

СОДЕРЖАНИЕ

Том 77, номер 5, 2022

Работы по анализу биомедицинских объектов (продолжение).

Редактор-составитель – Б.Б. Дзантиев

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Количественное определение мРНК бета-лактамаз в РНК-транскриптах резистентных к антибиотикам бактерий с использованием колориметрических биочипов

*М. Ю. Рубцова, А. А. Филиппова, Н. К. Фурсова, В. Г. Григоренко,
Г. В. Преснова, М. М. Уляшова, А. М. Егоров* 393

Автоматическое экспресс-определение четырех кардиомаркеров в плазме крови пациентов с кардиопатологиями

*Н. Л. Нечаева, О. Н. Сорокина, Т. С. Константинова, А. Д. Васильева, Л. В. Юрина,
Н. А. Бызова, А. Е. Бугрова, С. Н. Подойницын, А. В. Еременко, И. Н. Курочкин* 406

ОБЗОРЫ

Современная практика нецелевого химического анализа

Б. Л. Мильман, И. К. Журкович 412

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Аналитические возможности капельно-искрового спектрометра при вводе пробы в электролитный анод

В. В. Ягов, А. А. Жирков 427

Определение содержания нефтепродуктов в почве с естественной влажностью ИК-спектрометрическим методом

П. А. Василенко, С. Г. Корниенко 433

Поверхностно-модифицированный оксид железа как сорбционный материал для извлечения асфальтенов

Д. В. Пряжников, И. В. Кубракова, Д. И. Панюкова, Т. А. Марютина 438

Сорбционные возможности магнитного композита на основе модифицированных углеродных нанотрубок, синтезированных на различных катализаторах

С. С. Гражулене, Н. И. Золотарева, А. Н. Редькин 446

Микроэкстракционное концентрирование хлоруксусных кислот с флотационным выделением экстракта

В. А. Крылов, П. В. Мосягин, Р. Г. Сироткин 454

Хромато-масс-спектрометрическое определение полициклических ароматических углеводов в почвах и донных отложениях с пробоподготовкой по технике QuEChERS

З. А. Темердашев, Т. Н. Мусорина, С. К. Овсепян, И. Г. Корпакова 462

Внутрикапиллярная хиральная дериватизация аминокислот

Л. А. Карцова, Д. О. Москвичев 471

В НАУЧНОМ СОВЕТЕ РАН ПО АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ

45-я Годичная сессия совета 478

Вступительное слово председателя Научного совета РАН по аналитической химии на Годичной сессии 28 сентября 2021 г.

480

ХРОНИКА

VI Всероссийский симпозиум “Разделение и концентрирование
в аналитической химии и радиохимии”

482

Памяти М.С. Черновьянц

485

УДК 543.9;577.29;577.2.08

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ мРНК БЕТА-ЛАКТАМАЗ В РНК-ТРАНСКРИПТАХ РЕЗИСТЕНТНЫХ К АНТИБИОТИКАМ БАКТЕРИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИХ БИОЧИПОВ

© 2022 г. М. Ю. Рубцова^{а, *}, А. А. Филиппова^а, Н. К. Фурсова^б, В. Г. Григоренко^а, Г. В. Преснова^а, М. М. Уляшова^а, А. М. Егоров^а

^аМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет
Ленинские горы, 1, стр. 3, Москва, 119991 Россия

^бГосударственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии
Территория “Квартал А”, 24, пос. Оболensk, г. о. Серпухов, Московская обл., 142279 Россия

*e-mail: mrubtsova@gmail.com

Поступила в редакцию 12.07.2021 г.

После доработки 26.08.2021 г.

Принята к публикации 28.08.2021 г.

Разработана методика количественного определения мРНК сериновых бета-лактамаз TEM-типа у бактерий, устойчивых к бета-лактамам антибиотикам. Методика включает несколько стадий: выделение фракции общей РНК из бактериальной культуры, получение ДНК-мишени бета-лактамазы в последовательных реакциях обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции с введением метки – биотина и гибридизацию ДНК-мишени на колориметрических биочипах. Оптимизированы условия пробоподготовки для увеличения выхода анализируемой ДНК-мишени. Градуировочная кривая для определения количества мРНК построена с использованием стандартного образца мРНК бета-лактамазы TEM-1, полученного методом транскрипции *in vitro*. Преимуществом использования стандартного образца, соответствующего полноразмерному гену *bla*_{TEM-1}, является прохождение им всех стадий анализа параллельно с исследуемыми образцами с одинаковой эффективностью. Предел обнаружения мРНК бета-лактамазы TEM-1 составил 0.40 ± 0.05 амоль/мл, диапазон определяемых концентраций – от 1.0 амоль/мл до 2000 фмоль/мл, относительное стандартное отклонение не превышало 12%. Продолжительность анализа после получения бактериальной культуры составляет около 7 ч. Разработанная методика может быть использована для изучения условий экспрессии генов бета-лактамаз у резистентных к антимикробным препаратам бактерий.

Ключевые слова: биочипы, колориметрическое детектирование, мРНК, бета-лактамазы, антибиотикорезистентность бактерий.

DOI: 10.31857/S0044450222050140

Широкое распространение резистентных к антибиотикам бактерий – возбудителей инфекционных заболеваний – является одной из актуальных проблем современной биологии, медицины и фармакологии. Она обострилась в связи с появлением мульти- и пан-резистентных бактерий, одновременно устойчивых к нескольким классам, и даже практически ко всем антибиотикам [1–3]. Механизмы резистентности бактерий разнообразны и включают процессы с участием ферментов, модифицирующих бактериальные мишени антибиотиков, изменяющих структуру самих антибиотиков, нарушающих процессы их проникновения в бактериальную клетку и активный вывод из нее [4, 5]. Проблема устойчивости к антибиотикам является очень широкой и касается всех микроорганизмов, включая грамотрицательные и грамположительные бактерии. Сочета-

ние нескольких механизмов устойчивости у патогенных бактерий существенно осложняет выбор антимикробных препаратов, особенно при лечении внутрибольничных инфекций, которые развиваются очень быстро у ослабленных пациентов.

Одним из наиболее распространенных видов резистентности у грамотрицательных бактерий является их устойчивость к бета-лактамам антибиотикам – классу антимикробных препаратов, наиболее часто используемых в здравоохранении. Так, на долю пенициллинов широкого спектра и цефалоспоринов приходится соответственно 39 и 20% от всех используемых в клинической практике антибиотиков [6, 7]. Основным механизмом резистентности является гидролиз антибиотиков бета-лактамазами (БЛ), образуя-

щими суперсемейство из более 2800 ферментов и различающимися по строению активного центра, субстратной специфичности и чувствительности к ингибиторам [8]. Мультирезистентные бактерии часто являются носителями генов нескольких типов БЛ.

Для исследования устойчивых к бета-лактамам антибиотикам бактерий, в том числе мультирезистентных, активно используются молекулярно-генетические методы, основанные на идентификации генов, кодирующих БЛ [9, 10]. В результате постоянно протекающих процессов эволюции резистентности в экосистемах, в том числе госпитальных, отмечается феномен развития гетерорезистентности, связанной с формированием смешанной популяции бактерий, резистентных и чувствительных к антимикробным препаратам [11, 12]. Для изучения механизмов формирования генетической и фенотипической гетерорезистентности популяций патогенов, влияния внешних факторов на подавление и активацию генов антибиотикорезистентности у бактерий необходимы методы количественного определения экспрессирующихся генов через выявление специфических мРНК в РНК-транскриптах бактерий. Эти методы должны обладать высокими специфичностью и чувствительностью, а также широким динамическим диапазоном, позволяющим определять как низкие, так и высокие уровни экспрессии генов. В связи с разнообразием типов ферментов, обуславливающих антибиотикорезистентность, методы определения мРНК должны обладать высокой производительностью и возможностью одновременного определения большого набора разных мРНК.

В настоящее время для определения специфических мРНК в РНК-транскриптах бактерий применяют полуколичественные методы с использованием внутренних контролей: изменение экспрессии изучаемого гена определяется по отношению к уровню экспрессии контрольного гена (генов). Для этих целей активно развиваются две технологии: полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (ПЦР-РВ) [13–15] и использование биочипов высокой плотности [16]. Обе технологии включают пробоподготовку, состоящую из выделения общей РНК из бактериальной культуры и получения кДНК в реакции обратной транскрипции (ОТ). Количество одновременно определяемых генов в одной реакции методом ПЦР-РВ ограничено количеством флуорофоров, которые могут быть использованы в качестве метки [17]. Биочипы высокой плотности характеризуются наиболее высокой мультиплексностью — от десятков до сотен и более тысяч вариантов одновременно идентифицируемых генов, которая определяется количеством иммобилизованных на биочипе специфических олигонуклеотидных зондов.

Технология ПЦР-РВ позволяет оценить количество мРНК или числа копий гена в одной бактериальной клетке, однако для этого необходимо знать эффективность стадий ОТ и ПЦР, что не всегда можно определить экспериментально [18]. Биочипы высокой плотности активно применяются для изучения механизмов резистентности бактерий, они показали свою эффективность для определения профилей изменения РНК-транскриптомов [19, 20]. Однако, поскольку результаты определения специфических мРНК являются относительными, данная технология позволяет зарегистрировать только существенные изменения в экспрессии генов. Более тонкие эффекты, связанные с незначительными изменениями концентраций отдельных мРНК, трудно зафиксировать из-за сложности многоступенчатой нормировки результатов анализа.

В последние годы для идентификации устойчивости к антимикробным препаратам у бактерий активно развивается технология колориметрических биочипов низкой плотности, включающих не более нескольких десятков специфических олигонуклеотидных зондов [21, 22]. Колориметрические биочипы показали свою эффективность для идентификации генов различных БЛ, в том числе у клинических патогенных штаммов с множественной резистентностью к антибиотикам [23–25]. Данные биочипы представляются более перспективными для практического использования в клинической практике по сравнению с биочипами высокой плотности, поскольку не требуют дорогостоящего оборудования для проведения анализа и получения результатов. Подобные биочипы могут входить в состав автоматизированных устройств для “диагностики по месту лечения” (point of care), что существенно упрощает их применение в клинических лабораториях [26].

До настоящего времени биочипы низкой плотности применялись в основном для идентификации генов антибиотикорезистентности в геномах бактерий. Поскольку интенсивность окрашивания зон биочипа определяется с высокой точностью с использованием оптических сканеров высокого разрешения, данная технология может применяться и для количественного определения нуклеиновых кислот.

Цель данного исследования — разработка методики определения мРНК БЛ, основанной на комбинации реакций ОТ и ПЦР с гибридизацией полученной ДНК-мишени на колориметрических биочипах в лунках 96-луночных планшетов. Для определения исследуемой мРНК строили градуировочную зависимость с использованием набора стандартных образцов мРНК, полученной методом транскрипции *in vitro*. Задачи работы включали оптимизацию отдельных стадий мето-

дики, построение градуировочной зависимости с использованием стандартных образцов мРНК и применение разработанной методики для определения мРНК БЛ в контрольном и клинических образцах грамотрицательных бактерий.

В качестве объекта исследования выбрали сериновые БЛ класса А TEM-типа. Данное семейство БЛ включает более 240 ферментов, характеризующихся высокой консервативностью последовательностей с единичными аминокислотными заменами [27]. БЛ TEM-1 обеспечивает устойчивость бактерий к пенициллинам и цефалоспорином I поколения. Часть мутантов этого фермента, имеющих единичные аминокислотные замены, относится к БЛ расширенного спектра (БЛРС), обуславливающих резистентность бактерий ко всем пенициллинам и цефалоспорином. БЛ TEM-типа достаточно широко распространены среди клинических штаммов бактерий, а также почвенных бактерий, они являются удобной моделью для изучения механизмов ферментативного гидролиза и резистентности бактерий к бета-лактамам антибиотикам [28]. Интерес к определению мРНК БЛ TEM-типа обусловлен появлением данных об увеличении экспрессии ферментов этого типа у грамотрицательных бактерий при применении бета-лактамов в комбинации с бета-лактамами ингибиторами [29, 30].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Бактериальные штаммы. В работе использовали лабораторные штаммы *Escherichia coli* – продуценты рекомбинантных БЛ TEM-1, TEM-2, TEM-12, TEM-18, TEM-129, TEM-160, содержащие плазмиду pET 24d с клонированными генами соответствующих БЛ под контролем промотора бактериофага T7 со средним уровнем копийности по методике, описанной в работе [31], аббревиатуры ферментов соответствуют номерам мутантных форм БЛ TEM-типа в международной базе данных NCBI Beta-Lactamase Data Resources (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/beta-lactamase-data-resources/>); клинические штаммы грамотрицательных бактерий, выделенные из клинического материала (моча, эндотрахеальный аспират) (*E. coli* B-1350/18, *E. coli* B-2607/18, *Klebsiella pneumoniae* B-1088/17). Клинические штаммы получены из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов “ГКПМ-Оболенск”. Их видовую идентификацию проводили на приборах VITEK-2 Compact (bioMérieux, Франция) и MALDI Biotyper (Bruker, Германия). Интерпретацию результатов проводили согласно рекомендациям Европейского комитета по тестированию антимикробной чувствительности (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), EUCAST v.10.0 [32].

Культивирование бактерий, выделение нуклеиновых кислот, выделение периплазматических фракций, определение в них ферментативной активности БЛ. Бактерии культивировали в трех повторках на жидкой питательной среде LB (Becton Dickinson, США) при 37°C в течение 18–24 ч, лабораторные штаммы – в присутствии 50 мг/л канамицина, клинические штаммы – в присутствии разных концентраций ампициллина (0, 8, 100, 250 мг/л).

Плазмидную ДНК выделяли из культуры бактериальных клеток по методике [33] с использованием набора Plasmid Midiprep 2.0 (Eurogen, Россия). Фракцию общей РНК выделяли из бактериальных клеток набором РНК-экстран (Синтол, Россия) по протоколу компании-производителя. Качество полученной РНК контролировали методом электрофореза в 1%-ном агарозном геле по наличию двух полос 18S и 28S недеградированной рРНК. Примесь ДНК удаляли ДНКазой I (Thermo Scientific, Литва): инкубировали образец с ДНКазой (2 е. а./мкл) в течение 30 мин при 37°C, реакцию останавливали 4 мМ ЭДТА (конечная концентрация) и инкубировали 10 мин при 65°C. Полноту удаления ДНК контролировали методом ПЦР с использованием праймеров к фрагменту 16S бактериальной ДНК по отсутствию продукта амплификации [34]. Концентрацию нуклеиновых кислот определяли спектрофотометрически на спектрофотометре UV-1602 (Shimadzu, Япония).

Для получения периплазматических фракций использовали методику [35]: 10 мл бактериальной культуры осаждали центрифугированием при 3500 g в течение 10 мин на центрифуге (Eppendorf 5810/5810R, Германия) и замораживали осадок биомассы при –20°C. Клетки разрушали осмотическим шоком в растворе сахарозы (20%-ная сахароза, 10 мМ Трис-НСl, 1 мМ ЭДТА, pH 8.0), затем центрифугировали при 12000 g в течение 15 мин при температуре +4°C и отделяли супернатант. Ферментативную активность БЛ определяли по скорости гидролиза ампициллина: в кювете объемом 1 мл смешивали 50 мМ Na-фосфатного буферного раствора с pH 7.0 с 35 мкл периплазматической фракции и раствором ампициллина в конечной концентрации 75 мкМ, затем регистрировали кинетические кривые расхода ампициллина при длине волны 235 нм ($\Delta\epsilon_{235} = 670 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$). Ферментативную активность определяли как отношение изменения оптической плотности за единицу времени к молярному коэффициенту поглощения согласно формуле:

$$A = \frac{\Delta OD t}{\Delta \epsilon}, \quad (1)$$

где ΔOD – изменение оптической плотности за промежуток времени t , $\Delta \epsilon$ – молярный коэффициент поглощения.

Получение мРНК БЛ TEM-1 методом транскрипции *in vitro*. Амплифицировали фрагмент плазмиды, включающий полноразмерный ген БЛ TEM-1 и участки промотора и терминатора T7 с использованием прямого (5'-TCCGGA-TATAGTTCCTCCTTTCA-3') и обратного (5'-AG-ATCTCGATCCCGCGAA-3') праймеров, в качестве матрицы использовали фракцию общей ДНК, выделенной из клеток *E. coli* – продуцентов БЛ TEM-1. Синтез мРНК проводили с использованием набора T7-Transcription (Биолабмикс, Россия) по методике [36] с увеличенными концентрациями фермента и dNTP: 1 мкл ПЦР-продукта смешивали в объеме 50 мкл с буфером для транскрипции, смесь dNTP в конечной концентрации 1 mM и T7 РНК-полимеразой (3 е. а./мкл) инкубировали в течение 2 ч при 37°C. Излишки ДНК удаляли с помощью ДНКазы (2 е. а./мкл, 37°C, 30 мин). Концентрацию РНК определяли спектрофотометрически.

Получение первой цепи кДНК в реакции обратной транскрипции. Первую цепь кДНК получали с использованием реакции обратной транскрипции по методике [37], в которой меняли состав праймеров: 2 мкл образца общей РНК и праймеры в конечной концентрации 0.5 мкМ (набор праймеров случайного состава длиной 10 оснований (Random(dNTP)₁₀), включающий олигонуклеотид для взаимодействия с поли-dATP фрагментом на 3'-конце мРНК (Oligo(dTTP)₁₅), или специфический обратный праймер для БЛ TEM типа (5'-ГТААТСАГТГАГГСАСТАТ-3')) прогревали (70°C, 2 мин), затем охлаждали на льду и добавляли 5× буфер (250 mM Трис-НСl, 250 mM КСl, 20 mM MgCl₂, pH 8.3), смесь dNTP в конечной концентрации 1 mM, 2 mM дитиотриэтола и 1 мкл ревертазы MMLV вируса лейкемии летучих мышей (Евроген, Россия). Смесь инкубировали (42°C, 1 ч) и останавливали реакцию прогреванием (70°C, 10 мин).

Гибридизационный анализ биотинилированной ДНК-мишени на биочипах. 96-луночные планшеты (Greiner Bio-one Maxisorb, Германия) модифицировали поли-D-лизином (200 мкг/мл в фосфатном буферном растворе (ФБ), 50 мкл/лунку) в термомиксере Thermomixer Comfort (Eppendorf AG, Гамбург, Германия) (37°C, 1 ч), отмывали ФБ (2 раза по 10 мин). Затем в лунки добавляли глутаровый альдегид (1%-ный раствор в ФБ, 50 мкл/лунку), инкубировали (37°C, 1 ч), отмывали ФБ (2 раза по 10 мин). Олигонуклеотидные зонды, модифицированные на 5'-конце аминогруппой и линкером из 13 dTTP, растворяли в буферном растворе (160 mM Na₂SO₄, 130 mM Na₂HPO₄) до конечной концентрации

20 пмоль/мкл и наносили в виде матрицы (6 × 6) в лунки планшетов с использованием робота XactII™ (LabNextInc., США). Последовательно олигонуклеотидных зондов для идентификации БЛ разных типов приведены в табл. 1. Каждый специфичный зонд был нанесен в шести повторах, контрольные зонды – в трех повторах. Средний размер зоны биочипа с зондом составлял 300 мкм, расстояние между зонами составляло 500 мкм. После нанесения зондов планшет прогревали (60°C, 20 мин), отмывали ФБ (2 раза по 10 мин) и блокировали в растворе состава 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 1% казеина (37°C, 1 ч).

Образец первой цепи кДНК использовали в качестве матрицы в реакции ПЦР с введением биотина [38]. Размер амплифицируемых полноразмерных генов БЛ составлял 851 п. о. Затем полученные ампликоны фрагментировали ДНКазой I (0.1 е. а./30 нг ДНК) в объеме 50 мкл при комнатной температуре в течение 5 мин. Реакцию останавливали добавлением 3 mM ЭДТА и инкубировали 10 мин при 65°C. Размер полученных фрагментов составлял от 50 до 150 п. н. Гибридизацию проводили в термомиксере: 50 мкл ДНК, меченной биотином, в буферном растворе SSPE (0.2 M NaH₂PO₄, 3.0 M NaCl, 20 mM ЭДТА, 0.1% додецилсульфата натрия, pH 7.4) и 1 нМ биотинилированного контрольного олигонуклеотида инкубировали в лунках планшета (45°C, 2 ч). Затем планшет отмывали ФБ (45°C, 10 мин), инкубировали с конъюгатом стрептавидин-пероксидаза хрена (Имтек, Россия) в ФБ, содержащем 1% БСА (37°C, 30 мин), отмывали раствором ФБ (комнатная температура, три раза по 10 мин) и добавляли субстратный раствор (5 mM 3,3',5,5' – тетраметилбензидина, 1 mM H₂O₂, 0.5% декстран-сульфата натрия в 0.1 M ацетатном буферном растворе, pH 5.5).

Количественная обработка результатов гибридизационного анализа. Поверхность биочипов в лунках планшета сканировали на оптическом сканере Perfection V750 Pro (Epson, Германия) с разрешением 4800 dpi, цветные изображения получали в формате TIFF файлов (16 bit). Далее цветные изображения переводили в монохромные черно-белые с использованием программного обеспечения Adobe Photoshop CS3 и определяли интенсивность окрашивания каждой зоны биочипа и локального фонового окрашивания вокруг нее с использованием ScanArray Express (версия 3.0).

Интенсивность окрашивания (I) определяли как среднее арифметическое значение интенсивностей окрашивания зоны за вычетом среднего локального фонового окрашивания по формуле:

$$I = \frac{\sum (I_i - I_{fi})}{n}, \quad (2)$$

Таблица 1. Последовательности олигонуклеотидных зондов для гибридизационного анализа генов бета-лактамаз на биочипах

Тип бета-лактамазы (молекулярный класс)	Зонд (участок нуклеотидной последовательности гена, н.)	Олигонуклеотидная последовательность 5'–3'
TEM (класс А)	ID ₁ -TEM (362–381)	CAGTGCTGCCATAACCATG
	ID ₂ -TEM (409–429)	CTGACAACGATCGGAGGACCG
	ID ₃ -TEM (598–619)	GCTTCCCGGCAACAATTAATAG
	ID ₄ -TEM (565–589)	CGCAAATACTAATACTGGCGAACTAC
SHV (класс А)	ID-SHV	GTTGATCCGCTCCGTGCTG
CTX-M (класс А)	ID-CTX-M	TATATCGCGGTGATCTGGCC
OXA (класс D)	ID-OXA-48	TGCTGTATCACAATAAGTTACACGTATC
NDM (класс B)	ID-NDM	TCCAAGTCGCTCGGCAATCTC
–	Положительный контроль гибридизации (ПКГ)	TGATTGGACGAGTCAGGAGC
–	Отрицательный контроль гибридизации (ОКГ)	TCTAGACAGCCACTCATA
–	Контрольный зонд для гибридизации (ПКГ-Бт*)	Биотин-GCTCCTGACTCGTCCAATC

где I_i – интенсивность окрашивания зоны биочипа, I_{fi} – локальное фоновое значение, n – число повторов одной зоны на биочипе.

Относительную интенсивность окрашивания зоны рассчитывали как отношение среднего значения интенсивности окрашивания данной зоны к среднему значению окрашивания контрольной зоны по формуле (3):

$$I_{\text{отн}} = I/I_{\text{контр}}, \quad (3)$$

где $I_{\text{отн}}$ – среднее значение относительной интенсивности окрашивания зоны, I – среднее значение интенсивности окрашивания зоны со специфическим зондом для данного типа БЛ, $I_{\text{контр}}$ – среднее значение интенсивности окрашивания зоны положительного контроля гибридизации (ПКГ).

Статистическую обработку данных проводили с использованием t -критерия Стьюдента ($p < 0.05$).

Построение градуировочной кривой для определения мРНК БЛ. Определение мРНК БЛ TEM-1 в стандартных образцах проводили с использованием разработанной методики, включающей последовательные стадии ОТ, ПЦР и гибридизации на биочипе, как описано выше. Строили градуировочную зависимость относительной интенсивности окрашивания специфических зон биочипа от концентрации стандартных образцов мРНК.

Предел обнаружения мРНК БЛ рассчитывали по формуле:

$$c = I_{\text{отн}0} + 3\sigma, \quad (4)$$

где $I_{\text{отн}0}$ – значение относительной интенсивности окрашивания зоны биочипа со специфиче-

ским зондом при гибридизации образца, не содержащего мРНК БЛ TEM-типа; σ – стандартное отклонение фонового сигнала.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Определение специфических мРНК БЛ включает несколько этапов: пробоподготовку меченной биотином ДНК-мишени, гибридизацию ее на биочипе с иммобилизованными специфическими олигонуклеотидными зондами и детекцию метки-биотина в дуплексах ДНК, образовавшихся в отдельных зонах биочипа (рис. 1). Пробоподготовка заключается в выделении фракции общей РНК из клеточной культуры, получении кДНК в реакции ОТ и амплификации анализируемого гена БЛ методом ПЦР с одновременным введением метки-биотина. Стадия детектирования включает выявление биотина конъюгатом стрептавидин-пероксидаза хрена и последующее колориметрическое определение пероксидазы. В результате ферментативной реакции образуется нерастворимый окрашенный продукт синего цвета, адсорбирующийся в соответствующей зоне биочипа. Изменение интенсивности окраски зон биочипа пропорционально изменению концентрации мРНК исследуемого гена в РНК-транскрипте.

Оптимизация условий определения мРНК включала оптимизацию определения ДНК БЛ на биочипах и оптимизацию методики пробоподготовки.

Оптимизация гибридизационного анализа на колориметрических биочипах для определения генов БЛ TEM-типа. Для выявления генов БЛ TEM-ти-

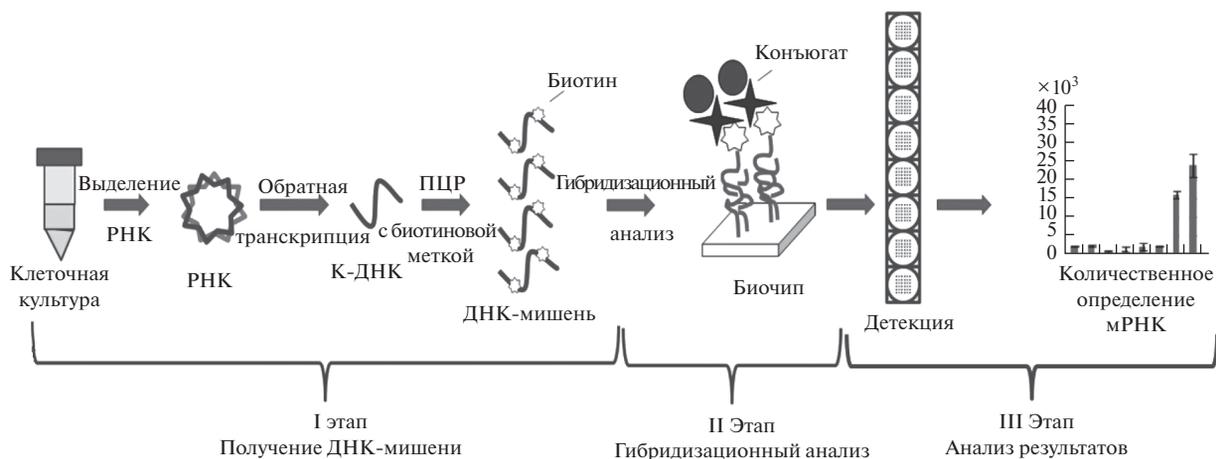


Рис. 1. Схема метода определения мРНК БЛ методом гибридационного анализа на колориметрических биочипах низкой плотности.

па на биочипах протестировали четыре олигонуклеотидных зонда, последовательность которых соответствовала четырем консервативным участкам нуклеотидных последовательностей (362–381, 409–429, 565–589 и 598–619 п. н.) генов ферментов данного семейства. Биочипы включали специфичные зонды (ID₁-ТЕМ, ID₂-ТЕМ, ID₃-ТЕМ, ID₄-ТЕМ) и два контрольных зонда (положительный ПКГ и отрицательный ОКГ). Последовательности зондов приведены в табл. 1. В качестве контрольных зондов использовали последовательности олигонуклеотидов, которые не встречаются у бактерий.

При гибридизации образца ДНК БЛ ТЕМ-1, меченной биотином, со специфичными олигонуклеотидными зондами интенсивность окраши-

вания зависела от типа зонда, поскольку последние имели разную структуру и длину и характеризовались соответственно различной стабильностью ДНК-дуплексов (рис. 2). Для всех зондов наблюдали прямо пропорциональную зависимость интенсивности окрашивания зон биочипа от количества ДНК-мишени. Для дальнейшей работы выбрали зонд ID₁-ТЕМ, соответствующий в нуклеотидной последовательности гена участку 362–381 п. н., обеспечивающий наиболее высокие значения интенсивностей окрашивания зон биочипа в диапазоне концентраций ДНК-мишени от 100 до 400 нг/биочип.

Для определения ДНК БЛ изготовили биочипы, включающие шесть специфичных олигонуклеотидных зондов, соответствующих наиболее клинически значимым типам БЛ различных молекулярных классов (ТЕМ-, SHV-, СТХ-М-типов (класс А), NDM типа (класс В), OXA-48 типа (класс D)). Структуру идентификационных зондов выбрали ранее по консервативным участкам нуклеотидных последовательностей генов соответствующих БЛ (табл. 1) [24]. Помимо специфичных зондов, каждый биочип включал два контрольных зонда. Схема расположения зондов на биочипе представлена на рис. 3.

Биочипы применили для определения ДНК БЛ ТЕМ-типа с использованием образцов ДНК, выделенных из клеток *E. coli* – продуцентов разных вариантов БЛ (ТЕМ-2, -12, -18, -129, -160), различающихся единичными аминокислотными заменами. Ферменты ТЕМ-12, -18, -129 и -160 являются БЛРС и содержат замены ключевых аминокислот, приводящие к расширению спектра субстратной специфичности и устойчивости к ингибиторам БЛ бета-лактаманной структуры. Результаты гибридационного анализа (рис. 4) показали высокую специфичность определения БЛ

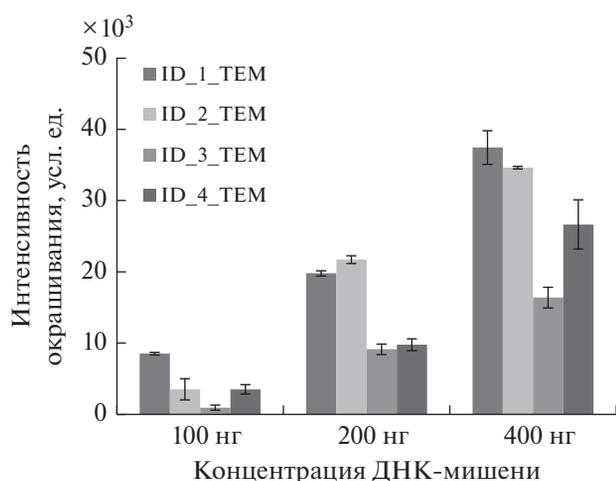


Рис. 2. Интенсивность окрашивания зон биочипа с иммобилизованными олигонуклеотидными зондами при гибридационной меченной биотином ДНК БЛ ТЕМ-1.

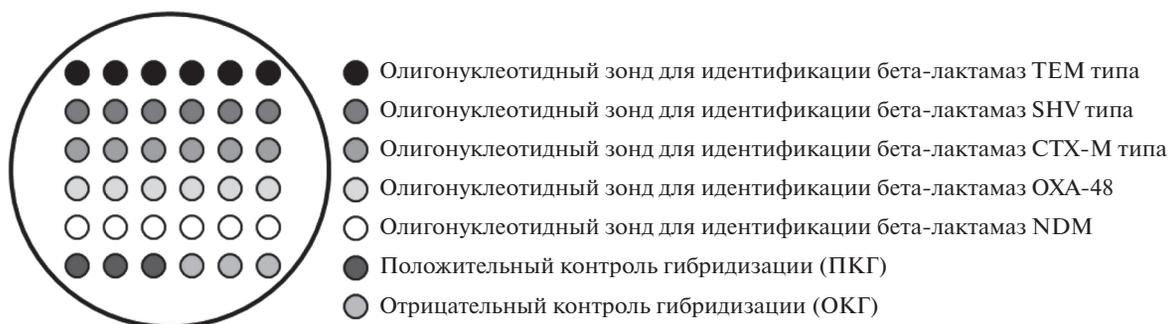


Рис. 3. Расположение специфичных и контрольных олигонуклеотидных зондов на биочипе в лунке 96-луночного планшета.

данного типа: окрашивание зон биочипа со специфичным зондом ID₁-TEM характеризовалось высокой интенсивностью, при этом интенсивность окрашивания зон с зондами другой специфичности, в том числе с зондами для наиболее близких структурно БЛ класса А (SHV-и CTX-M-типов), была низкой. Необходимо отметить хорошую сходимость значений интенсивности при гибридизации образцов ДНК, соответствующих разным вариантам БЛ TEM-типа, разброс значений не превышал 11%, что позволяет использовать гибридизационный анализ на колориметрических биочипах для определения нуклеиновых кислот.

Получение кДНК и меченной биотином ДНК-мишени для гибридизационного анализа. Для оптимизации методики пробоподготовки ДНК-мишени изучали условия получения кДНК и амплификации генов БЛ методом ПЦР с одновременным введением метки-биотина. На первом этапе определили оптимальное количество циклов ПЦР, необходимое для получения достаточной интенсивности окрашивания специфичных зон биочипа. В качестве матрицы использовали образец ДНК, выделенный из клеток штамма *E. coli* – продуцента рекомбинантной БЛ TEM-1. Проводили ПЦР в условиях, разработанных ранее для мультиплексной амплификации БЛ разных классов в одной реакции, в течение разного количества циклов реакции. Далее ампликоны гибридизовали на биочипе, определяли интенсивность окрашивания специфичных зон биочипа и нормировали ее на интенсивность окрашивания зоны положительного контроля. Анализ зависимости относительных интенсивностей окрашивания зон биочипа от числа циклов (рис. 5а) показал, что выход реакции начинает увеличиваться после 20 цикла и достигает максимальных значений после 30 цикла. В дальнейшей работе использовали 30 циклов для амплификации ДНК-мишеней.

Получение кДНК проводили в реакции ОТ с использованием в качестве матрицы фракции общей РНК, выделенной из лабораторного штамма *E. coli*. Для увеличения эффективности данной стадии изучали состав праймеров, в качестве которых использовали набор праймеров случайного состава длиной 10 оснований и праймера, включающего последовательность из поли-dTTP для взаимодействия с поли-dATP фрагментом на 3'-конце мРНК, а также праймер, специфичный для БЛ TEM-типа, выбранный по консервативному концевому участку нуклеотидной последовательности гена. Полученные кДНК использовали в качестве матрицы ПЦР, размер продуктов которой анализировали электрофоретически (рис. 5б). Сравнение эффективности использова-

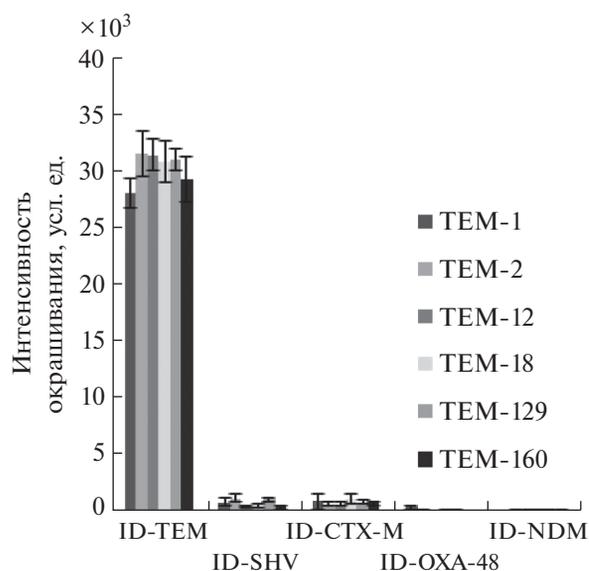


Рис. 4. Интенсивность окрашивания зон биочипа с иммобилизованными зондами разной специфичности после гибридизации 400 нг ДНК-мишени, полученной из образцов ДНК разных БЛ TEM-типа (TEM-1, -2, -12, -18, -129, -160).

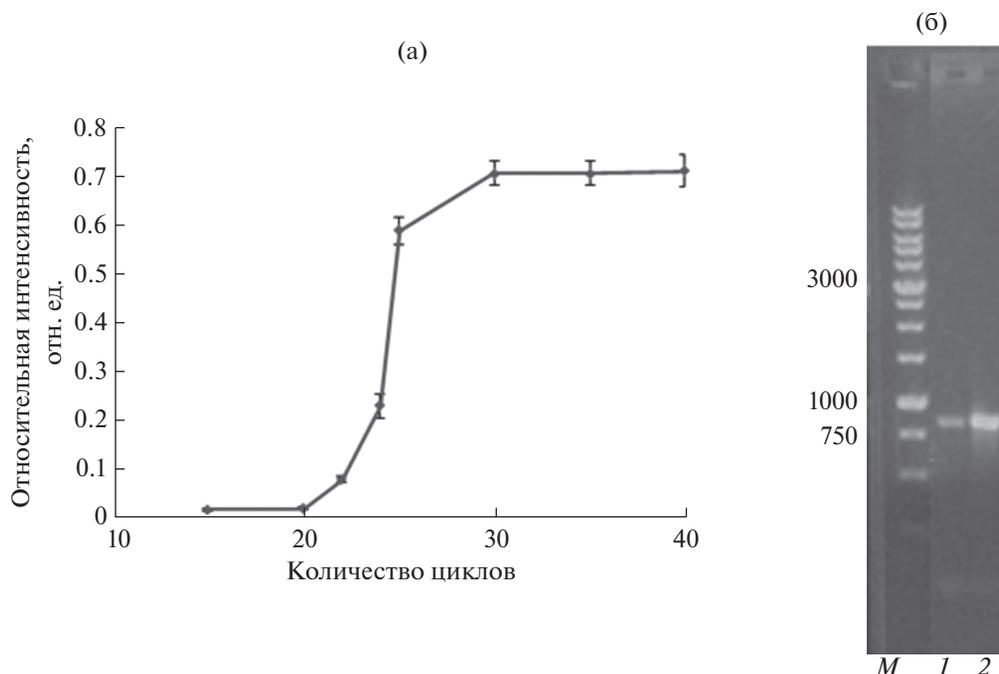


Рис. 5. (а): Относительная интенсивность окрашивания специфических зон биочипа после гибридизации ПЦР-продуктов, полученных с использованием разного числа циклов амплификации. (б): Электрофореграмма продуктов последовательных реакций ОТ и ПЦР гена БЛ ТЕМ-1, в качестве матрицы использован образец общей РНК, выделенный из клеток *E. coli*-продуцентов (1×10^7 КОЕ/мл). М – смесь ДНК-маркеров известной длины. Реакцию ОТ проводили с использованием смеси праймеров случайного состава длиной 10 оснований и праймера из 15 dТТР (1) и специфического праймера для БЛ ТЕМ-типа (2).

ния в реакции ОТ набора случайных праймеров и специфического праймера показывает преимущества последнего, что объясняется направленным синтезом кДНК нужной специфичности и отсутствием синтеза нецелевых продуктов. Таким образом, найдены условия последовательных стадий ОТ и ПЦР, в которых выход ДНК-мишени увеличен в несколько раз по сравнению со стандартными методиками с использованием наборов праймеров случайного состава.

Определение мРНК БЛ ТЕМ-1 в лабораторном штамме *E. coli*. Для получения стандартного образца мРНК использовали плазмиду рЕТ24 ВL21 с клонированным геном *bla*_{ТЕМ-1}, выделенную из клеток штамма *E. coli* – продуцентов рекомбинантной БЛ ТЕМ-1. Методом ПЦР амплифицировали продукт размером 1140 п. н., включающий полноразмерный ген *bla*_{ТЕМ-1}, совместно с участками промотора и терминатора бактериофага Т7 (рис. 6а). Этот продукт ПЦР использовали в качестве матрицы для синтеза специфичной мРНК данной БЛ в реакции транскрипции *in vitro*. Размер и чистоту полученного образца мРНК оценивали методом электрофореза в агарозном геле (рис. 6б). Основным продуктом реакции являлась одноцепочечная мРНК БЛ ТЕМ-1 размером 1095 н. Образец содержал также примесь ДНК-матрицы размером 1140 п.н., которую удаляли обработкой ДНКазой,

полноту удаления контролировали методом электрофореза. Очищенный от примесей ДНК образец использовали для приготовления стандартных образцов мРНК БЛ ТЕМ-1 с различными концентрациями (от 16500 до 0.0016 фмоль/мл).

Градуировочная зависимость для определения мРНК БЛ ТЕМ-типа, построенная с использованием стандартных образцов, приведена на рис. 7а. Предел обнаружения мРНК БЛ ТЕМ-1 составил 0.40 ± 0.05 амоль/мл, диапазон определяемых концентраций – от 1.0 амоль/мл до 2000 фмоль/мл, относительное стандартное отклонение не превышало 12%. Таким образом, разработана методика определения специфичных мРНК БЛ, которая позволила количественно определять мРНК с высокими чувствительностью и точностью.

Разработанную методику применили для определения мРНК БЛ ТЕМ-1 в клетках лабораторного штамма *E. coli* – продуцента данной БЛ. Из образцов бактериальных клеток с разной концентрацией (от 6×10^6 КОЕ/мл до 5×10^7 КОЕ/мл) выделили фракции общей РНК, в которых определили специфичную мРНК (рис. 7б). Для контроля экспрессии БЛ из образцов клеток *E. coli* с такой же концентрацией клеток были получены периплазматические фракции и в них определена ферментативная активность БЛ ТЕМ-1 в реакции гидролиза ампициллина (рис. 7в). Сравнение по-

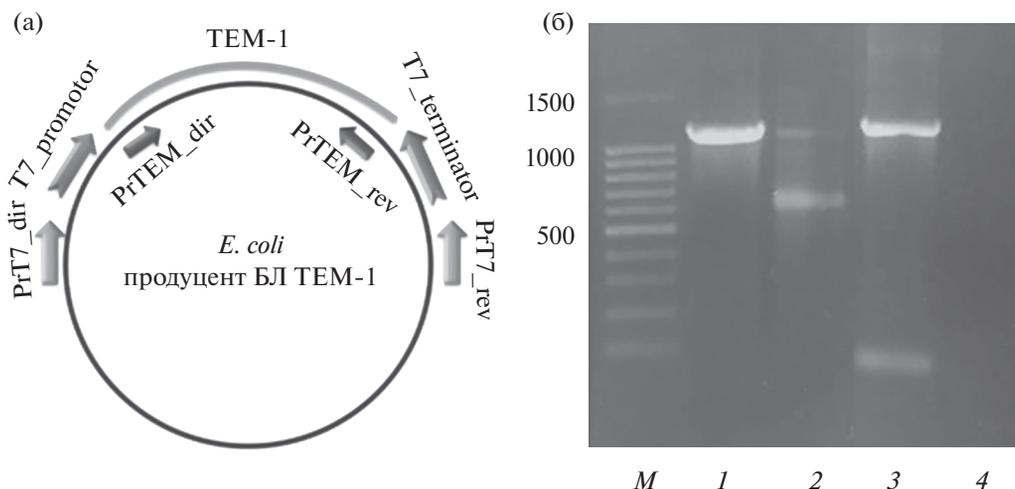


Рис. 6. (а): Строение фрагмента плазмиды рЕТ 24 BL21, использованного для получения мРНК БЛ TEM-1. (б): Электрофореграммы продуктов отдельных стадий синтеза мРНК БЛ TEM-1: *M* – смесь ДНК-маркеров известной длины; *1* – двухцепочечный ПЦР-продукт размером 1140 п. о. – фрагмент плазмиды рЕТ 24 BL 21, включающий ген БЛ TEM-1 с участками промотора и терминатора бактериофага T7; *2* – одноцепочечная РНК БЛ TEM-1 размером 1095 о., полученная в реакции транскрипции *in vitro* с примесью ДНК-матрицы размером 1140 п. о.; *3* – положительный контроль ПЦР – амплификация полноразмерного гена БЛ TEM-1; *4* – отрицательный контроль ПЦР.

лученных результатов показало, что концентрация специфичной мРНК линейно зависит от концентрации клеток, что хорошо коррелирует с уровнем ферментативной активности в периплазматической фракции этих же клеток.

Определение мРНК БЛ TEM-1 в клинических образцах грамотрицательных бактерий с разной чувствительностью к бета-лактамам антибиотикам. Разработанную методику применили для определения мРНК БЛ TEM-1 в клинических штаммах *E. coli* и *K. pneumoniae* с разным уровнем чувствительности к бета-лактамам антибиотикам (табл. 2). Два штамма (*E. coli* В-1350/18 и *K. pneumoniae* В-1088/17) были устойчивыми к ампициллину и чувствительными к остальным бета-лактамам, штамм *E. coli* В-2607/18 был чувствительным ко всем бета-лактамам антибиотикам и использовался как контрольный. Наличие генов БЛ в препаратах плазмидной ДНК, выделенных из клеток клинических штаммов, определяли методом гибридизационного анализа на биочи-

пах: у бактерий штаммов *E. coli* В-1350/18 и *K. pneumoniae* В-1088/17 обнаружили ген *bla*_{TEM-1}, в то время как в контрольном штамме *E. coli* В-2607/18 гены БЛ отсутствовали (табл. 2).

Выбранные клинические штаммы культивировали в присутствии разных концентраций ампициллина и в отсутствие антибиотика. Концентрации ампициллина выбрали согласно рекомендациям EUCAST: 8 мг/л – концентрация, соответствующая пороговой величине чувствительности к ампициллину у резистентных штаммов; 100 мг/л – стандартная концентрация, используемая при лечении ампициллином, 250 мг/л – повышенная концентрация антибиотика. Показано, что результаты культивирования бактерий зависят от типа штамма и концентрации антибиотика в среде культивирования (табл. 3). В отсутствие антибиотика бактерии всех исследованных штаммов выросли до одинаковой концентрации. При увеличении концентрации антибиотика клетки *K. pneumoniae* В-1088/17 рос-

Таблица 2. Характеристика клинических штаммов грамотрицательных бактерий, использованных в работе

Вид бактерий	Штамм	Источник выделения	МПК антибиотиков, мг/л				Плазмидно-локализованные гены БЛ
			AMP	CAZ	MER	AZT	
<i>E. coli</i>	В-1350/18	Моча	256	0.5	0.25	0.5	<i>bla</i> _{TEM-1}
<i>K. pneumoniae</i>	В-1088/17	Аспират	≥256	1	0.25	0.25	<i>bla</i> _{TEM-1}
<i>E. coli</i>	В-2607/18 (контроль)	Аспират	4	0.25	0.25	0.25	–

Обозначения: AMP – ампициллин, CAZ – цефтазидим, MER – меропенем, AZT – азтреонам.

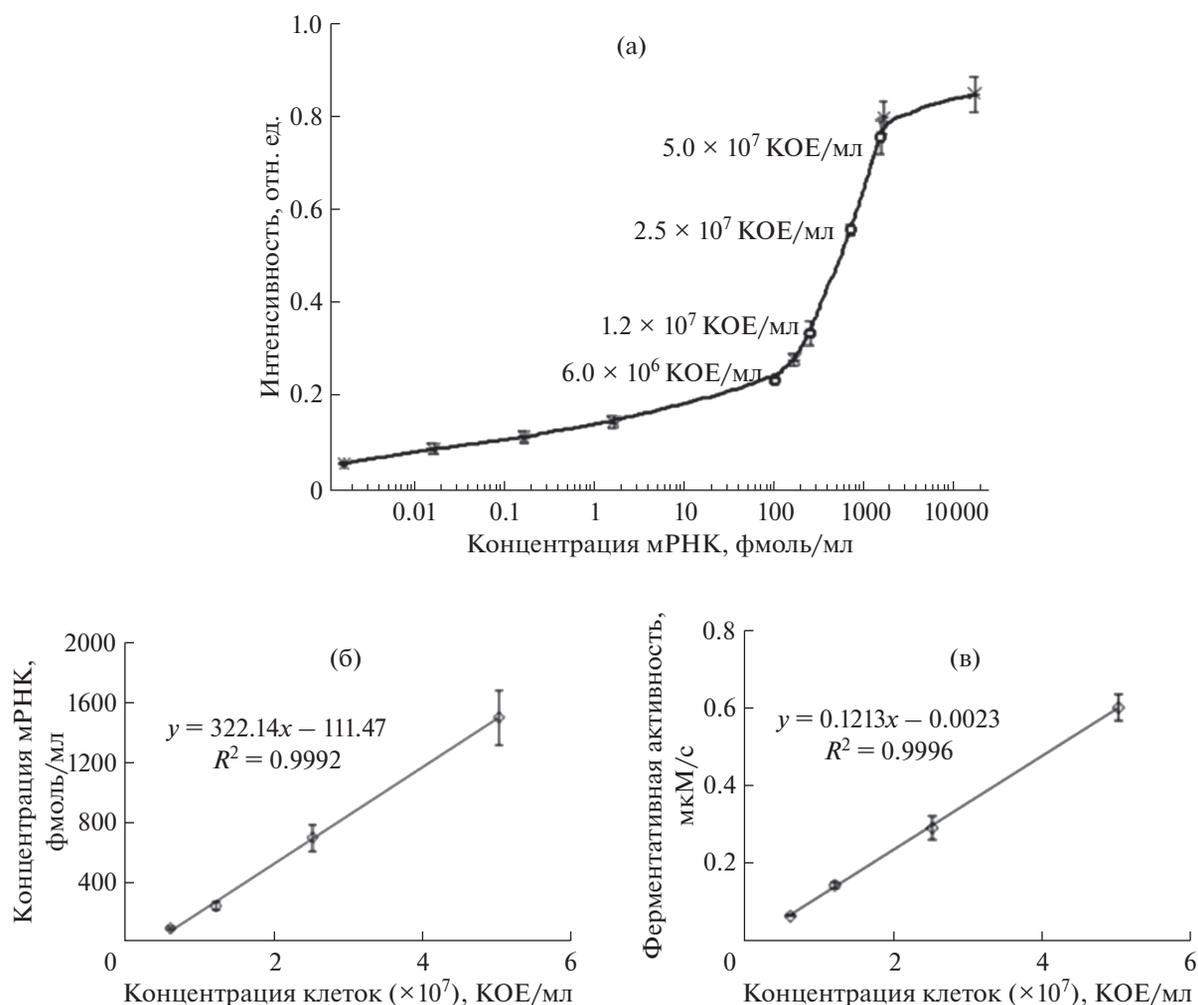


Рис. 7. (а): Градуировочная зависимость интенсивности окрашивания зон биочипа от концентрации мРНК БЛ TEM-1; (б): определение концентрации мРНК TEM-1 в образцах клеток лабораторного штамма *E. coli*; (в): определение ферментативной активности БЛ TEM-1 в реакции гидролиза ампициллина в периплазматических фракциях клеток лабораторного штамма *E. coli*.

