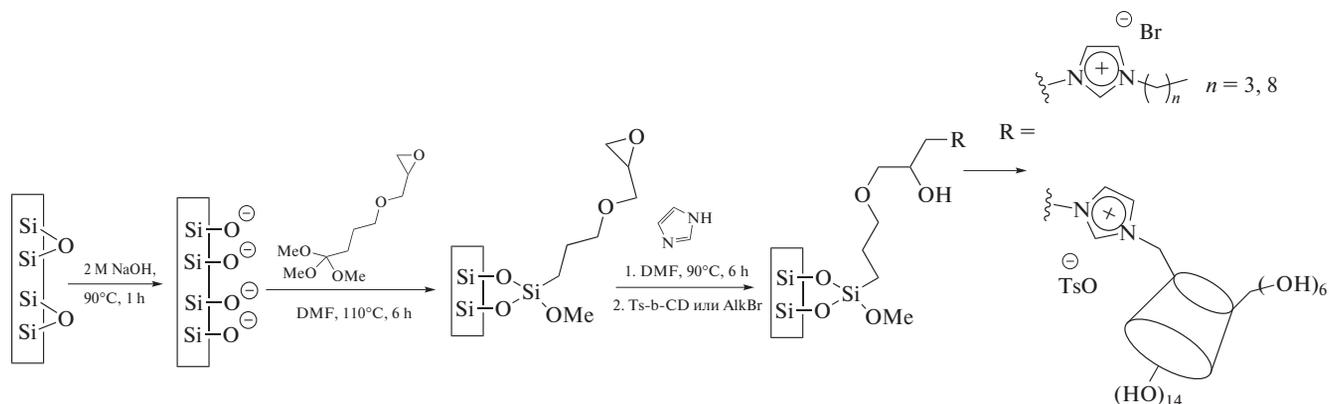


Рис. 4. Общая схема синтеза ковалентных покрытий на основе имидазолиевого катиона [28, 30].

(10 мМ) обеспечило повышение эффективности и селективности разделения биогенных аминов.

Несмотря на простоту формирования динамических покрытий, растет число работ, в которых для разделения и концентрирования биологически активных аналитов используют ковалентно связанные стационарные фазы. Это обеспечивает стабильный ЭОП и высокую воспроизводимость результатов анализа. Дизайн на основе имидазолиевого катиона прекрасно зарекомендовал себя и в этой роли.

Нами предложен вариант синтеза ковалентных покрытий на основе имидазолиевого катиона, который включает в себя предварительную подготовку капилляра, формирование слоя-линкера и функционализацию [28, 30] (рис. 4). Подготовка капилляра заключалась в активации его стенок путем травления щелочью и десорбции координированной воды. Слой-линкер был синтезирован в форме олигомера 3-глицидилпропилтриметоксисилана в результате четырех последовательных реакций силилирования. Первый этап функционализации – реакция нуклеофильного замещения имидазолом с раскрытием оксиранового кольца. Наличие нуклеофила в полученной на этом этапе структуре покрытия обеспечило возможность последующей функционализации посредством реакции нуклеофильного замещения (в нашем случае использованы 1-бромбутан, 1-бромоктан, а также предварительно синтезированный для этой цели моно-*n*-толуолсульфонил-β-циклодекстрин).

Аналитические характеристики бутил- и октил-имидазолиевых покрытий изучены на примере электрофоретического разделения основных аналитов – биогенных аминов. Ковалентная модификация внутренней стенки кварцевого капилляра предотвратила сорбцию аналитов, а дополнительные π-π-взаимодействия с имидазолиевым кольцом проявились в улучшении эффективности и селективности разделения. Применение

различных вариантов онлайн-концентрирования на таком покрытии позволило существенно снизить пределы обнаружения (ПО) биогенных аминов (при сочетании свипинга с электростэкингом для бутилового покрытия – 1–2 нг/мл; для октилового – 0.3–1.1 нг/мл). Это, в свою очередь, обеспечило определение этих нейромедиаторов в образцах мочи [28].

В серии электрофоретических экспериментов используемый дизайн синтезированного ковалентного покрытия (рис. 4) позволил обнаружить весьма интересное явление. Наличие в структуре покрытия β-ЦД обеспечило, помимо электрофоретического определения гидрофильных аналитов, разделение гидрофобных стероидных гормонов (гидрокортизон, кортикостерон, 11-дезоксикортизол) в режиме капиллярной электрохроматографии за счет их взаимодействия с гидрофобной полостью макроцикла на поверхности капилляра. При этом циклодекстрин выполнил роль и хирального селектора, обеспечив разделение энантиомеров нестероидного противовоспалительного препарата (рис. 5) [30]. Однако в ходе реализации различных подходов к онлайн-концентрированию (стэкинг с большим объемом вводимой пробы, свипинг) с целью увеличения селективности разделения выявились некоторые ограничения. Для реализации свипинга в качестве мицеллярного агента мы использовали β-ЦД, гидроксипропил-β-ЦД, β-ЦД-MImOTs, а также ионные жидкости C<sub>16</sub>MImCl и C<sub>12</sub>MImCl в концентрациях, превышающих значение ККМ. Вместо ожидаемого эффекта роста селективности разделения наблюдалось ее снижение. Причиной этого могла стать блокировка полостей β-ЦД в составе стационарной фазы введенными в фоновый электролит добавками. Для нивелирования нежелательного эффекта испытали вариант с вводом мицеллярной пробки. Предположили, что введение псевдостационарной фазы в виде пробки обеспечит дополнительный резерв селективности разделения за

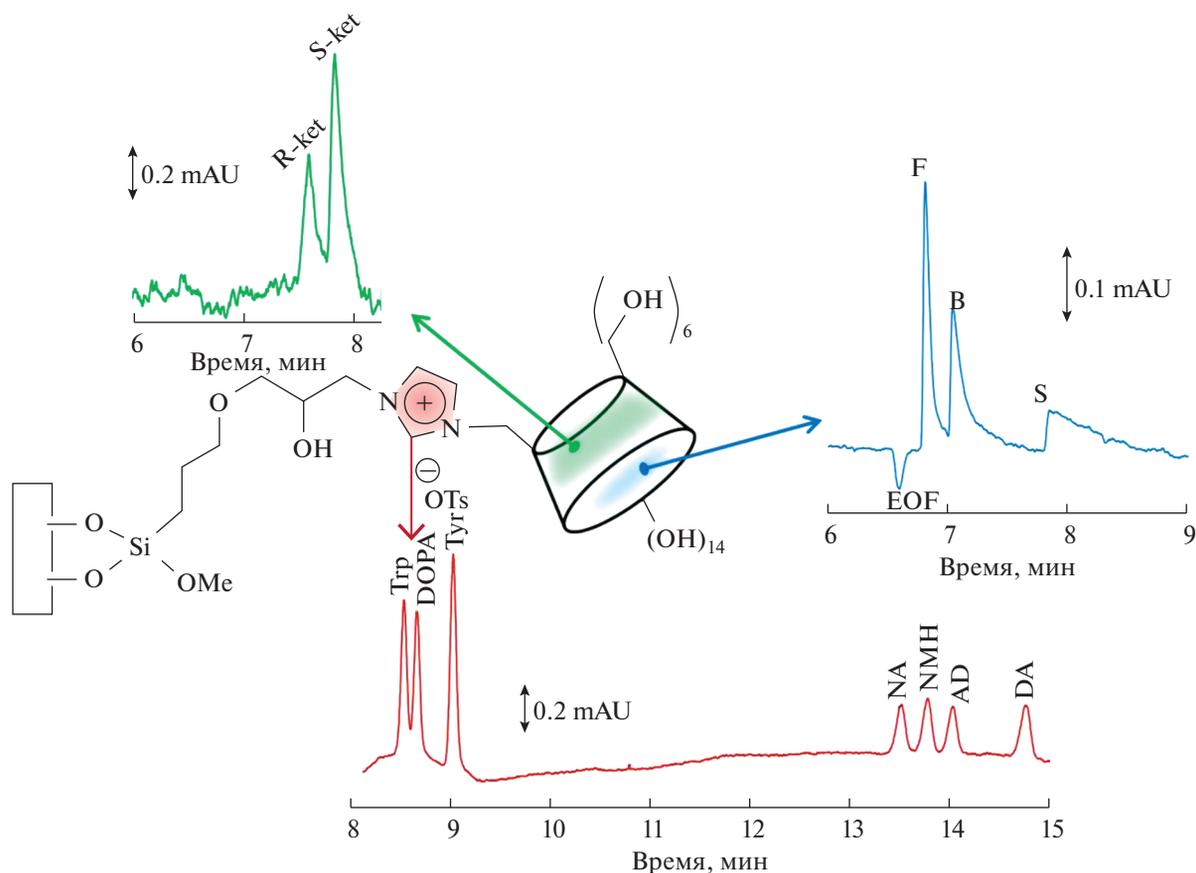


Рис. 5. Аналитические возможности ковалентного покрытия на основе  $\beta$ -циклодекстрина и имидазола [34].

счет взаимодействия с аналитами, не блокируя полость макроцикла в составе стационарной фазы. Несмотря на то, что ожидаемого улучшения селективности не произошло, введение мицеллярной пробки с ИЖ в качестве мицеллообразующего агента ( $C_{16}MImCl$ ,  $C_{12}MImCl$  в концентрации выше ККМ и 3-метил-1- $\beta$ -циклодекстринимидазолтозилат) позволило реализовать режим стэкинга с большим объемом вводимой пробы (факторы концентрирования 3–10) с сохранением селективности разделения [35].

Таким образом, применение имидазолиевых ионных жидкостей в качестве многофункциональных катионных модификаторов позволяет контролировать скорость и направление ЭОП за счет формирования стабильных ковалентных и динамических покрытий и способствовать снижению пределов обнаружения за счет реализации онлайн-концентрирования. Некоторые результаты, полученные при работе с имидазолиевыми ионными жидкостями, суммированы в табл. 1.

\* \* \*

Применение различных модификаторов для электрофоретического определения и внутрикапиллярного концентрирования гидрофобных и гидрофильных аналитов – одна из активно развивающихся областей капиллярного электрофореза, существенно расширяющая аналитические возможности этого метода. Сюда можно отнести увеличение селективности разделения, предотвращение сорбции аналитов, снижение пределов обнаружения и увеличение чувствительности анализа, формирование ковалентных и динамических покрытий, обеспечивающих различные режимы электрофоретического метода. Особый интерес представляют полифункциональные модификаторы, среди которых успешно зарекомендовали себя имидазолиевые ионные жидкости.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (номер гранта 19-13-00370).*

**Таблица 1.** Имидазолиевые ионные жидкости в качестве динамических и ковалентных покрытий при разделении и концентрировании биогенных аминов и стероидных гормонов

Тип покрытия	Модификация ЭОП, $\mu\text{ЭОП} \times 10^9$ , $\text{м}^2/(\text{В с})$	Вариант концентрирования											
		биогенные амины				стероидные гормоны							
		наличие разделения	FASS		свилинг + FASI		наличие разделения		FASS				
Динамическое покрытие на основе $\text{C}_{12}\text{MImCl}$ [36]	-62.7 <sup>a</sup>	+	10–13	ПО	SEF <sub>h</sub>	ПО	Не подходящие условия для реализации	-	-	-	-	-	-
Динамическое покрытие на основе $\text{C}_4\text{MImCl}$	-18.5 <sup>b</sup>	+					Не подходящие условия для реализации	-	-	-	-	-	-
N-бутилимидазолиевое ковалентное покрытие [28]	-40.3 <sup>b</sup>	+	105–125	11–17 нг/мл	930–1500	1.4–2.3 нг/мл	-	-	-	-	-	-	-
N-β-циклодекстринимидазолиевое ковалентное покрытие [30]	-37.7 <sup>b</sup>	+	3–6	150–240 нг/мл	Мицеллы блокируют полость ЦД		± (разделение трех стероидных гормонов)	2–3	120–160 нг/мл	-	-	-	Не подходящие условия для реализации

*Обозначения:* FASS — стэкинг с усилением поля (field-amplified sample stacking), FASI — электростэкинг (field-amplified sample injection), SEF<sub>h</sub> — фактор концентрирования (staging efficiency factor). <sup>a</sup>10 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (рН 2.0, доводили 0.1 М HCl), 9 мМ C<sub>12</sub>MImCl, -20 кВ, 220 нм, маркер ЭОП — 3%-ный (по объему) раствор диметилформамида (ДМФА) в воде. <sup>b</sup>10 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (рН 2.0, доводили 0.1 М HCl), 20 мМ ИЖ, -20 кВ, 220 нм, маркер ЭОП — 3%-ный (по объему) раствор ДМФА в воде. <sup>h</sup>10 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (рН 2.0, доводили 0.1 М HCl), -20 кВ, 220 нм, маркер ЭОП — 3%-ный (по объему) раствор ДМФА в воде.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Brugnerotto P., Betta F.D., Gonzaga L.V., Fett R., Costa A.C.O.* A capillary electrophoresis method to determine aliphatic organic acids in bracinga honeydew honey and floral honey // *J. Food Compos. Anal.* 2019. V. 82. 103243. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103243>
2. *Li W., Qian Z., Li C., Guo D., Wei J., Liu X.* On-line electrokinetic supercharging and sweeping for the preconcentration and determination of nucleosides and related compounds by capillary electrophoresis // *Anal. Lett.* 2020. V. 53. №. 12. P. 1919. <https://doi.org/10.1080/00032719.2020.1725033>
3. *Righetti P.G., Gelfi C., Verzola B., Castelletti L.* The state of the art of dynamic coatings // *Electrophoresis.* 2001. V. 22. P. 603. [https://doi.org/10.1002/1522-2683\(200102\)22:4<603::AID-ELPS603>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/1522-2683(200102)22:4<603::AID-ELPS603>3.0.CO;2-N)
4. *Znaleziona J., Petr J., Knob R., Maier V., Sevcik J.* Dynamic coating agents in CE // *Chromatographia.* 2008. V. 67. P. 5. <https://doi.org/10.1365/s10337-007-0509-y>
5. *Lucy C.A., MacDonald A.M., Gulcev M.D.* Non-covalent capillary coatings for protein separations in capillary electrophoresis // *J. Chromatogr. A.* 2008. V. 1184. P. 81. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.10.114>
6. *Liua X., Suna S., Niea R., Maa J., Qub Q., Yanga L.* Highly uniform porous silica layer open-tubular capillary columns produced via in-situ biphasic sol-gel processing for open-tubular capillary electrochromatography // *J. Chromatogr. A.* 2018. V. 1538. P. 86. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.01.024>
7. *Polikarpov N., Potolytsyna V., Bessonova E., Tripp S., Appelhans D., Voit B., Kartsova L.* Dendritic glycopolymer as dynamic and covalent coating in capillary electrophoresis: View on protein separation processes and detection of nanogram-scaled albumin in biological samples // *J. Chromatogr. A.* 2015. V. 1378. P. 65. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.11.051>
8. *Wang X.-N., Liang R.-P., Meng X.-Y., Qiu J.-D.* One-step synthesis of mussel-inspired molecularly imprinted magnetic polymer as stationary phase for chip-based open tubular capillary electrochromatography enantioseparation // *J. Chromatogr. A.* 2014. V. 1362. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.08.044>
9. *Ramezani Z., Safdarian M., Ghadiri A.A.* Metal-coded hydrogel magnetic molecularly imprinted polymer for preconcentration and cleanup of sarcosine: Determination in urine; coupled to on-column capillary electrophoresis // *Talanta.* 2021. V. 230. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122309>
10. *Kartsova L.A., Makeeva D.V., Davankov V.A.* Nanosized polymer and polymer-coated particles in electrokinetic separations // *Trends Anal. Chem.* 2019. V. 120. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115656>
11. *Бессонова Е.А., Карцова Л.А., Галлямова В.Ф.* Влияние ионной жидкости хлорид 3-метил-1-цетилимидазолия на процессы электрофоретического концентрирования стероидных гормонов // *Журн. аналит. химии.* 2016. Т. 71. № 7. С. 724. <https://doi.org/10.7868/S0044450216070045> (*Bessonova E.A., Kartsova L.A., Gallyamova V.F.* Effect of 3-methyl-1-cetylimidazolium chloride ionic liquid on the electrophoretic preconcentration of steroid hormones // *J. Anal. Chem.* 2016. V. 71. № 7. P. 696. ) <https://doi.org/10.7868/S0044450216070045>
12. *Su H.L., Lan M.T., Hsieh Y.Z.* Using the cationic surfactants N-cetyl-N-methylpyrrolidinium bromide and 1-cetyl-3-methylimidazolium bromide for sweeping-micellar electrokinetic chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2009. V. 1216. P. 5313. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.05.001>
13. *El-Hady D.A., Albishri H.M.* Simultaneous determination of acrylamide, asparagine and glucose in food using short chain methyl imidazolium ionic liquid based ultrasonic assisted extraction coupled with analyte focusing by ionic liquid micelle collapse capillary electrophoresis // *Food Chem.* 2015. V. 188. P. 551. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.047>
14. *Quirino J.P., Anres P., Sirieix-Plénet J., Delaunay N., Gareï P.* Potential of long chain ionic liquids for on-line sample concentration techniques: Application to micelle to solvent stacking // *J. Chromatogr. A.* 2011. V. 1218. P. 5718. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.06.071>
15. *Карцова Л.А., Кравченко А.В., Колобова Е.А.* Ковалентные покрытия кварцевых капилляров для электрофоретического определения биологически активных аналитов // *Журн. аналит. химии.* 2019. Т. 74. № 8. С. 563. (*Kartsova L.A., Kravchenko A.V., Kolobova E.A.* Covalent coatings of quartz capillaries for the electrophoretic determination of biologically active analytes // *J. Anal. Chem.* 2019. V. 74. № 8. P. 729. ) <https://doi.org/10.1134/S0044450219080103>
16. *Yang X., Hao L., Zhang S., Wang C., Wang Z.* Sweeping-micelle to solvent stacking for the online preconcentration and determination of organic acids in *Angelica sinensis* by capillary electrophoresis // *RSC Adv.* 2018. V. 8. P. 7949. <https://doi.org/10.1039/C7RA11553A>
17. *Hsieh S.Y., Wang C.C., Kou H.S., Wu S.M.* Dialkyl anionic surfactant in field-amplified sample injection and sweeping-micellar electrokinetic chromatography for determination of eight leanness-promoting  $\beta$ -agonists in animal feeds // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2017. V. 141. P. 222. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.04.013>
18. *Yao Y., Zhou L., Li M., Guo X.* The cation-selective exhaustive injection and sweeping capillary electrophoresis method for the analysis of chlorpheniramine enantiomers in rat plasma // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2018. V. 148. P. 142. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.09.021>
19. *Rabanes H.R., Quirino, J.P.* Sweeping of alprenolol enantiomers with an organic solvent and sulfated  $\beta$ -cyclodextrin in capillary electrophoresis // *Electrophoresis.* 2013. V. 34. P. 1319. <https://doi.org/10.1002/elps.201200595>
20. *Chao H.C., Liao H.W., Kuo C.H.* Using water plug-assisted analyte focusing by micelle collapse in combination with microemulsion electrokinetic chromatography for analyzing phthalate esters // *J. Chromatogr. A.*

2016. V. 1445. P. 149.  
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.03.086>
21. *Chang C.W., Chen Y.C., Liu C.Y.* Separation and on-line preconcentration of nonsteroidal anti-inflammatory drugs by microemulsion electrokinetic chromatography // *Electrophoresis*. 2015. V. 36. P. 2745.  
<https://doi.org/10.1002/elps.201500160>
22. *Quirino J.P., Grochocki W., Markuszewski M.J.* Sample concentration of charged small molecules and peptides in capillary electrophoresis by micelle to cyclodextrin stacking // *Anal. Chem.* 2017. V. 89. № 24. P. 13422.  
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b03700>
23. *Chu C., Liu C., Yang F., Lian L., Li J., Mao H., Yan J.* A dual preconcentration method by combining micro matrix solid-phase dispersion extraction with field-enhanced sample injection and micelle to cyclodextrin stacking for sensitive analysis of neutral coumarins // *Electrophoresis*. 2021.  
<https://doi.org/10.1002/elps.202000273>
24. *Luo T., Ke J., Xie Y., Dong Y.* Determination of underivatized amino acids to evaluate quality of beer by capillary electrophoresis with online sweeping technique // *J. Food Drug Anal.* 2017. V. 25. № 4. P. 789.  
<https://doi.org/10.1016/j.jfda.2017.03.003>
25. *Zhou X.J., Chen J., Shi Y.P.* Determination of amino acids in plasma and nutritional supplements by capillary electrophoresis with copper(II) coordination // *Anal. Lett.* 2015. V. 48. P. 25.  
<https://doi.org/10.1080/00032719.2014.936019>
26. *Chen K.L., Jiang S.J., Chen Y.L.* Determining lead, cadmium and mercury in cosmetics using sweeping via dynamic chelation by capillary electrophoresis // *Anal. Bioanal. Chem.* 2017. V. 409. P. 2461.  
<https://doi.org/10.1007/s00216-017-0193-1>
27. *Hou M., Zhang M., Chen L., Gong K., Pan C., Wang Y.* Amplification of lysozyme signal detected in capillary electrophoresis using mixed polymer brushes coating with switchable properties // *Talanta*. 2019. V. 202. P. 426.  
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.05.014>
28. *Kolobova E., Kartsova L., Kravchenko A., Bessonova E.* Imidazolium ionic liquids as dynamic and covalent modifiers of electrophoretic systems for determination of catecholamines // *Talanta*. 2018. V. 188. P. 183.  
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.05.057>
29. *Колобова Е.А., Карцова Л.А., Бессонова Е.А., Кравченко А.В.* Он-лайн концентрирование биогенных аминов методом капиллярного электрофореза с использованием синтезированных ковалентных покрытий на основе ионных жидкостей // *Аналитика и контроль*. 2017. Т. 21. № 1. С. 57.  
<https://doi.org/10.15826/analitika.2017.21.1.006>  
(*Kolobova E.A., Kartsova L.A., Bessonova E.A.,*
- Kravchenko A.V.* On-line concentration of biogenic amines by capillary electrophoresis method using the synthesized covalent coating based on the imidazolium ionic liquids // *Analytica and Control*. 2017. V. 21. № 1. P. 57.)  
<https://doi.org/10.15826/analitika.2017.21.1.006>
30. *Kravchenko A., Kolobova E., Kartsova L.* Multifunction covalent coatings for separation of amino acids, biogenic amines, steroid hormones, and ketoprofen enantiomers by capillary electrophoresis and capillary electrochromatography // *Sep. Sci. Plus*. 2020. V. 3. P. 102.  
<https://doi.org/10.1002/sscp.201900098>
31. *Li L., Du H., Yu H., Xu L., You T.* Application of ionic liquid as additive in determination of three  $\beta$ -agonists by capillary electrophoresis with amperometric detection // *Electrophoresis*. 2013. V. 34. P. 277.  
<https://doi.org/10.1002/elps.201200385>
32. *Xiao W., Wang F.Q., Li C.H., Zhang Q., Xia Z.N., Yang F.Q.* Determination of eight isoflavones in *Radix Puerariae* by capillary zone electrophoresis with an ionic liquid as an additive // *Anal. Methods*. 2015. V. 7. P. 1098.  
<https://doi.org/10.1039/C4AY02374A>
33. *Chu C., Wei M., Liu C., Li H., Cao J., Yan J.* Over 1000-fold improvement in an online preconcentration of trace anionic compounds by capillary electrophoresis with ionic liquid micelle-based three-step stacking // *Anal. Chim. Acta*. 2018. V. 1044. P. 191.  
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.08.027>
34. *Kravchenko A.V., Kolobova E.A., Kartsova L.A.* Application of covalent coatings based on imidazolium cations for separation and online preconcentration of basic and neutral analytes in capillary electrophoresis / *Proc. 16th Int. Students Conf. "Modern Analytical Chemistry"* / Edited Nesměřák Karel. Prague: Faculty of Science, Charles University, 2020. P. 35
35. *Кравченко А.В.* Синтез полифункциональных модификаторов на основе имидазолиевых ионных жидкостей для селективного электрофоретического определения стероидов и бета-блокаторов ... Магистерская диссертация. Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный университет, 2019. 109 с.
36. *Колобова Е.А., Карцова Л.А., Бессонова Е.А.* Ионные жидкости на основе имидазола в качестве модификаторов электрофоретических систем при определении биогенных аминов и стероидных гормонов // *Вестник СПбГУ*. 2015. Сер. 4. Т. 2. № 2. С. 185.  
(*Kolobova E.A., Kartsova L.A., Bessonova E.A.* Ionic liquids based on imidazole as a modifier of electrophoretic systems for determination of biogenic amines and steroid hormones // *Vestn. SPbSU (Russ.)*. 2015. V. 2. P. 185.)

УДК 543.544

## СРАВНЕНИЕ АНАЛИТИЧЕСКИХ ВОЗМОЖНОСТЕЙ РАЗЛИЧНЫХ СХЕМ ХРОМАТОМЕМБРАНОЙ ГАЗОВОЙ ЭКСТРАКЦИИ

© 2021 г. О. В. Родинков<sup>а, \*</sup>, А. С. Бугайченко<sup>а</sup>, Л. Н. Москвин<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Институт химии  
Университетский просп., 26, Петродворец, Санкт-Петербург, 198504 Россия

\*e-mail: o.rodinkov@spbu.ru

Поступила в редакцию 07.04.2021 г.

После доработки 17.04.2021 г.

Принята к публикации 18.04.2021 г.

Сопоставлены аналитические возможности различных схем относительного перемещения потоков анализируемой водной фазы и газа-экстрагента при осуществлении хроматомембранной газовой экстракции. Показано, что в тех случаях, когда эффективность системы возрастает с увеличением скорости потока газа-экстрагента (анализ в режиме online), предпочтительнее проточная схема, а в случае анализа предварительно отобранных проб – двухмерная схема.

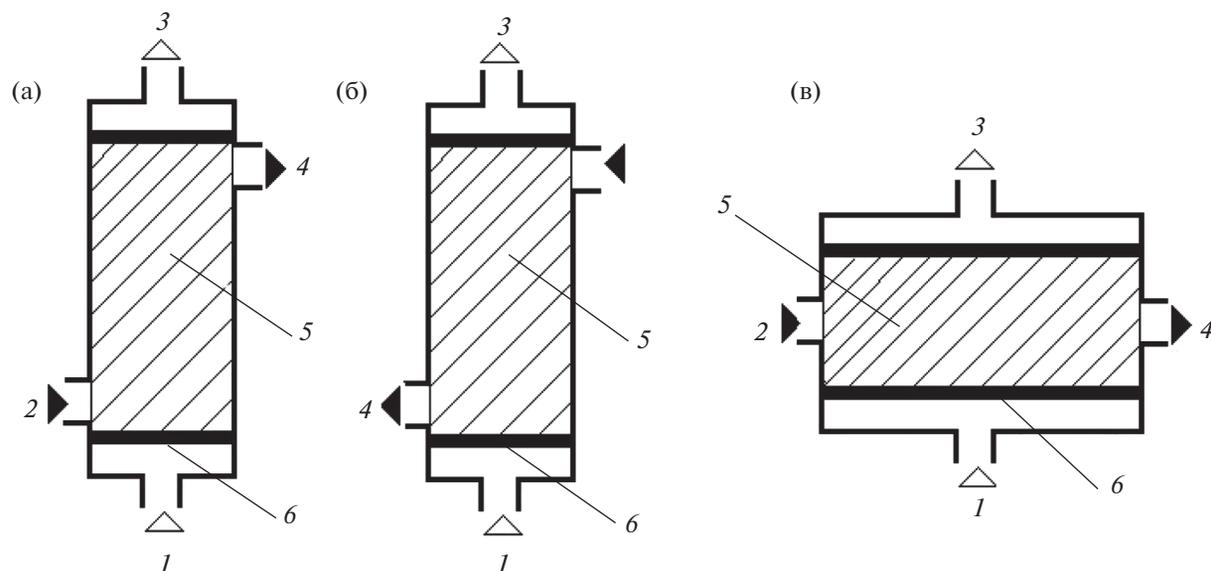
**Ключевые слова:** парофазный анализ, хроматомембранная газовая экстракция, газовая хроматография, летучие органические соединения, определение, водные растворы.

**DOI:** 10.31857/S0044450221090097

Газовая экстракция относится к важнейшим методам пробоподготовки при определении летучих органических соединений в водных средах [1, 2]. Она лежит в основе парофазного анализа (ПФА) – метода получения информации о составе конденсированной фазы на основании анализа контактировавшей с ней газовой фазы [3]. В современном понимании ПФА не ограничивается только анализом газа-экстрагента и включает различные варианты дополнительного концентрирования аналитов после их газоэкстракционного извлечения [4]. В зависимости от способа осуществления газовой экстракции различают статические, динамические и проточные варианты ПФА [4, 5]. Традиционные статический и динамический варианты парофазного анализа включают, как правило, ряд рутинных процедур, которые относительно плохо поддаются автоматизации. В рамках современной тенденции автоматизации всей процедуры анализа особую актуальность приобретают проточные варианты ПФА. В них извлечение аналитов происходит при одновременном движении потоков анализируемой жидкости и газа-экстрагента через массообменное устройство [6, 7]. Применение проточных вариантов ПФА позволяет также предотвратить образование артефактов в процессе хранения и транспортировки проб в лабораторию и увеличивает точность анализа за счет исключения или уменьшения действия человеческого фактора на результаты анализа.

Новые возможности для развития проточного ПФА открыл предложенный Л.Н. Москвиным хроматомембранный массообменный процесс [8] и реализуемая в рамках этого процесса хроматомембранная газовая экстракция (ХГЭ) [9]. При осуществлении ХГЭ массообмен между потоками водной и газовой фазой происходит в гидрофобной бипористой матрице из политетрафторэтилена с двумя типами открытых пор, различающимися по размерам. По крупным макропорам перемещается водная фаза, а по микропорам – газ-экстрагент, который подается в массообменный слой (бипористую матрицу) и выводится из него через гидрофобные непроницаемые для водной фазы микропористые мембраны. Поток газа-экстрагента с выделенными из водной фазы летучими компонентами подается либо в дозатор газового хроматографа и анализируется, либо пропускается через сорбционную колонку для газоадсорбционного концентрирования аналитов с их последующей термодесорбцией.

В ХГЭ хроматографический механизм межфазного обмена между жидкой и газовой фазой сочетается с мембранным процессом введения и выведения фаз из зоны массообмена. Подобное сочетание обеспечивает, с одной стороны, высокую эффективность разделения, свойственную хроматографическим методам, а с другой, – возможность разделения в непрерывном или легко автоматизируемом дискретном режиме.



**Рис. 1.** Прямоточная (а), противоточная (б) и двухмерная (в) схемы хроматомембранной газовой экстракции: 1 и 3 – вход и выход потока газа-экстрагента, 2 и 4 – вход и выход потока водной пробы, 5 – массообменный слой, 6 – мембраны.

Теоретически направление потоков обменивающихся фаз через массообменный слой может быть любым. Однако практическое значение имеют три схемы относительного перемещения фаз: прямоточная (потоки жидкой и газовой фазы перемещаются в одном направлении); двухмерная (потоки фаз перемещаются под углом 90 град) и противоточная (потоки перемещаются навстречу друг другу) (рис. 1). Закономерности указанных схем ХГЭ подробно изучены, однако непосредственное сравнение их возможностей ранее не проводили.

Цель настоящей работы – сравнение аналитических возможностей различных схем хроматомембранной газовой экстракции применительно к определению летучих органических соединений в водных растворах.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследования проводили в хроматомембранных ячейках, конструкция которых позволяла непрерывно пропускать потоки водной пробы и газа-экстрагента в одном, противоположном и перпендикулярном направлениях. Массообменный слой в ячейке состоял из бипористого политетрафторэтилена (ПТФЭ), который получали по известной методике [10]. Исходным материалом для изготовления служил полимеризационный порошок ПТФЭ марки Ф-4ПН-20 производства ООО “Галополимер” (Пермь, Россия). Размеры макропор слоя составляли (50–200) мкм, микропор – (0.5–5) мкм. Хроматомембранные ячейки для прямоточной и противоточной ХГЭ имели

массообменный слой цилиндрической формы диаметром 16 мм и высотами 20 и 16 мм (ячейки 1 и 2 соответственно). Ячейки для двухмерного варианта имели массообменный слой в виде параллелепипеда, их габариты (50 × 20 × 10) мм (ячейка 3) и (20 × 10 × 10) мм (ячейка 4). Первой указана длина, за которую принимали протяженность массообменного слоя по направлению движения водной фазы, второй – ширина – протяженность массообменного слоя перпендикулярно движению потоков водной и газовой фаз, третьей – высота – протяженность слоя по направлению движения газовой фазы. Массообменный слой был ограничен с двух противоположных сторон микропористыми ПТФЭ-мембранами марки МФ-ФМ 400 L/G толщиной 300 мкм со средним диаметром пор 0.5 мкм производства НПО “Эко-фильтр” (Обнинск, Россия).

Анализируемую жидкость вытесняли из пробоотборной емкости и подавали в ячейку под действием избыточного давления газа, создаваемого регулятором давления, входящим в состав формирователя газовых потоков производства “Хроматэк” (Россия). Скорость потока газа-экстрагента через ячейку ( $W_G$ ) устанавливали с помощью регулятора расхода того же формирователя и проверяли с помощью млыно-пленочного расходомера. Расход жидкости ( $W_L$ ) измеряли с помощью мерного цилиндра и секундомера. Водные растворы с заданной концентрацией тестовых веществ, квалификации которых была не ниже ч., готовили объемно-объемным способом.

Определение тестовых веществ в потоке газа-экстрагента на выходе из ячейки выполняли с по-

мощью газового хроматографа Кристалл-5000.2 (Хроматэк, Россия), снабженного пламенно-ионизационным детектором и капиллярной колонкой ВРХ-1 (10 м × 0.53 мм × 2.65 мкм) со 100%-ным диметилполисилоксаном в качестве неподвижной фазы. Для этого поток газа-экстрагента направляли в дозирующую петлю (1 мл) автоматического обогреваемого крана-дозатора. Температурные режимы работы хроматографа выбирали в зависимости от природы тестовых веществ.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Условия осуществления хроматомембранной газовой экстракции.** Одновременное движение жидкости по макропорам массообменного слоя, а газа-экстрагента – по микропорам возможно тогда, когда в любой точке массообменного слоя, в частности на входе и на выходе из него, выполняется условие:

$$P_G < P_L < P_G + |P_c|, \quad (1)$$

где  $P_G$  и  $P_L$  – давление газовой и жидкой фазы соответственно,  $P_c$  – капиллярное давление. Выполнение правой части этого неравенства должно обеспечиваться и для мембран, в противном случае в их поры будет проникать жидкая фаза и препятствовать прохождению потока газовой.

В прямооточной схеме одна из фаз на входе в массообменный слой, где ее давление максимально, и на выходе из этого слоя, где ее давление минимально, контактирует с другой фазой, имеющей ту же направленность градиента давления. В соответствии с неравенством (1) допустимые градиенты давлений фаз  $\Delta P$  (разность давлений на входе и выходе) определяются неравенством:

$$|\Delta P_L - \Delta P_G| \leq |P_c|.$$

В случае противоточной и двухмерной схем одна из фаз на входе в массообменный слой контактирует с другой фазой, находящейся на выходе из него, и допустимые градиенты давлений должны отвечать более жесткому условию, значительно ограничивающему потоки обменивающихся фаз через ячейку:

$$\Delta P_L + \Delta P_G \leq |P_c|.$$

Критерии выбора размеров макропор в ХГЭ те же, что и при выборе размеров частиц сорбентов и носителей в хроматографии. В обоих случаях приходится искать компромисс между увеличением эффективности массообмена и уменьшением проницаемости массообменного слоя при уменьшении размеров частиц. Для решения большинства аналитических задач диапазон размеров макропор (100–200) мкм можно принять в качестве оптимального. Поскольку в ХГЭ межфазный обмен происходит на границе микро- и макро-

**Таблица 1.** Предельные расходы воздуха ( $W_G$ ) через хроматомембранные ячейки в зависимости от расхода воды ( $W_L$ ) для различных схем хроматомембранной газовой экстракции

$W_L$ , мл/мин	$W_G$ , мл/мин		
	прямоточная ячейка 1	противоточная ячейка 1	двухмерная ячейка 4
5.0	260	50	90
10.0	340	35	60
15.0	380	20	35

пор, микропоры выступают лишь в роли транспортных каналов для прохождения газовой фазы и их радиус не оказывает значимого влияния на эффективность массообмена. Поэтому оптимальный радиус микропор соответствует максимальному расходу газовой фазы. Увеличение радиуса микропор, с одной стороны, ведет к увеличению проницаемости, а с другой, – к уменьшению  $P_c$  и, следовательно, к уменьшению допустимой величины  $\Delta P_G$ . Зависимость расхода газа от радиуса микропор проходит через максимум в диапазоне от 0.5 до 2 мкм, который можно принять в качестве оптимального.

Применение бипористых сред с оптимальными размерами макро- и микропор позволяет реализовывать ХГЭ в достаточно широких пределах изменения скоростей потоков обеих фаз (табл. 1). Как видно из табл. 1, в отличие от других схем, в случае прямооточной схемы увеличение расхода водной фазы позволяет увеличивать и расход газа-экстрагента через хроматомембранную ячейку.

Для объективного сравнения аналитических возможностей различных схем ХГЭ необходимо учитывать режимы ее осуществления. Если параметры процесса ХГЭ остаются неизменными во времени, в том числе концентрации аналитов на входе в ячейку, то через определенный интервал времени становятся постоянными и концентрации аналитов в потоке газа-экстрагента на выходе из ячейки. Такой режим процесса принято называть стационарным. На практике стационарному режиму соответствует традиционный лабораторный анализ предварительно отобранных проб, а также анализ в режиме online с медленно изменяющимися концентрациями аналитов в потоке анализируемой пробы.

При изменении каких-либо параметров процесса, в частности, при быстром изменении концентраций аналитов на входе в ячейку, концентрации аналитов на выходе из нее изменяются не мгновенно, а постепенно приближаются к своему новому стационарному значению. Такой режим принято называть переходным [11]. Исследования закономерностей переходного режима акту-

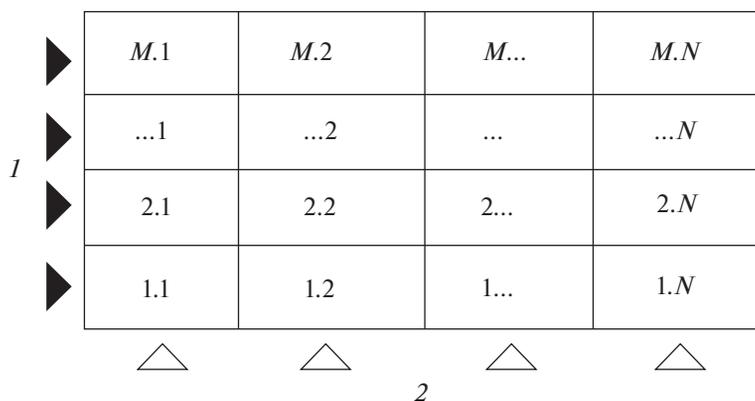


Рис. 2. Тарелочная модель двумерной схемы хроматомембранной газовой экстракции: 1 – поток водной пробы, 2 – поток газа-экстрагента.  $N$  и  $M$  – число тарелок по направлению движения потоков водной пробы и газа-экстрагента соответственно.

ально для анализа в режиме online, когда аналиты непрерывно извлекаются из потока анализируемой среды непосредственно на пробоотборной линии.

**Стационарный режим хроматомембранной газовой экстракции.** Хроматографический принцип межфазного обмена при осуществлении ХГЭ позволил использовать тарелочную модель для адекватного описания всех схем этого процесса [12–14]. Для прямоточной схемы ХГЭ эффективность массообмена соответствует одной эквивалентной теоретической тарелке. При этом зависимость концентрации аналита в потоке газа-экстрагента на выходе из хроматомембранной ячейки  $c_G$  от его концентрации в жидкой фазе на входе в нее  $c_0$  определяется только коэффициентом распределения аналита в системе жидкость–газ ( $K$ ) и соотношением объемных скоростей потоков (расходов) газа-экстрагента ( $W_G$ ) и жидкой пробы ( $W_0$ ) через ячейку [12]:

$$c_G = c_0 \frac{1}{1/K + W_G/W_0}, \quad (2)$$

где  $K$  – коэффициент распределения, равный отношению его концентраций в газовой и жидкой фазах при равновесии.

В прямоточной схеме, если длина массообменного слоя больше высоты, эквивалентной теоретической тарелке (ВЭТТ), то ее изменение не влияет на концентрацию аналитов в выходящем из ячейки потоке газа-экстрагента  $c_G$ . Учитывая, что типичные значения ВЭТТ в ХГЭ не превышают (5–10) мм, для реализации прямоточной схемы могут быть использованы достаточно миниатюрные ячейки.

В случае противоточной схемы массообменный слой может рассматриваться по аналогии с обычной хроматографической колонкой как ряд последовательно соединенных эквивалентных тео-

ретических тарелок, характеризующихся определенной ВЭТТ [13]. Для этой схемы справедливо:

$$c_G = c_0 K \frac{[W_0/(W_G K)]^{-N} - 1}{[W_0/(W_G K)]^{-N-1} - 1}, \quad (3)$$

где  $N$  – число эквивалентных теоретических тарелок. Легко убедиться, что выражение (2) переходит в неравенство (1) при  $N = 1$ .

Для описания двумерной схемы ХГЭ предложена модель двумерных теоретических тарелок, в основе которой лежит представление о массообменном слое как о прямоугольной матрице (рис. 2), состоящей из совокупности двумерных тарелок [14]. Эти тарелки характеризуются ВЭТТ по направлению движения потока жидкой фазы и ВЭТТ по направлению движения газовой фазы. В рамках этой модели справедливо:

$$c_G = c_0 K Y \left[ 1 - (M/YN + 1)^{-N} \times \sum_{s=0}^{M-1} \frac{(N-1+s)!(M/YN)^s (M-s)}{(N-1)!s!(M/YN)^s M} \right],$$

где  $Y = W_0/(W_G K)$ , ! – символ факториала.