ли только при низких концентрациях антибиотика (8 мг/л), при увеличении концентрации антибиотика от 100 мг/л клетки не росли, хотя по данным фенотипических тестов минимальная подавляющая концентрация (МПК) ампициллина для данного штамма превышала значение 256 мг/л. Клетки штамма *E. coli* В-1350/18 росли в присутствии всех использованных концентраций ампициллина, включая концентрацию, близкую к значению МПК.

Из бактериальных культур, выросших в присутствии антибиотика, выделяли общую РНК и анализировали описанным выше методом гибридационного анализа на биочипах. Интенсивность окрашивания специфичных зон биочипа нормировали на интенсивность окрашивания зоны положительного контроля. Результаты определения концентрации мРНК БЛ TEM-1 в РНК-транскриптах клинических штаммов приведены

на рис. 8. Культивирование штамма *E. coli* В-1350/18 в присутствии повышенных концентраций ампициллина (более 100 мг/л) индуцировало увеличение экспрессии гена bla_{TEM-1} примерно в 10 раз. Культивирование в присутствии пониженных концентраций ампициллина (8 мг/л) снижало экспрессию гена bla_{TEM-1} у обоих резистентных к ампициллину штаммов. Экспрессии гена bla_{TEM-1} у чувствительного к ампициллину штамма *E. coli* В-2607/18 не наблюдали.

Разработанная нами методика определения специфичных мРНК на колориметрических биочипах характеризуется высокой чувствительностью и существенно более высокой точностью по сравнению с методом ПЦР-РВ благодаря применению классического подхода биоаналитической

Таблица 3. Результаты определения концентрации клеток грамотрицательных бактерий, выращенных в присутствии различных концентраций ампициллина

Вид бактерий	Штамм	Концентрация клеток, выращенных в среде без антибиотика, КОЕ/мл	Концентрация клеток, выращенных в присутствии ампициллина, КОЕ/мл		
			8 мг/л	100 мг/л	250 мг/л
<i>E. coli</i>	B-1350/18	1×10^9	8×10^8	6×10^8	5×10^8
<i>K. pneumoniae</i>	B-1088/17	1×10^9	1×10^9	Нет роста	Нет роста
<i>E. coli</i>	B-2607/18 (контроль)	1×10^9	Нет роста	Нет роста	Нет роста

химии – определения мРНК по градуировочной кривой, построенной с использованием стандартных образцов мРНК той же специфичности, в отличие от используемых ранее методов нормирования на результат определения мРНК референсного или контрольного гена [18, 39]. Стоит подчеркнуть, что выбор гена, экспрессия которого не зависит от условий эксперимента, представляет сложную задачу, использование нескольких контрольных генов существенно усложняет анализ и обработку результатов [40, 41].

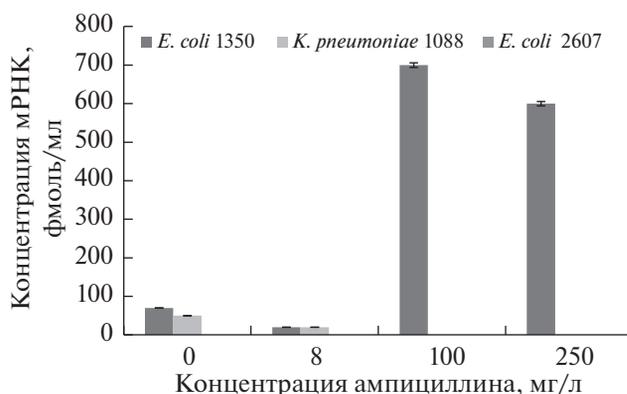
К преимуществам использованного нами подхода, основанного на анализе стандартных образцов, относится размер молекул мРНК, соответствующий полноразмерному гену БЛ. Ранее показано, что использование в качестве стандартов ДНК конструкций, представляющих собой небольшой фрагмент определяемого гена, не позволяет правильно определять количество мРНК в транскриптомном анализе бактерий из-за различий в эффективности синтеза меченых мРНК разного размера [42]. Другим преимуществом использования стандартных образцов мРНК, проходящих все стадии анализа вместе с исследуемыми образцами, является отсутствие необходимости определения эффективности отдельных стадий пробоподготовки (ОТ и ПЦР), что требуется при количественном определении экспрессии генов методом ПЦР-РВ [18, 43]. Точное определение эффективности этих стадий часто невозможно, так как она зависит от концентрации мРНК, структуры праймеров и выбранных генов.

Мы показали применимость разработанного подхода для определения экспрессии генов БЛ в РНК-транскриптах клинических штаммов семейства Enterobacteriaceae, выращенных в присутствии различных концентраций ампициллина, которые соответствуют концентрациям, используемым в клинической практике. Следует отметить высокую точность результатов определения мРНК в широком диапазоне концентраций, достигнутую благодаря использованию стандартных образцов для построения градуиро-

вочной зависимости. Таким образом, использование новой методики позволяет перейти от полуквантитативного анализа транскриптов генов, принятому в ПЦР-РВ, к количественному, что необходимо при изучении молекулярных механизмов индукции генов антибиотикорезистентности у бактерий с множественной устойчивостью к антибиотикам.

Размещение биочипов в лунках 96-луночного планшета позволяет существенно увеличить производительность методики. В данной работе определяли мРНК БЛ одного типа, однако используемый принцип мультианализа с размещением олигонуклеотидных зондов разной специфичности позволит определять на одном биочипе до десяти типов транскриптов генов. В настоящее время продолжительность анализа составляет около 7 ч, в дальнейшем она может быть сокращена при совмещении стадий ОТ и ПЦР и автоматизации процессов отмывки.

Таким образом, разработанная методика определения специфичных мРНК БЛ в РНК-транскриптах бактериальных клеток может быть использована для контроля экспрессируемых БЛ

**Рис. 8.** Определение мРНК БЛ TEM-1 в РНК-транскриптах клинических штаммов семейства Enterobacteriaceae, культивированных в присутствии ампициллина.

мультирезистентными к антибиотикам штаммами в клинических лабораториях, а также для изучения механизмов формирования устойчивости бактерий к антибиотикам. Дальнейшая оптимизация методики будет состоять в объединении стадий ОТ и ПЦР и увеличении количества определяемых специфичных мРНК БЛ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Госзадания МГУ им. М.В. Ломоносова по теме АААА-А21-121011290089-4 и РФФИ (Грант 19-34-50071).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Eichenberger E.M., Thaden J.T. Epidemiology and mechanisms of resistance of extensively drug resistant gram-negative bacteria // *Antibiotics* (Basel). 2019. V. 8. № 2. P. 37.
2. World Health Organization. Antibiotic resistance. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance> (01.07.2021).
3. Mulani M.S., Kamble E.E., Kumkar S.N., Tawre M.S., Pardesi K.R. Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: A review // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. P. 539.
4. Wright G.D. Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005. V. 57. № 10. P. 1451.
5. Егоров А.М., Уляшова М.М., Рубцова М.Ю. Бактериальные ферменты и резистентность к антибиотикам // *Acta naturae.* 2018. T. 10. № 4. С. 33. (Egorov A.M., Ulyashova M.M., Rubtsova M.Y. Bacterial enzymes and antibiotic resistance // *Acta naturae.* 2018. V. 10. № 4. P. 33.)
6. Klein E.Y., Van Boeckel T.P., Martinez E.M., Pant S., Gandra S., Levin S.A., Goossens H., Laxminarayan R. Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015 // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2018. V. 115. № 15. P. 3463.
7. King D.T., Sobhanifar S., Strynadka N.C.J. The Mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics / *Handbook of Antimicrobial Resistance.* 2017. P. 177.
8. Bush K. Past and present perspectives on β -lactamases // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2018. V. 62. № 10. Article e01076-18.
9. Edwards T., Williams C., Teethaisong Y., Sealey J., Sasaki S., Hobbs G., Cuevas L.E., Evans K., Adams E.R. A highly multiplexed melt-curve assay for detecting the most prevalent carbapenemase, ESBL, and AmpC genes // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2020. V. 97. № 4. Article 115076.
10. Dallenne C., Da Costa A., Decré D., Favier C., Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae // *J. Antimicrob. Chemother.* 2010. V. 65. № 3. P. 490.
11. Band V.I., Weiss D.S. Heteroresistance: A cause of unexplained antibiotic treatment failure? // *PLoS Pathog.* 2019. V. 15. № 6. Article e1007726.
12. Andersson D.I., Nicoloff H., Hjort K. Mechanisms and clinical relevance of bacterial heteroresistance // *Nat. Rev. Microbiol.* 2019. V. 17. № 8. P. 479.
13. Kjeldsen T.S.B., Overgaard M., Nielsen S.S., Bortolaia V., Jelsbak L., Sommer M., Guardabassi L., Olsen J.E. CTX-M-1 β -lactamase expression in *Escherichia coli* is dependent on cefotaxime concentration, growth phase and gene location // *J. Antimicrob. Chemother.* 2015. V. 70. № 1. P. 62.
14. Maurya A.P., Chanda D.D., Bora D., Talukdar A.D., Chakravarty A., Bhattacharjee A. Transcriptional response of multiple ESBL gene within *Escherichia coli* under oxymino-cephalosporin stress // *Microb. Drug Resist.* 2017. V. 23. № 2. P. 133.
15. Balabanian G., Rose M., Manning N., Landman D., Quale J. Effect of porins and blaKPC expression on activity of imipenem with relebactam in *Klebsiella pneumoniae*: Can antibiotic combinations overcome resistance? // *Microb. Drug Resist.* 2018. V. 24. № 7. P. 877.
16. Lietard J., Ameer D., Damha M.J., Somoza M.M. High-density RNA microarrays synthesized in situ by photolithography // *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 2018. V. 57. № 46. P. 15257.
17. Wang Y., Quc J., Baa Q., Donga J., Zhang L., Zhanga H., Wue A., Wangf D., Xia Z., Peng D., Shuf Y., Caoc B., Ji-ang T. Detection and typing of human-infecting influenza viruses in China by using a multiplex DNA biochip assay // *J. Virol. Methods.* 2016. V. 234. P. 178.
18. Bustin S., Nolan T. Talking the talk, but not walking the walk: RT-qPCR as a paradigm for the lack of reproducibility in molecular research // *Eur. J. Clin. Invest.* 2017. V. 47. № 10. P. 756.
19. Hughes T.R., Marton M.J., Jones A.R., Roberts C.J., Stoughton R., Armour C.D., Friend S.H. Functional discovery via a compendium of expression profiles // *Cell.* 2000. V. 102. № 1. P. 109.
20. Feng J., Billal D.S., Lupien A., Racine G., Winstall E., Légaré D., Ouellette M. Proteomic and transcriptomic analysis of linezolid resistance in streptococcus pneumoniae // *J. Proteome Res.* 2011. V. 10. № 10. P. 4439.
21. Al-Rubaye D.S., Henihan G., Al-Abasly A.K.A., Seagar A.L., Al-Attraqchi A.A.F., Schulze H., Hashim D.S., Kamil J.K., Laurensen I.F., Bachmann T.T. Genotypic assessment of drug-resistant tuberculosis in Baghdad and other Iraqi provinces using low-cost and low-density DNA microarrays // *J. Med. Microbiol.* 2016. V. 65. № 2. P. 114.
22. Moure R., Tudó G., Medina R., Vicente E., Caldito J.M., Codina M.G., Coll P., Español M., Gonzalez-Martin J., Rey-Jurado E., Salvadó M., Tórtola M.T., Alcaide F. Detection of streptomycin and quinolone resistance in mycobacterium tuberculosis by a low-density DNA array // *Tuberculosis (Edinb).* 2013. V. 93. № 5. P. 508.
23. Naas T., Cuzon G., Truong H., Bernabeu S., Nordmann P. Evaluation of a DNA microarray, the check-points ESBL/KPC array, for rapid detection of TEM, SHV, and CTX-M extended-spectrum beta-lactamases and KPC carbapenemases // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010. V. 54. № 8. P. 3086.
24. Rubtsova M.Yu., Ulyashova M.M., Edelstein M.V., Egorov A.M. Oligonucleotide microarrays with horseradish peroxidase-based detection for the identification of ex-

- tended-spectrum β -lactamases // Biosens. Bioelectron. 2010. V. 26. № 4. P. 1252.
25. Рубцова М.Ю., Уляшова М.М., Поболелова Ю.И., Преснова Г.В., Егоров А.М. Биочип для одновременной идентификации генов бета-лактамаз и карбапенемаз, обуславливающих устойчивость бактерий к бета-лактамам антибиотикам // Прикладная биохимия и микробиология. 2020. Т. 56. № 2. С. 1. (Rubtsova M.Yu., Ulyashova M.M., Pobolelova Yu.I., Presnova G.V., Egorov A.M. Biochip for simultaneous identification of beta-lactamase and carbapenemase genes conferring the bacterial resistance to beta-lactam antibiotics // Appl. Biochem. Microbiol. 2020. V. 56. № 2. P. 130.)
26. Díaz-González M., Pablo Salvador J., Bonilla D., Pilar Marco M., Fernández-Sánchez C., Baldi A. A microfluidic device for the automated electrical readout of low-density glass-slide microarrays // Biosens. Bioelectron. 2015. V. 74. P. 698.
27. Palzkill T. Structural and mechanistic basis for extended-spectrum drug-resistance mutations in altering the specificity of TEM, CTX-M, and KPC β -lactamases // Front. Mol. Biosci. 2018. V. 5. P. 1.
28. Pimenta A.C., Fernandes R., Moreira I.S. Evolution of drug resistance: insight on TEM β -lactamases structure and activity and β -lactam antibiotics // Mini Rev. Med. Chem. 2014. V. 14. № 2. P. 111.
29. Singh N.S., Singhal N., Kumar M., Viridi J.S. Exploring the genetic mechanisms underlying amoxicillin-clavulanate resistance in waterborne *Escherichia coli* // Infect. Genet. Evol. 2021. V. 90. Article 104767.
30. Hubbard A.T.M., Mason J., Roberts P., Parry C.M., Corless C., van Aartsen J., Howard A., Bulgasim I., Fraser A.J., Adams E.R., Roberts A.P., Edwards T. Piperacillin/tazobactam resistance in a clinical isolate of *Escherichia coli* due to IS26-mediated amplification of bla_{TEM-1B} // Nat. Commun. 2020. V. 11. № 1. P. 4915.
31. Grigorenko V.G., Andreeva I.P., Rubtsova M.Yu., Deygen I.M., Antipin R.L., Majouga A.G., Egorov A.M., Beshnova D.A., Kallio J., Hackenberg C., Lamzin V.S. Novel non- β -lactam inhibitor of β -lactamase TEM-171 based on acylated phenoxyaniline // Biochimie. 2017. V. 132. P. 45.
32. https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_10.0_Breakpoint_Tables.pdf (01.07.2021).
33. Birnboim H.C., Doly J. A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plasmid DNA // Nucleic Acids Res. 1979. V. 7. P. 1513.
34. Greisen K., Loeffelholz M., Purohit A., Leong D. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid // J. Clin. Microbiol. 1994. V. 32. № 2. P. 335.
35. Nossal N.G., Heppel L.A. The release of enzymes by osmotic shock from *Escherichia coli* in exponential phase // J. Biol. Chem. 1966. V. 241. № 13. P. 3055.
36. Schenborn E.T., Mierendorf R.C. Jr. A novel transcription property of SP6 and T7 RNA polymerases: Dependence on template structure // Nucleic Acids Res. 1985. V. 13. № 17. P. 6223.
37. Verma I.M. Reverse transcriptase / The Enzymes / Ed. Boyer P.D. N.Y.: Academic Press Inc., 1981. V. 14. P. 87.
38. Поболелова Ю.И., Уляшова М.М., Рубцова М.Ю., Егоров А.М. Мультиплексная ПЦР для совместной амплификации генов бактериальных ферментов карбапенемаз молекулярных классов А, В и D // Биохимия. 2014. Т. 79. № 6. С. 718. (Pobolelova Yu.I., Ulyashova M.M., Rubtsova M.Yu., Egorov A.M. Multiplex PCR for joint amplification of carbapenemase genes of molecular classes A, B, and D // Biochemistry (Moscow). 2014. V. 79. № 6. P. 566.)
39. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method // Methods. 2001. V. 25. № 4. P. 402.
40. Bustin S.A. The reproducibility of biomedical research: Sleepers awake // Biomol. Detect. Quantif. 2014. V. 2. P. 35.
41. Bustin S.A., Benes V., Garson J., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G. et al. The need for transparency and good practices in the qPCR literature // Nat. Methods. 2013. V. 10. P. 1063.
42. Курбатов Л.К., Згода В.Г. Использование ДНК-матрицы в качестве контроля при проведении транскриптомного анализа на стандартных микрочипах Agilent Technologies // Биомедицинская химия. 2016. Т. 62. № 6. С. 715. (Kurbatov L.K., Zgoda V.G. A possibility to use the DNA-based probes as internal standards for Agilent Technologies microarray transcriptomic analysis // Biomed. Khim. 2016. V. 62. № 6. P. 715.)
43. Bustin S.A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems // J. Mol. Endocrinol. 2002. V. 29. P. 23.

УДК 543.07;543.054

АВТОМАТИЧЕСКОЕ ЭКСПРЕСС-ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧЕТЫРЕХ КАРДИОМАРКЕРОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С КАРДИОПАТОЛОГИЯМИ

© 2022 г. Н. Л. Нечаева^{а, *}, О. Н. Сорокина^а, Т. С. Константинова^а, А. Д. Васильева^а,
Л. В. Юрина^а, Н. А. Бызова^б, А. Е. Бугрова^а, С. Н. Подойницын^а,
А. В. Еременко^а, И. Н. Курочкин^{а, с}

^аИнститут биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук
ул. Косыгина, 4, Москва, 110334 Россия

^бФедеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук
Ленинский просп., 33, стр. 2, Москва, 119071 Россия

^сМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет
Ленинские горы, 1, стр. 3, Москва, 119991 Россия

*e-mail: laboratoria.ibcp@gmail.com

Поступила в редакцию 23.06.2021 г.

После доработки 02.08.2021 г.

Принята к публикации 02.08.2021 г.

Предложен метод одновременного экспресс-определения четырех белков – кардиомаркеров (С-реактивный белок, цистатин С, миоглобин и Д-димер) в плазме крови пациентов с кардиопатологиями. Изменение концентрации каждого из белков в отдельности может указывать на определенные патологические процессы в организме человека, а одновременное повышение концентрации всех четырех маркеров свидетельствует о возможном развитии острой кардиопатологии. Экспресс-анализ основан на методе иммуномагнитной аффинной сепарации целевых белков из образцов крови с использованием флуоресцентной метки для каждого исследуемого белка. Предложенный метод автоматизирован и оптимизирован для определения физиологических и патологических концентраций целевых маркеров крови. Разработана автоматическая биоаналитическая платформа на основе предлагаемого метода, которая позволяет проводить экспресс-определение кардиомаркеров в 17 мкл плазмы крови за 14 мин.

Ключевые слова: кардиомаркер, флуоресцентный иммуноанализ, магнитные частицы, экспресс-анализ.

DOI: 10.31857/S0044450222050103

Широкий спектр заболеваний может демонстрировать сходные симптомы и для постановки точного диагноза требуется проведение дифференциальной диагностики патологического состояния. Так, например, можно перечислить целый ряд причин боли в груди. Они могут возникать в связи с заболеваниями сердца, легких, желудочно-кишечного тракта, и в этом случае важно как можно более точно определить происхождение боли. Одним из самых информативных видов анализа для диагностики является анализ крови на специфические маркеры (сердечно-сосудистые, воспалительные, почечные, онкологические и др.). Экспресс-тесты крови, доступные для индивидуального применения, или экспресс-анализ в больнице могут сделать предварительную диагностику более дифференцированной и эффективной. В клинической практике требуется

быстрый и точный анализ крови на инфекционные маркеры, заболевания почек и сердца. Ранняя диагностика таких биомаркеров может значительно снизить риск возникновения возможных осложнений и упростить лечение и реабилитацию пациента. Четыре белка плазмы человека – С-реактивный белок (СРБ), цистатин С (Цис-С), миоглобин (МГ) и Д-димер (Д-Дм) – отражают воспалительный или тромбоэмболический статус пациента и играют роль кардиомаркеров [1, 2]. Миоглобин – цитоплазматический белок скелетных мышц и миокарда с молекулярной массой 17.9 кДа. Физиологическая концентрация МГ в крови составляет от 6 до 85 нг/мл [3]. Избыток МГ позволяет оценить разрушение мышечной ткани, динамику процесса и эффективность лечения. Устойчивый избыток МГ в крови указывает на его продолжающееся высвобождение.

ние из мышечной ткани, так как его полувыведение из крови (через почки) составляет около 9 мин [4]. Цистатин С – это низкомолекулярный (13.4 кДа) белок, ингибитор цистеиновых протеаз, который продуцируется всеми ядродержащими клетками организма. Повышение уровня Цис-С в крови может указывать на умеренную почечную недостаточность и сердечно-сосудистую дисфункцию у пожилых пациентов [5]. Физиологический уровень Цис-С в плазме крови находится в диапазоне от 600 до 1200 нг/мл. С-реактивный белок – это белок с молекулярной массой 25 кДа, который участвует в воспалительных и иммунологических процессах. Физиологическая концентрация СРБ в плазме крови составляет около 1000 нг/мл, но может резко возрасти при острой фазе воспаления до 500 мкг/мл [6, 7]. Клинические исследования показали, что высокие значения СРБ (4.0–6.0 мкг/мл) связаны с риском сердечно-сосудистых дисфункций [8]. Д-димер представляет собой продукт разложения фибрина с молекулярной массой 180 кДа, уровень которого в крови увеличивается после фибринолиза. В клинической практике Д-Дм используется для контроля коагуляции и фибринолиза [9]. Физиологический диапазон Д-Дм составляет от 0 до 250 нг/мл [10]. Повышение концентрации Д-Дм указывает на активацию коагуляции (диссеминированное внутрисосудистое свертывание, тромбоз глубоких вен, легочная тромбоэмболия, массивное повреждение тканей или хирургическое вмешательство, сердечная недостаточность, опухолевые заболевания). И коагуляция, и фибринолиз приводят к увеличению уровня Д-Дм, в отличие от других подобных маркеров. Повышенное содержание каждого белка может указывать на серьезные проблемы со здоровьем, а их одновременное обнаружение позволит прояснить всю картину заболевания. Быстрое и точное одновременное определение этих четырех биомаркеров может упростить дифференциальную диагностику и выбрать корректную стратегию лечения.

Экспресс-определению сердечных биомаркеров в микрообъеме пробы посвящено немало работ. Так, описан [11] иммуносенсор для обнаружения Д-Дм в модельной системе с малым временем отклика (20 с), однако оно не включает затраты времени на промывку и регенерацию датчика. В работе [12] описан электрохимический биосенсор для определения МГ в 1 мкл неразбавленной плазмы в течение 30 мин. Этот иммуносенсор работает в широком диапазоне концентраций МГ – от значений, характерных для здоровых доноров, до типичных для пациентов с острым инфарктом миокарда. Тем не менее особый интерес представляют работы, в которых обсуждается одновременное определение нескольких биомаркеров.

Мультиплексное определение может быть реализовано с помощью маркировки аналитов разными маркерами [13]. Используя два разных маркера можно определять два разных аналита. Например, иммуноанализ с использованием антител, меченных хелатными комплексами европия(III) и самария(III), использовали для определения МГ и сердечного тропонина Т с последующим флуоресцентным детектированием методом флуориметрии с временным разрешением. Одновременное определение СРБ и Д-Дм в плазме крови человека проводят методом спектроскопии отражения с предварительной градуировкой с использованием биотинилированных антител [14]. Каждый шаг занимает 20 мин, таким образом, весь анализ смеси двух аналитов длится примерно 45 мин. Описано также определение нескольких кардиомаркеров менее чем за 30 мин, но только в модельной системе [15]. Креатинкиназу МВ, СРБ, Д-Дм и ассоциированный с беременностью протеин-А плазмы определяли одновременно в буферном растворе с помощью интегрированной акустической платформы. Иммунохроматографический анализ (ИХА) также показал убедительные результаты [16]. Авторы описали ИХА-тест для быстрой количественной оценки трех биомаркеров (тропонин I, белок, связывающий жирные кислоты, и СРБ) в сыворотке всего за 10 мин. В интегрированном чипе [17] происходит связывание белков-маркеров на поверхности сенсора и регистрируется электрический сигнал, что позволяет одновременно определять три сердечных биомаркера: тропонин Т, креатинкиназу ММ и креатинкиназу МВ. Встроенный чип позволяет достичь предела обнаружения 1 пг/мл для трех сердечных биомаркеров из 2 мкл крови за 45 мин.

Несмотря на быстрое развитие точных методов определения, разделение и концентрирование целевых аналитов остается актуальной задачей. Магнитные частицы (МЧ) используются в качестве твердофазных носителей для аффинной сепарации и концентрирования аналита. В настоящее время МЧ, функционализированные антителами, широко используются в аналитической химии как для разделения сложных смесей, так и для специфического определения различных соединений [18–21]. Применение МЧ позволяет преодолеть проблему диффузионных ограничений, типичную для гетерогенной иммунореакции. Комбинация МЧ с различными методами определения приводит к сокращению продолжительности анализа и снижению пределов обнаружения за счет уменьшения объема образца и концентрирования определяемого вещества в зоне измерения соответственно [22–24].

В настоящей работе представлена автоматическая бионалитическая платформа (АБП) для проведения одновременного флуоресцентного опре-

деления методом иммуноанализа на магнитных частицах четырех кардиомаркеров в плазме крови пациентов с кардиопатологиями.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Ковалентная иммобилизация антител на магнитных частицах с помощью поверхностной функциональной аминогруппы ($-\text{NH}_2$). Поверхность МЧ функционализировали моноклональными антителами путем ковалентного связывания через глутаровый альдегид согласно протоколу производителя (Силекс, Россия). 1.75 мл смеси 0.025 М натрий-фосфатного буферного раствора, 22% глутаральдегида и 6 мг/мл МЧ в конечном объеме инкубировали в течение 3 ч при комнатной температуре при постоянном перемешивании. Затем МЧ промывали 0.025 М натрий-фосфатным буферным раствором (рН 7.4). После этого 1 мл раствора антител **At1** (анти-МГ клон 4E2сс, анти-СРБ клон С2сс, анти-Д-Дм клон DD189сс, анти-Цис-С клон Cyst24сс), содержащего аскорбиновую кислоту (5 мМ), добавляли в суспензию МЧ до конечной концентрации 0.5 мг/мл и инкубировали полученную смесь при постоянном перемешивании в течение 2 ч при комнатной температуре. Для пассивации свободной поверхности магнитных частиц к суспензии добавляли 0.5% бычьего сывороточного альбумина (**БСА**) и инкубировали в течение 3 ч при постоянном перемешивании. Несвязанные антитела и другие избыточные реагенты удаляли из суспензии многократной промывкой 0.05 мМ фосфатным буферным раствором (**ФСБ**) с рН 7.4. Затем МЧ ресуспендировали в 1 мл **ФСБ** с 0.1% **БСА** для получения стоковой суспензии 10 мг/мл. Для предотвращения бактериального загрязнения к готовой суспензии добавляли 20 мкл 1%-ного раствора азида натрия. Модификацию МЧ моноклональными антителами контролировали неконкурентным гетерогенным иммуноферментным анализом (**ИФА**) на магнитных частицах в качестве твердой фазы.

Синтез флуоресцентных конъюгатов. Антитела конъюгировали флуоресцентной меткой следующим образом: 200 мкл 0.1 мМ раствора антител **At2** (анти-МГ клоны 7С3сс, анти-СРБ Сбсс, анти-Д-Дм DD255сс и анти-Цис-С Cyst19сс) в 50 мМ **ФСБ** с рН 7.4 смешивали с 0.5 мМ раствором сложного эфира N-гидроксисукцинимид бордипиррометенового флуорофора BDP 558/568 (**Фл**) в диметилсульфоксиде и инкубировали в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре при непрерывном перемешивании. Избыточные непрореагировавшие реагенты с низкой молекулярной массой удаляли диализом против **ФСБ**. Концентрацию антител в конъюгатах определяли спектрофотометрически с антивидовыми моноклональными антителами мыши, конъюгирован-

ными пероксидазой хрена, на микропланшетах, покрытых антигеном, при $\lambda = 450$ нм. Молярное отношение флуоресцентной метки к антителу в конъюгатах составляло 1.2–1.5.

Автоматизированная биоаналитическая платформа для одновременного определения биомаркеров. Автоматизированная биоаналитическая платформа для определения биомаркеров на МЧ методом иммуноанализа была изготовлена в лаборатории совместно с Троицким инженерным центром и позволяет одновременно определять антигены (**Ag**) МГ, Цис-С, СРБ и Д-Дм в плазме крови. Такая платформа состоит из чипа с реагентами, столика-манипулятора, микронасосов Cavo® XCalibur Pump (XC) (Tecan Trading AG, Швейцария) и системы детекции флуоресценции с длиной волны возбуждения 532 нм (зеленый твердотельный диодный лазер). Все действия манипулятора, насосов и детектора флуоресценции контролировались программой автоматического управления, разработанной авторами. Общая продолжительность процедуры, включая введение образца, смешивание, инкубацию, промывку и детектирование сигнала, составила 14 мин.

Автоматизированная биоаналитическая платформа (рис. 1) работает следующим образом. Чип с реагентами (1) устанавливается на платформу столика-манипулятора (2) и запускается компьютерная программа автоматического управления биоаналитической платформой. Для каждого аналита имеется отдельная лунка с МЧ, мечеными специфическими антителами. Четыре отдельные лунки чипа подключены к промывочной насосной системе (3) для инкубации и промывки аналитов. Наконечник (4) разносит плазму крови в лунки для образцов. Объемы плазмы, необходимые для анализа, зависят от средней концентрации и молекулярной массы белка в плазме крови. Объемы образцов и флуоресцентного конъюгата представлены в табл. 1. Для проведения автоматического анализа аналиты разделены на две группы с высокой (СРБ и Цис-С) и низкой (МГ и Д-Дм) концентрацией в крови. Образец плазмы для определения МГ и Д-Дм разбавляют в два раза флуоресцентными конъюгатами, а в случае СРБ и Цис-С – в десять раз. Такая схема разбавления позволяет учесть разницу концентраций аналитов в два порядка. После добавления образца плазмы крови к МЧ и флуоресцентному конъюгату на поверхности МЧ формируется комплекс **At1–Ag–At2–Фл**. Не связавшиеся в комплекс реагенты удаляются с помощью промывки лунок раствором **ФСБ**, при этом МЧ удерживаются в лунке внешним магнитным полем от постоянного магнита (NdFeB).

Образцы плазмы крови были предоставлены городской клинической больницей № 51 и про-

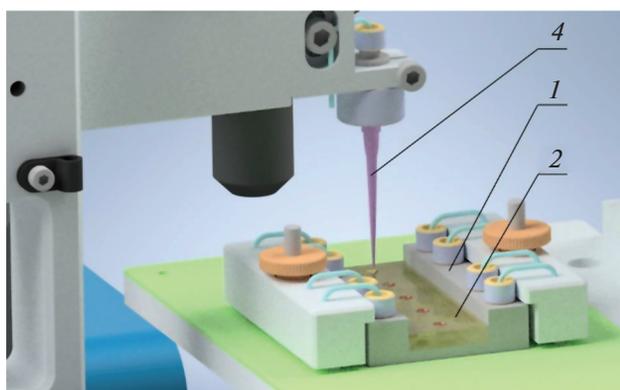
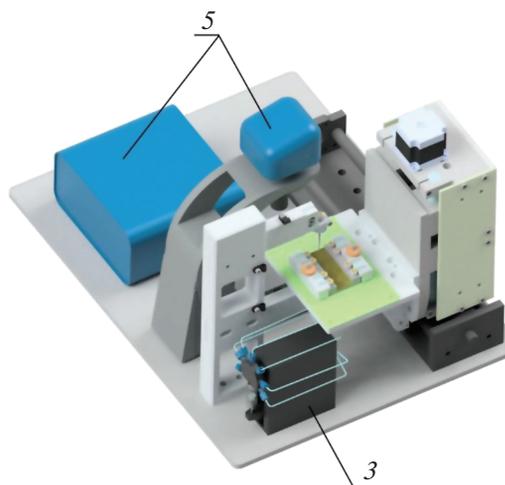


Рис. 1. Схема работы автоматизированной биоаналитической платформы для одновременного количественного анализа. 1 – чип с реагентами, 2 – платформа манипулятора, 3 – система промывочных насосов, 4 – наконечник, 5 – детектор флуоресценции.

анализированы в больнице на автоматическом анализаторе Siemens.

Флуоресцентные измерения с поверхности МЧ выполняли с использованием флуоресцентного анализатора (5) – спектрометра innoRam (BWTech) с лазером 532 нм (максимальная мощ-

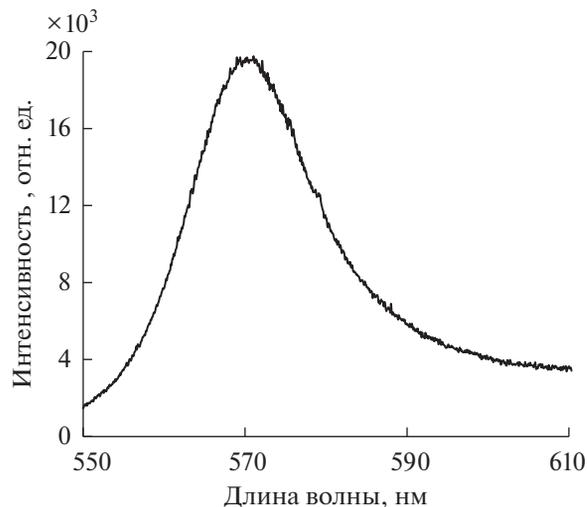


Рис. 2. Спектр флуоресценции красителя бордипирометенового флуорофора BDP 558/568.

ность 40 мВт), оснащенного видеомикроскопом ВАС102. Объектив PL L 10/0.40 фокусирует лазерный луч в пятно шириной 210 мкм. Интенсивность излучения лазера оптимизировали для каждого анализа (см. табл. 1). Все эксперименты проводили в трехкратной повторности. Рассчитывали среднее значение и доверительный интервал.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Биомаркеры определяли одностадийным методом иммуноанализа на МЧ с флуоресцентным детектированием. Спектр флуоресценции красителя BDP 558/568 представлен на рис. 2. В качестве аналитического сигнала в разработанной методике использовали максимальную интенсивность спектров флуоресценции. Принцип анализа и схема его проведения подробно описаны в работе [25].

Пределы обнаружения аналитов предлагаемым методом составляют: для МГ 5.7 нг/мл (0.32 нмоль/л), для Цис-С – 143 нг/мл (10.7 нмоль/л), для СРБ –

Таблица 1. Условия одновременного автоматического определения четырех аналитов

Условие	МГ	Цис-С	СРБ	Д-Дм
Объем образца плазмы, мкл	5	1	1	10
Объем флуоресцентного конъюгата, мкл	5	8	8	10
Концентрация флуоресцентного конъюгата, мкг/мл	10	8	8	10
Время инкубации, мин	5	5	3	10
Интенсивность лазерного излучения для физиологических концентраций, мВт	20	4	4	30
Интенсивность лазерного излучения для патологических концентраций, мВт	4	1.2	1.2	12

Таблица 2. Результаты (нг/мл) одновременного определения кардиомаркеров в плазме крови пациентов с кардиопатологией с использованием разработанной автоматической биоаналитической платформы и данные, полученные в больнице № 51

№ пробы	СРБ		Цис-С		МГ		Д-Дм	
	АБП	больница	АБП	больница	АБП	больница	АБП	больница
1	25000 ± 500	62060	1500 ± 100	1170	135 ± 10	141	500 ± 50	—
2	800 ± 100	730	1800 ± 100	1770	51 ± 7	58	500 ± 50	233
3	19300 ± 500	16010	2600 ± 100	2170	51 ± 7	53	3220 ± 100	3728
4	1450 ± 100	1380	1150 ± 50	—	47 ± 7	—	550 ± 50	586
5	13700 ± 500	14970	1600 ± 100	—	52 ± 7	—	10000 ± 500	23312
6	15000 ± 500	41500	1150 ± 50	1150	67 ± 7	64	2900 ± 100	2915
7	1780 ± 100	1790	790 ± 50	760	41 ± 7	42	200 ± 30	377
8	1600 ± 100	2030	950 ± 50	990	44 ± 7	41	1400 ± 100	1509
9	18000 ± 500	11170	1070 ± 50	960	44 ± 7	49	700 ± 50	621
10	25000 ± 500	45170	1600 ± 100	1350	74 ± 10	74	680 ± 50	582
11	16500 ± 500	16640	2300 ± 100	2111	88 ± 10	70	10000 ± 500	—
12	2000 ± 100	470	1320 ± 50	1320	42 ± 7	42	600 ± 50	—
13	12000 ± 500	8700	1700 ± 100	1650	44 ± 7	46	200 ± 30	206
14	3700 ± 300	3550	1100 ± 50	830	55 ± 7	30	600 ± 50	—
15	1700 ± 100	4700	1700 ± 100	—	40 ± 7	—	420 ± 50	566
16	6000 ± 300	4930	1030 ± 50	1020	60 ± 7	61	950 ± 50	956
17	25000 ± 500	64030	900 ± 50	700	54 ± 7	56	1300 ± 100	981

67 нг/мл (2.7 нмоль/л), для Д-Дм — 61 нг/мл (0.34 нмоль/л) [25].

Автоматизация может упростить мультиплексное обнаружение за счет сокращения затрат времени на рутинные процедуры, такие как промывка и перенос реагентов, а также за счет выполнения нескольких процессов одновременно.

Ранее одновременное определение четырех кардиомаркеров в плазме крови с помощью автоматизированной биоаналитической платформы проводили в плазме крови доноров с физиологическими концентрациями кардиомаркеров. В настоящей работе аналитические возможности платформы расширены и выполнено определение патологических концентраций аналитов. Расширение диапазона определяемых содержаний границ стало возможным за счет дополнительной регистрации флуоресцентного сигнала в условиях, отличных от условий регистрации сигнала от образцов с физиологическими параметрами (табл. 1). Такой подход позволяет получать количественные данные о концентрации белков за пределами их физиологических значений без проведения дополнительных операций по разведению образца, в отличие от анализа методом ИФА. Исследовали образцы крови пациентов с кардиопатологией. Результаты автоматизированного определения концентраций кардиомаркеров в образцах крови 17 пациентов с кардиопатологией представле-

ны в табл. 2 в сравнении с показателями концентраций маркеров, предоставленных ГКБ № 51.

Из табл. 2 видно, что с учетом стандартной погрешности определения результаты, полученные с использованием разработанной биоаналитической платформы, соответствуют данным ГКБ № 51. Диапазон определяемых концентраций в плазме крови с помощью АБП для СРБ составляет 200–25000 нг/мл, для Цис-С 770–2600 нг/мл, для МГ 14–135 нг/мл, для Д-Дм 8–10000 нг/мл.

Разработанный способ флуоресцентного иммуноанализа с использованием магнитных микрочастиц позволяет проводить автоматизированное одновременное определение четырех кардиомаркеров в диапазоне как физиологических концентраций, так и за их пределами с использованием 17 мкл плазмы крови в течение 14 мин. Результаты автоматизированного экспресс-определения кардиомаркеров от 17 пациентов, выполненного на разработанной автоматической установке, коррелируют со значениями, полученными на автоматическом анализаторе Siemens в больнице № 51. Предлагаемый прототип может быть преобразован в стационарный прибор для экспресс-анализа крови и дифференциальной диагностики.

Работа выполнена за счет средств госзадания АААА-А19-119071890024-8 и АААА-А19-119110790066-5 и гранта РФФИ 20-21-00080.

Авторы выражают благодарность больнице № 51 за предоставленные образцы плазмы крови.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Suzuki T., Lyon A., Saggarr R., Heaney L.M., Aizawa K., Cittadini A., Mauro C., Citro R., Limongelli G., Ferrara F., Vriz O., Morley-Smith A., Calabrò P., Bossone E. Editor's choice-biomarkers of acute cardiovascular and pulmonary diseases // Eur. Hear. J. Acute Cardiovasc. Care. 2016. V. 5. P. 416.
2. Tripoliti E.E., Ioannidou P., Toumpaniaris P., Ramos A., Pacitto D., Lourme J.C., Goletsis Y., Naka K.K., Errachid A., Fotiadis D.I.I. Point-of-care testing devices for heart failure analyzing blood and saliva samples // IEEE Rev. Biomed. Eng. 2020. V. 13. P. 17.
3. Stone M.J., Waterman M.R., Harimoto D., Murray G., Willson N., Platt M.R., Blomqvist G., Willerson J.T. Serum myoglobin level as diagnostic test in patients with acute myocardial infarction // Br. Heart J. 1977. V. 39. P. 375.
4. Klocke F.J., Copley D.P., Krawczyk J.A., Reichlin M. Rapid renal clearance of immunoreactive canine plasma myoglobin // Circulation. 1982. V. 65. P. 1522.
5. Shlipak M.G., Katz R., Sarnak M.J., Fried L.F., Newman A.B., Stehman-Breen C., Seliger S.L., Kestenbaum B., Psaty B., Tracy R.P., Siscovick D.S. Cystatin C and prognosis for cardiovascular and kidney outcomes in elderly persons without chronic kidney disease // Ann. Int. Med. 2006. V. 145. P. 237.
6. Pepys M.B., Hirschfield G.M. C-reactive protein: A critical update // J. Clin. Invest. 2003. V. 111. P. 1805.
7. Simental-Mendía L.E., Sahebkar A., Rodríguez-Morán M., Zambrano-Galván G., Guerrero-Romero F. Effect of magnesium supplementation on plasma C-reactive protein concentrations: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials // Curr. Pharm. Des. 2017. V. 23. P. 4678.
8. Ridker P.M., Cook N. Clinical usefulness of very high and very low levels of C-reactive protein across the full range of framingham risk scores // Circulation. 2004. V. 109. P. 1955.
9. Adam S.S., Key N.S., Greenberg C.S. D-dimer antigen: current concepts and future prospects // Blood. 2009. V. 113. P. 2878.
10. La'ulu S.L., Dominguez C.M., Roberts W.L. Performance characteristics of the AxSYM D-dimer assay // Clin. Chim. Acta. 2008. V. 390. P. 148.
11. Ibupoto Z.H., Mitrou N., Nikoleli G.P., Nikolelis D.P., Willander M., Psaroudakis N. The development of highly sensitive and selective immunosensor based on antibody immobilized ZnO nanorods for the detection of D-dimer // Electroanalysis. 2014. V. 26. P. 292.
12. Suprun E., Bulko T., Lisitsa A., Gnedenko O., Ivanov A., Shumyantseva V., Archakov A. Electrochemical nanobiosensor for express diagnosis of acute myocardial infarction in undiluted plasma // Biosens. Bioelectron. 2010. V. 25. P. 1694.
13. Wang L., Xu M., Huang R., Chang X., Chen C., Li L., Zhang Z., Han Y. A dual-label time-resolved fluorescence immunoassay for the simultaneous determination of cardiac troponin T and myoglobin // SLAS Technol. 2017. V. 22. P. 130.
14. Koukouvinos G., Petrou P., Misiakos K., Drygiannakis D., Raptis I., Stefanitis G., Martini S., Nikita D., Goustouridis D., Moser I., Jobst G., Kakabakos S. Simultaneous determination of CRP and D-dimer in human blood plasma samples with white light reflectance spectroscopy // Biosens. Bioelectron. 2016. V. 84. P. 89.
15. Mitsakakis K., Gizeli E. Detection of multiple cardiac markers with an integrated acoustic platform for cardiovascular risk assessment // Anal. Chim. Acta. 2011. V. 699. № 1. P. 1.
16. Byzova N.A., Zherdev A.V., Vengerov Y.Y., Starovoitova T.A., Dzantiev B.B. A triple immunochromatographic test for simultaneous determination of cardiac troponin I, fatty acid binding protein, and C-reactive protein biomarkers // Microchim. Acta. 2017. V. 184. P. 463.
17. Zhang G.J., Luo Z.H.H., Huang M.J., Ang J.J., Kang T.G., Ji H. An integrated chip for rapid, sensitive, and multiplexed detection of cardiac biomarkers from fingerprick blood // Biosens. Bioelectron. 2011. V. 28. P. 459.
18. Xie L., Jiang R., Zhu F., Liu H., Ouyang G. Application of functionalized magnetic nanoparticles in sample preparation // Anal. Bioanal. Chem. 2014. V. 406. P. 377.
19. Lee E.A., Yim H., Heo J., Kim H., Jung G., Hwang N.S. Application of magnetic nanoparticle for controlled tissue assembly and tissue engineering // Arch. Pharm. Res. 2014. V. 37. P. 120.
20. Li C., Ma C., Wang F., Xi Z., Wang Z., Deng Y., He N. Preparation and biomedical applications of core-shell silica/magnetic nanoparticle composites // J. Nanosci. Nanotechnol. 2012. V. 12. P. 2964.
21. Colombo M., Carregal-Romero S., Casula M.F., Gutiérrez L., Morales M.P., Böhm I.B., Heverhagen J.T., Prosperi D., Parak W.J. Biological applications of magnetic nanoparticles // Chem. Soc. Rev. 2012. V. 41. P. 4306.
22. de Ávila B.E.F., Escamilla-Gómez V., Lanzone V., Campuzano S., Pedrero M., Compagnone D., Pingarrón J.M. Multiplexed determination of amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide and C-reactive protein cardiac biomarkers in human serum at a disposable electrochemical magnetoimmunosensor // Electroanalysis. 2014. V. 26. P. 254.
23. Yang Z., Wang H., Guo P., Ding Y., Lei C., Luo Y. A multi-region magnetoimpedance-based bio-analytical system for ultrasensitive simultaneous determination of cardiac biomarkers myoglobin and C-reactive protein // Sensors (Switzerland). 2018. V. 18. P. 1765.
24. Nechaeva N.L., Sorokina O.N., Konstantinova T.S., Vasilyeva A.D., Yurina L.V., Byzova N.A., Bugrova A.E., Yanovich S.V., Eremenko A.V., Kurochkin I.N. Simultaneous express immunoassay of multiple cardiac biomarkers with an automatic platform in human plasma // Talanta. 2021. V. 224. Article 121860.

СОВРЕМЕННАЯ ПРАКТИКА НЕЦЕЛЕВОГО ХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

© 2022 г. Б. Л. Мильман^{a, b, *}, И. К. Журкович^b^aИнститут экспериментальной медицины

ул. Академика Павлова, 12, Санкт-Петербург, 197376 Россия

^bНаучно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова ФМБА России

ул. Бехтерева, 1, Санкт-Петербург, 192019 Россия

*e-mail: bormilman@yandex.ru

Поступила в редакцию 19.06.2021 г.

После доработки 08.08.2021 г.

Принята к публикации 09.08.2021 г.

Представлен обзор основных методов, процедур и информационных продуктов, применяемых в нецелевом анализе (НЦА) при установлении неизвестного состава веществ. Предпочтительны методы пробоотбора и пробоподготовки, обеспечивающие извлечение определяемых соединений из анализируемых образцов в широком диапазоне свойств аналитов с наименьшими их потерями. Необходимые методы анализа представляют собой различные варианты хроматографии–тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения (ХМС), которые обеспечивают получение индивидуальных характеристик аналитов (масс-спектров, характеристик удерживания) с целью их правильной идентификации. Приоритизация аналитической стратегии позволяет отбросить ненужные определения и тем самым повысить эффективность НЦА. Химические базы данных, массивы справочных масс-спектров и характеристик удерживания, алгоритмы и программы обработки данных ХМС незаменимы в НЦА.

Ключевые слова: нецелевой анализ, масс-спектрометрия, хроматография, экстракция, информатика, базы данных.

DOI: 10.31857/S0044450222050085

Нецелевой химический анализ (НЦА) представляет собой установление неизвестных аналитики компонентов анализируемых образцов (“известных неизвестных”, табл. 1), а также “неизвестных неизвестных”, табл. 1). В общем случае наиболее вероятно обнаружение тех или иных аналитов, относящихся к массиву нескольких миллионов распространенных индивидуальных соединений [1, 2]. Нецелевой химический анализ занимает все более значительное место в современных научных исследованиях химиков и биохимиков и практической деятельности технологов и инженеров. Это определяется тремя факторами. Первый из них отражает возрастающие потребности в таких аналитических определениях, которые связаны с появлением новых (emerging) загрязнителей окружающей среды, более полным контролем качества продуктов питания, последовательным усилением внимания к здоровью человека и т.д. Два других фактора позволяют реализовать возможности таких анализов. Здесь следует указать на современный высокий уровень развития аналитической методологии как следствие разработки новых типов и моделей хроматографов и масс-спектрометров, новых вариантов извлече-

ния соединений из анализируемых сред. Наконец, важно отметить бурное развитие информатики, сопровождающееся наращиванием характеристик компьютеров и их сетей; появлением новых баз данных (БД); созданием алгоритмов и соответствующих программ, позволяющих эффективно манипулировать большими объемами получаемых данных и справочной информации. Названные факторы обуславливают резкий рост числа публикаций в области НЦА: более половины научных статей приходится на последние пять лет (рис. 1).