Основным недостатком рассмотренной модели, основанной на представлении о двумерных теоретических тарелках, является громоздкое математическое описание, ограниченное к тому же целочисленными значениями  $N$  и  $M$ . Для описания двумерной схемы ХГЭ представляет интерес известная [15] модель перекрестной экстракции (рис. 3).

Для того, чтобы использовать модель перекрестной экстракции, необходимо принять, что протяженность тарелки в направлении движения потока газа-экстрагента равна протяженности массообменного слоя и соответственно  $M = 1$ . Ранее показано [14], что при прочих равных услови-

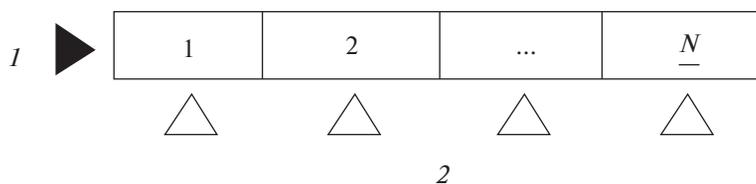


Рис. 3. Перекрестная модель двухмерной схемы ХГЭ: 1 – поток водной пробы, 2 – поток газа-экстрагента.  $\underline{N}$  – число тарелок по направлению движения потоков отдающей фазы пробы.

ях увеличение высоты массообменного слоя  $N$  приводит к увеличению концентрации аналита в потоке газа-экстрагента, однако представленная на рис. 3 модель этого не учитывает. В этой связи логично принять, что

$$\underline{N} = NM,$$

где  $\underline{N}$  и  $N$  – число тарелок в направлении движения потока отдающей фазы в перекрестной и тарелочной моделях соответственно. В рамках перекрестной модели получаем:

$$c_G = c_0 KY [1 - (1 + 1/YNM)^{-NM}]. \quad (4)$$

Общие закономерности различных схем ХГЭ, независимо от абсолютных значений коэффициентов распределения аналитов и расходов пробы и газа-экстрагента через ячейку, отражают зависимости величины  $(c_G/c_0K)$  от соотношения  $W_0/(W_GK) = Y$ . Экспериментальные и рассчитанные по уравнениям (2)–(4) зависимости для прямоточной, противоточной и двухмерной схем приведены на рис. 4.

Анализ рассматриваемых зависимостей позволяет выделить три области осуществления ХГЭ (см. рис. 4): режим полного извлечения аналитов из потока пробы в поток экстрагента (I), когда с достаточной для практики точностью можно принять:

$$c_G = c_0 W_0 / W_G, \quad (5)$$

область частичного извлечения или насыщения (II) и область равновесного насыщения (III) потока газа-экстрагента выделяемым аналитом, когда можно принять:

$$c_G = Kc_0. \quad (6)$$

С точки зрения аналитического применения наибольший интерес представляют области полного извлечения и равновесного насыщения, которые обеспечивают минимальную погрешность анализа, поскольку в этом случае результаты анализа в минимальной степени подвержены влиянию изменений условий эксперимента. Диапазоны указанных областей зависят от выбранной схемы ХГЭ. Недостатком прямоточной схемы являются узкие диапазоны соотношения расходов фаз, при которых реализуются полное извлечение и равновесное насыщение. Как следует из урав-

нения (2), выполнение соотношения (5) с погрешностью менее 1 отн. % будет достигнуто, если  $W_0/W_G < 100K$ , а соотношения (6) – если  $W_0/W_G > 100K$ . В случае противоточной и двухмерной схем указанные режимы легко реализуются соответственно при  $W_0/W_G < 2K$  и  $W_0/W_G > 2K$ .

Положительный эффект от увеличения числа тарелок в противоточной схеме постепенно ослабевает по мере увеличения  $N$ . Поскольку увеличение длины массообменного слоя приводит к пропорциональному увеличению инерционности экстракционной системы, применение громоздких хроматомембранных ячеек становится нерациональным. С учетом величины ВЭТТ оптимальная длина массообменного слоя ХМЯ для

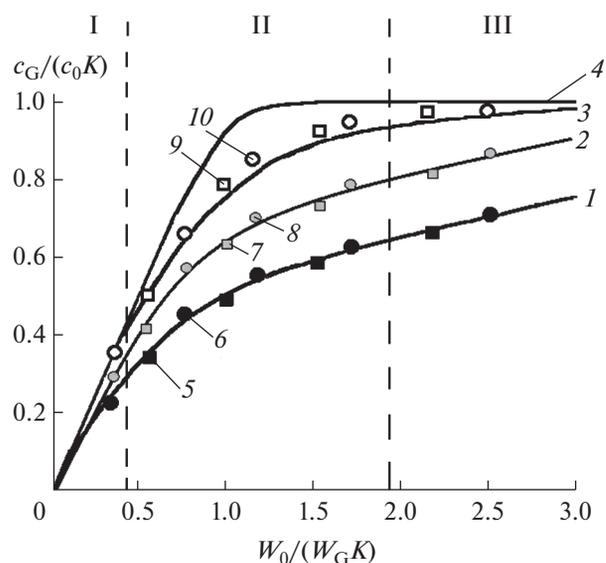
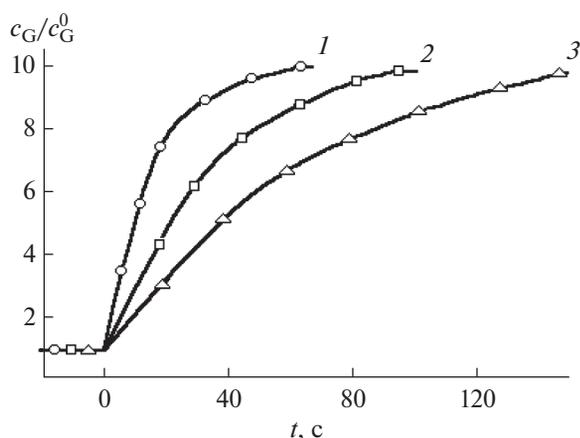


Рис. 4. Закономерности прямоточной, противоточной и двухмерной схем хроматомембранной газовой экстракции. Сплошные линии – зависимости, рассчитанные по уравнению (3) ( $1 - N = 1$ ,  $3 - N = 3$ ,  $4 - N = 10$ ) и по уравнению (4) ( $2 - N = 5$ ,  $M = 2$ ); значки – экспериментальные данные. 5, 6 – прямоточная схема (ячейка 1); 7, 8 – двухмерная схема (ячейка 3); 9, 10 – противоточная схема (ячейка 1). 5, 7, 9 – бензол; 6, 8, 10 – хлороформ. I – область полного извлечения, II – область частичного извлечения и насыщения, III – область равновесного насыщения (для кривой 4).



**Рис. 5.** Изменение концентрации этилацетата в потоке газа-экстрагента после ее увеличения в потоке пробы в 10 раз.  $W_0 = 10$  мл/мин: 1 – прямоточная схема, ячейка 2,  $W_G = 250$  мл/мин; 2 – двухмерная схема, ячейка 4,  $W_G = 60$  мл/мин; 3 – противоточная схема, ячейка 2,  $W_G = 40$  мл/мин.

противоточной схемы составляет 20–30 мм, при которой обеспечивается  $N \approx (3-4)$ .

Аналогичные тенденции проявляются и для двухмерной схемы ХГЭ. Как указано выше, к повышению концентрации выделяемого компонента в экстрагенте приводит не только увеличение  $N$ , но и  $M$ , т.е. увеличение как длины, так и высоты массообменного слоя. При прочих равных условиях, в частности, при одном и том же объеме массообменного слоя, максимальные значения  $c_G$  достигаются при равном числе  $M$  и  $N$ . Принимая во внимание, что ВЭТТ в направлении потока водной пробы приблизительно в пять раз больше, чем ВЭТТ в направлении потока газа-экстрагента, оптимальное соотношение длины и высоты массообменного слоя составляет 5 : 1.

При лабораторном анализе, когда быстродействие экстракционной системы не имеет принципиального значения, оптимальной является двухмерная схема ХГЭ. Эта схема, в отличие от противоточной, позволяет варьировать соотношения

**Таблица 2.** Влияние температуры на постоянную времени хроматомембранной ячейки ( $\tau$ ) (двухмерная схема, ячейка 4,  $W_0 = 10$  мл/мин,  $W_G = 20$  мл/мин)

Аналит	$\tau$ , с	
	25°C	65°C
Диэтиловый эфир	12	8
Дихлорметан	33	18
Этилацетат	40	20
Бензол	68	31
Толуол	110	42

расходов фаз в гораздо более широком диапазоне и, в отличие от прямоточной схемы, дает возможность достигать равновесного насыщения при гораздо меньшем соотношении  $W_0/W_G$ .

**Переходный режим.** Закономерности этого режима имеют принципиальное значение при контроле состава потока анализируемой среды в режиме online. Установлено [16], что переходный режим ХГЭ адекватно описывается уравнением:

$$c_G(t) = c_G^{\text{кон}} - (c_G^{\text{кон}} - c_G^0)e^{-t/\tau}, \quad (7)$$

где  $c_G(t)$  – текущее значение концентрации компонента в потоке экстрагента на выходе из хроматомембранной ячейки,  $c_G^0$  и  $c_G^{\text{кон}}$  – концентрации компонента в потоке газа-экстрагента соответственно до и после изменения концентрации в потоке пробы на входе в ячейку,  $t$  – время после изменения концентрации в потоке пробы,  $\tau$  – постоянная времени ячейки.

На основании тарелочной теории получено следующее выражение для постоянной времени хроматомембранной ячейки [12]:

$$\tau = (V_L + V_G + V_S K_{SG}) / (W_L K + W_G),$$

где  $V_0$ ,  $V_G$  и  $V_S$  – объемы водной пробы, газа-экстрагента и твердофазного носителя в ячейке;  $K_{SG}$  – коэффициент адсорбции аналита из газовой фазы на поверхности твердофазного носителя.

Таким образом, к повышению быстродействия хроматомембранной ячейки (уменьшению ее постоянной времени) приводит уменьшение размеров массообменного слоя, увеличение расходов фаз, снижение удельной поверхности носителя и повышение температуры, обуславливающие снижение адсорбции из газовой фазы. При одинаковых размерах и структуре массообменного слоя прямоточная схема ХГЭ обеспечивает максимальное быстродействие, поскольку при ее реализации можно использовать в несколько раз более высокие расходы обменивающихся фаз через ячейку (см. табл. 1). По этой же причине двухмерная схема обладает большим быстродействием по сравнению с противоточной. Динамика изменения концентрации аналита (на примере этилацетата) в потоке газа-экстрагента после изменения его концентрации в потоке водного раствора с 5 до 50 мг/л для различных схем ХГЭ приведена на рис. 5.

Миниатюрность ячеек и высокая скорость межфазного обмена обеспечивают высокое быстродействие и выгодно отличают ХГЭ от барботирования, где новые стационарные значения  $c_G$  устанавливаются спустя несколько минут после изменения концентрации в анализируемой среде [17]. При осуществлении ХГЭ постоянная времени для веществ с температурой кипения до 100°C не превышает одной минуты. Негативное влия-

ние адсорбции на быстродействие можно уменьшить, повышая температуру процесса (табл. 2). Кроме увеличения быстродействия, повышение температуры приводит также к значительному (в 3–4 раза) увеличению концентраций аналитов в потоке газа-экстрагента [18].

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Poole C., Mester Z., Miró M., Pedersen-Bjergaard S., Pawliszyn J.* Extraction for analytical scale sample preparation (IUPAC Technical Report) // *Pure Appl. Chem.* 2016. V. 88. № 7. P. 649.
2. *Urbanowicz M., Zabiegala B., Namiesnik J.* Solventless sample preparation techniques based on solid- and vapour-phase extraction // *Anal. Bioanal. Chem.* 2011. V. 399. P. 277.
3. *Иоффе Б.В.* О терминологии газохроматографических методов анализа, основанных на внеколоночных фазовых равновесиях и распределениях // *Журн. аналит. химии.* 1981. Т. 36. № 8. С. 1663.
4. *Родинков О.В., Бугайченко А.С., Москвин Л.Н.* Статический парофазный анализ и его современное состояние // *Журн. аналит. химии.* 2020. Т. 75. № 1. С. 3. (*Rodinkov O.V., Bugaichenko A.S., Moskvina L.N.* Static head space analysis and its status // *J. Anal. Chem.* 2020. V. 75. № 1. P. 1.)
5. *Витенберг А.Г., Иоффе Б.В.* Газовая экстракция в хроматографическом анализе. Л.: Химия, 1982. 279 с. (*Ioffe B.V., Vitenberg A.G.* Head-space analysis and related methods in gas chromatography. N.Y.: Wiley Inters, 1984. 276 p.)
6. *Lara-Gonzalo A., Sanchez-Uria J.E., Segovia-Garcia E., Sanz-Medel A.* Critical comparison of automated purge and trap and solid-phase microextraction for routine determination of volatile organic compounds in drinking waters by GC-MS // *Talanta.* 2008. V. 74. P. 1455.
7. *Saridara C., Brukh R., Mitra S.* Development of continuous on-line purge and trap analysis // *J. Sep. Sci.* 2006. V. 29. № 3. P. 446.
8. *Moskvina L.N.* Chromatomembrane method for the continuous separation of substances // *J. Chromatogr. A.* 1994. V. 669. P. 81.
9. *Moskvina L.N., Rodinkov O.V.* Continuous chromatomembrane headspace analysis // *J. Chromatogr. A.* 1996. V. 725. P. 351.
10. *Преображенский Б.К., Калямин А.В., Лилова О.М., Москвин Л.Н.* Зернистый пористый фторопласт для хроматографии. Способ получения и свойства // *Радиохимия.* 1968. Т. 10. № 3. С. 375.
11. *Шишкин И.Ф.* Теоретическая метрология. М.: Издательство стандартов, 1991. С. 165.
12. *Родинков О.В.* Закономерности непрерывной хроматомембранной газовой экстракции при движении фаз в одном направлении // *Вестн. СПбГУ.* Сер. 4. 2001. Вып. 3 (№ 20). С. 68.
13. *Родинков О.В., Москвин Л.Н.* Непрерывная двумерная хроматомембранная газовая экстракция. Тарелочная модель и практические следствия // *Журн. аналит. химии.* 2000. Т. 55. № 9. С. 950. (*Rodinkov O.V., Moskvina L.N.* Continuous two-dimensional chromatomembrane gas extraction: A plate model and its practical consequences // *J. Anal. Chem.* 2000. V. 55. № 9. P. 854.)
14. *Родинков О.В., Москвин Л.Н.* Закономерности противоточной хроматомембранной газовой экстракции // *Журн. аналит. химии.* 2003. Т. 58. № 6. С. 611. (*Rodinkov O.V., Moskvina L.N.* Regularities in counterflow chromatomembrane gas extraction // *J. Anal. Chem.* 2003. V. 58. № 6. P. 530.)
15. *Гиндин Л.М.* Экстракционные процессы и их применение. М.: Наука, 1984. 144 с.
16. *Родинков О.В., Москвин Л.Н., Майорова Н.А.* Быстродействие различных схем непрерывной хроматомембранной газовой экстракции // *Журн. аналит. химии.* 2005. Т. 60. № 8. С. 727. (*Rodinkov O.V., Moskvina L.N., Maiorova N.A.* Operation rates of different schemes of continuous chromatomembrane gas extraction // *J. Anal. Chem.* 2005. V. 60. № 8. P. 820.)
17. *Витенберг А.Г., Новикайте Н.В.* Газохроматографическое определение летучих примесей в воде методом проточного парофазного анализа // *Журн. аналит. химии.* 1999. Т. 54. № 3. С. 300. (*Vitenberg A.G., Novikaite N.V.* Gas-chromatographic determination of volatile impurities in water by flow headspace analysis // *J. Anal. Chem.* 1999. V. 54. № 3. P. 264.)
18. *Москвин Л.Н., Родинков О.В.* От жидкостно-газовой хроматографии к хроматомембранному массообменному процессу // *Журн. аналит. химии.* 2019. Т. 74. № 10. С. 729. (*Moskvina L.N., Rodinkov O.V.* From liquid-gas chromatography to a chromatomembrane mass-exchange process // *J. Anal. Chem.* 2019. V. 74. № 10. P. 955.)

УДК 543.545

## МИКРОЭМУЛЬСИОННОЕ КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ ИЗ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ И ОБРАЗЦОВ МОЧИ

© 2021 г. Л. А. Карцова<sup>а</sup>, \*, С. А. Соловьева<sup>а</sup>, Е. А. Бессонова<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Санкт-Петербургский государственный университет

Университетский просп., 26, Петродворец, Санкт-Петербург, 198504 Россия

\*e-mail: kartsova@gmail.com

Поступила в редакцию 07.04.2021 г.

После доработки 10.04.2021 г.

Принята к публикации 12.04.2021 г.

Показана возможность использования микроэмульсии типа “масло-в-воде” состава 3% додецилсульфата натрия, 8% *n*-бутанола, 1% этилацетата, 88% воды (по массе) в качестве экстрагента для извлечения и концентрирования стероидных гормонов кортизола, кортизона, кортикостерона, 11-дезоксикортизола, 11-дезоксикортикостерона из водных растворов и образцов мочи с последующим анализом методом обращенно-фазовой ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием. При оптимизации условий экстракции варьировали природу масла, время и температуру экстракции, а также время расслоения микроэмульсии. Для разрушения микроэмульсии использовали хлорид магния. Установлено, что коэффициенты концентрирования стероидных гормонов возрастают с увеличением гидрофобности аналитов. Пределы обнаружения стероидов составили 0.5–3 нг/мл, коэффициенты концентрирования – 8–20.

**Ключевые слова:** микроэмульсионное концентрирование, микроэмульсия “масло-в-воде”, стероидные гормоны, поверхностно-активные вещества, обращенно-фазовая ВЭЖХ.

**DOI:** 10.31857/S004445022109005X

Микроэмульсии (МЭ) представляют собой гомогенные, термодинамически стабильные и оптически прозрачные системы с размером капель (10–200) нм. Для микроэмульсий, в отличие от их макроаналогов, характерна большая площадь поверхности. Выделяют микроэмульсии типа “масло-в-воде” (М/В) и “вода-в-масле”, где под маслом понимают любую малорастворимую в воде органическую жидкость. В составе микроэмульсии обязательно содержится поверхностно-активное вещество (ПАВ) в концентрации, превышающей критическую концентрацию мицеллообразования. Для формирования МЭ часто требуется введение второго немилцеллообразующего ПАВ (со-ПАВ) – спирта с небольшим гидрофобным радикалом (от *n*-бутанола до *n*-октанола). Роль со-ПАВ заключается в стабилизации МЭ и снижении поверхностного натяжения на границе раздела двух фаз [1, 2]. Микроэмульсии обладают повышенной солюбилизующей емкостью, т.е. способностью растворять полярные и неполярные аналиты. Это свойство МЭ оказалось востребованным при определении стероидных гормонов [3–8], полифенолов и катехоламинов [9, 10], витаминов [11–13] и др. в условиях микроэмульсионной электрокинетической хроматографии, а также в процессах пробоподготовки объектов со

сложной матрицей для извлечения и концентрирования соединений различной природы и получило название метода *микроэмульсионной экстракции* [14, 15]. Принцип такой экстракции заключается в концентрировании аналитов в капли масла или воды, после чего микроэмульсии разрушаются. При этом образуются несмешивающиеся слои органической и водной фаз. Целевые компоненты концентрируются в фазе меньшего объема. При оптимизации условий микроэмульсионной экстракции варьируют природу масла, со-ПАВ, время экстракции и расслоения МЭ.

Способы разрушения микроэмульсии зависят от типа используемого детергента (ионогенного, цвиттер-ионного, неионогенного). Среди анионных ПАВ наибольшее распространение получили додецилсульфат (ДДСН) и октилсульфонат натрия; катионных – цетилтриметиламмония бромид; неионогенных – гидроксипропан-2-ил-β-D-глюкозиды, гидроксипропан-2-ил-β-D-галактозиды, гидроксипропан-2-ил-β-D-маннозиды, гидроксипропан-2-ил-β-D-ксилозиды, гидроксипропан-2-ил-β-D-рибозиды, гидроксипропан-2-ил-β-D-арабинозиды, гидроксипропан-2-ил-β-D-галактозиды, гидроксипропан-2-ил-β-D-маннозиды, гидроксипропан-2-ил-β-D-ксилозиды, гидроксипропан-2-ил-β-D-рибозиды, гидроксипропан-2-ил-β-D-арабинозиды, гидроксипропан-2-ил-β-D-галактозиды, гидроксипропан-2-ил-β-D-маннозиды, гидроксипропан-2-ил-β-D-ксилозиды, гидроксипропан-2-ил-β-D-рибозиды, гидроксипропан-2-ил-β-D-арабинозиды. Растворы анионных ПАВ подвергают фазовому разделению путем добавления кислот [16]. Данный способ применен для экстракции в мицеллы ДДСН различных полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) из водных образцов. Растворы неионогенных ПАВ разделяют на две

фазы при повышении температуры (так называемая “экстракция в точке помутнения”). Подобный подход применен для разрушения МЭ на основе Тритона X-100 с целью извлечения ионов кальция, магния и кобальта из образцов дизельного топлива [17]. Показана [15] возможность расслоения МЭ на основе ДДСН путем добавления избытка ионов кальция за счет образования осадка с ДДСН. Способ апробирован при определении ПАУ и диалкилфталатов в образцах почв. В некоторых работах стабильные МЭ разрушают при длительном (15 мин) и интенсивном центрифугировании. Такой способ применили в работе [18] для извлечения антиоксиданта ликопина из томатов с помощью МЭ с сапонином в качестве ПАВ.

Цель данной работы – выявление возможности использования микроэмульсий типа *масло в воде* в качестве экстрагента для извлечения и концентрирования стероидных гормонов.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Способ приготовления микроэмульсии типа “масло в воде”.** Общий алгоритм приготовления микроэмульсии следующий. К точной навеске ПАВ (додецилсульфата натрия) добавляют необходимое количество дистиллированной воды и помещают в ультразвуковую баню до полного растворения ДДСН. Затем к полученному раствору прибавляют определенное количество *масла* и тщательно перемешивают; далее добавляют со-ПАВ (*n*-бутанол), перемешивают и помещают в ультразвуковую баню на 15 мин для образования микроэмульсии.

После серии предварительных экспериментов выбрали состав микроэмульсии. Для приготовления 10 мл МЭ состава 3% ДДСН, 8% *n*-бутанола, 1% этилацетата, 88% воды (по массе), используемой для извлечения стероидных гормонов из образцов мочи, в пробирке емк. 25 мл взвешивали 0.3 г ДДСН, добавляли 8.9 мл дистиллированной воды и помещали в ультразвуковую баню до полного растворения ДДСН. Затем к раствору ДДСН добавляли 111 мкл этилацетата, перемешивали, добавляли 990 мкл *n*-бутанола, снова перемешивали и помещали в ультразвуковую баню на 15 мин для образования микроэмульсии.

**Приготовление растворов стандартов.** Тестовые растворы анализов с концентрацией 1 мг/мл получали растворением точной навески каждого из стероидов (0.001 г в 1 мл ацетонитрила) и хранили при  $-16^{\circ}\text{C}$  в морозильной камере. Разбавлением тестовых растворов дистиллированной водой получали требуемые рабочие растворы.

**Схема пробоподготовки образцов мочи для извлечения кортикостероидов с использованием микроэмульсии типа “масло в воде”.** В пробирке типа

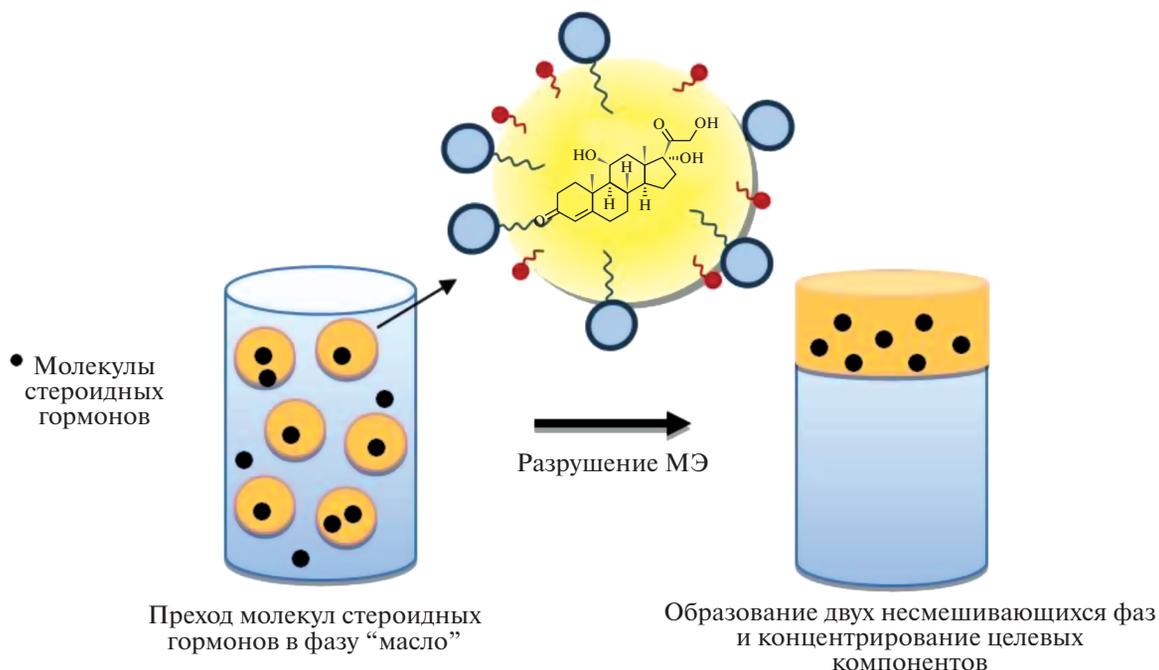
Эппендорф емк. 2 мл смешивали 1000 мкл образца мочи и 500 мкл микроэмульсии типа *масло в воде* (3% ДДСН, 8% *n*-бутанола, 1% этилацетата, 88% (по массе)). Полученный раствор помещали в ультразвуковую баню на 5 мин для экстракции стероидных гормонов в каплю микроэмульсии. Затем к раствору добавляли 0.3 г сухого  $\text{MgCl}_2$  и помещали в ультразвуковую баню на 10 мин для разрушения микроэмульсии. Отбирали 40 мкл образовавшегося органического слоя, добавляли 20 мкл 1 М раствора NaOH, центрифугировали в течение 1 мин со скоростью 10000 об/мин и отбирали надосадочную жидкость для хроматографического анализа.

**Условия хроматографического разделения кортикостероидов со спектрофотометрическим детектированием.** Хроматографический анализ сконцентрированных стероидных гормонов методом микроэмульсионной экстракции из водных образцов и проб мочи выполняли на жидкостном хроматографе “Shumadzu” LC-20 (Япония) с мультиволновым детектором (SPD-20A); на колонке Luna C18 (2) (150 × 3 мм, 3 мкм). Условия обращенно-фазовой (ОФ) ВЭЖХ: подвижная фаза: вода (раствор А)– $\text{CH}_3\text{CN}$  (раствор Б). Программа градиентного элюирования: 0 мин – 26% Б; 3 мин – 26% Б; 10 мин – 40% Б; 13 мин – 60% Б; 15 мин – 80% Б; 17 мин – 80% Б. Скорость подвижной фазы (п.ф.) – 0.3 мл/мин; объем вводимой пробы – 20 мкл; спектрофотометрическое детектирование при 254 и 242 нм.

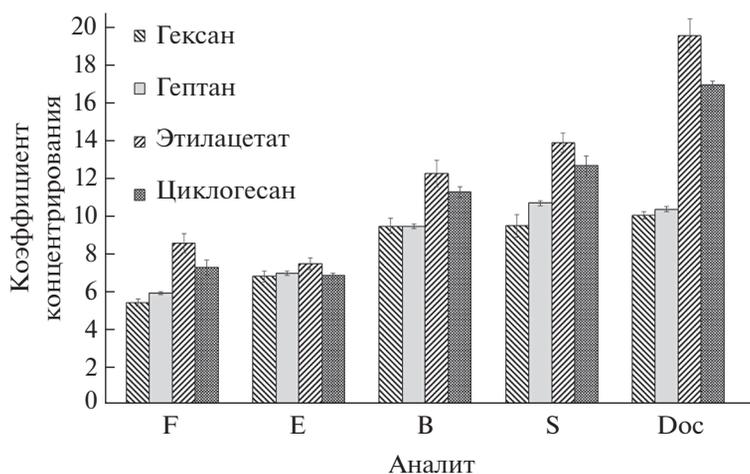
### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для хроматографического определения стероидных гормонов, содержание которых в биологических жидкостях (сыворотка крови, моча) составляет всего несколько нг/мл, требуются предварительные стадии концентрирования и освобождения от большинства сопутствующих компонентов матрицы пробы. Мы предположили, что гидрофобные по природе стероидные гормоны могут проникать из водного раствора в каплю *масла* микроэмульсии М/В, а после разрушения МЭ концентрироваться в органической фазе, объем которой существенно меньше по сравнению с водной (рис. 1).

При оптимизации условий экстракции стероидных гормонов с помощью микроэмульсии *масло-в-воде* на модельных системах варьировали природу *масла*, время и температуру экстракции, а также время расслоения МЭ. Установили, что аналитическими возможностями обладает экстрагирующая система – микроэмульсия состава 3% ПАВ, 8% со-ПАВ (*n*-бутанол), 1% *масла*, 88% воды (по массе). В качестве *масла* исследовали различные органические растворители (гексан, гептан, циклогексан, этилацетат), плотность ко-



**Рис. 1.** Схема извлечения и концентрирования стероидных гормонов из водных растворов с помощью микроэмульсии типа "масло-в-воде".

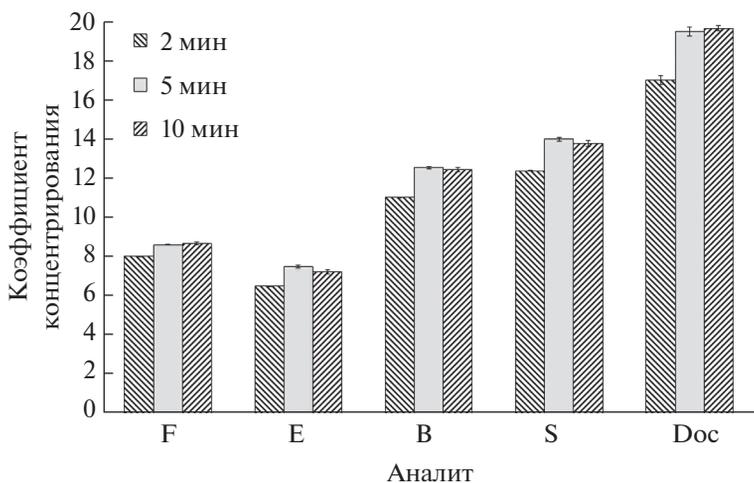


**Рис. 2.** Зависимости коэффициентов концентрирования F, E, B, S, Dos от природы масла ( $n = 3$ ,  $P = 0.95$ ). Концентрация стероидных гормонов 100 нг/мл. F — кортизол, E — кортизон, B — кортикостерон, S — 11-дезоксикортизол, Dos — 11-дезоксикортикостерон.

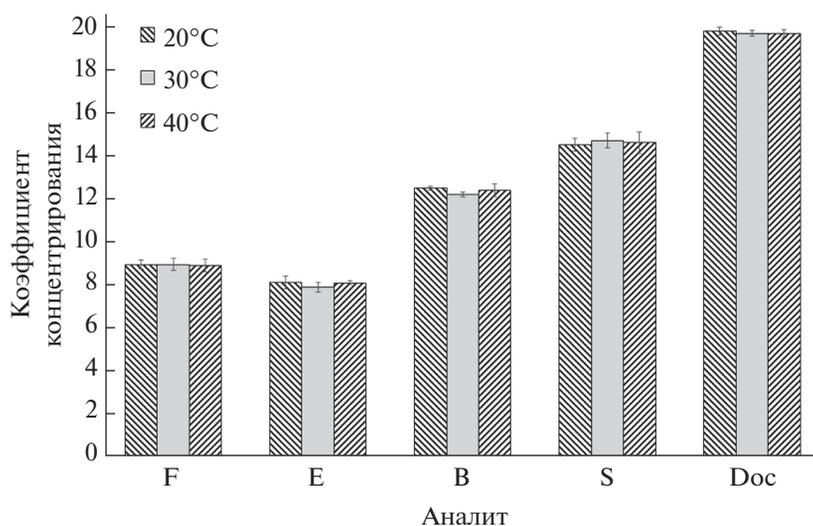
торых меньше 1 г/мл. Необходимо, чтобы органическая фаза находилась над водной, и после разрушения МЭ в объеме органической фазы оставались масло и со-ПАВ (*n*-бутанол,  $\rho = 0.81$  г/мл). Максимальные значения коэффициентов концентрирования достигнуты в случае этилацетата (рис. 2). Другие параметры микроэмульсионной экстракции стероидов выбирали далее с составом микроэмульсии 3% ДДСН, 1% этилацетата, 8% *n*-бутанола, 88% воды (по массе).

Максимальные значения коэффициентов концентрирования стероидов достигаются при времени и температуре экстракции в ультразвуковой бане 5 мин и 30°C соответственно. Увеличение значений этих параметров не приводит к росту коэффициентов концентрирования (рис. 3, 4).

Для разрушения МЭ необходимо выделить ПАВ в осадок, что может привести к нестабильности капли масла и расслоению гомогенной системы. С этой целью провели предварительную се-



**Рис. 3.** Зависимости коэффициентов концентрирования F, E, B, S, Doc от времени экстракции ( $n = 3, P = 0.95$ ). Концентрация стероидных гормонов 100 нг/мл. F – кортизол, E – кортизон, B – кортикостерон, S – 11-дезоксикортизол, Doc – 11-дезоксикортикостерон.

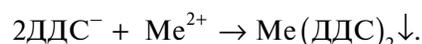


**Рис. 4.** Зависимости коэффициентов концентрирования стероидных гормонов (F, E, B, S, Doc) от температуры экстракции ( $n = 3, P = 0.95$ ). Концентрация стероидных гормонов 100 нг/мл. F – кортизол, E – кортизон, B – кортикостерон, S – 11-дезоксикортизол, Doc – 11-дезоксикортикостерон.

рию экспериментов по разрушению микроэмульсии с применением водного раствора стандартов стероидных гормонов кортизола (F), кортизона (E), кортикостерона (B), 11-дезоксикортизола (S), 11-дезоксикортикостерона (Doc). Использование микроэмульсии М/В с цетилтриметиламмоний бромидом в качестве ПАВ с добавлением перхлората лития привело к образованию рыхлого осадка перхлората цетилтриметиламмония, который не отделялся при центрифугировании и мешал отбору органической фазы.

Для разрушения микроэмульсии М/В на основе ДДСН применили способ, ранее предложен-

ный в работе [15] и основанный на осаждении ДДСН солями двухвалентных металлов:



В настоящей работе с этой целью использовали сухой хлорид магния. В предварительных экспериментах обнаружили, что расслоение микроэмульсии начинается при концентрации ионов магния 1 М, что соответствует его 20-кратному избытку по отношению к ДДСН. Рассчитали коэффициенты концентрирования (КК) стероидных гормонов как отношение площадей пиков аналита до и после экстракции с помощью мик-

**Таблица 1.** Коэффициенты концентрирования кортизола (F), кортизона (E), кортикостерона (B), 11-дезоксикортизола (S), 11-дезоксикортикостерона (Dос) при использовании микроэмульсии *масло в воде*\* ( $n = 3, P = 0.95$ )

Концентрация ионов $Mg^{2+}$ , М	F	E	B	S	Dос
1	$5.5 \pm 0.3$	$4.6 \pm 0.1$	$10.9 \pm 0.5$	$11.2 \pm 0.9$	$16.0 \pm 0.4$
1.5	$8.4 \pm 0.4$	$7.2 \pm 0.2$	$12.3 \pm 0.8$	$13.9 \pm 0.7$	$18.9 \pm 0.7$
2	$8.0 \pm 0.8$	$6.9 \pm 0.4$	$12.0 \pm 0.3$	$13.5 \pm 0.4$	$19.3 \pm 0.5$

\* Состав микроэмульсии 3% ДДСН, 8% *n*-бутанола, 1% этилацетата, 88% воды (по массе).

роэмульсии *масло-в-воде* при различных концентрациях хлорида магния (табл. 1). К водному раствору стандартов стероидных гормонов добавляли МЭ в соотношении 2 : 1 (по объему), помещали в ультразвуковую баню на 15 мин для экстракции аналитов в каплю *масла*, затем вводили необходимое количество сухого  $MgCl_2$  и вновь помещали в ультразвуковую баню на 10 мин для разрушения микроэмульсии. Далее отбирали органический слой и проводили ОФ ВЭЖХ-УФ-анализ.

Обнаружено, что коэффициенты концентрирования стероидных гормонов возрастают с увеличением гидрофобности аналитов. При концентрации ионов  $Mg^{2+}$  выше 1.5 М значения КК практически не изменяются. Таким образом, для разрушения системы водный раствор аналитов—микроэмульсия (2 : 1) (по объему) в исследуемую пробу добавляли твердый  $MgCl_2$  в таком количестве, чтобы его концентрация составила 1.5 М.

Максимальные значения КК стероидных гормонов получили при времени расслаивания системы в ультразвуковой бане 10 мин. Дальнейшее увеличение времени расслаивания приводит к

снижению коэффициентов концентрирования (рис. 5), что возможно, связано с миграцией молекул стероидных гормонов к границе раздела органической и водной фаз.

Таким образом, извлечение и концентрирование кортикостероидов из водного раствора с помощью микроэмульсии М/В в выбранных оптимальных условиях включает следующие этапы:

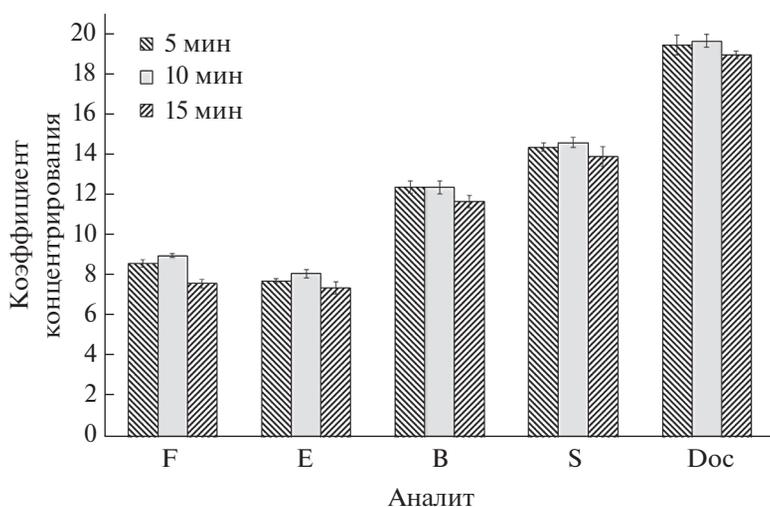
- Добавление к водному раствору МЭ состава 3% ДДСН, 8% *n*-бутанола, 1% этилацетата, 88% воды в соотношении 2 : 1 (по объему).

- Выдерживание раствора в ультразвуковой бане при 30°C в течение 5 мин для экстракции стероидных гормонов в каплю *масла*.

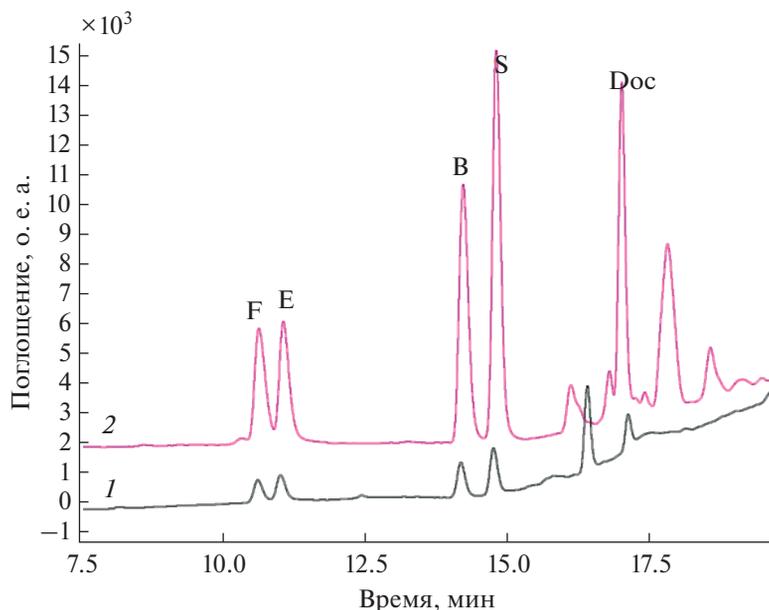
- Добавление  $MgCl_2$  в концентрации 1.5 М и выдерживание раствора в ультразвуковой бане в течение 10 мин для разрушения МЭ.

- Отделение органического слоя и его хроматографический анализ (рис. 6).

Как видно из табл. 2, коэффициенты концентрирования для F, E, B, S, Dос коррелируют с гидрофобностью аналитов. Хроматограммы водных растворов стандартов стероидных гормонов



**Рис. 5.** Зависимости коэффициентов концентрирования F, E, B, S, Dос от времени расслаивания системы ( $n = 3, P = 0.95$ ). Концентрация стероидных гормонов 100 нг/мл. F – кортизол, E – кортизон, B – кортикостерон, S – 11-дезоксикортизол, Dос – 11-дезоксикортикостерон.