Методология НЦА, используемая практически во всех областях химической аналитики, рассмотрена в многочисленных обзорах, часто связанных с отдельными объектами исследований (табл. 2). Методы и способы НЦА непрерывно совершенствуются, и имеет смысл зафиксировать современный уровень его *общего* развития, типичный для большинства объектов анализа. Такого рода *общие* характеристики НЦА будут рассмотрены в данной статье в сжатом обзорном виде. Наряду с методами анализа, подготовки проб и обработки информации, будет обсуждаться вопрос об эффективности НЦА, уровне его ошибок.

Таблица 1. Основные термины нецелевого химического анализа

Английский термин	Русский эквивалент	Комментарии
Untargeted/non-target/ non-targeted/nontargeted/nontarget analysis/screening	Нецелевой анализ/скрининг	Определение неизвестных аналитику компонентов анализируемых образцов; глагольные формы термина (окончание <i>-ed</i>) типичны прежде всего для описаний анализа биообъектов (метабономика, протеомика)
(General) unknown analysis/screening	Анализ пробы/образца/ вещества неизвестного состава	Старый, стабильный термин (эквивалентный нецелевому анализу) в английском языке; используется в криминалистике, судебной медицине, токсикологии
Screening	Скрининг	Быстрое обнаружение аналитов с предварительным заключением об их природе. Наблюдаются отчетливые аналитические сигналы (хроматографические и массовые пики), надежная идентификация проблематична
Suspect analysis	Определение ожидаемых соединений (ООС)	Промежуточен между целевым анализом (ЦА), реализуемым по стандартным методикам, и НЦА
Effect-directed analysis	Анализ, направляемый эффектом	Анализ части пробы, которая содержит биологически активные соединения, проявляя ту или иную биологическую активность
Analytical strategy	Аналитическая стратегия	Совокупность и последовательность основных используемых методов, методик и операций
Prioritiz(s)ation	Приоритизация	Предпочтение в определении тех или иных аналитов, имеющих те или иные свойства
Annotation	Аннотация	Формальная процедура приписания характеристик определяемого соединения аналитическому сигналу. Термин достаточно часто используется вместо “идентификации”
Identification level	Уровень идентификации	Степень детализации в заключении о формуле и структуре аналита
Chemical space	Химическое пространство	Совокупность всех известных и/или возможных химических соединений
Known unknown	“Известное неизвестное” соединение	Известное соединение, его состав и строение установлены ранее, но факт присутствия в пробе аналитику неизвестен
Unknown unknown	“Неизвестное неизвестное” соединение	Новое соединение; его строение и свойства еще не установлены в результате экспериментальных исследований

В большинстве случаев, однако, не существует способов достоверной оценки таких ошибок. О правильности результатов НЦА часто можно судить лишь по тому, что реализована *современная надлежащая практика* его проведения. Это означает, что соответствующая работа включает основные необходимые стадии анализа, приборы, программы и базы данных, кратко рассмотренные в этой обзорной статье.

В обзоре затрагиваются низкомолекулярные соединения; преимущественно цитируется наиболее значимая литература последних лет, содержащая ссылки на предыдущие исследования. Следует отметить новые руководства по проведению НЦА в отдельных научных областях [16, 18, 21]; эти публикации имеют особое значение при начале работы в рассматриваемой области аналитики.

КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕЦЕЛЕВОГО АНАЛИЗА

В наиболее широком смысле НЦА включает определение всех компонентов образца, состав которого неизвестен аналитику до эксперимента. Выбор *приоритетов* (см. ниже) может внести поправки в количество и природу определяемых соединений. Стадии НЦА формально совпадают для большинства объектов анализа (рис. 2). Результат анализа – соединения, обнаруженные и идентифицированные в пробе. Количественные определения обычно не ассоциируются с НЦА, но могут быть проведены вслед за идентификацией аналитов. Полноценное количественное определение требует подходящих методик анализа и аналитических стандартов. Полуколичественное определение возможно при использовании в качестве стандартов соединений со сходной структурой или при оценке относительной чувствительности методов к разным соединениям [12].

Основные методы НЦА – это различные варианты хроматографии-масс-спектрометрии (ХМС). В случае летучих соединений – это газовая хроматография (ГХ)-масс-спектрометрия (МС) с электронной ионизацией (ЭИ) и одним квадрупольным масс-анализатором. При определении нелетучих аналитов, к которым относится большинство биологически важных соединений, применяют высокоэффективную или ультраэффективную жидкостную хроматографию (В/УЭЖХ) в сочетании с тандемной масс-спектрометрией высокого разрешения (МС²ВР); в качестве устройства ионизации используют электрораспыление (ИЭР). Другие варианты масс-спектрометрии небеспользуются, но, как правило, менее эффективны. В последние годы развивается весьма ценное до-

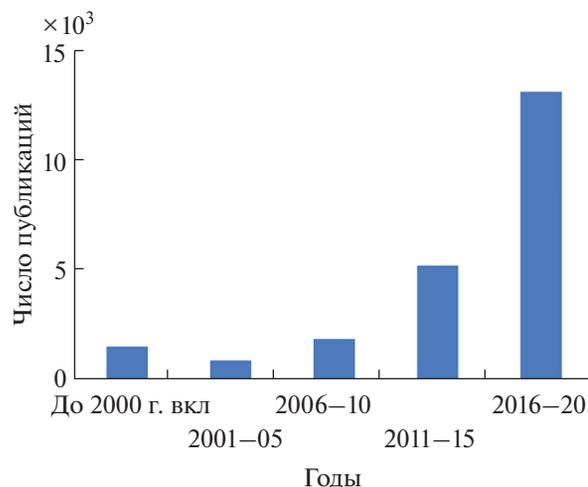


Рис. 1. Динамика числа публикаций в области нецелевого химического анализа. Оценка проведена в начале 2021 г. суммированием числа статей и других документов, которые найдены в результате поисков в системе Google Академия по различным англоязычным терминам, обозначающих этот вид анализа (см. табл. 1).

полнение к ХМС – спектрометрия ионной подвижности [22]. При обнаружении и определении структуры новых, неописанных в научной литературе соединений (“неизвестных неизвестных”) целесообразно их выделение из анализируемых образцов и дальнейшее применение спектроскопии ЯМР (в дополнение к МС).

Нецелевой химический анализ преимущественно касается органических (биоорганических) соединений. В обзоре рассмотрен именно этот предмет НЦА. Тем не менее к нему может от-

Таблица 2. Основные области нецелевого химического анализа и соответствующие объекты анализа

Область	Объект/матрица			
	воздух, вода, почва, донные отложения, отходы, мусор	пищевые продукты и напитки	моча, кровь, ткани и др. биоматрицы	образцы растительного и животного происхождения
Объекты окружающей среды [3–9]	++		+	+
Пища, продовольственное сырье, напитки [10–12]	+	++	+	+
Лекарства, наркотики, допинг [13–15]*			++	
Токсикология [13–15]*	+	+	++	+
Метаболомика [16–18]		+	++	+
Природные соединения [19, 20]	+			++

Примечание: ++ – основная матрица, + – более редкие анализы. * Объединяются в сфере криминалистики, судебной медицины.

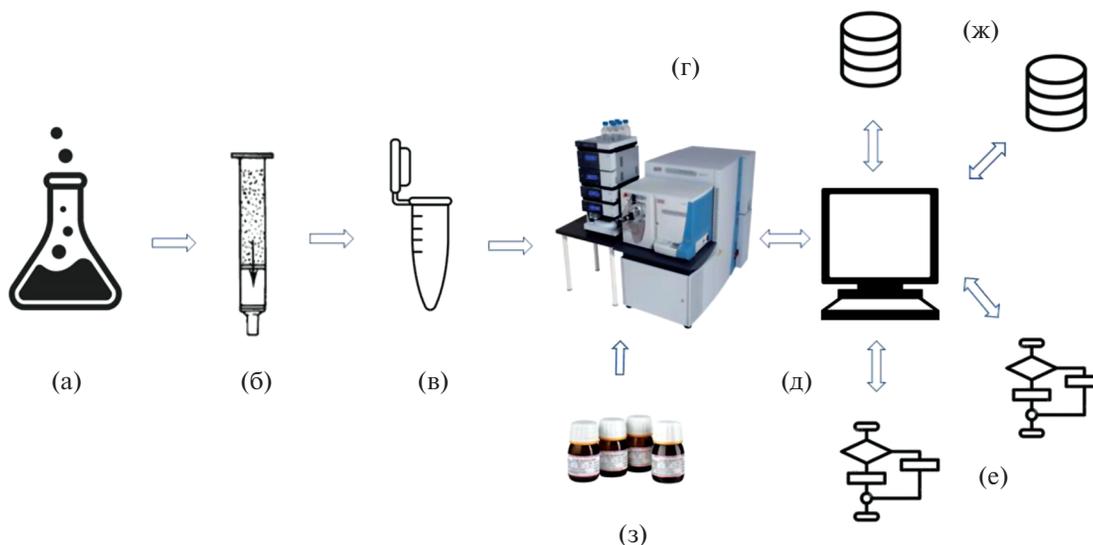


Рис. 2. Схематичное изображение НЦА образца (а). Аналиты (в) выделяют методом экстракции (б) и вводят в хромато-масс-спектрометр (г). Работа прибора управляется компьютером (д), снабженным многочисленными программами (е) и связанным с разнообразными базами данных (ж). Предусмотрено обеспечение аналитическими стандартами (з) для окончательной идентификации аналитов.

носиться и определение элементов, если рассматривается молекулярная форма их присутствия (speciation analysis); при этом применяется сочетание ВЭЖХ и МС с индуктивно связанной плазмой [23]). Другие виды “неорганического” НЦА важны, скорее, в историческом отношении.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ НЕЦЕЛЕВОГО АНАЛИЗА

Показатель, вынесенный в заголовок раздела, мы предлагаем определить как долю соединений, обнаруженных и/или правильно идентифицированных в результате НЦА. В случае скрининга эффективность НЦА можно выразить величиной P_c и формулой (1):

$$P_c (\%) = 100 \times \frac{\text{(Количество обнаруженных соединений)}}{\text{(Количество компонентов пробы)}} \quad (1)$$

Результат скрининга – обнаруженные компоненты анализируемой пробы и предварительное заключение об их природе. “Полноценный” же

НЦА, где требуется максимально полно и надежно идентифицировать компоненты образца, характеризуется величиной $P_{\text{НЦА}}$:

$$P_{\text{НЦА}} (\%) = 100 \times \frac{\text{(Количество идентифицированных соединений)}}{\text{(Количество компонентов пробы)}} \quad (2)$$

В общем случае величины P_c и $P_{\text{НЦА}}$ оценить очень сложно, поскольку состав анализируемой пробы и количество компонентов (знаменатель дроби) неизвестны. Числитель этих дробей вычислить легче, хотя не всегда понятно, насколько надежна соответствующая идентификация (см. ниже). Значения $P_{\text{НЦА}}$ можно оценить в случае модельной ситуации, например, используя специальные искусственные смеси соединений,

представляющие интерес для рассматриваемой области анализа [24, 25], и оценивая количество идентифицированных и неидентифицированных соединений. Величина $P_{\text{НЦА}}$ в этом случае представляет собой показатель правильных положительных результатов (ПП) [26, 27], который в тест-экспериментах со смесями, выпускаемыми американским агентством ЕРА, не превышал 65% для методов, основанных на ВЭЖХ-МС²ВР [24].

ПРИОРИТИЗАЦИЯ

Если приоритеты НЦА (табл. 1) сформулированы, проводится поиск соответствующих соединений, которые наиболее важны и обладают определенными свойствами/признаками. При этом число определяемых соединений сокращается, что уменьшает знаменатель формул (1) и (2) и, следовательно, увеличивает величину P .

Наиболее простой вариант НЦА реализуется в том случае, если ожидается присутствие в пробе тех или иных соединений (ООС, табл. 1) [4, 5, 7]. Такой анализ может быть близок к целевому, тем более что некоторые современные методики анализа включают определение многих сотен аналитов [28]. К ожидаемым относятся: (а) соединения, присутствующие в списках приоритетных загрязнителей окружающей среды, например в БД NORMAN [29]; (б) другие токсичные соединения, в том числе такие, опасные характеристики которых предсказаны; (в) вещества, часто встречающиеся в тех или иных матрицах; (г) соединения, родственные приоритетным, похожие на них по физико-химическим свойствам, в том числе продукты их трансформации (например, метаболиты).

Различие между ООС и “настоящим” НЦА заключается в том, что в первом случае число кандидатов на идентификацию (возможных аналитов) сравнительно невелико (соответствует выбранному приоритетам). Часто к ним относятся распространенные соединения, в отношении которых имеется представительная справочная хроматографическая и масс-спектрометрическая информация, что облегчает их идентификацию. В остальных случаях НЦА, которые охватывают менее популярные или менее ожидаемые соединения, в целом объем справочных данных не так велик и носит фрагментарный характер, поэтому поиск информации требует обращения к самым большим БД.

Если указывать другие варианты приоритизации, то к ним следует отнести “анализ, направляемый эффектом” (табл. 1). В этом случае контролируют (в том числе выделяют фракционированием) и анализируют ту часть пробы, которая проявляет биологическую активность. Еще один пример предпочтительного определения – хлор- и/или броморганические соединения, многие из которых относятся к опасным веществам. Их присутствие легко выявляется по характерной изотопной картине в масс-спектрах. Наконец, следует отметить тривиальный приоритет – основные компоненты проб, определяемые по наиболее интенсивным сигналам на хроматограммах и в масс-спектрах [8]. Родственная методология при поиске новых биологически активных соединений носит название “дерепликации”: здесь в первую очередь идентифицируют основные ком-

поненты проб (как правило, известные соединения) и далее исключают их из рассмотрения [19].

Приоритизация может распространяться не только на аналиты, но и на сами анализируемые образцы. Часть образцов общего происхождения можно пропускать, а детально анализировать только те из них, которые демонстрируют (а) интенсивные аналитические сигналы в ожидаемых участках хроматограмм и масс-спектров и, более того, (б) рост интенсивностей таких сигналов в серии проб.

ПРЕАНАЛИТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕДУРЫ

Качество этих процедур – отбора, транспортировки и хранения образцов – должно быть таким, чтобы не потерять искомые аналиты (приводит к ложным отрицательным результатам, ЛО; табл. 3) и не загрязнить пробу посторонними веществами (ложные положительные результаты, ЛП). Необходимые стандартные требования к таким процедурам сформулированы [16, 18, 21, 30], хотя трудно утверждать, что они выполняются во всех текущих исследованиях.

Техника отбора проб влияет на представительство различных аналитов в отобранном веществе и появление ложных результатов (табл. 3). При пассивном пробоотборе проб воздуха или воды соотношение между аналитами может зависеть от типа сорбента. В разовых пробах воды, отобранных простым зачерпыванием (grab), такая дискриминация компонентов смесей отсутствует [7].

Посторонние соединения (ЛП) в анализируемой пробе сравнительно легко выявляются при анализе холостых проб (подготовленных из матриц, матриалов, растворителей, реактивов и др. [16]). Труднее выявить ЛО. Для этого следует установить факт потери/разложения/превращения (в том числе биотрансформации) определяемых соединений до начала или в ходе анализа с использованием внутренних стандартов, что не просто сделать в НЦА, поскольку аналиты неизвестны. Тем не менее рекомендуют использовать добавки в анализируемые пробы – по одному соединению из каждого класса (группы) ожидаемых веществ [21] или из группы, представляющей тот или иной интервал физико-химических характеристик аналитов, например коэффициента распределения n -октанол–вода K_{OW} [8]. Аналогичным образом формируют тест-смеси для обеспечения качества анализа [18].

ПРОБОПОДГОТОВКА

Эта необходимая процедура представляет собой выделение аналитов из отобранных образцов, сопровождающееся концентрированием первых. В большинстве проводимых анализов жидких

Таблица 3. Источники и причины ложных результатов нецелевого химического анализа

Процедура, метод	ЛП*	ЛО
Преаналитические процедуры		Плохая сорбция при пробоотборе. Трансформация аналитов
Пробоподготовка		Потери аналитов, неэффективные процедуры экстракции, неполные целевые химические превращения (дериватизация, деконъюгация)
Хроматография	Совпадение характеристик удерживания разных соединений	Плохое разделение, слабые сигналы, вариация характеристик удерживания, испарение летучих аналитов в В/УЭЖХ, невозможность прямого определения нелетучих аналитов в ГХ, отсутствие справочных данных
Масс-спектрометрия	Совпадение масс-спектров разных соединений	Плохая ионизация, матричные эффекты, множественные формы ионов, содержащих молекулы аналита, слабые сигналы, ошибки в значениях ионных масс, плохая воспроизводимость масс-спектров, наложение спектров разных аналитов, отсутствие справочных данных

* Общие источники ЛП: компоненты используемых материалов и вспомогательных веществ; продукты превращения аналитов, возможность появления которых не исключена на всех стадиях НЦА.

(водных) образцов используется жидкостная или твердофазная (ТФЭ) экстракция. Разные аналиты обладают неидентичными физико-химическими свойствами, поэтому селективность рассматриваемых процедур и различная потеря аналитов неизбежны. Химические реакции (разложение, дегидратация, окисление, полимеризация), невольно сопровождающие процедуры пробоподготовки, приводят в ряде случаев к ложным результатам. К ним же приводит неполнота химических процедур, входящих в процесс пробоподготовки (табл. 3) [16].

В качестве экстрагентов для крови, плазмы крови и некоторых других биологических матриц используют водно-метанольные и водно-ацетонитрильные смеси, обеспечивающие близкую степень извлечения многих метаболитов. Кроме того, изменяя состав экстрагентов, можно поочередно извлекать и затем определять компоненты биологических матриц с разной полярностью [18]. Перспективен выбор тройных систем в качестве экстрагентов для плазмы крови, например использование смеси ацетонитрил–изопропанол–вода для извлечения полярных и умеренно полярных аналитов в диапазоне 25 порядков их величин K_{OW} [17]. Для биологических матриц неизбежны быстрые превращения (энзимные реакции), так или иначе влияющие на степень извлечения аналита [18]. Эти процессы останавливают замораживаем пробы или добавлением холодных растворителей.

Еще одна процедура, реализуемая в начале подготовки твердых образцов, а именно гомогенизация, может повлиять на результаты анализа,

если не будет сформирована представительная проба [21]. В этих случаях проводят измельчение в специальных мельницах, где также необходимо подавить активность ферментов по отношению к компонентам образцов растительного и животного происхождения. Аналиты из таких измельченных проб извлекают методами экстракции, например с использованием популярной процедуры QuEChERS [11, 12].

В некоторых случаях (сравнительно высокие концентрации определяемых веществ) возможен прямой анализ (прямая инъекция в хроматограф) жидких образцов, таких как сточные воды и моча, без существенной потери многих аналитов; при этом часто практикуют предварительное разбавление исходных проб (методы dilute-and-shoot) [8]. Тем не менее и здесь очень вероятны ЛО. При сравнении таких процедур и ТФЭ продемонстрировано, что во втором случае можно обнаружить в воде больше полярных соединений, нежели при прямом вводе сравнительно больших объемов (0.5–1 мл) воды в жидкостный хроматограф [9].

ХРОМАТОГРАФИЯ

Как и в ЦА, хроматография является основным методом разделения в НЦА, хотя применение капиллярного электрофореза [31] и спектрометрии ионной подвижности (в дополнение к жидкостной хроматографии) [32] в каких-то ситуациях может привести к успеху. Неполное хроматографическое разделение аналитов искажает параметры удерживания и масс-спектры, что приводит к ошибкам в идентификации мажорных аналитов и потере минорных компонентов

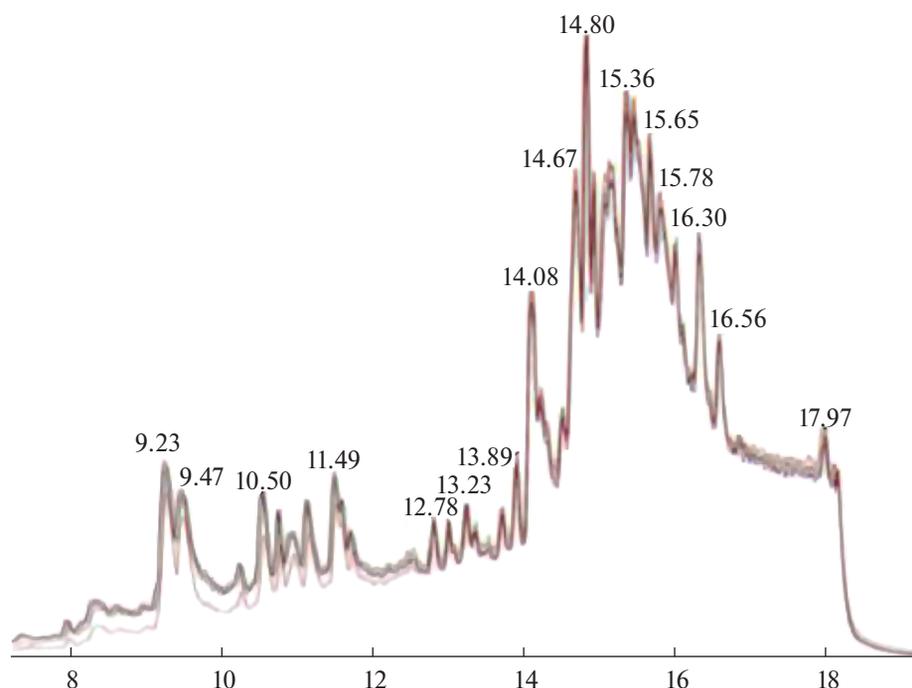


Рис. 3. Пример сложной хроматограммы, адаптирован из работы [33]. Образец ткани одного из участков головного мозга. Метод УЭЖХ-МС²ВР. Горизонтальная ось – время удерживания, мин.

анализируемых смесей (табл. 3). Наиболее трудны для анализа сложные образцы, содержащие десятки, сотни, тысячи компонентов, поскольку соответствующие хроматограммы содержат очень много пиков, значительная часть которых в той или иной степени перекрывается (рис. 3). По этой причине в хромато-масс-спектрометрии реализуют процедуру деконволюции – разделение на индивидуальные хроматограммы, соответствующие отдельным компонентам смесей, с использованием их масс-спектрометрических сигналов (рис. 4, программы, см. [16]).

Два основных вида хроматографии – газовая и жидкостная – применяются при определении летучих и нелетучих соединений соответственно.

В случае ГХ нелетучие соединения так или иначе теряются. Дериватизация (силилирование и другие реакции) может обеспечить их определение, хотя неполная дериватизация или испарение наиболее летучих производных могут привести к ЛО [16]. Вариант двумерной ГХ (ГХ-ГХ) приводит к более эффективному разделению смесей и решению некоторых важных аналитических задач качественного анализа П [27] – идентификации (характеризации, аутентификации и т.п.) самих анализируемых образцов [35, 36]. Традиционное сочетание ГХ-МС¹ дополняется в последние годы комбинациями ГХ (ГХ-ГХ) с более сложными вариантами масс-спектрометрии: МСВР и МС² [35, 36].

Для определения нелетучих соединений традиционно применяют обращенно-фазовую (ОФ) жидкостную хроматографию, в том числе в варианте, обеспечивающем лучшее разделение (ОФ-УЭЖХ). В последние годы набрала популярность гидрофильная хроматография (ННЛС) демонстрирующая в случае очень полярных аналитов лучшие характеристики разделения по сравнению с ОФ-В/УЭЖХ (где эти аналиты не удерживаются колонкой) [17, 18]. Тем не менее в случае ННЛС наблюдаются более существенные вариации времен удерживания и более частое присутствие матричных эффектов (типичное для ХМС подавление ионизации отдельных аналитов в масс-спектрометре) [18]. Это может приводить к ЛО вследствие плохого прогнозирования времен удерживания (порядка элюирования аналитов) и незначительных масс-спектрометрических сигналов соответственно.

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ

Масс-спектрометр – основной инструмент идентификации аналитов в НЦА [26, 27]. Определение “известных неизвестных” летучих соединений – сравнительно легко решаемая задача, обеспеченная сопоставлениями экспериментальных масс-спектров ЭИ с соответствующими справочными/библиотечными спектрами. Спектры этого вида достаточно хорошо воспроизводятся и зарегистрированы.

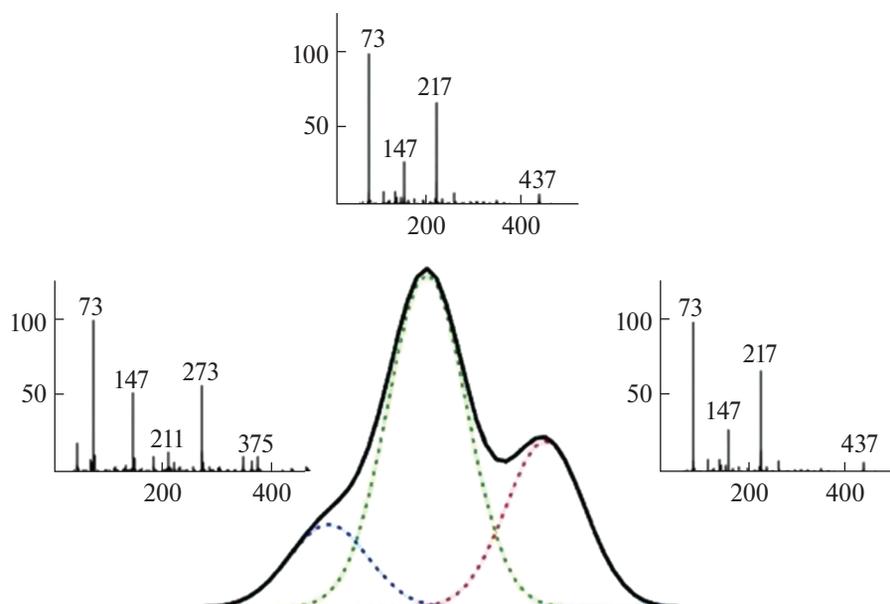


Рис. 4. Пример деконволюции хроматографического пика в ГХ-МС. Адаптирован из работы [34]. Масс спектры, горизонтальная ось — значения m/z , вертикальная ось — относительная интенсивность, %. Сложный хроматографический пик разделен на три гауссовых сигнала. Второй и третий масс-спектры очень похожи. Для различения этих аналитов необходимы справочные параметры удерживания и, в конечном счете, аналитические стандарты. Еще один путь анализа — применение MS^2 и MS^3 .

стрированы для подавляющего большинства распространенных летучих соединений (см. ниже).

В случае нелетучих соединений наибольшие возможности НЦА обеспечиваются масс-спектрометрией высокого разрешения и tandemной масс-спектрометрией, прежде всего в сочетании В/УЭЖХ-ИЭР- MS^2 ВР. В этом тандеме первый масс-спектрометр представляет собой квадрупольный масс-анализатор или ионную ловушку, второй — времяпролетный масс-анализатор или специальную ионную ловушку Orbitrap. Между двумя масс-анализаторами располагается та или иная ячейка столкновений ионов (ионов-предшественников) с газовой мишенью, формирующая фрагментные ионы, которые необходимы для идентификации аналитов.

Отметим, что наибольшее массовое разрешение — у приборов ионно-циклотронного резонанса [37], недоступных для подавляющего большинства химических лабораторий из-за своей очень высокой стоимости. Технику и методологию с использованием Orbitrap в последнее время могут называть “масс-спектрометрией высокого разрешения с определением точной массы” (high-resolution accurate-mass mass spectrometry) [38]. Применение масс-спектрометров с обычным “единичным” разрешением в какой-то степени также может приводить к успеху [39] при решении менее сложных задач НЦА. Различные аналитические методы основаны на комбинации разных вариантов хроматографии (ОФ или НЛ-

ИС, ВЭЖХ или УЭЖХ) и масс-спектрометрии (различные масс-анализаторы, положительные или отрицательные ионы и др.)

Указанные приборы высокого разрешения обеспечивают точность измерения масс (значений m/z) ионов-предшественников на уровне ppm, ионов-фрагментов — несколько хуже. Ионы-предшественники отбираются во всей совокупности их пиков в MS^1 -спектрах (сбор данных, независимых от исходной информации, data-independent acquisition) или могут задаваться заранее для ожидаемых соединений (сбор данных, зависящих от исходной информации, data-dependent acquisition). Наложение некоторых массовых пиков ионов-предшественников может потребовать их деконволюции и разделения MS^2 -спектров [40]. Важно иметь в виду, что молекулы аналита образуют в процессе ИЭР не только протонированные молекулы основных изотопных форм, но и ионы-аддукты, включая катионированные молекулы, заряженные частицы других изотопных форм (“изотопологи”). Исключение последних ионов из рассматриваемого (процедура “компонентизации” [8]) существенно упрощает обработку хромато-масс-спектрометрических данных. При идентификации чаще всего прибегают к сравнению экспериментальных спектров со справочными. Приборы, включающие обычные ионные ловушки, приводят к спектрам MS^2 , которые хуже сопоставимы со спектрами, полу-

ченными с применением других типов тандемных масс-спектрометров [27, 41].

Природа ложных результатов, которые могут быть следствием применения МС, отражена в табл. 3 (см. также [18]).

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Правильность/надежность идентификации определяется соответствием полученных данных определенным критериям. В случае ЦА эти критерии, основанные на хроматографических и масс-спектрометрических данных, хорошо очерчены [26, 27, 42]. В НЦА ситуация оказывается гораздо менее определенной.

Наиболее надежная идентификация с получением ПП достигается (а) совпадением хроматографических и массовых пиков при совместном анализе пробы, содержащей определяемое соединение, и соответствующего аналитического стандарта [26, 27, 42, 43]. На втором месте по надежности – (б) способ идентификации, заключающийся в сходстве экспериментальных и справочных масс-спектров и параметров хроматографического удерживания. Сходство может быть выражено его общим показателем (см. ниже) или степенью близости интенсивностей нескольких основных пиков одних и тех же (различающихся только в пределах погрешности) масс. Правильность идентификации летучих соединений по библиотекам справочных масс-спектров ЭИ составляет в общем случае ~80%; у нелетучих аналитов и масс-спектров ИЭР-МС² ситуация более неопределенная, доля ПП варьируется в широких пределах [26, 27, 41].

Второй способ идентификации (б) может быть столь же надежным как первый вариант (а), но при выполнении ряда условий: значения указанных величин должны быть получены в сходных экспериментальных условиях (одинаковые типы и модели приборов, близкие режимы получения данных), и эти значения должны быть уникальны для идентифицируемого соединения. Другие способы идентификации (интерпретация данных, сравнение с предсказанными спектрами и хроматографическими характеристиками [27, 43, 44]) менее надежны, но, по-видимому, применимы для отбора кандидатов на идентификацию.

Если ряд таких “кандидатских” соединений имеет общие элементы структуры, то на этом этапе идентификацию называют групповой [26, 27]. Такую группу соединений позволяют выявить “молекулярные сети” – графы структурно сходных соединений, построенные по похожим масс-спектрам [45, 46].

В англоязычной научной литературе весьма популярен термин “уровень идентификации” (табл. 1). Его смысл в подробной трактовке одной

из публикаций [3] и с нашими комментариями прояснен в табл. 4. Добавим, что высота уровня идентификации коррелирует с ее надежностью (долей ПП).

Существуют независимые количественные показатели надежности [26, 27, 43]. К ним относятся α - и β -критерии принятия статистических гипотез при рассмотрении идентификации как процедуры их проверки. Весьма популярна концепция точек идентификации – совпадающих значений измеряемых масс-спектрометрических и хроматографических величин с учетом их различной значимости. Показатели сходства масс-спектров, такие как точечная функция или вероятность их совпадения, можно также рассматривать как частную меру надежности. Недавно предложена общая шкала надежности, учитывающая уровни идентификации, степень совпадения характеристик удерживания и число точек идентификации [47].

ИНФОРМАТИКА

Несколько видов информационных продуктов незаменимы при проведении НЦА.

Библиотеки масс-спектров – основной ресурс справочной информации. Наиболее крупные из них представлены в табл. 5. Сравнительно хорошо обстоит дело со спектрами ЭИ-МС¹ летучих соединений: в библиотеках представлено большинство известных и наиболее важных соединений этого класса. Библиотеки спектров МС² и тем более МС²-ВР, преимущественно относящихся к нелетучим аналитам, т.е. большинству биологически важных соединений, стали создаваться значительно позже. Масс-спектры многих соединений в библиотеках отсутствуют, и спектры МС² в целом недостаточно хорошо воспроизводятся, зависят от типа тандемного масс-спектрометра и энергии столкновений, приводящих к распаду ионов-предшественников [26, 27, 41]. Необходимость пополнения и повышения качества библиотек тандемных масс-спектров широко осознается [41, 43].

Сводки параметров удерживания. База данных НИСТ включает 447285 значений газохроматографических индексов удерживания (ИУ) для 139693 соединений [49]. Для В/УЭЖХ концепция ИУ применима в меньшей степени, чем в ГХ, но соответствующие работы появляются, как и методы оценки значений этих величин [55].

Химические базы данных. Наиболее крупные БД, содержащие сведения о химических соединениях, указаны в табл. 6. Информация, содержащаяся в них и дополняющая экспериментальные данные ХМС, носит название априорной или *метаинформации*. Она полезна и даже необходима

Таблица 4. Уровни и детали идентификации методом (ВЭЖХ)-МС²ВР [3]

Уровень	Надежность (confidence)	Результат идентификации	Наши комментарии
1		Структура, подтвержденная аналитическим стандартом	Наиболее надежная идентификация индивидуального соединения, очень высокая вероятность ПП
2		Структура, подтвержденная библиотечным поиском и/или характеристичными ионами (diagnostic evidence), совпадающими параметрами удерживания (retention behavior), присутствием родственных веществ	Результат, по надежности сопоставимый с уровнем 1 при выполнении ряда условий (см. текст)
3		Условный кандидат на идентификацию; входит в список предполагаемых аналитов. Установлены элементы структуры (substructure) и класс соединений. ООС начинается с этого уровня	В общем случае — это уровень неоднозначно идентифицированных соединений большинством методов МС
4		Однозначное определение молекулярной формулы, недостаток структурной информации	Может считаться кандидатом на идентификацию при учете метаинформации (см. текст)
5		Недостаток полученной информации, несовпадение со справочными данными или свойствами аналитического стандарта. Старт НЦА	Идентификация отсутствует

Таблица 5. Основные библиотеки масс-спектров низкомолекулярных соединений

Название	Количество данных		Комментарии
	спектры	соединения	
Wiley Registry 12 th , ЭИ-МС ¹ [48]*	817 290	668 435	Летучие соединения
NIST 20, ЭИ-МС ¹ [49]**	350 643	306 869	Летучие соединения
NIST 20, МС ² [49]***	1 320 389	31 000	
METLIN [50]		>500 000	МС ² , преобладают метаболиты
MassBank of North America (MONA) [51]	691 548	226 303	Преобладают МС ² спектры биологически активных соединений. Присутствуют <i>in silico</i> масс-спектры
mzCloud [53]	806 513 5	19 109	МС ⁿ , лекарственные соединения, метаболиты
The Global Natural Product Social Molecular Networking (GNPS) [45]	221 083	18 163	МС ² , природные соединения. Данные 2016 г.
MassBank [52]	86 576	16 537	МС ¹ , МС ⁿ , летучие и нелетучие соединения
Human Metabolome Database (HMDB) [54]			Метаболиты, преобладают <i>in silico</i> масс-спектры. Данные 2018 г.
–ИЭ-МС ¹	1763	1220	
–МС ²	279 972	1249	

* Может быть дополнена специализированными библиотеками меньшего размера.

** 111788 соединений охарактеризованы масс-спектрами и ИУ.

*** Включая масс-спектры высокого разрешения 27 840 соединений.

Таблица 6. Наиболее крупные химические базы данных

Название	Массив соединений	Свободный доступ	Комментарии
Chemical Abstracts Service (CAS) [56]	182 млн веществ, включая индивидуальные соединения* и смеси** и 68 млн биополимеров (пептиды, белки и др.)	–	Полная библиографическая информация по химии и смежным наукам и сопутствующие фактографические данные
PubChem [57]	110 млн индивидуальных соединений*, 271 млн веществ*. **	+	Биологически значимые соединения, свойства, биологическая активность, токсичность и др. Компиляция из 795 источников
ChemSpider [1, 58]	≥ 80–90 млн структур (индивидуальных соединений*)	+	То же, более короткие справки о веществах, но с большим количеством опций поиска, в том числе по массам ионов. Компиляция из 279 источников

* Однокомпонентные вещества по терминологии ЕС [28].

** Многокомпонентные вещества, а также вещества неизвестного или переменного состава по терминологии ЕС [28].

при отборе и ранжировании соединений – кандидатов на идентификацию.

При использовании этих массивов информации наиболее важны три обстоятельства. Во-первых, БД ChemSpider позволяет проводить поиск молекулярных формул по экспериментально установленным массам молекулярных ионов (M^+) или протонированных (катионированных) молекул (M^2). Во-вторых, эти БД дают возможность оценить популярность/распространенность химических соединений – по числу источников информации о них, по количеству такой метаинформации и др. [1, 2, 27]. При проверке идентификационных гипотез [26, 27] имеет смысл начинать с наиболее популярных соединений (при прочих равных условиях). В-третьих, имеющаяся в БД информация о получении и свойствах химических соединений, их присутствии в различных объектах также полезна при отборе кандидатов на идентификацию.

Предсказание масс-спектров и параметров удерживания. Существует несколько методов, алгоритмов и соответствующих программ предсказания масс-спектров (*in silico* масс-спектров). Они основаны на машинном обучении, эвристике (правилах фрагментации ионов), комбинаторике (перебору и оценке вероятностей появления различных комбинаций атомов исходного иона), квантово-химических расчетах и смешанных принципах [59]. В среднем результаты предсказания спектров оказываются умеренно правильными. Так, мы провели исследование возможности различения структурных изомеров одним из методов машинного обучения. Доля ПП при сравнении выборок предсказанных и экспериментальных спектров составила ~50–60% [44], и это

далеко не самый низкий результат в рассматриваемой области вычислений [59]. Тем не менее методы предсказания масс-спектров бурно развиваются, и можно ожидать повышения их эффективности. Даже сейчас эту методологию можно использовать в НЦА, (а) рассчитывая масс-спектры кандидатов на идентификацию, которые отобраны по массе ионов-предшественников и поискам в химических базах данных, и (б) отбрасывая наиболее непохожие *in silico* спектры.

Несмотря на существование большой коллекции экспериментальных ГХ-ИУ (см. выше), проводятся работы по предсказанию и этих показателей, хотя бы с целью проверки эффективности вычислительных методов. Применение методологии машинного обучения позволяет рассчитывать их значения с удовлетворительной точностью [60]. Подобные алгоритмы предсказания были использованы для расчёта ВЭЖХ-ИУ; полученные данные не имели существенного самостоятельного значения для идентификации, но все-таки улучшали ее результаты, основанные на предсказании масс-спектров [55].

В случае ЖХ чаще предсказывают не ИУ, а (относительные) времена удерживания (ВУ) [61–63]. Некоторые результаты предсказания оказываются удовлетворительными. Из прогнозов ВУ для 80 тыс. соединений, которые включены в БД METLIN (табл. 5), следует, что в 70% случаев соответствующие анализы оказываются в числе трех наиболее вероятных кандидатов на идентификацию [62].

Различные программы. Программы обработки хромато-масс-спектрометрических данных незаменимы в анализе сложных образцов, который приводит к многочисленным хроматографиче-

ским пикам. Надлежащая практика НЦА подразумевает проведение в автоматическом режиме [4, 6, 8, 16, 40, 64, 65]:

- деконволюции хроматографических пиков с выделением сигналов отдельных компонентов и их масс-спектров,
- фильтрации массовых пиков с удалением фоновых и слабых пиков, выбросов,
- аннотации пиков в масс-спектрах: приписания пикам значений масс и даже формул соответствующих ионов, выведенных из точных масс (значений m/z) и изотопной картины,
- сравнения масс-спектров, а также характеристик удерживания с соответствующими справочными данными, оценивание их сходства,
- формирования домашних библиотек масс-спектров,
- взаимной подгонки разных хроматограмм по временам удерживания и/или массам ионов реперных соединений для сравнения между собой различных образцов.

Соответствующими программами обеспечено серийно выпускаемое оборудование, они поставляются и другими фирмами/организациями [16, 64].

Следует также упомянуть алгоритмы и программы многомерного статистического анализа (хеометрии), позволяющего по результатам НЦА группировать и классифицировать изучаемые образцы, например образцы продовольствия [10, 12, 66].

* * *

Многочисленные инновации в аналитическом приборостроении и информатике сделали доступным одновременное определение многих десятков, сотен и даже тысяч органических (биоорганических) соединений, неизвестных аналитику до проведения эксперимента, в самых сложных матрицах (биологические и медицинские объекты, продукты питания, объекты окружающей среды и т.д.). Среди аналитических приборов первостепенное значение приобрели tandemные масс-спектрометры высокого разрешения, соединенные с хроматографами, в значительном количестве поступившие в аналитические лаборатории в последние 10–15 лет. Параллельно достигнут значительный прогресс в области информатики, который привел к появлению больших БД и новых программ обработки хромато-масс-спектрометрических данных. Результатом успехов приборостроения и информатики явился взрывной рост работ в области НЦА.

Следует выделить два аспекта этих публикаций. В их числе оказалось много соответствующих тематических обзоров, связанных с отдельными методами и/или объектами анализа. Совместное рассмотрение этих работ позволяет

очертить общую практику НЦА, выявить его стандартные приемы, применение определенных методов пробоподготовки, анализа, извлечения и обработки информации. Вторая сторона обсуждаемых научных публикаций заключается в том, что они отражают новый, достаточно полный анализ самых разных объектов во всем их географическом, биологическом, природном, промышленном и т.п. многообразии. Такого рода исследования с использованием методологии НЦА продолжаются, ожидается появление новых фактических данных, касающихся неизвестного ранее состава веществ. Полученные в последние годы и ожидаемые новые данные, вероятно, также будут нуждаться в широком обобщении, которое будет интересно химикам многих специальностей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Milman B.L., Zhurkovich I.K.* Statistics of the popularity of chemical compounds in relation to the non-target analysis // *Molecules*. 2021. V. 26. № 8. P. 2394. <https://doi.org/10.3390/molecules26082394>
2. *Мильман Б.Л., Журкович И.К.* Популярность химических соединений. О чем это? // *Аналитика*. 2020. Т. 10. № 6. С. 464. <https://doi.org/10.22184/2227-572X.2020.10.6.464.469>
3. *Schymanski E.L., Singer H.P., Slobodnik J., Ipolyi I.M., Oswald P., Krauss M., Schulze T., Haglund P., Letzel T., Grosse S., Thomaidis N.S., Bletsou A., Zwiener C., Ibáñez M., Portolés T., De Boer R., Reid M.J., Onghena M., Kunkel U., Schulz W., Guillon A., Noyon N., Leroy G., Bados P., Bogianni S., Stipanich D., Rostkowski P., Hollender J.* Non-target screening with high-resolution mass spectrometry: Critical review using a collaborative trial on water analysis // *Anal. Bioanal. Chem.* 2015. V. 407. № 21. P. 6237. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8681-7>
4. *Hollender J., Schymanski E.L., Singer H.P., Ferguson P.L.* Nontarget screening with high resolution mass spectrometry in the environment: Ready to go? // *Environ. Sci. Technol.* 2017. V. 51. № 20. P. 11505. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b02184>
5. *Csanccapa-Cartagena A., Pico Y., Ortiz X., Reiner E.J.* Suspect, non-target and target screening of emerging pollutants using data independent acquisition: Assessment of a Mediterranean River basin // *Sci. Total Environ.* 2019. V. 687. P. 355. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.057>
6. *Ljoncheva M., Stepišnik T., Džeroski S., Kosjek T.* Cheminformatics in MS-based environmental exposomics: Current achievements and future directions // *Trends Environ. Anal. Chem.* 2020. V. 28. Article e00099. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2020.e00099>
7. *Menger F., Gago-Ferrero P., Wiberg K., Ahrens L.* Wide-scope screening of polar contaminants of concern in water: A critical review of liquid chromatography-high resolution mass spectrometry-based strategies // *Trends Environ. Anal. Chem.* 2020. V. 28.

- Article e00102.
<https://doi.org/10.1016/j.teac.2020.e00102>
8. *Schulze B., Jeon Y., Kaserzon S., Heffernan A.L., Dewapriya P., O'Brien J., Ramos M.J.G., Gorji S.G., Mueller J.F., Thomas K.V., Samanipour S.* An assessment of quality assurance/quality control efforts in high resolution mass spectrometry non-target workflows for analysis of environmental samples // *Trends Anal. Chem.* 2020. V. 133. Article 116063.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116063>
 9. *Kutlucinar K.G., Hann S.* Comparison of preconcentration methods for nontargeted analysis of natural waters using HPLC-HRMS: Large volume injection versus solid-phase extraction // *Electrophoresis.* 2021. V. 42. № 4. P. 490.
<https://doi.org/10.1002/elps.202000256>
 10. *Riedl J., Esslinger S., Fauhl-Hassek C.* Review of validation and reporting of non-targeted fingerprinting approaches for food authentication // *Anal. Chim. Acta.* 2015. V. 885. P. 17.
<https://doi.org/10.1002/elps.202000256.org/10.1016/j.aca.2015.06.003>
 11. *Knolhoff A.M., Croley T.R.* Non-targeted screening approaches for contaminants and adulterants in food using liquid chromatography hyphenated to high resolution mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* 2016. V. 1428. P. 86.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.08.059>
 12. *Fisher C.M., Croley T.R., Knolhoff A.M.* Data processing strategies for non-targeted analysis of foods using liquid chromatography/high-resolution mass spectrometry // *Trends Anal. Chem.* 2021. V. 136. Article 116188.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116188>
 13. *Chen C., Wohlfarth A., Xu H., Su D., Wang X., Jiang H., Feng Y., Zhu M.* Untargeted screening of unknown xenobiotics and potential toxins in plasma of poisoned patients using high-resolution mass spectrometry: Generation of xenobiotic fingerprint using background subtraction // *Anal. Chim. Acta.* 2016. V. 944. P. 37.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.09.034>
 14. *Oberacher H., Arnhard K.* Current status of non-targeted liquid chromatography-tandem mass spectrometry in forensic toxicology // *Trends Anal. Chem.* 2016. V. 84. P. 94.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.12.019>
 15. *Mollerup C.B., Dalsgaard P.W., Mardal M., Linnet K.* Targeted and non-targeted drug screening in whole blood by UHPLC-TOF-MS with data-independent acquisition // *Drug Test. Anal.* 2017. V. 9. № 7. P. 1052.
<https://doi.org/10.1002/dta.2120>
 16. *Mastrangelo A., Ferrarini A., Rey-Stolle F., Garcia A., Barbac C.* From sample treatment to biomarker discovery: A tutorial for untargeted metabolomics based on GC-(EI)-Q-MS // *Anal. Chim. Acta.* 2015. V. 900. P. 21.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.10.001>
 17. *Cajka T., Fiehn O.* Toward merging untargeted and targeted methods in mass spectrometry-based metabolomics and lipidomics // *Anal. Chem.* 2016. V. 88. № 1. P. 524.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04491>
 18. *Pezzatti J., Boccard J., Codesido S., Gagnebin Y., Joshi A., Picard D., Gonzalez-Ruiz V., Rudaz S.* Implementation of liquid chromatography-high resolution mass spectrometry methods for untargeted metabolomic analyses of biological samples: A tutorial // *Anal. Chim. Acta.* 2020. V. 1105. P. 28.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.12.062>
 19. *Hubert J., Nuzillard J.M., Renault J.H.* Dereplication strategies in natural product research: how many tools and methodologies behind the same concept? // *Phytochem. Rev.* 2017. V. 16. № 1. P. 55.
<https://doi.org/10.1007/s11101-015-9448-7>
 20. *Aydoğan C.* Recent advances and applications in LC-HRMS for food and plant natural products: A critical review // *Anal. Bioanal. Chem.* 2020. V. 412. № 9. P. 1973.
<https://doi.org/10.1007/s00216-019-02328-6>
 21. *Caballero-Casero N., Belova L., Vervliet P., Antignac J.P., Castaño A., Debrauwer L., López M.E., Huber C., Klanova J., Krauss M., Lommen A., Mol H.G.J., Oberacher H., Pardo O., Price E.J., Reinstadler V., Vitale C.M., Van Nuijs A.L.N., Covaci A.* Towards harmonized criteria in quality assurance and quality control of suspect and non-target LC-HRMS analytical workflows for screening of emerging contaminants in human biomonitoring // *Trends Anal. Chem.* 2021. V. 136. Article 116201.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116201>
 22. *Mairinger T., Causon T.J., Hann S.* The potential of ion mobility-mass spectrometry for non-targeted metabolomics // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2018. V. 42. P. 9.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.10.015>
 23. *Lorenc W., Hanć A., Sajnog A., Baratkiewicz D.* LC/ICP-MS and complementary techniques in be-spoke and nontargeted speciation analysis of elements in food samples // *Mass Spectrom. Rev.* 2020. P. 1.
<https://doi.org/10.1002/mas.21662>
 24. *Sobus J.R., Grossman J.N., Chao A., Singh R., Williams A.J., Grulke C.M., Richard A.M., Newton S.R., McEachran A.D., Ulrich E.M.* Using prepared mixtures of ToxCast chemicals to evaluate non-targeted analysis (NTA) method performance // *Anal. Bioanal. Chem.* 2019. V. 411. № 4. P. 835.
<https://doi.org/10.1007/s00216-018-1526-4>
 25. *Knolhoff A.M., Premo J.H., Fisher C.M.* A Proposed quality control standard mixture and its uses for evaluating nontargeted and suspect screening LC/HR-MS method performance // *Anal. Chem.* 2021. V. 93. № 3. P. 1596.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c04036>
 26. *Мильман Б.Л.* Введение в химическую идентификацию. СПб: ВВМ, 2008. 180 с.
 27. *Milman B.L.* Chemical Identification and Its Quality Assurance. Berlin: Springer, 2011. 281 p.
 28. *Мильман Б.Л., Журкович И.К.* Большие данные в современном химическом анализе // *Журн. анал. хим.* 2020. Т. 75. №. 4. С. 316.
<https://doi.org/10.31857/S0044450220020139>
(Milman B.L., Zhurkovich I.K.) Big data in modern chemical analysis // *J. Anal. Chem.* 2020. V. 75. № 4. P. 443.
<https://doi.org/10.1134/S1061934820020124>

29. NORMAN Database System. <https://www.norman-network.com/nds> (05.06.2021).
30. Stevens V.L., Hoover E., Wang Y., Zanetti K.A. Pre-analytical factors that affect metabolite stability in human urine, plasma, and serum: A review // *Metabolites*. 2019. V. 9. № 8. P. 156. <https://doi.org/10.3390/metabo9080156>
31. García A., Godzien J., López-González Á., Barbas C. Capillary electrophoresis mass spectrometry as a tool for untargeted metabolomics // *Bioanalysis*. 2017. V. 9. № 1. P. 99. <https://doi.org/10.4155/bio-2016-0216>
32. Mairinger T., Causon T.J., Hann S. The potential of ion mobility–mass spectrometry for non-targeted metabolomics // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2018. V. 42. P. 9. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.10.015>
33. Geng C., Guo Y., Qiao Y., Zhang J., Chen D., Han W., Yang M., Jiang P. UPLC-Q-TOF-MS profiling of the hippocampus reveals metabolite biomarkers for the impact of DL-3-n-butylphthalide on the lipopolysaccharide-induced rat model of depression // *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 2019. V. 15. P. 1939. <https://doi.org/10.2147/NDT.S203870>
34. Koek M.M., Jellema R.H., Van der Greef J., Tas A.C., Hankemeier T. Quantitative metabolomics based on gas chromatography mass spectrometry: Status and perspectives // *Metabolomics*. 2011. V. 7. № 3. P. 307. <https://doi.org/10.1007/s11306-010-0254-3>
35. Aspromonte J., Wolfs K., Adams E. Current application and potential use of GC × GC in the pharmaceutical and biomedical field // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2019. V. 176. Article 112817. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.112817>
36. Franchina F.A., Zanella D., Dubois L.M., Focant J.F. The role of sample preparation in multidimensional gas chromatographic separations for non-targeted analysis with the focus on recent biomedical, food, and plant applications // *J. Sep. Sci.* 2021. V. 44. № 1. P. 188. <https://doi.org/10.1002/jssc.202000855>
37. Ghaste M., Mistrik R., Shulaev V. Applications of Fourier transform ion cyclotron resonance (FT-ICR) and orbitrap based high resolution mass spectrometry in metabolomics and lipidomics // *Int. J. Mol. Sci.* 2016. V. 17. № 6. P. 816. <https://doi.org/10.3390/ijms17060816>
38. Strupat K., Scheibner O., Bromirski M. High-resolution, accurate-mass orbitrap mass spectrometry—definitions, opportunities, and advantages // *Thermo Technical Note*. 2013. № 64287. P. 1. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Technical-Notes/tn-64287-hram-orbitrap-ms-tn64287-en.pdf> (06.06.2021).
39. Alon T., Amirav A. Comparison of isotope abundance analysis and accurate mass analysis in their ability to provide elemental formula information // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* // 2021. V. 32. № 4. P. 929. <https://doi.org/10.1021/jasms.0c00419>
40. Samanipour S., Reid M.J., Bæk K., Thomas K.V. Combining a deconvolution and a universal library search algorithm for the nontarget analysis of data-independent acquisition mode liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry results // *Environ. Sci. Technol.* 2018. V. 52. № 8. P. 4694. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b00259>
41. Oberacher H., Sasse M., Antignac J.P., Guitton Y., Debrauwer L., Jamin E.L., Schulze T., Krauss M., Covaci A., Caballero-Casero N., Rousseau K., Damont A., Fenaille F., Lamoree M., Schymanski E.L. A European proposal for quality control and quality assurance of tandem mass spectral libraries // *Environ. Sci. Eur.* 2020. V. 32. № 1. P. 1. <https://doi.org/10.1186/s12302-020-00314-9>
42. Мильман Б.Л., Журкович И.К. Обобщенные критерии идентификации химических соединений методами хроматографии–масс-спектрометрии // *Аналитика и контроль*. 2020. Т. 24. №. 3. С. 164. <https://doi.org/10.15826/analitika.2020.24.3.003>
43. Milman B.L. General principles of identification by mass spectrometry // *Trends Anal. Chem.* 2015. V. 69. P. 24. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.12.009>
44. Milman B.L., Ostrovidova E.V., Zhurkovich I.K. Isomer differentiation using *in silico* MS² spectra. A case study for the CFM-ID mass spectrum predictor // *Mass Spectrom. Lett.* 2019. V. 10. № 3. P. 93. <https://doi.org/10.5478/MSL.2019.10.3.93>
45. Global Natural Products Social Molecular Networking. <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/gnps-splash.jsp> (06.06.2021).
46. Vincenti F., Montesano C., Di Ottavio F., Gregori A., Compagnone D., Sergi M., Dorrestein P. Molecular networking: A useful tool for the identification of new psychoactive substances in seizures by LC–HRMS // *Front. Chem.* 2020. V. 8. Article 572952. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.572952>
47. Rochat B. Proposed confidence scale and ID score in the identification of known-unknown compounds using high resolution MS data // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2017. V. 28. № 4. P. 709. <https://doi.org/10.1007/s13361-016-1556-0>
48. Wiley Registry of Mass Spectral Data, 12th Ed. <https://www.sisweb.com/software/wiley-registry.htm#1> (07.06.2021).
49. The NIST 20 Mass spectral library. <https://www.sisweb.com/software/ms/nist.htm#stats> (07.06.2021).
50. METLIN. https://metlin.scripps.edu/landing_page.php?pgcontent=mainPage (07.06.2021).
51. MONA – MassBank of North America. <https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/spectra/statistics?tab=0> (07.06.2021).
52. MassBank. <https://massbank.eu/MassBank/Contents> (07.06.2021).
53. mzCloud. <https://www.mzcloud.org> (07.06.2021).
54. The human metabolome database (HMDB). <https://hmdb.ca> (07.06.2021).
55. Samaraweera M.A., Hall L.M., Hill D.W., Grant D.F. Evaluation of an artificial neural network retention index model for chemical structure identification in nontargeted metabolomics // *Anal. Chem.* 2018. V. 90. № 21. P. 12752. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b03118>
56. CAS. <https://www.cas.org/about/cas-content> (07.06.2021).

57. PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> (07.06.2021).
58. ChemSpider. <http://www.chemspider.com> (07.06.2021).
59. *Krettler C.A., Thallinger G.G.* A map of mass spectrometry-based in silico fragmentation prediction and compound identification in metabolomics // *Briefings Bioinf.* 2021. P. 1. <https://doi.org/10.1093/bib/bbab073>
60. *Matyushin D.D., Buryak A.K.* Gas chromatographic retention index prediction using multimodal machine learning // *IEEE Access.* 2020. V. 8. P. 223140. <https://doi.org/10.1109/ACCESS.2020.3045047>
61. *McEachran A.D., Mansouri K., Newton S.R., Beverly B.E., Sobus J.R., Williams A.J.* A comparison of three liquid chromatography (LC) retention time prediction models // *Talanta.* 2018. V. 182. P. 371. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.01.022>
62. *Domingo-Almenara X., Guijas C., Billings E., Montenegro-Burke J.R., Uritboonthai W., Aisporna A.E., Chen E., Benton H.P., Siuzdak G.* The METLIN small molecule dataset for machine learning-based retention time prediction // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13680-7>
63. *Witting M., Böcker S.* Current status of retention time prediction in metabolite identification // *J. Sep. Sci.* 2020. V. 43. № 9–10. P. 1746. <https://doi.org/10.1002/jssc.202000060>
64. *Kind T., Tsugawa H., Cajka T., Ma Y., Lai Z., Mehta S.S., Wohlgemuth G., Barupal D.K., Showalter M.R., Arita M., Fiehn O.* Identification of small molecules using accurate mass MS/MS search // *Mass Spectrom. Rev.* 2018. V. 37. № 4. P. 513. <https://doi.org/10.1002/mas.21535>
65. *Helmus R., Ter Laak T.L., Van Wezel A.P., De Voogt P., Schymanski E.L.* patRoom: Open source software platform for environmental mass spectrometry based non-target screening // *J. Cheminf.* 2021. V. 13. № 1. P. 1. <https://doi.org/10.1186/s13321-020-00477-w>
66. *Cavanna D., Righetti L., Elliott C., Suman M.* The scientific challenges in moving from targeted to non-targeted mass spectrometric methods for food fraud analysis: A proposed validation workflow to bring about a harmonized approach // *Trends Food Sci. Technol.* 2018. V. 80. P. 223. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.08.007>

УДК 543.423.1 546.46 546.41

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ВОЗМОЖНОСТИ КАПЕЛЬНО-ИСКРОВОГО СПЕКТРОМЕТРА ПРИ ВВОДЕ ПРОБЫ В ЭЛЕКТРОЛИТНЫЙ АНОД

© 2022 г. В. В. Ягов^а, А. А. Жирков^а *^аИнститут геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского Российской академии наук
ул. Косыгина, 19, Москва, 119991 Россия

*e-mail: vdomah@gmail.com

Поступила в редакцию 12.07.2021 г.

После доработки 02.09.2021 г.

Принята к публикации 17.09.2021 г.

Изучены аналитические возможности капельно-искрового спектрометра при вводе пробы в электролитный анод. Показано, что перенос вещества через границу электролитный анод–плазма происходит селективно (без коллоидного распыления), что особенно наглядно проявляется для Pb и Cd в концентрированных растворах NaCl. На примере свинца продемонстрировано влияние формы нахождения элемента в электролитном аноде на сигнал.

Ключевые слова: капельно-искровой разряд, микроплазма, атомно-эмиссионная спектроскопия, элементный анализ, электролитный анод.

DOI: 10.31857/S0044450222030136

В последнее время публикуется все больше работ, посвященных использованию в спектральном анализе микроплазменных источников атомизации и возбуждения на основе электрических разрядов на поверхности водных растворов [1–5]. Такие источники отличаются компактностью, простотой, низким уровнем энергопотребления и расхода газов, а также возможностью проведения измерений в потоке. Устройства на основе электролитных разрядов при атмосферном давлении, описанные в работах [4, 6–8], по пределу обнаружения, воспроизводимости и диапазону определяемых содержаний почти сравнялись с атомно-эмиссионными спектрометрами с индуктивно связанной плазмой [4, 6–8].

Описано большое число систем атомизации и возбуждения на основе микроплазменного разряда с одним или двумя жидкими электродами – капельно-искровой разряд (КИР) [9], разряд при вскипании в канале [10], разряд с электролитным катодом [11], тлеющий разряд с электролитным катодом (ТРЭК) [12, 13], разряд между струями [14] и ряд других.

Начиная с первых работ по разрядам над водными растворами [11], и до недавнего времени [4] считалось, что металлы поступают в плазму только из электролитного катода, но не из электролитного анода [14]. Что касается щелочных, щелочноземельных металлов и алюминия, это мнение не опровергнуто до настоящего времени [15, 16], однако для ряда элементов (As, Ag, Bi, Cd, Hg,

Pb, Sb, Se, Tl, Zn) показана возможность попадания в плазму разряда из анодного раствора [15, 17, 18], причем в ряде случаев при анодном поступлении аналита в плазму достигаются более низкие пределы обнаружения. Например, при определении кадмия и цинка при помощи тлеющего разряда с электролитным анодом (ТРЭА) Лю [15] получил пределы обнаружения в 0.05 и 0.1 нг/мл, что на два порядка лучше результатов, полученных группой Шекхара [19] с источником на основе ТРЭК. Для обладающих высокими потенциалами возбуждения селена и ртути Вебб [20] методом ТРЭК получил предел обнаружения 3 мкг/мл и 20 нг/мл соответственно, а Горска [18], используя проточный вариант ТРЭА, снизила пределы обнаружения до 3 и 0.5 нг/мл соответственно. В то же время для серебра и кадмия пределы обнаружения как в катодном [20], так и в анодном варианте [17] практически совпадают. Для свинца в случае ТРЭК предел обнаружения составляет 10 нг/мл [20], что лучше, чем для систем с ТРЭА (90 нг/мл [17] и 30 нг/мл [21]).

Цель настоящей работы – изучение аналитических возможностей источника атомизации и возбуждения на основе КИР при вводе пробы в электролитный анод. Эффекты, описанные для ТРЭА с твердым катодом [15–18, 21], воспроизведены на источнике с двумя жидкими электродами. Предложенный подход использован для расширения аналитических возможностей капельно-искрового спектрометра.

Таблица 1. Некоторые метрологические характеристики определения элементов методом капельно-искровой спектроскопии с электролитным анодом ($n = 10$, $P = 0.95$)

Элемент, λ , нм	Среда	c_{\min} , мкМ	c_{H} , мкМ	c_{B} , мМ	Уравнение градуировочной зависимости
Cd 228.80	HCl 0.12 М	1	10	0.7	$I = (2.3 \pm 0.1) \times 10^3 c + 1.2 \times 10^2$
Pb 405.78	HCl 0.12 М	3	5	5	$I = (2.85 \pm 0.07) \times 10^3 c + 2.1 \times 10^2$
Ag 338.29	HNO ₃ 0.04 М	0.2	0.4	0.1	$I = (1.62 \pm 0.04) \times 10^5 c + 4.1 \times 10^3$
Tl 535.04	HNO ₃ 0.04 М	6×10^{-2}	0.1	0.15	$I = (3.14 \pm 0.07) \times 10^5 c + 3.1 \times 10^3$
Pb 405.78	HCOOH 0.15 М	4×10^{-2}	0.1	1.5	$I = (2.91 \pm 0.05) \times 10^4 c + 1.4 \times 10^2$

Примечание: c_{\min} – предел обнаружения; c_{H} , c_{B} – нижняя и верхняя границы диапазона определяемых содержаний.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Капельно-искровой разряд возникает при сближении разноименно заряженных капель водного электролита. Опускающаяся верхняя капля, образованная вспомогательным раствором (обычно разбавленная HCl), служит для замыкания цепи, а также жидкой линзой, через которую свет попадает в оптоволоконный жгут спектрометра Maya2000 Pro. Пробу наносили в виде нижней капли объемом 20 мкл. Подробное описание прибора дано в нашей предыдущей работе [22]. Единственное отличие состояло в том, что если ранее нижняя капля с пробой всегда была заряжена отрицательно, то в настоящей работе устройство дополнено ключом, позволяющим изменять полярность. Большая часть данных относится к инверсной системе (с положительно заряженной пробой), в некоторых случаях сравнивали данные для обеих полярностей.

Растворители и реагенты. Использовали свежеприготовленную дистиллированную воду (установка очистки ДЭ-4, pH 5.8); Ca, Mg, Na, K, Pb, Hg, Ta, Cd, Ag (растворы хлоридов соответствующих металлов с концентрацией 1 мг/мл в 0.1 М HCl, ГСО, “Экоаналитика”, Россия); азотную, соляную, муравьиную, уксусную, сульфосалициловую кислоты ос. ч. (Химмед, Россия); хлорид натрия х. ч. (Химмед, Россия).

Растворы готовили непосредственно перед проведением эксперимента. Аликвотные части отбирали при помощи набора микропипеток ThermoScience (диапазоны объемов 2–20, 20–200, 100–1000 мкл, точность отбора аликвотной части $\pm 1.5\%$). Для измерения массы использовали весы Extended ED Sartorius AG (Германия).

Методики исследования. Резервуар для вспомогательного раствора (жидкой линзы) заполняли 0.12 М HCl. Рабочий раствор для анодного электролита готовили, варьируя концентрацию соляной, азотной кислоты или соответствующей соли смешением концентрированного раствора с дистиллированной водой, при необходимости делая добавку рассчитанного количества органиче-

ской кислоты. Аликвотную часть раствора определяемого элемента (ГСО) разбавляли рабочим раствором до требуемой концентрации, наносили полученный раствор дозатором в виде капли на металлический анод и измеряли сигнал на длинах волн, указанных в табл. 1. Аналитическим сигналом служила интегральная интенсивность свечения при соответствующей длине волны за первые 40 мс разряда.

Для определения предела обнаружения использовали 3σ -критерий, а для расчета нижней и верхней границ диапазона определяемых содержаний – критерий величины относительного стандартного отклонения сходимости $s_r < 0.33$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве модельных использовали растворы элементов, приготовленные разбавлением соответствующих государственных стандартных образцов состава 0.12 М HCl и 0.04 М HNO₃. Некоторые метрологические характеристики приведены в табл. 1.

Диапазон линейности градуировочной зависимости для свинца и таллия в минеральных кислотах составил около трех порядков величины; ограничение концентрации сверху определялось максимальной интенсивностью света, которую можно измерить в данных условиях. Для кадмия и серебра градуировочные графики имели участок насыщения. По-видимому, это связано с самопоглощением, что характерно для наиболее чувствительной в случае ТРЭА спектральной линии кадмия 228.80 нм [23]. Линейный диапазон для этих двух металлов составляет около двух порядков величины. Достигнутые пределы обнаружения для серебра согласуются с литературными данными по ТРЭА, однако для свинца и кадмия они в десятки раз выше, чем в работах [21, 24]. Различие может быть вызвано как отличием в спектральном разрешении и времени экспозиции (10 с в работе [24] против 40 мс в настоящей работе), так и ярко выраженной зависимостью интен-

Таблица 2. Влияние полярности на интенсивность линий Pb, Cd, Tl, In в спектре капельно-искрового разряда (фоновый электролит – 0.12 М HCl, $n = 7$, $P = 0.95$)

Элемент, λ нм	Концентрация, мкМ	Проба на аноде	Проба на катоде
Pb 405.78	700	2500 \pm 200	1300 \pm 100
Cd 228.80	700	1300 \pm 100	1400 \pm 100
Tl 535.04	1	39 \pm 9	32 \pm 8
In 410.17	200	130 \pm 10	2300 \pm 200

сивности излучения металлов от состава раствора, характерной для ТРЭА [18, 21].

Интересно было сопоставить интенсивность излучения металлов в плазме КИР при анодном и катодном способе ввода пробы, зафиксировав остальные параметры неизменными. Как видно из табл. 2, в данных условиях наблюдали двадцатикратное превышение катодного сигнала индия над анодным, что согласуется с отсутствием в литературе данных об излучении индия в случае ТРЭА. Для свинца введение пробы в анодный раствор дает двукратный рост интенсивности свечения в сравнении катодным, для кадмия и таллия значимое различие отсутствует. Следует отметить, что эффект смены полярности сильнее всего зависит от состава фонового электролита. Приведенные данные касаются только 0.12 М HCl. Как показано в работе [25], при введении пробы в электролитный катод в области низких концентраций фонового электролита увеличение ионной силы раствора приводит к многократному возрастанию интенсивности линий металлов в спектре КИР и ТРЭК, причем эффект мало зависит от природы фонового электролита и металла. Для одноосновных сильных неорганических кислот область максимума интенсивности обычно приходится на концентрацию ~0.4 М [25]. Предварительные опыты, выполненные в ходе настоящей работы, показали, что при вводе пробы в электролитный анод оптимальная концентрация фонового электролита примерно на порядок ниже, однако для анода влияние природы металла и фонового электролита существенно сильнее. Из данных в табл. 2 следует, что 0.12 М HCl – это компромиссный фоновый раствор, для которого эффективность поступления металла в плазму из электролитного катода и электролитного анода одинакова для кадмия и таллия и всего в два раза отличается для свинца. Для катодного варианта 0.12 М HCl – слишком разбавленный фоновый раствор, для анодного – слишком концентрированный.

Очень интересным представляется тот факт, что излучение щелочных и щелочноземельных металлов, наиболее интенсивное при катодном поступлении электролита в плазму разряда, полностью отсутствует в его анодном варианте. С практической точки зрения это полезно для

определения тяжелых металлов в солевых матрицах, включая и высокоминерализованные среды, являющиеся неудобным объектом для многих инструментальных методов аналитической химии. Возможности определения свинца и кадмия в насыщенном растворе хлорида натрия иллюстрируют рис. 1 и табл. 3. Как видно из приведенного на рис. 1 спектра, интенсивность D-линии натрия оказывается ниже интенсивностей наиболее чувствительных линий свинца и кадмия, несмотря на тысячекратное различие концентраций и значительное превосходство D-линии в относительной интенсивности. Фактически в факеле капельно-искрового разряда над насыщенным раствором NaCl почти нет натрия, но есть Cd и Pb, селективно поступающие в плазму. Механизм транспорта вещества через границу электролитный анод/плазма, чувствительный к природе элемента и форме его нахождения в растворе, представляется наиболее интересным аспектом изучаемого явления. Эффект пока не нашел адекватного объяснения в литературе [15, 17, 18, 21].

Как видно из представленных данных, определение в насыщенном растворе хлорида натрия не просто оказывается возможным, но достигнутые

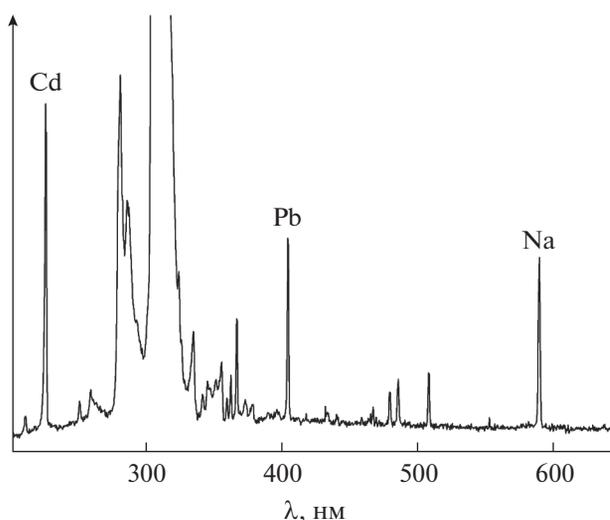


Рис. 1. Спектр излучения 1 мМ свинца и кадмия в насыщенном растворе хлорида натрия в капельно-искровом разряде. Проба в анодном электролите.

Таблица 3. Некоторые метрологические характеристики определения свинца и кадмия в насыщенном растворе хлорида натрия при помощи капельно-искрового разряда с электролитным анодом ($n = 5$, $P = 0.95$)

Элемент, λ , нм	c_{\min} , мкМ	c_H , мкМ	c_B , мМ	Уравнение градуировочной зависимости
Pb 405.78	8	15	10	$I = (1.95 \pm 0.06) \times 10^3 c + 1.8 \times 10^2$
Cd 228.80	5	10	0.4	$I = (6.2 \pm 0.3) \times 10^3 c + 3.7 \times 10^2$

при этом метрологические характеристики незначительно отличаются от таковых в 0.12 М соляной кислоте. Интересно, что коэффициент чувствительности (тангенс угла наклона градуировочной зависимости) для кадмия возрастает более чем вдвое с одновременным снижением верхней границы определяемых содержаний. Данное обстоятельство косвенно подтверждает вывод, что принципиальное значение для выхода элемента из электролитного раствора в плазму

Таблица 4. Влияние состава фонового электролита на интенсивность излучения 1 мМ свинца в капельно-искровом разряде с электролитным анодом ($n = 4$, $P = 0.95$)

Фоновый раствор	Интенсивность линии Pb 405.78 нм
Соляная кислота 4 мМ	980 ± 90
Соляная кислота 40 мМ	1600 ± 100
Соляная кислота 60 мМ	1900 ± 100
Хлорид натрия 50 мМ	1800 ± 100
Хлорид натрия 500 мМ	2500 ± 200
Хлорид натрия 5.7 М	1200 ± 100
Уксусная кислота 330 мМ	3600 ± 400
Янтарная кислота 170 мМ	1200 ± 200
Муравьиная кислота 90 мМ	3600 ± 300
Муравьиная кислота 150 мМ	6900 ± 600
Муравьиная кислота 220 мМ	5500 ± 400
Муравьиная кислота 430 мМ	3500 ± 200
Хлорид натрия 5.7 М + муравьиная кислота 220 мМ	2800 ± 300
Хлорид натрия 5.7 М + муравьиная кислота 650 мМ	2600 ± 200
Сульфосалициловая кислота 14 мМ	1400 ± 100
Сульфосалициловая кислота 46 мМ	3300 ± 400
Сульфосалициловая кислота 92 мМ	920 ± 100
Сульфосалициловая кислота 460 мМ	40 ± 8
Сульфосалициловая кислота 46 мМ + 70 мМ NaOH	320 ± 40
Сульфосалициловая кислота 46 мМ + 70 мМ NH ₃	550 ± 40

разряда имеет его форма нахождения в растворе, зависящая от pH, ионной силы, присутствия лигандов. Подобное поведение аналитов нетипично для методов атомно-эмиссионной спектроскопии, но в части зависимости от pH подтверждается данными [21, 26].

Для всестороннего рассмотрения данного явления состав и природу фонового электролита варьировали в широких пределах, используя свинец в качестве модельного аналита. Как видно из табл. 4, интенсивность линии Pb I 405.78 нм очень сильно зависит от природы и концентрации фонового электролита – разброс превышает два порядка величины. Для всех представленных растворов зависимость сигнала от концентрации фонового электролита проходит через максимум, что особенно хорошо видно для сульфосалициловой кислоты. Когда эту кислоту в оптимальной концентрации (46 мМ) наполовину нейтрализовали раствором аммиака и особенно гидроксидом натрия, сигнал снижался почти на порядок (см. последние строки в табл. 4). Можно предположить, что прочный анионный комплекс свинца – менее предпочтительная форма, чем положительно заряженный ион, что (возможно, случайно) соответствует тривиальной электростатической модели эмиссии с анода. Аналогичного снижения при переходе от соляной кислоты к ее натриевой соли не наблюдается, т.е. эффект не сводится к влиянию pH.

С практической точки зрения, наиболее значимый эффект в определении свинца достигается добавкой муравьиной кислоты в диапазоне концентраций несколько сотен мМ. Добавка всего 200 мМ HCOOH к насыщенному раствору хлорида натрия усиливает сигнал в два с половиной раза. Электропроводность растворов, содержащих более 50 мМ HCOOH, достаточна для зажигания КИР, что позволяет обойтись без добавки минерального электролита, обеспечивая потенциально наиболее благоприятные условия определения. Максимальная чувствительность достигнута в случае раствора, содержащего 150 мМ муравьиной кислоты. Достигнутые при этом метрологические характеристики приведены в табл. 1.

Использование оптимальной концентрации муравьиной кислоты позволяет увеличить коэффициент чувствительности определения свинца в десять раз при одновременном снижении предела

обнаружения на два порядка величины за счет снижения соотношения сигнал/шум (табл. 1), что приближается к достигнутым в работах [15, 17, 21] показателям.

В заключение отметим, что КИР создает условия для широкого варьирования химического состава матрицы (фонового электролита). Обновляемость жидких поверхностей в КИР позволяет легко удалять загрязнения, оставшиеся после опытов с концентрированными растворами. Кроме того, импульсная природа КИР позволяет обойти ограничения, существующие в случае описанного в литературе стационарного ТРЭА, устойчиво горящего только над разбавленными (<0.1 М) растворами минеральных кислот [17, 24]. Так, описанные выше эксперименты с насыщенным раствором хлорида натрия и другими концентрированными растворами невозможны с использованием ТРЭА.

Работа выполнена в ГЕОХИ РАН им. В.И. Вернадского в рамках Государственного задания 0137-2019-024.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Cai Y., Gao X.-G., Ji Z.-N., Yu Y.-L., Wang J.-H.* Non-thermal optical emission spectrometry for simultaneous and direct determination of zinc, cadmium and mercury in spray // *Analyst*. 2018. V. 143. P. 930.
2. *Han B., Jiang X., Hou X., Zheng C.* Miniaturized dielectric barrier discharge carbon atomic emission spectrometry with online microwave-assisted oxidation for determination of total organic carbon // *Anal. Chem.* 2014. V. 86. P. 6214.
3. *Hoegg E.D., Marcus R.K., Koppenaal D.W., Irvahn J., Hager G.J., Hart G.L.* Determination of uranium isotope ratios using a liquid sampling atmospheric pressure glow discharge/orbitrap mass spectrometer system // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2017. V. 31. P. 1534.
4. *Pohl P., Jamroz P., Swiderski K., Dzimitrowicz A., Lesniowicz A.* Critical evaluation of recent achievements in low power glow discharge generated at atmospheric pressure between a flowing liquid cathode and a metallic anode for element analysis by optical emission spectrometry // *Trends Anal. Chem.* 2017. V. 88. P. 119.
5. *Yang C., Chan C.-Y., He D., Liu Z., Deng Q., Zheng H., Hu S., Zhu Z.* Highly sensitive determination of arsenic and antimony based on an interrupted gas flow atmospheric pressure glow discharge excitation source // *Anal. Chem.* 2019. V. 91. P. 1912.
6. *Peng X., Wang Z.* Ultrasensitive determination of selenium, arsenic by modified helium atmospheric pressure glow discharge optical emission spectrometry coupled with hydride generation // *Anal. Chem.* 2019. V. 91. P. 10073.
7. *Cai Y., Zhang Y.-J., Wu D.-F., Yu Y.-L., Wang J.-H.* Nonthermal optical emission spectrometry: Direct atomization and excitation of cadmium for highly sensitive determination // *Anal. Chem.* 2016. V. 88. P. 4192.
8. *Yu J., Zhang Z., Lu Q., Sun D., Zhu S., Zhang X., Wang X., Yang W.* High-sensitivity determination of K, Ca, Na, and Mg in salt mines samples by atomic emission spectrometry with a miniaturized liquid cathode glow discharge // *J. Anal. Methods Chem.* 2017. V. 1. № 10. Article ID 7105831.
9. *Ягов В.В., Зуев Б.К., Коротков А.С.* Электрический разряд в межэлектролитном промежутке: перспективы создания атомно-эмиссионного сенсора // *Доклады РАН*. 1998. Т. 359. № 2. С. 208.
10. *Зуев Б.К., Ягов В.В., Гецина М.Л., Руденко Б.А.* Разряд при вскипании в канале – новый источник атомизации и возбуждения для атомно-эмиссионного определения металлов в потоке // *Журн. аналит. химии*. 2002. Т. 57. № 10. С. 907. (*Zuev B.K., Yagov V.V., Getsina M.L., Rudenko B.A.* Discharge on boiling in channel as a new atomization and excitation source for the flow determination of metals by atomic emission spectrometry // *J. Anal. Chem.* 2002. V. 57. P. 907.)
11. *Cherfalvi T., Mezei P., Apai P.* Emission studies on a glow discharge in atmospheric pressure air using water as cathode // *J. Phys. D: Appl. Phys.* 1993. V. 26. P. 2184.
12. *Jamroz P., Zyrnicki W.* Spectroscopic characterization of miniaturized atmospheric-pressure DC glow discharge generated in contact with flowing small size liquid cathode // *Plasma Chem. Plasma Proc.* 2011. V. 31. P. 681.
13. *Paing H.W., Hall K.A., Marcus R.K.* Sheathing of the liquid sampling – atmospheric pressure glow discharge microplasma from ambient atmosphere and its implication for optical emission spectroscopy // *Spectrochim. Acta B*. 2019. V. 155. P. 99.
14. *Ягов В.В., Гецина М.Л., Зуев Б.К.* О возможности применения разрядов со струйным электролитным катодом в качестве источников эмиссионных спектров для атомно-эмиссионного детектора в проточном анализе // *Журн. аналит. химии*. 2004. Т. 59. № 11. С. 1150. (*Yagov V.V., Getsina M.L., Zuev B.K.* Use of electrolyte jet cathode glow discharge as source of emission spectra for atomic emission detectors in flow-injection analysis // *J. Anal. Chem.* 2004. V. 59. P. 1037.)
15. *Liu X., Zhu Z., He D., Zheng H., Gan Y., Belshaw N.S., Hu S., Wang Y.* Highly sensitive elemental analysis of Cd and Zn by solution anode glow discharge atomic emission spectrometry // *J. Anal. At. Spectrom.* 2016. V. 31. P. 1089.
16. *Jamroz P., Greda K., Dzimitrowicz A., Swiderski K., Pohl P.* Sensitive determination of Cd in small-volume samples by miniaturized liquid drop anode atmospheric pressure glow discharge optical emission spectrometry // *Anal. Chem.* 2017. V. 89. P. 5729.
17. *Greda K., Swiderski K., Jamroz P., Pohl P.* Flowing liquid anode atmospheric pressure glow discharge as an excitation source for optical emission spectrometry with improved detectability of Ag, Cd, Hg, Pb, Tl and Zn // *Anal. Chem.* 2016. V. 88. P. 8812.
18. *Gorska M., Greda K., Pohl P.* On the coupling of hydride generation with flowing liquid anode atmospheric pressure glow discharge for determination of traces of As, Bi, Hg, Sb and Se by optical emission spectrometry // *Talanta*. 2021. V. 222. P. 121510.
19. *Shekhar R., Karunasagar D., Ranjit M., Arunachalam J.* Determination of elemental constituents in different

- matrix materials and flow injection studies by the electrolyte cathode glow discharge technique with a new design // *Anal. Chem.* 2009. V. 81. P. 8157.
20. Doroski T.A., King A.M., Fritz M.P., Webb M.R. Solution-cathode glow discharge-optical emission spectrometry of a new design and using a compact spectrograph // *J. Anal. At. Spectrom.* 2013. V. 28. P. 1090.
 21. Swiderski K., Dzimitrowicz A., Jamroz P., Pohl P. Influence of pH and low-molecular weight organic compounds in solution on selected spectroscopic and analytical parameters of flowing liquid anode atmospheric pressure glow discharge for the optical emission spectroscopic determination of Ag, Cd and Pb // *J. Anal. At. Spectrom.* 2018. V. 33. P. 437.
 22. Ягов В.В., Коротков А.С., Жирков А.А., Погонин В.И., Зуев Б.К. Портативный атомно-эмиссионный спектрометр для анализа растворов на основе капельно-искрового разряда // *Журн. аналит. химии.* 2019. Т. 74. С. 234.
 23. Зайдель А.Н., Прокофьев В.К., Райский С.М. Таблицы спектральных линий. М.: Наука, 1977. 800 с.
 24. Greda K., Gorska M., Welna M., Jamroz P., Pohl P. In-situ generation of Ag, Cd, Gh, In Tl and Zn volatile species by flowing liquid anode atmospheric pressure glow discharge operated in gaseous jet mode — evaluation of excitation processes and analytical performance // *Talanta.* 2019. V. 199. P. 107.
 25. Ягов В.В., Гецина М.Л. Влияние состава фонового электролита на интенсивность линий металлов в электрических разрядах с жидким электролитным катодом // *Журн. аналит. химии.* 2004. Т. 59. № 1. С. 1.
 26. Liu X., Liu Z., He D., Yao S., Zheng H., Hu S. Generation of volatile cadmium and zinc species based on solution anode glow discharge induced plasma electrochemical processes // *Anal. Chem.* 2017. V. 89. № 6. P. 3739.

УДК 543.42.062

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ НЕФТЕПРОДУКТОВ В ПОЧВЕ С ЕСТЕСТВЕННОЙ ВЛАЖНОСТЬЮ ИК-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

© 2022 г. П. А. Василенко^а, *, С. Г. Корниенко^а^аИнститут проблем нефти и газа Российской академии наук
ул. Губкина, 3, Москва, 119333 Россия

*e-mail: pevasilenko@yandex.ru

Поступила в редакцию 08.12.2020 г.

После доработки 10.06.2021 г.

Принята к публикации 10.06.2021 г.

Предложен способ определения содержания нефтепродуктов (НП) в почве с естественной влажностью ИК-спектрометрическим методом. Проведен сравнительный анализ результатов определения содержания НП в почвах стандартным методом и предлагаемым ИК-спектрометрическим способом с измерением оптической плотности экстракта нефтепродуктов из почвы хладоном 113. Определение нефтепродуктов в почвах по ГОСТу Р 54039-2010 и РД 52.18.575-96 не позволяет оценить содержание легких НП, поскольку значительная их часть теряется при высушивании проб на стадии пробоподготовки. Предлагаемый способ позволяет существенно повысить достоверность определения содержания нефтепродуктов в почвах, поскольку измерения проводят при естественной влажности образцов, соответствующей их влажности в момент изъятия из горизонта залегания.

Ключевые слова: инфракрасная спектрометрия, оптическая плотность, нефтепродукты, почвы.**DOI:** 10.31857/S0044450222030124

Содержание нефтепродуктов (НП) в почвах в настоящее время определяют по ГОСТу Р 54039-2010 [1], предусматривающему использование спектрометрии в ближней инфракрасной (ИК) области в режиме диффузного отражения. Метод позволяет определять НП в диапазоне содержания 0.1–10 мас. %. Пробоподготовка почвы по этому ГОСТу (сушка, растирка в ступке, просеивание) приводит к значительной потере присутствующих в составе загрязнения легких фракций нефтепродуктов. Весьма сложен также процесс калибровки ИК-спектрометра. ГОСТ Р 54039-2010 рекомендует для определения содержания нефтепродуктов в качестве базового использовать метод ИК-спектрометрии экстрактов в соответствии с РД 52.18.575-96 [2], при этом НП экстрагируют из почв четыреххлористым углеродом.

Цель настоящей работы – обоснование методики определения содержания НП в почвах с естественной влажностью ИК-спектрометрическим способом. В данном случае естественной влажностью считается влажность образца почвы в момент его изъятия из горизонта залегания.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследования проводили на территории аэродрома, загрязненной керосином ТС-1, где было отобрано более 200 проб почвогрунтов по 0.5 кг на глубине до 4.2 м. Содержание НП в пробах определяли ИК-спектрометрически по оптической плотности экстракта, полученного после экстракции нефтепродукта из почвы хладоном 113 [3, 4] при комнатной температуре. Пробу грунта (обычно массой 10 г) измельчали (не растирали) в ступке, а затем НП экстрагировали с использованием 30 мл хладоном 113 путем встряхивания в течение 15 мин в закрытой колбе. При очевидных признаках значительного содержания нефтепродуктов их экстрагировали из сырой пробы дважды с использованием 20 мл хладоном. Оставшуюся после экстракции НП пробу грунта сушили в течение 10–12 ч при комнатной температуре (~23–25°C), растирали в ступке (не просеивали) и нефтепродукты снова экстрагировали хладоном. Экстракт НП из проб почво-растительного слоя очищали от естественных углеводородов на хроматографической колонке с использованием оксида алюминия и фильтровали через бумажный фильтр. Экстракты нефтепродуктов из остальных проб фильтровали только через бумажный фильтр. Таким образом, каждую

Таблица 1. Основные технические характеристики спектрометра ИКАН-1

Параметр	Значение
Спектральный диапазон, нм	от 1800 до 3600
Абсолютная погрешность установки длины волны, нм	Не выше 5
Диапазон измерений спектрального коэффициента направленного пропускания (СКНП), %	от 0 до 100
Пределы допускаемого значения абсолютной погрешности при измерении СКНП, %	±2
Пределы допускаемого значения случайной составляющей погрешности при измерении СКНП, %	0.5
Время установления рабочего режима, мин	20
Время анализа одной пробы, мин	5

пробу анализировали дважды – один раз во влажном состоянии, а второй раз после осушки. Полученные значения концентраций НП в пробах во влажном и сухом состоянии суммировали. В связи с исключительно высоким уровнем техногенного загрязнения возможное содержание в пробах природных углеводородов считали незначительным и в расчет не принимали.

Содержание НП в пробах определяли по градуировочным зависимостям оптической плотности экстракта при длине волны 3.42 мкм от концентрации в нем керосина (мг/кг образца). Использовали экспериментальный образец ИК-спектрометра ИКАН-1, разработанного в Институте проблем нефти и газа РАН. Основные технические характеристики прибора ИКАН-1 приведены в табл. 1.

Одновременно в таком же количестве пробы грунта (10 г) определяли содержание нефтепродуктов в соответствии с РД 52.18.575-96. Четыреххлористый углерод, рекомендуемый в стандартном методе РД 52.18.575-96, заменили на хладон 113, поскольку степень извлечения керосина из проб четыреххлористым углеродом существенно меньше, чем хладоном. Промышленный хладон очищали перегонкой. Для построения градуировочных зависимостей использовали растворы керосина ТС-1 в хладоне 113.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 2 приведены результаты определения содержания керосина в различных типах почв, которые были отобраны при обследовании территории аэродрома. В столбцах “Влажная проба” и “Сухой остаток” приведены результаты определения содержания керосина в пробах предлагаемым ИК-спектрометрическим способом, а в столбце “Стандартный метод” – рассчитанные по методике РД 52.18.575-9. В большинстве глинистых проб (глины и суглинки) количество керосина, экстрагированного из высушенной после экстракции сырой пробы, больше, чем количество керосина, экстрагированного из такой же пробы, высушенной в соответствии с РД 52.18.575-9 при любом содержании керосина в

пробе. Но так как по предлагаемому способу часть керосина извлечена заранее из влажной пробы, общее количество керосина оказалось существенно больше, что особенно заметно при высоком загрязнении почвы. Анализ данных табл. 2 свидетельствует о том, что методики определения загрязнений почвы легкими НП в ГОСТ Р 54039-2010 или РД 52.18.575-96 не учитывают естественное испарение нефтепродуктов при сушке влажной пробы. Это существенно снижает достоверность результатов определения содержания нефтепродуктов, так как на практике необходимо знать их содержание в почвах с естественной влажностью, соответствующей условиям их залегания, а не в сухом образце почвы. Это может служить доказательством более высокой достоверности определения степени загрязнения почвы предлагаемым способом по сравнению с методикой РД 52.18.575-96, в соответствии с которой содержание НП определяют только для искусственно высушенных проб почвы.

Представленные в табл. 2 результаты показывают, что предлагаемый способ можно использовать для определения содержания легких фракций нефтепродуктов практически в любых почвах и при любой концентрации НП. Очевидно, что рекомендуемый в РД 52.18.575-96 в качестве растворителя четыреххлористый углерод не извлекает весь содержащийся в почве нефтепродукт и поэтому ограниченно пригоден для этой цели. Следует отметить также, что четыреххлористый углерод ядовит.

Настоящее исследование выполнено в 2000 г., а в 2001 г. опубликован патент [3] на экстракцию нефтепродуктов из воды хладоном 113. Преимущество использования хладона 113 для экстракции НП впервые доказано Петровым и сотр. [4]. Несмотря на то, что многие страны перешли на экстракцию нефтепродуктов хладоном 113, в России до сих пор для этой цели используют четыреххлористый углерод, который, в соответствии с полученными данными, извлекает из почвы не более половины НП.

Таблица 2. Найденное содержание (мг/кг) керосина в пробах почв различных видов

№ скважины, описание породы	Влажная проба	Сухой остаток	Стандартный метод	Суммарное по предлагаемому способу	Глубина отбора проб, м
Глины					
417, плотная, светло-коричневая	6.7	13.7	9.2	20.4	4.0–4.2
419, темно-серая, уплотненная	5.1	5.4	5.3	10.5	4.0–4.2
428, коричневая, слабопластинчатая	4.6	4.8	5.0	9.4	1.0–1.2
428, коричневая, слабопластинчатая	5.7	5.2	4.0	10.9	4.0–4.2
435, коричневая, вязкая	5.2	13.5	8.1	18.7	1.0–1.2
435, серая, пластинчатая	4.9	24.0	18.6	28.9	4.0–4.2
442, коричневая, вязкая	1.4	22.9	18.1	24.3	4.0–4.2
448, темная с песком	23.2	294.4	242.3	317.6	4.0–4.2
452, светло-желтая, плотная	5.2	5.3	5.1	10.5	4.0–4.2
459, коричневая, плотная	4.3	16.6	17.0	20.9	1.0–1.2
460, коричневая, плотная	4.1	10.9	9.2	15.0	1.0–1.2
460, коричневая, плотная	8.6	17.0	15.6	25.6	4.0–4.2
467, коричневая, плотная	3.9	5.7	5.0	9.6	1.0–1.2
467, коричневая, плотная	3.2	5.6	5.0	8.8	4.0–4.2
470, коричневая, плотная	9.6	13.5	13.4	23.1	4.0–4.2
471, коричневая, плотная	3.0	5.7	4.1	8.7	1.0–1.2
475, коричневая, плотная	4.9	5.0	4.6	9.9	4.0–4.2
476, темно-коричневая, слюдистая	13.0	6.5	8.3	19.5	4.0–4.2
477, с глинистым песком	3.5	14.7	13.2	18.2	1.0–1.2
477, коричневая	3.7	17.9	11.5	21.6	4.0–4.2
481, серая	9.7	14.1	—	23.8	0.8–1.0
482, светло-коричневая	6.0	16.5	6.6	22.5	0.8–1.0
503, коричневая, вязкая, пластинчатая	9.8	17.9	21.1	27.7	4.0–4.2
432, темно-коричневая, плотная	51.6	65.3	82.4	116.9	4.0–4.2
447, темная	106.2	487.7	511.4	593.9	4.0–4.2
452, светло-желтая, плотная	5.2	5.3	5.2	10.5	4.0–4.2
469, коричневая, плотная	52.9	283.6	186.8	336.5	4.0–4.2
445, темно-серая, слабопесчаная	2944.9	661.7	1967.0	3606.6	4.0–4.2
454, темно-серая, вязкая	601.7	565.1	611.2	1166.8	1.0–1.2
454, пластинчатая	911.1	960.5	949.8	1871.6	4.0–4.2
Суглинки					
418, светло-желтый, плотный	4.8	5.7	5.0	10.5	4.0–4.2
429, светло-коричневый	5.1	4.5	5.3	9.6	4.0–4.2
430, коричневый, плотный	134.7	385.6	376.3	520.3	0.0–0.20
436, коричневый, плотный	5.2	5.6	3.8	10.8	1.0–1.2
442, черный, супесчаный	4.8	28.1	17.1	32.9	0.0–0.2
442, желтый, плотный	4.2	17.7	10.4	21.9	1.0–1.2
445, коричневый с просл.глин	292.3	183.9	264.3	476.2	1.0–1.2
446, темно-серый до коричневого	5.6	5.0	5.9	10.6	2.4–2.6
480, желтый, средний	11.6	27.8	12.3	39.4	0.8–1.0
486, коричневый	4.8	5.3	5.0	10.1	0.8–1.0
487, светло-коричневый	4.6	5.1	4.8	9.7	0.8–1.0
488, черный	8.1	14.0	13.9	22.1	0.8–1.0

Таблица 2. Окончание

№ скважины, описание породы	Влажная проба	Сухой остаток	Стандартный метод	Суммарное по предлагаемому способу	Глубина отбора проб, м
Почво-растительный слой					
420	201.1	220.9	203.9	422.0	0.0–0.2
424	5.0	432.9	268.9	437.9	0.0–0.2
435	9.6	26.2	12.2	35.8	0.0–0.2
447	136.3	138.1	52.8	274.4	0.0–0.2
454	157.1	374.5	364.2	531.6	0.0–0.2
459	5.7	5.4	5.7	11.1	0.0–0.2
460	9.2	8.3	7,9	17.5	0.0–0.2
467	8.3	5.7	6.2	14.0	0.0–0.2
477	6.1	484.8	324.7	490.9	0.0–0.2
480	0.6	6.7	6.1	7.3	0.0–0.2
482	4.0	9.5	6.6	13.5	0.0–0.2
486	5.4	5.1	5.7	10.5	0.0–0.2
487	5.0	5.3	5.3	10.3	0.0–0.2
488	13.7	29.4	16.9	43.1	0.0–0.2
Песок					
424, песок темно-серый, глинистый	2171.9	294.4	1715.8	2466.3	4.0–4.2
425, супесь серая, легкая	1249.0	205.9	1209.2	1454.9	1.0–1.2
425, песок серый, среднезернистый	3245.8	126.6	1910.1	3372.4	4.0–4.2
430, песок темно-серый, мелкозернистый, глинистый	5.9	1069.8	687.9	1075.7	1.0–1.2
430, песок темно-серый, мелкозернистый, глинистый	851.9	196.3	494.4	1048.2	4.0–4.2
436, песок черный, среднезернистый с глинистой прослойкой	2722.7	601.9	1722.2	3324.6	4.0–4.2
437, песок серый, среднезернистый с глинистой прослойкой	1180.7	115.6	608.5	1296.3	1.0–1.2
437, песок серый, среднезернистый	227.4	55.4	154.3	282.8	4.0–4.2
438, песок желтый, среднезернистый	98.7	66.9	65.0	165.6	1.0–1.2
438, песок среднезернистый, серый	400.8	185.9	167.3	586.7	6.3–6.5
448, песок желто-коричневый, слабоглинистый	23.2	294.4	242.3	317.6	4.0–4.2
450, песок желтый, среднезернистый, глинистый	4.8	15.6	13.0	20.4	4.0–4.2
456, супесь желтая, средняя	5.5	181.2	49.9	186.7	4.0–4.2
451, песок глинистый, среднезернистый	10.9	6.0	5.8	16.9	4.0–4.2
453, супесь желтая, легкая	4.5	5.0	4.6	9.5	4.0–4.2
456, супесь желтая, средняя	5.5	181.2	49.9	186.7	4.0–4.2

* * *

Таким образом, показано, что используемые для определения нефтепродуктов в почвах методики ГОСТ Р 54039-2010 и РД 52.18.575-96 не позволяют оценить содержание легких нефтепродуктов, поскольку значительная их часть теряется при высушивании проб на стадии пробоподготовки. Использование хладона 113 вместо четыреххлористого углерода при экстракции НП из образцов почвы позволяет существенно повы-

сить достоверность определения содержания в них нефтепродуктов. Полученные результаты могут быть положены в основу разработки и апробации методики определения содержания нефтепродуктов в почве ИК-спектрометрическим способом при создании новых нормативов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- ГОСТ Р 54039-2010. Качество почв. Экспресс-метод ИК-спектроскопии для определения количе-

- ства и идентификации загрязнения почв нефтепродуктами. М.: Стандартиформ, 2011. 5 с.
2. РД 52.18.575-96. Методические указания. Определение валового содержания нефтепродуктов в пробах почвы методом инфракрасной спектроскопии. Методика выполнения измерений. СПб.: Гидрометеоздат, 1999. 22 с.
 3. *Любименко В.А., Василенко П.А., Жалнина Т.И., Петров С.И., Якубсон К.И.* Способ определения нефтепродуктов в воде. Патент РФ № 2164024 С2. Заявка 99102065/12 от 02.04.1999, опубл. 03.10. 2001.
 4. *Петров С.И., Фула А., Василенко П.А., Жалнина Т.И., Любименко В.А.* ИК-спектрофотометрическое определение нефтепродуктов в воде с предварительным концентрированием методом твердофазной экстракции // Журн. аналит. химии. 1998. Т. 53. № 11. С. 1194.