**Рис. 6.** Хроматограммы водного раствора стандартов F, E, B, S, Doc (100 нг/мл) до (1) и после экстракции (2) с помощью микроэмульсии *масло-в-воде* (3% ДДСН, 8% *n*-бутанола, 1% этилацетата, 88% воды, по массе). F – кортизол, E – кортизон, B – кортикостерон, S – 11-дезоксикортизол, Doc – 11-дезоксикортикостерон. Условия: жидкостный хроматограф Shimadzu LC-20 с мультимолновым детектором (SPD-20A); колонка Luna C18 (2) (150 × 3 мм, 3 мкм); подвижная фаза: 1 – H<sub>2</sub>O, 2 – CH<sub>3</sub>CN; градиентный режим элюирования; скорость подвижной фазы – 0.3 мл/мин; объем вводимой пробы – 20 мкл.

до и после экстракции с помощью МЭ М/В в выбранных условиях представлены на рис. 6. Пределы обнаружения стероидных гормонов F, E, B, S, Doc, рассчитанные по утроенному уровню шума, составили 0.5–3 нг/мл.

Условия пробоподготовки с использованием микроэмульсии типа “*масло в воде*”, выбранные на модельных растворах, апробировали на образцах мочи с целью извлечения кортизола и кортизона. Обнаружена необходимость промывки анализируемого органического слоя после разрушения МЭ щелочью (1 М раствор NaOH) для удаления мешающих компонентов реального образца (пигментов и т.д.) и снижения уровня шума от матрицы пробы. Степени извлечения (RE) добавленных до и после процедуры пробоподготовки в образец биологической матрицы кортизола и кортизона, рассчитывали как отношение площадей их пиков:

$$RE = \frac{S_{\text{доэкстракционная добавка стандарта}}}{S_{\text{постэкстракционная добавка стандарта}}}$$

Они составили 83 и 74% соответственно.

Хроматограммы образцов мочи без и с добавкой стандартов стероидных гормонов представлены на рис. 7.

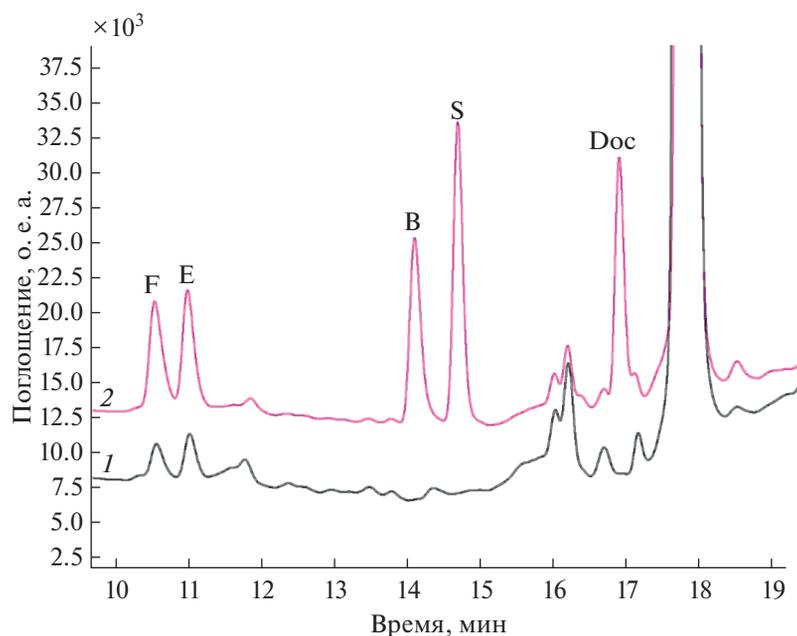
\* \* \*

Предложен экспрессный способ пробоподготовки образцов мочи для определения кортизона, кортизола с помощью микроэмульсии М/В состава 3% ДДСН, 8% *n*-бутанола, 1% этилацетата, 88% воды (по массе): соотношение образец–МЭ (2 : 1, по объему); экстракция в течение 5 мин, добавление сухого MgCl<sub>2</sub> в таком количестве, чтобы его концентрация составила 1.5 М; разрушение МЭ в течение 10 мин; промывка органического

**Таблица 2.** Значения коэффициентов концентрирования и критерия гидрофобности (*H*) стероидных гормонов

Параметр	F	E	B	S	Doc
Коэффициент гидрофобности ( <i>H</i> )	12.06	12.06	13	13	14.07
Коэффициенты концентрирования	9.1 ± 0.4	8.2 ± 0.2	12.5 ± 0.7	14.7 ± 0.5	19.8 ± 0.9

*Примечание:* критерий гидрофобности *H* рассчитывали по формуле:  $H = nH - 4\sqrt{nf}$ , *nH* – суммарное число атомов углерода и галогенов в молекуле, *nf* – число функциональных групп в молекуле.



**Рис. 7.** Хроматограммы образцов мочи без (1) и с добавкой 100 нг/мл F, E, B, S, Doc (2) после экстракции с помощью микроэмульсии *масло-в-воде*. F – кортизол, E – кортизон, B – кортикостерон, S – 11-дезоксикортизол, Doc – 11-дезоксикортикостерон.

слоя 1 М раствором NaOH. Степени извлечения кортизола, кортизона составили 83 и 74% соответственно.

*Выражаем благодарность Ресурсному центру СПбГУ “Методы анализа состава вещества” за предоставленное оборудование.*

*Работа выполнена при финансовой поддержке проекта РНФ № 19-13-00370.*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Puell U. Micellar and Microemulsion Electrokinetic Chromatography. *Capill. Electromigr. Sep. Methods*. Elsevier, 2018. P. 113.
2. Пирогов А.В., Шпигун О.А. Применение микроэмульсий в жидкостной хроматографии и электрокинетических методах анализа. Достоинства и недостатки подхода // *Журн. аналит. химии*. 2020. Т. 75. № 2. С. 99. (Pirogov A.V., Shpigun O.A. Application of microemulsions in liquid chromatography and electrokinetic methods of analysis: Advantages and disadvantages of the approach // *J. Anal. Chem.* 2020. V. 75. № 2. P. 139.)
3. Noe S., Bohler J., Keller E., Frahm A.W. Evaluation and optimisation of separation buffers for the determination of corticosteroids with micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC) // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1998. V. 18. P. 911.
4. Vomastová L., Mikšík I., Deyl Z. Microemulsion and micellar electrokinetic chromatography of steroids // *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 1996. V. 681. P. 107.
5. Pomponio R., Gotti R., Fiori J., Cavrini V. Microemulsion electrokinetic chromatography of corticosteroids: Effect of surfactants and cyclodextrins on the separation selectivity // *J. Chromatogr. A*. 2005. V. 1081. P. 24.
6. Silva C.A., Aurora-Prado M.S., Altria K.D., Tavares M.F.M. Separation of steroids and the determination of estradiol content in transdermic patches by microemulsion electrokinetic chromatography // *Chromatographia*. 2011. V. 73. P. 373.
7. Карцова Л.А., Бессонова Е.А., Москвичев Д.О. Разделение стероидных гормонов методом микроэмульсионной электрокинетической хроматографии с участием ионных жидкостей // *Аналитика и контроль*. 2019. Т. 23. № 2. С. 193. (Kartsova L.A., Bessonova E.A., Moskvichev D.O. Separation of steroid hormones by microemulsion electrokinetic chromatography involving ionic liquids // *Analytics and Control*. 2019. V. 23. P. 193.)
8. Pomponio R., Gotti R., Fiori J., Cavrini V. Microemulsion electrokinetic chromatography of corticosteroids: Effect of surfactants and cyclodextrins on the separation selectivity // *J. Chromatogr. A*. 2005. V. 1081. P. 24.
9. Карцова Л.А., Ганжа О.В. Новые возможности микроэмульсионной электрокинетической хроматографии при определении катехинов и катехоламинов в природных объектах // *Журн. аналит. химии*. 2010. Т. 65. № 3. С. 285.
10. Kartsova L., Moskvichev D., Bessonova E., Peshkova M. Imidazolium ionic liquids in microemulsion electrokinetic chromatography for separation of polyphenol antioxidants // *Chromatographia*. 2020. V. 83. № 8. P. 1001.

11. *Yin C.N., Cao Y.H., Ding S.D., Wang Y.* Rapid determination of water- and fat-soluble vitamins with microemulsion electrokinetic chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2008. V. 1193. P. 172.
12. *Карцова Л.А., Ганжа О.В., Хмельницкий И.К.* Факторы, влияющие на разделение полифенолов, стероидных гормонов и витаминов в режиме микроэмульсионной электрокинетической хроматографии // *Сорбционные и хроматографические процессы.* 2009. Т. 9. № 1. С. 33.
13. *Свидрицкий Е.П., Пашкова Е.Б., Пирогов А.В., Шнигун О.А.* Одновременное определение жирорастворимых витаминов методом микроэмульсионной электрокинетической хроматографии // *Журн. аналит. химии.* 2010. Т. 65. № 3. С. 292.
14. *Дербина А.А., Пирогов А.В., Каргин И.Д., Шнигун О.А.* Применение микроэмульсий типа “вода в масле” в микроэмульсионной электрокинетической хроматографии и в качестве экстрагентов для извлечения полярных веществ // *Журн. аналит. химии.* 2015. Т. 70. № 10. С. 1102.
15. *Толмачева Н.Г., Чжан М., Пирогов А.В., Шнигун О.А.* Использование микроэмульсий для извлечения и одновременного концентрирования бенз(а)пирена из почвы // *Сорбционные и хроматографические процессы.* 2017. Т. 17. № 3. С. 358.
16. *Casero I., Sicilia D., Rubio S., Pérez-Bendito D.* An acid-induced phase cloud point separation approach using anionic surfactants for the extraction and preconcentration of organic compounds // *Anal. Chem.* 1999. V. 71. № 20. P. 4519.
17. *Pereira F.M., Fábio B., Lepri Ricardo D.M.G., Cassella J.* Extraction induced by emulsion breaking as a tool for Ca and Mg determination in biodiesel by fast sequential flame atomic absorption spectrometry (FS-FAAS) using Co as internal standard // *Microchem. J.* 2014. V. 117. P. 172.
18. *Amiri-Rigi A., Abbasi S.* Microemulsion-based lycopene extraction: Effect of surfactants, co-surfactants and pretreatments // *Food Chem.* 2016. V. 197. P. 1002.

УДК 543.551.4:543.8

## МИЦЕЛЛЯРНАЯ ЭКСТРАКЦИЯ АКТИВНЫХ КОМПОНЕНТОВ ИЗ СПЕЦИЙ И ОЦЕНКА Ce(IV)-ВОССТАНАВЛИВАЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ ИЗВЛЕЧЕНИЙ

© 2021 г. Г. К. Зиятдинова<sup>а</sup>, \*, Г. К. Будников<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Химический институт им. А.М. Бутлерова, Казанский федеральный университет  
ул. Кремлевская, 18, Казань, 420008 Россия

\*e-mail: Ziyatdinovag@mail.ru

Поступила в редакцию 11.04.2021 г.

После доработки 19.04.2021 г.

Принята к публикации 19.04.2021 г.

Найдены условия мицеллярной экстракции активных компонентов из специй с помощью 0.1 М Brij® 35 в качестве экстрагента. Для интенсификации извлечения использована ультразвуковая обработка. Показано, что однократная экстракция в течение 10 мин обеспечивает максимальное извлечение активных компонентов. Соотношение сырье/экстрагент варьируется в широких пределах в зависимости от типа специй. Для характеристики полученных извлечений использован показатель Ce(IV)-восстанавливающая способность, основанный на взаимодействии компонентов экстрактов с электрогенерированным Ce(IV). На примере аскорбиновой кислоты показано, что мицеллярная среда Brij® 35 не оказывает влияния на выход по току кулонометрического титранта. Установлены стехиометрические коэффициенты ряда биологически активных соединений с электрогенерированным Ce(IV). Оценена Ce(IV)-восстанавливающая способность 20 специй. Полученные результаты сопоставлены с обобщенными антиоксидантными показателями.

**Ключевые слова:** мицеллярная экстракция, специи, Ce(IV)-восстанавливающая способность, кулонометрическое титрование, анализ пищевых продуктов.

**DOI:** 10.31857/S0044450221090127

Одним из основных источников биологически активных веществ для человека являются пищевые продукты, среди которых следует отметить специи, проявляющие широкий спектр биологической активности, в том числе антиоксидантные свойства [1, 2]. Эти полезные свойства специй предопределили их применение в качестве консервантов продуктов питания, а также вкусоароматических добавок к ним. Кроме того, многие биологически активные вещества, применяемые в производстве биологически активных добавок или лекарственных средств, получают путем выделения из растительного сырья, в том числе и специй. Экстракты специй активно используют в пищевой промышленности. В связи с этим поиск и разработка способов извлечения активных компонентов из специй представляет теоретический и практический интерес. Для решения этой задачи обычно используют жидкостную, твердофазную и сверхкритическую флюидную экстракцию [3, 4]. Для интенсификации процесса извлечения часто применяют ультразвуковую обработку. Это позволяет значительно сократить продолжительность процедуры экстракции и расход экстрагент-

та, число стадий извлечения, а также использовать достаточно мягкие условия для извлечения аналитов [3–5], что соответствует концепции “зеленой химии”. Другой способ реализации этой концепции – переход от экстракции органическими растворителями к нетоксичным водным средам, в качестве которых применяют мицеллярные среды на основе поверхностно-активных веществ (ПАВ). Их главным преимуществом по сравнению с другими экстрагентами является способность сольбилизовать как полярные, так и неполярные соединения, что имеет значение для обобщенной характеристики свойств полученных извлечений [3]. В литературе описаны лишь единичные примеры мицеллярной экстракции активных компонентов из специй. Так, для извлечения эвгенола и полифенолов из гвоздики предложен метод динамической мацерации при 50°C в течение 40 мин с помощью 5%-ного Tween 80 при pH 12, обеспечивающий более высокий выход аналитов по сравнению с традиционной экстракцией этанолом и водно-этанольными смесями [6].

Представляет практический интерес сочетание экстракции ПАВ-содержащими средами с ультразвуковой обработкой. Для извлечения таншинонов (биоактивных компонентов сальвии) из *Salvia miltiorrhiza bunge* успешно использованы мицеллярные среды на основе ионных жидкостей с ультразвуковой обработкой [7]. Показана возможность ультразвуковой экстракции фенольных антиоксидантов из специй с помощью 0.25 мМ Triton X-100 [8], однако подход неприменим для извлечения куркуминоидов. Это ограничение успешно преодолевается при ультразвуковой экстракции антиоксидантов из специй мицеллярной средой Brij® 35 [9, 10]. Установлено, что такой подход обеспечивает более высокий выход фенольных антиоксидантов по сравнению с экстракцией органическими растворителями [9].

В настоящей работе для экстракции активных компонентов из специй применили мицеллярную экстракцию 0.1 М Brij® 35, эффективность которой оценивали методом кулонометрического титрования электрогенерированным Се(IV). Применение Се(IV) в качестве кулонометрического титранта позволяет охватить широкий круг биологически активных веществ, способных к окислению, в том числе антиоксидантов различной природы, поскольку Се(IV) проявляет сильные окислительные свойства. Кроме того, Се(IV) является одноэлектронным окислителем, что позволяет в какой-то степени приблизиться к условиям протекания реакций в живых системах с участием активных форм кислорода и азота. Рассмотрена электрогенерация Се(IV) в присутствии Brij® 35 и его влияние на реакции титранта с биологически активными соединениями. Определена Се(IV)-восстанавливающая способность полученных мицеллярных экстрактов специй и сопоставлена с другими антиоксидантными показателями.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Реагенты и растворы.** Использовали 97%-ный рутин тригидрат (Alfa Aesar, Великобритания), 98%-ный кверцетин дигидрат, 98%-ный катехин гидрат (Sigma, Германия), танин фармакопейной чистоты (Fluka, Германия), 99%-ную галловую, 98%-ную кофейную, 98%-ную розмариновую и 98%-ную *n*-кумаровую кислоты (Sigma, Германия), 70%-ный куркумин из *Curcuma longa*, 96%-ный  $\alpha$ -токоферол и 95%-ный ретинол (Sigma, Германия), 50%-ный капсаицин (Sigma, Индия), 95%-ную хлорогеновую и 99%-ную феруловую кислоты, 99%-ный эвгенол и 98%-ный сиреневый альдегид (Aldrich, Германия), 99.5%-ный тимол (Sigma, Германия). Их стандартные 0.40–10 мМ растворы готовили растворением точной навески в 0.1 М Brij® 35 (Sigma, Германия) с ультразвуковой обработкой (WiseClean WUC-A03H (DAIHAN Sci-

entific Co., Ltd., Корея)) в течение 10 мин. Остальные реактивы были марки х. ч.

**Кулонометрические определения** проводили на анализаторе Эксперт-006 (ООО “Эконикс-Эксперт”, Россия). Электрогенерацию Се(IV) осуществляли из 0.1 М раствора нитрата церия(III) в 3 М  $H_2SO_4$  на Pt-электроде при постоянной силе тока 5.0 мА, обеспечивающей 100%-ный выход по току титранта. В качестве катода использовали свернутую спиралью платиновую проволоку. Катодная камера со вспомогательным электродом была отделена от анодной камеры пористой стеклянной перегородкой. Конечную точку титрования определяли биамперометрически с платиновыми электродами ( $\Delta E = 200$  мВ). Поверхность платиновых электродов очищали азотной кислотой с последующим промыванием дистиллированной водой.

В электрохимическую ячейку емк. 50 мл внесли 20.0 мл фонового электролита, помещали в ячейку электроды и включали генераторную цепь. По достижении индикаторным током определенного значения генераторная цепь автоматически отключалась и снова включалась одновременно с таймером после внесения аликвоты исследуемого соединения или экстракта специй. Для титрования брали аликвоты с таким расчетом, чтобы время титрования не превышало 2 мин. Конечную точку титрования устанавливали по достижении индикаторным током первоначального значения. По времени титрования рассчитывали количество электричества, затраченного на титрование экстракта, или число электронов по закону Фарадея для индивидуальных соединений.

Интегральную антиоксидантную емкость и железовосстанавливающую способность определяли кулонометрическим титрованием экстрактов с помощью электрогенерированных брома и гексацианоферрат(III)-ионов соответственно [8, 10].

**Экстракция мицеллярной средой Brij® 35.** Точную навеску ( $0.1000 \pm 0.0005$  г) коммерческих образцов специй помещали в пробирки емк. 15.0 мл, добавляли от 2.0 до 9.0 мл 0.1 М раствора Brij® 35 и помещали в ультразвуковую ванну на 10 мин [9]. Экстракт отфильтровывали и использовали для оценки полноты экстракции и церий-восстанавливающей способности.

**Статистическую обработку результатов** проводили для пяти измерений (три измерения для оценки эффективности электрогенерации титранта) при доверительной вероятности 0.95. Результаты представляли как  $X \pm \Delta X$ , где  $X$  – среднее значение и  $\Delta X$  – доверительный интервал. Случайную погрешность определения оценивали по величине относительного стандартного отклонения ( $s_r$ ). Корреляционный анализ проводили в программе OriginPro 8.0 (OriginLab, США).

**Таблица 1.** Эффективность тока генерации Ce(IV) в присутствии Brij® 35 по данным кулонометрического титрования аскорбиновой кислоты ( $n = 3$ ,  $P = 0.95$ )

$c_{\text{Brij}^{\circledR} 35}$ , мМ	$Q_{\text{теор}}$ , Кл	$Q_{\text{практ}}$ , Кл	$s_{\text{r}}$	Выход титранта по току, %
0.25	0.102	$0.102 \pm 0.004$	0.015	$100 \pm$
0.50	0.205	$0.205 \pm 0.001$	0.0028	$99.8 \pm 0.3$
0.75	0.307	$0.306 \pm 0.005$	0.0068	$99.6 \pm 0.7$
1.0	0.409	$0.408 \pm 0.002$	0.0025	$99.9 \pm 0.3$

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для извлечения активных компонентов из специй предложена мицеллярная экстракция 0.1 М Brij® 35, так как неоиногенное ПАВ обеспечивает максимальное извлечение по сравнению с катионными и анионными ПАВ [9].

**Электрогенерация Ce(IV) в присутствии Brij® 35.** Обязательным условием реализации метода кулонометрического титрования является количественный выход по току титранта. При переходе к ПАВ-содержащим средам происходит изменение вязкости растворов, что приводит к уменьшению скорости диффузии ионов, из которых генерируется титрант в ходе электрохимической реакции, а следовательно, и скорости переноса электрона [11, 12]. Поэтому концентрация ПАВ в среде генерирования титранта имеет значение.

Рассмотрена электрогенерация Ce(IV) в присутствии Brij® 35. Сопоставление времени генерации титранта показало, что одноэлектронное окисление Ce(III) до Ce(IV) не осложняется в присутствии Brij® 35 в диапазоне его концентраций от 0.050 до 4 мМ. Эффективность электрогенерации Ce(IV) оценена по титрованию аскорбиновой кислоты в качестве стандарта. Для этого генерировали титрант в течение времени, составляющего 90–95% от теоретически необходимого в отсутствие титруемого вещества, затем в ячейку вводили определенное количество аскорбиновой кислоты и дотитровывали до точки эквивалентности.

Аскорбиновая кислота окисляется электрогенерированным Ce(IV) до дегидроаскорбиновой кислоты с участием двух электронов. Эффективность генерации титранта для различных количеств аскорбиновой кислоты рассчитывали как отношение теоретического и практического значений количества электричества, выраженное в процентах (табл. 1). Установлено, что электрогенерация титранта в присутствии Brij® 35 протекает со 100%-ным выходом по току, что позволяет

использовать Ce(IV) как титрант для решения аналитических задач.

**Реакции электрогенерированного Ce(IV) с компонентами специй.** Кулонометрическое титрование стандартных растворов индивидуальных биологически активных компонентов специй показало, что все рассматриваемые соединения окисляются Ce(IV). Число электронов, участвующих в реакции, варьируется, что обусловлено природой рассматриваемых соединений и силой титранта-окислителя (в кислой среде Ce(IV) проявляет сильные окислительные свойства). Так, аскорбиновая, кофейная, хлорогеновая, феруловая и *n*-кумаровая кислоты и  $\alpha$ -токоферол окисляются по двухэлектронному механизму. Для галловой кислоты и рутина реакция протекает с участием трех электронов, а в случае кверцетина, эвгенола, розмариновой кислоты и ретинола — четырех электронов. Окисление катехина и тимола включает перенос пяти электронов, а куркумина и капсаицина — шести электронов. Танин окисляется с участием 150 электронов, что свидетельствует о глубоком окислении молекулы и согласуется с большим числом фенольных гидроксильных групп в его структуре. Следует отметить, что Ce(IV) является одноэлектронным окислителем, что сводит к минимуму вероятность протекания конкурирующих реакций. Таким образом, электрогенерированный Ce(IV) обладает высокой реакционной способностью и может быть использован для оценки содержания активных компонентов специй.

**Мицеллярная экстракция активных компонентов из специй и Ce(IV)-восстанавливающая способность полученных извлечений.** Оценена эффективность мицеллярной экстракции с ультразвуковой обработкой активных компонентов специй с использованием в качестве экстрагента 0.1 М Brij® 35. Для этого проводили кулонометрическое титрование экстрактов электрогенерированным Ce(IV). В качестве параметра для оценки эффективности извлечения использовали количество

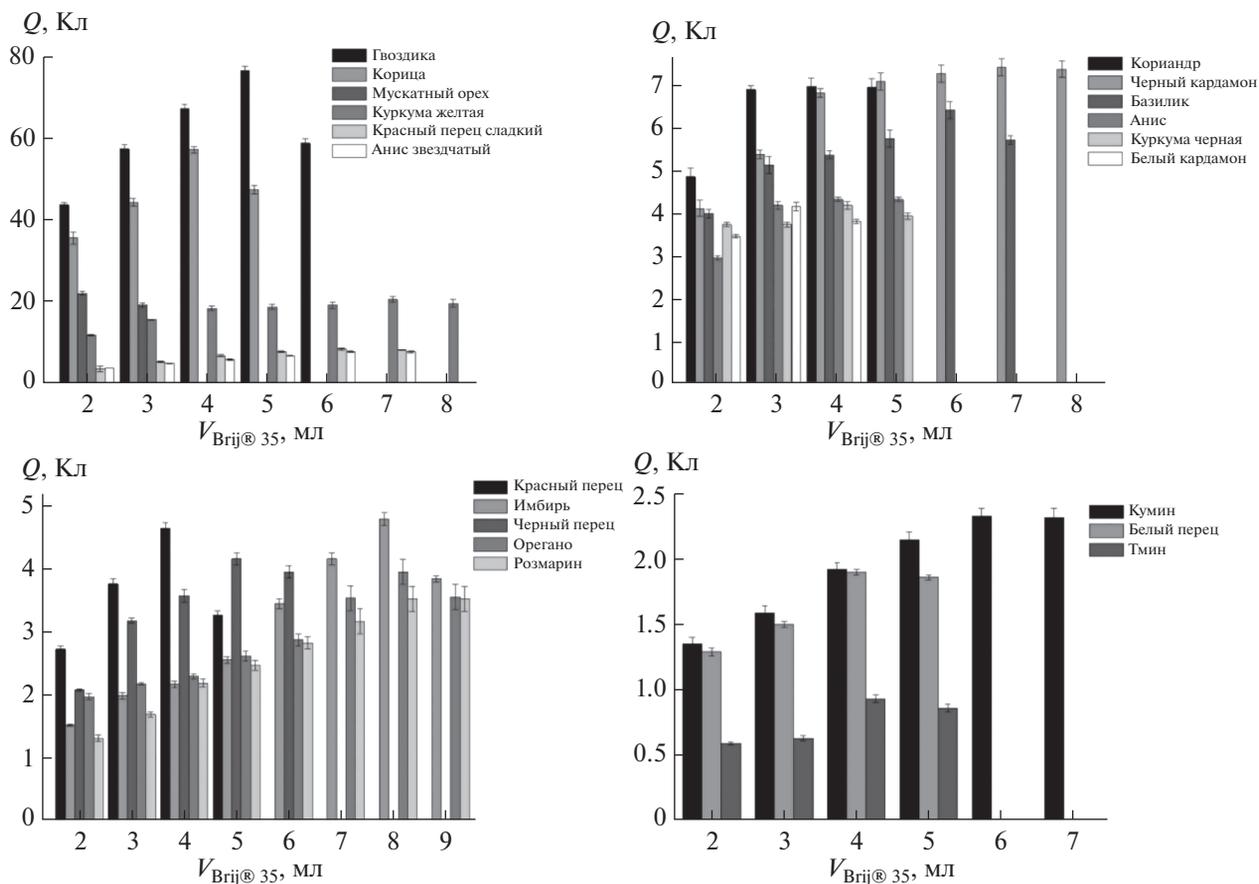


Рис. 1. Влияние объема экстрагента (0.1 М Brij® 35) на извлечение активных компонентов специй.

электричества, затраченное на титрование экстракта. Варьирование времени экстракции в диапазоне 5–15 мин на примере гвоздики показало, что 10 мин достаточно для извлечения активных

компонентов. Соотношение сырье/экстрагент, обеспечивающее максимальное извлечение, устанавливали для каждой специи индивидуально (рис. 1). Показано, что этот параметр варьиру-

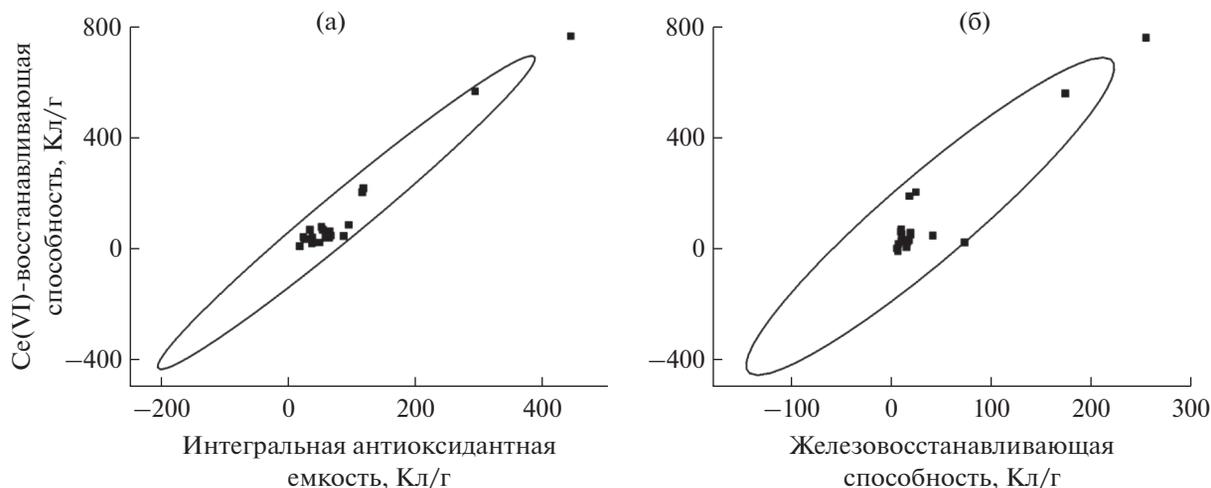


Рис. 2. Корреляция Se(IV)-восстанавливающей способности мицеллярных экстрактов специй с интегральной антиоксидантной емкостью (а) и железовосстанавливающей способностью (б).

**Таблица 2.** Се(IV)-восстанавливающая способность мицеллярных экстрактов специй (экстрагент – 0.1 М Brij® 35,  $n = 5$ ,  $P = 0.95$ )

Специя	$V_{\text{Brij}^{\circledR} 35}$ на 1 г специи, мл	Се(IV)-восстанавливающая способность, Кл/1 г	$s_r$
Гвоздика	50	$768 \pm 8$	0.010
Корица	40	$569 \pm 7$	0.011
Мускатный орех	20	$219 \pm 4$	0.014
Куркума желтая	70	$205 \pm 7$	0.020
Красный перец сладкий	60	$87 \pm 3$	0.012
Анис звездчатый	60	$79 \pm 1$	0.011
Черный кардамон	70	$74 \pm 2$	0.012
Белый кардамон	80	$69 \pm 4$	0.025
Кориандр	30	$69 \pm 1$	0.0083
Базилик	60	$64 \pm 1$	0.016
Имбирь	90	$47.6 \pm 0.7$	0.0092
Красный перец	40	$46.5 \pm 0.5$	0.009
Анис	40	$43.0 \pm 0.4$	0.0038
Куркума черная	40	$42.0 \pm 0.7$	0.010
Черный перец	60	$41 \pm 3$	0.029
Орегано	80	$40 \pm 1$	0.012
Розмарин	80	$35.2 \pm 0.9$	0.018
Кумин	60	$23.3 \pm 0.5$	0.017
Белый перец	40	$18.8 \pm 0.30$	0.0062
Тмин	40	$9.3 \pm 0.6$	0.025

ется в широких пределах (от 1 : 20 до 1 : 90) в зависимости от природы специи, что согласуется с литературными данными [8–10].

Определили Се(IV)-восстанавливающую способность экстрактов 20 специй (табл. 2), которую выражали как количество электричества, затраченное на титрование экстракта в пересчете на 1 г сухой специи. Основные компоненты, вносящие вклад в Се(IV)-восстанавливающую способность, представлены главным образом терпеноидами и различными классами фенольных антиоксидантов (табл. 3). Максимальные значения Се(IV)-восстанавливающей способности получены для гвоздики и корицы, что хорошо согласуется с ан-

тиоксидантными параметрами их спиртовых экстрактов [10, 13–15] и мицеллярных извлечений средой Triton X-100 [8].

Результаты определения Се(IV)-восстанавливающей способности мицеллярных экстрактов специй сопоставили с их интегральной антиоксидантной емкостью по реакции с электрогенерированным бромом и железовосстанавливающей способностью по реакции с электрогенерированными гексацианоферрат(III)-ионами. Установлены положительные корреляции (рис. 2) с коэффициентами 0.9826 и 0.9382 для интегральной антиоксидантной емкости и железовосстанавливающей способности соответственно, что подтверждает

Таблица 3. Биологически активные компоненты специй [2, 3, 14, 16–18]

Специя	Биологически активные компоненты специй
Гвоздика	Эвгенол и его производные, галлаты, флавоноиды, ванилин, сесквитерпеноиды
Корица	Эвгенол и его производные, коричный альдегид, монотерпены, линалоол, $\beta$ -кариофиллен, флавоноиды (катехины, процианидины, кверцетин, кемпферол), танины
Мускатный орех	Эвгенол и его производные, флавоноиды (катехины, мирицетин, оргентин), $\gamma$ -терпены, олеиновая, кофейная, пальмитиновая и миристиновая кислоты, терпеновые спирты, камфен, мирцен
Куркума желтая	Куркуминоиды (куркумин, деметоксикуркумин, бисдеметоксикуркумин и тетрагидрокуркумин), аскорбиновая, сиреневая, ванилиновая и гидроксикоричные кислоты, эвгенол, $\beta$ -каротин
Куркума черная	Эстрагол, производные эвгенола, терпеноиды (камфора, 1,8-цинеол, турмерон, оцимен, борнеол), флавоноиды
Красный перец сладкий	Аскорбиновая, пальмитиновая, миристиновая и гидроксикоричные кислоты, $\gamma$ -терпены, терпеновые спирты, эвгенол, флавоноиды, $\alpha$ -токоферол, $\beta$ -каротин, $\beta$ -ситостерол, камфен
Красный перец	Капсаициноиды, терпеновые спирты, аскорбиновая, пальмитиновая, миристиновая и гидроксикоричные кислоты, флавоноиды, $\beta$ -каротин
Черный перец	Пиперин и его производные, фенольные амиды, терпеновые спирты, аскорбиновая, лауриловая, пальмитиновая и миристиновая кислоты, флавоноиды, $\beta$ -каротин, камфен
Кардамон	Терпеноиды (лимонен, 1,8-цинеол, мирцен, терпинолен), кофейная кислота, флавоноиды (кверцетин, кемпферол, лютеолин), антоцианы (пеларгонин)
Кориандр	Аскорбиновая, ванилиновая, миристиновая, протокатехиновая и гидроксикоричные кислоты, флавоноиды, терпеновые спирты, $\gamma$ -терпены, пальмитиновая кислота, $\beta$ -каротин, $\beta$ -ситостерол, камфен, мирцен
Бasilik	Флавоноиды (апигенин, катехины, кверцетин, рутин, кемпферол), антоцианы, эвгенол, терпеноиды (линалоол, пинен, оцимен), танины, фенольные кислоты (кофейная, ванилиновая, <i>n</i> -кумаровая, розмариновая), урсоловая кислота, метилхавикол
Имбирь	Зингерон, шогаолы, парадолы, диарилгептаноиды, $\gamma$ -терпены, терпеновые спирты, флавоноиды, миристиновая и гидроксикоричные кислоты, $\beta$ -каротин, $\beta$ -ситостерол, камфен, капсаицин, куркумин, мирцен
Анис	Хлорогеновые кислоты, <i>транс</i> -анетол, анисовый альдегид, флавоноиды, эстрагол, терпеноиды
Анис звездчатый	<i>цис</i> - и <i>транс</i> -Анетол, шикимовая и гидроксibenзойные кислоты, флавоноиды, лигнаны, сесквитерпеноиды, фенилпропаноиды
Орегано	Фенольные кислоты (розмариновая, протокатеховая, <i>n</i> -кумаровая, кофейная) и их производные, флавоноиды (апигенин, кверцетин, лютеолин, мирицетин, диосметин и эриодиктиол), изопропилметилфенолы (тимол карвакрол), токоферолы, $\gamma$ -терпены, терпеновые спирты, камфен
Розмарин	Карнозиновая, розмариновая, урсоловая, аскорбиновая и гидроксикоричные кислоты, карнозол, розманол, $\gamma$ -терпены, терпеновые спирты, флавоноиды (апигенин, диосмин, лютеолин), танины, эвгенолы, олеиновая кислота, $\beta$ -каротин, $\beta$ -ситостерол, камфен, пинен, 1,8-цинеол
Кумин	Фенольные монотерпеноиды (тимол, $\alpha$ -терпинеол, куминовый спирт), терпеноиды (лимонен, 1,8-цинеол, мирцен, терпинолен)
Тмин	$\beta$ -Каротин, камфен, мирцен, $\gamma$ -терпены, миристиновая, пальмитиновая и лауриновая кислоты, кверцетин, танин

правильность полученных результатов. Предложенный подход можно успешно использовать для скрининга специй и других растительных материалов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rubió L., Motilva M.-J., Romero M.-P. Recent advances in biologically active compounds in herbs and spices: A review of the most effective antioxidant and anti-inflammatory active principles // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2013. V. 53. № 9. P. 943. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.574802>
2. Yashin A., Yashin Y., Xia X., Nemzer B. Antioxidant activity of spices and their impact on human health: a review // Antioxidants 2017. V. 6. № 3. Article 70. <https://doi.org/10.3390/antiox6030070>
3. Зиятдинова Г.К., Будников Г.К. Антиоксиданты специй как объекты аналитической химии //

- Журн. аналит. химии. 2018. Т. 73. № 10. С. 739. (Ziyatdinova G.K., Budnikov H.C. Spice antioxidants as objects of analytical chemistry // J. Anal. Chem. 2018. V. 73. № 10. P. 946. )  
<https://doi.org/10.1134/S106193481810012X>
4. Ajila C.M., Brar S.K., Verma M., Tyagi R.D., Godbout S., Valero J.R. Extraction and analysis of polyphenols: recent trends // Crit. Rev. Biotechnol. 2011. V. 31. № 3. P. 227.  
<https://doi.org/10.3109/07388551.2010.513677>
  5. Chemat F., Rombaut N., Sicaire A.-G., Meullemiestre A., Fabiano-Tixier A.-S., Abert-Vian M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review // Ultrasonics Sonochemistry. 2017. V. 34. P. 540.  
<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>
  6. Cortés-Rojas D.F., Souza C.R.F., Oliveira W.P. Surfactant mediated extraction of antioxidants from *Syzygium aromaticum* // Sep. Sci. Technol. 2015. V. 50. № 2. P. 207.  
<https://doi.org/10.1080/01496395.2014.952305>
  7. Wu K., Zhang Q., Liu Q., Tang F., Long Y., Shouzhuo Y. Ionic liquid surfactant-mediated ultrasonic-assisted extraction coupled to HPLC: Application to analysis of tanshinones in *Salvia miltiorrhiza bunge* // J. Sep. Sci. 2009. V. 32. № 23–24. P. 4220.  
<https://doi.org/10.1002/jssc.200900398>
  8. Зиятдинова Г.К., Нгуен Конг Ф., Будников Г.К. Оценка антиоксидантных свойств мицеллярных экстрактов специй методом гальваностатической кулонометрии с электрогенерированными гексацианоферрат(III)-ионами // Журн. аналит. химии. 2015. Т. 70. № 8. С. 854. (Ziyatdinova G.K., Nguyen Cong F., Budnikov H.C. Assessment of the antioxidant properties of micellar spice extracts by galvanostatic coulometry with electrogenerated hexacyanoferrate(III) ions // J. Anal. Chem. 2015. V.70. № 8. P. 974. )  
<https://doi.org/10.1134/S1061934815080195>
  9. Ziyatdinova G., Ziganshina E., Nguyen Cong Ph., Budnikov H. Ultrasound-assisted micellar extraction of phenolic antioxidants from spices and antioxidant properties of the extracts based on coulometric titration data // Anal. Methods. 2016. V. 8. № 39. P. 7150.  
<https://doi.org/10.1039/c6ay02112c>
  10. Зиганшина Э.Р., Зиятдинова Г.К., Нгуен Конг Ф., Будников Г.К. Интегральная антиоксидантная емкость мицеллярных экстрактов специй по данным гальваностатической кулонометрии // Бултеровские сообщения. 2015. Т. 42. № 5. С. 56.
  11. Rosen M.J., Kunjappu J.T. Surfactants and Interfacial Phenomena. 4th Ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc, 2012. 616 p.  
<https://doi.org/10.1002/9781118228920>
  12. Ziyatdinova G., Ziganshina E., Budnikov H. Surfactant media for constant-current coulometry. Application for the determination of antioxidants in pharmaceuticals // Anal. Chim. Acta. 2012. V. 744. P. 23.  
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.07.023>
  13. Зиятдинова Г.К., Будников Г.К. Оценка антиоксидантных свойств специй по данным циклической вольтамперометрии // Журн. аналит. химии. 2014. Т. 69. № 10. С. 1086. (Ziyatdinova G.K., Budnikov H.C. Evaluation of the antioxidant properties of spices by cyclic voltammetry // J. Anal. Chem. 2014. V. 69. № 10. P. 990. )  
<https://doi.org/10.1134/S1061934814100189>
  14. *Chemistry of Spices* / Eds. Parthasarathy V.A., Chempakam B., Zachariah T.J. CABI, 2008. 445 p.
  15. Mansour A.F., Ramadan M.M., Fekry R.M., Salem M.T., Mohammad A.A., Ali M.M., Mohammed N.S. Evaluation of synergistic interactions on antioxidant and anti-cancer efficacy of methanol extracts of some egyptian spices in combination // Int. J. Biol. Chem. 2017. V. 11. № 1. P. 9.  
<https://doi.org/10.3923/ijbc.2017.9.16>
  16. Embuscado M.E. Bioactives from culinary spices and herbs: a review // J. Food Bioact. 2019. V. 6. P. 68.  
<https://doi.org/10.31665/JFB.2019.6186>
  17. Shan B., Cai Y.Z., Sun M., Corke H. Antioxidant capacity of 26 spice extract and characterization of their phenolic constituents // J. Agric. Food Chem. 2005. V. 53. № 20. P. 7749.  
<https://doi.org/10.1021/jf051513y>
  18. Embuscado M.E. Spices and herbs: natural sources of antioxidants – A mini review // J. Funct. Foods. 2015. V. 18. Part B. P. 811.  
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.03.005>

УДК 543.054

## ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЙ ИЗОФЛАВОНОИДОВ В КЛЕВЕРЕ ЛУГОВОМ (*TRIFOLIUM PRATENSE* L.) ИЗ СЕМЕЙСТВА БОБОВЫЕ (*FABACEAE*) В УСЛОВИЯХ ЭКСТРАКЦИИ РАЗЛИЧНЫМИ СПОСОБАМИ

© 2021 г. З. А. Темердашев<sup>а</sup>, \*, Т. К. Чубукина<sup>а</sup>, Е. А. Веницкая<sup>а</sup>,  
М. В. Нагалецкий<sup>а</sup>, Н. В. Киселева<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Кубанский государственный университет  
ул. Ставропольская, 149, Краснодар, 350040 Россия

\*e-mail: temza@kubsu.ru

Поступила в редакцию 29.03.2021 г.