УДК 543.054

ПОВЕРХНОСТНО-МОДИФИЦИРОВАННЫЙ ОКСИД ЖЕЛЕЗА КАК СОРБЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ ДЛЯ ИЗВЛЕЧЕНИЯ АСФАЛЬТЕНОВ

© 2022 г. Д. В. Пряжников^а *, И. В. Кубракова^а, Д. И. Панюкова^а, Т. А. Марютина^а^аИнститут геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского Российской академии наук
ул. Косыгина, 19, Москва, 119991 Россия

*e-mail: pryaznikov@geokhi.ru

Поступила в редакцию 25.05.2021 г.

После доработки 18.10.2021 г.

Принята к публикации 18.10.2021 г.

Изучено сорбционное поведение асфальтенов, а также их агрегатов в неводных (толуольных) растворах на поверхностно-модифицированном сорбенте типа “ядро–оболочка” на основе наноразмерного магнетита. Асфальтены предварительно выделяли из нескольких видов тяжелого нефтяного сырья и характеризовали комплексом физико-химических методов. По результатам сорбционных исследований можно говорить о потенциальной эффективности предложенного сорбента для извлечения асфальтеновых соединений, например, для промышленной деасфальтизации нефти или в сорбционно-аналитических схемах определения асфальтенов в нефтепродуктах.

Ключевые слова: поверхностно-модифицированные магнитные сорбенты, асфальтены, тяжелое нефтяное сырье.

DOI: 10.31857/S0044450222050127

В настоящее время практически весь прирост запасов нефти происходит за счет так называемого тяжелого нефтяного сырья (ТНС), характеризующегося высоким содержанием асфальтенов. Переработка тяжелой нефти сложнее по сравнению с более легкими фракциями, энергоёмка и, как следствие, низкоэффективна; в связи с этим поиск способов повышения эффективности переработки ТНС представляет особую актуальность.

Асфальтены – наиболее высокомолекулярные и полярные компоненты нефти со средней молярной массой около 750 г/моль; содержание асфальтенов в нефтях колеблется от 1 до 20% [1, 2]. Они характеризуются склонностью к агрегированию в объеме дисперсионной среды и адсорбции на поверхностях из-за сильных межмолекулярных взаимодействий, обусловленных наличием гетероатомов, полярных групп, атомов металлов и полиароматических структур. Известно, что каталитические яды, к которым относятся ванадий и никель, прочно связаны со структурой асфальтенов нефти. Металлы, накапливаясь на катализаторах вторичных процессов нефтепереработки, существенно снижают их активность. Ограничения содержания ванадия в топливах также связаны с ванадиевой коррозией, возникающей на стенках камер сгорания газовых турбин и топочных устройств. Вследствие этого поиск и разра-

ботка эффективных и технологичных способов облагораживания (деасфальтизации и деметаллизации) ТНС остаются важными вопросами нефтедобычи и нефтепереработки [3, 4].

Наиболее широкое практическое применение для облагораживания ТНС получил метод сольвентной деасфальтизации. Один из активных вариантов такой обработки – дополнительное введение в систему сверхкритического флюида (действующего как антирастворитель), в котором диспергируемое вещество (асфальтен) малорастворимо или не растворимо вовсе. Сверхкритический антирастворитель характеризуется диффузией, которая может быть на два порядка выше показателя диффузии в обычном органическом растворителе. Этот факт предполагает, что перенасыщение раствора происходит быстрее и соответственно быстрее и более полно осаждаются растворенные вещества (в нашем случае асфальтеновая фракция) [5, 6]. Для улучшения эффективности процесса деасфальтизации под действием сверхкритического флюидов применяют добавки различных агентов. Один из таких вариантов – дополнительное введение сорбционных материалов, в частности, магнитных наносорбентов [7–9].

Потенциально применение таких сорбентов для решения практических задач сорбции (твердофазной экстракции) различных компонентов

имеет ряд преимуществ по сравнению с существующими сорбционными методиками. Наночастицы имеют значительно большую площадь поверхности на единицу объема, что позволяет повысить скорость и эффективность сорбционных процессов. За счет направленной модификации их поверхности можно сформировать сорбционные центры необходимого строения [10]. Эффективный и быстрый процесс магнитной сепарации использованного сорбента позволяет исключить длительную стадию седиментации или фильтрования осажденной массы от осветленной жидкости. Все это делает магнитные наночастицы потенциально мощным инструментом как для промышленных сорбционных процессов, так и для аналитических определений (стадии твердофазного концентрирования аналитов). Однако примеры сорбции из неводных (органических) систем (в отличие от водных растворов) на модифицированных магнитных наносорбентах практически не описаны в научной литературе. Отсутствуют также данные по оптимальной структуре оболочки (оболочек), обеспечивающей функционирование наночастиц в неводных средах, а также по подбору параметров сорбции.

В настоящей работе мы оценили возможности выделения асфальтенов из толуольных растворов на предложенном поверхностно-модифицированном сорбенте, исследовали закономерности сорбции, связанные с особенностями химического строения асфальтенов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты и оборудование. В качестве сорбатов использовали образцы асфальтенов, выделенные по стандартной методике ASTM D 6560 (IP 143). Источник асфальтенов – тяжелая нефть и гудрон с двух предприятий нефтепереработки (АО “Танеко” и ООО “ЛУКОЙЛ-Ухтанефтепереработка”). Асфальтены характеризовали валовым содержанием макрокомпонентов (S, N, O, H, C), ванадия и никеля, а также структурными параметрами молекул асфальтенов и их нанонагрегатов (рентгеноструктурные и ЯМР-исследования). ^1H и ^{13}C ЯМР-спектры асфальтенов регистрировали с использованием спектрометра Bruker Avance III HD 500, оснащенного криодатчиком повышенной чувствительности Bruker Prodigy CPB-VON&F. Рабочие частоты ЯМР-спектрометра: 500.13 МГц для ^1H и 125.76 МГц для ^{13}C . Рентгеновские дифрактограммы асфальтенов получали на дифрактометре Rigaku Rotaflex RU-200, оснащенном вращающимся медным анодом (длина волны излучения 1.542 Å), горизонтальным гониометром фирмы “Rigaku” (Япония) D/MAX-b, фокусирующим графитовым кристаллом-монокроматором и сцинтилляционным детектором.

Средние молекулярные массы асфальтенов определяли методом масс-спектрометрии с лазерно-десорбционной ионизацией с времяпролетным масс-анализатором (MALDI-TOF) на масс-спектрометре Bruker Autoflex Speed, оснащенный твердотельным УФ-лазером с длиной волны 355 нм, в линейном режиме и с регистрацией положительных однозарядных ионов (диапазон регистрируемых масс 500–5000 Да). Для регистрации ИК-спектров асфальтенов использовали ИК-Фурье спектрометр EQUINOX 55 S (Bruker, Германия); спектры регистрировали в диапазоне 700–4000 cm^{-1} .

Содержания матричных элементов в выделенных асфальтенах определяли путем динамического сжигания пробы в присутствии кислорода с последующим разделением на хроматографической колонке образующихся газов CO_2 , N_2 , H_2O , SO_2 . Анализ проводили на элементном анализаторе Thermo Scientific Flash EA-2000. Содержание наиболее распространенных в составе ТНС металлов (V, Ni) определяли методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой на масс-спектрометре Agilent 7900 в соответствии с ASTM D 5708 после предварительной подготовки образцов к анализу по методике ASTM D 7876.

Реакционные массы при получении модифицированных наносорбентов нагревали в микроволновой системе Discover SP-D (CEM Corp., США) с фокусированным излучением (частота 2.45 ГГц, максимальная мощность магнетрона 300 Вт с возможностью программирования и контроля текущих параметров: температуры и скорости ее подъема, давления, времени и мощности) в комплекте с температурным ИК-датчиком для работы при атмосферном и повышенном давлении.

Спектрофотометрическое определение содержания кремния, входящего в состав сорбента, проводили после кислотного разложения навески материала (спектрофотометр UV-1800, Shimadzu Corp., Япония). Содержание железа определяли методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой (Iris Intrepid Duo, Thermo Elemental, США). Изображения частиц получали при помощи сканирующего электронного микроскопа JEOL JSM-6700F (Япония). Содержание асфальтенов в растворах до и после сорбции определяли спектрофотометрически при 350 нм.

Синтез сорбционного материала и условия проведения экспериментов. Все реагенты для синтеза и модифицирования квалификации х.ч. или ч.д.а. использовали без дополнительной очистки. Для синтеза магнетитовых ядер использовали реакцию соосаждения Fe_3O_4 из смеси водных растворов солей железа Fe(II) и Fe(III) в мольном соотношении 1 : 2 водным раствором NH_3 (25–28 мас. %) в

условиях микроволнового (МВ) нагрева (методика описана в работе [11], условия МВ-обработки приведены в табл. 1).

Для модифицирования поверхности синтезированные частицы диспергировали в смеси этанола, дистиллированной воды и концентрированного раствора NH_3 с последующим добавлением Si-содержащего прекурсора (тетраэтилортосиликат, ТЭОС) (методика описана в работе [12]). Полученную суспензию перемешивали магнитной мешалкой при комнатной температуре в течение нескольких минут. Далее сосуд с содержимым помещали в микроволновую систему и нагревали по программе, приведенной в табл. 1, в результате чего происходил гидролиз ТЭОС и модифицирование поверхности Fe_3O_4 продуктами гидролиза (в основном диоксидом кремния). После охлаждения реакционной смеси полученный продукт ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$) отделяли магнитной сепарацией, промывали несколько раз водой и спиртом.

Сорбционные характеристики наносорбента (изотермы сорбции) по отношению к асфальтенам изучали отдельно для низких (0–50 мг/л) и более высоких (500–3000 мг/л) концентраций сорбатов, т.е. предположительно для случаев сорбции отдельных молекул и наноагрегатов. Эксперименты проводили при комнатной температуре и при 45°C, поскольку установлено, что степень извлечения асфальтенов в фазу сорбента из модельных толуольных растворов при этой температуре максимальна [13]. В качестве растворителя для асфальтенов использовали толуол. По результатам сорбционных экспериментов ($V_{\text{р-ра}} = 10$ мл, $m_{\text{сорб}} = 45$ мг, время установления равновесия 30–40 мин при перемешивании магнитной мешалкой) строили соответствующие изотермы сорбции.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение состава и структуры асфальтенов. Достоверная информация о строении асфальтенов является основой для последующего прогнозирования их поведения (в том числе и сорбционного) в реальных системах. С развитием инструментальных физико-химических методов анализа химическое строение асфальтенов изучают, используя комплекс методов ИК- и УФ-спектроскопии, ядерного и парамагнитного резонанса, рентгеноструктурного, электронно-микроскопического и масс-спектрометрического анализа.

Поскольку асфальтены – это не индивидуальные соединения, а класс компонентов нефти, их валовый состав и химическое строение варьирует в зависимости от конкретного нефтяного источника. Основной структурой асфальтена является плоский “лист” из конденсированных бензольных колец, на периферии которого расположены

Таблица 1. Условия микроволнового синтеза Fe_3O_4 и $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$

Параметр микроволнового синтеза	Fe_3O_4	$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$
Температура, °С	80	90
Мощность, Вт	300	300
Время набора, мин	0.5	2.5
Продолжительность нагрева, мин	10	15

заместители – парафиновые и нафтеновые углеводородные радикалы. Гетероатомы (S, N, O), вероятно, замещают некоторые из ароматических атомов углерода в листах. Некоторые фрагменты полиароматической структуры могут быть частично или полностью насыщенными и в разных сочетаниях с алифатическими участками могут формировать различные конечные структуры; на этот счет до сих пор существуют различные модели асфальтеновых молекул [2].

По данным рентгеноструктурных и электронографических исследований, асфальтены в твердом виде имеют кристаллоподобную структуру с несовершенной гексагонально-плоскостной упаковкой атомов углерода (подобной графиту). Эта упаковка формируется за счет агрегирования молекул с формированием “пачечных” структур диаметром 0.9–1.7 нм из 4–5 слоев, отстоящих друг от друга на расстояние около 0.36 нм [1]. При определенных условиях суммарное действие межмолекулярных сил приводит к дополнительному взаимодействию между ареновыми фрагментами, карбоксильными и аминогруппами в молекулах асфальтенов, что обеспечивает дальнейшее формирование более крупных кластеров наноагрегатов.

Эти закономерности строения, определяющие сорбционное поведение асфальтенов, подтверждены данными, полученными и рассчитанными для использованных в данной работе асфальтенов (табл. 2).

Видно, что исследованные образцы асфальтенов незначительно отличаются по валовому атомному составу и по структуре как самих молекул, так и агрегатов. На это же указывают и ИК-спектры образцов (рис. 1), которые также весьма близки. Во всех ИК-спектрах можно выделить характерные полосы поглощения, которые могут быть отнесены к тем или иным молекулярным группам, характерным для класса асфальтенов: сульфоксидные группы (1031 см^{-1}), метиленовые – CH_2 – и метильные – CH_3 группы (2851 и 2921 см^{-1} соответственно), карбонильные группы $\text{C}=\text{O}$

Таблица 2. Элементный состав и структурные характеристики образцов асфальтенов

Показатель	Гудрон Танеко	Нефть Танеко	Гудрон Ухта	Нефть Ухта
Валовый состав				
Молярная масса, г/моль	1680	1500	1710	1700
Содержание серы, %	4.07	7.67	3.7	3.72
Содержание азота, %	1.6	1.75	1.46	1.45
Содержание водорода, %	7.35	7.46	7.71	7.72
Содержание углерода, %	84.9	81.24	85.16	84.62
Содержание кислорода, % (по разнице)	2.08	1.88	1.97	2.49
Атомное соотношение Н/С	1.04	1.1	1.08	1.09
Содержание никеля, мкг/г	333 ± 15	517 ± 10	416 ± 37	382 ± 32
Содержание ванадия, мкг/г	1179 ± 54	2156 ± 37	476 ± 44	393 ± 27
Данные рентгеноструктурного анализа				
Расстояние между ароматическими листами	3.52	3.52	3.51	—
Средняя высота стопки ароматических листов в направлении, перпендикулярном плоскости листов	22.1	18.2	21.4	—
Число ароматических листов в стопке	7.3	6.2	7.1	—
Расстояние между алифатическими слоями (соседними алифатическими цепочками либо насыщенными кольцами)	5.64	5.9	5.79	—
Средний диаметр ароматического листа	19.3	19	19.4	—
Среднее количество ароматических колец в листе	7.2	7.1	7.3	—
Число атомов в молекуле с учетом элементного анализа (ЯМР ¹ Н и ¹³ С)				
Фактор ароматичности	0.74	0.7	0.75	0.73
Длина боковых алкильных цепей	5	4	5	5
Абсолютное число атомов водорода	123	112	132	131
Абсолютное число атомов углерода	119	102	121	120
Абсолютное число атомов серы	2	4	2	2
Абсолютное число атомов азота	2	2	2	2
Абсолютное число атомов кислорода	2	2	2	3

(1730 см⁻¹). Полосы поглощения при 1625 см⁻¹ относятся к валентным колебаниям С–С связей ароматических колец, при 1375 см⁻¹ – к валентным колебаниям С–С связей метильных групп (указывают на наличие алкильных заместителей небольшой длины), колебания при 725 см⁻¹ связаны с числом метиленовых групп в парафинах ($n \geq 4$).

Сорбент для отделения асфальтенов. Предложенный материал представляет собой наночастицы магнетита, покрытые слоем силикагеля. Такие поверхностно-модифицированные различными соединениями-модификаторами материалы являются эффективными сорбентами. За счет варьирования природы и характеристик оболочек

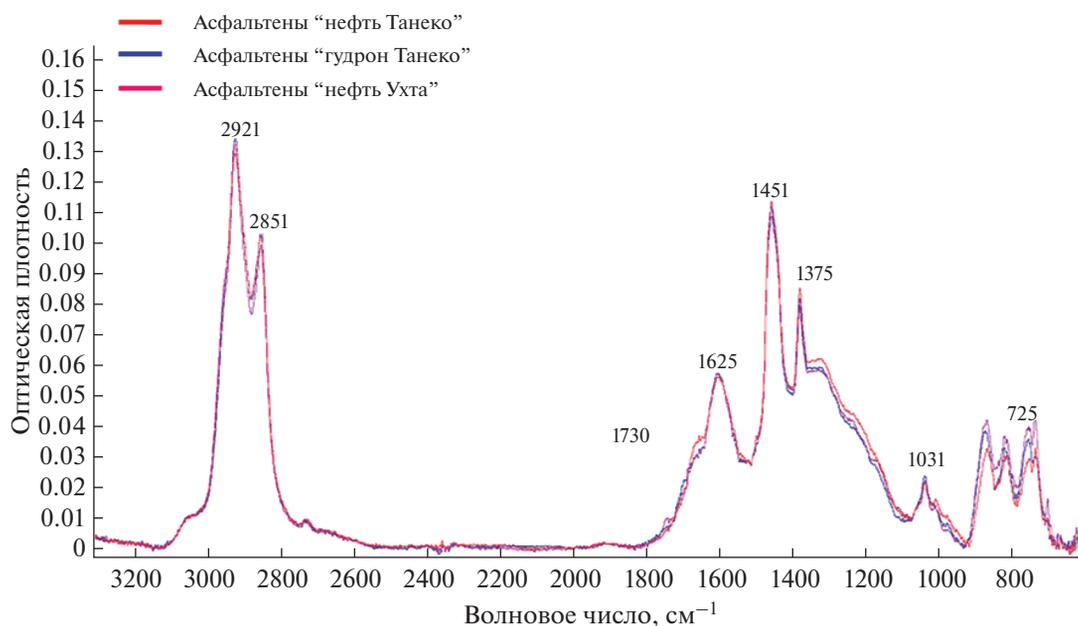


Рис. 1. ИК-спектры исследованных образцов асфальтенов.

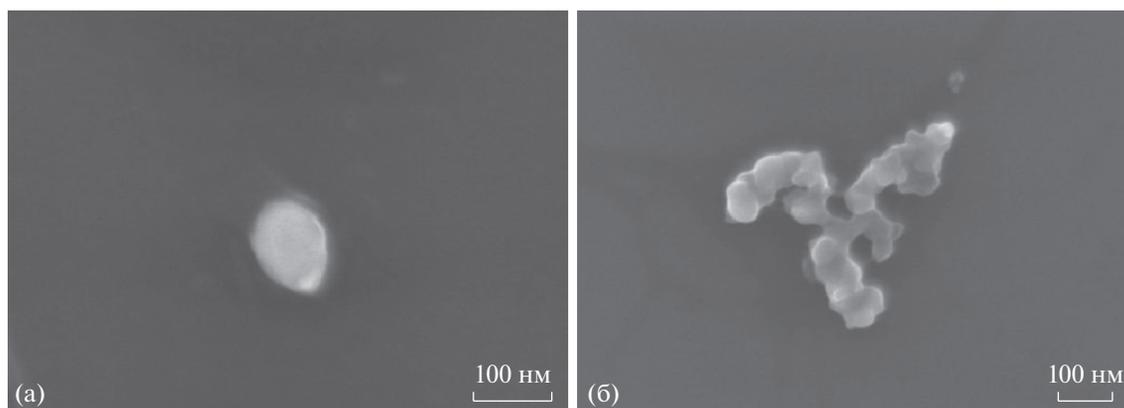


Рис. 2. Электронные микрофотографии отдельных частиц (а) и агрегатов (б) сорбционного материала $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$.

наночастиц можно менять в широких пределах их сорбционные свойства по отношению к сорбатам различной химической природы [10–13]. Выбор полярного силикагелевого покрытия обусловлен необходимостью сорбции умеренно полярных соединений (асфальтеновая фракция, как отмечалось выше, является наиболее полярной из присутствующих в нефтяном сырье) из органических неполярных сред; кроме того, силикагель устойчив (не реагирует химически и не растворяется) в органических средах. За счет суперпарамагнитных свойств ядра частицы сорбента под действием внешнего магнитного поля могут быть отделены, в то же время далее при необходимости частицы легко редуцируются; это свойство сорбента позволяет избежать длительных стадий

седиментации или фильтрования при разделении фаз, что ускоряет и упрощает процесс извлечения компонентов из жидких сред.

Электронными фотографиями сорбента $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ подтвердили наноразмерность полученных частиц (рис. 2): синтезированные материалы представляют собой одиночные частицы и их ассоциаты, имеющих размер от 50–80 нм до 400–700 нм. Сорбенты имеют развитую поверхность (113.4 м²/г по методу БЭТ), средний размер пор 10.4 нм, содержание основных компонентов в $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$, мас. %: SiO_2 36.0, Fe_3O_4 61.4 [13]. Получение фазы магнетита при синтезе подтверждено данными ИК-спектроскопии и рентгенодифракционного анализа [11].

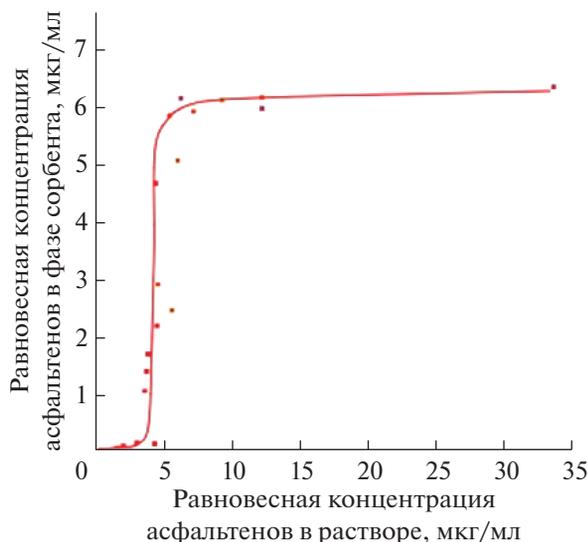


Рис. 3. Изотерма сорбции асфальтенов (источник – гудрон Лукойл УНП) на модифицированном наносорбенте $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ из толуольных растворов при комнатной температуре.

Применение МВ-нагрева при получении поверхностно-модифицированных сорбентов – относительно новый, но перспективный прием, позволяющий получать наночастицы с более узким распределением по размерам с бóльшим выходом за гораздо мéньшее время синтеза [14].

Потенциальную эффективность применения сорбента $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ по отношению к асфальтенам в статических условиях оценивали путем построения и последующего анализа изотерм сорбции молекулярных и агрегированных форм. Считается, что асфальтены в среде толуола образуют истинные растворы при концентрациях не более 50 мг/л; при выполнении этого условия изотерма сорбции имеет явно выраженную S-образную форму (рис. 3). Этот факт может указывать на существование достаточно сильных межмолекулярных взаимодействий между соседними сорбированными молекулами, что вполне объяснимо, учитывая описанную выше специфику строения молекул асфальтенов. Насыщение поверхности сорбента наступало при равновесной концентрации асфальтенов выше 5 мг/л, максимальная сорбционная емкость – 6.4 мг/г (0.057 мг/м^2).

При возрастании концентрации асфальтенов в жидкой фазе на 1–2 порядка, т.е. при формировании агрегатов асфальтенов в фазе раствора (рис. 4), изотермы сорбции приобретают выпуклую форму с ярко выраженным выходом на плато. Экспериментальные точки аппроксимировались уравнением Лэнгмюра с коэффициентом корреляции 0.93–0.99. Рассчитанная максимальная сорбционная емкость возрастает для исследованных образцов асфальтенов до 100–125 мг/г

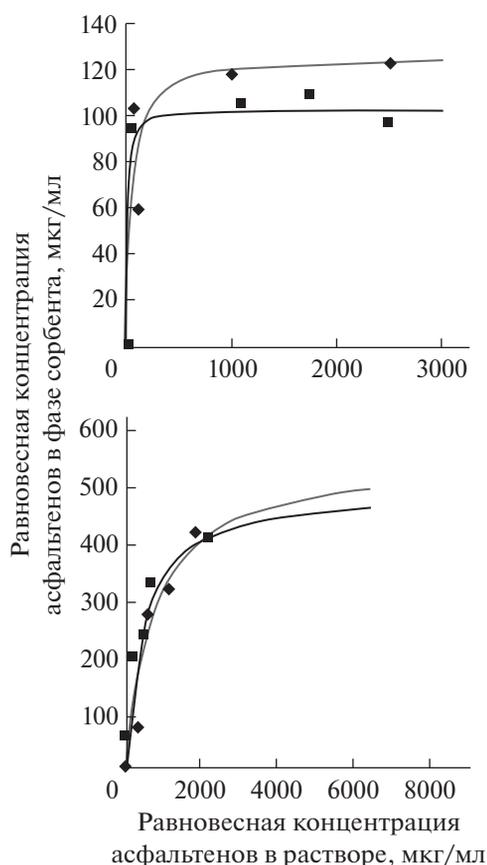


Рис. 4. Изотермы сорбции (экспериментальные точки и кривые, рассчитанные по уравнению Лэнгмюра) двух видов асфальтенов на модифицированном наносорбенте $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ из толуольных растворов при комнатной температуре (а) и при 45°C (б). (♦) – асфальтены из гудрона Лукойл-УНП, (■) – асфальтены из СВН Татнефть.

($0.9\text{--}1.1 \text{ мг/м}^2$) при комнатной температуре и до $500\text{--}550 \text{ мг/г}$ ($4.4\text{--}4.9 \text{ мг/м}^2$) при 45°C . Такое возрастание объяснимо, поскольку каждый сорбционный центр занимает не единичная молекула, а агрегат. Для организации крупномасштабных сорбционных процессов режим сорбции агрегатов будет, разумеется, более эффективным и рациональным.

С другой стороны, факт значительного роста сорбционной емкости при росте температуры процесса находится в противоречии с моделью Лэнгмюра, которая постулирует фиксированное и неизменное число центров сорбции, а следовательно, и сорбционной емкости при насыщении независимо от температуры. Факт температурной зависимости сорбционной емкости при насыщении можно объяснить разными закономерностями формирования агрегатов асфальтенов при различных температурах. В то же время для асфальтенов, полученных из разных источников,

сорбционные зависимости различаются между собой не слишком значительно.

В работе [15] получены лэнгмюровские изотермы сорбции асфальтенов на наночастицах различных оксидов из толуольных растворов при 25–55°C. Рассчитанные максимальные удельные количества сорбированных асфальтенов составили 0.6–1.05 мг/м². Авторы отмечают, что асфальтены лучше сорбировались на кислотных оксидах (NiO), нежели на основных или амфотерных (MgO и Fe₃O₄). В этом плане предложенные нами модифицированные наночастицы будут иметь очевидное преимущество (из-за внешней поверхности, состоящей из оксида с явно выраженными кислотными свойствами (SiO₂)), что подтверждается более высокой величиной максимальной сорбции (до 4.9 мг/м²).

В итоге можно говорить о принципиально различных механизмах при низких и высоких концентрациях сорбата (асфальтенов) в жидкой органической фазе. В первом случае (рис. 3) происходит сорбция отдельных молекул асфальтенов, по видимому, формирующих далее друг с другом на поверхности надмолекулярные структуры различной степени упорядоченности за счет межмолекулярных взаимодействий. При существенном увеличении концентрации асфальтенов в растворе (рис. 4) формируются агрегаты, сорбирующиеся по механизму монослойного заполнения поверхности. При этом значительное увеличение сорбируемости может быть связано именно с сорбцией наноагрегатов, а не отдельных молекул. Показанная экспериментально значительная зависимость максимальной сорбируемости от температуры (100–125 мг/г при комнатной температуре и 500–550 мг/г при 45°C) также можно объяснить температурной зависимостью размеров асфальтеновых агрегатов.

Возрастание эффективности деасфальтизации и деметаллизации при применении наноразмерных оксидов в гибридных технологиях переработки также отмечено в работе [8].

В итоге полученные данные свидетельствуют о том, что сорбент Fe₃O₄@SiO₂ может быть перспективен для выделения асфальтенов в аналитических либо промышленных целях. Полученные результаты в дальнейшем могут быть применены для разработок конкретных методик деасфальтизации. Однако для оптимального выбора конкретных агентов для деасфальтизации (растворитель, сорбент) и условий процесса (температура, соотношения реагентов, продолжительность), а также для подтверждения и/или уточнения имеющихся данных необходимо проведение дальнейших исследований с большей выборкой образцов нефтей и ТНС.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект 18-29-06044 мк.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сергиенко С.Р., Таиманова Б.А., Талалаев Е.И. Высокмолекулярные неуглеводородные соединения нефти. Смолы и асфальтены. М.: Наука, 1979. 269 с.
2. Adams J.J. Asphaltene adsorption, a literature review // *Energy and Fuels*. 2014. V. 28. № 5. P. 2831.
3. Магомедов Р.Н., Припахайло А.В., Марютина Т.А., Шамсуллин А.И., Айнуллово Т.С. Тренды развития и роль процесса сольвентной деасфальтизации в современной практике нефтепереработки (обзор) // *Журн. прикл. химии*. 2019. Т. 92. № 13. С. 1641. (Magomedov R.N., Pripakhaylo A.V., Maryutina T.A., Shamsullin A.I., Ainullovo T.S. Role of solvent deasphalting in the modern oil refining practice and trends in the process development // *Russ. J. Appl. Chem*. 2019. V. 92. № 12. P. 1634.)
4. Магомедов Р.Н., Попова А.З., Марютина Т.А., Кадиев Х.М., Хаджиев С.Н. Состояние и перспективы деметаллизации тяжелого нефтяного сырья (обзор) // *Нефтехимия*. 2015. Т. 55. № 4. С. 267. (Magomedov R.N., Popova A.Z., Maryutina T.A., Kadiev K.M., Khadzhiev S.N. Current status and prospects of demetallization of heavy petroleum feedstock (review) // *Petrol. Chem*. 2015. V. 55. № 6. P. 423.)
5. Zaki N.N., Kilpatrick P.K., Carbonell R.G. Methods of deresinating crude oils using carbon dioxide. US Patent 2010/0032340 A1. 2010.
6. Магомедов Р.Н., Припахайло А.В., Фотеева Л.С., Марютина Т.А. Метод выделения асфальтенов из состава нефти путем их осаждения в среде сверхкритического диоксида углерода // *Химия и технология топлив и масел*. 2019. № 3(613). С. 49.
7. Ko S., Huh C. Use of nanoparticles for oil production applications // *J. Petrol. Sci. Eng*. 2019. V. 172. P. 97.
8. Магомедов Р.Н., Припахайло А.В., Марютина Т.А. Влияние наночастиц оксида железа на эффективность сольвентной деасфальтизации нефтяного остатка субкритическим пентаном // *Сверхкритические флюиды: теория и практика*. 2019. Т. 14. № 3. С. 56.
9. Nassar N.N., Hassan A., Carbognani L., Lopez-Linares F., Pereira-Almao P. Iron oxide nanoparticles for rapid adsorption and enhanced catalytic oxidation of thermally cracked asphaltenes // *Fuel*. 2012. V. 95. P. 257.
10. Пряжников Д.В., Кубракова И.В. Магнитные наноразмерные материалы с модифицированной поверхностью: получение и исследование структуры, состава и свойств // *Журн. аналит. химии*. 2021. Т. 76. № 6. С. 496. (Pryazhnikov D.V., Kubrakova I.V. Surface-modified magnetic nanoscale materials: preparation and study of their structure, composition, and properties // *J. Anal. Chem*. 2021. V. 76. № 6. P. 685.)
11. Кубракова И.В., Кошечева И.Я., Пряжников Д.В., Мартынов Л.Ю., Киселева М.С., Тютюнник О.А. Микроволновый синтез, свойства и аналитические возможности наноразмерных сорбционных материалов на основе магнетита // *Журн. аналит. химии*. 2014. Т. 69. № 4. С. 378. (Kubrakova I.V., Koshecheva I.Ya., Pryazhnikov D.V., Martynov L.Yu., Kiseleva M.S., Tyutyunnik O.A. Microwave synthesis, properties and analytical possibilities of magnetite based na-

- noscale sorption materials // *J. Anal. Chem.* 2014. V. 69. № 4. P. 336.)
12. *Пряжников Д.В., Киселева М.С., Кубракова И.В.* Поверхностно-модифицированный магнитный наноразмерный сорбент для МТФЭ-ВЭЖХ-УФ определения 4-нонилфенола в природных водных объектах // *Аналитика и контроль.* 2015. Т. 19. № 3. С. 220.
 13. *Pryazhnikov D. V., Kubrakova I. V., Grebneva-Balyuk O.N., Maryutina T. A.* Magnetite-based highly dispersed materials for the sorption of asphaltenes // *Mend. Comm.* 2019. V. 29. № 6. P. 1.
 14. *Кубракова И.В., Пряжников Д.В.* Микроволновый синтез наноразмерных магнитных сорбентов // *Журн. аналит. химии.* 2021. Т. 76. № 1. С. 20. (*Kubrakova I.V., Pryazhnikov D.V.* Microwave-assisted synthesis of nanosized magnetic sorbents // *J. Anal. Chem.* 2021. V. 76. № 1. P. 15.)
 15. *Kashefi S., Lotfollahi M.N., Shahrabadi A.* Адсорбция асфальтенов наночастицами с различным химическим составом поверхности: исследование равновесных и термодинамических характеристик // *Нефтехимия.* 2019. Т. 59. № 6. № 1. С. 645. (*Kashefi S., Lotfollahi M.N., Shahrabadi A.* Asphaltene adsorption using nanoparticles with different surface chemistry: Equilibrium and thermodynamics studies // *Petrol. Chem.* 2019. V. 59. № 11. P. 1201.)

УДК 543.423

СОРБЦИОННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ МАГНИТНОГО КОМПОЗИТА НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК, СИНТЕЗИРОВАННЫХ НА РАЗЛИЧНЫХ КАТАЛИЗАТОРАХ

© 2022 г. С. С. Гражулене^а *, Н. И. Золотарева^а, А. Н. Редькин^а^аИнститут проблем технологии микроэлектроники и особочистых материалов Российской академии наук ул. Академика Осипьяна, 6, Черноголовка, Московская обл., 142432 Россия

*e-mail: grazhulene@mail.ru

Поступила в редакцию 22.06.2021 г.

После доработки 14.09.2021 г.

Принята к публикации 15.10.2021 г.

На примере сорбции ионов Ag(I), Au(III) и Pd(II) из водных растворов изучена зависимость сорбционных возможностей магнитных сорбентов МНЧ@УНТ от соотношения образующих его компонентов: наночастиц магнетита (МНЧ) и углеродных нанотрубок (УНТ), синтезированных методом каталитического пиролиза паров этанола на различных катализаторах группы железа. Показано, что сорбционная емкость всех типов композитов растет с увеличением содержания в них УНТ по отношению к МНЧ. Установлено, что оптимальное соотношение компонентов в композите для всех УНТ, полученных на различных катализаторах и имеющих различную морфологию, равно 10 : 1. При этом соотношении композит имеет максимальную сорбционную емкость по отношению к изучаемым ионам, которая составляет 6.5, 6.1 и 5.5 мг/г для сорбции Ag(I), Au(III) и Pd(II) соответственно, и достаточную намагниченность для разделения фаз в магнитном поле. Показано, что модификация УНТ магнитными наночастицами позволяет использовать образовавшийся композит не только в статическом, но и в динамическом варианте твердофазной экстракции; ранее применение индивидуальных УНТ, полученных на кобальтовом и железном катализаторах, не дало положительных результатов. В динамическом режиме можно использовать большие объемы анализируемых растворов, достигаются более высокие коэффициенты концентрирования по сравнению со статическим режимом, а также более низкие пределы определения элементов после выпаривания элюатов на графитовом порошке. Для всех видов композита выполнена сравнительная метрологическая оценка результатов определения элементов методом дуговой атомно-эмиссионной спектроскопии. Полученные пределы определения элементов составляют $n \times 10^{-7}$ мас. % ($K_{\text{конц}} = 200$).

Ключевые слова: сорбция, магнитный композит, магнитная твердофазная экстракция, углеродные нанотрубки, магнитные наночастицы, статический и динамический методы твердофазной экстракции.

DOI: 10.31857/S0044450222050036

Метод магнитной твердофазной экстракции (МТФЭ), заключающийся в сорбции ионов металлов или органических соединений на магнитном сорбенте с последующим отделением сорбента от раствора с помощью постоянного магнита, находит все более широкое применение в аналитической химии [1]. Разделение фаз с помощью магнита позволяет избежать трудоемких процессов фильтрования или центрифугирования, которые обычно используются для разделения фаз в статических методах твердофазной экстракции, и значительно упростить и ускорить процесс извлечения определяемых веществ из растворов. Магнитные сорбенты представляют собой материалы, в которых наночастицы оксидов железа внедрены в немагнитные матрицы.

Одним из перспективных магнитных сорбентов является МНЧ@УНТ, состоящий из магнитных наночастиц магнетита (МНЧ) и углеродных нанотрубок (УНТ). Благодаря высокой удельной поверхности, быстрому массообмену, полноте сорбции и десорбции, а также возможности многократной регенерации, магнитные нанокompозиты МНЧ@УНТ с успехом используются в аналитической практике для концентрирования, а также для очистки объектов окружающей среды [2–4]. Нанокompозит МНЧ@УНТ устойчив как в кислой, так и в щелочной средах, поэтому может использоваться для извлечения определяемых веществ из раствора в широком диапазоне рН. Обычно его получают путем адсорбции предварительно синтезированных МНЧ поверхностью

УНТ, так как этот способ является наиболее простым и экономичным [5, 6]. Как правило, для синтеза УНТ используют метод каталитического пиролиза паров (chemical vapor deposition, CVD) ацетилена [7], изобутана [8] или этанола [9] на различных катализаторах. Наши предыдущие исследования [10] показали, что полученные на никелевом катализаторе УНТ(Ni), а также кислотнo модифицированные УНТ могут успешно применяться в качестве сорбентов в твердофазной экстракции (ТФЭ) как в статическом, так и в динамическом режимах. Использование УНТ, полученных на кобальтовом (УНТ(Co)) и железном (УНТ(Fe)) катализаторах затруднено в статическом режиме из-за сложности разделения фаз и практически невозможно в динамическом варианте ТФЭ в связи с трудностью заполнения хроматографической колонки из-за ватообразной консистенции этих материалов. Причина этого явления – различная морфология УНТ, полученных в различных условиях синтеза, в частности с катализаторами разных типов. В то же время синтез на железном и кобальтовом катализаторах экономически более привлекателен в связи с гораздо большим по сравнению с никелевым катализатором валовым выходом продукта реакции – УНТ, что особенно важно в технологии и при концентрировании примесей из больших объемов водных сред в аналитической практике.

В связи с изложенным выше задачей настоящего исследования являлось нахождение и сопоставление возможностей использования в качестве сорбентов УНТ различных морфологий: УНТ(Ni), УНТ(Fe), УНТ(Co). Для решения этой задачи модифицировали УНТ магнитными наночастицами и изучали зависимости сорбционных возможностей композитов от соотношения в них УНТ и МНЧ в статическом и динамическом режимах ТФЭ. Особый интерес представляло изучение возможности использования УНТ(Co) и УНТ(Fe), модифицированных магнитными наночастицами, и в динамическом варианте ТФЭ, который позволяет достигать более низкие пределы обнаружения определяемых ионов металлов по сравнению со статическим за счет использования для анализа больших объемов водных растворов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для синтеза магнетита использовали свежеприготовленные растворы хлоридов железа(III) и (II) при их соотношении 2 : 1, содержащие 11.7 г $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ и 4.3 г $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Синтез МНЧ проводили в трехгорлой круглодонной колбе емк. 200 мл при 80°C в атмосфере инертного газа аргона при интенсивном перемешивании в течение одного часа. Затем в раствор быстро добавляли 20 мл 25–30%-ного раствора NH_3 до достижения pH 10. После охлаждения осадок удерживали в

колбе с помощью магнита, промывали деионизованной водой и этанолом до pH 7, высушивали до сухого остатка в сушильном шкафу при 60°C , перемешивали в ступке из оргстекла и помещали в бюкс, а затем в эксикатор для хранения.

Углеродные нанотрубки синтезировали по разработанной нами методике CVD [9]. УНТ осаждали на поверхности никелевого, кобальтового или железного катализатора, который после синтеза отмывали 30%-ной HNO_3 . Полученные образцы УНТ промывали деионизованной водой, высушивали и проводили окислительную модификацию путем кипячения УНТ в конц. HNO_3 ос. ч. в течение полутора часов. Затем УНТ отмывали от кислоты деионизованной водой до pH 7, высушивали и использовали для синтеза композита.

Магнитный сорбент МНЧ@УНТ синтезировали в конической колбе емк. 100 мл, в которую помещали по 100 мг заранее полученных МНЧ и УНТ. Заливали их 30 мл деионизованной воды и перемешивали при комнатной температуре на качалке с возвратно-поступательным движением в течение 30 мин. Образующийся магнитный сорбент удерживали в колбе магнитом, а не связавшиеся с МНЧ углеродные нанотрубки сливали в кварцевую чашку. Оставшийся в колбе полученный сорбент дважды промывали деионизованной водой и промывные воды сливали в ту же чашку. Сливы выпаривали, а сухой остаток высушивали под ИК-лампой и взвешивали, определяя таким образом количество не связавшихся в композит УНТ. По разности масс исходных и не связанных в композит УНТ определяли количество УНТ в магнитном сорбенте. Полученный магнитный сорбент оставляли в колбе во влажном состоянии и использовали для изучения сорбции ионов металлов из водных растворов.

Состав синтезированных порошков МНЧ и МНЧ@УНТ изучали методом рентгенофазового анализа на дифрактометре Bruker D2 PHAZER ($\text{CoK}\alpha_1$ -излучение) в виде суспензии в вазелиновом масле. При расшифровке рентгенограмм использовали банк данных “Power Diffraction File (PDF-2)”. Магнитные характеристики МНЧ и композита определяли при комнатной температуре на вибрационном магнитометре EG&G Princeton Applied Research, model 155. Для исследования морфологии образцов композитов МНЧ@УНТ, в состав которых входили УНТ, полученные на различных катализаторах, применяли просвечивающий электронный микроскоп (ПЭМ) JEOL JEM-2100 при ускоряющем напряжении 200 кВ.

Для изучения сорбции ионов металлов из водных растворов 50 мл раствора помещали в коническую колбу емк. 100 мл, где уже находилось 200 мг магнитного сорбента, и перемешивали на качалке в течение 20 мин. Необходимое значение

pH раствора создавали добавлением 10%-ного раствора NH_3 или 5%-ной HNO_3 .

После окончания процесса сорбции сорбент с извлеченными из раствора ионами металлов удерживали в колбе магнитом, а раствор сливали в кварцевую чашку с 500 мг графитового порошка, выпаривали досуха под ИК-лампой и анализировали. Сорбированные ионы Ag(I) , Au(III) и Pd(II) элюировали 6 мл 1 М HNO_3 при постоянном перемешивании в течение 30 мин. Затем сорбент вновь удерживали в колбе магнитом, а элюат сливали в другую кварцевую чашку с 500 мг графитового порошка, упаривали досуха под ИК-лампой и анализировали.

В случае сорбции в динамическом режиме для приготовления колонки 80 мг магнитного сорбента МНЧ@УНТ засыпали во фторопластовую трубку длиной 30 и внутренним диаметром 2.5 мм через фторопластовую воронку. Верх и низ колонки закрывали пробками из стекловолна. Колонку промывали раствором 1 М HNO_3 , затем деионизованной водой и 3 мл буферного раствора с pH 5.5–6.0. Анализируемый раствор пропускали через колонку со скоростью 2 мл/мин, используя перистальтический насос. Ионы металлов элюировали с колонки 4 мл 1 М HNO_3 . Элюат сливали в кварцевую чашку с 500 мг графитового порошка, упаривали досуха под ИК-лампой и анализировали.

Магнитный сорбент регенерировали путем обработки его в течение 15 мин 0.5 М HNO_3 и промывания деионизованной водой.

В качестве исходных растворов исследуемых элементов использовали одноэлементные стандартные растворы High Purity Standarts (США) с концентрацией элементов 1000 ppm. Рабочие растворы исследуемых элементов необходимой концентрации готовили разбавлением исходных деионизованной водой.

Для построения изотерм сорбции и определения сорбционной емкости сорбента готовили серию растворов с концентрацией исследуемых элементов от 10 до 70 мкг/мл. Из каждого раствора отбирали аликвоту 50 мл и при pH 6 проводили сорбцию на 200 мг сорбента до достижения сорбционного равновесия. Сорбент с извлеченными из раствора ионами металлов удерживали в колбе магнитом, а раствор сливали в кварцевую чашку с 500 мг графитового порошка, выпаривали досуха под ИК-лампой и анализировали.

Содержание элементов определяли методом атомно-эмиссионной спектроскопии (АЭС) в дуге постоянного тока силой 10 А на дифракционном спектрографе PGS-2 с решеткой 651 штр/мм, обеспечивающей обратную линейную дисперсию 0.74 нм/мм. В работе использовали графитовый порошок особой чистоты марки ОСЧ 8-4. Пробу

набивали в кратер нижнего электрода (анода). Кратер имел глубину и диаметр 4 мм, толщину стенок 1 мм. Конец верхнего электрода (катода) был заточен на конус. Расстояние между электродами составляло 4 мм. Использовали трехлинзовую систему освещения щели. Для регистрации эмиссионных спектров использовали разработанную в лаборатории фотоэлектрическую систему регистрации на основе линеек приборов с зарядовой связью. Анализ выполняли, применяя государственные стандартные образцы на основе графитового порошка (комплект СОГ-21, УГТУ-УПИ). Для расчета содержания элементов в растворе их концентрацию в графитовом порошке делили на коэффициент концентрирования, который определяли как соотношение масс анализируемого раствора и графитового порошка.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для решения поставленных задач синтезировали составляющие композит компоненты: МНЧ, УНТ(Ni), УНТ(Fe), УНТ(Co), из которых получали композиты МНЧ@УНТ методами, изложенными в “Экспериментальной части”, а также описанными нами ранее [10, 11]. Магнитный композит получали в две стадии при 80°C в атмосфере аргона. Этот метод получения, с нашей точки зрения, является более удобным и экономичным, чем одностадийный, а также позволяет управлять соотношением между УНТ и МНЧ в композите. Дифрактограмма порошка МНЧ показала, что его состав соответствует однофазному магнетиту Fe_3O_4 (карточка PDF 11-614). Средний размер частиц МНЧ составил 15.0 нм [11]. Методом ПЭМ установили, что средний диаметр частиц композита составляет 35–55, 45–85, 90–145 нм для УНТ(Ni), УНТ(Co) и УНТ(Fe) соответственно.

Сорбционные возможности полученных сорбентов изучали по отношению к ионам Au(III) , Ag(I) и Pd(II) из азотнокислых растворов. Для определения времени достижения сорбционного равновесия в статическом режиме изучали распределение исследуемых элементов между сорбентом и водным раствором в зависимости от времени контакта фаз. Установили, что максимальная сорбция всех исследуемых ионов металлов на сорбентах происходит в течение 20 мин (рис. 1).

Оптимальное значение pH сорбции элементов в статическом и динамическом режимах составило pH 6. Характер зависимости сорбции от pH аналогичен для всех типов сорбентов, содержащих УНТ: УНТ(Ni), УНТ(Co) и УНТ(Fe), поэтому на рис. 2 приведены кривые лишь для МНЧ@УНТ(Ni).

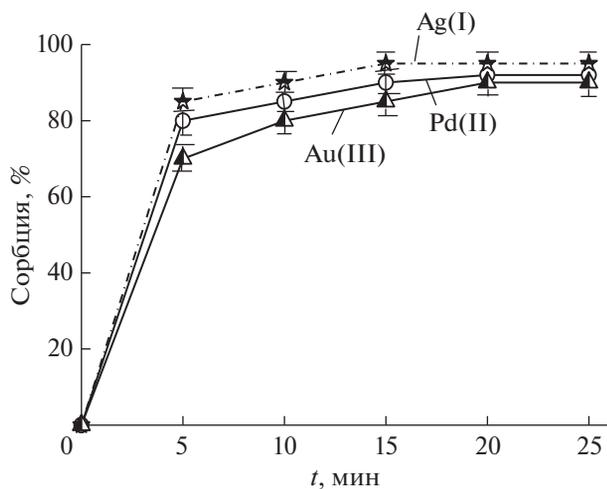


Рис. 1. Зависимость сорбции Au(III), Ag(I) и Pd(II) на МНЧ@УНТ от времени контакта с сорбентом (рН 6).