После доработки 07.04.2021 г.

Принята к публикации 15.04.2021 г.

Проведена хроматографическая оценка извлечения нативных форм основных изофлавоноидов в водно-спиртовые экстракты в условиях экстракции различными способами из разных морфологических частей клевера лугового (*Trifolium pratense* L.). Проанализированы водно-спиртовые экстракты клевера лугового, полученные мацерацией, микроволновым, ультразвуковым, субкритическим и фармакопейными способами. Из соцветий клевера лугового максимально извлекаются формонетин (0.260 мг/г) и генистеин (0.051 мг/г) мацерацией, биоканин А – субкритической экстракцией (0.340 мг/г), а дайдзеин – ультразвуковым способом (0.034 мг/г). Оптимизированы условия ВЭЖХ-определения дайдзеина, генистеина, формонетина и биоканина А в водно-спиртовых экстрактах клевера лугового. Определены концентрации изофлавоноидов в различных морфологических частях клевера лугового. Максимальное суммарное содержание изофлавоноидов (0.190 мг/г) наблюдается в водно-этанольном экстракте соцветий.

**Ключевые слова:** изофлавоноиды, клевер луговой (*Trifolium pratense* L.), ультразвуковая экстракция, микроволновая экстракция, субкритическая экстракция, мацерация.

DOI: 10.31857/S0044450221090115

Изофлавоноиды и их производные иногда называют фитоэстрогенами – природными гормоноподобными веществами растительного происхождения, принадлежащими к классу флавоноидов, многие из которых являются биологически активными веществами [1]. По строению фитоэстрогены сходны с эстрадиолом и могут проявлять себя как эстрогены, связываясь с эстрогеновыми рецепторами [1, 2].

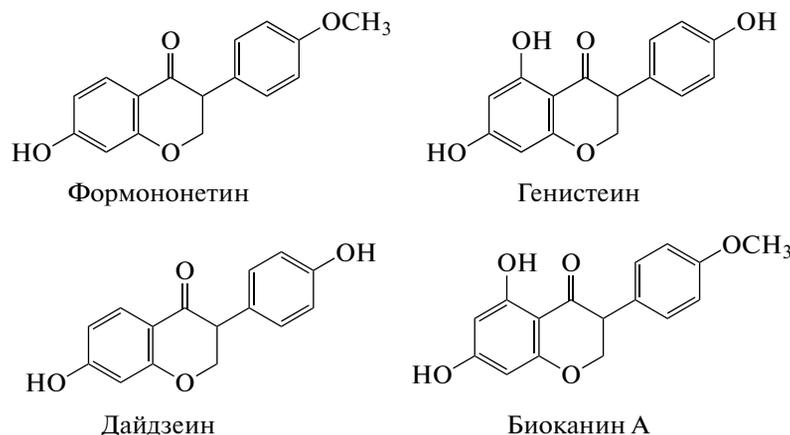
Распространенными источниками природных аналогов эстрогенов являются растения из семейства Бобовые (*Fabaceae*) – клевер (*Trifolium*), люцерна (*Medicago*), донник (*Melilotus*) [3, 4]. Род *Trifolium* насчитывает порядка 300 видов, произрастающих в Европе, Азии, Северной Америке, Австралии и некоторых районах Африки [5]. В настоящее время содержание изофлавоноидов исследовано в 37 природных и гибридных видах клевера (*Trifolium*), наиболее полно изученным и распространенным из которых является клевер луговой (*Trifolium pratense* L.) [6–10]. При изучении 23 видов клевера Висневски-Некрасова с соавт. [10] обнаружили, что наибольшее количество

изофлавоноидов содержится в клевере подземном (*Trifolium subterraneum* L.), клевере александрийском (*Trifolium alexandrinum* L.), клевере луговом (*Trifolium pratense* L.), клевере репейниковом (*Trifolium lappaceum* L.), подвиде клевера подземного (*Trifolium subterr. subsp. brachycalycinum* L.). Ренда с соавт. [9] считают, что самыми богатыми по содержанию изофлавоноидов среди 11 изученных ими видов являются клевер седоватый (*Trifolium canescens* L.) и одна из разновидностей клевера лугового (*Trifolium pratense* var. *pratense* L.).

На содержание изофлавоноидов в клевере влияет не только вид, но и условия произрастания: влажность климата, характер почв, район произрастания, температура, режим полива и др. [6, 10]. Накоплению изофлавоноидов способствует более мягкий климат и влажность. Кроме того, их содержание зависит от времени сбора, а также от частей растения [11–14]. В период роста растения изофлавоноиды в большей степени накапливаются в листьях и стеблях, в период цветения их концентрация повышается и часть из них

накапливается в цветах [11, 15, 16]. Так как при использовании клевера в фитотерапии наиболее важной является фаза максимального содержания изофлавоноидов, наибольший интерес для исследования представляют растения, собранные на стадии цветения. Основными изофлавоноидами, определяющими биологическую активность клевера лугового (*Trifolium pratense* L.), считаются

дайдзеин (ДЗ), генистеин (ГН), формонетин (ФН) и биоканин А (БКА) [17] – соединения с фенольным радикалом в положении С3 (схема 1). Формонетин может метаболизироваться до дайдзеина, а биоканин А до генистеина в процессе роста растения, что повышает его эстрогенную активность [2].



**Схема 1.** Основные изофлавоноиды, определяющие биологическую активность клевера лугового (*Trifolium pratense* L.).

Чаще всего извлечение изофлавоноидов из клевера лугового проводят жидкостной экстракцией (ЖЭ) с различными видами физического воздействия (табл. 1), в качестве растворителей обычно используют водно-спиртовые смеси различного состава [15, 16, 18]. При необходимости перевода гликозидных форм в агликоны проводят кислотный гидролиз добавлением трифторуксусной [11, 19, 20] или соляной кислоты [8, 9, 12, 14]. Некоторые примеры способов извлечения, а также содержания основных изофлавоноидов в различных частях *Trifolium pratense* L. приведены в табл. 1.

Для определения изофлавоноидов в экстрактах клевера лугового наибольшее распространение получили хроматографические методы [21]. Для разделения и идентификации изофлавоноидов можно использовать планарную хроматографию (бумажную и тонкослойную). Несмотря на ряд преимуществ данного метода (простота, возможность сравнения со стандартными образцами, экспрессность и низкая стоимость), его применяют нечасто из-за ограниченного круга выделяемых компонентов [22]. Применение метода газовой хроматографии при определении изофлавоноидов ограничено из-за трудностей, связанных с работой при высоких температурах, что может привести к разложению аналитов, а также с необходимостью их дериватизации, усложняющей анализ [23, 24].

Наиболее эффективным методом разделения и определения изофлавоноидов в экстрактах клевера лугового является ВЭЖХ с различными вариантами детектирования [25]. Метод ВЭЖХ с диодно-матричным и масс-спектрометрическим детектированием позволяет получить наиболее полную информацию о качественном составе и количественном содержании изофлавоноидов в исследуемых экстрактах и позволяет определять как агликоны, так и гликозиды без применения дополнительных операций пробоподготовки (табл. 1). Для получения правильных результатов важно подобрать оптимальные условия хроматографирования: режим элюирования, состав подвижной фазы, температуру колонки, длину колонки, состав и размер частиц сорбента. ВЭЖХ-определение изофлавоноидов, как правило, проводят в обращенно-фазовом режиме [26, 27] с использованием хроматографических колонок, заполненных химически модифицированным силикагелем с привитыми октадецильными группами [7, 9, 22], в качестве подвижной фазы применяют смесь воды с метанолом или ацетонитрилом [28, 29].

Целью данной работы является хроматографическая оценка извлечения нативных форм основных изофлавоноидов в водно-спиртовые экстракты в условиях экстракции различными способами из разных морфологических частей клевера лугового (*Trifolium pratense* L.).

**Таблица 1.** Некоторые приемы извлечения и данные по месту, времени сбора образцов и содержанию изофлавоноидов из различных морфологических частей клевера лугового (мг/г)\*

Объект	Условия извлечения	Метод анализа	Место и время сбора	ДЗ	ГН	ФН	БКА	Литература
Листья	УЭ, МеОН-вода-ацетон (40 : 32 : 28) + 0.05% ТФУ	УВЭЖХ-МС	Декабрь 2015 (лето в Южном полушарии); Порту-Алегри, Бразилия	н.о.	н.о.	12.689	1.832	[11]
			Май 2015 (осень в Южном полушарии); Порту-Алегри, Бразилия	0.368	0.198	15.407	0.763	
	ЖЭ, 50% EtOH + 2 М HCl, 40°C	ВЭЖХ-УФ	Стадия цветения; опытное поле Института сельского хозяйства, Кедайняйский район, Литва	0.786	0.452	1.51	—	[14]
			Стадия роста растения; сад факультета биологии Университета Анкары	0.490	0.276	2.930	6.958	[15]
	ЖЭ, 80% МеОН, встряхивание, 180 об/мин	ВЭЖХ-УФ-Vis-МС	Стадия цветения; сад факультета биологии Университета Анкары	0.639	0.110	1.934	1.372	
			Образцы от компании Мелброзин, Вена, Австрия	0.11	0.10	2.04	2.89	[19]
	ЖЭ, 80% МеОН + ТФУ, перерастворение в ДМСО, 80°C, рефлюксная система	ВЭЖХ-ДМД	Ранняя стадия бутонизации; Исследовательский центр (Шарлоттаун, ПЕЙ, Канада)	0.42	0.54	10.58	6.81	[16]
			Поздняя стадия цветения; Исследовательский центр (Шарлоттаун, ПЕЙ, Канада)	0.08	0.07	12.72	11.63	
	УЗ + ЖЭ, 80% МеОН + 2 М HCl, на бане 80–85°C	УВЭЖХ-ДМД	Стадия цветения; Институт сельского хозяйства Литовского исследовательского центра сельского и лесного хозяйства, Центральная низменность Литвы	0.11	0.64	5.77	5.76	[12]
			Февраль-июнь; опытный участок аграрной станции Вайрао в Университете Порту, Португалия	0.0017	0.0095	0.2912	0.3248	[10]

Таблица 1. Продолжение

Объект	Условия извлечения	Метод анализа	Место и время сбора	ДЗ	ГН	ФН	БКА	Литература
Стебли	УЗ + ЖЭ, 80% MeOH + 2 М HCl, на бане 80–85°C	УВЭЖХ-ДМД	Стадия цветения; Институт сельского хозяйства Литовского исследовательского центра сельского и лесного хозяйства, Центральная низменность Литвы	0.13	0.48	1.76	0.56	[12]
			Ранняя стадия бутонизации; Исследовательский центр (Шарлоттаун, ПЕЙ, Канада)	0.29	0.36	15.49	3.79	[16]
	ЖЭ, 70% MeOH	ВЭЖХ-ДМД-МС	Поздняя стадия цветения; Исследовательский центр (Шарлоттаун, ПЕЙ, Канада)	0.62	0.24	8.64	1.81	
			Стадия цветения; сад факультета биологии Университета Анкары	1.291	0.104	н.о.	н.о.	[15]
ЖЭ, 80% MeOH, встряхивание, 180 об/мин	ВЭЖХ-УФ-Vis-МС		Стадия роста растения; сад факультета биологии Университета Анкары	2.630	0.199	0.319	0.158	
			Июнь-октябрь; полевая станция Фармакогнозии Университета Иллинойса, Даунерс-Гроув, Иллинойс, США	0.13–0.33	0.14–0.68	2.1–5.9	0.7–3.3	[18]
ЖЭ, 50% EtOH + 2 М HCl, 40°C	ВЭЖХ-УФ		Стадия цветения; опытное поле Института сельского хозяйства, Кедайняйский район, Литва	0.947	0.181	2.19	–	[14]

Таблица 1. Окончание

Объект	Условия извлечения	Метод анализа	Место и время сбора	ДЗ	ГН	ФН	БКА	Литература
Цветы	УЗ + ЖЭ, 80% MeOH + 2 M HCl, на бане 80–85°C	УВЭЖХ-ДМД	Стадия цветения; Институт сельского хозяйства Литовского исследовательского центра сельского и лесного хозяйства, Центральная низменность Литвы	0.001	0.11	0.52	0.78	[12]
	ЖЭ, 80% MeOH, встряхивание, 180 об/мин	ВЭЖХ-УФ-Vis-МС	Стадия цветения; сад факультета биологии Университета Анкары	н.о.	0.025	0.893	0.192	[15]
	ЖЭ, 70% MeOH	ВЭЖХ-ДМД-МС	Поздняя стадия цветения; Исследовательский центр (Шарлоттаун, ПЕЙ, Канада)	н.о.	0.11	0.88	0.98	[16]
	ЖЭ, выдерживание последовательно в деион. воде, 100%-ном и 70%-ном EtOH	ВЭЖХ-ДМД	Июнь – октябрь; полевая станция фармакогнозии Университета Иллинойса, Даунерс-Гроув, Иллинойс, США	0.025–0.079	0.18–0.19	0.47–1.2	0.70–1.4	[18]
	ЖЭ, 50% EtOH + 2 M HCl, 40°C	ВЭЖХ-УФ	Стадия цветения; опытное поле Института сельского хозяйства, Кедайняйский район, Литва	0.324	0.231	1.66	–	[14]
Корни	ЖЭ + УЗ, 80% MeOH + 2 M HCl, 80°C	ВЭЖХ-ДМД	Стадия цветения; экспериментальные сады Университета Анкары, биологического факультета и факультета естественных наук	н.о.	0.020	0.249	0.072	[9]
	ЖЭ, 80% MeOH, встряхивание, 180 об/мин	ВЭЖХ-УФ-Vis-МС	Стадия цветения; сад факультета биологии Университета Анкары	2.681	0.116	0.054	н.о.	[15]
Наземные части	УЗЭ, 75% MeOH, 35–38% HCl, 75°C, ТФЭ на C <sub>6</sub> H <sub>11</sub>	ВЭЖХ-ДМД-ФЛД	Стадия роста растений; сад факультета биологии Университета Анкары	1.656	0.040	0.075	0.011	
	80% MeOH + ТФУ, 75°C, перерастворение в ДМСО	ВЭЖХ-ДМД-ФЛД	Стадия цветения; различные регионы Польши	0.113	0.239	0.877	1.060	[8]
		ВЭЖХ-УФ	Лето; Анатолия, Турция	0.0147	0.3742	0.1125	0.0711	[9]

\* ДЗ – лайзеин, ГН – генистин, ФН – формонетин, БКА – биоканин А, н.о. – не обнаружено, “–” – не исследовано, УЗЭ – ультразвуковая экстракция, MeOH – метанол, ТФУ – трифторуксусная кислота, ЖЭ – жидкостная экстракция, EtOH – этанол, МС – масс-спектрометрический детектор, УФ – спектрофотометрическое детектирование в ультрафиолетовой области, Vis – спектрофотометрическое детектирование в видимой области, ДМСО – диметилсульфоксид, ДМД – диодно-матричный детектор, MSPD – матричная твердофазная дисперсия, С18 – сорбент для твердофазной экстракции с привитыми октадецильными группами, деион. вода – деионизованная вода, ТФЭ – твердофазная экстракция, C<sub>6</sub>H<sub>11</sub> – сорбент для твердофазной экстракции с привитыми циклопентильными группами, ФЛД – флуориметрический детектор, наземные части – листья, стебли, цветы.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Растительный материал.** Объект исследования – образцы клевера лугового (*Trifolium pratense* L.), собранные на территории ботанического сада Кубанского госуниверситета (Краснодар, средняя высота над уровнем моря 36 м). Исходное сырье предварительно сушили путем его раскладки в затемненном помещении на ровной поверхности тонким слоем при 30°C до воздушно-сухого состояния. Затем сырье измельчали и просеивали, выделяя фракции 0.5–1.0 мм [30], после чего усредняли путем перемешивания.

**Реактивы и стандартные образцы.** Из растворителей использовали ацетонитрил (HPLC-S, Biosolve BV, Нидерланды), муравьиную кислоту (85%, ЛенРеактив, Россия), этанол (ректифицированный, высшей очистки), метанол х. ч. (Вектон, Россия) и изопропанол х. ч. (Экос 1, Россия). Деионизованную воду с удельным сопротивлением 18.2 МОм · см (25°C) получали на установке Milli-Q-UV (Millipore, Франция).

Для идентификации аналитов использовали стандартные образцы дайдзеина, генистеина и формонетина (Sigma-Aldrich, Германия).

**Сорбционные материалы.** В качестве сорбентов использовали картриджи для твердофазной экстракции с массой сорбента 100 мг: Strata X (размер частиц 33 мкм, диаметр пор 85 нм) и Strata C18-E (размер частиц 55 мкм, диаметр пор 7 нм) (Phenomenex, США), Oasis HLB (размер частиц 30 мкм, диаметр пор 82 нм) (Waters, США) и Isolute ENV+ (размер частиц 90 мкм, диаметр пор 80 нм) (Biotage, Швеция).

**Экстракция изофлавоноидов из клевера лугового.** Извлечение изофлавоноидов из клевера лугового проводили регионамированными фармакопейной статьей способами [30], а также с интенсификацией процесса ультразвуком [31, 32], микроволновым излучением [33–35] и при повышенном давлении [23, 36, 37]. Данные по извлечению изофлавоноидов различными способами представляли в пересчете на единицу массы воздушно-сухого сырья, мг/г.

Изофлавоноиды экстрагировали по методике согласно *Государственной Фармакопее РФ (ГФ)*. Навеску сырья (1.0000 г) помещали в круглодонную колбу, растворяли в 96%-ном этаноле (30 мл) с добавлением 10%-ной соляной кислоты (2 мл), подключали к обратному холодильнику и проводили экстракцию на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Далее экстракт фильтровали через вату в мерную колбу емк. 100 мл и доводили объем до метки 96%-ным этанолом. Перед хроматографическим анализом экстракт пропускали через фильтр с диаметром пор 45 мкм.

**Микроволновую экстракцию (МВЭ)** изофлавоноидов из клевера лугового проводили с использованием микроволновой системы ETHOS EX

(Milestone, Италия). Навеску сухой измельченной пробы (0.5000 г) помещали в ячейку-экстрактор, куда добавляли 70%-ный этиловый спирт (25 мл). Продолжительность экстракции составляла 30 мин при мощности микроволнового излучения 300 Вт и температуре 75°C [38]. Далее экстракт фильтровали через вату в мерную колбу емк. 25 мл и доводили до метки 70%-ным этанолом. Перед хроматографическим анализом экстракт пропускали через фильтр с диаметром пор 45 мкм.

Для **ультразвуковой экстракции (УЗЭ)** изофлавоноидов из клевера лугового навеску сухой измельченной пробы (0.5000 г) помещали в коническую колбу со шлифом емк. 100 мл. В качестве растворителя использовали 70%-ный этиловый спирт (25 мл). Экстракцию проводили в ультразвуковой ванне УЗВ–4.0/1 ТТЦ (Сапфир, Россия) с частотой ультразвукового излучения 35 кГц в течение 30 мин. Затем экстракт фильтровали через вату в мерную колбу емк. 25 мл, доводили до метки 70%-ным этанолом, пропускали через фильтр с диаметром пор 45 мкм и анализировали.

Для экстракции изофлавоноидов из клевера лугового *мацерацией* навеску пробы (1.2500 г) помещали в коническую колбу со шлифом емк. 100 мл, добавляли 70%-ный этанол (25 мл) и оставляли на 24 ч отстаиваться. Затем экстракт фильтровали через вату в мерную колбу емк. 25 мл и при необходимости доводили до метки 70%-ным этанолом. Перед хроматографическим анализом полученный экстракт фильтровали через фильтр с диаметром пор 45 мкм.

**Субкритическую экстракцию (СЭ)** фитоэстрогенов из клевера лугового в динамических условиях при повышенных температуре и давлении проводили на экспериментальной установке, включающей термостат с регулируемым электронным электронагревателем. Экстрагент подавали насосом от жидкостного хроматографа LC20AD (Shimadzu, Япония), в качестве ячейки-экстрактора использовали стальной корпус хроматографической колонки размером 150 × 4.6 мм, которую подключали к установке двумя стальными капиллярами. Для предотвращения закипания экстрагента и поддержания требуемого давления в системе использовали ограничитель противодавления. Высушенную и измельченную навеску пробы (0.2000 г) помещали в ячейку-экстрактор в печи термостата. Экстрагент – 70%-ный этанол – предварительно продували азотом для удаления растворенного кислорода и с помощью насоса заполняли им систему. Затем оставляли поток экстрагента и включали нагрев термостата. По достижении термостатом заданной температуры (120°C) выдерживали систему в течение 10 мин при постоянной температуре и остановленном потоке экстрагента, после чего

**Таблица 2.** Параметры ВЭЖХ-ДМД-МС-определения\* изофлавоноидов в водно-этанольных экстрактах цветков клевера лугового

Соединение	$t_R$ , мин	$m/z$	$\lambda_{\max}$ , нм	$c_{\min}$ , мкг/мл	$c_H$ , мкг/мл
Дайдзеин	6.1	253	249; 301	0.03	0.10
Генистеин	11.0	269	260; 328	0.02	0.07
Формонonetин	14.0	267	249	0.03	0.10
Биоканин А	18.6	283	261; 326	0.02	0.07

\*  $t_R$  – время удерживания;  $\lambda_{\max}$  – длина волны поглощения;  $c_{\min}$  – предел обнаружения;  $c_H$  – предел определения;  $c_{\min}$  и  $c_H$  рассчитаны согласно рекомендациям [39].

его подавали в систему со скоростью 1 мл/мин. Давление в системе по показаниям манометра насоса составляло 80–150 атм. На выходе собирали 5 мл экстракта в стеклянные емкости. Перед ВЭЖХ с диодно-матричным (ДМД) и масс-спектрометрическим (МС) детектированием полученный экстракт фильтровали через фильтр с диаметром пор 45 мкм.

*Твердофазную экстракцию (ТФЭ)* изофлавоноидов проводили из экстракта клевера лугового, предварительно полученного с использованием метода УЗЭ. Для концентрирования изофлавоноидов и очистки экстрактов использовали сорбенты Strata X, Oasis HLB, Isolute ENV+ и Strata C18-E. Для этого пропускали 1 мл экстракта через кондиционированный сорбент, который затем сушили в токе азота, и далее элюировали аналиты с картриджа метанолом.

**Хроматографическое определение изофлавоноидов в экстрактах клевера лугового.** ВЭЖХ-определение изофлавоноидов в полученных экстрактах проводили на хроматографе LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония), состоящем из дегазатора DGU-20A<sub>5</sub>, насоса LC20AD, автоматического дозатора SIL-20A, термостата колонок CTO-20AC, спектрофотометрического детектора на основе диодной матрицы SPD-M20A, масс-спектрометрического детектора LCMS2010EV. Изофлавоноиды разделяли на хроматографической колонке Luna C18 100A, 250 × 2.0 мм, 5 мкм (Phenomenex, США) с предколонкой C18 4 × 2.0 мм, 5 мкм (Phenomenex, США) в режиме градиентного элюирования. Подвижной фазой являлась смесь ацетонитрил (А)–0.1%-ная муравьиная кислота (В): 0.01–7 мин от 70 до 65% В, 7–15 мин от 65 до 50% В, 15–20 мин от 50 до 40% В, 20–22 мин от 40 до 5% В, 22–23 мин 5% В, 23–28 мин от 5 до 70% В. Скорость потока подвижной фазы составляла 0.35 мл/мин при температуре термостата колонки 30°C и объеме вводимой пробы 5 мкл. Сбор данных на диодно-матричном детекторе проводили в диапазоне длин волн 190–800 нм. При МС-детектировании веществ применили ионизацию электрораспылением: напряжение на детекторе 2 кВ, температура ионного источника 250°C, скорость потока азота 0.18 л/мин, скорость сканирования

масс-спектра 2000 а. е. м./с, диапазон сканируемых масс 120–700  $m/z$ . Анализ проводили в режиме отрицательной ионизации. Сбор и последующую обработку данных осуществляли с помощью программного обеспечения LCMS Solution (Shimadzu, Япония).

Изофлавоноиды идентифицировали сопоставлением времен удерживания, спектров поглощения и масс-спектров с аналогичными характеристиками стандартов индивидуальных соединений (табл. 2).

Градуировочные зависимости для дайдзеина, генистеина и формонетина в методе ВЭЖХ-ДМД-МС получали с использованием соответствующих стандартных образцов. Линейность отклика сигнала определяли для 10 уровней концентраций всех соединений в 70%-ном этаноле; в каждом случае проводили не менее трех параллельных определений одной концентрации раствора. Все градуировочные кривые строили по данным шести параллельных измерений. Для всех соединений градуировочный график линейен в диапазоне концентраций аналитов 0.1–10 мкг/мл с коэффициентами корреляции  $\geq 0.999$ . Параметры ВЭЖХ-ДМД-МС-определения изофлавоноидов в водно-этанольных экстрактах цветков клевера лугового приведены в табл. 2. Концентрацию биоканина А определяли методом одного эталона, в качестве последнего использовали генистеин с учетом схожести спектральных характеристик этих соединений.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Выбор условий хроматографирования экстрактов клевера лугового.** Высокая гидрофобность изофлавоноидов требует использования при хроматографических исследованиях подвижной фазы (ПФ) с большей долей неполярного элюента. В настоящей работе использовали хроматографическую колонку Luna C18 100A (250 × 2.0 мм, 5 мкм), которая обеспечивала разделение изофлавоноидов за 28 мин в градиентном режиме элюирования. В качестве подвижных фаз опробовали смеси ацетонитрил–0.1%-ная муравьиная кислота и метанол–0.1%-ная муравьиная кисло-

**Таблица 3.** Некоторые хроматографические характеристики компонентов водно-этанольного экстракта соцветий клевера лугового, полученные для подвижных фаз различного состава и стандартных образцов дайдзеина, генистеина, формононетина

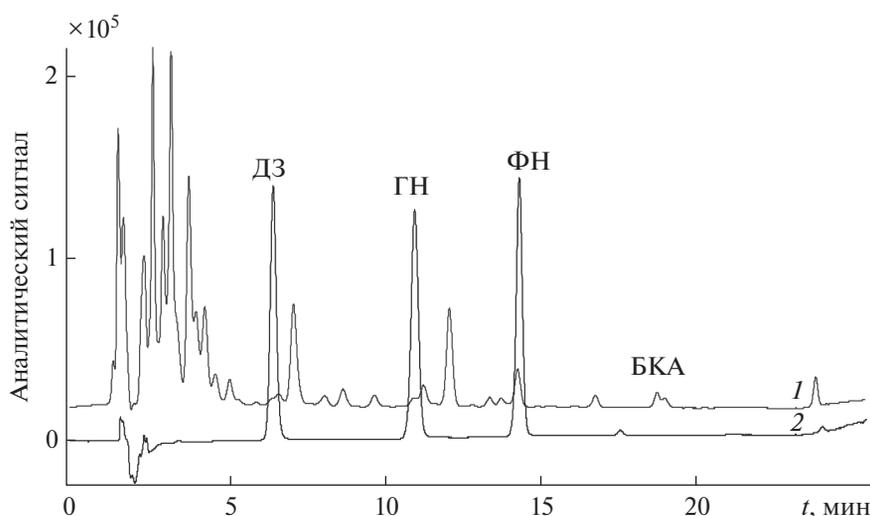
Хроматографический параметр	Ацетонитрил–0.1%-ная муравьиная кислота			Метанол–0.1%-ная муравьиная кислота		
	ДЗ	ГН	ФН	ДЗ	ГН	ФН
Стандартные образцы						
Разрешение (аналит/предшествующий пик)	9.7	11.5	8.5	12.1	5.2	7.0
Нагрузочный коэффициент	2.9	5.9	7.7	2.8	25.7	5.3
Экстракт соцветий клевера						
Разрешение (аналит/предшествующий пик)	1.3	2.2	21.2	0.27	2.0	0.9
Нагрузочный коэффициент	3.7	7.1	9.4	50.1	62.5	86.3

та. Некоторые хроматографические характеристики стандартных образцов ДЗ, ГН, ФН и компонентов экстракта соцветий клевера лугового, полученные с применением подвижных фаз различного состава, представлены в табл. 3.

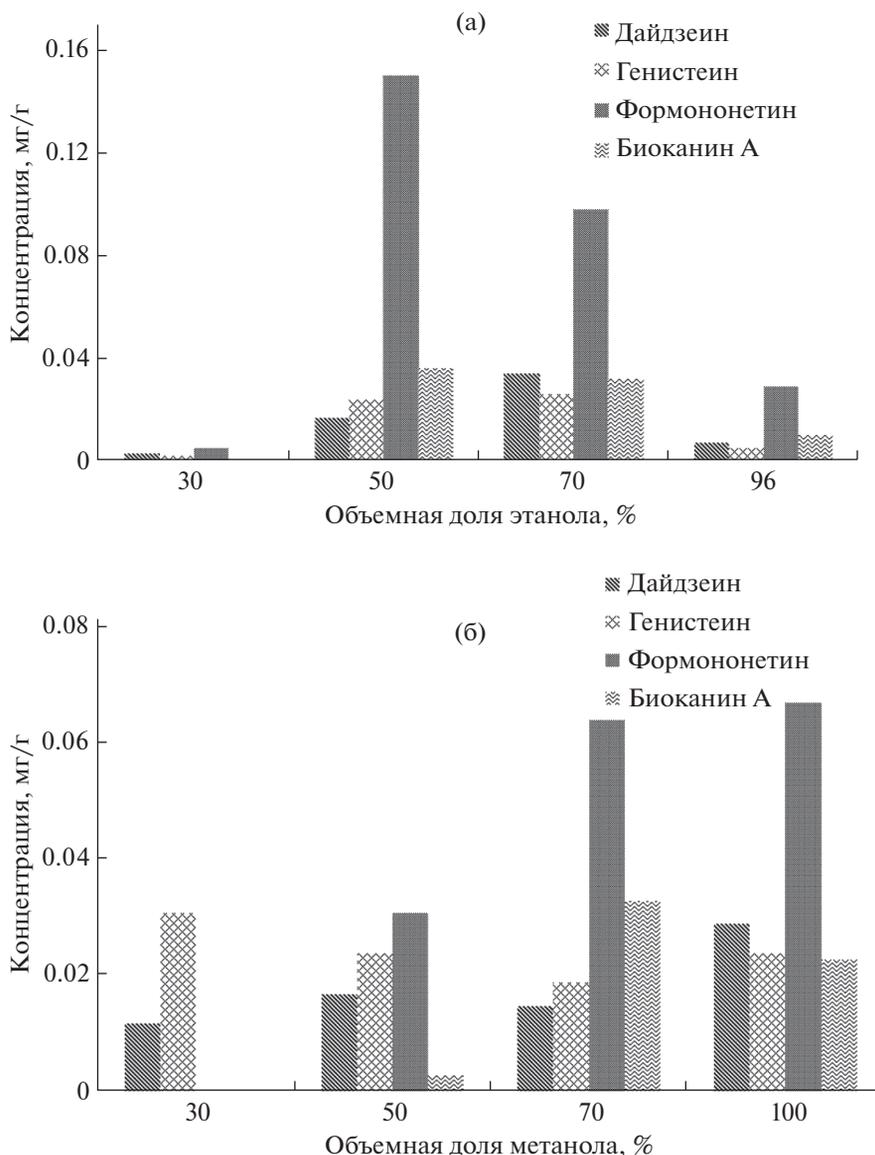
Помимо целевых аналитов в экстрактах соцветий клевера присутствует большое количество компонентов матрицы, поэтому особого внимания требует разрешающая способность ПФ, учитывающая влияние ширины пика и размывания зоны на селективность разделения соседних веществ. Если величина разрешающей способности ПФ < 1, то разделение веществ считается неполным, и наоборот. Альтернативным параметром, позволяющим оценить степень удерживания растворенного вещества по степени его взаимодействия с неподвижной фазой (НФ), является нагрузочный коэффициент, определяемый по отношению числа молекул вещества в НФ к числу молекул, находящихся в ПФ. Оптимальные зна-

чения данного параметра лежат в диапазоне от 2 до 10 [40]. Совокупность полученных данных по разрешающей способности ПФ и нагрузочному коэффициенту позволила выбрать в качестве оптимальной ПФ смесь состава ацетонитрил–0.1%-ная муравьиная кислота. Полученные в оптимальных условиях разделения хроматограммы водно-этанольного экстракта клевера лугового и смеси стандартных веществ приведены на рис. 1.

**Подбор оптимального состава растворителя для экстракции изофлавоноидов.** Эффективность извлечения изофлавоноидов оценивали по концентрациям дайдзеина, генистеина, формононетина и биоканина А в водно-спиртовых системах при УЗЭ из соцветий клевера лугового с различным содержанием этанола и метанола (30, 50, 70 и 100%, по объему). Из полученных диаграмм (рис. 2) видно, что качественный и количественный выход изофлавоноидов при использовании водно-спиртовых смесей различного состава в качестве



**Рис. 1.** Хроматограмма водно-этанольного экстракта клевера лугового (1) и стандартных образцов изофлавоноидов (2) в условиях ВЭЖХ-ДМД-МС-анализа.



**Рис. 2.** Концентрации дайдзеина, генистеина, формононетина и биоканина А в этанольных (а) и метанольных (б) экстрактах соцветий клевера лугового, полученных с помощью ультразвуковой экстракции.

экстрагента разный. Максимальное суммарное извлечение изофлавоноидов метанолом достигается при его 100%-ном содержании и составляет 0.143 мг/г, включая 0.029 мг/г дайдзеина, 0.024 мг/г генистеина, 0.067 мг/г формононетина и 0.023 мг/г биоканина А. При использовании в качестве экстрагента этанола характер выхода изофлавоноидов иной. Максимальное суммарное извлечение изофлавоноидов (0.227 мг/г) наблюдается при использовании водно-этанольной системы с 50% этанола, причем 66% составляет формононетин – 0.150 мг/г. Выход изофлавоноидов более сбалансированный при экстракции 70%-ной водно-этанольной системой, которая суммарно извлекает 0.190 мг/г, включая 0.034 мг/г ДЗ,

0.026 мг/г ГН, 0.098 мг/г ФН и 0.032 мг/г БКА. Видно, что извлечение дайдзеина максимально при использовании 70%-ного этанола (0.034 мг/г), а генистеина – 30%-ного метанола (0.031 мг/г). С учетом полученных результатов 70%-ную водно-этанольную систему выбрали в качестве оптимального растворителя.

**Эффективность экстракции изофлавоноидов из соцветий клевера лугового различными способами.** Изучали и сравнивали различные способы экстракции – мацерацию, субкритическую, ультразвуковую, микроволновую и твердофазную экстракцию, а также экстракцию по Государственной фармакопее РФ. Полученные результаты приведены в табл. 4.

**Таблица 4.** Концентрации (мг/г) изофлавоноидов в водно-этанольных экстрактах клевера лугового, полученных различными способами ( $n = 6$ ,  $P = 0.95$ )

Соединение	Ультразвуковая экстракция	Микроволновая экстракция	Субкритическая экстракция	Мацерация	Экстракция по ГФ*
Дайдзеин	0.034 ± 0.005	0.014 ± 0.003	0.015 ± 0.002	0.029 ± 0.003	0.007 ± 0.001
Генистеин	0.026 ± 0.003	0.031 ± 0.003	0.033 ± 0.003	0.051 ± 0.004	0.009 ± 0.002
Формонетин	0.098 ± 0.007	0.129 ± 0.003	0.210 ± 0.020	0.260 ± 0.020	0.043 ± 0.009
Биоканин А	0.032 ± 0.006	0.051 ± 0.005	0.340 ± 0.050	0.032 ± 0.009	0.041 ± 0.008
Суммарное содержание изофлавоноидов	0.190 ± 0.010	0.225 ± 0.009	0.598 ± 0.030	0.372 ± 0.010	0.100 ± 0.009

\* Экстрагент – 96%-ный этанол.

В Государственной фармакопее РФ отсутствует способ экстракции фенольных соединений флавоноидного ряда из клевера лугового, но описан способ экстракции 96%-ным этанолом кипячением с обратным холодильником фенольных соединений флавоноидного ряда из высушенной и измельченной травы Донника (*Melilotus*), относящейся к семейству бобовые. Исходя из их принадлежности к одному семейству, этот способ экстракции применили по отношению к клеверу луговому. Согласно ГФ РФ, в экстракционную систему добавляют соляную кислоту, разрушающую гликозидные связи, что затрудняет определение нативных форм изофлавоноидов. В данных условиях из клевера лугового извлекли 0.007 мг/г ДЗ, 0.009 мг/г ГН, 0.043 мг/г ФН и 0.041 мг/г БКА (табл. 4). Сравнивая результаты, приведенные в табл. 1 и в табл. 4, можно отметить, что суммарное содержание изофлавоноидов в водно-этанольном экстракте ниже, что связано, по-видимому, с большим сродством ГН, ФН и БКА к метанолу. Степень экстракции ДЗ водно-этанольной смесью оказалась выше, чем 80%-ным метанолом. Недостатком данного способа являются длительность и трудоемкость, а также извлечение в экстракт большого количества посторонних компонентов.

Традиционно применяемым способом экстракции является мацерация. Основным недостатком данного способа извлечения изофлавоноидов является длительность, которая может достигать нескольких часов, а иногда и суток. С другой стороны, суммарное извлечение изофлавоноидов этим способом достаточно высокое и достигает 0.372 мг/г.

Наличие в изофлавоноидах полярных групп позволяет применить микроволновое излучение для их извлечения. Экстракцию целевых соединений проводили при 300–450 Вт; при более высокой мощности возможен разрыв клеточной стенки и извлечение в растворитель матричных компонентов. Выход целевых компонентов по-

вышается с увеличением продолжительности микроволновой экстракции, но при этом возрастает и риск их деструкции. При микроволновом излучении выход дайдзеина, генистеина, формонетина и биоканина А оказался более высоким по сравнению с ГФ. Суммарное содержание изофлавоноидов в полученных при МВЭ и ГФ извлечениях составило 0.225 и 0.100 мг/г соответственно. С другой стороны, МВЭ по эффективности уступает способам субкритической экстракции и мацерации (табл. 4).

Субкритическую экстракцию изофлавоноидов проводили 70%-ным этанолом при повышенных температуре и давлении. Величина суммарного извлечения изофлавоноидов (0.598 мг/г) показала, что такой способ является наиболее эффективным. По количеству извлеченного дайдзеина субкритическая экстракция сопоставима с МВЭ (0.015 и 0.014 мг/г соответственно), но почти в два раза менее эффективна, чем УЗЭ и мацерация (табл. 4). Низкие содержания дайдзеина в экстрактах при использовании МВЭ и СЭ возможны из-за его вероятной деструкции под воздействием микроволнового излучения, нагревания или повышенного давления.

Одним из распространенных способов извлечения изофлавоноидов из растительного сырья считается ультразвуковая экстракция, которая более экспрессна и позволяет использовать широкий набор растворителей. Дайдзеин и биоканин А в условиях УЗЭ извлекаются в количествах, сопоставимых с экстракцией мацерацией. Содержание генистеина в извлечении (0.026 мг/г) сопоставимо с результатами МВЭ (0.031 мг/г) и субкритической экстракции (0.033 мг/г), а также с полученными другими авторами и приведенными в табл. 1 данными по ЖЭ 80%-ным метанолом, но меньше, чем при использовании мацерации (0.051 мг/г).

Анализ полученных результатов позволяет заключить, что наиболее эффективным способом извлечения изофлавоноидов является субкритиче-

**Таблица 5.** Степень извлечения (%) изофлавоноидов из водно-этанольного экстракта соцветий клевера лугового различными сорбентами ( $n = 3$ ,  $P = 0.95$ )

Соединение	Strata X	Strata C18-E	Oasis HLB	Isolute ENV+
Дайдзеин	92 ± 6	н.о.*	17.3 ± 0.5	н.о.
Генистеин	56 ± 4	н.о.	1.1 ± 0.3	0.7 ± 0.3
Формононетин	40 ± 6	1.7 ± 0.6	3.3 ± 0.6	н.о.
Биоканин А	1.7 ± 0.4	1.9 ± 0.5	н.о.	н.о.

\*н.о. – не обнаружено.

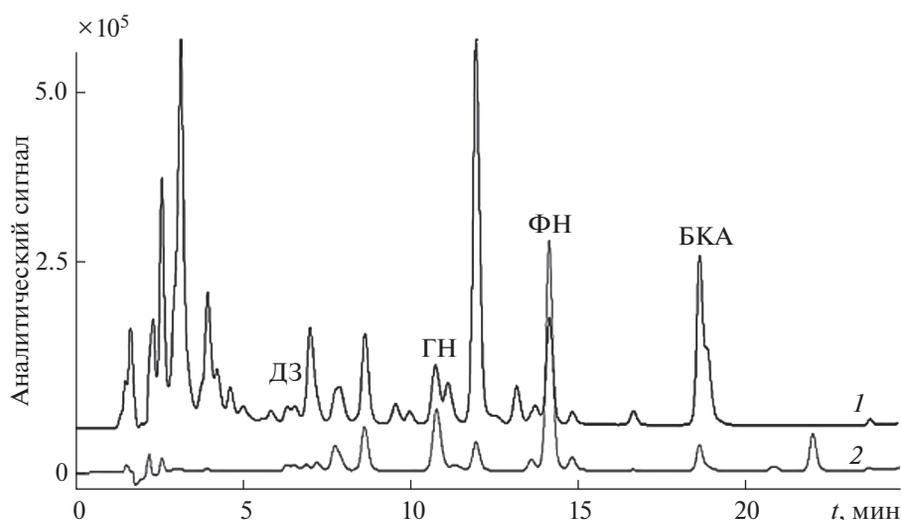
ская экстракция. Наибольшее количество формононетина извлекается из соцветий клевера лугового способами мацерации (0.260 мг/г) и субкритической экстракции (0.210 мг/г). Наибольшее количество биоканина А содержится в экстрактах, полученных субкритической экстракцией (0.340 мг/г). Полученный нами результат в два раза выше значений, полученных авторами работы [15], но в три раза меньше данных [16], приведенных в табл. 1. Генистеин более эффективно извлекается мацерацией (0.051 мг/г), а экстракция дайдзеина под действием сильного внешнего воздействия падает. Можно заключить, что способ экстракции необходимо выбирать, исходя из поставленных конкретных задач.

Для концентрирования целевых компонентов и очистки экстрактов можно использовать твердофазную экстракцию изофлавоноидов с сорбентами различных типов. Изучена ТФЭ изофлавоноидов из водно-этанольных экстрактов соцветий клевера с использованием различных сорбентов – Strata C18-E, Strata X, Oasis HLB и Isolute ENV+. Десорбцию анализов проводили 100%-ным метанолом, который наиболее часто применяется для этих целей. В выбранных усло-

виях наблюдаются низкие степени реэкстракции целевых соединений (табл. 5), что может быть связано с необратимой сорбцией анализов на материалах сорбентов. Исключением по отношению к ДЗ является сорбент Strata X, который количественно его извлекает ( $R = 92\%$ ) при незначительном концентрировании и обеспечивает очистку экстракта от мешающих компонентов (рис. 3). Полученные на сегодняшний день данные по ТФЭ не позволяют рекомендовать данный способ для концентрирования всех целевых компонентов, здесь, по-видимому, требуется проведение дальнейших изысканий.

#### Определение содержания изофлавоноидов в различных морфологических частях клевера лугового.

В оптимизированных условиях извлечения изофлавоноидов анализировали водно-этанольные экстракты различных частей клевера лугового – листья, стебли и соцветия (табл. 6). Содержание изофлавоноидов (0.190 мг/г) максимально в водно-этанольном экстракте соцветий. Концентрации изофлавоноидов в морфологических частях клевера лугового отличны от данных, приведенных в табл. 1. Объективно прокомментировать данные отличия не представляется возможным,



**Рис. 3.** Хроматограмма водно-этанольного экстракта клевера лугового до (1) и после (2) твердофазной экстракции в условиях ВЭЖХ-ДМД-МС-анализа.

**Таблица 6.** Концентрации (мг/г) изофлавоноидов в водно-этанольных экстрактах разных морфологических частей клевера лугового ( $n = 3$ ,  $P = 0.95$ )

Часть растения	ДЗ	ГН	ФН	БКА	Суммарное содержание изофлавоноидов
Соцветия	0.034 ± 0.005	0.026 ± 0.003	0.098 ± 0.007	0.032 ± 0.006	0.190 ± 0.010
Листья	0.003 ± 0.002	0.013 ± 0.002	0.021 ± 0.001	0.033 ± 0.001	0.070 ± 0.006
Стебли	0.003 ± 0.001	0.003 ± 0.001	0.008 ± 0.001	0.008 ± 0.001	0.022 ± 0.004

так как полную идентичность условий произрастания, времени сбора, получения экстрактов клевера лугового из публикаций установить не удалось.

Для повышения выхода некоторых изофлавоноидов ряд исследователей в состав экстракционных систем добавляли соляную или трифторуксусную кислоту, которые разрушают гликозидные связи. Такой подход искажает данные о количественном содержании нативных форм изофлавоноидов.

\* \* \*

Таким образом, изучено извлечение нативных форм основных изофлавоноидов в водно-спиртовые экстракты разных морфологических частей клевера лугового (*Trifolium pratense* L.), полученные мацерацией, микроволновым, ультразвуковым, субкритическим и фармакопейными способами. Наибольшую эффективность по извлечению изофлавоноидов показали ультразвуковая и субкритическая экстракция. Максимально формононетин (0.260 мг/г) и генистеин (0.051 мг/г) извлекаются мацерацией, биоканин А – субкритической экстракцией (0.340 мг/г), а дайдзеин – ультразвуковым способом (0.034 мг/г) из соцветий клевера лугового. Установлены содержания изофлавоноидов в различных морфологических частях клевера лугового – максимальное суммарное содержание которых (0.190 мг/г) наблюдается в водно-этанольном экстракте соцветий.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования (проект № FZEN-2020-0022) с использованием научного оборудования ЦКП “Эколого-аналитический центр” Кубанского государственного университета.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Meghwal M., Sahu C.K. Soy isoflavonoids as nutraceutical for human health: An update // *J. Cell Sci. Ther.* 2015. V. 6. № 1. P. 1.
- Беркегейм М.Л. Фитоэстрогены // Проблемы репродукции. 2000. № 3. С. 12.
- Карпук В.В. Фармакогнозия. Минск: БГУ, 2011. 334 с.
- Муравьева Д.А., Самылина И.А., Яковлев Г.П. Фармакогнозия. М.: Медицина, 2007. 656 с.
- Дренин А.А., Ботиров Э.Х. Флавоноиды и изофлавоноиды растений рода *Trifolium* L. Структурное разнообразие и биологическая активность // Химия растительного сырья. 2017. № 3. С. 39.
- Krenn L., Unterrieder I., Rupprechter R. Quantification of isoflavones in red clover by high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. B.* 2002. № 777. P. 123.
- Tsao R., Papadopoulos Y., Yang R., Young J.C., McRae K. Isoflavone profiles of red clovers and their distribution in different parts harvested at different growing stages // *J. Agric. Food Chem.* 2006. № 54. P. 5797.
- Lemeziene N., Padaruskas A., Butkute B., Ceseviciene J. The concentration of isoflavones in red clover (*Trifolium pratense* L.) at flowering stage // *Zemdirbyste.* 2015. V. 4. № 102. P. 443.
- Ercetin T., Toker G., Kartal M., Colgecen H. In vitro isoflavonoid production and analysis in natural tetraploid *Trifolium pratense* (red clover) calluses // *Rev. Bras. Farmacogn.* 2012. V. 5. № 22. P. 964.
- Visnevski-Necrasov T., Faria M., Cunha S., Harris J., Meimberg H., Curto M., Pereira M., Oliveira M., Nunes E. Isoflavone synthase (IFS) gene phylogeny in *Trifolium* species associated with plant isoflavone contents // *Plant Syst. Evol.* 2013. № 299. P. 299.
- Reis A., Scopel M., Zuanazzi J. *Trifolium pratense*: Friable calli, cell culture protocol and isoflavones content in wild plants, in vitro and cell cultures analyzed by UPLC // *Rev. Bras. Farmacogn.* 2018. № 28. P. 542.
- Lemeziene N., Padaruskas A., Butkute B., Ceseviciene J., Taujenis L., Norkeviciene E., Mikaliuniene J. The concentration of isoflavones in red clover (*Trifolium pratense* L.) at flowering stage // *Zemdirbyste-Agriculture.* 2015. V. 102. № 4. P. 443.
- Carlsen S., Pedersen H., Spliid N., Fomsgaard I. Fate in soil of flavonoids released from white clover (*Trifolium repens* L.) // *Appl. Environ. Soil Sci.* 2011. V. 2012. P. 1.
- Dabkeviciene G., Butkute B., Lemeziene N., Jakstas V., Vilcinskas E., Janulis V. Distribution of formononetin, daidzein and genistein in *Trifolium* species and their aerial plant parts // *Chemija.* 2012. V. 23. № 4. P. 306.
- Colgecen H., Koca Caliskan U., Kartal M., Buyukkartal H. Comprehensive evaluation of phytoestrogen accumulation in plants and in vitro cultures of *Medicago sativa* L. ‘Elçi’ and natural tetraploid *Trifolium pratense* L. // *Turk. J. Biol.* 2014. № 38. P. 619.
- Tsao R., Papadopoulos Y., Yang R., Young J.C., McRae K. Isoflavone profiles of red clovers and their distribution

- in different parts harvested at different growing stages // J. Agric. Food Chem. 2006. № 54. P. 5797.
17. Zgorka G. Ultrasound-assisted solid-phase extraction coupled with photodiode-array and fluorescence detection for chemotaxonomy of isoflavone phytoestrogens in *Trifolium* L. (Clover) species // J. Sep. Sci. 2009. № 32. P. 965.
18. Booth N., Overk C., Yao P., Totura S., Deng Y., Hedayat A., Bolton J., Pauli G., Farnsworth N. Seasonal variation of red clover (*Trifolium pratense* L., *Fabaceae*) Isoflavones and estrogenic activity // J. Agric. Food Chem. 2006. № 54. P. 1277.
19. Krenn L., Unterrieder I., Rupprechter R. Quantification of isoflavones in red clover by high-performance liquid chromatography // J. Chromatogr. B. 2002. № 777. P. 123.
20. Renda G., Yalcin F., Nemutlu E., Akkol E., Sutar I., Kelles H., Ina H., Calis I., Ersoz T. Comparative assessment of dermal wound healing potentials of various *Trifolium* L. extracts and determination of their isoflavone contents as potential active ingredients // J. Ethnopharmacol. 2013. № 148. P. 423.
21. Wu Q., Wang M., Simon J.E. Analytical methods to determine phytoestrogenic compounds // J. Chromatogr. B. 2004. № 812. P. 325.
22. Kowalska I., Jedrejek D., Ciesla L., Pecio L., Masullo M., Piacente S., Oleszek W., Stochmal A. Isolation, chemical and free radical scavenging characterization of phenolics from *Trifolium scabrum* L. aerial parts // J. Agric. Food Chem. 2013. № 61. P. 4417.
23. Huie C.W. A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants // Anal. Bioanal. Chem. 2002. № 373. P. 23.
24. Benedetti B., Carro M. Di, Mirasole C., Magi E. Fast derivatization procedure for the analysis of phytoestrogens in soy milk by gas chromatography tandem mass spectrometry // Microchem. J. 2018. V. 137. P. 62–70.
25. Khoddami A., Wilkes M.A., Roberts T.H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds // Molecules. 2013. № 18. P. 2328.
26. Jeong S., Chang M., Choi S., Oh S., Wu H., Zhu Y., Gao X., Wang X., Zhang B., Lim D., Lee J., Kim S., Song Y. Estrogenic effects of phytoestrogens derived from *Flemingia strobilifera* in MCF-7 cells and immature rats // Arch. Pharm. Res. 2018. V. 41. № 5. P. 57.
27. Spagnuolo P., Rasini E., Luini E., Legnaro M., Luzzani M., Casareto E., Carreri M., Paracchini S., Marino F., Cosentino M. Isoflavone content and estrogenic activity of different batches of red clover (*Trifolium pratense* L.) extracts: An in vitro study in MCF-7 cells // Fitoterapia. 2014. № 94. P. 62.
28. Zarena A.S., Sankar K.U. Phenolic acids, flavonoid profile and antioxidant activity in mangosteen (*Garcinia Mangostana* L.) pericarp // J. Food Biochem. 2012. № 36. P. 627.
29. Yingngam B., Brantner A., Jinarat D., Kaewamatawong R., Rungseevijitprapa W., Suksamrarn A., Piyachaturawat P., Chokchaisiri R. Determination of the marker diarylheptanoid phytoestrogens in *Curcuma comosa* Rhizomes and selected herbal medicinal products by HPLC-DAD // Chem. Pharm. Bull. 2018. № 66. P. 65.
30. Государственная Фармакопея Российской Федерации. Изд. 14. Москва, 2018. Т. 4. С. 6020.
31. Vinatoru M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs // Ultrason. Sonochem. 2001. № 8. P. 303.
32. Biesaga M. Influence of extraction methods on stability of flavonoids // J. Chromatogr. A. 2011. № 1218. P. 2505.
33. Michel T., Halabalaki M., Skaltsounis A. New concepts, experimental approaches, and dereplication strategies for the discovery of novel phytoestrogens from natural sources // Planta Med. 2013. № 79. P. 514.
34. Ekezie F., Sun D., Cheng J. Acceleration of microwave-assisted extraction processes of food components by integrating technologies and applying emerging solvents: A review of latest developments // Trends Food Sci. Technol. 2017. № 67. P. 160.
35. Lauberts M., Lauberte L., Arshanitsa A., Dizhbite T. Structural transformations of wood and cereal biomass components induced by microwave assisted torrefaction with emphasis on extractable value chemicals obtaining // J. Anal. Appl. Pyrolysis. 2018. № 134. P. 1.
36. Kronholm J., Hartonen K., Riekkola M. Analytical extractions with water at elevated temperatures and pressures // Trends Anal. Chem. 2007. V. 26. № 5. P. 396.
37. Asbahani A., Miladi K., Badri W., Sala M., Addi A., Casabianca H. Essential oils: From extraction to encapsulation // Int. J. Pharm. 2015. № 483. P. 220.
38. Милевская В.В., Статкус М.А., Темердашев З.А., Киселева Н.В., Бутыльская Т.С., Шилько Е.А. Экстракция и определение биологически активных компонентов зверобоя и препаратов на его основе // Журн. аналит. химии. 2016. Т. 71. № 7. С. 768. (Milevskaya V.V., Temerdashev Z.A., Kiseleva N.V., Butyl'skaya T.S., Shil'ko E.A., Statkus M.A. Extraction and determination of biologically active components of St. John's wort and its pharmaceutical preparations // J. Anal. Chem. 2016. V. 71. № 7. P. 741.)
39. Представление результатов химического анализа (рекомендации IUPAC 1994 г.) // Журн. аналит. химии. 1998. Т. 53. № 9. С. 999.
40. Рили С.М. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Теоретические основы и решение прикладных задач. Пер. с англ. Лапина Б.П. / Под ред. Лоу У.Дж., Уайнер И.У. М.: Мир, 1982, 271 с.

УДК 543.544

## НОВЫЙ СОРБЕНТ ДЛЯ ГИДРОФИЛЬНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ НА ОСНОВЕ СИЛИКАГЕЛЯ, МОДИФИЦИРОВАННОГО ПО РЕАКЦИИ УГИ

© 2021 г. Н. Ю. Чикурова<sup>а</sup>, А. О. Шемякина<sup>а</sup>, Д. Э. Брыскина<sup>б</sup>, В. Н. Нуриев<sup>а</sup>, А. А. Комаров<sup>б</sup>,  
М. А. Статкус<sup>а</sup>, А. Н. Ставрианиди<sup>а</sup>, А. В. Чернобровкина<sup>а</sup>, \*

<sup>а</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет  
Ленинские горы, 1, стр. 3, Москва, 119991 Россия

<sup>б</sup>ООО “НВЦ Агроветзащита”  
Игарский проезд, 4, стр. 2, Москва, 129329 Россия

\*e-mail: chernobrovkina@analyt.chem.msu.ru

Поступила в редакцию 05.04.2021 г.

После доработки 16.04.2021 г.

Принята к публикации 16.04.2021 г.

Получены новые неподвижные фазы для гидрофильной хроматографии (ГИХ) с функциональными слоями, сформированными по мультикомпонентной реакции Уги. В качестве компонентов реакции использованы ацетон, гликолевая кислота, этиловый эфир изоциануксусной кислоты и 3-аминопропилсиликагель, выступающий также в роли матрицы сорбентов. Изучение влияния растворителя на выход реакции показало, что большая степень покрытия матрицы достигается при проведении реакции в этаноле. Оценку хроматографических свойств новых сорбентов в сравнении с исходной матрицей проводили с использованием тестов Танака для гидрофильных фаз, а также путем изучения удерживания полярных аналитов различных классов. Синтезированные сорбенты продемонстрировали высокую эффективность и селективность при разделении модельных смесей сахаров, аминокислот и водорастворимых витаминов в режиме ГИХ.

**Ключевые слова:** гидрофильная хроматография, синтез сорбентов, силикагель, мультикомпонентная реакция Уги, сахара, водорастворимые витамины, аминокислоты, тест Танака.

DOI: 10.31857/S0044450221090036

Гидрофильная хроматография (ГИХ) – современный метод определения полярных нейтральных и заряженных веществ на полярных неподвижных фазах, обеспечивающий иную селективность по сравнению с традиционно используемой обращенно-фазовой хроматографией (ОФ ВЭЖХ) и позволяющий разделять сильнополярные аналиты, которые практически не удерживаются в режиме ОФ ВЭЖХ и имеют несимметричную форму пиков [1, 2]. Высокая селективность и эффективность в гидрофильной хроматографии достигаются за счет использования полярных сорбентов с разнообразными по строению и природе функциональными группами, среди которых наибольшие гидрофильность и факторы удерживания полярных аналитов обеспечивают амидные неподвижные фазы [2]. Однако в связи с усложнением задач, решаемых ГИХ, создание неподвижных фаз с улучшенной эффективностью и альтернативной селективностью остается одним из основных направлений развития метода.

На текущий момент синтез новых селективных неподвижных фаз для ГИХ требует сложных многостадийных процедур ковалентного модифицирования. В большинстве случаев проводят реакции с функциональными группами, закрепленными на поверхности предварительно модифицированного силикагеля [3–5], однако зачастую для одновременного введения в функциональный слой сорбентов групп различных типов сначала получают соответствующие лиганды и только после этого закрепляют их на поверхности матрицы [6–8].

Перспективным подходом к созданию новых функциональных слоев сорбентов для ГИХ является использование мультикомпонентных реакций, преимуществами которых являются высокий выход продуктов, простота исполнения, возможность получать необходимый продукт в одном реакторе в результате одностадийной или многостадийной реакции без выделения промежуточных продуктов (“one-pot” реакция), а также разнообразие возможностей в изменении струк-

туры функционального слоя путем варьирования исходных соединений. Одним из примеров таких реакций, позволяющих получать гидрофильные амидные группы, является реакция Уги [9, 10] – мультикомпонентная реакция, включающая взаимодействие аминов, карбонильных соединений, изоцианидов и органических/неорганических кислот. Классическую реакцию Уги можно проводить как в растворе, так и в твердой фазе. Реакция может протекать в водной, водно-органической либо в органической среде, причем выбор растворителя может значительно влиять на выход реакции [9]. Кроме того, селективность реакции в воде уменьшается из-за образования продуктов реакции Пассерини, которая в таких условиях значительно ускоряется. Добавление кислот Льюиса в реакционную смесь может стать благоприятным фактором для повышения выхода реакции [11].

На сегодняшний день в литературе существует всего несколько примеров использования мультикомпонентных реакций, в том числе реакции Уги, для создания новых неподвижных фаз. При этом практически все варианты предполагают предварительное получение лигандов по данной реакции и их последующее закрепление на поверхности матрицы. Так, в работе [6] мультикомпонентную реакцию Уги использовали для создания цвиттер-ионных фрагментов на поверхности сорбентов для ОФ ВЭЖХ и ГИХ. Авторы синтезировали аминокислотные цвиттер-ионные лиганды и только после очистки ковалентно закрепили их на поверхности силикагеля. Синтез лиганда по реакции Уги обеспечил высокий выход продукта и возможность легкого управления селективностью получаемых сорбентов. Однако предложенный авторами работы [6] способ синтеза неподвижных фаз является трудоемким и требует большого количества времени из-за необходимости очистки лиганда и последующего модифицирования матрицы.

Один из вариантов успешного использования реакции Уги на твердых носителях – полистирольных смолах – продемонстрировали авторы работы [12]. В данном случае твердый носитель с предварительно введенными функциональными группами выступал в качестве одного из компонентов мультикомпонентной реакции для получения и выделения ряда соединений. Авторы подтвердили успешное протекание реакции и получение соответствующего продукта методом ЯМР-спектроскопии.

Учитывая такие преимущества реакции Уги, как высокий выход, быстрота протекания и мягкие условия проведения (комнатная температура) [9, 10], а также формирование гидрофильных амидных фрагментов в продуктах реакции, можно предположить, что мультикомпонентная реакция Уги может быть простым и перспективным

подходом для синтеза новых гидрофильных неподвижных фаз для ГИХ. При этом использование аминированного силикагеля в качестве аминокон компонента в этой реакции обеспечит модифицирование матрицы исключительно необходимыми функциональными группами благодаря легкости отделения возможных побочных продуктов конкурирующей реакции Пассерини, образующихся исключительно в жидкой фазе. Такой способ синтеза неподвижной фазы для ГИХ станет уникальным в своем роде, поскольку в реакции непосредственно будет участвовать аминированная матрица, и образующийся лиганд сразу же будет закрепляться на ней.

Целью данной работы являлся синтез сорбентов на основе аминированного силикагеля с использованием мультикомпонентной реакции Уги, выбор растворителя для повышения степени модифицирования матрицы, изучение полученных сорбентов в режиме ГИХ на примере разделения полярных веществ различных классов и оценка возможностей их применения для анализа реальных объектов.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Приборы и материалы.** Для синтеза сорбентов в качестве матрицы использовали силикагель с привитыми аминопропильными радикалами Диасфер-110-Амин (БиоХиммак СТ, Россия) со сферическими частицами диаметром 5 мкм, 1.70% N. Применяли ацетон ч. д. а. (ХимМед, Россия), гликолевую кислоту ч. д. а. (Panreac, Испания), этанол ч. д. а. (Лабтех, Россия), метанол ч. д. а. (Лабтех, Россия).

Для синтеза этилового эфира изоциануксусной кислоты использовали оксихлорид фосфора ос. ч. (Элма-Хим, Россия) напрямую из вскрытой ампулы без дополнительной очистки; этил-N-формилглицинат 98%, синтетический [13, 14]; дихлорметан х. ч. (Компонент-Реактив, Россия), перегоняли над свежим оксидом фосфора(V); триэтиламин х. ч. (Acros, Россия), перегоняли над гидроксидом кальция.

Для изучения свойств сорбентов использовали толуол х. ч. (Компонент-Реактив, Россия); аденозин, >99.0%; урацил, >99.0%; теобромин, >98.0%; теофиллин, >98.0%; уридин, >98.0%; видарабин моногидрат, >98.0%; 5-метилуридин, >98.0%; 2'-деоксиуридин, >98.0%; N, N, N-триметилфенил-аммоний хлорид, >98.0%; тозилат натрия, >90.0% (ТСИ, Япония).

**Сахара:** D-(+)-рибоза, 98%; D-(+)-глюкоза, 99.5%; D-(+)-фруктоза, 99.9%; D-(+)-лактоза моногидрат, >98%; D-(+)-мальтоза моногидрат, >98%; D-(+)-сахароза, >98%; L-(+)-рамноза моногидрат, >98%; D-(+)-ксилоза, >98%; D-(+)-раффиноза пентагидрат (ТСИ, Япония).

**Витамины:** никотинамид, 99.7%; кислота никотиновая (Sigma-Aldrich, США). Рибофлавин (В<sub>2</sub>), 99%; пиридоксин гидрохлорид (В<sub>6</sub>), 99%; цианокобаламин (В<sub>12</sub>) ч. д. а.; аскорбиновая кислота (витамин С), 99%; тиамин (В<sub>1</sub>), >96% (ТС1, Япония).

**Аминокислоты:** D,L-фенилаланин х. ч.; L-пролин х. ч.; D,L-серин х. ч.; L-изолейцин х. ч.; L-лейцин х. ч.; L-метионин х. ч. (Serva, Германия); L-аспарагин х. ч.; β-аланин х. ч.; глицин х. ч. (Merck, Германия).

**Прочие реактивы:** ацетонитрил, "HPLC gradient grade"; кислота уксусная ледяная, 99.5%; кислота ортофосфорная, 85% х. ч., хлорид калия ч. д. а. (Panreac, Испания); этанол ч. д. а.; ацетат аммония ч. (Лабтех, Россия); ацетон ч. д. а. (ХимМед, Россия); 1,4-диоксан ч. д. а. (Компонент-Реактив, Россия).

Для изучения хроматографических свойств сорбентов использовали систему ВЭЖХ Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, США), состоящую из двухканального насоса высокого давления, автоматической системы ввода пробы, термостата для колонок и детектора на диодной матрице. Регистрацию хроматограмм осуществляли с помощью программного пакета Chromeleon 7 (Thermo Fisher Scientific, США). Для масс-спектрометрического детектирования применяли тройной квадрупольный масс-анализатор Qtrap 5500 (AB Sciex, Канада), оснащенный источником электрораспылительной ионизации (ЭРИ). Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения Analyst (version 1.5, AB Sciex, Канада). Система ВЭЖХ состояла из изократического ВЭЖХ-насоса, шестиходового крана-дозатора и рефрактометрического детектора (Agilent Technologies, США). Регистрацию хроматограмм осуществляли с помощью программного пакета ChemStation (Agilent Technologies, США). Жидкостной хроматограф Shimadzu Prominence состоял из следующих блоков: насоса высокого давления LC-20AD с четырехканальным градиентным смесителем на стороне низкого давления, дегазатора DGU-20A5R, управляющего модуля SVM-20A, ручного инжектора Rheodyne 7725i, детектора по светорассеянию ELSD-LT II. Сжатый воздух для детектора получали с помощью компрессора Jun-

Air OF302-25B. Давление сжатого воздуха для детектора составляло 350 кПа, температура нагрева испарителя +40°C, усиление детектора  $k = 6$  выбирали, исходя из высоты пиков на хроматограмме в ходе эксперимента. Объем пробы – 20 мкл.

В работе использовали стальные колонки размером 100 × 3 мм, заполнение которых осуществляли при помощи насоса Knauer K-1900 (Knauer, Германия).

**Условия масс-спектрометрического детектирования.** Для разделения сахаров на колонке C-U<sub>M</sub> использовали двухкомпонентную смесь растворителей, состоящую из деионизованной воды и ацетонитрила, при 30°C со скоростью потока 0.4 мл/мин. Элюирование проводили в градиентном режиме: 0–4.5 мин 85–83% CH<sub>3</sub>CN; 4.5–11 мин 63% CH<sub>3</sub>CN, 11–19 мин 85% CH<sub>3</sub>CN. Сахара детектировали в режиме ЭРИ-МС/МС-регистрации отрицательных ионов. Напряжение на капилляре –4500 В; температура источника ионов 350°C; давление газа-распылителя (N<sub>2</sub>) 50 psi; газа-осушителя (N<sub>2</sub>) 50 psi; газа-завесы (N<sub>2</sub>) 20 psi; входной потенциал –10 В; потенциал на выходе из ячейки соударений –15 В.

Витамины разделяли, используя двухкомпонентную смесь растворителей, состоящую из 20 мМ буферного раствора формиата аммония с рН 3.7 (А) и ацетонитрила (В). Скорость потока 0.4 мл/мин, температура термостата колонки 25°C. Условия градиентного элюирования: 0–6 мин 98% CH<sub>3</sub>CN, 6–25 мин 98–5% CH<sub>3</sub>CN, 25–30 мин 5% CH<sub>3</sub>CN, 30–38 мин 98% CH<sub>3</sub>CN. Витамины детектировали в режиме ЭРИ-МС/МС-регистрации отрицательных ионов. Напряжение на капилляре 4500 В; температура источника ионов 350°C; давление газа-распылителя (N<sub>2</sub>) 50 psi; газа-осушителя (N<sub>2</sub>) 50 psi; газа-завесы (N<sub>2</sub>) 20 psi; входной потенциал 10 В; потенциал на выходе из ячейки соударений 15 В.

Специфичные параметры детектирования, а именно потенциал декластеризации (ДП) и энергию соударений (ЭС), подбирали для каждого аналита по отдельности (табл. 1). Время регистрации каждого ионного перехода 50 мс.

**Синтез этилового эфира изоциануксусной кислоты** проводили в соответствии со схемой 1 [13]:

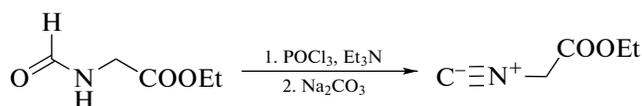


Схема 1. Схема синтеза этилового эфира изоциануксусной кислоты.

К раствору 19.7 г (0.15 моль) перегнанного этилового эфира N-формилглицина [14] и 37.5 г (0.37 моль) триэтиламина в 150 мл дихлорметана

добавляли по каплям при 0°C 23.0 г (0.15 моль) оксихлорида фосфора(V). Смесь перемешивали в течение 1 ч, поддерживая температуру около 0°C.

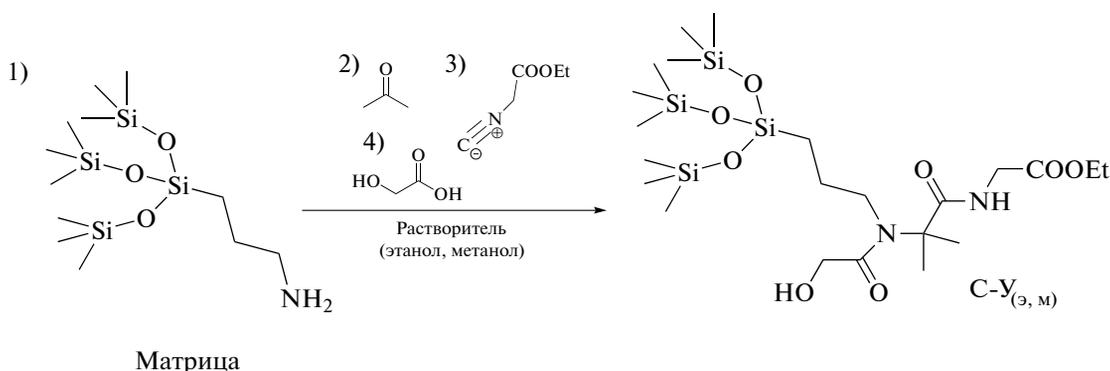
**Таблица 1.** Масс-спектрометрические параметры, выбранные для детектирования сахаров и витаминов

Соединение	Полярность	ДП, В	Ион предшественник, $m/z$	Фрагментный ион, $m/z$	ЭС, В
В <sub>1</sub>	+	70	265	122.1	21
			265	144.1	19
В <sub>2</sub>	+	70	377.2	172.1	53
			377.2	243.1	31
Никотинамид	+	70	123	96.2	27
			123	79.9	29
В <sub>6</sub>	+	70	169.8	134.1	29
			169.8	152.1	19
Никотиновая кислота	+	70	124	78	31
			124	80	29
В <sub>12</sub>	+	70	678.5	147.1	35
			678.5	359.3	35
Glu/Fru	–	–30	179.1	119.1	–10
			179.1	89.1	–20
			179.1	59.1	–25
Suc/Mal/Lac	–	–40	341.3	59.1	–55
			341.3	179.1	–18
Xyl/Rib	–	–30	149.1	59.1	–25

Медленно прибавляли раствор 30 г (0.28 моль) безводного карбоната натрия в 120 мл воды при энергичном перемешивании при 20–25°C. Полученную смесь перемешивали 30 мин при комнатной температуре. После разделения фаз водную фазу разбавляли в 2.5 раза и экстрагировали двумя порциями дихлорметана по 80 мл. Объединенные органические фазы промывали насыщенным раствором хлорида натрия, высушивали над карбонатом калия, растворитель отгоняли на ротонном испарителе без нагревания. Остаток перегоняли в вакууме водоструйного насоса, собирая фракцию, кипящую при 79–81°C (10 мм рт. ст.). Получили 9.8 г (56%) практически бесцветной жидкости с неприятным запахом, желтеющей при стоянии. По данным ЯМР <sup>1</sup>H в течение более года состав продукта практически не меняется (молярная чистота ≥95%), если хранится в стеклянной посуде при –20°C (в атмосфере сухого аргона). Спектры ЯМР <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C подтвердили структуру полученного соединения. ЯМР <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>;

400 МГц; δ, м.д.; J, Гц): 4.28 (2H, кв, <sup>3</sup>J = 7.15 Гц, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>O), 4.22 (2H, с, CH<sub>2</sub>N), 1.31 (3H, т, J = 7.15 Гц, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>O). ЯМР <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 МГц, δ, м.д.): 163.76, 160.86, 62.60, 43.34, 13.81.

**Синтез сорбентов и заполнение хроматографических колонок.** Сорбенты С-У<sub>м</sub> (в метаноле) и С-У<sub>э</sub> (в этаноле) получали ковалентным модифицированием полярных фрагментов матрицы – аминопропилсиликагеля “Диасфер-амин” по реакции Уги в разных растворителях: метаноле и этаноле, соответственно (схема 2). Строго соблюдали порядок добавления реагентов. К 1.2 г аминопропилсиликагеля (1) добавляли 95 мкл ацетона (2), 142 мкл этилового эфира изоцианкусовой кислоты (lgP = 0.91) (3) и 0.1 г гликолевой кислоты (4). Реакционную смесь перемешивали в течение 24 ч со скоростью 250–300 об/мин. Продукт реакции отфильтровывали на фильтре со стеклянным пористым дном, промывали 100 мл дистиллированной воды и 80 мл ацетонитрила.



Матрица

**Схема 2.** Схема синтеза и предполагаемая структура неподвижных фаз  $C-Y_m$  (в метаноле) и  $C-Y_3$  (в этаноле).

Для заполнения колонок использовали смесь 10 мл 0.1 М раствора  $KCl$ , 8 мл этанола и 2 мл 1,4-диоксана в качестве раствора для приготовления суспензии сорбентов, а дегазированный ацетонитрил – в качестве подвижной фазы. Заполнение колонки проводили при давлении 250–300 бар.

**Анализ реальных объектов.** Вино Gran Marques Reserva предварительно разбавляли в два раза; 0.3 г кофе Nescafe Gold Cappuccino сначала растворяли в 100 мл воды и затем также разбавляли в два раза. Пробоподготовка включала очистку пробы путем твердофазной экстракции на картридже Chromabond® C18 ec f (силикагель, модифицированный октадецильными группами, объем 3 мл, масса адсорбента 500 мг, Macherey-Nagel, Германия) при помощи вакуумного манифолда. Картридж предварительно кондиционировали 10 мл ацетонитрила и 5 мл деионизованной воды. К полученным экстрактам добавляли ацетонитрил для достижения соотношения вода–ацетонитрил согласно составу подвижной фазы.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе для получения неподвижных фаз по мультикомпонентной реакции Уги использовали 3-аминопропилсиликагель (сорбент С), ацетон, гликолевую кислоту и этиловый эфир изоциануксусной кислоты. Как отмечено выше, мультикомпонентные реакции предоставляют широкий спектр возможностей для варьирования структуры получаемых продуктов путем замены одного или нескольких компонентов реакции. На начальном этапе работы основной задачей было добиться лучшей степени покрытия матрицы функциональным слоем фиксированной структуры. С учетом литературных данных о влиянии органического растворителя на выход реакции синтез проводили в метаноле и в этаноле. В результате получили сорбенты, условно обозначенные как  $C-Y_m$  (в метаноле) и  $C-Y_3$  (в этаноле). Для оценки успешности синтеза хроматографические характеристики полученных сорбентов

сравнивали с таковыми для матрицы (сорбента С – 3-аминопропилсиликагеля). Сравнение осуществляли с помощью теста Танака для гидрофильных неподвижных фаз [15, 16] и на примере разделения модельных смесей сахаров, водорастворимых витаминов и аминокислот.

**Тест Танака.** Исходя из величин фактора удерживания уридина  $k(U)$  (табл. 2), отвечающего за оценку гидрофильных взаимодействий, сорбенты, полученные по реакции Уги, демонстрируют меньшие величины фактора удерживания уридина  $k(U)$  по сравнению с матрицей, что, по-видимому, связано с введением гидрофобных фрагментов в структуру функционального слоя. Это согласуется с величинами параметров гидрофобности Ханша  $lgP$ , рассчитанных с помощью Eriweb 4.1 для аминопропильного радикала и структурного фрагмента, полученного после реакции Уги, и составляющих 0.34 и 0.51 соответственно. В соответствии с результатами теста, представленными в табл. 2, значения большинства параметров для сорбента  $C-Y_m$  близки и незначительно отличаются от таковых для сорбента С (матрицы). В случае сорбента  $C-Y_3$  существенное уменьшение наряду с  $k(U)$  наблюдали для метиленовой  $\alpha(CH_2)$ , гидроксильной  $\alpha(OH)$  и анионообменной селективности  $\alpha(AX)$ . Полученные данные позволяют предположить, что проведение реакции в этаноле обеспечивает больший выход по сравнению с метанолом и, следовательно, приводит к увеличению степени покрытия матрицы новым функциональным слоем.

При этом отмечено, что селективность по отношению к стереоизомерам  $\alpha(V/A)$  и катионообменная селективность  $\alpha(CX)$  практически не изменяются для обоих синтезированных сорбентов по сравнению с матрицей, а величины  $\alpha(Tb/Tr) < 1$  подтверждают основную природу всех сорбентов. Незначительное увеличение  $\alpha(CX)$  для сорбента  $C-Y_3$  по сравнению с матрицей может быть вызвано большим фактором удерживания гидрофобного катиона и меньшим – полярного ура-

**Таблица 2.** Величины коэффициентов селективности теста Танака

Параметр	C (матрица)	C-У <sub>м</sub>	C-У <sub>3</sub>
k(U)	3.95	3.78	2.68
α(CH <sub>2</sub> )	1.49	1.55	1.11
α(OH)	2.09	2.30	1.54
α(V/A)	1.36	1.37	1.30
α(CX)	0.06	0.05	0.33
α(AX)	14.31	15.01	11.87
α(Tb/Tr)	0.72	0.77	0.72

Условия: подвижная фаза CH<sub>3</sub>CN–20 мМ ацетатно-аммонийный буферный раствор с pH 4.7 (90 : 10, по объему); скорость потока 0.5 мл/мин; УФ-детектирование, 254 нм.

цила, являющимися тестовыми аналитами для расчета этого параметра, вследствие снижения гидрофильности поверхности при модифицировании по реакции Уги.

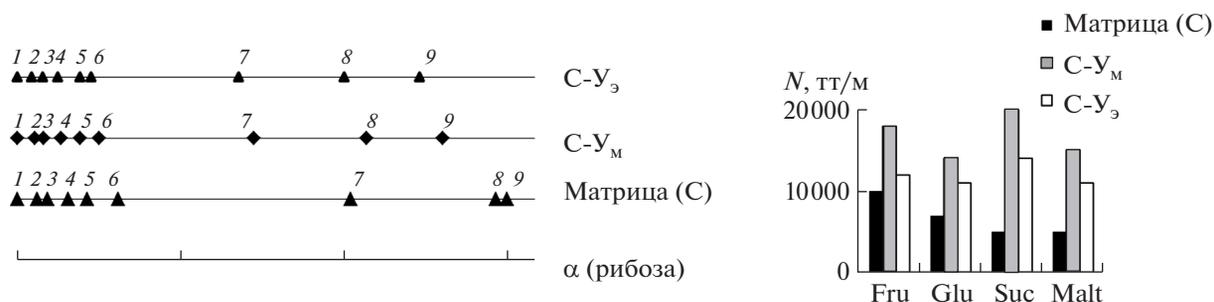
**Сахара** являются удобными модельными аналитами для изучения свойств и возможностей гидрофильных сорбентов в отношении разделения полярных нейтральных веществ. В удерживание сахаров вносит вклад не только распределение в адсорбированном на полярной неподвижной фазе приповерхностном слое воды, но также и адсорбционный механизм, и образование водородных связей с ОН-группами [17–19].

Показано, что при модифицировании матрицы по реакции Уги времена удерживания сахаров уменьшаются, что согласуется с уменьшением гидрофильности поверхности по результатам теста Танака. Однако при этом значительно увеличивается эффективность (рис. 1), что может быть следствием уменьшения вклада сопротивления массопереносу при уменьшении толщины функционального слоя, в том числе приповерхностного слоя воды (в котором реализуется распределение) в результате создания структурных фрагментов по

реакции Уги на поверхности аминопропилсиликагеля. Более того, селективность для пары мальтоза/лактоза, обладающих одинаковым значением параметра гидрофобности Ханша (lgP = –5.46, Eriweb 4.1), существенно увеличилась для сорбентов C-У<sub>м</sub> и C-У<sub>3</sub> по сравнению с матрицей C (рис. 1), что обеспечило возможность разрешения этой пары сахаров. Коэффициенты селективности α<sub>Mal/Lact</sub> составили 1.15–1.20. В целом для новых сорбентов селективность по другим сахарам несколько уменьшилась, однако благодаря увеличению эффективности при модифицировании аминопропилсиликагеля по реакции Уги удалось разделить девять сахаров за 23 мин при составе подвижной фазы CH<sub>3</sub>CN–H<sub>2</sub>O (85 : 15, по объему).

Поскольку использование рефрактометрического детектора позволяет работать только в изократическом режиме, далее в работе использовали испарительный детектор по светорассеянию, что дало возможность осуществлять градиентное элюирование, тем самым увеличив количество разделяемых углеводов в модельной смеси. Так, на сорбенте C-У<sub>м</sub>, демонстрирующем лучшую эффективность по сахарам, за 20 мин было достигнуто разделение модельной смеси 10 сахаров, включая трисахарид раффинозу, факторы удерживания которого слишком высоки в изократическом режиме элюирования. Соотношение воды и ацетонитрила в подвижной фазе изменяли в интервале 14–27 и 86–73% соответственно. Сорбент C-У<sub>м</sub> продемонстрировал приемлемую форму пиков (коэффициенты асимметрии 1.0–2.1) и хорошее разрешение для смеси сахаров. Хроматограмма и условия элюирования приведены на рис. 2, рассчитанные хроматографические параметры – в табл. 3.