Степень извлечения ионов металлов на магнитных сорбентах (табл. 1) составила 90–95%. Содержание сорбированных на композите ионов металлов определяли по разности содержаний в исходном растворе и в сливе. По разности между количеством сорбированных ионов и их содержанием в элюате определяли количество десорбированных ионов. Оптимальное время элюирования сорбированных ионов 6 мл 1 М HNO_3 при постоянном перемешивании на качалке составило 30 мин.

На рис. 3 приведены изотермы сорбции (при комнатной температуре) ионов Au(III), Ag(I) и Pd(II) на МНЧ@УНТ(Ni). Аналогичный вид имеют изотермы сорбции для УНТ(Co) и УНТ(Fe). Полученные величины сорбционной емкости всех типов магнитных сорбентов по отношению к благородным металлам в зависимости от соотношения компонентов приведены в табл. 2. Как видно, с уменьшением содержания МНЧ в композитах их сорбционная емкость увеличивается. Соотношение компонентов, соответствующее

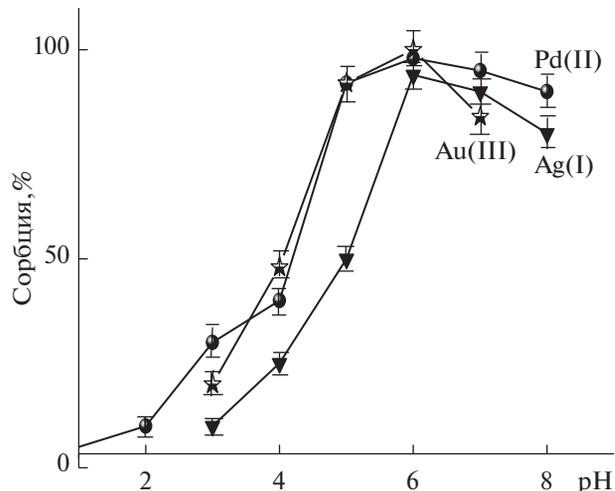


Рис. 2. Зависимость сорбции Au(III), Ag(I) и Pd(II) на МНЧ@УНТ(Ni) от рН раствора (концентрация сорбируемых ионов металлов 10 мкг/мл, объем раствора 10 мл).

сорбентам с максимальной емкостью, равно 10 : 1 для всех композитов, содержащих УНТ, полученных на различных катализаторах. При таком соотношении намагниченность всех исследованных композитов еще достаточна для отделения сорбента от анализируемого раствора с помощью магнита. Как и следовало ожидать, максимальным значением емкости относительно всех элементов обладает МНЧ@УНТ(Ni), а минимальной – МНЧ@УНТ(Fe). Сорбционная емкость МНЧ@УНТ(Co) имеет промежуточное значение.

Механизм сорбции ионов металлов на окислительно-функционализированных УНТ не раз обсуждался в работах ученых различных стран и обсуждался нами в обзоре [12]. К настоящему времени утвердилось мнение, что механизм сорбции включает несколько физических и химических процессов, преобладающим из которых является ионный обмен между ионами металлов в водной фазе и протонами карбоксильных и кар-

Таблица 1. Степень извлечения ионов Au(III), Ag(I) и Pd(II) из водного раствора магнитным сорбентом МНЧ@УНТ, содержащим углеродные нанотрубки различных морфологий, в оптимальных условиях сорбции и элюирования ($n = 4$, $P = 0.95$)

Параметр сорбции	МНЧ@УНТ(Ni)			МНЧ@УНТ(Co)			МНЧ@УНТ(Fe)		
	Ag(I) ($s_r = 0.14$)	Au(III) ($s_r = 0.16$)	Pd(II) ($s_r = 0.15$)	Ag(I) ($s_r = 0.15$)	Au(III) ($s_r = 0.18$)	Pd(II) ($s_r = 0.16$)	Ag(I) ($s_r = 0.17$)	Au(III) ($s_r = 0.19$)	Pd(II) ($s_r = 0.18$)
Введено, мкг	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
Сорбция, мкг	48.5 ± 10.8	47.0 ± 12.0	48.0 ± 11.4	47.5 ± 11.3	46.0 ± 11.3	47.5 ± 12.1	47.0 ± 12.7	46.0 ± 14.0	47.0 ± 13.5
Десорбция, мкг	47.5 ± 10.5	45.5 ± 11.6	46.0 ± 11.0	46.5 ± 11.1	44.5 ± 12.7	46.0 ± 11.7	45.5 ± 12.3	45.0 ± 13.4	45.0 ± 12.9
Степень извлечения, %	95.0	91.0	92.0	93.0	90.0	92.0	91.0	90.0	90.0

бонильных групп функционализированных УНТ. При этом известно, что при обработке УНТ более сильными окислителями (конц. HNO_3 , KMnO_4) на поверхности нанотрубок образуются преимущественно карбоксильные функциональные группы. В большинстве работ обсуждается влияние на сорбционные свойства УНТ условий окисления: типа окислителя, температуры и времени обработки, кислотности среды или pH растворов, концентрации металлов. Введенные функциональные группы повышают отрицательный заряд поверхности углерода, соответственно увеличивая катионообменную емкость УНТ. Однако нами показано [10–12], что при одних и тех же условиях функционализации существенную роль играет морфология УНТ, определяющая способность к функционализации (введению кислородосодержащих групп), а следовательно, к повышению сорбционных свойств полученного материала. В свою очередь, морфология УНТ зависит от условий синтеза: температуры и типа катализатора. Именно это, по-видимому, является фундаментальной причиной существенного различия сорбционных свойств УНТ, функционализированных в одинаковых условиях, но полученных при разных условиях синтеза (в одном и том же CVD методе синтеза). Логично предположить, что более дефектные УНТ будут более восприимчивы к воздействию сильных окислителей при модификации, что подтверждается на практике. В УНТ, полученных на никелевом катализаторе, концентрация дефектов существенно больше, что облегчает введение кислородосодержащих групп. При синтезе УНТ на железном и кобальтовом катализаторах образуются более совершенные структуры, затрудняющие ввод кислородосодержащих групп, о чем свидетельствует более низкая кислотность поверхности, полученная после обработки конц. HNO_3 .

В то же время более разветвленная морфология УНТ влияет, видимо, и на электростатический механизм сорбции, внося определенный вклад в общую величину сорбции.

Таблица 2. Сорбционная емкость композита МНЧ@УНТ (мг/г) с углеродными нанотрубками различных морфологий по отношению к ионам Au(III), Ag(I) и Pd(II) в зависимости от соотношения образующих его компонентов ($n = 4$, $P = 0.95$)

Соотношение УНТ : МНЧ	МНЧ@УНТ(Ni)			МНЧ@УНТ(Co)			МНЧ@УНТ(Fe)		
	Ag(I) ($s_r = 0.14$)	Au(III) ($s_r = 0.16$)	Pd(II) ($s_r = 0.15$)	Ag(I) ($s_r = 0.15$)	Au(III) ($s_r = 0.18$)	Pd(II) ($s_r = 0.16$)	Ag(I) ($s_r = 0.17$)	Au(III) ($s_r = 0.19$)	Pd(II) ($s_r = 0.18$)
1 : 1	3.5 ± 0.8	3.4 ± 0.9	3.0 ± 0.7	2.9 ± 0.7	2.7 ± 0.8	2.3 ± 0.6	2.0 ± 0.5	1.5 ± 0.4	1.3 ± 0.4
2 : 1	4.6 ± 1.0	4.5 ± 1.1	4.0 ± 1.0	3.8 ± 0.9	3.5 ± 1.0	3.0 ± 0.8	2.5 ± 0.7	2.0 ± 0.6	2.0 ± 0.6
5 : 1	5.8 ± 1.3	5.6 ± 1.4	5.1 ± 1.2	4.8 ± 1.1	4.6 ± 1.3	3.8 ± 1.0	3.4 ± 0.9	2.3 ± 0.7	2.5 ± 0.7
10 : 1	6.5 ± 1.4	6.1 ± 1.6	5.5 ± 1.3	5.2 ± 1.2	5.0 ± 1.4	4.0 ± 1.0	3.7 ± 1.0	2.7 ± 0.8	2.8 ± 0.8

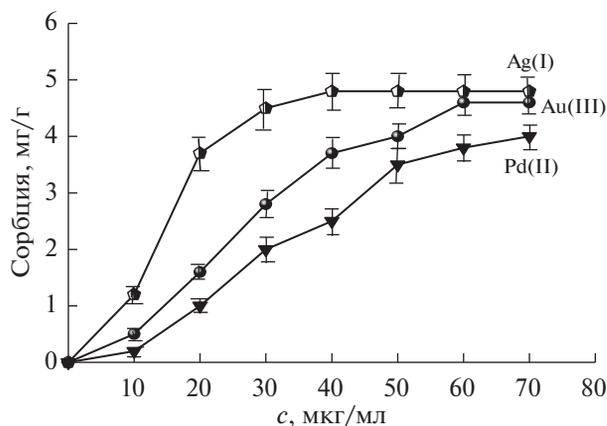


Рис. 3. Изотермы сорбции Au(III), Ag(I) и Pd(II) на МНЧ@УНТ(Ni) (pH 6, 25°C).

Поскольку нами показано, что определяющий вклад в величину сорбции на синтезированных магнитных сорбентах вносят УНТ [13], приведенные выше рассуждения по сорбции на УНТ можно отнести и к сорбции на композите, что подтверждено нами экспериментально в настоящей работе. Таким образом, различие в поведении магнитных сорбентов можно объяснить различающейся морфологией входящих в состав композита УНТ, полученных на различных катализаторах.

Показано [14], что в композите на основе УНТ(Ni) поверхность частиц шероховатая, имеются многочисленные изгибы и переплетения друг с другом. В композите МНЧ@УНТ(Fe) нанотрубки более прямые, имеют винтообразную форму и практически не переплетены между собой. В композите МНЧ@УНТ(Co) нанотрубки имеют как упорядоченные, так и скрученные участки, т.е. поверхность нанотрубок, выращенных как на кобальтовом, так и на железном катализаторах, существенно более гладкая, чем в случае никелевого. Магнитные частицы располагаются, как правило, в местах изгибов и дефектов УНТ. Таким образом, можно заключить, что сорбционная емкость магнитного композита по

Таблица 3. Проверка правильности и пределы определения Au(III), Ag(I) и Pd(II) в водных растворах дуговым атомно-эмиссионным методом после их предварительного концентрирования на магнитных сорбентах в динамическом режиме ($n = 4$, $P = 0.95$, объем раствора 100 мл, $K_{\text{конц}} = 200$)

Элемент	Введено, мкг	МНЧ@УНТ(Ni)		МНЧ@УНТ(Co)		МНЧ@УНТ(Fe)		c_{lim} , мас. %
		найдено, мкг	s_r	найдено, мкг	s_r	найдено, мкг	s_r	
Ag(I)	10.0	9.2 ± 2.0	0.14	9.0 ± 2.1	0.15	8.8 ± 2.4	0.17	1×10^{-7}
Au(III)	10.0	8.7 ± 2.1	0.16	8.8 ± 2.4	0.18	8.4 ± 2.5	0.19	5×10^{-7}
Pd(II)	10.0	9.0 ± 2.1	0.15	9.2 ± 2.2	0.16	8.7 ± 2.5	0.18	3×10^{-7}

отношению к исследованным элементам тем выше, чем менее упорядочена структура УНТ, входящих в его состав.

Вторая важная часть работы состояла в выяснении возможности использования магнитных сорбентов с УНТ всех морфологий в динамическом режиме ТФЭ. Известно, что динамический вариант ТФЭ позволяет использовать для анализа большие объемы растворов и тем самым обеспечивает более низкие пределы обнаружения ионов металлов по сравнению со статическим вариантом благодаря высоким коэффициентам концентрирования. Было интересно выяснить, позволит ли модификация УНТ магнитными наночастицами использовать их в динамическом режиме ТФЭ. Установлено, что МНЧ@УНТ(Co) и МНЧ@УНТ(Fe), в отличие от индивидуальных УНТ(Co) и УНТ(Fe), легко можно засыпать в колонку через воронку, если с противоположного конца колонки расположить магнит. Вначале через колонку с композитом пропускали буферный раствор с pH 5.5–6.0, а затем анализируемый раствор, содержащий определяемые ионы металлов. Оптимальная скорость пропускания раствора и элюирования с помощью 6 мл 1 М HNO₃ составляла 2 мл/мин. Элюат выпаривали на графитовом порошке ос. ч. и анализировали методом АЭС в дуге постоянного тока.

Для расчета количества ионов металлов в анализируемом растворе их содержание в концентрате на графитовом порошке делили на коэффициент концентрирования ($K_{\text{конц}}$), который определяли как соотношение массы анализируемого раствора к массе графитового порошка, на котором выпаривался элюат. Были достигнуты пределы определения элементов (c_{lim}) на уровне 10^{-7} мас. % (табл. 3), которые оценивали по нижней точке градуировочного графика, найденной с приемлемой точностью [15]. Правильность результатов определения Au(III), Ag(I) и Pd(II) в водном растворе после их предварительного концентрирования на магнитном сорбенте динамическим методом ТФЭ проверяли методом введено–найдено. Результаты (табл. 3) свидетельствуют об отсутствии

систематической погрешности в результатах определений.

Магнитный композит легко регенерируется 1 М HNO₃ и может многократно использоваться для извлечения исследуемых ионов металлов из водных растворов. Для подтверждения этого изучали сорбцию ионов Au(III), Ag(I) и Pd(II) из водных растворов при pH 6 на регенерированных сорбентах. В табл. 4 приведены результаты сорбции только для ионов Ag(I), так как для остальных ионов получили аналогичные закономерности. Как видно, один и тот же последовательно регенерируемый сорбент МНЧ@УНТ можно использовать для извлечения исследуемых ионов из водных растворов не менее 10 раз. И лишь после этого его сорбционная способность начинает заметно уменьшаться. Дополнительно постоянно контролировали количество магнитных частиц, которые могли бы перейти в раствор из сорбента в процессе сорбции и элюирования исследуемых ионов. Для этого определяли содержание железа в каждом сливе и элюате. Установлено, что количество растворившихся магнитных частиц в процессе проведения одного цикла сорбции и десорбции очень незначительно и находится на уровне 5×10^{-3} мг. Потеря массы магнитных частиц после 10 циклов сорбции–десорбции составляла лишь 5×10^{-2} мг, что никак не сказывается на устойчивости и сорбционных возможностях магнитного сорбента.

Таким образом, модификация УНТ магнитными наночастицами позволяет не только упростить и облегчить разделение фаз после сорбции элементов, но и решить более принципиальную и важную задачу использования УНТ(Co), УНТ(Fe) и УНТ(Ni) в качестве сорбентов. Здесь уместно напомнить, что ввиду высокой дисперсности и склонности к коагуляции, индивидуальные сорбенты УНТ(Co) и УНТ(Fe) практически непригодны для работы как в статическом, так и в динамическом вариантах ТФЭ из-за сложности разделения фаз после сорбции, а также невоз-

Таблица 4. Степень извлечения ионов Ag(I) из водного раствора магнитным сорбентом МНЧ@УНТ(Ni) в зависимости от кратности его использования ($n = 4$, $P = 0.95$, введено 50.0 мкг Ag(I))

№ эксперимента	Десорбция, мкг	s_T	Степень извлечения, %
1	47.5 ± 9.0	0.12	95.0
2	47.0 ± 9.0	0.12	94.0
3	47.5 ± 8.3	0.11	95.0
4	46.5 ± 8.1	0.11	93.0
5	46.0 ± 8.8	0.12	92.0
6	46.5 ± 8.1	0.11	93.0
7	45.0 ± 9.3	0.13	92.0
8	47.0 ± 9.0	0.12	94.0
9	46.0 ± 9.5	0.13	92.0
10	44.0 ± 8.3	0.12	90.0
11	43.0 ± 7.5	0.11	86.0
12	40.0 ± 7.6	0.12	80.0

возможности заполнения ими хроматографической колонки. Открывшаяся возможность работы с этими сорбентами в динамическом режиме, а также многократного их использования повышает экономическую эффективность разработанного метода извлечения следов благородных металлов из водных сред, пригодного как для пробоподготовки в аналитической практике, так и для технологических целей. Полученные метрологические характеристики разработанного химико-атомно-эмиссионного метода анализа свидетельствуют о надежности и достаточно низких пределах определения ионов Au(III), Ag(I) и Pd(II).

Работа выполнена в рамках Госзадания 075-00355-21-00.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Толмачева В.В., Апяри В.В., Кочук Е.В., Дмитриенко С.Г. Магнитные сорбенты наночастиц оксидов железа для выделения и концентрирования органических соединений // Журн. аналит. химии. 2016. Т. 71. № 4. С. 339. (Tolmacheva V.V., Apyari V.V., Kochuk E.V., Dmitrienko S.G. Magnetic adsorbents based on iron oxide nanoparticles for preconcentration of organic compounds // J. Anal. Chem. 2016. V. 71. № 4. P. 321.)
2. Safarik I., Horska K., Pospiskova K., Safarikova M. Magnetically responsive activated carbons for bio- and environmental applications // Int. Rev. Chem. Eng. 2012. V. 4. P. 346.
3. Zhu M., Diao G. Review on the progress in synthesis and application of magnetic carbon nanocomposites // Nanoscale. 2011. V. 3. P. 2748.
4. Постнов В.Н., Родинков О.В., Москвин Л.Н., Новиков А.Г., Бугайченко А.С., Крохина О.А. От углеродных наноструктур к высокоэффективным сорбентам для хроматографического разделения и концентрирования // Успехи химии. 2016. Т. 85. № 2. С. 115. (Postnov V. N., Rodinkov O.V., Moskvina L.N., Novikov A.G., Bugaichenko A.S., Krokhina O.A. From carbon nanostructures to high-performance sorbents for chromatographic separation and preconcentration // Russ. Chem. Rev. 2016. V. 85. № 2. P. 115.)
5. Luo M, Liu D., Zhao L., Han J., Liang Y., Wang P., Zhou Z. A novel magnetic ionic liquid modified carbon nanotube for the simultaneous determination of aryloxyphenoxy-propionate herbicides and their metabolites in water // Anal. Chim. Acta. 2014. V. 852. P. 88.
6. Luo Y.B., Yu Q.W., Yuan B.F., Feng Y.Q. Fast microextraction of phthalate acid esters from beverage, environmental water and perfume samples by magnetic multi-walled carbon nanotubes // Talanta. 2012. V. 90. P. 123.
7. Chen C., Hu J., Shao D., Li J. Wang X. Adsorption behavior of multiwall carbon nanotube/iron oxide magnetic composites for Ni(II) and Sr(II) // J. Hazard. Mater. 2009. V. 164. P. 923.
8. Pistone A., Iannazzo D., Fazio M., Celegato F., Barrera G., Tiberto P., Giordano A., Azzerboni B., Galvagno S. Synthesis and magnetic properties of multiwalled carbon nanotubes decorated with magnetite nanoparticles // Physica B. 2014. V. 435. P. 88.
9. Редькин А.Н., Кипин В.А., Малияревич Л.В. Синтез углеродных волокнистых наноматериалов из паров этанола на никелевом катализаторе // Неорг. материалы. 2006. Т. 42. № 3. С. 284. (Red'kin A.N., Kipin V.A., Malyarevich L.V. Synthesis of fibrous carbon nanomaterials from ethanol vapor on a nickel catalyst // Inorg. Mater. 2006. V. 42. № 3. P. 242.)
10. Гражулене С.С., Редькин А.Н., Телегин Г.Ф. Исследование корреляций между физико-химическими свойствами углеродных нанотрубок и типом катализатора для их синтеза // Журн. аналит. химии. 2012. Т. 67. № 5. С. 479. (Grazhulene S.S., Redkin A.N., Telegin G.F. Study of correlations between the physico-chemical properties of carbon nanotubes and the type of catalyst used for their synthesis // J. Anal. Chem. 2012. V. 67. № 5. P. 423.)
11. Гражулене С.С., Редькин А.Н., Телегин Г.Ф., Баженов А.В., Фурсова Т.Н. Сорбционные свойства углеродных нанотрубок в зависимости от температуры их синтеза и последующей обработки // Журн. аналит. химии. 2010. Т. 65. № 7. С. 699. (Grazhulene S.S., Redkin A.N., Telegin G.F., Bazhenov A.V., Fursova T.N. Adsorption properties of carbon nanotubes depending on the temperature of their synthesis and subsequent treatment // J. Anal. Chem. 2010. V. 65. № 7. P. 682.)
12. Гражулене С.С., Редькин А.Н. Сорбенты на основе углеродных нанотрубок / Нанообъекты и нанотехнологии в химическом анализе / Под ред. Штыкова С.Н. М.: Наука, 2015. С. 375. (Grazhulene S., Red'kin A. Sorbents based on carbon nanotubes. In: Nanoanalytics: Nanoobjects and Nanotechnologies in Analytical Chemistry / Ed. Shtykov. S. De Gruyter, 2018. P. 343.)

13. *Гражулене С.С., Золотарева Н.И., Редькин А.Н., Шилкина Н.Н., Митина А.А., Колесникова А.М.* Магнитный сорбент на основе магнетита и модифицированных углеродных нанотрубок для извлечения некоторых токсичных элементов // Журн. прикл. химии. 2018. Т. 91. № 11. С. 1642. (*Grazhulene S.S., Zolotareva N.I., Redkin A.N., Shilkina N.N., Mitina A.A., Kolesnikova A.M.* Magnetic sorbent based on magnetite and modified carbon nanotubes for extraction of some toxic elements // J. Appl. Chem. 2018. V. 91. № 11. P. 1847.)
14. *Гражулене С.С., Золотарева Н.И., Редькин А.Н., Шилкина Н.Н., Митина А.А., Колесникова А.М., Ходос И.И.* Сорбционные свойства магнитного композита на основе модифицированных углеродных нанотрубок в зависимости от условий синтеза // Журн. прикл. химии. 2020. Т. 93. № 1. С. 66. (*Grazhulene S.S., Zolotareva N.I., Redkin A.N., Shilkina N.N., Mitina A.A., Kolesnikova A.M., Khodos I. I.* Sorption properties of a magnetic composite based on modified carbon nanotubes: influence of the synthesis conditions // J. Appl. Chem. 2020. V. 93. № 1. P. 57.)
15. *Экспериандова Л.П., Беликов К.Н., Химченко С.В., Бланк Т.А.* Еще раз о пределах обнаружения и определения // Журн. аналит. химии. 2010. Т. 65. № 3. С. 229. (*Eksperiandova L.P., Belikov K.N., Khimchenko S.V., Blank T.A.* Once again about determination and detection limits // J. Anal. Chem. 2010. V. 65. № 3. P. 223.)

УДК 543.05:546.137

МИКРОЭКСТРАКЦИОННОЕ КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ ХЛОРУКСУСНЫХ КИСЛОТ С ФЛОТАЦИОННЫМ ВЫДЕЛЕНИЕМ ЭКСТРАКТА

© 2022 г. В. А. Крылов^а, *, П. В. Мосягин^а, Р. Г. Сироткин^а

^аНациональный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского (ННГУ), химический факультет
просп. Гагарина, 23, Нижний Новгород, ГСП-20, 603950 Россия

*e-mail: k658995@mail.ru

Поступила в редакцию 22.06.2021 г.

После доработки 24.09.2021 г.

Принята к публикации 24.09.2021 г.

Разработана методика жидкостно-жидкостного микроэкстракционного концентрирования моно-, ди- и трихлоруксусной кислот (ХУК) с флотационным выделением экстракта. В качестве экстрагента использовали метил-трет-бутиловый эфир, который эмульгировали с помощью ультразвукового воздействия. Концентрирование осуществляли в ампуле объемом 27 мл, оснащенной капилляром для отбора микроколичеств экстракта. Ионхроматографическое определение ХУК проводили после замены органической матрицы экстракта на водную. Показаны преимущества флотационного способа деэмульсификации по сравнению с центрифужным: коэффициенты концентрирования хлоруксусных кислот в 2–2.2 раза больше, пределы обнаружения ХУК понижены до 5×10^{-4} – 4×10^{-3} мг/л, а время выделения экстракта уменьшено в 3.3 раза.

Ключевые слова: хлоруксусные кислоты, ионная хроматография, микроэкстракционное концентрирование, флотационная деэмульсификация.

DOI: 10.31857/S0044450222050073

Жидкостно-жидкостное микроэкстракционное концентрирование с диспергированием экстрагента широко применяется в аналитической практике [1–7]. Это важный этап предварительной подготовки образцов, повышающий эффективность определения примесей без использования больших количеств реагентов, зачастую весьма токсичных. При разработке способов микроэкстракционного концентрирования примесей часто стремятся к увеличению коэффициента концентрирования K . Это достигается уменьшением объема экстрагента или увеличением объема водной фазы (пробы), что следует из соотношения:

$$\frac{1}{K} = \frac{1}{D} + \frac{V_0}{V_B}$$

где D – коэффициент распределения примеси, V_0 и V_B – объемы экстрагента и водной фазы соответственно.

Следует отметить, что уменьшение объема экстрагента ведет к снижению степени извлечения примеси R и соответственно к уменьшению абсолютного количества аналита в экстракте:

$$R = \frac{m_{\text{пр, экс}}}{m_{\text{пр, исх}}} = \frac{1}{1 + \frac{V_B}{V_0 D}} = K \frac{V_0}{V_B}$$

где $m_{\text{пр, экс}}$ – масса примеси в экстракте, мг; $m_{\text{пр, исх}}$ – масса примеси в исходном образце, мг.

Зависимость коэффициента концентрирования K и степени извлечения R от соотношения объемов водной и органической фаз для различных коэффициентов распределения показана на рис. 1. Как видно, начиная с определенных значений отношения V_B/V_0 происходит небольшое увеличение K , а степень извлечения примеси заметно падает, что ведет к уменьшению абсолютного количества примесного вещества, вводимого в аналитический прибор, падению аналитического сигнала и возрастанию (ухудшению) предела обнаружения примеси. Любой аналитический прибор характеризуется определенным объемом дозатора. Введение объема пробы, меньшего, чем объем дозатора, приведет к ее разбавлению. Таким образом, желательно, чтобы объем концентрата приближался к объему дозатора; для лабораторных ионных хроматографов он составляет в среднем 50–100 мкл.

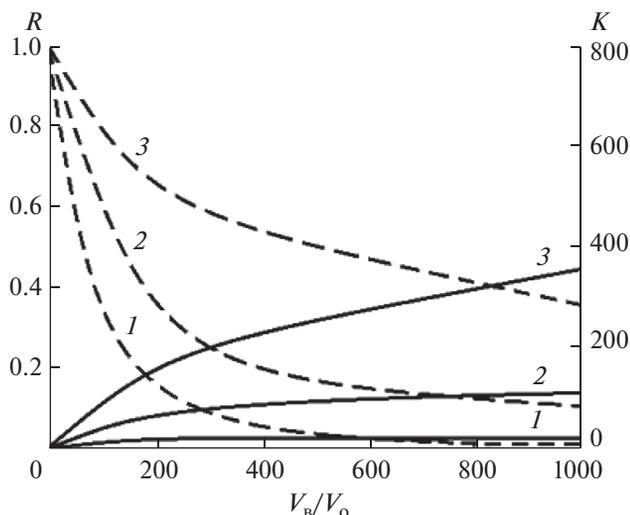


Рис. 1. Зависимость коэффициента концентрирования K и степени извлечения R от соотношения объемов водной и органической фаз $V_{\text{в}}/V_{\text{о}}$ при значениях коэффициента распределения D 20 (1), 100 (2), 500 (3).

Другой возможностью снижения предела обнаружения является увеличение объема исходной пробы. Обычно объем проб не превышает 5–10 мл, что определяется возможностями центрифужного извлечения экстракта. Другими проблемами метода центрифугирования являются трудность автоматизации методики концентрирования и риск разрушения стеклянных концентраторов при центрифугировании.

В последнее десятилетие за рубежом появились работы, посвященные флотационной деэмульсификации [8–14]. Объем пробы воды практически не лимитируется и в цитируемых работах достигает 35 мл. Это способствует снижению пределов обнаружения примесей. Принцип флотационной деэмульсификации заключается в пропускании пузырьков газа через эмульсию экстрагента в пробе и сорбции на поверхности пузырьков частиц эмульгированного экстрагента. Достигнув поверхности водной фазы, пузырьки газа схлопываются и легкие экстрагенты (с плотностью меньше, чем у воды) агрегируются в отдельный верхний слой, а тяжелые (с плотностью больше, чем у воды) оседают на дно концентратора. Газ подается в емкость насосом [8–10, 12–14] или может генерироваться непосредственно в пробе химическим путем, например, добавлением в подкисленную водную фазу раствора гидрокарбоната натрия [11]. Описание устройства с расположенным в донной части концентратора резиновым уплотнением (септой), через которое газ вводится с помощью металлической иглы [10]. Для флотационной деэмульсификации применя-

ют азот [8, 12], воздух [9, 10, 13, 14], углекислый газ [11].

Целью настоящей работы является разработка методики жидкофазного эмульсионного микроэкстракционного концентрирования ХУК с флотационным выделением экстракта для их последующего ионохроматографического определения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы. Рабочие растворы хлоруксусных кислот готовили из соответствующих реактивов и деионизованной воды (моноклоруксусная кислота (МХУК) ч. ТУ 6-09-13-674-78, дихлоруксусная кислота (ДХУК) ч. ТУ 6-09-11-1926-85, трихлоруксусная кислота (ТХУК) ч. ТУ 6-09-1926-77); для приготовления элюента использовали гидроксид калия х. ч. (ГОСТ 24363-80) и тирозин х. ч. (ТУ 6-09-5093-84); для микроэкстракционного концентрирования использовался метил-*трет*-бутиловый эфир (МТБЭ) х. ч. (ТУ 2632-118-44493179-08).

Оборудование. Жидкостный ионный хроматограф LC-20ADsp фирмы “Shimadzu” (Япония) с петлей-дозатором объемом 50 мкл, весы аналитические Shimadzu AUX320, насос ПУ-2Э, ультразвуковая ванна ПСБ-Галс 133505 с мощностью генератора ультразвука 50 Вт и рабочей частотой 35 кГц, стеклянный концентратор для флотационной деэмульсификации емк. 27 мл, микродозаторы НТЛ 20–200 мкл и DragonLAB TopPette Pipettor 2-20.

Устройство для флотационной деэмульсификации. На рис. 2 дана схема разработанного концентратора с флотационным выделением экстракта. Устройство применяли для микроэкстракции примесей легким экстрагентом. В верхней части концентратора находится капилляр 1 диаметром 2.50 ± 0.05 мм для отбора микроэкстракта. Отвод 2 служит для добавления воды и транспортировки поверхностного слоя экстракта в капилляр 1. К донной части концентратора припаян моллированный ввод 3 внутренним диаметром 8.15 ± 0.05 мм, в котором находится фторопластовый шток 4. Отвод 5 предназначен для подсоединения насоса и подачи воздуха. Барботирование воздуха через эмульсию экстрагента осуществляется через восемь кварцевых капилляров 6 длиной 10 мм и внутренним диаметром 0.2 мм, находящихся в верхней части штока 4.

Методика микроэкстракционного концентрирования. Анализируемый образец воды объемом 23 мл помещали в концентратор. Для перевода ХУК в молекулярную форму добавляли 1.25 мл конц. H_2SO_4 [15, 16]. Объем свободного пространства над пробой не превышал 0.5 мл. Для повышения эффективности концентрирования в пробу добавляли высаливатель — сульфат натрия [15, 16]. Затем в концентратор шприцем вводили 1 мл

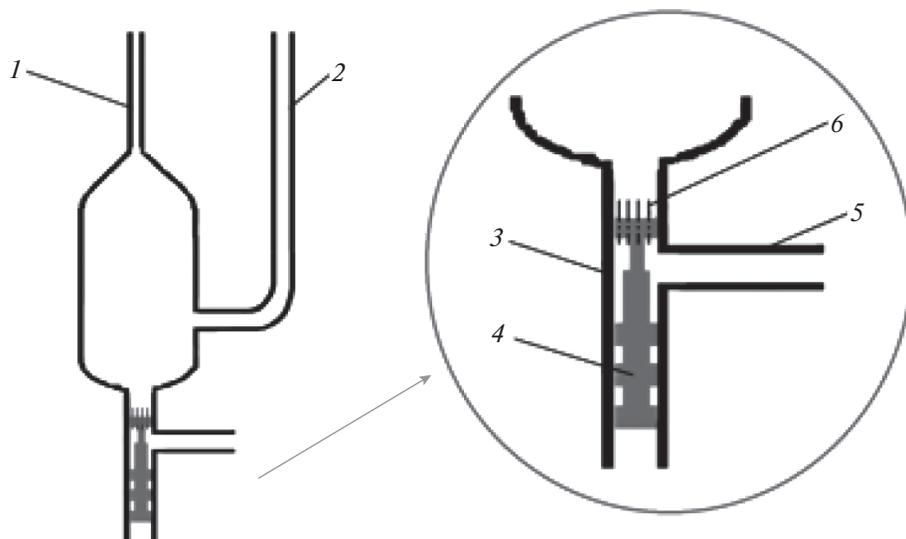


Рис. 2. Схема устройства для флотационной деэмульсификации (пояснения см. в тексте).

МТБЭ с одновременным воздействием ультразвуком. Барботирование воздуха через образовавшуюся эмульсию осуществляли с помощью насоса ПУ-2Э. Температура концентрирования составляла $(23 \pm 0.5)^\circ\text{C}$. Для замены органической матрицы экстракта (МТБЭ) на водную фазу проводили испарение эфира в чашке Петри со скоростью 4×10^{-4} мл/(см² с). Площадь зеркала испарения составляла 2.5 см². Конечную массу концентрата уменьшали до уровня 1–2 мг. К остатку добавляли 50 мкл элюента и перемешивали стеклянной палочкой, после чего отбирали микрошприцем и вводили в хроматограф [16].

Ионохроматографическое определение хлоруксусных кислот. Использовали аминокислотный элюент на основе тирозина (1 мМ тирозина/1 мМ КОН, скорость потока 2 мл/мин) и кондуктометрическое детектирование. Аналитическая колонка 4×150 мм содержала центрально-привитой анионит “Канк-Аст” в ОН⁻-форме, подавительная колонка 4×150 мм была заполнена катионитом КУ-2 \times 8 в Н⁺-форме. Температура термоста-та колонок составляла 32^oС.

Чистота использованной воды. Для приготовления рабочих растворов ХУК и элюента использовали деионизованную воду, которую получали очисткой бидистиллированной воды на анионите АРА-8п в ОН⁻-форме и катионите КРС-2п в Н⁺-форме [17]. Чистоту полученной воды контролировали по удельной электропроводности, которая не превышала 2 мкСм/см. Ионохроматографический анализ деионизованной воды показал, что концентрация в ней исследуемых примесей ниже пределов прямого обнаружения (0.05–0.25 мг/л). Очищенную воду хранили в емкостях из полиэтилена не более недели.

Чистота экстрагента и вспомогательных реактивов. Чистоту использованных реактивов и экстрагента, а также воздуха лаборатории на присутствие ХУК подтверждали результатами холостого опыта. Пробу заменяли соответствующим объемом деионизованной воды, в которую добавляли используемые реактивы и экстрагент. Концентрирование возможных загрязнений проводили по описанной выше методике. Содержание ХУК в полученных экстрактах оказалось ниже достигнутых пределов обнаружения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние времени барботирования на эффективность деэмульсификации. На рис. 3 показана зависимость объема отделяемого экстракта от времени барботирования. Расход барботируемого воздуха составлял 25 мл/мин. После 3 мин барботирования выделяется 300 мкл экстракта. Потери МТБЭ обусловлены его растворимостью в воде – в присутствии высаливателя она составляет 2% (соответствует 460 мкл МТБЭ). 240 мкл экстрагента уносилось потоком барботируемого воздуха. Таким образом, потери растворителя при флотационной микроэкстракции (ФМЭ) составляют 0.7 мл или 70%. Это меньше, чем приводится в литературе (свыше 90%) [8, 10].

Зависимость массы исследованных примесей в экстракте от времени барботирования показана на рис. 4. После выделения максимального объема экстракта масса ХУК в экстракте в интервале времени от 3 до 5 мин практически не менялась. Последующее снижение массы примесей в экстракте объясняется превышением концентрации примесей над равновесной из-за испарения МТБЭ

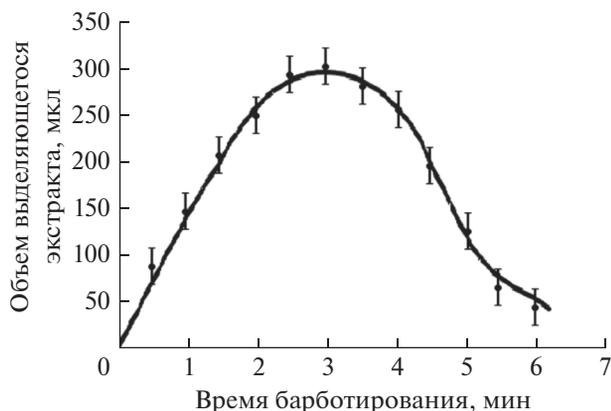


Рис. 3. Зависимость объема выделившегося экстракта от времени барботирования.

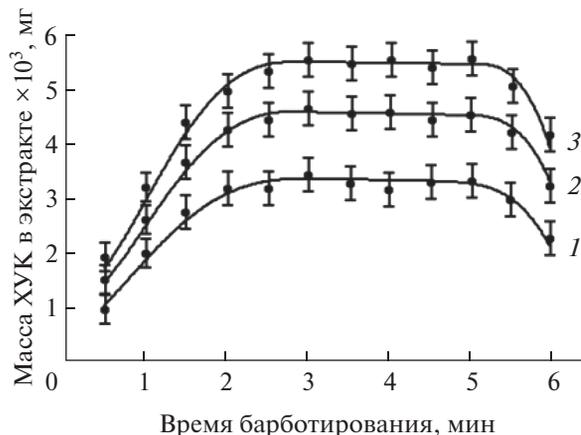


Рис. 4. Зависимость массы хлоруксусных кислот в экстракте от времени барботирования. 1 – три-, 2 – моно-, 3 – дихлоруксусная кислота.

и их переходом в водную фазу. Время барботирования 3 мин выбрано в качестве оптимального.

Эффективность микроэкстракционного концентрирования и извлечения аналитов. Для оценки эффективности разработанной методики рассчитали коэффициенты концентрирования K исследуемых компонентов:

$$K = c_{\text{эксп}} / c_{\text{в(исх)}}$$

где $c_{\text{эксп}}$ – концентрации аналита в экстракте после замены матрицы на водную объемом 50 мкл, $c_{\text{в(исх)}}$ – концентрация в исходном водном растворе.

В табл. 1 приведены значения коэффициентов концентрирования ХУК, достигнутые с применением разных способов извлечения экстракта. Из приведенных данных следует, что использование флотационной деэмульсификации позволило увеличить коэффициенты концентрирования ХУК в 2–2.2 раза. Важно отметить, что при использовании флотации для выделения экстракта необходимо 3 мин, а с применением центрифугирования – 10 мин [16].

Таблица 1. Коэффициенты концентрирования K , достигнутые при использовании флотационного и центрифужного способов выделения экстракта ($n = 3, P = 0.95$)

Аналит	Флотационное выделение $V_{\text{пробы}} = 23 \text{ мл}$	Центрифугирование $V_{\text{пробы}} = 4.1 \text{ мл}$
МХУК	89 ± 9	48 ± 5
ДХУК	75 ± 9	35 ± 3
ТХУК	65 ± 7	30 ± 3

Пределы обнаружения хлоруксусных кислот.

В табл. 2 приведены достигнутые пределы обнаружения ХУК. Пределы обнаружения ХУК с применением микроэкстракции $c_{\text{мин}}^{\text{ФМЭ}}$ и $c_{\text{мин}}^{\text{ЦМЭ}}$ рассчитывали делением предела прямого обнаружения $c_{\text{мин}}^{\text{ПРЯМ}}$, найденного по 3s-критерию, на соответствующий коэффициент концентрирования K . В табл. 2 представлены также значения нижней границы определяемых содержаний ХУК. Диапазон определяемых содержаний ХУК составил: для монохлоруксусной кислоты 20–0.002, для дихлоруксусной кислоты – 20–0.003, для трихлоруксусной кислоты 100–0.01 мг/л.

Как видно из табл. 2, применение флотационного выделения экстракта позволило снизить пределы обнаружения исследованных аналитов в два раза по сравнению с центрифужным выделением экстракта. Разработанная методика позволяет определять в 10–500 раз меньшие концентрации аналитов, чем нормированные СанПиН и ВОЗ [18, 19]. Это дает возможность проводить высокочувствительное определение ХУК в воде задолго до наступления критической экологической ситуации.

Анализ реальных образцов воды. Проанализировали реальные образцы воды различного происхождения. Концентрацию $c_{\text{в}}$ рассчитывали по формуле:

$$c_{\text{в}} = c_{\text{эксп}} / K.$$

Проанализировано четыре образца водопроводной воды централизованной системы питьевого водоснабжения Нижнего Новгорода (табл. 3). Концентрация монохлоруксусной и дихлоруксусной кислот составила $(1.0\text{--}2.0) \times 10^{-2}$ мг/л. В родниковой и скваженной воде хлоруксусные кислоты не обнаружены. Полученные данные подтвер-

Таблица 2. Пределы обнаружения хлоруксусных кислот

Аналит	$c_{\text{мин}}^{\text{ПРЯМ}} \times 10^2$, мг/л	$c_{\text{мин}}^{\text{ЦМЭ}} \times 10^2$, мг/л	$c_{\text{мин}}^{\text{ФМЭ}} \times 10^2$, мг/л	$c_{\text{н}}^{\text{ФМЭ}} \times 10^2$, мг/л	ПДК	
					СанПиН, $c \times 10^2$, мг/л	ВОЗ, $c \times 10^2$, мг/л
МХУК	5	0.1	0.05	0.2	5	2
ДХУК	7	0.2	0.09	0.3	—	5
ТХУК	25	0.8	0.40	1.0	500	20

Таблица 3. Результаты анализа воды ($n = 3$, $P = 0.95$)

Тип воды	№ образца	Содержание ХУК в образцах воды, $c \times 10^2$, мг/л		
		МХУК	ДХУК	ТХУК
Водопроводная	1	1.0 ± 0.2	1.3 ± 0.3	<0.4
	2	1.1 ± 0.2	1.4 ± 0.3	
	3	1.5 ± 0.3	2.0 ± 0.4	
	4	1.0 ± 0.2	1.4 ± 0.3	
Вода из подземной скважины	1	<0.05	<0.09	<0.4
	2	<0.05	<0.09	
Родниковая	1	<0.05	<0.09	<0.4
	2	<0.05	<0.09	

ждают возможность образования ХУК в водопроводной воде, обеззараженной хлорированием.

Подтверждение правильности определения примесей. Правильность анализа подтверждали методом добавок ХУК в реальную водопроводную воду. Из табл. 4 видно, что систематическая погрешность статистически незначима по сравнению со случайной.

Сравнение с результатами других работ. Пределы обнаружения ХУК по разработанной методике меньше, чем в работах [20, 21] с определением методом ионной хроматографии с кондуктометри-

ческим детектированием примесей (табл. 5). При определении моно- и дихлоруксусной кислот разработанная методика может конкурировать с двумерной ионной хроматографией с предварительным удалением мешающих компонентов из пробы [22, 23], с ионной хроматографией с масс-спектрометрическим детектированием [24, 25], а также с газовой хроматографией с масс-спектрометрическим детектированием, где использовалось микроэкстракционное концентрирование [26, 27]. Пределы обнаружения различаются не более чем в два раза.

Таблица 4. Результаты определения хлоруксусных кислот способом добавок ($n = 3$, $P = 0.95$)

Аналит	Найдено без добавки, $c_x \times 10^2$, мг/л	Введено, $c_{\text{доб}} \times 10^2$, мг/л	Найдено с добавкой, $c_{\text{сум}} \times 10^2$, мг/л
МХУК	1.0 ± 0.2	0.6	1.5 ± 0.3
		1.2	2.2 ± 0.4
ДХУК	1.3 ± 0.3	1.0	2.3 ± 0.4
		2.5	3.8 ± 0.5

Таблица 5. Сравнительная характеристика методов определения хлоркусусных кислот

Объем исходной пробы воды, мл	Метод пробоподготовки	Экстрагент, (объем, мкл)	Аналит	Метод детектирования* (вводимый объем, мкл)	$C_{\text{мин}} \times 10^3$, мг/л	Литература
0.1	–	–	МХУК	ИХ-КД (100)	8	[20]
			ДХУК		16	
			ТХУК		80	
10	Предварительное осаждение ионов Cl^- и SO_4^{2-} , ввод большого объема пробы	–	МХУК	ИХ-КД с градиентным элюированием (500)	3.7	[21]
			ДХУК		3.6	
			ТХУК		35.4	
500	Удаление карбонатов из проб	–	МХУК	Двумерная ИХ-КД (100 [14], 750 [15])	0.30, 1.7	[22, 23]
			ДХУК		0.34, 0.7	
			ТХУК		0.46, 0.7	
40	–	–	МХУК	ИХ-МС (100)	1	[24]
			ДХУК			
			ТХУК			
100	Твердофазное микроэкстракционное концентрирование	Десорбция аналитов сверхчистой водой (1000)	МХУК	ИХ-МС (50)	0.30	[25]
			ДХУК		0.24	
			ТХУК		0.09	
7	Дериватизация ХУК с твердофазной микроэкстракцией сорбентом C_{18}	Десорбция аналитов МТБЭ (20)	МХУК	ГХ-МС (20)	0.69	[26]
3	Микроэкстракция <i>n</i> -октанолом с дериватизацией	<i>n</i> -Октанол (2)	МХУК	ГХ-МС (2)	1.2	[27]
			ДХУК		0.19	
			ТХУК		0.25	
23	Микроэкстракционное концентрирование с флотационным выделением экстракта	МТБЭ (1000)	МХУК	ИХ-КД (50)	0.5	Данная работа
			ДХУК		0.9	
			ТХУК		4	

* ИХ-КД – ионная хроматография с кондуктометрическим детектированием, ИХ-МС – ионная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием, ГХ-МС – газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием.

* * *

Разработанная методика отличается простотой исполнения: отсутствуют некоторые стадии удаления мешающих компонентов и дериватизации ХУК. Методика апробирована при анализе водопроводной воды централизованной системы питьевого водоснабжения (Нижний Новгород), а также воды подземных источников. Случайная погрешность определения не превышает 25%. Статистическая незначимость систематической погрешности подтверждена методом добавок.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Rezaee M., Assadi Y., Milani Hosseini M.-R., Aghaee E., Ahmadi F., Berijani S.* Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction // *J. Chromatogr. A.* 2006. V. 1116. P. 1.
2. *Ozcan S., Tor A., Aydin M.E.* Determination of selected polychlorinated biphenyls in water samples by ultrasound-assisted emulsification-microextraction and gas chromatography-mass-selective detection // *Anal. Chim. Acta.* 2009. V. 647. P. 182.
3. *Fontana A.R., Wuilloud R.G., Martinez L.D., Altamirano J.C.* Simple approach based on ultrasound-assisted emulsification-microextraction for determination of polibrominated flame retardants in water samples by gas chromatography-mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* 2009. V. 1216. P. 147.
4. *Saleh A., Yamini Y., Faraji M., Rezaee M., Ghambarian M.* Ultrasound-assisted emulsification microextraction method based on applying low density organic solvents followed by gas chromatography analysis for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples // *J. Chromatogr. A.* 2009. V. 1216. P. 6673.
5. *Ma J.J., Du X., Zhang J.W., Li J.C., Wang L.Z.* Ultrasound-assisted emulsification-microextraction combined with flame atomic absorption spectrometry for determination of trace cadmium in water samples // *Talanta.* 2009. V. 80. P. 980.
6. *Крылов В.А., Крылов А.В., Мосягин П.В., Маткивская Ю.О.* Жидкофазное микроэкстракционное концентрирование примесей // *Журн. аналит. химии.* 2011. Т. 66. С. 341. (*Krylov V.A., Krylov A.V., Mosyagin P.V., Matkivskaya Yu.O.* Liquid-phase microextraction preconcentration of impurities // *J. Anal. Chem.* 2011. V. 66. P. 331.)
7. *Дмитриенко С.Г., Апяри В.В., Толмачева В.В., Горбунова М.В.* Дисперсионная жидкостно-жидкостная микроэкстракция органических соединений. Обзор обзоров // *Журн. аналит. химии.* 2020. Т. 75. № 10. С. 867. (*Dmitrienko S.G., Apjari V.V., Tolmacheva V.V., Gorbunova M.V.* Dispersive liquid-liquid microextraction of organic compounds: An Overview of Reviews // *J. Anal. Chem.* 2020. V. 75. № 10. P. 1237.)
8. *Hosseini M.H., Rezaee M., Mashayekhi H.A., Akbarian S., Mizani F., Pourjavid M.R.* Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil samples using flotation-assisted homogeneous liquid-liquid microextraction // *J. Chromatogr. A.* 2012. V. 1265. P. 52.
9. *Hosseini M.H., Rezaee M., Akbarian S., Mizani F., Pourjavid M.R., Arabieh M.* Homogeneous liquid-liquid microextraction via flotation assistance for rapid and efficient determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples // *Anal. Chim. Acta.* 2013. V. 762. P. 54.
10. *Hosseini M.H., Heydari R., Alimoradi M.* Vortex and air assisted liquid-liquid microextraction as a sample preparation method for high-performed liquid chromatography determinations // *Talanta.* 2014. V. 130. P. 171.
11. *Molaei S., Saleh A., Ghoulipour V., Seidi S.* Dissolved carbon dioxide flotation: an effective way for phase separation in emulsification microextraction method // *J. Chromatogr. A.* 2015. V. 1388. P. 280.
12. *Zhang L., Wang C., Li Z., Zhao C., Zhang H., Zhang D.* Extraction of acetanilides in rice using ionic liquid-based matrix solid phase dispersion-solvent flotation // *Food Chem.* 2018. V. 245. P. 1190.
13. *Moavenian B., Hosseini M.H., Arabieh M., Pourjavid M.R., Sohrabi M.R.* Extraction of lead from water using homogeneous liquid-liquid microextraction via flotation assistance method and UV-Vis spectrophotometric determination // *J. Water Chem. Technol.* 2018. V. 40. № 5. P. 291.
14. *Rezaee M., Saberyan K., Tajer-Mohammad-Ghazvini P.* Determination of malathion by homogeneous liquid-liquid micro extraction via flotation assistance combined with gas chromatography in water samples // *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* 2019. V. 33. № 1. P. 1.
15. *Pawlecki-Vonderheide A.M., Munch D.J., Munch J.W.* Research associated with the development of EPA method 552.2 // *J. Chromatogr. Sci.* 1997. V. 35. № 7. P. 293.
16. *Сироткин П.Г., Крылов В.А., Елипашева Е.В., Грубов П.Е., Лутюшкина К.А.* Ионохроматографическое определение хлоруксусных кислот с предварительным микроэкстракционным концентрированием // *Аналитика и контроль.* 2020. Т. 24. № 1. С. 31.
17. *Гребенюк В.Д., Мазо А.А.* Обессоливание воды ионитами. М.: Химия, 1980. 254 с.
18. СанПиН 2.1.4.1074-01. Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества. М.: Минздрав России, 2002. 103 с.
19. Guidelines for Drinking-water Quality. 4th Ed. World Health Organization. http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/dwq-guidelines-4/en/ (10.06.2020).
20. *Nair L.M., Saari-Nordhaus R., Anderson J.M.* Determination of haloacetic acids by ion chromatography // *J. Chromatogr. A.* 1994. V. 671. P. 309.
21. *Fu H.-T., Zhao L.-M., Luo M., Zhang H.-Y., Zhang J.* Determination of chloroacetic acids in drinking water by ion chromatography using silver oxide as precipitant eliminating interference of chlorate in matrix // *Chinese J. Anal. Chem.* 2008. V. 36. № 10. P. 1407.
22. *Teh H.B., Li S.F.Y.* Simultaneous determination of bromate, chlorite and haloacetic acids by two-dimensional matrix elimination ion chromatography with coupled conventional and capillary columns // *J. Chromatogr. A.* 2015. V. 1383. P. 112.
23. *Verrey D., Louyer M.-V., Thomas O., Baures E.* Direct determination of trace-level haloacetic acids in drinking water by two-dimensional ion chromatography with suppressed conductivity // *Microchem. J.* 2013. V. 110. P. 608.