**Аминокислоты.** В качестве модельных объектов для изучения свойств и возможностей синтезированных сорбентов использовали также аминокислоты, представляющие класс полярных цвиттер-ионных аналитов. Для разделения смесей аминокислот в качестве подвижной фазы выбра-



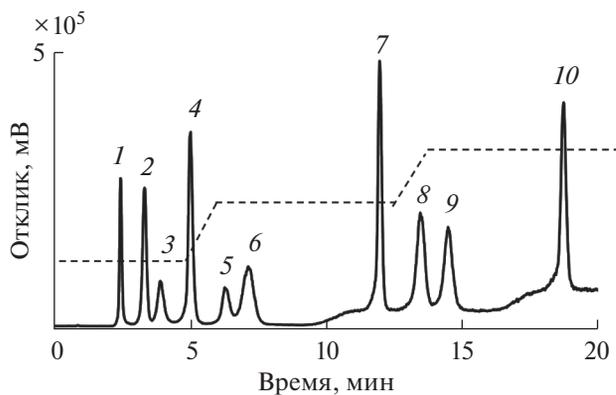
**Рис. 1.** Шкалы селективности сахаров относительно рибозы (слева), диаграмма эффективности определения сахаров (справа). Подвижная фаза: CH<sub>3</sub>CN–H<sub>2</sub>O (85 : 15, по объему); скорость потока 1 мл/мин; рефрактометрическое детектирование: 1 – рибоза, 2 – ксилоза, 3 – арабиноза, 4 – фруктоза, 5 – манноза, 6 – глюкоза, 7 – сахароза, 8 – мальтоза, 9 – лактоза.

ли фосфатный буферный раствор, не поглощающий электромагнитное излучение при длине волны 210 нм, используемой для детектирования аминокислот [20]. При выборе условий элюирования содержание буфера снизили до 1 мМ для обеспечения растворимости фосфата в водно-органической среде, долю водной фазы варьировали в пределах от 10 до 15%. Для синтезированных сорбентов оптимальная доля воды составила 15%. Повышение pH элюента до 6.5 – вблизи изоэлектрических точек большинства аминокислот – привело к увеличению их факторов удерживания и повышению селективности.

Для сорбентов С-У<sub>м</sub> и С-У<sub>з</sub> увеличилось время удерживания аминокислот по сравнению с сорбентом С, а также возросла эффективность по аминокислотам (рис. 3). Несмотря на большую гидрофобность полученных сорбентов, удерживание цвиттер-ионных аминокислот на них заметно возросло по сравнению с матрицей, вероятно, благодаря введению гидроксид- и амидных групп в функциональный слой сорбентов, что позволило увеличить число разделяемых аналитов. Однако, несмотря на большие величины факторов удерживания аминокислот на сорбенте С-У<sub>м</sub>, на нем не удалось достичь разрешения пары серин/аланин. Сорбент С-У<sub>з</sub> продемонстрировал лучшую селективность по парам тирозин/лейцин и серин/аланин, лучшую симметрию пиков и большую эффективность по отношению к аминокислотам. Таким образом, можно сделать вывод, что модифицирование аминопропилсиликагеля по реакции Уги с выбранными реагентами в этаноле приводит к получению сорбента с лучшими хроматографическими характеристиками для веществ цвиттер-ионной природы, таких как аминокислоты, вероятно, вследствие большего выхода реакции в этаноле по сравнению с метанолом. Хроматограммы модельных смесей аминокислот представлены на рис. 3.

**Водорастворимые витамины.** Различия в гидрофильности и разнообразии физико-химических свойств делает водорастворимые витамины интересными модельными аналитами для изучения свойств сорбентов в режиме ГИХ. В составе подвижной фазы в этом случае рационально использовать ацетатно-аммонийный буферный раствор, обладающий высокой растворимостью в присутствии ацетонитрила. Это позволяет работать в градиентном режиме элюирования, а также повышать концентрацию элюирующего иона при наличии электростатических взаимодействий заряженных форм аналитов с неподвижной фазой и высокой ионообменной емкости сорбентов.

Исходя из данных [21], для разделения соединений данного класса использовали 100 мМ ацетатно-аммонийный буферный раствор и ацетонитрил в качестве подвижной фазы; детектирова-



**Рис. 2.** Хроматограмма модельной смеси сахаров. Условия: сорбент С-У<sub>м</sub>, подвижная фаза H<sub>2</sub>O–CH<sub>3</sub>CN; скорость потока 1 мл/мин; режим градиентного элюирования: 0–5.5 мин 14% H<sub>2</sub>O, 6.5–12.5 мин 22% H<sub>2</sub>O, 13.5–26.5 мин 27% H<sub>2</sub>O, 28.5–32.5 мин 14% H<sub>2</sub>O, детектирование по светорассеянию (размеры колонки 100 × 3 мм): 1 – рибоза, 2 – ксилоза, 3 – арабиноза, 4 – фруктоза, 5 – манноза, 6 – глюкоза, 7 – сахароза, 8 – мальтоза, 9 – лактоза, 10 – раффиноза.

ние проводили при длине волны УФ-детектора 270 нм. С целью повышения экспрессности для разделения смеси семи витаминов использовали градиентное элюирование. На первом этапе выбирали условия разделения слабоудерживаемых витаминов. Чтобы добиться хорошего разделения смеси витаминов, для каждого сорбента выбирали pH буферного раствора (5.4–5.8) и долю водной фазы в элюенте в диапазоне 8–12%. Оптимальное содержание водной фазы для всех сорбентов составило 10%, а pH буферного раствора – 5.4, так как при pH 5.8 не удалось обеспечить полного разрешения витаминов В<sub>1</sub> и В<sub>2</sub>. Далее выбирали условия градиентного элюирования витамина В<sub>12</sub>, а

**Таблица 3.** Хроматографические параметры разделения сахаров

Сахар	$k'$	Rs	As	$N$ , тт/м
Рибоза	1.7	–	2.1	11000
Ксилоза	2.6	1.8	1.2	8000
Арабиноза	3.3	1.6	1.6	9000
Фруктоза	4.4	1.7	1.7	18000
Манноза	5.8	1.5	1.0	22000
Глюкоза	6.7	1.2	1.2	14000
Сахароза	12.1	2.1	1.3	–
Мальтоза	13.6	1.2	1.4	–
Лактоза	14.7	1.1	1.2	–
Раффиноза	19.4	1.4	1.6	–

Условия: сорбент С-У<sub>м</sub>, подвижная фаза H<sub>2</sub>O–CH<sub>3</sub>CN; скорость потока 1 мл/мин; режим градиентного элюирования (см. рис. 4), детектирование по светорассеянию.

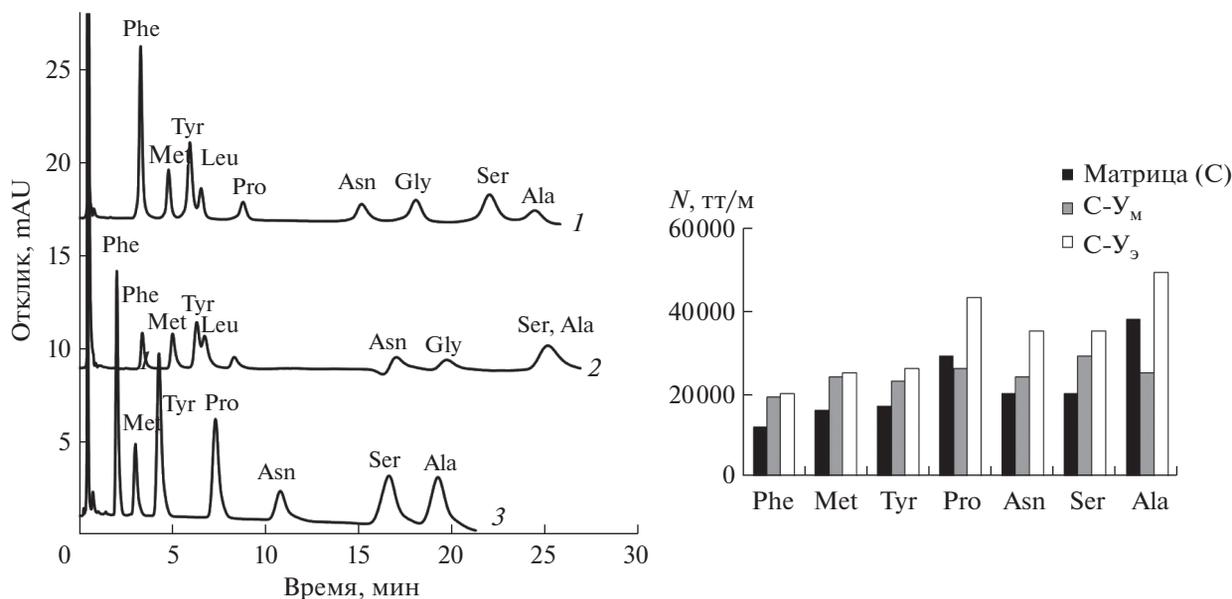


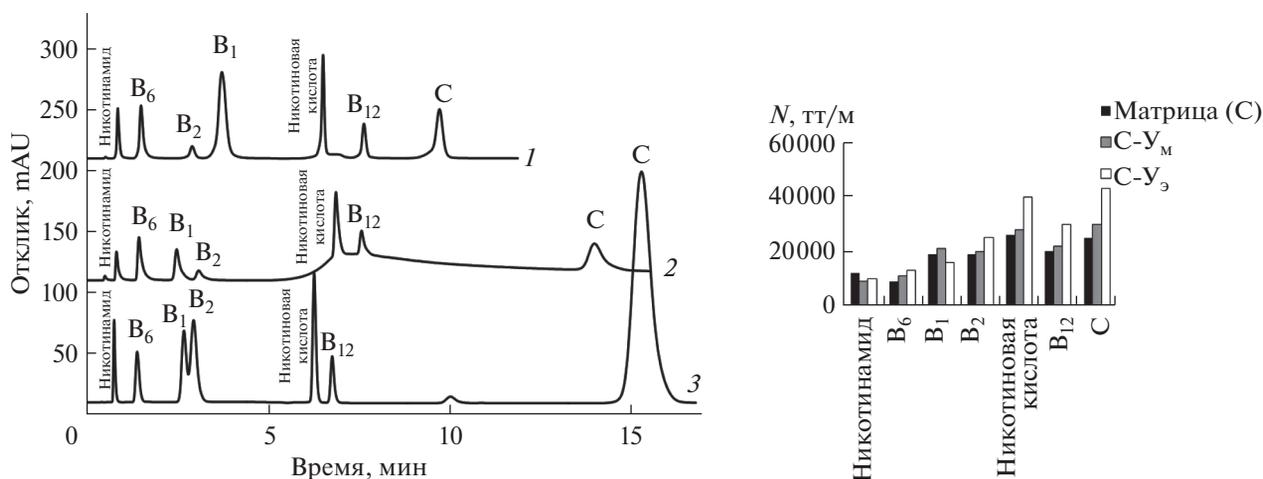
Рис. 3. Хроматограммы модельной смеси аминокислот (слева), диаграмма эффективности определения аминокислот (справа). Сорбенты: C-Y<sub>3</sub> (1), C-Y<sub>M</sub> (2), C (матрица) (3); подвижная фаза CH<sub>3</sub>CN–1 мМ фосфатный буферный раствор с рН 6.5 (85 : 15, по объему); скорость потока 1 мл/мин; УФ-детектирование при 210 нм.

также никотиновой и аскорбиновой кислот, имеющих большие факторы удерживания на сорбентах, характеризующихся высокой анионообменной селективностью согласно тесту Танака (табл. 2). Путем повышения содержания ацетатно-аммонийного буферного раствора в подвижной фазе в диапазоне 20–28% удалось добиться полного разрешения пиков и экспрессного разделения этих витаминов на полученных сорбентах при содержании буферного раствора 28% в качестве второй ступени градиентного режима.

Как видно из рис. 4, для обоих сорбентов, полученных по реакции Уги, улучшается разрешение пары витаминов В<sub>1</sub>/В<sub>2</sub> (R<sub>s</sub> = 1.8 для C-Y<sub>M</sub>) по сравнению с матрицей, а на сорбенте C-Y<sub>3</sub> наблюдается иная селективность – обратный порядок элюирования данной пары (R<sub>s</sub> = 2.0 для C-Y<sub>3</sub>). Увеличение фактора удерживания положительно заряженного тиамин согласуется с уменьшением анионообменной селективности α(АХ) сорбента C-Y<sub>3</sub> и увеличением α(СХ). Уменьшение гидрофильности и анионообменной селективности данного сорбента привело к уменьшению удерживания витаминов кислотной природы – аскорбиновой и никотиновой кислот – и более экспрессному разделению семи витаминов. Кроме того, сорбент C-Y<sub>3</sub> продемонстрировал лучшую симметрию пиков (A<sub>s</sub> от 1.0 до 1.2) и большую эффективность по витаминам – до 45000 тт/м (рис. 4). Хроматограммы модельной смеси витаминов представлены на рис. 4.

**Выбор условий разделения в режиме гидрофильной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (МС).** При определении полярных органических соединений методом ГИХ в сочетании с МС-детектированием необходимо учитывать не только хроматографические параметры разделения, но и условия ионизации аналитов. Ионизация электрораспылением – ключевая стадия в МС-детектировании, во время которой образуются заряженные молекулы аналитов, обычно их протонированные и депротонированные формы, и осуществляется их перенос из фазы мелкого аэрозоля в газовую фазу. На этой стадии состав подвижной фазы и ее рН влияют не только на форму существования молекул аналитов в элюате, но и на распыление этого элюата в виде аэрозоля вследствие увеличения или уменьшения поверхностного натяжения. Компоненты буферных растворов могут конкурировать с молекулами аналитов при ионизации, служить переносчиками заряда, образовывать заряженные кластеры с молекулами растворителей и т.д. Таким образом, необходимо выбрать наиболее подходящий состав подвижной фазы, найдя компромисс между наилучшими условиями для хроматографического разделения и для электрораспылительной ионизации разделяемых соединений.

Для разделения и определения сахаров в варианте ВЭЖХ-МС использовали стандартную подвижную фазу, состоящую из ацетонитрила и воды [22]. Профиль градиента подбирали таким образом, чтобы, увеличивая содержание воды в подвижной фазе, добиться оптимальной формы



**Рис. 4.** Хроматограммы модельной смеси витаминов (слева), диаграмма эффективности определения витаминов (справа, получена в изократическом режиме элюирования). Сорбенты: C-Y<sub>3</sub> (1), C-Y<sub>M</sub> (2), C (матрица) (3); подвижная фаза: 100 мМ ацетатно-аммонийный буферный раствор с pH 5.4—CH<sub>3</sub>CN; градиентное элюирование: 0–4.5 мин 10% буферного раствора, 5.5–16 мин 28% буферного раствора; скорость потока 1 мл/мин; УФ-детектирование при 270 нм.

пиков дисахаридов — глюкозы, мальтозы и лактозы (рис. 5а).

Для разделения и определения витаминов в варианте ВЭЖХ-МС выбирали подходящий состав подвижной фазы, варьируя концентрацию буферного раствора (формиата аммония) от 10 до 30 мМ. Ухудшение ионизации витаминов при увеличении концентрации формиата аммония от 10 до 20 мМ компенсировалось улучшением формы их хроматографических пиков, а при переходе к концентрации 30 мМ интенсивность сигналов снижалась, поэтому было решено далее использовать 20 мМ буферный раствор. Дальнейшее повышение концентрации нецелесообразно из-за ухудшения отклика МС-детектора, а кроме того, невозможно полностью подавить удерживание по ионообменному механизму, как это происходит при использовании фосфатного буферного раствора, несовместимого с МС-детектированием. По этой причине приняли решение понизить pH, добавив муравьиную кислоту к раствору формиата аммония до pH 3.7, а его содержание в составе подвижной фазы в градиентном режиме линейно увеличивали от 2 до 95%. Полученная хроматограмма модельной смеси витаминов группы В представлена на рис. 5б.

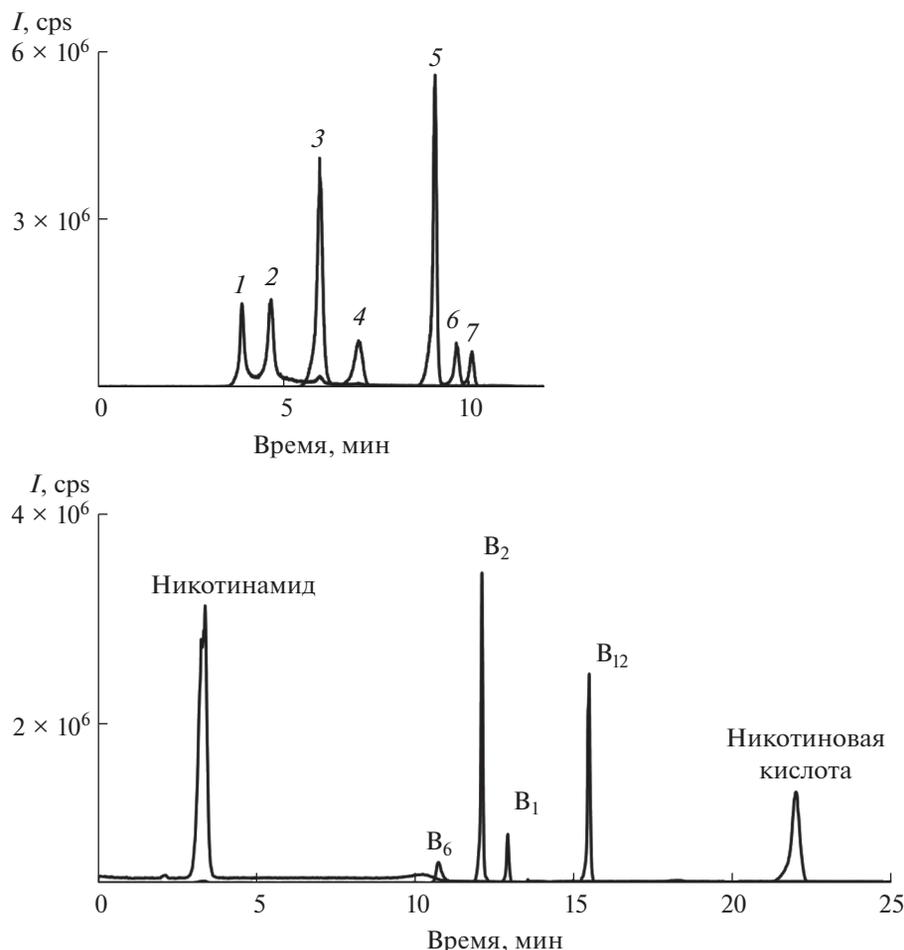
**Анализ реальных объектов.** Для проверки применимости сорбента C-Y<sub>M</sub> для определения сахаров в реальных объектах провели анализ вина Gran Marques Reserva и растворимого кофе Nescafe Gold Cappuccino. Определяемые углеводы в исследуемых образцах идентифицировали сопоставлением их времен удерживания со временами удерживания компонентов в стандартных растворах. Количественную оценку содержания каждого аналита проводили на основе линейных граду-

ировочных зависимостей площади пика от концентрации. Градуировочные зависимости для десяти сахаров строили с использованием стандартных растворов в диапазоне концентраций 50–800 мг/л, выбранном исходя из предполагаемого содержания в объектах анализа. Правильность предложенного подхода к определению сахаров проверяли методом введено—найдено, воспроизводимость — путем повторного введения образцов.

В результате качественного анализа в красном сухом вине обнаружили фруктозу и глюкозу, а в растворимом кофе Nescafe Gold Cappuccino — сахарозу и лактозу, что характерно для сладкого напитка с добавлением молока. В пробу вина вводили добавки девяти сахаров по 294 мг/л каждого, а в пробу растворимого кофе — добавки десяти сахаров по 100 мг/л. Большое количество глюкозы в вине мешает определению маннозы, поэтому добавку маннозы не вводили. Хроматограммы разбавленного вина и кофе на колонке C-Y<sub>M</sub> представлены на рис. 6; результаты количественного анализа и проверки правильности методом введено—найдено, а также характеристики полученных градуировочных зависимостей и пределы обнаружения сахаров приведены в табл. 4. Найденные количества сахаров согласуются с введенными, что подтверждает применимость полученного сорбента и способа определения сахаров к анализу реальных объектов.

\*\*\*

Таким образом, изучены новые неподвижные фазы, синтезированные по мультикомпонентной реакции Уги с использованием матрицы 3-ами-

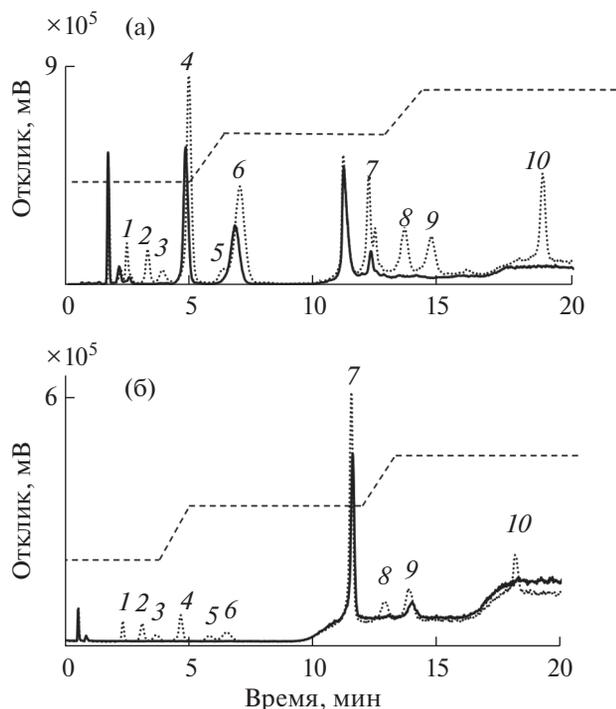


**Рис. 5.** Хроматограмма модельной смеси сахаров (а) и витаминов (б) на сорбенте С-У<sub>м</sub>. (а): Подвижная фаза – деионизованная вода–ацетонитрил; режим градиентного элюирования: 0–4.5 мин 15% воды, 4.5–9.0 мин с 17 до 37% воды, 9.0–9.1 мин с 37 до 17% воды; МС-детектирование; скорость потока 0.4 мл/мин; температура колонки 30°C; 1 – рибоза, 2 – ксилоза, 3 – фруктоза, 4 – глюкоза, 5 – сахароза, 6 – мальтоза, 7 – лактоза. (б): Подвижная фаза – 20 мМ формиат аммония (рН 3.7)–ацетонитрил: 0–6 мин 2% буферного раствора, 6–25 мин 2–95% буферного раствора, 25–30 мин 5% буферного раствора, 30–38 мин 2% буферного раствора; скорость потока 0.4 мл/мин, температура колонки 25°C; МС-детектирование.

**Таблица 4.** Метрологические характеристики определения сахаров (диапазон линейности градуировочных зависимостей 50–800 мг/л)

Вещество	$c_{мин}$ , мг/л	$s_T^*$	$r$	$a \times 10^{-3**}$	$b \times 10^{-5**}$	Найдено, мг/л	Найдено после введения 294 мг/л***, мг/л	Найдено после введения 100 мг/л****, мг/л
Рибоза	7	0.03	0.996	5.77	3.50	—	280 ± 40	104 ± 5
Ксилоза	8	0.04	0.995	8.13	5.06	—	220 ± 70	100 ± 5
Арабиноза	20	0.16	0.992	3.53	2.34	—	250 ± 40	120 ± 20
Фруктоза	5	0.05	0.995	13.36	8.01	630 ± 60***	880 ± 60	100 ± 5
Манноза	35	0.21	0.991	5.02	3.73	—	—	110 ± 10
Глюкоза	20	0.22	0.989	10.98	8.09	600 ± 50***	800 ± 100	110 ± 10
Сахароза	20	0.06	0.998	14.06	4.80	340 ± 30****	310 ± 20	420 ± 30
Мальтоза	26	0.25	0.995	11.11	4.85	—	220 ± 60	120 ± 20
Лактоза	25	0.30	0.994	9.23	3.45	120 ± 20****	220 ± 60	210 ± 30
Раффиноза	30	0.04	0.998	13.83	2.47	—	260 ± 30	100 ± 20

\* Рассчитано для концентраций 50 мг/л; \*\* вид градуировочной зависимости  $y = ac - b$ ; \*\*\* в вине Gran Marques Reserva ( $n = 3$ ,  $P = 0.95$ ); \*\*\*\* в кофе Nescafe Gold Cappuccino ( $n = 3$ ,  $P = 0.95$ ).



**Рис. 6.** Хроматограммы вина Gran Marques Reserva (сплошная линия), вина с добавками (пунктирная линия) (а); кофе Nescafe Gold Cappuccino (сплошная линия), кофе с добавками (пунктирная линия) (б). Сорбент С-У<sub>М</sub>; подвижная фаза вода-CH<sub>3</sub>CN; скорость потока 1 мл/мин; режим градиентного элюирования. (а): 0–5.5 мин 12% воды, 6.5–12.5 мин 20% воды, 13.5–26.5 мин 25% воды, 28.5–32.5 мин 12% воды; (б): 0–5.5 мин 14% воды, 6.5–12.5 мин 22% воды, 13.5–26.5 мин 27% воды, 28.5–32.5 мин 14% воды; детектирование по светорассеянию: 1 – рибоза, 2 – ксилоза, 3 – арабиноза, 4 – фруктоза, 5 – манноза, 6 – глюкоза, 7 – сахароза, 8 – мальтоза, 9 – лактоза, 10 – раффиноза.

нопропилсиликагеля, ацетона, гликолевой кислоты и этилового эфира изоциануксусной кислоты в разных растворителях (этанол, метанол). Показано, что большая степень покрытия матрицы достигается при проведении реакции в этаноле. Улучшение разделяющей способности новых сорбентов по отношению к различным классам полярных аналитов по сравнению с исходной матрицей свидетельствует о перспективности предложенного подхода для создания новых неподвижных фаз для ГИХ. Дальнейшие работы в данной области будут направлены на повышение степени покрытия матрицы функциональным слоем, а также варьирование структуры получаемого слоя для управления селективностью получаемых сорбентов.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 20-13-00140.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Buszewski B., Noga S.* Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) – A powerful separation technique // *Anal. Bioanal. Chem.* 2012. V. 402. P. 231.
2. *Чернобровкина А.В., Смоленков А.Д., Шнигун О.А.* Гидрофильная хроматография – перспективный метод определения полярных веществ // *Лаборатория и производство.* Т. 4. № 4. С. 76.
3. *Moni L., Ciogli A., Acquarica I., Dondoni A., Gasparrini F., Marra A.* Synthesis of sugar-based silica gels by copper-catalysed azide–alkyne cycloaddition via a single-step azido-activated silica intermediate and the use of the gels in hydrophilic interaction chromatography // *Chem. Eur. J.* 2010. V. 16. P. 5712.
4. *Guo Z., Jin Y., Liang T., Liu Y., Xu Q., Liang X., Lei A.* Synthesis, chromatographic evaluation and hydrophilic interaction/reversed-phase mixed-mode behavior of a “Click-cyclodextrin” stationary phase // *J. Chromatogr. A.* 2009. V. 1216. P. 257.
5. *Shen A., Guo Z., Yu L., Cao L., Liang X.* A novel zwitterionic HILIC stationary phase based on “thiol-ene” click chemistry between cysteine and vinyl silica // *Chem. Commun.* 2011. V. 47. P. 4550.
6. *Gargano A.F.G., Leek T., Lindner W., Lämmerhofer M.* Mixed-mode chromatography with zwitterionic phosphopeptidomimetic selectors from Ugi multicomponent reaction // *J. Chromatogr. A.* 2013. V. 1317. P. 12.
7. *Ferreira C.C., Gama M.R., Silva G.S., Pereira A.W., Collins C.H., Jardim I.C.S.F.* Synthesis and evaluation of a pentafluorobenzamide stationary phase for HPLC separations in the reversed phase and hydrophilic interaction modes // *J. Sep. Sci.* 2018. V. 41. P. 1.
8. *Kotoni D., d’Acquarica I., Ciogli A., Villani C., Capitani D., Gasparrini F.* Design and evaluation of hydrolytically stable bidentate urea-type stationary phases for hydrophilic interaction chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2012. V. 1232. P. 196.
9. *Ugi I., Dömling A.* Multicomponent reactions with isocyanides // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2000. V. 39. P. 3168.
10. *Мионов М.А., Бабаев Е.В.* Параллельная реакция Уги в студенческих практикумах Урала и Москвы // *Рос. хим. журн. (Журн. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева).* 2009. Т. 53. № 5. С. 139.
11. *Krasavin M., Parchinsky V., Shumsky A., Konstantinov I., Vantskul A.* Proline-like b-turn mimics accessed via Ugi reaction involving monoprotected hydrazines // *Tetrahedron Lett.* 2010. V. 51. P. 1367.
12. *Strocker A., Keating T., Tempest P., Armstrong R.* Use of a convertible isocyanide for generation of Ugi Reaction derivatives on solid support: Synthesis of  $\alpha$ -acylaminoesters and pyrroles // *Tetrahedron Lett.* 1996. V. 37. P. 1149.
13. *Hoppe D., Schöllkopf U.* Synthesen mit  $\alpha$ -metallierten Isocyaniden XIII. Neue Synthese von 2-Imidazolin // *Liebigs Ann. Chem.* 1972. Bd. 763. S. 1.
14. *Тумце Л., Айхер Т.* Препаративная органическая химия. М.: Мир, 2004. С. 161.
15. *Dolci M.* Chromatographic Characterization of Stationary Phases for Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography. Runcorn, Cheshire, UK: Thermo Fisher Scientific, 2013.

16. *Kawachi Y., Ikegami T., Takubo H., Ikegami Y., Miyamoto M., Tanaka N.* Chromatographic characterization of hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases: Hydrophilicity, charge effects, structural selectivity, and separation efficiency // *J. Chromatogr. A.* 2011. V. 1218. P. 5903.
17. *Попов А.С., Максимов Г.С., Смоленков А.Д., Шпигун О.А., Чернобровкина А.В.* Новые сорбенты для гидрофильной хроматографии на основе силикагеля, ковалентно модифицированного полиэтиленгликолем // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия.* 2021. Т. 62. № 2. С. 164.
18. *Fu Q., Liang T., Li Z., Xu X., Ke Y., Jin Y., Liang X.* Carbohydrate separation by hydrophilic interaction liquid chromatography on a 'click' maltose column // *Carbohydr. Res.* 2013. V. 379. P. 13.
19. *Jenkins K.* HILIC separation of carbohydrates using BEH amide particle technology // *J. Chromatogr. Today.* 2015. V. 8. P. 14.
20. *Themelis T., Gotti R., Gatti R.* A novel hydrophilic interaction liquid chromatography method for the determination of underivatized amino acids in alimentary supplements // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2017. V. 145. P. 751.
21. *Karatapanis A.E., Fiamegos Y.C., Stalikas C.D.* HILIC separation and quantitation of water-soluble vitamins using diol column // *J. Sep. Sci.* 2009. V. 32. P. 909.
22. *Sarvin B.A., Seregin A.P., Shpigun O.A., Rodin I.A., Stavrianidi A.N.* A novel strategy for isolation and determination of sugars and sugar alcohols from conifers // *J. Chromatogr. B.* 2018. V. 1092. P. 138.

УДК 544.543

## РАЗДЕЛЕНИЕ РАЦЕМАТА ПЕНТАНОЛА-2 НА ХИРАЛЬНОЙ НЕПОДВИЖНОЙ ФАЗЕ НА ОСНОВЕ ГОМОХИРАЛЬНЫХ КРИСТАЛЛОВ $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , ПОЛУЧЕННЫХ В УСЛОВИИ СОЗРЕВАНИЯ ВИЕДМЫ

© 2021 г. Ю. Ф. Шарафутдинова<sup>а</sup>, \*, А. Ш. Ганиева<sup>а</sup>, В. Ю. Гуськов<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Башкирский государственный университет  
ул. Заки-Валиди, 32, Уфа, 450076 Россия

\*e-mail: ms.shaihitdinova94@gmail.com

Поступила в редакцию 26.03.2021 г.

После доработки 31.03.2021 г.

Принята к публикации 01.04.2021 г.

Для разделения рацемата пентанола-2 предложена новая хиральная неподвижная фаза на основе гомохиральных кристаллов  $\alpha$ - $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , полученных в условии созревания Виедмы. Из хроматограмм разделения рацемата пентанола-2 определены времена удерживания и параметры разделения. Разделение происходит в диапазоне концентраций 4–11.3 мг/мл (элюент – смесь *n*-гептана и хлороформа). Достоверность разделений подтверждена поляриметрическим и газохроматографическим с масс-спектрометрическим детектированием анализом фракций каждого пика. Показано, что параметры разделения не зависят от скорости элюирования. При увеличении объемной доли хлороформа элюирующая сила возрастает, а критерий разделения и коэффициент селективности снижаются. Последний варьировался от 1.09 до 1.32. Максимальная эффективность разделения составила 2000 тт/м. Предложенная неподвижная фаза может быть применена для полупрепаративного разделения энантиомеров.

**Ключевые слова:** пентанол-2, ВЭЖХ, гексагидрат сульфата никеля, созревание Виедмы.

**DOI:** 10.31857/S0044450221090103

Проблема разделения рацемических веществ возникла с тех пор, как Пастер обнаружил молекулярную асимметрию органических соединений в 1848 г. [1]. Целью разделения рацемата является как анализ энантиомерного состава, так и полупрепаративное и препаративное выделение оптически чистого изомера, поскольку стереохимические характеристики структуры сильно влияют на биологическую активность органических соединений. Методы разделения рацемических спиртов делятся на две основные группы: (1) разделение путем синтеза и разделения диастереоизомеров и (2) разделение рацемических спиртов путем энантиоселективной кристаллизации, а также хроматографически [2].

Кристаллизация с образованием хиральных (энантиоморфных) кристаллов возможна как для изначально хиральных, так и для ахиральных молекул. В случае последних получают право- и левовращающие кристаллы с вероятностью 50 : 50. Кондепуди [3–6] показал, что при автокаталитической кристаллизации хлората натрия (ахиральное вещество, кристаллизующееся в энантиоморфной пространственной группе) данное правило может быть нарушено. Чистые хи-

ральные кристаллы хлората натрия можно получить в условиях интенсивного размешивания раствора. Эта концепция спонтанного разделения энантиоморфных кристаллов заключалась в решающей роли вторичного зародышеобразования: растворенное вещество кристаллизуется на поверхности существующего материнского кристалла, а вновь добавленный материал принимает хиральность поверхности.

Виедма [7] в 2005 г. предложил механизм такого спонтанного нарушения симметрии при сопровождающейся размешиванием кристаллизации: в процессе размешивания происходят разбиение мешальником достигнутого критического размера кристалла на более мелкие той же хиральности (вторичная нуклеация) [8] и последующий автокаталитический процесс Франка [9] в сочетании с Оствальдским созреванием [10]. Виедма показал, что получение чистых энантиоморфных кристаллов возможно и при высокой скорости первичной нуклеации как за счет создаваемого стеклянными шариками “эффекта мельницы” [7], так и за счет температурного градиента при отсутствии размешивания [11]. Данный метод получения энантиоморфных кристаллов на-

зван “созреванием Виедмы” и успешно применен для получения многих энантиоморфных кристаллов, в том числе и из растворов рацематов [12–17].

Созревание Виедмы делает возможным использование энантиоморфных кристаллов для хирального разделения. Соаи с соавт. [18] обнаружили способность поверхности энантиоморфных кристаллов ахиральных молекул к асимметрическому катализу реакции диизопропилцинка с пиримидин-5-карбальдегидом. Одним из таких кристаллов был гексагидрат сульфата никеля. Для полученных группой Соаи в 2015 г. кристаллов  $\alpha$ -NiSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O зафиксирован круговой дихроизм при 390 нм. Обнаружено, что кристаллы с положительным круговым дихроизмом приводят к образованию (S)-пиримидилалконола, а с отрицательным – (R)-пиримидилалконола.

Таким образом, кристаллы  $\alpha$ -NiSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O, полученные в условиях созревания Виедмы, могут быть применены и для разделения энантиомеров. В настоящей работе адсорбент на основе таких кристаллов использовали для разделения рацемата пентанола-2 на энантиомеры.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве адсорбента использовали семиводный сульфат никеля (98%, Кыштымский медэлектролитный завод, Кыштым, Россия, CAS 10101-98-1). В качестве адсорбента-носителя кристаллов  $\alpha$ -NiSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O применяли силикагель (Chemapol, Прага, Чешская республика, размер частиц (5–40) мкм). Для приготовления растворов NiSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O использовали высокоочищенную воду с проводимостью 10 мкс/м, полученную на деионизаторе воды ДВ-10UV (Цветхром, Дзержинск, Россия).

Гомохиральные кристаллы  $\alpha$ -NiSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O получали по следующей методике: в насыщенный при 40°C раствор NiSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O добавляли 15 г стеклянных шариков для создания “эффекта мельницы”, затем включали размешивание со скоростью 1300 об/мин. Раствор испарялся до тех пор, пока было возможно осуществлять перемешивание. Осадок отфильтровывали и высушивали в эксикаторе над свежепрокаленным CaCl<sub>2</sub>.

Для нанесения  $\alpha$ -NiSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O на поверхность силикагеля последний заливали водой, нагревали до 50°C, после чего вносили навеску  $\alpha$ -NiSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O. Количество модификатора составляло 10% от массы адсорбента-носителя. Суспензию размешивали в течение 15 мин при 100 об/мин. Затем температуру понижали до 40°C со скоростью 1°C/10 мин. Суспензию размешивали в течение дня, далее раствор отфильтровывали и готовый адсорбент высушивали в эксикаторе. После этого адсорбент дополнительно сушили в атмосфере азота в течение часа.

Полученным сорбентом наполняли стальную колонку длиной 25 см и внутренним диаметром 4.6 мм. Колонку заполняли суспензией модифицированного адсорбента в октанол-1, далее через колонку элюировали ацетонитрил со скоростью потока 10 мл/мин. Процедуру повторяли до плотного заполнения всей колонки.

Исследование проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в нормально-фазовом режиме на хроматографе Perkin Elmer series 200 (Perkin Elmer, США) с УФ-детектором. Объем петли инжектора составлял 20 мкл, рабочая длина волны (250–265) нм, скорость элюирования (0.1–0.6) мл/мин. Обработка хроматограмм выполнялась в программе МультиХром версия 2.4 для Аквилона.

В качестве элюентов выбрали *n*-гептан (>99.5%, Экос-1, Москва, Россия, CAS 142-82-5) и хлороформ х. ч. (Экос-1, CAS 67-66-3). Элюенты дополнительно очищали согласно общепринятым методикам [19]. Гептан экстрагировали конц. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (объемное соотношение гептан–H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 9 : 1). Хлороформ встряхивали с конц. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, промывали водой до нейтральной реакции среды, сушили над CaCl<sub>2</sub> и перегоняли. Объемная концентрация хлороформа в смеси гептан–хлороформ варьировалась от 10 до 40%. В качестве объекта исследования использовали пентанол-2 (98%, Sigma-Aldrich, Милуоки, США, CAS 60-32-29-7).

Для установления факта хирального разделения во время элюирования отбирали фракции, соответствующие первому и второму пикам. Далее фракции концентрировали и исследовали методами поляриметрии и газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Значения угла вращения плоскости поляризованного света каждой из фракций анализировали на автоматическом поляриметре Atago AP-300 (Atago, Япония). Использовали кювету толщиной 100 мм и объемом 5 мл. Рабочая длина волны составляла 589 нм. Содержимое фракций анализировали на газовом хроматографе Agilent 6890 с масс-спектрометрическим детектором Agilent 5973 на колонке DB-624 (длина 30 м, внутренний диаметр 0.25 мм). Использовали следующий режим программирования температуры: 50°C в течение 3 мин; подъем температуры со скоростью 10°C/мин до 100°C; подъем температуры со скоростью 30°C/мин до 220°C, далее изотерма в течение 3 мин. Температура испарителя 250°C, переходной линии 260°C, постоянное давление 58.513 кПа, деление потока 1 : 80. Режим масс-спектрометра: электронная ионизация, 70 эВ, сканирование в диапазоне (29–350) а. е., 5 скан/с. Образец (0.2 мкл) вводили микрошприцом.

Из экспериментальных хроматограмм рассчитывали времена удерживания, коэффициенты селективности и критерии разделения.

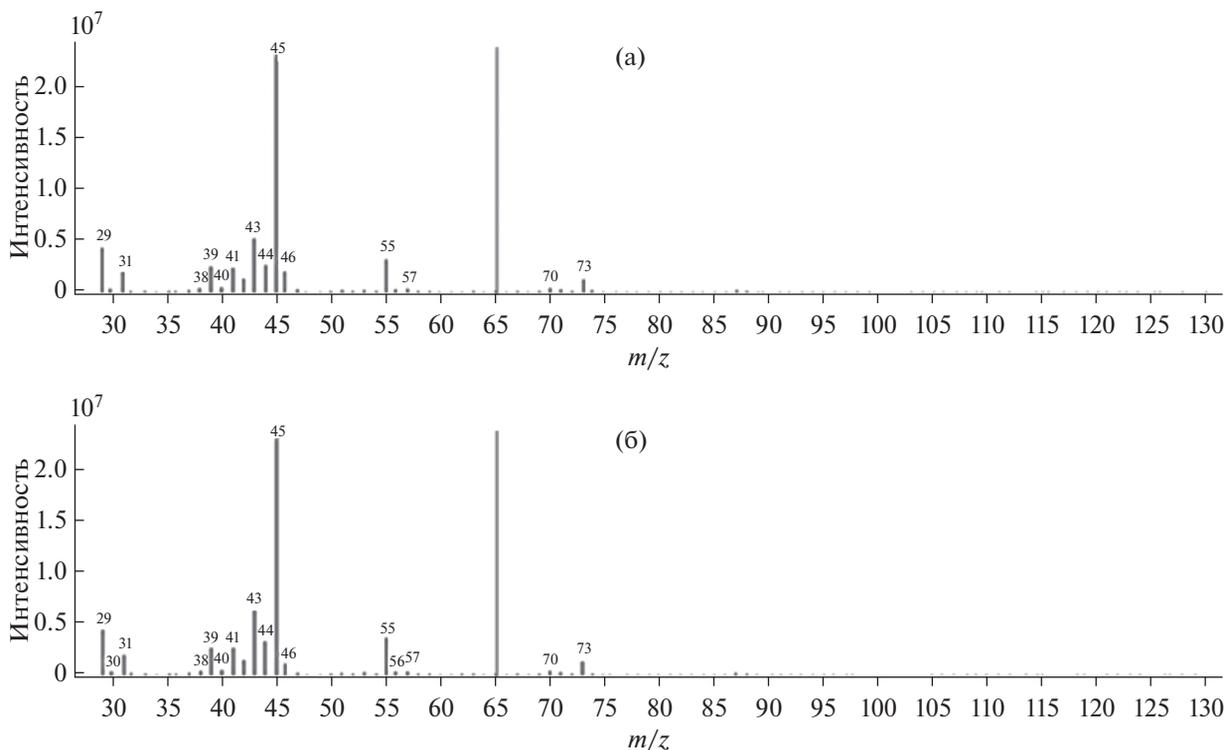


Рис. 1. Масс-спектры фрагментов, соответствующих пикам 1 (а) и 2 (б).

Коэффициент селективности энантиомеров рассчитывали по формуле:

$$\alpha = V_g^S / V_g^R \quad (1)$$

Здесь и ниже слабее удерживающийся энантиомер обозначен как R-энантиомер, сильнее удерживающийся – как S-энантиомер.

Для расчета критерия разделения  $R$  по причине неполного разделения пиков использовали критерий разделения  $K_2$ :

$$K_2 = (h_1 + h_2) / h_{\min} \quad (2)$$

где  $h_1$  и  $h_2$  – высоты первого и второго пиков соответственно,  $h_{\min}$  – минимум на кривой элюирования между пиками. В этом случае критерий разделения  $R$  рассчитывали из следующего соотношения:

$$K_2 = e^{4R^2} \quad (3)$$

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании адсорбции пентанола-2 на неподвижной фазе, модифицированной  $\alpha$ -NiSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O, происходит разделение рацемата на два пика. Газохроматографический с масс-спектрометрическим детектированием анализ показал, что помимо элюента в обеих пробах содержится только одно вещество (рис. 1). Расшиф-

ровка масс-спектров по характеристическим ионам как для первой, так и для второй фракции показала, что данным веществом является пентанол-2. Поляриметрический анализ показал, что для фракции, соответствующей первому пику на хроматограмме, угол вращения плоскости поляризованного света составил +0.11°, а в случае второй фракции –0.11°. Таким образом, очевидно, что два пика на хроматограмме иллюстрируют разделение энантиомеров пентанола-2, причем первый пик на хроматограмме соответствует R-пентанолу, а второй – S-пентанолу.

В табл. 1 приведены параметры разделения пентанола-2 элюированием смесью гептан–хлороформ в соотношении 80 : 20. Как видно, при варьировании скорости потока от 0.1 до 0.6 мл/мин фактор селективности меняется от 1.29 до 1.32. Следовательно, скорость потока не влияет на селективность разделения. Хроматограммы разделения приведены на рис. 2, 3.

Изучена зависимость коэффициента селективности и критерия разделения от концентрации рацемата (табл. 2). Показано, что данные величины растут с увеличением концентрации пентанола-2. При концентрации 3 мг/мл и ниже селективность пропадает и разделения не происходит. При концентрации 11.3 мг/мл наблюдается разделение с высоким коэффициентом селективности ( $\alpha = 1.36$ ), однако уменьшение площадей

**Таблица 1.** Значения времен удерживания  $t_R$  энантиомеров пентанола-2, а также критериев разделения  $K_2$ ,  $R$  и коэффициентов селективности  $\alpha$  на изучаемом адсорбенте при различных скоростях элюирования ( $c = 10$  мг/мл, объемное соотношение гептан–хлороформ 80 : 20)

Скорость потока, мл/мин	$t_R$ , мин		$\alpha$	$K_2$	$R$
	R	S			
0.1	53.51	69.25	1.29	3.29	0.55
0.15	36.01	46.32	1.29	3.48	0.56
0.2	27.04	35.66	1.32	4.5	0.61
0.3	18.18	23.63	1.30	3.14	0.53
0.4	13.69	17.76	1.30	3.66	0.57
0.5	11.24	14.64	1.30	3.81	0.58
0.6	7.82	10.35	1.32	2.7	0.50

пиков по сравнению с таковыми при концентрации 10 мг/мл свидетельствует о частичной необратимой адсорбции пентанола-2 на поверхности неподвижной фазы. Это явление подтверждает появление при увеличении элюирующей силы растворителя (увеличение объемной доли хлороформа с 20 до 30%) пиков адсорбированного пентанола-2 при анализе холостой пробы. При объемном соотношении гептан–хлороформ (80 : 20) в области концентраций от 3 до 10 мг/мл параметры удерживания, а также все характеристики разделения воспроизводятся.

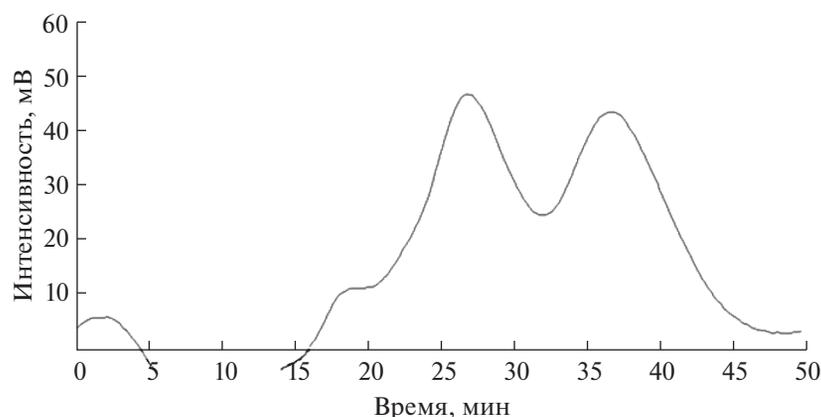
Отсутствие разделения рацемата при концентрациях 3 мг/мл и ниже обусловлено механизмом хирального разделения. Применяемые энантиомерные кристаллы состоят из ахиральных соединений. Хиральность таких кристаллов проявляется на надмолекулярном уровне. Механизм хирального разделения на кристаллах  $\alpha$ -NiSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O изучен нами ранее [20]. При хиральном разделении на

**Таблица 2.** Значения времен удерживания  $t_R$  энантиомеров пентанола-2, а также критериев разделения  $K_2$ ,  $R$  и коэффициентов селективности  $\alpha$  на изучаемом адсорбенте при различных концентрациях рацемата (скорость потока 0.5 мл/мин, объемное соотношение гептан–хлороформ 80 : 20)

Концентрация, мг/мл	$t_R$ , мин		$\alpha$	$K_2$	$R$
	R	S			
3	9.08	—	—	—	—
4	9.54	11.8	1.09	2.66	0.49
5	10.2	12.96	1.28	2.72	0.50
10	11.33	14.75	1.30	2.79	0.51
11.3	13.65	18.63	1.36	4.48	0.61

поверхности с надмолекулярной хиральностью распознавание возникает только при формировании адсорбированного слоя энантиомеров, что происходит только при достаточно больших концентрациях разделяемых веществ. При низких концентрациях аналитов молекулы адсорбируются на достаточно большом расстоянии друг от друга, что делает латеральные взаимодействия невозможными. Поверхность с надмолекулярной хиральностью неспособна распознавать отдельные молекулы энантиомеров. Это объясняет то, что при разделении рацемата пентанола-2 зафиксирована нижняя граница энантиоселективности.

Изучены параметры разделения при различных объемных соотношениях гептан–хлороформ. Скорость потока и концентрация пентанола-2 составляли 0.5 мл/мин и 10 мг/мл соответственно. Из табл. 3 видно, что при увеличении объемной доли хлороформа параметры разделе-



**Рис. 2.** Разделение пентанола-2. Концентрация 10 мг/мл, элюент гептан–хлороформ в соотношении 80 : 20, скорость потока 0.2 мл/мин ( $\alpha = 1.32$ ,  $R = 0.61$ ).

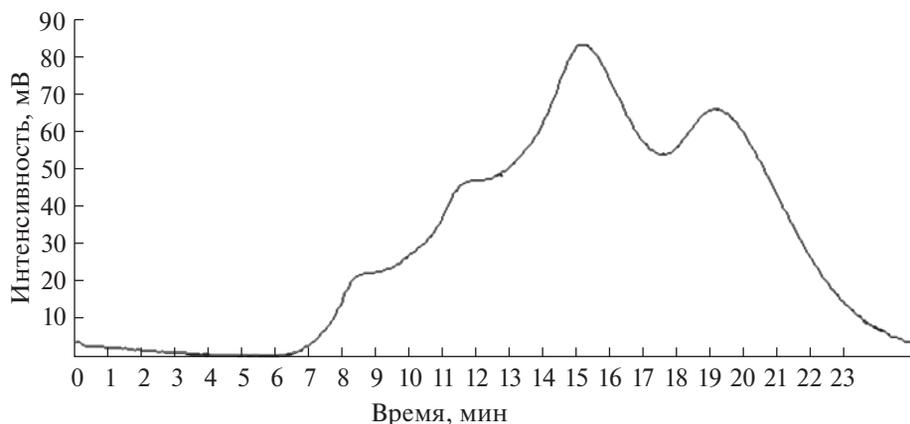


Рис. 3. Разделение пентанола-2. Концентрация 10 мг/мл, элюент гептан–хлороформ в соотношении 80 : 20, скорость потока 0.5 мл/мин ( $\alpha = 1.30$ ,  $R = 0.58$ ).

ния ухудшаются. Так, при объемном соотношении 80 : 20  $\alpha = 1.30$ ,  $R = 0.60$ , а при объемном соотношении 60 : 40 коэффициент селективности  $\alpha$  и критерий разделения  $R$  снижаются до 1.19 и 0.44 соответственно. При этом уменьшается и продолжительность анализа за счет возрастания элюирующей силы растворителя. Эффективность разделения варьировалась от 350 до 2000 тт/м.

Достигнутая энантиоселективность близка к таковой на другой полученной на основе созревания Виедмы неподвижной фазы для ВЭЖХ на основе 3,4,9,10-перилентетракарбоновой кислоты [21]. Полученные критерии разделения также отличаются незначительно. Однако преимуществом предлагаемой неподвижной фазы является возможность разделения больших концентраций рацемата в идентичных условиях.

Таким образом, на новой хиральной неподвижной фазе на основе энантиоморфных кристаллов  $\alpha$ -NiSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O достигнуто разделение рацемата пентанола-2 с максимальным фактором селективности 1.32. Разделение выполнено в об-

ласти высоких концентраций (от 4 до 10 мг/мл), что позволит в дальнейшем применять данную хиральную неподвижную фазу для полупрепаративного разделения рацематов.

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-73-10079).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pasteur L. Recherches sur les relations qui peuvent exister entre la forme cristalline, la composition chimique et le sens de la polarisation rotatoire // Ann. Chim. Phys. 1848. V. 24. P. 442.
2. Klyashchitskii B.A., Shvets V.I. Resolution of racemic alcohols into optical isomers // Russ. Chem. Rev. 1972. V. 41. № 7. P. 592.
3. Kondepudi D.K., Kaufman R.J., Singh N. Chiral symmetry breaking in sodium chlorate crystallization // Science. 1990. V. 250. P. 975.
4. Kondepudi D.K., Bullock K.L., Digits J.A., Yarborough P.D. Enantiomorphic symmetry breaking in crystallization of molten sodium chlorate // J. Am. Chem. Soc. 1995. V. 117. P. 401.
5. Kondepudi D.K., Nelson G.W. Chiral symmetrybreaking in nonequilibrium chemical-systems—time scales for chiral selection // Phys. Lett. A. 1984. V. 106. P. 203.
6. Kondepudi D.K., Nelson G.W. Weak neutral currents and the origin of biomolecular chirality // Nature. 1985. V. 314. P. 438.
7. Viedma C. Chiral symmetry breaking during crystallization: complete chiral purity induced by nonlinear autocatalysis and recycling // Phys. Rev. Lett. 2005. V. 94. № 6.
8. Kondepudi D.K., Digits J., Bullock K. Studies in chiral symmetry breaking crystallization I: The effects of stirring and evaporation rates // Chirality. 1995. V. 7. P. 62.
9. Frank F.C. On spontaneous asymmetric synthesis // Biochim. Biophys. Acta. 1953. V. 11. P. 459.
10. Noorduyn W.L., Meekes H., Bode A.A.C., Van Enckevort W.J.P., Kaptein B., Kellogg R.M., Vlieg E. Emergence of a single solid chiral state from a nearly ra-

Таблица 3. Значения времен удерживания  $t_R$  энантиомеров пентанола-2, а также критериев разделения  $R$  и коэффициентов селективности  $\alpha$  на изучаемом адсорбенте при различных объемных соотношениях гептан–хлороформ (скорость потока 0.5 мл/мин,  $c = 10$  мг/мл)

Соотношение гептан–хлороформ	$t_R$ , мин		$\alpha$	$K_2$	$R$
	R	S			
80 : 20	11.33	14.75	1.30	3.81	0.58
70 : 30	10.2	12.96	1.22	2.31	0.46
60 : 40	6.26	7.45	1.19	2.07	0.46

- chemic amino acid derivative // *Cryst. Growth Des.* 2008. V. 8. P. 1675.
11. *Viedma C., Cintas P.* Homochirality beyond grinding: deracemizing chiral crystals by temperature gradient under boiling // *Chem. Commun.* 2011. V. 47. P. 12786.
  12. *Sogutoglu L.-C., Steendam R.R.E, Meekes H., Vlieg E., Rutjes F.P.J.T.* Viedma ripening: A reliable crystallisation method to reach single chirality // *Chem. Soc. Rev.* 2015. V. 44. P. 6723.
  13. *Viedma C., McBride J.M., Kahr B., Cintas P.* Enantiomer-specific oriented attachment: formation of macroscopic homochiral crystal aggregates from a racemic system // *Angewandte Chemie.* 2013. V. 52. P. 10545.
  14. *Sivakumar R., Kwiatoszynski J., Fouret A., Nguyen T.P.T., Ramrup P., Cheung P.S.M., Cintas P., Viedma C., Cuccia L.A.* Directing the Viedma ripening of ethylenediammonium sulfate using "Tailor-made" chiral additives // *Crystal Growth and Design.* 2016. V. 16. P. 3573.
  15. *Sivakumar R., Askari M.S., Woo S., Madwar C., Ottenwaelder X., Bohle D.S., Cuccia L.A.* Homochiral crystal generation via sequential dehydration and Viedma ripening // *CrystEngComm.* 2016. V. 18. P. 4277.
  16. *Baglai I., Leeman M., Kellogg R.M., Noorduyn W.L.* A Viedma ripening route to an enantiopure building block for Levetiracetam and Brivaracetam // *Org. Biomol. Chem.* 2019. V. 17. P. 35.
  17. *Baglai I., Leeman M., Wurst K., Kaptein B., Kellogg R.M., Noorduyn W.L.* The Strecker reaction coupled to Viedma ripening: A simple route to highly hindered enantiomerically pure amino acids // *Chem. Commun.* 2018. V. 54. P. 10832.
  18. *Matsumoto A., Ozawa H., Inumaru A., Soai K.* Asymmetric induction by retergite, nickel sulfate hexahydrate, in conjunction with asymmetric autocatalysis // *New J. Chem.* 2015. V. 9. P. 6742.
  19. *Рудаков О.Б., Селеменев В.Ф.* Физико-химические системы сорбат-сорбент-элюент в жидкостной хроматографии. Воронеж: РИЦ ВГУ, 2003. С. 242.
  20. *Gus'kov V.Yu., Allayarova D.A., Garipova G.Z., Pavlova I.N.* Supramolecular chiral surface of nickel sulfate hexahydrate crystals and its ability to chirally recognize enantiomers by adsorption data // *New J. Chem.* 2020. V. 44. P. 17769.
  21. *Гуськов В.Ю., Гайнуллина Ю.Ю., Утеева Ж.Д., Мусабириев Д.Э.* Применение хиральной неподвижной фазы на основе 3,4,9,10-перилентетракарбонной кислоты для разделения энантиомеров в условиях газовой и жидкостной хроматографии // *Журн. аналит. химии.* 2020. Т. 75. С. 537.

УДК 543

## ПРОТОЧНОЕ ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ВО ВРАЩАЮЩЕЙСЯ СПИРАЛЬНОЙ КОЛОНКЕ ПРИ РАЗРАБОТКЕ СТАНДАРТНЫХ ОБРАЗЦОВ ПРИРОДНЫХ НАНОЧАСТИЦ

© 2021 г. М. С. Ермолин<sup>а</sup>, \*, А. И. Иванеев<sup>а</sup>, П. С. Федотов<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского Российской академии наук  
ул. Косыгина, 19, Москва, 119991 Россия

\*e-mail: ermolin@geokhi.ru

Поступила в редакцию 02.04.2021 г.

После доработки 15.04.2021 г.

Принята к публикации 21.04.2021 г.

Изучение свойств и состава природных наночастиц является важной проблемой аналитической химии. В настоящее время стандартные образцы природных наночастиц отсутствуют, что осложняет изучение роли наночастиц в тех или иных процессах, в том числе геохимических, а также делает практически невозможным сопоставление результатов, полученных разными исследователями. В данной работе наночастицы каолинита, монтмориллонита и мусковита изучены как потенциальные стандартные образцы природных наночастиц. Для выделения и характеристики минеральных наночастиц предложен комплекс аналитических методов, включающий проточное фракционирование частиц во вращающейся спиральной колонке, лазерную дифракцию, сканирующую электронную микроскопию, атомно-эмиссионную спектрометрию с индуктивно связанной плазмой. Показано, что согласно данным лазерной дифракции 93–98% выделенных частиц имеют размер от 40 до 300 нм, 2–7% частиц имеют размер до 830 нм. Размеры выделенных частиц подтверждены методом сканирующей электронной микроскопии. Исходя из содержания алюминия, оценена концентрация минеральных наночастиц в выделенных суспензиях. Изучена агрегационная устойчивость наночастиц в 5 мМ фосфатных буферных растворах при рН 6, 7 и 8. Показано, что наночастицы мусковита устойчивы при рН 7 и 8 в течение как минимум четырех недель, тогда как наночастицы монтмориллонита обладают схожей устойчивостью только при рН 8. Для наночастиц каолинита наблюдалась существенная агрегация при всех изучаемых значениях рН буферных растворов. Полученные экспериментальные результаты позволили уточнить проблемы и оценить перспективы разработки стандартных образцов природных наночастиц.

**Ключевые слова:** природные наночастицы, стандартные образцы, проточное фракционирование, вращающаяся спиральная колонка, агрегационная устойчивость.

**DOI:** 10.31857/S0044450221090048

Проблема исследования микрочастиц (частиц размером от 1 до 100 мкм) в наземных, воздушных и водных экосистемах давно привлекает внимание ученых [1], однако наночастицы размером 1–100 нм остаются малоизученными [2], что обусловлено рядом методологических сложностей, связанных с их идентификацией, выделением, характеристикой и анализом. При этом в силу уникальных свойств наночастиц, в том числе развитой поверхности, высокой реакционной способности, высокой проникающей способности в живые организмы и подвижности в окружающей среде, их поведение может существенно отличаться от поведения микрочастиц и заметно влиять на живые организмы, кинетику геохимических реакций и биогеохимические циклы в целом [3].

Наночастицы окружающей среды в зависимости от источника происхождения делят на три группы: синтетические (engineered nanoparticles), случайные (incidental nanoparticles) и природные (natural nanoparticles) [4–6]. Природные наночастицы образуются в результате естественных процессов, таких как вулканические извержения, процессы выветривания, пожары. Случайные (техногенные) наночастицы являются побочным продуктом жизнедеятельности человека; к ним, прежде всего, относят наночастицы выбросов промышленных предприятий и автомобилей. Стремительное развитие нанотехнологий неизбежно приводит к попаданию в окружающую среду синтетических наночастиц, намеренно созданных человеком для тех или иных целей. Водные системы и почвы являются основными ре-

зернуарами для синтетических наночастиц, попадающих в окружающую среду с бытовыми и технологическими стоками, а также атмосферными осадками.

Для оценки потенциального воздействия природных, случайных и синтетических наночастиц на окружающую среду можно сравнить их потоки в окружающей среде [5]. По оценкам, ежегодное поступление синтетических наночастиц в окружающую среду составляет порядка 0.3 млн тонн [7]. Ежегодный выброс случайных наночастиц в атмосферу оценивается примерно в 1–10 млн тонн [5]. Казалось бы, количества синтетических и случайных наночастиц, выбрасываемых в окружающую среду, весьма внушительны, однако эти значения значительно меньше по сравнению с вкладом природных наночастиц. Например, ежегодный вклад пылевых бурь и извержений вулканов в общее количество природных наночастиц составляет порядка 320 и 22 млн тонн соответственно [5, 6]. Наибольший вклад в общий поток природных наночастиц в окружающей среде вносят процессы выветривания почв. Глины считаются основным резервуаром природных наноматериалов, на их долю приходится порядка  $10^7$ – $10^8$  млн тонн наночастиц [5, 6]. Основными переносчиками силикатных наночастиц в окружающей среде являются грунтовые воды, реки, ледники, ветер и океанские течения. Реки ежегодно переносят порядка  $10^3$ – $10^4$  млн тонн природных наночастиц в Мировой океан [5, 6].

Таким образом, с одной стороны, рассматриваемая научная проблема носит фундаментальный биогеохимический характер с точки зрения, например, изучения транспорта химических элементов и веществ, связанных с наночастицами, как на региональном, так и глобальном уровне. С другой стороны, характеристика и анализ природных наночастиц является важной проблемой аналитической химии, обусловленной сложностью их выделения для последующего исследования [2]. В настоящее время в большей степени изучены поведение и транспорт в окружающей среде именно синтетических наночастиц, тогда как природные наночастицы незаслуженно остаются малоизученными. Одной из основных причин этого является отсутствие стандартных образцов природных наночастиц, что значительно осложняет процесс их изучения. Отсутствие стандартных образцов природных наночастиц также делает практически невозможным сопоставление результатов, полученных разными исследователями, и оценку их правильности.

В общем, можно выделить следующие основные этапы разработки стандартных образцов природных наночастиц:

- выбор и отбор природного образца;

- пробоподготовка и выделение наночастиц из полидисперсного природного образца;

- оценка агрегационной и химической устойчивости наночастиц;

- характеристика наночастиц.

В первую очередь, выбор стандартных образцов природных наночастиц должен основываться на потребностях исследователей в моделировании и изучении тех или иных природных процессов на наноразмерном уровне. Особый интерес представляют наночастицы, которых больше всего в окружающей среде. Таким образом, силикатные наночастицы, которые наиболее широко распространены в окружающей среде, могут в первую очередь рассматриваться как потенциальные стандартные образцы природных наночастиц. Как уже упомянуто выше, глины считаются основным резервуаром природных наночастиц [5]. Глинистые минералы являются одним из основных компонентов почв и широко распространены в водных экосистемах. Значительную часть поверхности суши Земли занимают пустыни, а пылевые бури являются основным источником природных наночастиц в окружающей среде [4]. Основным компонентом песка пустыни является кварц, поэтому пустыни можно рассматривать как резервуар природных наночастиц кварца.

Стандартные образцы природных наночастиц могут быть двух типов. Первый тип – наночастицы конкретных минералов, например каолинита, монтмориллонита, кварца. Такие наночастицы однородны с точки зрения их элементного состава и структуры. Второй тип – наночастицы сложных гетерогенных образцов (например, пустынные пески, вулканический пепел), которые содержат наночастицы различных минералов. Изучение и разработка стандартных образцов второго типа значительно сложнее, но также возможны. Например, ранее наночастицы вулканического пепла были успешно выделены, охарактеризованы и количественно проанализированы [8]. Кроме того, показано, что наночастицы вулканического пепла обладают высокой устойчивостью в водной среде [9].

Природные наночастицы нельзя синтезировать в лаборатории, поэтому важнейшим этапом разработки стандартных образцов природных наночастиц является их выделение из природных образцов. Выделение наночастиц осложняется их низким содержанием в полидисперсных природных образцах (порядка  $10^{-2}\%$  или менее) [10, 11]. Следовательно, методы разделения должны позволять работать с достаточно большим количеством полидисперсного природного образца. Следует отметить, что эффективность разделения также играет важную роль. Показано, что метод проточного фракционирования частиц во вращающейся спиральной колонке (ВСК) имеет пре-

имущества с точки зрения эффективности разделения по сравнению с мембранной фильтрацией и седиментацией [12]. Кроме того, показана возможность масштабирования процесса разделения в ВСК без снижения его эффективности [13], что очень важно для приготовления больших объемов суспензий наночастиц.

Самая важная проблема при разработке стандартных образцов (размера и состава) природных наночастиц – это их агрегационная и химическая устойчивость при хранении. Поскольку разделение наночастиц осуществляют в жидкой среде, получаемый продукт разделения представляет собой суспензию. Хранение наночастиц в сухом виде – более предпочтительный способ, исключающий воздействие дисперсионной среды на наночастицы. Возможно высушивание (например, лиофилизация) суспензии наночастиц, при этом важным аспектом является возвращение суспензии в исходное состояние после повторного диспергирования. Также частицы должны быть достаточно устойчивы после повторного диспергирования для проведения исследований. В этом случае ключевую роль играет агрегационная устойчивость наночастиц. Агрегация наночастиц сильно зависит от pH и ионной силы дисперсионной среды. Важно, чтобы стандартные образцы природных наночастиц хранились в условиях, близких к природным, например, без стабилизации сильными органическими поверхностно-активными веществами. После такой стабилизации изучать поведение наночастиц в условиях, близких к природным, не имеет смысла. Наночастицы – это метастабильные объекты, способные к различным химическим превращениям, в том числе к растворению. Таким образом, постоянство химического состава наночастиц также является важнейшим аспектом проблемы.

Характеризацию и анализ природных наночастиц необходимо проводить с использованием взаимодополняющих аналитических методов. В настоящее время существуют различные методы характеристики и анализа наночастиц: сканирующая/просвечивающая электронная микроскопия, динамическое светорассеяние, лазерная дифракция (или статическое светорассеяние), методы проточного фракционирования в поперечном силовом поле, атомно-эмиссионная и масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой. В целом характеристика и анализ природных наночастиц не является проблемой при условии получения устойчивых суспензий с достаточной концентрацией наночастиц.

Таким образом, разработка стандартных образцов природных наночастиц является насущной задачей аналитической химии. Цель настоящей работы – выделение минеральных наночастиц методом проточного фракционирования

частиц в ВСК, характеристика их размера и морфологии, а также оценка устойчивости наночастиц в водных средах. Исследование проведено на примере частиц каолинита, монтмориллонита и мусковита.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Образцы и реагенты.** Для выделения наночастиц использовали готовые порошки каолинита (КЛТ), монтмориллонита (ММТ) и мусковита (МСТ) из коллекции минералов Почвенного института им. В.В. Докучаева. Для приготовления фосфатных буферных растворов использовали следующие реагенты:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ( $\geq 99.0\%$ ) и  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  ( $\geq 99.0\%$ ). Деионизованную воду (18.2 МОм см, Millipore, Франция) использовали на всех этапах исследования.

**Выделение минеральных наночастиц из полидисперсных образцов.** Наночастицы выделяли из полидисперсных порошков минералов методом проточного фракционирования частиц в ВСК [10, 11]. Перед процедурой разделения готовили суспензии минералов, содержащие 0.1 г минерала и 10 мл фосфатного буферного раствора (5 мМ). Для каждого образца минерала готовили три суспензии при pH 6.0, 7.0 и 8.0. После этого приготовленные суспензии обрабатывали в ультразвуковой ванне Bandelin Sonorex DT 52 в течение 10 мин.

Суспензии вводили в ВСК, предварительно заполненную жидкостью-носителем. В качестве жидкости-носителя использовали фосфатный буферный раствор со значением pH, соответствующим pH разделяемой суспензии. Выделение наночастиц проводили при скорости вращения 800 об/мин и скорости потока жидкости-носителя 0.3 мл/мин. Элюирование частиц контролировали на выходе из ВСК при помощи спектрофотометра Thermo Scientific GENESYS 10S UV-Vis при длине волны 254 нм. В ходе фракционирования выделяли 20 мл суспензии минеральных наночастиц.

**Оценка размера и морфологии минеральных наночастиц.** Распределение минеральных наночастиц по размерам в суспензиях изучали методом лазерной дифракцией (ЛД) на приборе Shimadzu SALD-7500nano сразу после фракционирования, чтобы избежать агрегирования. Размер и морфологию выделенных наночастиц также изучали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ, Tescan Mira LMU).

**Оценку агрегационной устойчивости минеральных наночастиц** осуществляли путем измерения их размерного распределения методом ЛД в течение 28 дней. В ходе оценки долгосрочной агрегационной устойчивости наночастиц суспензии хранили в темноте при 4°C. Перед каждым изме-

рением суспензии обрабатывали в ультразвуковой ванне в течение 10 мин.

**Оценка концентрации минеральных наночастиц в суспензиях.** Для оценки концентрации минеральных наночастиц в выделенных суспензиях определяли алюминий методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмы (АЭС-ИСП, Thermo Scientific iCAP 6500 Duo) после кислотного разложения суспензий. Подробно процедура разложения и анализа минеральных частиц описана в работе [14].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Размерное распределение минеральных наночастиц.** Размерные распределения наночастиц КЛТ, ММТ и МСТ представлены на рис. 1. Наночастицы КЛТ имеют бимодальное размерное распределение с максимумами при 160 и 550 нм. Первая популяция частиц имеет размер в диапазоне от 45 до 300 нм, а вторая — от 460 до 830 нм. Необходимо отметить, что содержание частиц во второй популяции незначительно и варьируется в диапазоне от 1.5 до 6.3%. Выявлено влияние рН на размерное распределение наночастиц КЛТ. Согласно данным ЛД, содержание частиц во второй популяции (460–830 нм) уменьшается с увеличением рН. Кроме того, с увеличением рН увеличивается содержание частиц размером <100 нм. Наблюдаемый эффект можно объяснить стабилизацией наночастиц КЛТ при повышении рН. Однако данный эффект незначителен и может быть также отнесен к погрешностям измерений.

Наночастицы ММТ имеют бимодальное размерное распределение, которое включает две популяции частиц размером 40–300 и 460–830 нм. Содержание частиц во второй популяции варьируется в диапазоне от 2.8 до 6.5%. Следует отметить, что при рН 7 профиль распределения первой популяции (40–300 нм) имеет плечо на правом склоне, что можно отнести к погрешностям измерений. В целом существенного влияния рН на размерное распределение наночастиц ММТ не выявлено.

Согласно данным ЛД, размерное распределение наночастиц МСТ имеет диапазон от 60 до 300 нм с максимумом порядка 90–110 нм (в зависимости от рН). Необходимо отметить, что при рН 6 и 8 также наблюдали вторую популяцию частиц МСТ размером 520–660 нм, однако содержание этих частиц незначительно и составляет всего 0.02% при рН 6 и 0.44% при рН 8.

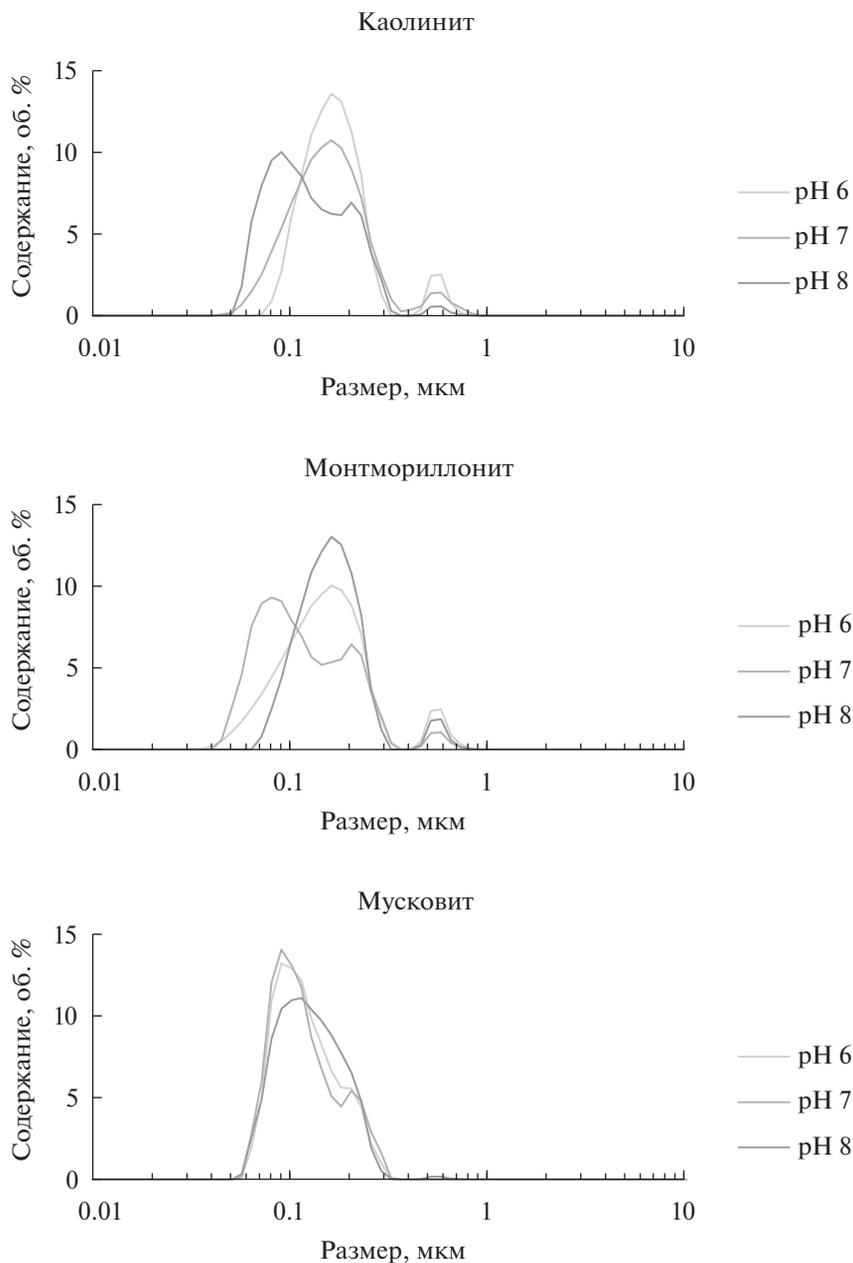
Таким образом, показано, что размерные распределения наночастиц КЛТ, ММТ и МСТ схожи и главным образом (не менее чем на 93.5%) состоят из частиц размером <300 нм. Частицы размером >300 нм также присутствуют в выделенных суспензиях минеральных наночастиц при раз-

личных рН, однако их содержание, как правило, невелико (менее 6.5%), а в случае МСТ и вовсе незначительно (менее 0.44%). Значительного влияния рН на размерное распределение выделенных минеральных наночастиц не выявлено. Важно отметить, что в основе метода ЛД лежит допущение о сферичности измеряемых частиц. Природные наночастицы редко имеют сферическую форму, поэтому возможны погрешности измерения размеров. Следовательно, необходима характеристика морфологии выделяемых наночастиц методом сканирующей электронной микроскопии.

**Морфология минеральных наночастиц.** Микрофотографии наночастиц каолинита, монтмориллонита и мусковита представлены на рис. 2. Как видно, большинство наночастиц КЛТ имеют размер порядка 100–300 нм, при этом также присутствуют частицы размером около 50 и 500 нм. Наночастицы ММТ имеют размер в диапазоне от 60 до 200 нм; кроме того, обнаружены частицы ММТ размером порядка 500 нм. Размер наночастиц МСТ варьируется приблизительно от 50 до 300 нм, при этом большинство наночастиц МСТ имеют размер около 100 нм. В целом микрофотографии наночастиц минералов хорошо согласуются с соответствующими распределениями по размерам. Что касается морфологии наночастиц, наночастицы КЛТ имеют пластинчатую форму. Напротив, наночастицы ММТ и МСТ имеют псевдосферическую форму.

**Агрегационная устойчивость минеральных наночастиц.** Устойчивость минеральных наночастиц изучали в приближенных к естественным условиях, а именно, при рН и ионной силе дисперсионной среды, соответствующим поверхностным водам. Как правило, рН поверхностных вод колеблется в диапазоне от 6.0 до 8.5, а ионная сила составляет порядка 1–5 мМ. Агрегационную устойчивость минеральных наночастиц оценивали в 5 мМ фосфатных буферных растворах при рН 6.0, 7.0 и 8.0.

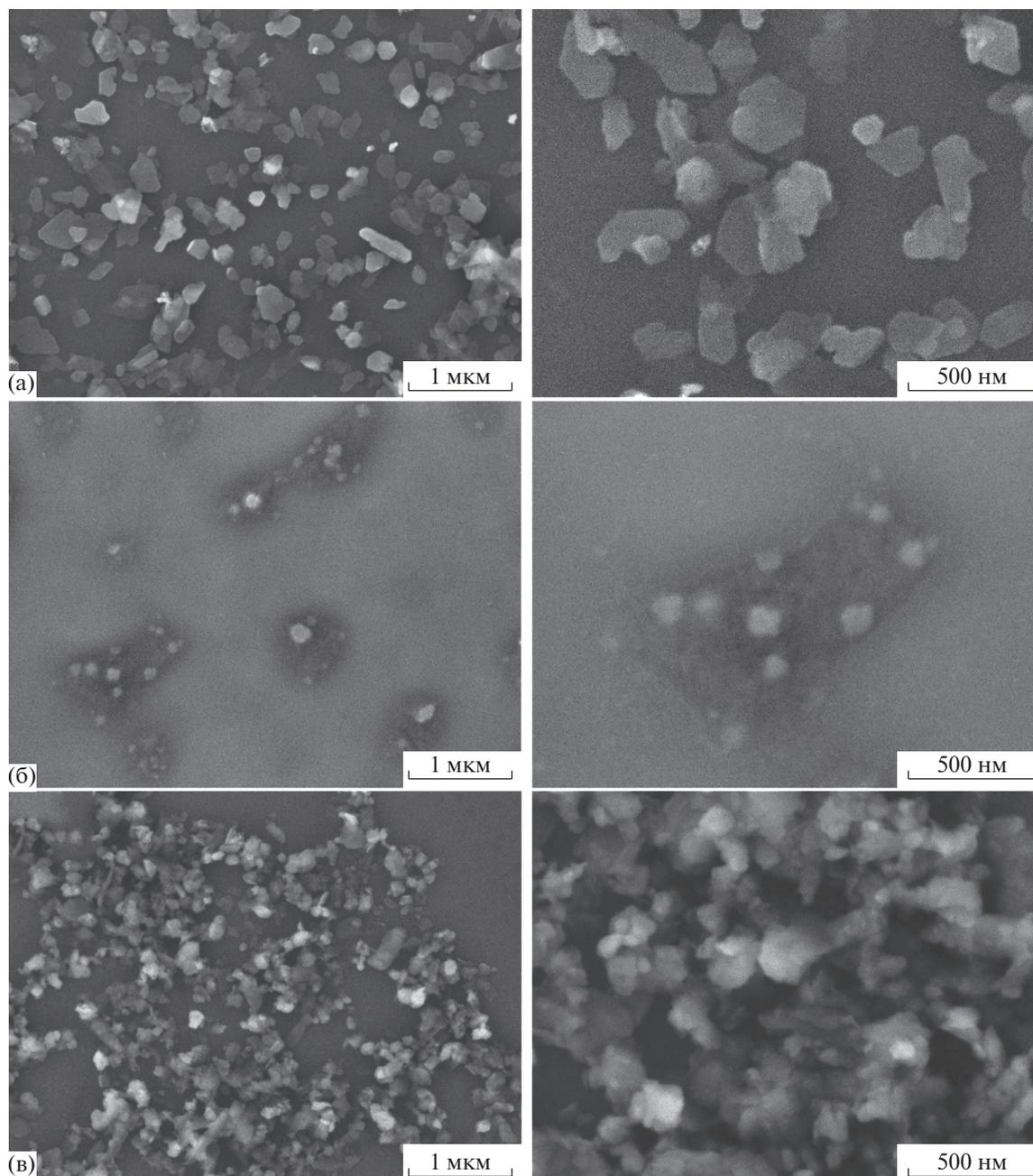
Устойчивость минеральных наночастиц оценивали путем измерения размерного распределения методом ЛД в течение четырех недель. Для упрощения и удобства сравнения результатов гранулометрического анализа суспензий наночастиц размерные распределения были преобразованы, а именно разделены на три размерных диапазона (<0.3, 0.3–1.0 и >1 мкм). Таким образом, сравнивали содержания минеральных наночастиц в каждом размерном диапазоне. Преобразованные (разделенные на три размерных диапазона) размерные распределения наночастиц КЛТ, ММТ и МСТ представлены на рис. 3. Показано, что наночастицы КЛТ агрегируют при хранении, при этом агрегация значительно зависит от рН фосфатного буферного раствора (рис. 3а). Уста-



**Рис. 1.** Размерное распределение наночастиц каолинита, монтмориллонита и мусковита, выделенных методом точного фракционирования частиц во вращающейся спиральной колонке.