24. *Righi E., Fantuzzi G., Predieri G., Aggazzotti G.* Bromate, chlorite, chlorate, haloacetic acids, and trihalomethanes occurrence in indoor swimming pool waters in Italy // *Microchem. J.* 2014. V. 113. P. 23.
25. *Prieto-Blanco M.C., Alpendurada M.F., Lopez-Mahia P., Muniategui-Lorenzo S., Prada-Rodriguez D., Machado S., Goncalves C.* Improving methodological aspects of the analysis of five regulated haloacetic acids in water samples by solid-phase extraction, ion-pair liquid chromatography and electrospray tandem mass spectrometry // *Talanta.* 2012. V. 94. P. 90.
26. *Ferreira A.M.C., Laespada M.E.F., Pavon J.L.P., Cordero B.M.* In situ derivatization coupled to microextraction by packed sorbent and gas chromatography for the automated determination of haloacetic acids in chlorinated water // *J. Chromatogr. A.* 2013. V. 1318. P. 35.
27. *Saraji M., Bidgoli A.A.H.* Single-drop microextraction with in-microvialderivatization for the determination of haloacetic acids in water sample by gas chromatography–mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* 2009. V. 1216. P. 1059.

УДК 543.054

ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИХ АРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ В ПОЧВАХ И ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЯХ С ПРОБОПОДГОТОВКОЙ ПО ТЕХНИКЕ QuEChERS

© 2022 г. З. А. Темердашев^а, *, Т. Н. Мусорина^а, С. К. Овсепян^а, И. Г. Корпакова^аКубанский государственный университет
ул. Ставропольская, 149, Краснодар, 350040 Россия

*e-mail: temza@kubsu.ru

Поступила в редакцию 26.07.2021 г.

После доработки 17.08.2021 г.

Принята к публикации 22.09.2021 г.

Работа посвящена хромато-масс-спектрометрическому определению полиароматических углеводородов (ПАУ) в почвах и донных отложениях с применением пробоподготовки с извлечением аналитов в растворитель и одновременной очисткой экстрактов посредством дисперсионной твердофазной экстракции (QuEChERS). Объектами исследования служили образцы песка, суглинистых почв и илистых донных отложений, а аналитами – 20 ПАУ. Для минимизации влияния матричных эффектов оптимизированы условия пробоподготовки, изучено ультразвуковое воздействие на извлечение аналитов. Степень извлечения ПАУ из песка и илистых донных отложений варьировала в пределах 80–105%, суглинистых почв – 60–99%. Идентификацию и определение ПАУ проводили методом газовой хромато-масс-спектрометрии с детектированием аналитов в режиме заданных ионов. Показано, что пробоподготовка по технике QuEChERS способствует более длительной эксплуатации оборудования с сохранением чувствительности детектирования аналитов. Методика апробирована на образце почвы, отобранной на территории Таманского терминала навалочных грузов.

Ключевые слова: полиароматические углеводороды, твердофазная экстракция, QuEChERS, пробоподготовка.

DOI: 10.31857/S0044450222050164

Определение полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) относится к числу приоритетных задач экологического мониторинга, поскольку эти токсиканты обладают канцерогенной, мутагенной и тератогенной активностью [1]. К природным источникам поступления ПАУ в окружающую среду относятся извержения вулканов, лесные пожары, горючие ископаемые, они образуются при протекании биогенных процессов, при низкотемпературном изменении органических молекул [2]. Антропогенные источники ПАУ – сжигание полимерных материалов, их термическая деградация, деятельность перерабатывающих предприятий, выбросы авто- и авиатранспорта [3].

Наиболее наглядный показатель загрязненности окружающей среды – концентрация ПАУ в почвах и донных отложениях, обладающих высокой аккумулярующей способностью. Обычно на содержание ПАУ анализируют поверхностные слои почв, с увеличением глубины почвенного

профиля их концентрация заметно снижается. Имобилизация ПАУ почвами обусловлена их органической частью, в том числе гуминовыми веществами, способными к связыванию гидрофобных соединений за счет π - π взаимодействий между имеющимися ароматическими фрагментами [4]. Контроль ПАУ в донных отложениях является неотъемлемой частью экологического мониторинга водных систем ввиду низкой растворимости данных соединений в воде. ПАУ практически консервируются в донных отложениях, так как они в основном находятся в агрегированном виде на поверхности различных взвешенных, со временем оседающих микрочастиц [5].

Для определения ПАУ в объектах окружающей среды применяют методы высокоэффективной жидкостной [6–8] и газовой [9, 10] хроматографии. Для достоверной идентификации и определения ПАУ в аналитической практике используют различные способы детектирования аналитов, одним из которых является газовая хромато-

масс-спектрометрия (ГХ-МС) [11]. Использование ГХ-МС в режиме заданных ионов (SIM) позволяет снизить влияние матрицы и повысить интенсивность сигнала, а применение капиллярных колонок способствует эффективному разделению близких по свойствам изомерных соединений.

Для извлечения ПАУ из почвенной матрицы традиционно используют аппарат Сокслета, однако данный способ экстракции весьма продолжителен, требует больших расходов растворителя [12]. Известны также альтернативные методы извлечения аналитов, более экспрессные и требующие меньшего расхода реагентов: ультразвуковая (УЗ) [13] и микроволновая экстракция [14], жидкостная экстракция под действием высокого давления [15], сверхкритическая флюидная экстракция [16], экстракция субкритической водой [17], дисперсионная жидкостно-жидкостная микроэкстракция [18].

Присутствие в матрицах почв и донных отложений широкого спектра органических веществ усложняет детектирование, поэтому, наряду с оптимизацией условий эффективного извлечения и концентрирования аналитов, особое внимание необходимо уделять очистке экстракта от компонентов матрицы, мешающих процедуре анализа. Твердофазная экстракция (ТФЭ) аналитов путем их распределения между подвижной и неподвижной фазами позволяет решать эту проблему [19]. Варьируя материал сорбента и систему растворителей при ТФЭ можно добиться высокой эффективности очистки экстракта и извлечения целевых компонентов. Для очистки почвенных экстрактов при определении ПАУ широко применяют силикагель [20] или его смеси с другими сорбентами, например оксидом алюминия [21]. Для этих же целей используют модифицированный октадецильными группами (C_{18}) силикагель, его обычно сочетают с первичным и вторичным амином (PSA) [22]. Указанные сорбенты также можно использовать самостоятельно [23], в некоторых случаях для этих целей применяют диатомовую землю, клиноптилолит и флорисил [24].

Перспективной техникой подготовки почв является метод QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe – быстро, просто, дешево, эффективно, надежно, безопасно) [25], предполагающий извлечение аналитов в растворитель в присутствии высаливателей и последующую очистку экстрактов посредством дисперсионной твердофазной экстракции [26]. Способ широко применяют при проведении экологического мониторинга, он обладает высокой производительностью, эффективностью и стабильностью. Метод QuEChERS позволяет извлекать аналиты из образцов со сложными матрицами за счет введения соответствующего сорбента либо смеси сор-

бентов в экстракт и распределения компонентов экстракта между двумя несмешивающимися фазами в образовавшейся дисперсной системе [27]. Диспергирование сорбента в матрицу образца посредством перемешивания, встряхивания, завихрения либо ультразвукового воздействия приводит к увеличению поверхности его контакта с сорбируемым веществом, что способствует повышению скорости массообменных процессов и быстрому установлению межфазного равновесия [28]. Использование дисперсионной ТФЭ в методе QuEChERS позволяет снизить объем используемых реагентов и сократить время анализа в сравнении с динамическим режимом сорбционной очистки экстрактов.

Цель данного исследования – хромато-масс-спектрометрическое определение ПАУ в почвах и донных отложениях различного типа с применением пробоподготовки по технике QuEChERS.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объекты исследований. Использовали реальные воздушно-сухие образцы песка (Темрюкский залив), суглинистых почв и илистых донных отложений (Куликово-Курчанская группа лиманов, Темрюкский район), отобранные при производственном экологическом контроле лицензионного участка ООО “НК “Приазовнефть”, а также образец почвы, отобранный на территории Таманского терминала навалочных грузов.

Материалы и реактивы. Использовали комплект индивидуальных стандартных образцов предприятия (СОП) состава растворов ПАУ в ацетонитриле, включающий нафталин (СОП 0109-03), 2-метилнафталин (СОП 0101-03), аценафтилен (СОП 0101-03), бифенил (СОП 0107-03), аценафтен (СОП 0103-03), флуорен (СОП 0113-03), фенантрен (СОП 0111-03), антрацен (СОП 0102-03), флуорантен (СОП 0112-03), пирен (СОП 0110-03), бенз[а]антрацен (СОП 0105-03), хризен (СОП 0114-03), бенз[б]флуорантен (СОП 0115-03), бенз[а]пирен (СОП 0106-03), бенз[к]флуорантен (СОП 0116-03), дибенз[а, h]антрацен (СОП 0108-03), бенз[g, h, i]перилен (СОП 0117-03) (НПО “Экрот”, Санкт-Петербург, Россия). Также использовали аналитические стандарты бенз[е]пирен (CAS 192-97-2) и индено[1,2,3-с, d]пирен (CAS 193-39-5) в циклогексане и трифенилен (CAS 217-59-4) (Sigma-Aldrich, США).

Для анализа исследуемых объектов использовали ацетонитрил 99.9% для ВЭЖХ (Sigma-Aldrich, США), силикагель “Sorbfil”, фракция 5–50 мкм (ООО “Имид”, Россия).

Пробоподготовка. Для установления оптимальных условий пробоподготовки по технике QuEChERS к навеске 0.5 г образца почвы (донных отложений) прибавляли 0.05–0.3 г силикаге-

ля и 1 мл ацетонитрила. Полученную смесь интенсивно встряхивали в течение 5 мин, после этого пробу подвергали УЗ-обработке генератором ультразвуковых колебаний (УЗ-ванна) с частотой излучения 35 кГц (Сапфир, Россия) в течение 5–30 мин для интенсификации извлечения ПАУ. Затем в течение 5 мин центрифугировали смесь на центрифуге Mini Spin plus (Eppendorf, Германия) при скорости вращения ротора 10000 об./мин, после чего переносили экстракт в виалу для хроматографирования.

Хромато-масс-спектрометрический анализ. Для хроматографических исследований использовали систему, состоящую из газового хроматографа GC-2010 Plus с кварцевой капиллярной колонкой Zebtron ZB-5MS (длина 60 м, внутренний диаметр 0.25 мм, толщина тонкого слоя 5% полисиларилена + 95% диметилполисилоксан 0.25 мкм) и моноквадрупольного масс-спектрометрического детектора GCMS-QP2020 (Shimadzu, Япония). Для идентификации компонентов применяли интегрированные библиотеки масс-спектров Wiley8 – Mass Spectral Library и NIST-17.1. Хроматографирование экстрактов осуществляли в оптимизированных для определения 20 ПАУ в почвах и донных отложениях условиях [18] (табл. 1). Хроматограмма смеси исследуемых ПАУ с концентрацией каждого из них 200 нг/мл, полученная в режиме заданных ионов, представлена на рис. 1.

Для определения ПАУ в анализируемых образцах строили градуировочные зависимости с использованием растворов ПАУ с концентрациями каждого 500, 250, 200, 150, 100, 50, 10, 5, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.5, 0.2, 0.1 нг/мл, приготовленных последовательным разбавлением смеси индивидуальных ПАУ. Рассчитанные коэффициенты аппроксимации для каждого аналита ($n = 5$, $P = 0.95$) составили не менее 0.99. Линейность отклика аналитического сигнала наблюдали для фенантрена, антрацена, флуорантена, пирена, бенз[а]антрацена, хризена, трифенилена, бенз[б]флуорантена, бенз[к]флуорантена, бенз[е]пирена, бенз[а]пирена, индено[1,2,3-с,д]пирена, дибенз[а, h]антрацена, бенз[g, h, i]перилена в диапазоне 1.0–500 нг/мл; для нафталина, 2-метилнафталина, аценафтилена, бифенила, аценафтена и флуорена он составил 2.0–500 нг/мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние матрицы образцов на ГХ-МС-определение ПАУ. ГХ-МС-определение ПАУ в почвах и донных отложениях осложнено присутствием в анализируемых многокомпонентных матрицах соэкстрагируемых веществ, снижающих эффективность хроматографической колонки и загрязняющих ионный источник, что приводит к резкому падению чувствительности определения аналитов от вкола к вколу. Необходимость введения

Таблица 1. Условия хроматографического определения ПАУ в ацетонитрильных экстрактах почв и донных отложений

Параметр	Значение
Объем вкола	2 мкл
Температура испарителя	280°C
Скорость потока	1.35 мл/мин
Режим ввода	Split
Коэффициент деления потока	1 : 5
Температурный режим	60°C/1 мин – нагрев 15°C/мин – до 170°C/3 мин – нагрев 10°C/мин – до 280°C/8 мин – нагрев 10°C/мин – до 290°C/25 мин
Задержка работы детектора	7 мин
Способ ионизации	Электронный удар, 70 эВ
Температура ионного источника	200°C
Температура интерфейса	280°C
Масс-анализатор	Моноквадруполь с предфильтром
Режим сканирования	SIM

стадии очистки экстрактов почв (донных отложений) подтверждают данные регистрации их матричных компонентов в режиме полного ионного тока (рис. 2, хроматограмма I). Для устранения влияния матричных компонентов изучили возможность включения стадии очистки по технике QuEChERS в пробоподготовку исследуемых образцов при последующем ГХ-МС-анализе. Применение силикагеля для очистки экстракта позволило значительно снизить матричную нагрузку на хроматографическую систему (рис. 2, хроматограмма II), но определение следовых содержаний ПАУ в экстракте при хроматографировании в режиме полного ионного тока оказалось практически невозможным.

Данную проблему можно решить путем применения режима сканирования заданных ионов, о чем свидетельствует хроматограмма очищенного силикагелем экстракта образца донных отложений (рис. 3). ГХ-МС-анализ в режиме SIM позволил получить достаточно высокое соотношение сигнал/шум и снизить влияние компонентов матрицы.

Оптимизация пробоподготовки испытуемых образцов по технике QuEChERS. Минимизацию потерь аналитов достигали извлечением и сорбции

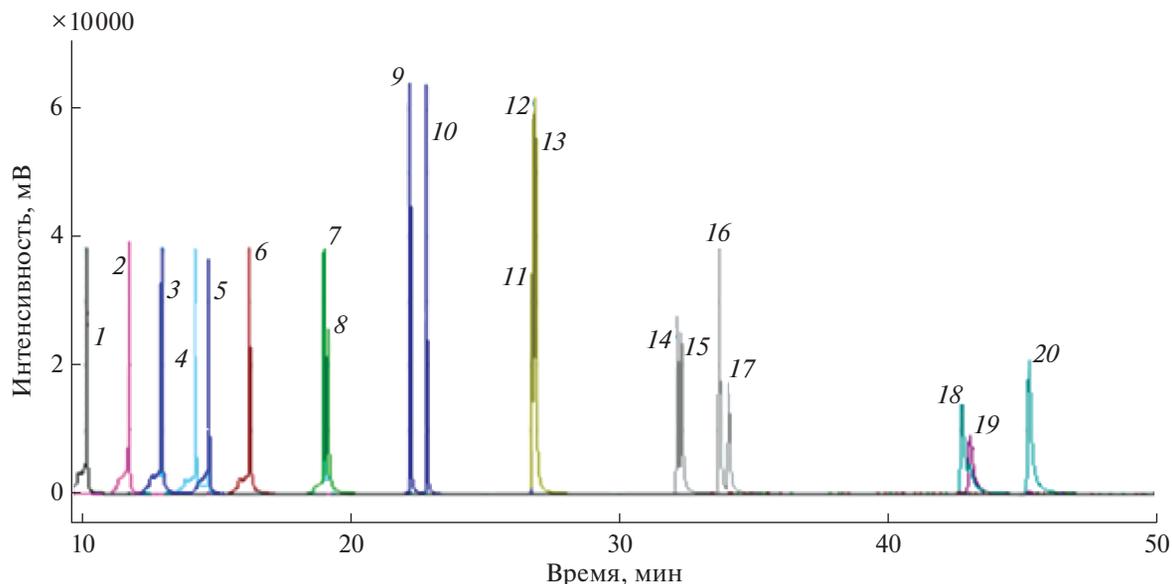


Рис. 1. Хроматограмма раствора смеси ПАУ с концентрацией каждого из 20 аналитов 200 нг/мл. 1 – нафталин, 2 – 2-метилнафталин, 3 – бифенил, 4 – аценафтилен, 5 – аценафтен, 6 – флуорен, 7 – фенантрен, 8 – антрацен, 9 – флуорантен, 10 – пирен, 11 – бенз[а]антрацен, 12 – хризен, 13 – трифенилен, 14 – бенз[б]флуорантен, 15 – бенз[к]флуорантен, 16 – бенз[е]пирен, 17 – бенз[а]пирен, 18 – индено[1,2,3-с,d]пирен, 19 – дибенз[а, h]антрацен, 20 – бенз[g,h,i]перилен.

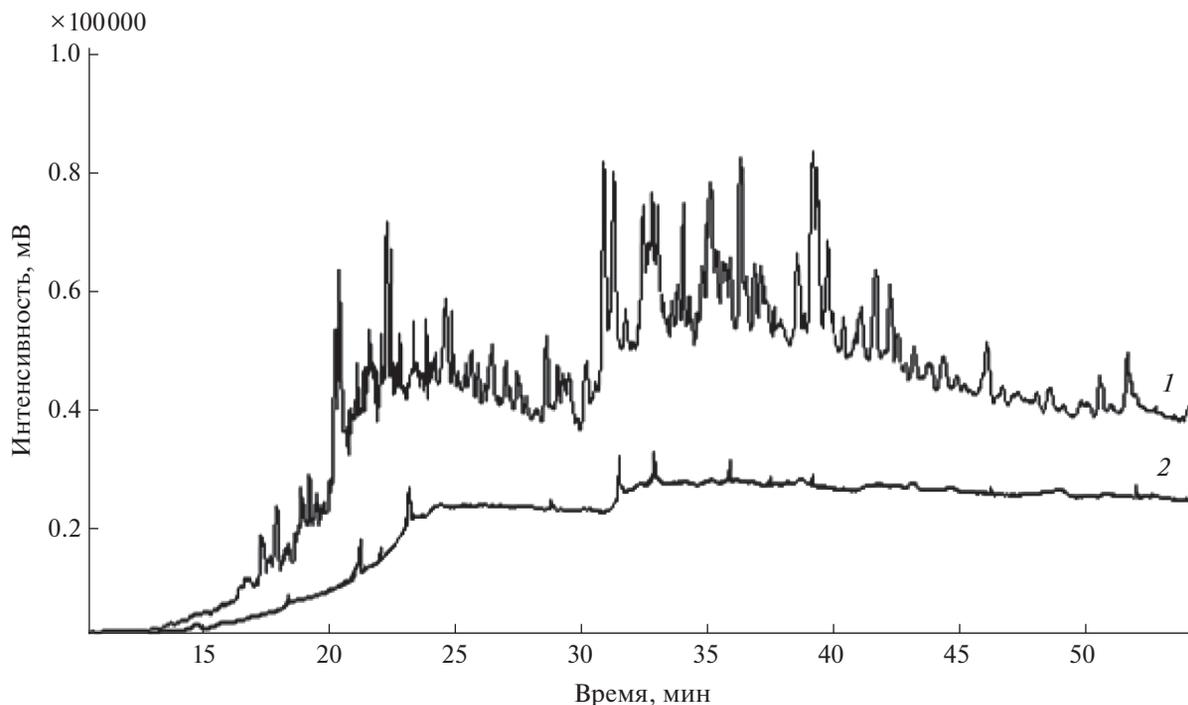


Рис. 2. Хроматограмма экстракта илистых донных отложений Куликово-Курчанской группы лиманов в режиме полного ионного тока до (1) и после (2) очистки экстракта силикагелем.

онной очисткой экстракта в одной пробирке. Эффективность данного процесса оценивали методом введено–найдено добавлением в испытуемый образец (0.5 г) по 50 нг каждого из 20 индивидуальных

ПАУ. Затем после выдерживания образцов в течение 2 ч ПАУ извлекали 1 мл ацетонитрила. Методику пробоподготовки обрабатывали на образцах илистых донных отложений, характеризующихся наи-

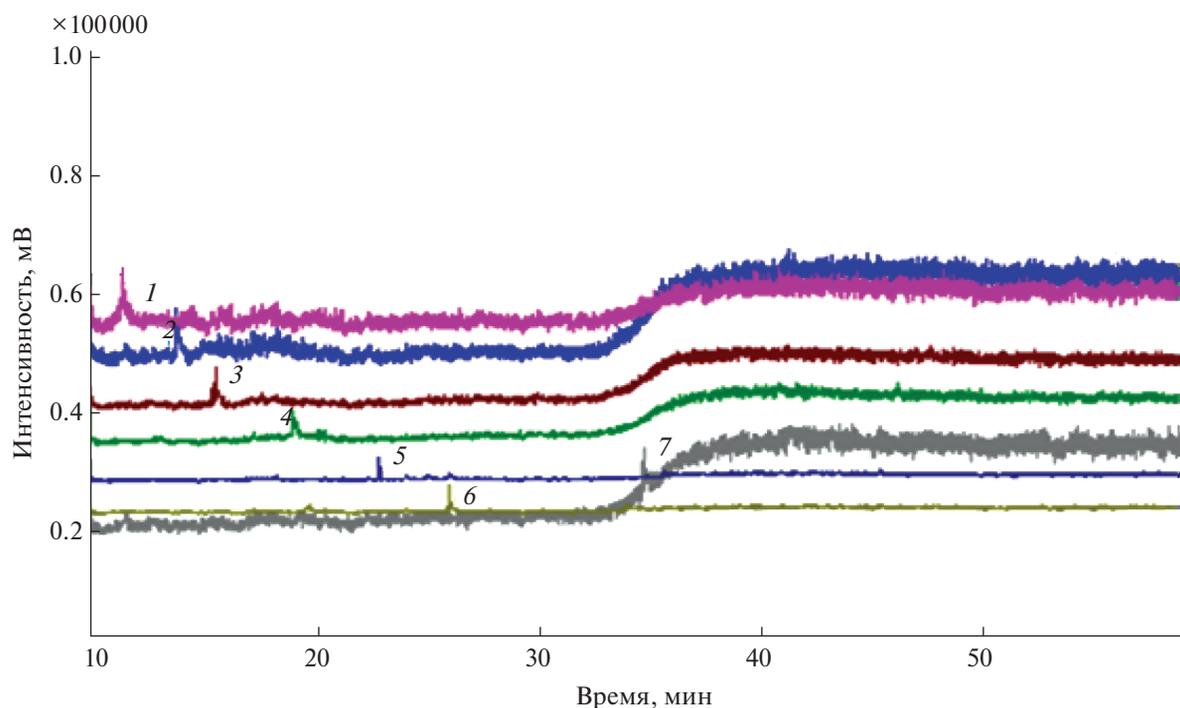


Рис. 3. Хроматограмма очищенного силикагелем экстракта образца илистых донных отложений Куликово-Курчанской группы лиманов, снятая в режиме сканирования заданных ионов. 1 – 2-метилнафталин, 2 – бифенил, 3 – флуорен, 4 – фенантрен, 5 – пирен, 6 – бенз[а]антрацен, 7 – бенз[а]пирен.

более сложным компонентным составом матрицы с исходным содержанием ПАУ, не превышающим минимально определяемые по методике [18] концентрации аналитов. Наименьшие потери “легких” ПАУ (нафталина, 2-метилнафталина, аценафтилена, бифенила, аценафтена, флуорена и фенантрена) наблюдали при использовании 300 мг силикагеля, в случае ПАУ с 4–6 бензольными кольцами – 200 мг сорбента (табл. 2). Увеличение площади поверхности контакта исследуемого образца с сорбентом за счет изменения навески силикагеля с 50 до 300 мг/0.5 г илистых донных отложений позволило снизить мешающее влияние матричных компонентов, препятствующих свободному переходу аналитов в экстрагент, и повысило степени извлечения ПАУ в 1.5 раза. Степени извлечения аналитов при использовании навесок силикагеля массой 200 и 300 мг/0.5 г илистых донных отложений менялись разнонаправленно по отношению к индивидуальным ПАУ и различались не более чем на 8%. Для дальнейших исследований в качестве оптимальной использовали навеску 200 мг силикагеля.

Ультразвуковое воздействие на извлечение ПАУ с использованием техники QuEChERS. О влиянии времени УЗ-обработки судили по значению степени извлечения ПАУ из образцов суглинистой почвы и илистых донных отложений Куликово-Курчанской группы лиманов, а также песка Темрюкского залива (рис. 4). Все 20 ПАУ из песка

эффективно извлекались в течение 10 мин УЗ-обработки. Степени извлечения аналитов из образцов почв сопоставимы в интервале от 10 до 30 мин. Из илистых донных отложений наиболее эффективно ПАУ экстрагируются при УЗ-обработке в течение 20 мин, при меньшем времени обработки полнота извлечения аналитов не достигается. Большая продолжительность УЗ-обработки образцов для извлечения ПАУ из суглинистой почвы и илистых донных отложений объясняется малой степенью накопления аналитов в песках ввиду обедненности их органического слоя. С учетом полученных результатов в качестве оптимальной выбрали продолжительность УЗ-воздействия 20 мин для всех типов исследуемых образцов.

Оптимизированная подготовка образцов песка, суглинистых почв и илистых донных отложений к ГХ-МС-анализу, основанная на ультразвуковой экстракции с одновременной очисткой экстракта методом дисперсионной ТФЭ по технике QuEChERS, схематично представлена на рис. 5.

Практическая значимость разработанной схемы заключается в минимизации влияния сложных для анализа матриц реальных образцов на разрешающую способность и чувствительность хромато-масс-спектрометрического определения ПАУ в почвах (донных отложениях). Необходи-

Таблица 2. Степень извлечения (%) ПАУ из образца илстых донных отложений при различных навесках силикагеля ($n = 5$, $P = 0.95$)

ПАУ	Навеска силикагеля, мг			
	50	100	200	300
Нафталин	50 ± 15	57 ± 14	67 ± 15	72 ± 18
2-Метилнафталин	52 ± 13	67 ± 16	72 ± 19	78 ± 16
Аценафтилен	48 ± 6	55 ± 9	55 ± 9	62 ± 11
Бифенил	50 ± 7	75 ± 8	86 ± 7	94 ± 8
Аценафтен	48 ± 12	65 ± 18	63 ± 17	70 ± 15
Флуорен	59 ± 8	82 ± 9	82 ± 11	83 ± 9
Фенантрен	60 ± 9	79 ± 7	80 ± 10	79 ± 8
Антрацен	46 ± 11	52 ± 13	69 ± 15	69 ± 7
Флуорантен	53 ± 6	79 ± 8	77 ± 6	69 ± 8
Пирен	53 ± 9	75 ± 10	72 ± 10	66 ± 14
Бенз[а]антрацен	58 ± 10	54 ± 4	64 ± 9	62 ± 8
Хризен	43 ± 12	60 ± 15	66 ± 19	64 ± 12
Трифенилен	45 ± 9	49 ± 6	54 ± 6	53 ± 8
Бенз[б]флуорантен	41 ± 9	83 ± 10	84 ± 9	79 ± 8
Бенз[к]флуорантен	45 ± 10	68 ± 10	66 ± 7	62 ± 9
Бенз[е]пирен	58 ± 10	75 ± 8	76 ± 13	71 ± 12
Бенз[а]пирен	63 ± 8	86 ± 8	97 ± 9	91 ± 9
Индено[1,2,3-с,d]пирен	63 ± 9	83 ± 17	86 ± 11	80 ± 17
Дибенз[а,h]антрацен	72 ± 9	99 ± 10	99 ± 10	100 ± 13
Бенз[g,h,i]перилен	55 ± 6	71 ± 7	73 ± 5	66 ± 6

мость и целесообразность стадии очистки исследовали периодическим контролем с использованием градуировочного раствора смеси ПАУ.

В случае хроматографирования подготовленных без очистки экстрактов после 35 вколов площади пиков ПАУ контрольного раствора уменьшились

Таблица 3. Результаты (мкг/кг) определения ПАУ в образце почвы (Таманский терминал навалочных грузов) ($n = 3$, $P = 0.95$)

ПАУ	ГХ-МС	ВЭЖХ-ФЛД [29]
Нафталин	8.4 ± 4.1	<20
Флуорен	3.1 ± 1.5	2.1 ± 0.8
Фенантрен	6.5 ± 3.2	6.8 ± 2.0
Антрацен	<2.0	0.9 ± 0.3
Флуорантен	6.6 ± 3.4	8.4 ± 2.5
Пирен	5.7 ± 2.7	6.3 ± 3.3
Хризен	2.8 ± 1.3	2.5 ± 0.6
Трифенилен	<2.0	2.1 ± 0.8
Бенз[б]флуорантен	5.6 ± 2.7	3.2 ± 1.1
Бенз[к]флуорантен	2.6 ± 1.3	1.8 ± 0.6
Бенз[а]пирен	2.2 ± 1.1	1.9 ± 0.4
Дибенз[а,h]антрацен	<2.0	0.25 ± 0.09
Бенз[g,h,i]перилен	4.4 ± 2.2	3.2 ± 1.2

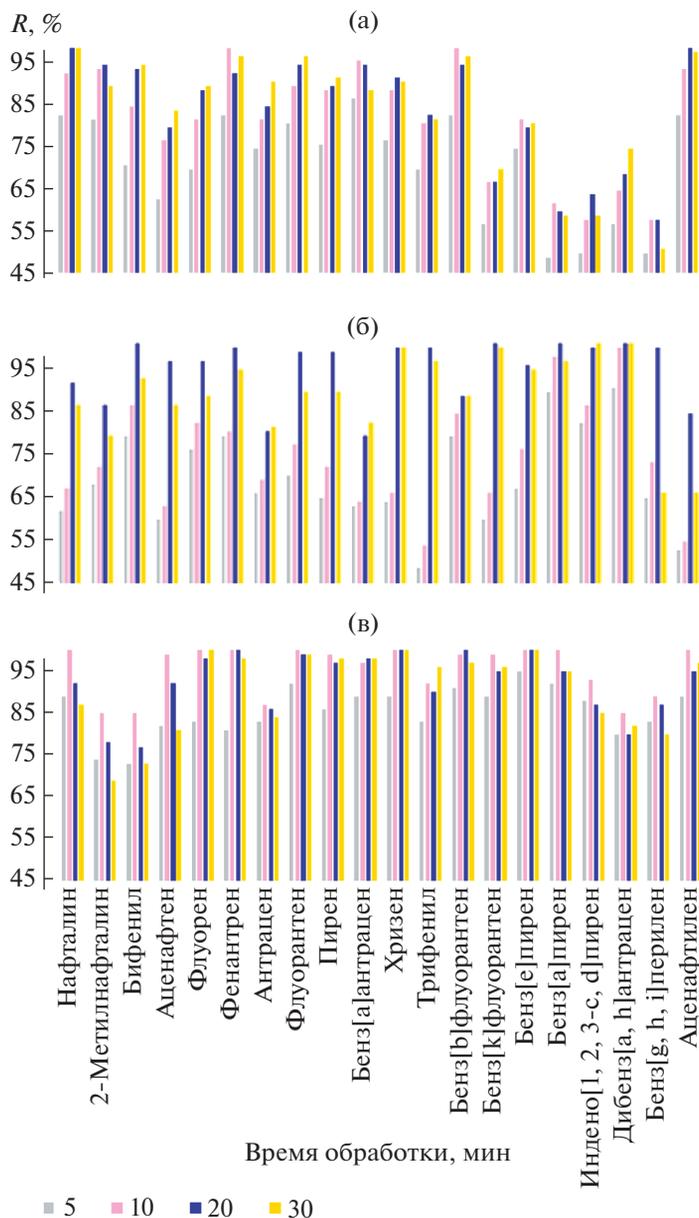


Рис. 4. Зависимость степени извлечения ПАУ от продолжительности УЗ-обработки образцов суглинистой почвы (а), илистых донных отложений Куликово-Курчанской группы лиманов (б) и песка Темрюкского залива (в).

на 30%. При анализе подготовленных по технике QuEChERS с УЗ-обработкой экстрактов снижение чувствительности детектора практически не наблюдается – изменения площади пиков колебались в пределах 10%.

Анализ реальных образцов. Сочетание УЗ-обработки и техники QuEChERS при определении ПАУ методом газовой хромато-масс-спектрометрии апробировали на образце почвы, отобранной на территории Таманского терминала навалочных грузов. Правильность полученных данных сопоставляли с результатами анализа образца методом ВЭЖХ с флуориметрическим детектирова-

нием (ФЛД) по аттестованной методике [29] (табл. 3).

Присутствие в образце большого количества различных ПАУ, по-видимому, обусловлено возможными загрязнениями почвы экотоксикантами при перевалке угля и высокой транспортной загруженностью исследуемой территории Таманского терминала навалочных грузов.

Можно сделать вывод, что пробоподготовка с применением техники QuEChERS может быть использована при определении ПАУ в образцах почв (донных отложений) с различными матрицами. Данная техника является относительно

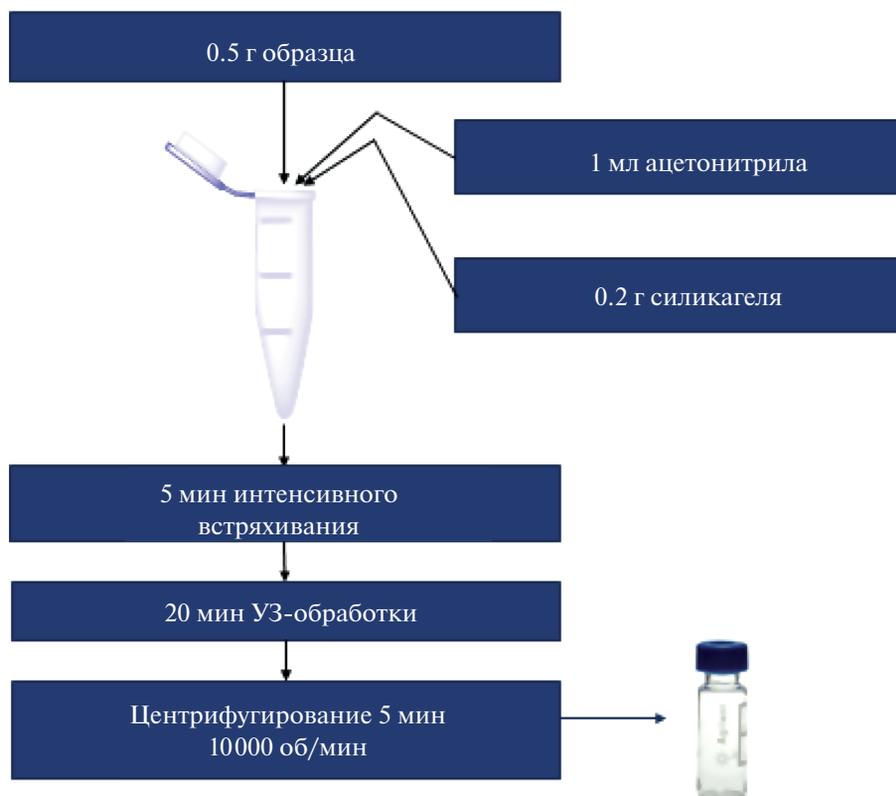


Рис. 5. Схема подготовки образцов почвы к анализу по технике QuEChERS с УЗ-обработкой.

простой и экспрессной, позволяет проводить извлечение аналитов и очистку экстракта в одну стадию. Степень извлечения ПАУ из образцов песка и илистых донных отложений варьирует в пределах 80–105%, суглинистых почв – 60–99%.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ (№ 19-43-230003 р_а) с использованием научного оборудования ЦКП “Эколого-аналитический центр” Кубанского государственного университета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baird M.W., Hooven L.A., Mahadevan B. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action // *Environ. Mol. Mutagen.* 2005. V. 45. P. 106.
2. Patel A.B., Shaikh S., Jain K.R., Desai C., Madamwar D. Polycyclic aromatic hydrocarbons: Sources, toxicity, and remediation approaches // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11. № 562813. P. 1.
3. Nikitha T., Satyaprakash M., Vani Satya S., Sadhana B., Padal S.B. A Review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Their transport, fate and biodegradation in the environment // *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 2017. V. 6. № 4. P. 1627.
4. Xu D., Zhu S., Chen H., Li F. Structural characterization of humic acids isolated from typical soils in China and their adsorption characteristics to phenanthrene // *Coll. Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.* 2006. V. 276. P. 1.
5. Baran A., Tarnawski M., Urbański K., Klimkiewicz-Pawlas A., Spałek I. Concentration, sources and risk assessment of PAHs in bottom sediments // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2017. V. 24. P. 23180.
6. Huang Y., Wei J., Song J., Chen M., Luo Y. Determination of low levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by high performance liquid chromatography with tandem fluorescence and diode-array detectors // *Chemosphere.* 2013. V. 92. P. 1010.
7. Zhang J., Yang J., Yu F., Liu X., Yu Y. Polycyclic aromatic hydrocarbons in urban Greenland soils of Nanjing, China: Concentration, distribution, sources and potential risks // *Environ. Geochem. Health.* 2020. V. 42. P. 4327.
8. Manousi N., Zachariadis G.A. Recent advances in the extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental samples // *Molecules.* 2020. V. 25. № 2182. P. 1.
9. Carvalho F.I.M., Dantas Filho H.A., Dantas K.G.F. Simultaneous determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in groundwater by GC-FID after solid-phase extraction // *SN Appl. Sci.* 2019. V. 1. № 7. Article 804.
10. Ericsson M., Colmsjö A. Dynamic microwave-assisted extraction coupled on-line with solid-phase extraction: determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in

- sediment and soil // *J. Chromatogr. A*. 2002. V. 964. P. 11.
11. *Soukariéh B., Hawari K., Husseini M., Budzinski H., Jaber F.* Impact of Lebanese practices in industry, agriculture and urbanization on soil toxicity. Evaluation of the polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) levels in soil // *Chemosphere*. 2018. V. 210. P. 85.
 12. *De la Rosa J.M., Paneque M., Hilber I., Blum F., Knicker H.E., Bucheli T.D.* Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in biochar and biochar-amended agricultural soil from Southern Spain // *J. Soils Sediments*. 2015. V. 16. P. 557.
 13. *Ozcan S., Tor A., Aydin M.E.* Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by miniaturized ultrasonic extraction and gas chromatography-mass selective detection // *Clean*. 2009. V. 37. P. 811.
 14. *Sánchez-Uría J.E., Del Castillo-Busto E.* Analytical performance of microwave-assisted solvent extraction (MASE) for the routine determination of PAHs in polluted soils by gas chromatographic-mass spectrometry (GC-MS) // *Rev. Int. Contam. Ambie.* 2018. V. 34. P. 355.
 15. *Barco-Bonilla N., Martínez Vidal J.L., Garrido Frenich A., Romero-Gonzalez R.* Comparison of ultrasonic and pressurized liquid extraction for the analysis of polycyclic aromatic compounds in soil samples by gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry // *Talanta*. 2009. V. 78. P. 156.
 16. *Librando V., Hutzinger O., Tringali G., Aresta M.* Supercritical fluid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from marine sediments and soil samples // *Chemosphere*. 2004. V. 54. P. 1189.
 17. *Latawiec A.E., Reid B.J.* Sequential extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons using subcritical water // *Chemosphere*. 2010. V. 78. P. 1042.
 18. *Темердашев З.А., Мусорина Т.Н., Червоная Т.А.* Хромато-масс-спектрометрическое определение полициклических ароматических углеводородов в почвах и донных отложениях с применением техники дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции // *Журн. аналит. химии*. 2020. Т. 75. С. 702. (*Temerdashev Z.A., Musorina T.N., Chervonnaya T.A.* Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil and bottom sediments by gas chromatography-mass spectrometry using dispersive liquid-liquid microextraction // *J. Anal. Chem.* 2020. V. 75. P. 1000.)
 19. *Dąbrowska H., Dąbrowski L., Bizziuk M., Gaca J., Namiesnik J.* Solid-phase extraction clean-up of soil and sediment extracts for the determination of various types of pollutants in a single run // *J. Chromatogr. A*. 2003. V. 1003. P. 29.
 20. *Wang Z., Chen J., Qiao X., Yang P., Tian F., Huang L.* Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons from urban to rural soils: A case study in Dalian, China // *Chemosphere*. 2007. V. 68. P. 965.
 21. *Wang R., Liu G., Chou C.-L., Liu J., Zhang J.* Environmental assessment of PAHs in soils around the Anhui coal district, China // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2009. V. 59. P. 62.
 22. *Hamid R.S.* GC/MS monitoring of selected PAHs in soil samples using ultrasound-assisted QuEChERS in tandem with dispersive liquid-liquid microextraction // *Int. J. Educ. Through Art*. 2015. V. 3. P. 288.
 23. *Martinez E., Gros M., Lacorte S., Barceló D.* Simplified procedures for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water, sediments and mussels // *J. Chromatogr. A*. 2004. V. 1047. P. 181.
 24. *Nikolic J.S., Stankov Jovanovic V.P., Dimitrijevic M.V., Cvetkovic D.J., Stanojevic L.P., Nikolic L.B., Mitic V.D.* Dispersive solid-phase extraction clean up combined with Soxhlet extraction for the determination of 16 PAHs in soil samples by GC-MS // *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 2017. V. 97. P. 112.
 25. *Федотов П.С., Малофеева Г.И., Савонина Е.Ю., Спиваков Б.Я.* Твердофазная экстракция органических веществ: нетрадиционные методы и подходы // *Журн. аналит. химии*. 2019. Т. 74. С. 163. (*Fedotov P.S., Malofeeva G.I., Savonina E.Y., Spivakov B.Y.* Solid-phase extraction of organic substances: Unconventional methods and approaches // *J. Anal. Chem.* 2019. V. 74. P. 205.)
 26. *Santana-Mayor A., Socas-Rodríguez B., Herrera-Herrera A.V., Rodríguez-Delgado M.A.* Current trends in QuEChERS method. A versatile procedure for food, environmental and biological analysis // *Trends Anal. Chem.* 2019. V. 116. P. 214.
 27. *Perestrelo R., Silva P., Porto-Figueira P., Pereira J.A.M., Silva C., Medina S., Câmara J.S.* QuEChERS – fundamentals, relevant improvements, applications and future trends // *Anal. Chim. Acta*. 2019. V. 1070. P. 1.
 28. *Sajid M., Nazal M.K., Ihsanullah I.* Novel materials for dispersive (micro) solid-phase extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples: A review // *Anal. Chim. Acta*. 2021. V. 1141. P. 246.
 29. ФР. 1.31.2007.03548. Методика выполнения измерений массовой доли полициклических ароматических углеводородов в пробах почв и донных отложений пресных и морских водных объектов. Ростов-на-Дону, 2007. 9 с.

УДК 543.545

ВНУТРИКАПИЛЛЯРНАЯ ХИРАЛЬНАЯ ДЕРИВАТИЗАЦИЯ АМИНОКИСЛОТ

© 2022 г. Л. А. Карцова^а, *, Д. О. Москвичев^а^аСанкт-Петербургский государственный университет, Институт химии
Университетский просп., 26, Петродворец, Санкт-Петербург, 198504 Россия

*e-mail: kartsova@gmail.com

Поступила в редакцию 06.09.2021 г.

После доработки 15.09.2021 г.

Принята к публикации 18.09.2021 г.

Обсуждаются возможности проведения внутрикапиллярной хиральной дериватизации аминокислот с использованием *орто*-фталевого альдегида и N-ацетил-L-цистеина. Выявлено влияние концентрации боратного буферного раствора и добавок в фоновый электролит 2-гидроксипропил-β-циклодекстрина и α-циклодекстрина на селективность разделения образующихся диастереомерных производных. Найденные условия адаптированы к электрофоретическому анализу культуральной жидкости бактерий *Escherichia coli* для обнаружения продуцируемых ими аминокислот. Идентифицированы тирозин, аланин, серин и глутаминовая кислота. Важным результатом является обнаружение в культуральной жидкости D-серина и D-аланина.

Ключевые слова: аминокислоты, капиллярный электрофорез, хиральная дериватизация, культуральная жидкость, концентрирование.

DOI: 10.31857/S004445022205005X

Аминокислоты (АК) являются важной группой аналитов, определение которых востребовано при диагностике различных заболеваний, оценке качества пищевых продуктов и кормов, при изучении клеточного метаболизма и др. В настоящее время отмечен возрастающий интерес к обнаружению D-аминокислот [1], играющих важную роль в жизни бактерий, которые с помощью D-аминокислот управляют процессом “сборки” клеточной стенки, защищая ее таким образом от неблагоприятных факторов окружающей среды. Эндогенный D-серин выполняет в мозгу млекопитающих функцию нейротрансмиттера, а D-аспарагиновая кислота, обнаруженная в нейроэндокринных тканях млекопитающих, модулирует гормональную секрецию. Одним из интересных объектов анализа для выявления продуцируемых аминокислот являются культуральные жидкости (КЖ) бактерий [2].

Для исследования энантиомерного состава смеси АК или их производных, получаемых в процессах дериватизации, применяют различные физико-химические методы анализа: газовую [3] и жидкостную хроматографию (ТСХ, ВЭЖХ) [4], капиллярный зонный электрофорез (КЗЭ) и микеллярную электрокинетическую хроматографию [5, 6], лигандообменный капиллярный электрофорез [7], спектрометрию ионной подвижно-

сти [8]. Необходимость получения производных при определении АК обусловлена отсутствием хромофорных групп в составе большинства их молекул.

Проведение дериватизации возможно как в автономном режиме, так и в режиме онлайн, т.е. непосредственно в кварцевом капилляре. При этом дериватирующие реагенты могут находиться в составе фонового электролита (ФЭ), матрицы пробы или же вводиться в кварцевый капилляр последовательно с анализируемой пробой. Весьма заманчивым является сочетание в одном аналитическом цикле внутрикапиллярной дериватизации [9] и онлайн концентрирования [10–13]. В работе [12] обсуждается вариант определения аминокислот методом капиллярного электрофореза с внутрикапиллярной дериватизацией *орто*-фталевым альдегидом (ОФА) совместно с тиольной компонентой в качестве нуклеофила. Реагенты добавляли непосредственно в фоновый электролит с последующим детектированием образующихся производных флуоресцентным детектором. Для регулирования селективности разделения в ФЭ вводили различные концентрации β-циклодекстрина (β-ЦД). Авторы показали возможность разделения энантиомеров 15 аминокислот и адаптировали полученные результаты

к электрофоретическому анализу белкового гидролизата.

Установлено, что на скорость реакции и стабильность образующегося продукта дериватизации сильно влияет природа нуклеофила. Роль тиольной компоненты в работе [12] выполнял хиральный реагент *N*-ацетил-*L*-цистеин (**N-АЦ**). Такой выбор обусловлен высокой скоростью реакции (~1 мин) с первичными аминогруппами с образованием соответствующих диастереомеров [14, 15]. Продукты этой реакции (схема 1) относи-

тельно нестабильны, однако время, затрачиваемое на внутрикапиллярную дериватизацию, разделение аналитов и детектирование, оказалось достаточным для проведения полного анализа.