новлено, что агрегационная устойчивость наночастиц КЛТ увеличивается с увеличением pH дисперсионной среды. При pH 8 за четыре недели хранения суспензии содержание наночастиц КЛТ размером  $<0.3$  мкм снизилось примерно на 10%, при этом содержание частиц (агрегатов) размером  $>1$  мкм увеличилось также на 10%; изменение содержания частиц размером  $0.3$ – $1.0$  мкм в течение хранения было незначительным. При pH 7 содержание наночастиц КЛТ ( $<0.3$  мкм) снизилось за четыре недели хранения приблизительно на 18–27%, при этом содержание микрон-

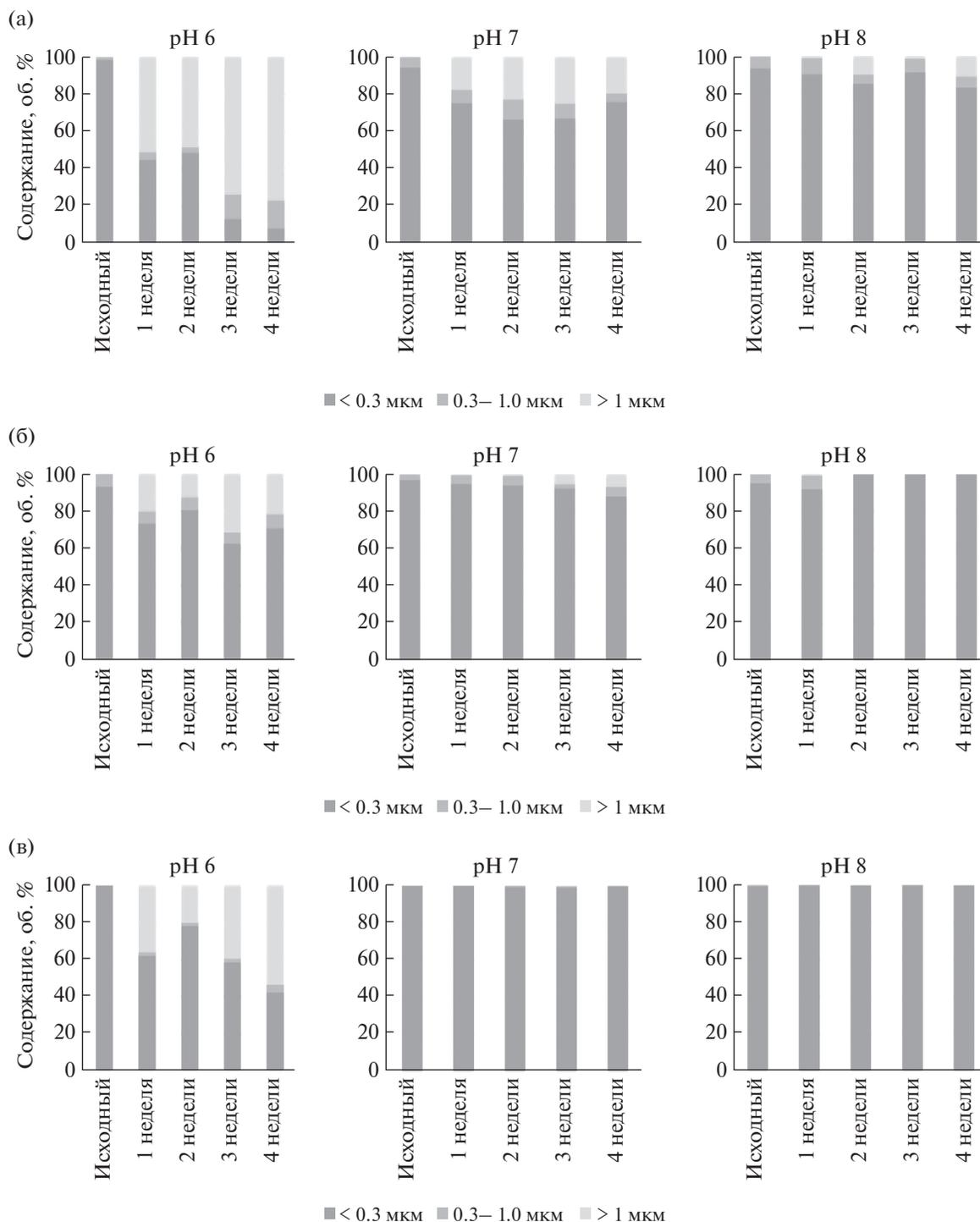
ных агрегатов ( $>1$  мкм) увеличилось приблизительно на 19–25%. Также наблюдалось незначительное увеличение содержания частиц размером  $0.3$ – $1.0$  мкм. Продемонстрировано, что наночастицы КЛТ неустойчивы в 5 мМ фосфатном буферном растворе при pH 6. После четырех недель хранения содержание наночастиц КЛТ ( $<0.3$  мкм) снизилось с 99 до 8%, а содержание частиц КЛТ размером  $0.3$ – $1.0$  мкм увеличилась с 1.5 до 15%. Содержание микронных агрегатов ( $>1$  мкм) при этом после четырех недель хранения составило 77%.



**Рис. 2.** Микрофотографии наночастиц каолинита (а), монтмориллонита (б) и мусковита (в), выделенных методом проточного фракционирования частиц во вращающейся спиральной колонке.

Наночастицы ММТ и МСТ продемонстрировали схожую агрегационную устойчивость при долгосрочном хранении. Показано, что устойчивость частиц ММТ и МСТ увеличивается с увеличением pH дисперсионной среды (рис. 3б, 3в). При pH 6 после четырех недель хранения содержание наночастиц (<0.3 мкм) в суспензиях снизилось с 93 до 71% для ММТ и со 100 до 42% для МСТ. Содержание субмикронных частиц (0.3–1.0 мкм) при этом изменилось незначительно; хранение в основном приводило к образованию

агрегатов микронного размера. При pH 7 наблюдали незначительную агрегацию наночастиц ММТ; агрегаты микронного размера (6.5%) появились после четырех недель хранения. Установлено, что при pH 8 наночастицы ММТ обладают высокой агрегационной устойчивостью, в то время как наночастицы МСТ устойчивы при pH 7 и 8. Продemonстрировано, что размерное распределение наночастиц ММТ (pH 8) и МСТ (pH 7 и 8) сохранялось в течение четырех недель хранения суспензий. Наблюдаемые незначитель-



**Рис. 3.** Преобразованные размерные распределения наночастиц каолинита (а), монтмориллонита (б) и мусковита (в), полученные в течение четырех недель хранения суспензий.

ные колебания доли субмикронных частиц (0.3–1.0 мкм) вероятнее всего вызваны погрешностями измерений методом ЛД.

Таким образом, показано, что агрегационная устойчивость наночастиц КЛТ, ММТ и МСТ зависит от рН дисперсионной среды. Устойчивость

наночастиц повышается с увеличением рН. Наночастицы МСТ при рН 7 и 8, а также наночастицы ММТ при рН 8 продемонстрировали высокую агрегационную устойчивость и оставались стабильными в течение как минимум четырех недель. Агрегационная устойчивость исследуемых

минеральных наночастиц возрастает в следующем порядке: каолинит < монтмориллонит < мусковит.

**Концентрация наночастиц в выделенных суспензиях.** Концентрацию наночастиц КЛТ, ММТ и МСТ в анализируемых суспензиях можно оценить по концентрации алюминия. Установлено, что содержание алюминия в выделенных суспензиях КЛТ, ММТ и МСТ составило  $7.3 \pm 0.1$ ,  $66.3 \pm 1.7$ ,  $11.3 \pm 0.4$  мг/л соответственно. Согласно минеральному составу, содержание алюминия в КЛТ, ММТ и МСТ составляет около 20%, поэтому концентрация минеральных наночастиц в разделенных суспензиях может составлять около 37, 332 и 57 мг/л соответственно. Следует отметить, что концентрацию наночастиц можно увеличить за счет увеличения массы разделяемого образца. В данной работе наночастицы выделяли из 0.1 г полидисперсных образцов минералов. Масса разделяемого образца для аналитической ВСК (объемом 20–25 мл) может быть увеличена до 1 г, что позволит получить более концентрированные суспензии. Необходимо отметить, что увеличение концентрации частиц также может повлиять на их устойчивость.

\* \* \*

Создание стандартных образцов природных наночастиц является насущной потребностью современной аналитической химии окружающей среды. В настоящей работе наночастицы каолинита, монтмориллонита и мусковита изучены в качестве потенциальных стандартных образцов природных наночастиц. Минеральные наночастицы успешно выделены, охарактеризованы и проанализированы. Особое внимание уделено агрегационной устойчивости наночастиц, поскольку хранение стандартных образцов природных наночастиц является важной проблемой. Показано, что наночастицы мусковита устойчивы в 5 мМ фосфатном буферном растворе при pH 7 и 8 в течение как минимум четырех недель. Для наночастиц монтмориллонита такая же устойчивость наблюдается только при pH 8. Выявлено, что наночастицы каолинита в значительной степени агрегируют при pH 6, 7 и 8. В целом устойчивость наночастиц монтмориллонита и мусковита в течение четырех недель является многообещающим результатом. Однако оценка устойчивости в течение более длительного периода (например, в течение нескольких месяцев) требует дополнительных исследований. Кроме этого, важное значение имеет изучение возможности высушивания суспензий природных наночастиц и повторного диспергирования с сохранением исходных свойств частиц (например, размерного распределения). Исследования в этой области будут в дальнейшем продолжены.

*Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 20-73-00299). Авторы искренне благодарны Ольге Борисовне Роговой (Почвенный институт им. В.В. Докучаева, Москва) за предоставление образцов минералов, а также Василию Константиновичу Карандашеву (Институт проблем технологии микроэлектроники и особо чистых материалов РАН, Черноголовка) за разложение и анализ суспензий наночастиц. Исследование соответствует теме № 0116-2019-0010 ГЕОХИ РАН.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Buffle J., van Leeuwen H.P.* Environmental Particles. Boca Raton: CRC Press, 1992. 576 p.
2. *Ermolin M.S., Fedotov P.S.* Separation and characterization of environmental nano- and submicron particles // *Rev. Anal. Chem.* 2016. V. 35. № 4. P. 185.
3. *Wang Y.* Nanogeochemistry: Nanostructures, emergent properties and their control on geochemical reactions and mass transfers // *Chem. Geol.* 2014. V. 378–379. № 1. P. 1.
4. *Buzea C., Pacheco I.I., Robbie K.* Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity // *Biointerphases.* 2007. V. 2. № 4. P. MR17.
5. *Hochella M.F., Mogk D.W., Ranville J., Allen I.C., Luther G.W., Marr L.C., McGrail B.P., Murayama M., Qafoku N.P., Rosso K.M., Sahai N., Schroeder P.A., Vikesland P., Westerhoff P., Yang Y.* Natural, incidental, and engineered nanomaterials and their impacts on the Earth system // *Science.* V. 363. № 6434. P. 1414.
6. *Hochella M.F., Aruguete D., Kim B., Madden A.S.* Naturally occurring inorganic nanoparticles: General assessment and a global budget for one of earth's last unexplored major geochemical components // *Nat. Nanostruct.* 2012. P. 1.
7. *Keller A.A., Lazareva A.* Predicted releases of engineered nanomaterials: From global to regional to local // *Environ. Sci. Technol. Lett.* 2013. V. 1. № 1. P. 65.
8. *Ermolin M.S., Fedotov P.S., Malik N.A., Karandashev V.K.* Nanoparticles of volcanic ash as a carrier for toxic elements on the global scale // *Chemosphere.* 2018. V. 200. P. 16.
9. *Ermolin M.S., Dzherayan T.G., Vanifatova N.G.* Stability of volcanic nanoparticles using combined capillary zone electrophoresis and laser diffraction // *Environ. Chem. Lett.* 2021. V. 19. № 1. P. 751.
10. *Ермолин М.С., Федотов П.С., Иванеев А.И., Карандашев В.К., Федюнина Н.Н., Ескина В.В.* Выделение и количественный анализ наночастиц дорожной пыли // *Журн. аналит. химии.* 2017. Т. 72. № 5. С. 448. (*Ermolin M.S., Fedotov P.S., Ivaneev A.I., Karandashev V.K., Fedyunina N.N., Eskina V.V.* Isolation and quantitative analysis of road dust nanoparticles // *J. Anal. Chem.* 2017. V. 72. № 5. P. 520.)
11. *Ермолин М.С., Федотов П.С., Карандашев В.К., Шкинев В.М.* Методология выделения и элементного анализа наночастиц вулканического пепла // *Журн. аналит. химии.* 2017. Т. 72. № 5. С. 462. (*Ermolin M.S., Fedotov P.S., Karandashev V.K., Shkinev V.M.* Methodology for separation and elemental analysis of

- volcanic ash nanoparticles // *J. Anal. Chem.* 2017. V. 72. № 5. P. 533.)
12. *Ivaneev A.I., Faucher S., Ermolin M.S., Karandashev V.K., Fedotov P.S., Lespes G.* Separation of nanoparticles from polydisperse environmental samples: comparative study of filtration, sedimentation, and coiled tube field-flow fractionation // *Anal. Bioanal. Chem.* 2019. V. 411. № 30. P. 8011.
  13. *Fedotov P.S., Ermolin M.S., Katasonova O.N.* Field-flow fractionation of nano- and microparticles in rotating coiled columns // *J. Chromatogr. A.* 2015. V. 1381. P. 202.
  14. *Ivaneev A.I., Faucher S., Fedyunina N.N., Karandashev V.K., Ermolin M.S., Fedotov P.S., Lespes G.* Reliability of the direct ICP-MS analysis of volcanic ash nanoparticles // *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 2019. V. 99. № 4. P. 369.

УДК 543:556.11

## ЭКСТРАКЦИОННОЕ ВЫМОРАЖИВАНИЕ С ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕМ – НОВАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ПРОБОПОДГОТОВКИ В ХИМИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ НА ПРИМЕРЕ ОРГАНИЧЕСКИХ ОСНОВАНИЙ

© 2021 г. В. Н. Бехтерев<sup>a, b, \*</sup>

<sup>a</sup>Сочинский государственный университет, инженерно-экологический факультет  
ул. Пластунская, 94, Сочи, 354000 Россия

<sup>b</sup>Научно-исследовательский центр курортологии и реабилитации, филиал “Северо-Кавказского федерального научно-клинического центра Федерального медико-биологического агентства”  
ул. Несебрская, 22, Сочи, 354000 Россия

\*e-mail: vic-bekhterev@yandex.ru

Поступила в редакцию 24.03.2021 г.

После доработки 21.04.2021 г.

Принята к публикации 21.04.2021 г.

Изучено влияние pH на эффективность извлечения органических оснований и линдана из водных растворов экстракционным вымораживанием в ацетонитрил в условиях центрифугирования. Продемонстрированы технологические возможности и преимущества такого способа пробоподготовки при определении органических веществ в водосодержащих средах. В комбинации с газовой хроматографией одностадийное экстракционное вымораживание в режиме центрифугирования пробы обеспечивает минимальные пределы обнаружения в 10 мл питьевой воды, мг/л: анилина 0.1, дифениламина 0.05, кофеина 0.015 и линдана 0.001. Разработанная технология экстракции проста и выполняется в одну стадию. Продолжительность пробоподготовки не превышает 30 мин, расход экстрагента менее 1 мл.

**Ключевые слова:** анилин, дифениламин, линдан, экстракционное вымораживание, одностадийная пробоподготовка, криоэкстрактор, водные и биологические объекты.

DOI: 10.31857/S0044450221090024

Несмотря на очевидный прогресс в развитии инструментальных методов анализа, определение растворенных органических соединений в водных средах часто связано с необходимостью использования предварительной сепарации и концентрирования. Это особенно актуально в случае низких концентраций растворенных полярных ионогенных веществ. Традиционные жидкостная, твердофазная и газовая экстракция, а также их различные варианты [1–4] основаны на принципе извлечения целевых веществ из одной фазы в другую через границу раздела. Все перечисленные выше способы экстракции предполагают контакт несмешивающихся водной фазы и экстрагента, в качестве которого могут быть использованы нерастворимая в воде органическая жидкость, сорбент или газ. Предложенный в 2005 г. метод экстракционного вымораживания (ЭВ) основан на другом подходе [5, 6]. В данном способе экстракция сочетается с вымораживанием: происходит низкотемпературное извлечение целевых компонентов за счет распределения растворенных веществ между жидкой фазой (предварительно до-

бавленный незамерзающий водорастворимый растворитель) и образующейся во время замораживания твердой фазой льда. Граница раздела фаз появляется в исходно гомогенной смеси экстрагента с водным раствором в результате охлаждения, когда образуется лед. Экстракционное вымораживание в режиме воздействия поля центробежных сил (ЭВЦ) позволяет значительно увеличить степень концентрирования аналитов в экстракте, упростить процедуру, сократить продолжительность этапа пробоподготовки и материальные затраты [7–9].

Способ ЭВЦ позволяет применять гидрофильные, водорастворимые экстрагенты без дополнительной химической модификации пробы (без высаливания). В отличие от твердофазной и жидкостной экстракции, он дает возможность напрямую без каких-либо дополнительных операций (без фильтрования) извлекать целевые вещества из сильно загрязненных дисперсных систем. Получаемые экстракты практически не содержат воды и могут быть сразу проанализированы методом газовой хроматографии. За счет значительно-

го снижения химического фона эндогенных соэкстрагирующихся веществ при ЭВЦ-подготовке биологических проб улучшаются условия газохроматографической (ГХ) с масс-спектрометрическим детектированием идентификации и уменьшается загрязнение МС-детектора. Метод способствует улучшению условий труда, так как наряду с минимизацией количества реактивов значительно уменьшается летучесть растворителей и аналитов. Достоинства способа ЭВЦ иллюстрируют разработанные схемы анализа и методики определения ряда органических соединений в биологических и иных объектах [5–16].

К настоящему времени на основе экспериментальных результатов созданы теоретические основы метода. Предложенная модель базируется на подобию процессов ЭВ и адсорбции [6, 10]. Предполагается, что при охлаждении смеси водного раствора с экстрагентом молекулы аналита выталкиваются на поверхность образующихся кристаллов воды и десорбируются в объем незамерзающей органической жидкой фазы экстрагента. Одновременно протекает и обратный процесс: молекулы аналита сорбируются поверхностью кристаллов льда.

Линейная зависимость концентрации аналита  $c_{\text{орг}}$  в экстракте от величины  $m_o/V_{\text{экстр}}$ , где  $m_o$  – масса аналита в исходной пробе, а  $V_{\text{экстр}}$  – объем экстрагента, которую предполагает модель экстракции с ЭВ, подтверждена большим массивом экспериментальных результатов [6, 9, 10, 14, 16]. Угловой коэффициент  $*K_{\text{равн}}$  этой зависимости фактически является индивидуальным адсорбционным параметром аналита, зависящим от его физико-химических свойств и природы экстрагента. Величина  $*K_{\text{равн}}$  характеризует эффективность извлечения аналита и по сути является коэффициентом распределения аналита между незамерзающим экстрагентом (жидкая фаза) и поверхностью льда (твердая фаза), поскольку пропорционален константе адсорбционно-десорбционного равновесия  $K_{\text{равн}}$ . Эту величину используют для характеристики эффективности ЭВЦ.

Установлено, например, что в гомологическом ряду одноосновных карбоновых кислот  $C_2$ – $C_8$  коэффициент распределения  $*K_{\text{равн}}$  растет с увеличением длины молекулы кислоты [9, 16] и с увеличением гидрофобности аналита подобно известной для них зависимости Ганча–Лео. Существенному возрастанию  $*K_{\text{равн}}$ , а следовательно, и повышению эффективности экстракции способствует также проведение процесса в условиях действия поля центробежных сил [7–9]. Показано, что при использовании ацетонитрила в качестве экстрагента величина  $*K_{\text{равн}}$  практически равна степени извлечения  $R$  ( $R = m_{\text{экстр}}/m_o$ , где  $m_{\text{экстр}}$  – это масса аналита в экстракте), по-

скольку содержание воды в экстракте не превышает 4% [9, 14, 17]. Одноосновные карбоновые кислоты  $C_4$ – $C_8$  извлекаются из водного раствора полностью даже при соотношении объемов воды и ацетонитрила 10 : 0.4 [9].

Управление избирательностью (селективностью) метода ЭВ основано на выборе экстрагента [16] и условий осуществления процедуры, например pH [14, 16].

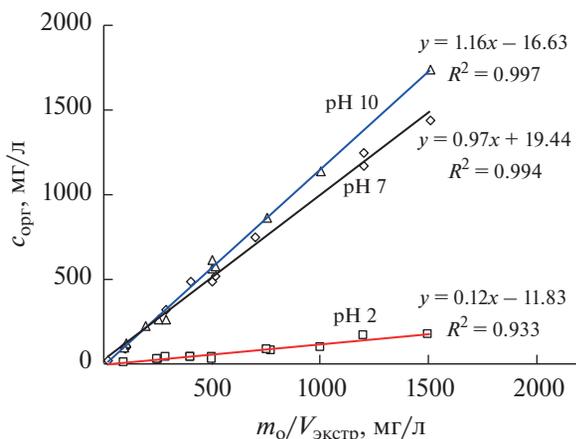
В настоящей работе изучено влияние pH на эффективность ЭВ некоторых органических оснований, а также линдана, из водных растворов в режиме действия центробежных сил (ЭВЦ). Исследование корреляций и установление закономерностей экстракции актуально для выявления возможностей технологии и оптимизации процедуры пробоподготовки. Это важно также для прогнозирования поведения экстракционных систем расчетными методами.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

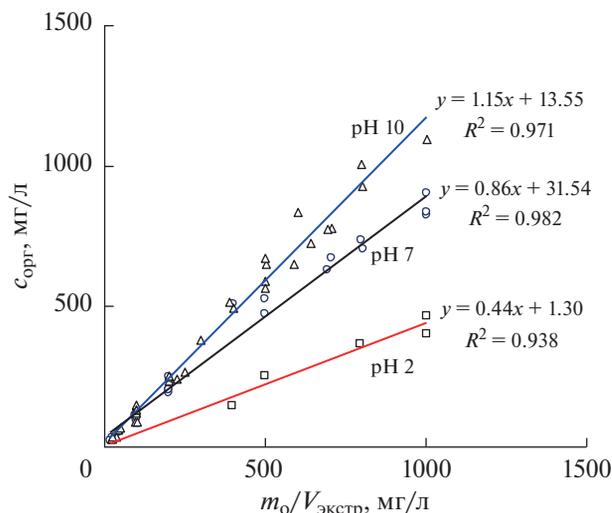
**Реагенты.** Использовали анилин (ХромЛаб, Россия), дифениламин (ЛенРеактив, Россия), линдан (гамма-1,2,3,4,5,6-гексахлорциклогексан) (ОПТИМУМ, Россия), ацетонитрил марки “Сорт 0” (ООО “НПК Криохром”, Россия). Все применяемые реактивы были аналитической чистоты.

**Аппаратура.** Для приготовления модельных и стандартных растворов органических веществ, определения массы получаемого экстракта использовали аналитические весы ЛВ-210-А (ЗАО “Сартогосм”, С.-Петербург, Россия) с погрешностью взвешивания, не превышающей 0.5 мг. Получаемые экстракты и стандартные смеси исследовали методом газовой хроматографии на хроматографах “Кристаллокс-4000М” с термоионным (ГХ-ТИД), пламенно-ионизационным (ГХ-ПИД) и электронно-захватным (ГХ-ЭЗД) детекторами отечественного производства и капиллярной колонкой ZB-5 длиной 30 м, внутренним диаметром 0.32 мм (Phenomenex, США).

**Методика эксперимента.** Процедура проведения экстракционного вымораживания в условиях одновременного центрифугирования детально описана в работах [7–9]. Исследуемые образцы модельных водных растворов аналитов готовили добавлением к определенному объему воды в стеклянной вials емк. 12 мл при заданном значении pH необходимого количества стандартного раствора аналита в ацетонитриле. Затем добавляли требуемое количество ацетонитрила, используемого в качестве экстрагента. Объем растворителя, вносимый со стандартным раствором аналита, учитывали в расчетах при обработке результатов ЭВЦ. Регулировали pH добавлением растворов серной кислоты и гидроксида натрия.



**Рис. 1.** Зависимость концентрации анилина в экстракте  $c_{орг}$  от его исходной массы  $m_0$  в воде и объема ацетонитрила  $V_{экстр}$  в результате экстракционного вымораживания в режиме воздействия поля центробежных сил при разных значениях pH. Мольная доля ацетонитрила в воде 0.027.



**Рис. 2.** Зависимость концентрации дифениламина в экстракте  $c_{орг}$  от его исходной массы  $m_0$  в воде и объема ацетонитрила  $V_{экстр}$  в результате экстракционного вымораживания в режиме воздействия поля центробежных сил при разных значениях pH. Мольная доля ацетонитрила в воде 0.027.

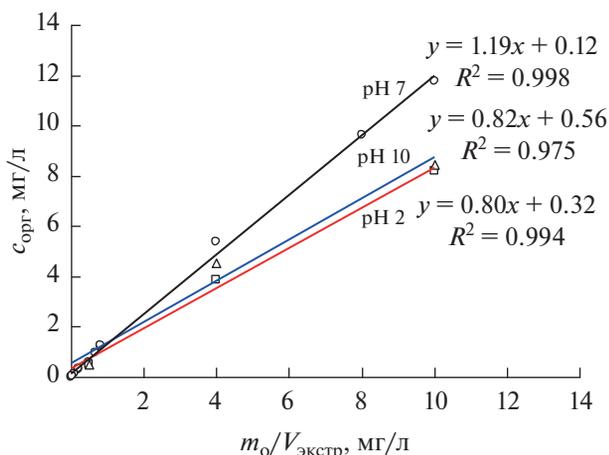
Флакн герметично закрывали завинчивающейся пробкой. Перемешивали и помещали в ротор криоэкстрактора ЭВЦ-2 (ООО «НПФ «Метахром», Россия) для вымораживания водной части образца. Условия проведения процедуры ЭВЦ: температура минус  $29 \pm 2^\circ\text{C}$ , скорость вращения ротора 4000 об/мин (центробежное ускорение 1650 g), продолжительность процедуры 25 мин. После этапа ЭВЦ верхний, жидкий ацетонитрильный слой отделяли декантацией, взвешивали и подвергали ГХ-анализу.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее на примере одноосновных карбоновых кислот  $\text{C}_2\text{--C}_8$  установлено, что эффективность экстракции падает при переходе от кислой среды к щелочной. Например, при изменении pH от 3 до 10–12 степень концентрирования уксусной кислоты  $c_{орг}/c_0$  во время ЭВ снижается в 150 раз [16]. Данный факт можно объяснить с позиции роста степени ионизации карбоновых кислот при смещении в щелочную область, что согласно модели приводит к увеличению их сорбции на поверхности кристаллов льда из жидкой органической фазы (экстракт). Лед выступает в роли полярного сорбента в соответствии с физико-химическими свойствами молекулы воды. Этот результат вполне закономерен как с точки зрения теории адсорбции, так и по аналогии с жидкостной хроматографией на полярных сорбентах [18]. Кроме того, в данном случае в процессе ЭВ поверхность льда дополнительно модифицирована щелочью.

Как видно из рис. 1, 2, при ЭВЦ органических оснований, аминов ситуация выглядит иным образом. Углы наклона линейных графиков, т.е. коэффициенты распределения  $*K_{равн}$  анилина и дифениламина между объемом жидкой фазы экстракта и поверхностью образующегося в результате ЭВЦ льда, при переходе из кислой среды в щелочную постепенно растут. Следовательно, увеличивается и эффективность экстракции. Аналогично анилин и дифениламин ведут себя и при жидкостной экстракции из воды [19]. Это согласуется с представлениями о закономерностях экстракции органических оснований из водных сред [20].

Вместе с тем, если при pH 10 анилин и дифениламин с учетом погрешности эксперимента имеют практически одинаковые значения  $*K_{равн}$ , то эффективность их извлечения ацетонитрилом из кислой среды заметно отличается. Коэффициент распределения из кислой среды дифениламина равен 0.44, что значительно больше, чем для анилина. Следовательно, в этом случае при pH 2 дифениламин лучше экстрагируется из воды, чем анилин, значение  $*K_{равн}$  которого достигает лишь 0.12. Данный факт можно объяснить с точки зрения общей тенденции роста эффективности ЭВЦ органических соединений с ростом гидрофобности [6, 9]. Действительно, более гидрофобным в этом случае является дифениламин, поскольку его параметр  $\lg P_{о-в}$  составляет 3.4 и существенно больше, чем в случае анилина 0.9 [21]. На мень-



**Рис. 3.** Зависимость концентрации линдана в экстракте  $c_{орг}$  от его исходной массы  $m_o$  в воде и объема ацетонитрила  $V_{экстр}$  в результате экстракционного вымораживания в режиме воздействия поля центробежных сил при разных значениях pH. Мольная доля ацетонитрила в воде 0.027.

шую гидрофобность аналита также указывает его более высокая растворимость в воде [21].

Величина pH может влиять на эффективность экстракции аналита из воды в процессе ЭВ не напрямую в зависимости от степени ионизации его молекулы, а за счет изменения структуры льда. Такой вывод сделан на основании изучения закономерности ЭВЦ кофеина из водных растворов. Кофеин обладает основными свойствами, хотя и менее выраженными, чем анилин и дифениламин, поскольку имеет в молекуле три аминных атома азота. Установлено, что, коэффициент распределения кофеина  $*K_{равн}$  достигает максимального значения при pH 7 [14]. Из щелочной и кислой сред при прочих равных условиях методом ЭВЦ кофеин извлекался хуже, чем из нейтральной. Иными словами, сорбционные свойства поверхности льда, полученного в нейтральной среде (pH 7) выражены слабее. Данный эффект не зависит от исходного соотношения объемов экстрагента ацетонитрила и водного раствора.

Дополнительным аргументом в пользу справедливости сделанного вывода могут быть результаты аналогичного исследования эффективности ЭВЦ линдана (гамма-гексахлорциклогексан) из воды. Его молекула не имеет ионогенных групп, поэтому можно было ожидать отсутствия влияния pH на эффективность его ЭВЦ из воды в ацетонитрил. Однако, как следует из сравнения зависимостей  $c_{орг}$  от  $m_o/V_{экстр}$  (рис. 3), максимальная эффективность ЭВЦ линдана из воды в ацетонитрил достигается при pH 7 подобно кофеину.

Обращает на себя внимание еще один интересный экспериментальный факт. Как видно из рис. 3, коэффициенты распределения линдана  $*K_{равн}$  (углы наклона линейных зависимостей), в отличие от всех других протестированных аналитов, в кислой и щелочной средах практически совпадают. По-видимому, это обусловлено его молекулярным строением, а именно, отсутствием кислотных и основных свойств.

Ранее показано [14], что величина  $*K_{равн} \geq 1$  свидетельствует о полном извлечении аналита в процессе ЭВЦ из воды в ацетонитрил и заметной его поверхностной активности на границе раздела воздух—экстракт. В таком случае можно сделать вывод, что линдан при pH 7, а также анилин и дифениламин при pH 10 полностью извлекаются в процессе ЭВЦ из воды уже при соотношении объемов воды и экстрагента 9.72 : 0.78 (мольная доля ацетонитрила в воде 0.027).

В табл. 1 представлены данные о пределах определения изученных аналитов в водопроводной воде в результате одноразовой процедуры ЭВЦ в качестве метода пробоподготовки. Из таблицы следует, что метод ЭВЦ обеспечивает быстрое (время пробоподготовки не превышает 25 мин) определение указанных аналитов в воде на уровне предельных норм, действующих в Российской Федерации на настоящий момент. Для исследования требуется малое количество образца (не более 10 мл) и экстрагента (0.5–0.8 мл). Кроме того, одностадийная пробоподготовка без каких-либо дополнительных манипуляций с экстрактом снижает погрешность определения аналитов. После 25 мин ЭВЦ-пробоподготовки остается только лишь декантировать экстракт с поверхности льда. С учетом перечисленных выше достоинств рассматриваемого способа экстракции есть все основания полагать, что он в ближайшее время будет востребован в качестве метода пробоподготовки при контроле различных органических веществ в воде, почве, донных отложениях и биологических объектах. На рис. 4 представлены фотографии, сделанные при пробоподготовке различных объектов анализа.

Важно также, что, в отличие от жидкостно-жидкостной экстракции, при анализе водных растворов на этапе пробоподготовки методом ЭВЦ с использованием ацетонитрила не требуется тщательного перемешивания смеси водного раствора и экстрагента, поскольку ацетонитрил неограниченно растворим в воде при комнатной температуре.

Экспериментально установленные пределы определения аналитов в воде (табл. 1) в случае необходимости можно дополнительно снизить путем выполнения процедуры ЭВЦ-пробоподготовки одновременно нескольких проб исследуемого объекта (в роторе криоэкстрактора ЭВЦ-2

**Таблица 1.** Определение аналитов в водных растворах методом экстракционного вымораживания в условиях центрифугирования образца (ЭВЦ) в комбинации с газовой хроматографией

Аналит	Метод детектирования	Соотношение вода : ацетонитрил (по объему)	Масса экстракта, г	Предел определения в воде $c_{н\text{вод}}$ , мг/л	ПДК в воде, мг/л [22]
Анилин	ГХ-ТИД	10 : 0.4 (рН 10)	$0.024 \pm 0.003$	0.1	0.1
Дифениламин	ГХ-ПИД	10 : 0.5 (рН 10)	$0.052 \pm 0.004$	0.05	0.05
Кофеин	ГХ-ТИД	9.72 : 0.78 (рН 7)	$0.07 \pm 0.01$	0.015	—
Линдан	ГХ-ЭЗД	9.72 : 0.78 (рН 7)	$0.058 \pm 0.005$	0.001	0.02

восемь посадочных мест). После процедуры пробоподготовки следует объединить полученные экстракты, при этом контролируя их массу взвешиванием, и сконцентрировать путем упаривания. Продолжительность анализа существенно не возрастет, поскольку объем экстракта (масса) составляет менее 1 мл (см. табл. 1).

\* \* \*

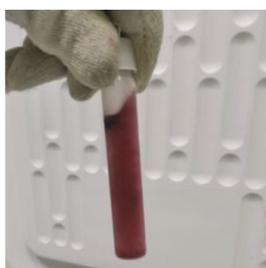
Таким образом, на примере нескольких органических оснований и линдана получены новые данные об экстракционном вымораживании органических веществ из водных растворов в условиях центрифугирования образца. Подтверждено, что предложенный новый метод экстракции обладает высокой эффективностью извлечения. Показано, что изменение рН среды влияет на эффективность экстракционного вымораживания. В целом для относительно сильных оснований эффективность экстракции изменяется в соответствии с известной для жидкостной экстракции и сорбции закономерностью, возрастая при пере-

ходе в щелочную среду. Вместе с тем экспериментально установлено, что в случае неионогенных аналитов, таких как линдан, и слабых оснований на эффективность экстракции могут влиять особенности формирования твердой фазы льда. Закономерности экстракционного вымораживания из водных растворов кофеина и линдана объяснены в рамках выдвинутой ранее теоретической модели. Благодаря высокой эффективности экстракции, сокращению числа стадий и затрат времени, количества реагентов, метод ЭВЦ перспективен для внедрения в качестве предварительного этапа подготовки пробы в химическом анализе. Кроме того, компактность созданного на его основе криоэкстрактора ЭВЦ-2 и малый расход экстрагента позволят применять такой аппарат в передвижных мобильных лабораториях при мониторинге загрязнения окружающей среды.

*Часть исследований проведена с использованием научного оборудования ЦКП "Эколого-аналитический центр" Кубанского госуниверситета.*



Питьевая вода



Красное вино



Донные отложения



Измельченный чайный лист

**Рис. 4.** Фотографии анализируемых образцов после этапа экстракционного вымораживания в режиме воздействия поля центробежных сил.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Koning S., Janssen H.-G., Brinkman U.A.Th.* Modern methods of sample preparation for GC analysis // *Chromatographia Supplement*. 2009. V. 69. P. 33.
2. *Raynie D.E.* Modern extraction techniques // *Anal. Chem.* 2010. V. 82. № 12. P. 4911.
3. *Ballesteros-Gomez A., Rubio S.* Recent advances in environmental analysis // *Anal. Chem.* 2011. V. 83. P. 4579.
4. *Цизин Г.И.* Развитие методов концентрирования микрокомпонентов в России (1991–2010 гг.) // *Журн. аналит. химии*. 2011. Т. 66. № 11. С. 1135. (*Tsysin G.I.* Method of the preconcentration of trace components: Development in Russia (1991–2010) // *J. Anal. Chem.* 2011. V. 66. № 11. P. 1020.)
5. *Бехтерев В.Н.* Способ извлечения органических веществ из водных сред экстракцией в сочетании с вымораживанием. Патент на изобретение № 2303476 РФ // *Б. и.* 2007. № 21. Приоритет 27.04.2005.
6. *Bekhterev V.N.* Extractive freezing-out in the analysis of organic compounds in the aqueous media // *Mendeleev Commun.* 2007. V. 17. P. 241.
7. *Бехтерев В.Н.* Способ извлечения органических веществ из водных сред экстракционным вымораживанием в поле центробежных сил. Патент на изобретение № 2564999 РФ // *Б. и.* 2015. № 28. Приоритет 14.04.2014.
8. *Bekhterev V.N.* A method of recovery of organic substances from aqueous media by freeze-out extraction under the action of a centrifugal force. Patent EP3357873 // *European Patent Bulletin*. 2019. № 45. P. 940. Priority date 28.09.2015.
9. *Бехтерев В.Н.* Экстракционное вымораживание одноосновных карбоновых кислот из воды в ацетонитрил в условиях действия центробежных сил // *Журн. физ. химии*. 2016. Т. 90. С. 1558. (*Bekhterev V.N.* Freeze-out extraction of monocarboxylic acids from water into acetonitrile under the action of centrifugal forces // *Russ. J. Phys. Chem. A*. 2016. V. 90. P. 2055.)
10. *Бехтерев В.Н.* Выделение фенолов из воды экстракционным вымораживанием // *Журн. аналит. химии*. 2008. Т. 63. № 10. С. 1045. (*Bekhterev V.N.* Recovery of phenols from water by extraction freezing // *J. Anal. Chem.* 2008. V. 63. № 10. P. 950.)
11. *Бехтерев В.Н., Гаврилова С.Н., Кошкарева Е.В., Шипанов И.Н.* Газохроматографическое определение пировалерона в моче методом экстракционного вымораживания в сочетании с центрифугированием // *Судебно-медицинская экспертиза*. 2017. Т. 60. № 3. С. 27.
12. *Бехтерев В.Н., Гаврилова С.Н., Шипанов И.Н.* Применение экстракционного вымораживания на этапе предварительной подготовки биопроб в ГХ–МС химико-токсикологическом анализе // *Судебно-медицинская экспертиза*. 2019. Т. 62. № 6. С. 53. (*Bekhterev V.N., Gavrilova S.N., Shipanov I.N.* The use of extractive freezing-out at the stage of preliminary preparation of bioprobes in GC–MS chemico-toxicological analysis // *Sudebno-Meditsinskaya Ekspertiza*. 2019. V. 62. № 6. P. 53.)
13. *Bekhterev V.N., Malyarovskaya V.I.* Rapid HPLC method of scopoletine determination in Weigela leaves based on one-step sample preparation by extractive freezing-out // *Mendeleev Commun.* 2019. V. 29. P. 592.
14. *Бехтерев В.Н.* Экстракционное вымораживание кофеина из водных растворов в условиях действия поля центробежных сил // *Журн. аналит. химии*. 2020. Т. 75. № 9. С. 771. (*Bekhterev V.N.* Extractive freezing-out of caffeine from aqueous solutions in a centrifugal force field // *J. Anal. Chem.* 2020. V. 75. № 9. P. 1103.)
15. *Темердашев З.А., Червонная Т.А., Мусорина Т.Н., Бехтерев В.Н.* Пробоподготовка почв и донных отложений с использованием техники экстракционного вымораживания при хроматомасс-спектрометрическом определении ПАУ // *Аналитика и контроль*. 2020. Т. 24. № 4. С. 287. (*Temerdashev Z.A., Chervonnaya T.A., Musorina T.N., Bekhterev V.N.* Sample preparation of soils and bottom sediments for gas chromatography–mass spectrometry determination of PAHs // *Analitika i kontrol' [Analytics and Control]*. 2020. V. 24. P. 287.)
16. *Бехтерев В.Н.* Закономерности поведения растворенных органических веществ в условиях экстракционного вымораживания // *Журн. аналит. химии*. 2011. Т. 66. № 6. С. 608. (*Bekhterev V.N.* Trends in the behavior of dissolved organic substances under the conditions of freeze extraction // *J. Anal. Chem.* 2011. V. 66. № 6. P. 591.)
17. *Schneider G.M.* Aqueous solutions at pressures up to 2 GPa: gas–gas equilibria, closed loops, high-pressure immiscibility, salt effects and related phenomena // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2002. V. 4. P. 845.
18. *Dmitrienko S.G., Zolotov Yu.A.* Polyurethane foams in chemical analysis: Sorption of various substances and its analytical applications // *Russ. Chem. Rev.* 2002. V. 71. № 2. P. 159.
19. *Wenshuai C., Xinyan Z., Wei L., Weidong Z., Zhiyong Z., Zhongqi R.* Extraction of aniline from wastewater: Equilibria, model, and fitting of apparent extraction equilibrium constants // *RSC Adv.* 2016. V. 6. P. 6125.
20. *Коренман И.М.* Экстракция в анализе органических веществ. М.: Химия. 1977. 200 с.
21. *Berthod A., Carda-Broch S.* Determination of liquid–liquid partition coefficients by separation methods // *J. Chromatogr. A*. 2004. V. 1037. P. 3.
22. Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования. Гигиенические нормативы ГН 2.1.5.1315-03.