Позднее те же авторы использовали аналогичную дериватирующую систему для разделения биогенных аминов, но в режиме мицеллярной электрокинетической хроматографии (в фоновый электролит добавляли мицеллообразующий агент — додецилсульфат натрия в концентрации 20 мМ) [11].

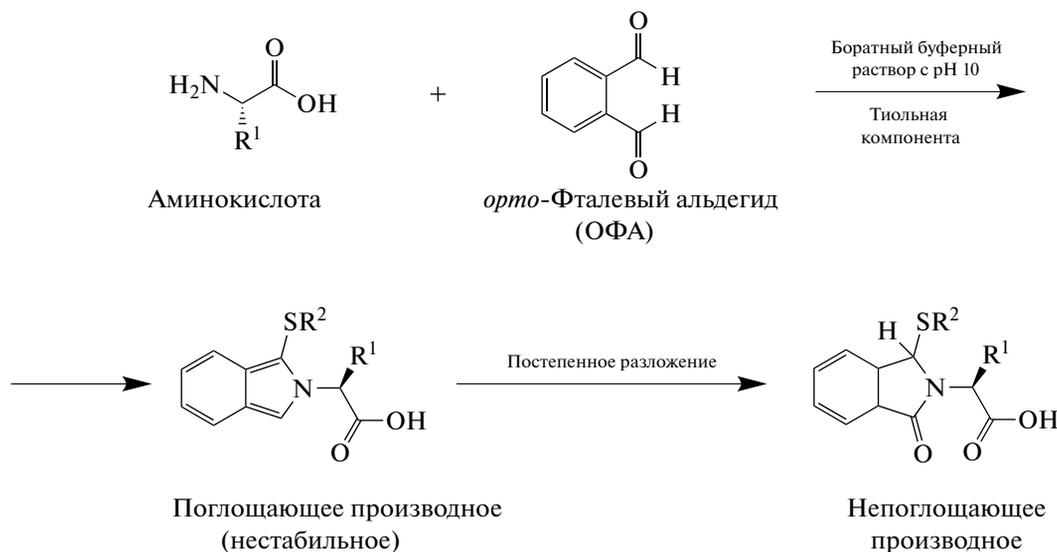


Схема 1. Схема дериватизации аминокислот *ortho*-фталевым альдегидом и тиольной компонентой [13].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Аппаратура. Для электрофоретического разделения применяли систему капиллярного электрофореза КАПЕЛЬ-105М со спектрофотометрическим детектором (Люмэкс, Санкт-Петербург). Использовали кварцевые капилляры с внешним полиимидным покрытием и общей длиной 60 или 75 см и эффективной длиной 50 или 65 см соответственно (внутренний диаметр 50 мкм, внешний диаметр 360 мкм). Обработку результатов проводили с помощью программного обеспечения “Эльфран” для Windows.

Для контроля pH при приготовлении буферных растворов использовали pH-метр HI 2210-2216 (Hanna, Германия).

Реагенты. Гидроксид натрия ч. д. а. (Химреактив, Россия); соляная кислота х. ч., диметилформамид ч., диметилсульфоксид, ацетон (Реахим, Россия); дигидрофосфат натрия двухводный х. ч.; ацетон х. ч. (Вектон, Россия); метанол (J.T.Baker, Нидерланды); борная кислота, (2-гидроксипропил)-β-циклодекстрин (**2-ГП-β-ЦД**), *N*-ацетил-*L*-цистеин, *o*-фталевый альдегид (Sigma-Aldrich,

Индия); *D,L*-протеиногенные аминокислоты: аланин (Ala), аспарагиновая кислота (Asp), валин (Val), глутаминовая кислота (Glu), метионин (Met), серин (Ser), тирозин (Tyr), треонин (Thr), триптофан (Trp); *L*-аминокислоты (Sigma-Aldrich, США): аланин (Ala), аспарагиновая кислота (Asp), валин (Val), глутаминовая кислота (Glu), метионин (Met), серин (Ser), тирозин (Tyr), треонин (Thr), триптофан (Trp); деионизованная вода.

Подготовка растворов реагентов и анализируемых объектов. Для приготовления 1 мл 400 мМ раствора *o*-фталевого альдегида в ацетонитриле брали его навеску массой 0.05365 г. Разбавленные растворы готовили путем добавления боратного буферного раствора соответствующей концентрации (50–200 мМ) с pH 9.5. Для приготовления 1 мл раствора *N*-ацетилцистеина с концентрацией 600 мМ навеску массой 0.0979 г растворяли в боратном буферном растворе. Смесь 50 мкг/мл *D,L*-аминокислот готовили из концентрированных растворов и разбавляли 15 мМ фосфатным буферным раствором (pH 5.6).

Образцы культуральной жидкости бактерий *E. coli*, выращенных на глюкозо-минеральной среде, предоставленные коллегами из Государственного научно-исследовательского института особо чистых биопрепаратов (С.-Петербург), разбавляли 30 мМ фосфатным буферным раствором (рН 5.6) в соотношении 1 : 1 (по объему).

Внутрикапиллярная хиральная дериватизация аминокислот *o*-фталевым альдегидом и *N*-ацетил-L-цистеином. Перед проведением электрофоретических анализов кварцевый капилляр промывали метанолом (5 мин), затем 0.1 М раствором HCl (5 мин) и 0.1 М раствором NaOH (5 мин), после чего контролировали электроосмотический поток (ЭОП) в 5 мМ боратном буферном растворе. В качестве маркера ЭОПа использовали диметилсульфоксид. Перед каждым анализом капилляр предварительно промывали 0.1 М раствором NaOH (5 мин) и фоновым электролитом (5 мин), затем вводили 150 мМ раствора *N*-ацетил-L-цистеина (2 с, 10 мбар), раствор пробы (10–60 с, 30 мбар) и, наконец, 100 мМ раствор *o*-фталевого альдегида (2 с, 10 мбар). Анализ проводили в боратном буферном растворе при концентрации в диапазоне 50–200 мМ и рН 9.5. Напряжение составляло 25 кВ, длина волны детектирования – 340 нм. В результате выбрали следующие условия: 160 мМ боратный буфер, рН 9.5.

Анализ культуральных жидкостей *E. coli*. Для анализа КЖ использовали фоновый электролит следующего состава: 160 мМ боратный буферный раствор с рН 9.5, 0.3 мМ 2-ГП-β-ЦД. Режим ввода: 150 мМ раствор *N*-ацетил-L-цистеина (2 с, 10 мбар), раствор пробы (80 с, 30 мбар) и 100 мМ раствор *o*-фталевого альдегида (2 с, 10 мбар).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В последние годы возможности внутрикапиллярной дериватизации аминокислот рассматривались в целом ряде работ [13, 14, 16]. В работе [16] используемые для этой цели реагенты ОФА и *N*-АЦ не входили в состав фонового электролита, а вводились отдельными зонами в кварцевый капилляр до и после ввода зоны пробы (так называемый метод “сэндвича”): сначала раствор *N*-АЦ, затем – разбавленный раствор анализируемой пробы и, наконец, раствор ОФА (5 с).

За счет разбавления пробы 60 мМ фосфатным буферным раствором с рН 6 достигалось онлайн концентрирование. По данным авторов работы [16], в этом случае реализуется смешанный вариант концентрирования – рН-скачок и изотахофорез: при вводе пробы в течение 100 с достигалось увеличение чувствительности в 40 раз по сравнению с вводом в течение 3 с. Добавление 1 мМ β-ЦД в ФЭ обеспечило увеличение селективности разделения дериватов [16]. Подобный принцип использован

при выявлении энантиомерной чистоты метионина, триптофана, фенилаланина и аспарагиновой кислоты [13]. В работе [13] смесь реагентов (30 мМ ОФА и 30 мМ *N*-АЦ в 20 мМ боратном буферном растворе) вводили в кварцевый капилляр до и после зоны пробы (5 с, 0.5 атм.), а в качестве дополнительного хирального селектора в фоновом электролите использовали γ-циклодекстрин. Сопоставлено влияние β-ЦД и γ-ЦД на разделение диастереомеров. Показано, что при использовании γ-ЦД для большинства АК значения факторов разрешения выше. Однако применение γ-ЦД не позволяет разделить энантиомеры серина, которые при использовании β-ЦД разделяются с разрешением 1.5.

Нами предпринята попытка внутрикапиллярной хиральной дериватизации с применением реагентов ОФА и *N*-АЦ в сочетании с онлайн концентрированием, а также исследовано влияние 2-ГП-β-ЦД и α-ЦД на селективность разделения образующихся диастереомеров. Для проведения внутрикапиллярной дериватизации за основу взяли условия из работы [16]. Варьировали концентрацию буферного электролита (50–200 мМ), время гидродинамического ввода пробы (2–100 с, 30 мбар) и время ввода реагентов дериватизации (2–5 с, 10–30 мбар). Данный вариант предполагал последовательное введение *N*-АЦ, раствора пробы и затем – раствора ОФА. Электрофоретическое разделение образующихся производных происходило в боратном буферном растворе с рН 9.5, в котором растворялись и реагенты дериватизации. В отличие от последних, анализируемую пробу аминокислот растворяли в фосфатном буферном растворе с рН 5.4, что обеспечило не только внутрикапиллярную хиральную дериватизацию, но и онлайн концентрирование (рН-скачок).

Суть механизма описана в работе [16]. В капилляр последовательно вводят раствор хирального реагента *N*-АЦ, далее – анализируемую пробу в фосфатном буферном растворе и, наконец, раствор ОФА (рис. 1а). После приложения напряжения положительно заряженные молекулы аминокислот мигрируют к катоду и концентрируются на границе зон пробы и *N*-ацетилцистеина. Навстречу им движутся отрицательно заряженные молекулы *N*-ацетил-L-цистеина. В зону пробы начинают проникать гидроксильные ионы, поскольку концентрация боратного буферного раствора в фоновом электролите выше, чем фосфатного в пробе (рис. 1б). Это приводит к изменению значения рН и аналитической формы аминокислот из катионной в анионную, после чего сконцентрированные аминокислоты совместно с *N*-АЦ начинают мигрировать к аноду, т.е. в противоположную сторону относительно электроосмотического потока, и в определенный момент достигают зоны *o*-фталевого альдегида. Здесь и

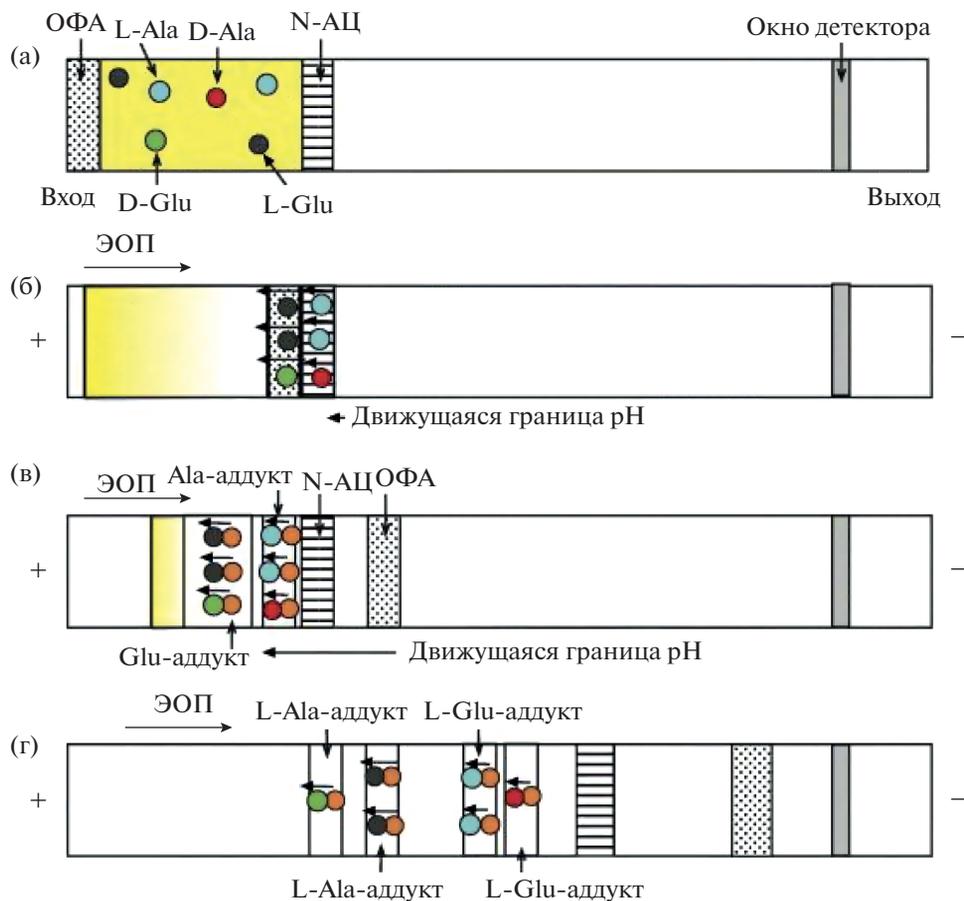


Рис. 1. Схема внутрикапиллярной хиральной дериватизации аминокислот. (а): Последовательное гидродинамическое введение растворов N-ацетил-L-цистеина (N-АЦ), пробы и о-фталевого альдегида (ОФА); (б): онлайн концентрирование аминокислот; (в): внутрикапиллярная дериватизация за счет смешения с зоной ОФА/N-АЦ; (г) хиральное разделение аддуктов диастереомерных аминокислот. Концентрирование аминокислот происходит на разных стадиях электромиграции — как до, так и после внутрикапиллярной дериватизации [16].

происходит реакция образования соответствующих изоиндолных производных (рис. 1в). Молекулы о-фталевого альдегида в боратном буферном растворе с рН 9.5 не имеют собственной электрофоретической подвижности и мигрируют совместно с ЭОП. Образующиеся и сконцентрированные диастереомеры аминокислот далее разделяются в условиях КЗЭ (рис. 1г).

Описанные выше эксперименты по хиральной внутрикапиллярной дериватизации проводили как для модельных систем аминокислот (рис. 2), так и для каждой АК в отдельности. Для увеличения эффективности концентрацию фосфатного буферного раствора в пробе снизили с 60 мМ (данные работы [16]) до 15 мМ. По нашим данным, D-энантиомеры имеют большую электрофоретическую подвижность и мигрируют первыми.

Исследовано влияние концентрации боратного буферного раствора на энантиоселективное разделение диастереомеров аминокислот. Приемлемые времена миграции и требуемую селек-

тивность разделения наблюдали при концентрации фонового электролита 150 мМ.

В найденных условиях достигнуто разделение энантиомеров производных Ser, Val, Met, Thr и Ala, однако D- и L-формы Trp и Thr не разделяются. Выполнили серию специальных экспериментов по установлению влияния макроциклического агента 2-ГП-β-ЦД в диапазоне концентраций 0.1–0.7 мМ в составе фонового электролита на миграционные характеристики хиральных производных аминокислот (рис. 3). При увеличении концентрации 2-ГП-β-ЦД в фоновом электролите энантиоселективность возрастает для Trp, Tyr, Val, Met и Thr, но при этом снижается для Ala и Val. Наиболее заметное влияние увеличения концентрации макроцикла на время миграции энантиомеров обнаружено в случае тирозина. При этом только для тирозина в этих условиях время миграции производного L-изомера меньше, чем D-изомера.

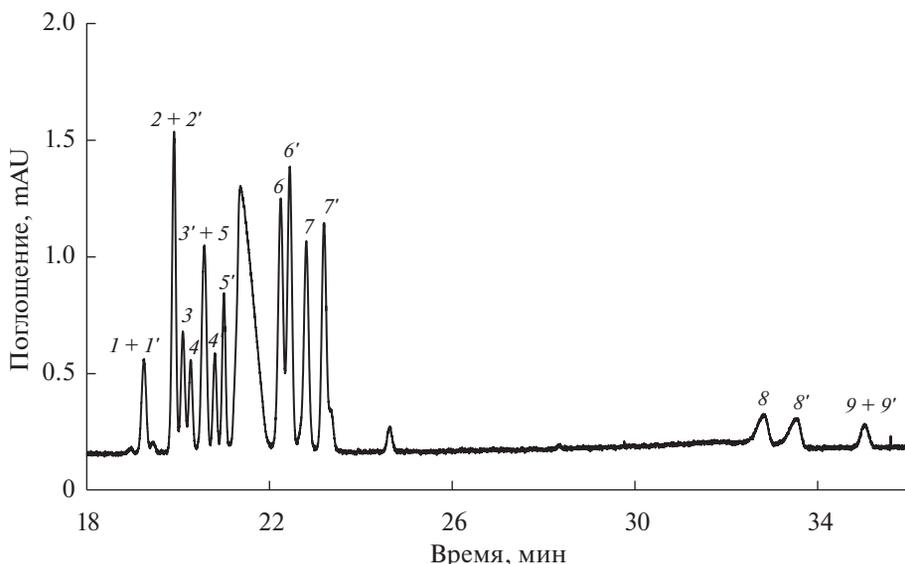


Рис. 2. Электрофореграмма, полученная при внутрикапиллярной дериватизации и онлайн концентрировании модельной смеси аминокислот. Условия: 160 мМ боратный буферный раствор с pH 9.5; режим ввода: 1 – 150 мМ раствор N-ацетил-L-цистеина (2 с, 10 мбар); 2 – раствор анализируемой пробы (50 с, 30 мбар); 3 – 100 мМ раствора *o*-фталевого альдегида (2 с, 10 мбар); 25 кВ; 340 нм. Обозначения производных аминокислот: 1, 1' – Trp; 2, 2' – Tyr; 3, 3' – Met; 4, 4' – Val; 5, 5' – Thr; 6, 6' – Ser; 7, 7' – Ala; 8, 8' – Glu; 9, 9' – Asp; D-изомеры обозначены цифрой, а L-изомеры – цифрой со штрихом.

Анализ результатов, полученных на модельной системе аминокислот, позволил выбрать наиболее подходящую концентрацию используемого макроциклического агента, которая составила 0.1 мМ (рис. 4). Факторы энантиоселективности (R_s) производных D- и L-аминокислот при данной концентрации представлены ниже:

АК	D,L- Trp	D,L- Tyr	D,L- Met	D,L- Val	D,L- Thr	D,L- Ser	D,L- Ala
R_s	0.4	1.2	2.3	4.0	2.1	0.8	1.2

Наличие в составе фонового электролита макроцикла с меньшим размером полости – α -циклодекстрина – влияет в первую очередь на времена миграции диастереомеров метионина, улучшая разделение с энантиомерами других АК, а также обеспечивает разделение энантиомеров производных триптофана. При этом D- и L-формы тирозина в этих условиях не разделяются (рис. 5). Для сокращения продолжительности анализа, начиная с 28-й минуты, подавали дополнительное давление 30 мбар. Введение добавок сульфобета-циклодекстрина не привело к изменению селективности разделения энантиомеров.

Выбранные условия (см. рис. 3) применили при электрофоретическом исследовании аминокислотного состава культуральной жидкости бактерии *E. coli* (рис. 6а). Для увеличения чувствительности анализируемую пробу вводили в течение

50 с при давлении 30 мбар. С целью идентификации компонентов КЖ добавляли смесь всех исследуемых АК (5 мкг/мл) (рис. 6б). Путем варьирования времени ввода пробы установлено, что при 80 с достигается максимальная чувствительность при сохранении селективности разделения. Пределы обнаружения составили 0.01 мМ для Glu и Asp, для других АК – в диапазоне 3–7 мкМ.

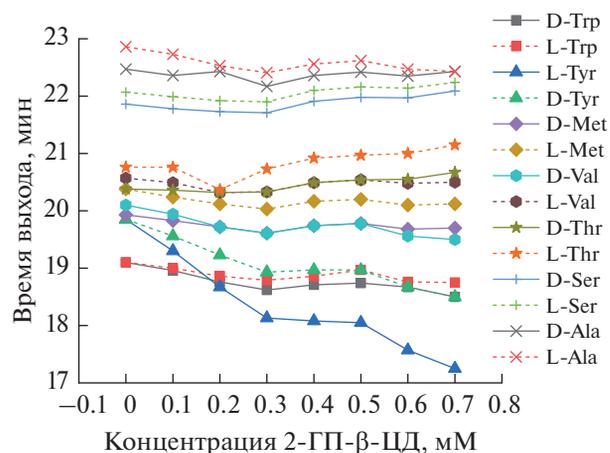


Рис. 3. Влияние концентрации (2-гидроксипропил)- β -циклодекстрина на селективность разделения диастереомерных производных аминокислот. Условия разделения см. в подписи к рис. 2.

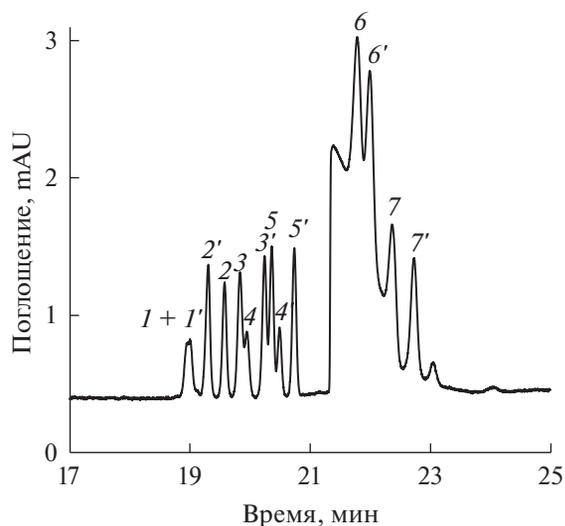


Рис. 4. Электрофореграмма диастереомеров производных аминокислот (Trp, Tyr, Ala, Ser, Val, Met, Thr) с добавкой (2-гидроксипропил)- β -циклодекстрина (2-ГП- β -ЦД) в фоновый электролит, полученная в условиях внутрикапиллярной дериватизации и онлайн концентрирования. Условия: 160 мМ боратный буферный раствор с рН 9.5, 0.1 мМ 2-ГП- β -ЦД; режим ввода: 1) – 150 мМ раствора N-ацетил-L-цистеина, 5 с, 15 мбар; 2) – раствор анализируемой пробы, 10 с, 30 мбар; 3) – 100 мМ раствор *o*-фталевого альдегида, 5 с, 15 мбар; 25 кВ; 340 нм. Обозначения производных аминокислот см. в подписи к рис. 2.

Таким образом, достигнуто электрофоретическое разделение энантиомеров аминокислот за счет внутрикапиллярной хиральной дериватизации с применением реагентов ОФА и N-АЦ в со-

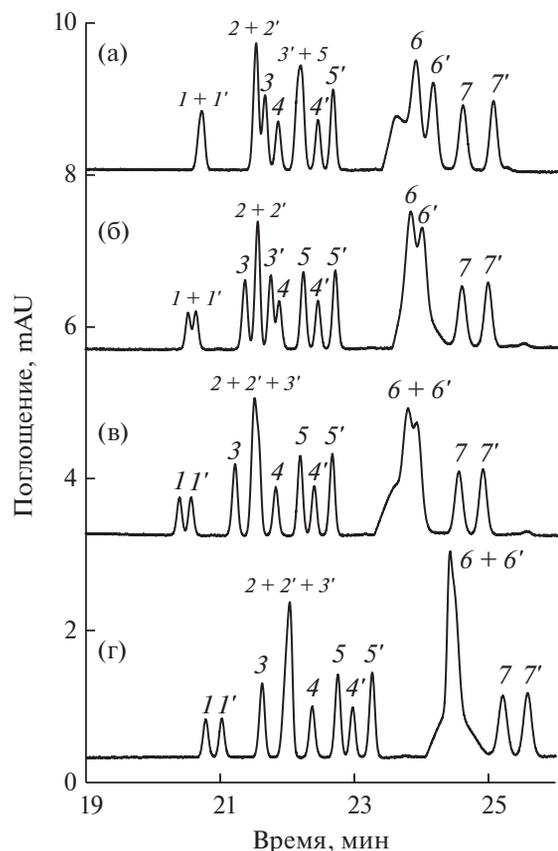


Рис. 5. Влияние концентрации α -циклодекстрина (α -ЦД) на селективность разделения диастереомерных производных аминокислот. Начиная с 28-й минуты, подается давление 30 мбар. Концентрация α -ЦД в фоновом электролите, мМ: 0 (а), 1.5 (б), 2 (в), 2.5 (г). Остальные условия разделения см. в подписи к рис. 2.

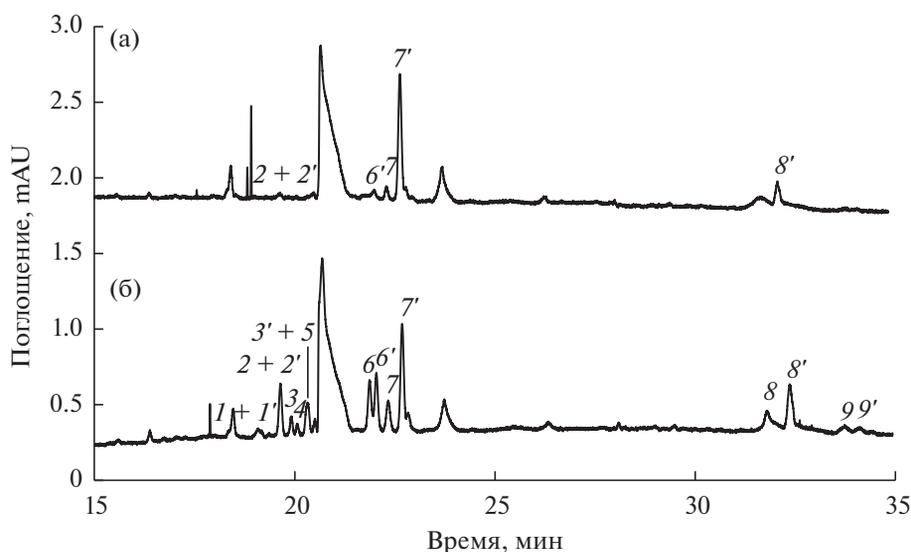


Рис. 6. Электрофореграмма культуральной жидкости *E. coli* в условиях хиральной дериватизации (а); с добавкой аминокислот (5 мкг/мл) (б). Ввод пробы – 50 с, 30 мбар. Остальные условия разделения см. в подписи к рис. 2.

четании с онлайн концентрированием. Выбранные условия использованы для определения продуцируемых аминокислот в культуральной жидкости бактерий *E. coli*. Электрофоретический анализ показал присутствие Thr, Ala, Ser и Glu. Важным результатом явилось электрофоретическое обнаружение в культуральной жидкости D-Ser и D-Ala.

Работа выполнена при финансовой поддержке проекта РНФ № 19-13-00370. Выражаем благодарность Ресурсному центру СПбГУ "Методы анализа состава вещества" за предоставленное оборудование.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Tanwar S., Bhushan R.* Enantioresolution of amino acids: A decade's perspective, prospects and challenges // *Chromatographia*. 2015. V. 78. № 17–18. P. 1113. <https://doi.org/10.1007/s10337-015-2933-8>
2. *Kartsova L.A., Makeeva D.V., Kravchenko A.V., Moskvichev D.O., Polikarpova D.A.* Capillary electrophoresis as a powerful tool for the analyses of bacterial samples // *Trends Anal. Chem.* 2021. V. 134. Article 116110. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116110>
3. *Schurig V.* Gas chromatographic enantioseparation of derivatized α -amino acids on chiral stationary phases—Past and present // *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2011. V. 879. № 29. P. 3122. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.04.005>
4. *Ilisz I., Aranyi A., Pataj Z., Péter A.* Recent advances in the direct and indirect liquid chromatographic enantioseparation of amino acids and related compounds: A review // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2012. V. 69. P. 28. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.01.020>
5. *Poinsot V., Carpené M.A., Bouajila J., Gavard P., Feurer B., Couderc F.* Recent advances in amino acid analysis by capillary electrophoresis // *Electrophoresis*. 2012. V. 33. № 1. P. 14. <https://doi.org/10.1002/elps.201100360>
6. *Giuffrida A., Maccarrone G., Cucinotta V., Orlandini S., Contino A.* Recent advances in chiral separation of amino acids using capillary electromigration techniques // *J. Chromatogr. A*. 2014. V. 1363. P. 41. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.08.041>
7. *Zhao L., Qiao J., Zhang K., Li D., Zhang H., Li Q.* Construction of chiral ligand exchange capillary electrochromatography for D,L-amino acids enantioseparation and its application in glutaminase kinetics study // *J. Chromatogr. A*. 2018. V. 1548. P. 104. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.03.031>
8. *Pérez-Míguez R., Bruyneel B., Castro-Puyana M., Marina M.L., Somsen G.W., Domínguez-Vega E.* Chiral discrimination of DL-amino acids by trapped ion mobility spectrometry after derivatization with (+)-1-(9-fluorenyl)ethyl chloroformate // *Anal. Chem.* 2019. V. 91. № 5. P. 3277. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b03661>
9. *Marina M.L., Castro-Puyana M.* Derivatization in capillary electrophoresis / *Capillary Electrophoresis. Methods in Molecular Biology* / Schmitt-Kopplin P. (eds). N.Y.: Humana Press, 2016. P. 37. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6403-1_3
10. *Cancelliere G., D'Acquarica I., Gasparrini F., Misiti D., Villani C.* Synthesis and applications of novel, highly efficient HPLC chiral stationary phases: A chiral dimension in drug research analysis // *Pharm. Sci. Technol. Today*. 1999. V. 2. № 12. P. 484. [https://doi.org/10.1016/S1461-5347\(99\)00218-7](https://doi.org/10.1016/S1461-5347(99)00218-7)
11. *Oguri S., Watanabe S., Abe S.* Determination of histamine and some other amines by high-performance capillary electrophoresis with on-line mode in-capillary derivatization // *J. Chromatogr. A*. 1997. V. 790. № 1–2. P. 177. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00719-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00719-X)
12. *Oguri S., Yokoi K., Motohase Y.* Determination of amino acids by high-performance capillary electrophoresis with on-line mode in-capillary derivatization // *J. Chromatogr. A*. 1997. V. 787. № 1–2. P. 253. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00664-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00664-X)
13. *Kühnreich R., Holzgrabe U.* Indirect enantioseparation of amino acids by CE using automated in-capillary derivatization with ortho-phthalaldehyde and N-acetyl-L-cysteine // *Chromatographia*. 2016. V. 79. № 15–16. P. 1013. <https://doi.org/10.1007/s10337-016-3122-0>
14. *Celá A., Glatz Z.* Homocyclic o-dicarboxaldehydes: Derivatization reagents for sensitive analysis of amino acids and related compounds by capillary and microchip electrophoresis // *Electrophoresis*. 2020. V. 41. № 21–22. P. 1851. <https://doi.org/10.1002/elps.202000041>
15. *García Alvarez-Coque M.C., Medina Hernández M.J., Villanueva Camañas R.M., Mongay Fernández C.* Formation and instability of o-phthalaldehyde derivatives of amino acids // *Anal. Biochem.* 1989. V. 178. № 1. P. 1. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90346-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90346-1)
16. *Ptolemy A.S., Tran L., Britz-McKibbin P.* Single-step enantioselective amino acid flux analysis by capillary electrophoresis using on-line sample preconcentration with chemical derivatization // *Anal. Biochem.* 2006. V. 354. № 2. P. 192. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.04.016>

**В НАУЧНОМ СОВЕТЕ РАН
ПО АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ**

45-Я ГОДИЧНАЯ СЕССИЯ СОВЕТА

DOI: 10.31857/S0044450222050061

28 сентября 2021 г. в рамках VI Всероссийского симпозиума “Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии” (26 сентября–02 октября 2021 г., с. Ольгинка Туапсинского района) состоялась очередная 45-я Годичная сессия Научного совета РАН по аналитической химии. Участие в ее работе приняли около 150 членов совета и участников конференции. Программа сессии включала вступительное слово председателя совета академика РАН Ю.А. Золотова (публикуется отдельно), доклад д. х. н. Д.О. Кирсанова о важнейших научных достижениях российских аналитиков в 2020 г. (на основании материалов отчета совета за 2020 г.), отчет о научно-организационной деятельности совета в 2020 и 2021 гг. ученого секретаря совета к. х. н. И.Н. Киселевой, доклад заместителя генерального директора – начальника управления программ и проектов РНФ А.Н. Блинова “Грантовая поддержка исследований в области химических наук” и сообщение член-корр. РАН В.П. Колотова о IV Съезде аналитиков России (25 сентября–01 октября 2022 г., г. Москва, НМЦ профсоюзов работников АПК).

На заседании состоялось вручение наград лауреатам молодежных премий совета за 2020 г.: к. х. н. В.В. Толмачевой и к. х. н. М.В. Горбуновой (МГУ им. М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра аналитической химии) – за разработку композитов на основе полимеров и наночастиц для концентрирования и определения биологически активных органических соединений, к. х. н. А.Ю. Шишову (СПбГУ, Институт химии, кафедра аналитической химии) – за развитие нового направления в области разделения и концентрирования, основанного на применении глубоких эвтектических растворителей.

Участники сессии поздравили академика Ю.А. Золотова с вручением ему в 2020 г. государственной награды РФ – ордена Александра Невского “За большой вклад в развитие науки и многолетнюю добросовестную работу” и Золотой медали РАН им. Н.С. Курнакова за цикл работ “Развитие общей методологии аналитической химии”.

Д.О. Кирсанов, основываясь на результатах наукометрической обработки числа публикаций и их тем в высокорейтинговых журналах по аналитической химии, показал, чем живет мировая аналитическая химия, и оценил место в ней рос-

сийских аналитиков. Если за основу сопоставления взять число публикаций по методам, то окажется, что Россия занимает 11-е место по масс-спектрометрии, 13-е по хроматографии, 16-е по химическим сенсорам, 18-е по электрохимическим методам, 20-е по биосенсорам. Если сопоставить тематику, то окажется, что, например, по масс-спектрометрии большинство работ посвящено белкам (их синтезу, изучению свойств), в электрохимических методах – исследованию электрополимеров, воды, наночастиц и т.д. Автор доклада считает, что в целом у нас все неплохо, аналитическая химия в России развивается в соответствии с мировыми тенденциями; впереди масс-спектрометрия, спектроскопия ГКР (SERS), исследование биологических объектов.

И.Н. Киселева перечислила мероприятия, организованные советом, его комиссиями и отделениями в 2020 г. В Саратове с 24 по 28 февраля на базе Института химии Саратовского университета состоялся 12-й Зимний симпозиум по хемометрике (The 12th Winter Symposium on Chemometrics, WSC-12, 55 участников); в Москве с 23 по 26 сентября в МВЦ “Крокус Экспо” прошла 18-я Международная выставка “Аналитика Экспо 2020”, на которой д. х. н. Б.К. Зуев провел семинар “Газовые сенсоры в аналитической химии”. С 27 сентября по 3 октября в с. Ольгинка под Туапсе была проведена IV Всероссийская конференция “Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез” (170 участников); в рамках конференции состоялась 44-я Годичная сессия совета. В Казани с 16 по 20 ноября была организована X юбилейная Всероссийская конференция по электрохимическим методам анализа ЭМА 2020 (63 участника). В 2021 г. с 13 по 16 апреля в Москве в “Крокус Экспо” состоялась очередная 19-я международная выставка “Аналитика Экспо 2021”, в научную программу которой были включены два семинара, организованные советом: “Аналитические методы подтверждения эффективности и безопасности фармацевтических препаратов” (ведущий д. х. н. Г.Б. Голубицкий) и “Определение лекарственных веществ в медицинских объектах” (ведущий д. х. н. А.И. Ревельский). В августе в Новосибирске успешно прошла 11-я Научная конференция и школа молодых ученых “Аналитика Сибири и Дальнего Востока”, посвященная 100-летию со дня рождения

И.Г. Юделевича, перенесенная из-за пандемии с августа 2020 г. на 2021 г. VI Всероссийский симпозиум “Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии” состоялся с 26 сентября по 1 октября 2021 г. в с. Ольгинка (около 300 участников).

А.Н. Блинов свое выступление начал с информации о ежегодных суммах грантовой поддержки фундаментальных и поисковых научных исследований. Так, в 2020 г. эта сумма составила 21 млрд руб.; 15.9% от нее были выделены на направление “Химия и науки о материалах”. Основными условиями конкурсов РНФ являются квалификация руководителя (8 публикаций в WoS и/или SCOPUS за 5 лет), обязательства взамен грантов (8 публикаций в WoS и/или SCOPUS за время выполнения работы), доля молодых исследователей (не менее 50%), срок выполнения – три года с возможностью продления еще на два года, коллектив 4–10 человек. Поддерживаются международные исследовательские коллективы. Существует президентская программа “Проведение фундаментальных научных исследований и поисковых научных исследований по поручениям Президента РФ”. С 2022 г. начинают работать конкурсы “Проведение фундаментальных научных исследований и поисковых научных исследований малыми научными группами”, а также региональные конкурсы. С момента подачи заявки до получения средств гранта проходит около полугода. Функционирует многоуровневая ком-

петентная экспертиза заявок, состав экспертов ежегодно обновляется. С условиями всех конкурсов можно познакомиться на сайте рнф.рф.

В.П. Колотов, один из сопредседателей IV Съезда аналитиков России, напомнил присутствующим о трех предыдущих съездах. В съезде 2010 г. приняли участие 464 человека, в 2013 г. более 400 человек и 391 человек в 2017 г. Докладчик напомнил о конференциях и симпозиумах, вошедших в их программы. Следующий, IV Съезд аналитиков России планируется провести с 25 сентября по 1 октября 2022 г. в г. Москве, НМЦ профсоюзов работников АПК. В программу съезда будут включены конференции “Аналитика России” (спектроскопические, масс-спектрометрические, электрохимические и биохимические методы, анализ объектов, общие вопросы аналитической химии), “Экоаналитика”, “Хроматография: теория и аналитическое применение”, “Рентгеновские методы анализа”, Симпозиум по преподаванию аналитической химии и подготовке кадров высшей квалификации, Симпозиум по аналитическому приборостроению, 46-я Годичная сессия Научного совета РАН по аналитической химии, круглые столы, лекции, культурная программа.

Заседание закончилось признанием отчета совета за 2020 г. удовлетворительным и его утверждением.

И.Н. Киселева

**В НАУЧНОМ СОВЕТЕ РАН
ПО АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ**

**ВСТУПИТЕЛЬНОЕ СЛОВО ПРЕДСЕДАТЕЛЯ НАУЧНОГО
СОВЕТА РАН ПО АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ НА ГОДИЧНОЙ СЕССИИ
28 СЕНТЯБРЯ 2021 Г.**

DOI: 10.31857/S0044450222050206

Дорогие коллеги! Я держу в руках отчет научного совета за 2020 г.; это многостраничный документ, в нем много интересного. Приятно сознавать, что, несмотря на пандемию, на изоляцию, исследования и разработки не только продолжались, но и дали многочисленные полезные результаты. Надо еще помнить, что в отчет совета попадает не все, что делается в стране в области аналитической химии. Несмотря на пандемию, проведены две крупные конференции – IV Всероссийская конференция “Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез” (27 сентября–2 октября 2020 г.) и XI Научная конференция “Аналитика Сибири и Дальнего Востока” в Новосибирске (16–20 августа 2021 г.). Защищено несколько докторских диссертаций (А.Ю. Богомолов, А.З. Темердашев, Н.В. Ульяновский).

Из событий более широкого плана надо с удовлетворением отметить, что в декабре 2020 г. наконец принят закон, в значительной степени возвращающий аспирантуру к тому статусу, который она имела до 2012 г., когда был принят Закон об образовании. С аспирантурой было бы совсем хорошо, если бы стипендия аспирантов увеличилась бы, скажем, в 5 раз.

Высшую школу ждет очередная организационная лихорадка: вместо системы бакалавриата и магистратуры, да и специалитета, предполагается внедрить так называемую систему 2 + 2 + 2.

Уходящий год был богат на юбилеи. 90 лет исполнилось создателю электротермической атомной абсорбции Борису Владимировичу Львову. 85-летний юбилей отметили: один из самых крупных наших хроматографистов Яков Иванович Яшин; Игорь Александрович Ревельский, внесший значительный вклад в масс-спектрометрию, а также специалист по органическим реагентам и экоанализу Юрий Маркович Дедков и энтузиаст искусственного интеллекта в приложении к расшифровке структур органических соединений Михаил Евгеньевич Эляшберг. 80 лет исполнилось члену-корреспонденту РАН, заместителю председателя нашего совета Борису Яковлевичу Спивакову, а также Владимиру Витальевичу Кузнецову, долгое время возглавлявшему кафедру

аналитической химии РХТУ им. Д.И. Менделеева.

Профессора Вячеслав Исаакович Вершинин (Омск), Михаил Иванович Дегтев (Пермь) и Владимир Матвеевич Грузнов (Новосибирск) прошли 75-летний рубеж. 70-летие отметили директор Института аналитического приборостроения В.Е. Курочкин, ведущий специалист по тонкослойной хроматографии В.Д. Красиков (оба из Петербурга), бывший декан федерального университета в Красноярске С.В. Качин и специалист по анализу стали академик К.В. Григорович. Свои 65 лет оставили позади З.А. Темердашев, А.М. Долгонос, А.Б. Волынский, 60 лет – М.К. Беклемишев, Г.Б. Голубицкий, И.А. Буряков, П.К. Суханов. С.Ю. Доронину исполнилось 50 лет. Юбилей отметили Э.Р. Оскотская, Л.А. Карцова, С.В. Курбатова, Г.Б. Слепченко, И.И. Занозина, И.Ю. Горячева.

Поздравляем всех юбиляров, желаем им здоровья, благополучия и успехов.

К глубокому сожалению, научный совет понес серьезные потери. 7 ноября 2020 г. ушла из жизни Валентина Павловна Фадеева, заведовавшая аналитической лабораторией Новосибирского института органической химии. 1 февраля мы потеряли Римму Кузьминичну Чернову, которая более сорока лет заведовала кафедрой в Саратовском государственном университете. 8 февраля 2021 г. скончался крупный хроматографист Виктор Григорьевич Березкин. 5 апреля не стало Юрия Степановича Другова, автора огромного числа руководств по анализу объектов окружающей среды. 14 июля ушел из жизни выдающийся ученый, заместитель председателя научного совета Юрий Александрович Карпов. Академик Карпов долгие годы заведовал аналитическим отделом Гиредмета, был президентом ассоциации “Аналитика”, главным редактором журнала “Заводская лаборатория. Диагностика материалов”.

Сообщество аналитиков объединяется не только научным советом. Есть Всероссийское масс-спектрометрическое общество (ВМСО), Хемометрическое общество, ассоциация “Аналитика”, ассоциация судебно-химических экспер-

тов (правда, многие члены этих и других объединений одновременно являются и членами нашего совета, во всяком случае все руководители). ВМСО проводит свои съезды и конференции, Хемометрическое общество – зимние симпозиумы по хемометрике, ассоциация “Аналитика” собирает аналитиков-практиков ежегодно в апреле. Все это очень хорошо. В апреле каждого года организуется выставка “Аналитика Экспо”, партнером которой является наш научный совет.

Издательства стали больше переводить хорошие иностранные книги, особенно по прикладному анализу (например, петербургское изда-

тельство “Профессия”) или типа учебных пособий и справочников; хуже обстоит дело с монографиями: издательства боятся, что на них будет малый спрос. В Советском Союзе государство брало расходы на себя, издательства, особенно издательство “Мир”, во многом способствовали развитию нашей науки, выпуская книги с переднего края науки мировой.

А мы должны стремиться к тому, чтобы быть на переднем крае.

Ю.А. Золотов

VI ВСЕРОССИЙСКИЙ СИМПОЗИУМ “РАЗДЕЛЕНИЕ И КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ В АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ И РАДИОХИМИИ”

DOI: 10.31857/S0044450222050176

С 26 сентября по 2 октября 2021 г. в с. Ольгинка Туапсинского района Краснодарского края проходил VI Всероссийский симпозиум “Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии”. Симпозиум был организован Министерством науки и высшего образования РФ, Научным советом РАН по аналитической химии, Институтом геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского РАН, Московским государственным университетом им. М.В. Ломоносова и Кубанским государственным университетом. В работе симпозиума участвовали 312 человек, из них 142 молодых ученых (школьников, студентов, магистров, аспирантов и молодых сотрудников), а также 4 специалиста из Белоруссии и Казахста-

на. Были представлены 68 организаций из 34 городов – 25 вузов, 13 академических институтов, а также отраслевых научно-исследовательских институтов, предприятий и организаций реального сектора экономики. Самые многочисленные делегации были представлены учеными из Москвы и Московской области (137), Краснодара (39), Санкт-Петербурга (36), Казани (9), Саратова (8), и Воронежа (8 человек). Свои экспозиции представили 14 фирм-производителей и поставщиков аналитического оборудования.

Обсуждались теория и методология разделения и концентрирования; различные методы разделения (сорбция, экстракция, электрохимические, мембранные методы и др.); концентрирова-



Фото 1. Почетный председатель Оргкомитета академик Ю.А. Золотов на открытии симпозиума.



Фото 2. В зале заседаний.



Фото 3. Демонстрация аналитического оборудования.

ние, в том числе с использованием наночастиц и наноструктур, для определения веществ методами спектроскопии, хроматографии, электрофореза и т.п.; практическое применение в аналитической химии и лабораторной радиохимии; приборы, автоматизация, компьютеризация.

Заслушаны 10 пленарных лекций, 16 приглашенных главных секционных и 44 секционных доклада, сделаны 228 стендовых сообщений (фото 1–3). Можно отметить приветствия сопредседателя Оргкомитета д. х. н. Г.И. Цизина и члена-корр. РАН С.Н. Калмыкова, доклады председателя НСАХ РАН академика РАН Ю.А. Золотова “О состоянии и тенденциях развития аналитической химии”, д. х. н. Р.Х. Хамизова и д. х. н. А.М. Долгоносова “Наноиониты. Свойства и возможности применения в аналитической химии”, чл.-корр. РАН С.Н. Калмыкова “Методы концентрирования и разделения радионуклидов в ядерном топливном цикле нового поколения”, чл.-корр. АН РБ В.Н. Майстренко и Ю.А. Ярковой “Новые хиральные материалы для дискриминации и определения энантиомеров в вольтамперометрических сенсорах”, д. х. н. П.С. Федотова, к. х. н. М.С. Ермолина, к. х. н. А.И. Иванеева и члена-корр. РАН Б.Я. Спивакова “Разделение и анализ наночастиц окружающей среды: современные методы и подходы”, д.х.н. Г.А. Евтюгина и к. х. н. А.В. Порфирьевой “Электрохимический анализ органических соединений в водно-органических и дисперсионных средах”, д.х.н. Х.З. Брайниной, д. х. н. Н.Ю. Стожко, к. х. н. М.А. Бухариновой и д. х. н. Л.Г. Гальперина “Электродные процессы на наночастицах: математическое моделирование и эксперимент”, д. х. н. П.Н. Нестеренко “Технология сухих пятен крови. Современное состояние и перспективы”, Р.Х. Дженлода, д. х. н. В.М. Шкинева и члена-корр. РАН Б.Я. Спивакова “Ультразвуковые стоячие волны в анализе различных объектов”, д. х. н. С.Г. Дмитриенко, д. х. н. В.В. Апяри, к. х. н. В.В. Толмачевой и к. х. н. М.В. Горбуновой “Жидкофазное микроэкстракционное концентрирование органических соединений”, д. х. н. Д.О. Кирсанова, Ю.С. Савосиной, М.С. Агафоновой-Мороз, к. х. н. А.В. Легина и к. х. н. В.А. Бабаина “Онлайн контроль экстракционного процесса разделения компонентов ОЯТ с помощью потенциометрических мультисенсорных систем”, члена-корр. РАН В.П. Колотова, А.В. Жилкиной, к. х. н. Е.А. Захарченко, к. х. н. Д.Н. Догадкина, В.Е. Огнева, Д.А. Тюрина и А.О. Хлуднева “Углеродные наноматериалы для концентрирования редкоземельных элементов: определение сверхнизких концентраций РЗЭ в ультраосновных геологических породах методом МС-ИСП”, А.А. Фурлетова, д. х. н. В.В. Апяри, П.А. Волкова, д. х. н. С.Г. Дмитриенко и академика РАН Ю.А. Золотова “Сорбционный способ получения и аналити-

ческие возможности нового композитного материала на основе пенополиуретана, модифицированного треугольными нанопластинками серебра”, д. х. н. Е.И. Савельевой “Новые тенденции в разделении и концентрировании при анализе биомедицинских проб”, д. х. н. А.В. Пирогова, Е.С. Марковой, к. х. н. М.В. Полика и члена-корр. РАН О.А. Шпигуна “Пассивные сорберы на основе углеродных материалов и их анализ для оценки нефтегазоносности пород”, д. х. н. В.В. Милютина, к. х. н. Н.А. Некрасова и В.О. Каптакова “Сравнительная оценка сорбционных характеристик различных сорбционных материалов по отношению к радионуклидам цезия и стронция”, д. х. н. Г.И. Цизина и к. х. н. М.А. Статкуса “Пористый графитированный углерод для разделения и концентрирования гидрофильных органических веществ”, к. х. н. Д.С. Косьякова “Сверхкритические флюидные технологии разделения и концентрирования в аналитической химии”, Ж.В. Арутюнян, А.С. Семеновой, Т.А. Червонной, к. х. н. Т.Н. Мусориной и к. х. н. А.З. Темердашева “Оптимизация техники DLLME при ВЭЖХ-определении ПАУ в поверхностных водах”, к. х. н. Е.А. Захарченко, А.В. Жилкина, В.Е. Огнева, к. х. н. Д.Н. Догадкина, В.И. Казина, О.А. Хлуднева и члена-корр. РАН В.П. Колотова “Сорбционные свойства углеродных наноматериалов различного типа и их модификаций по отношению к широкому спектру элементов: исследование методом МС-ИСП и возможности их аналитического применения”.

В рамках симпозиума проведена 45-годовая сессия Научного совета РАН по аналитической химии.

Участники отмечали, что симпозиум внес вклад в развитие фундаментальных и прикладных исследований в области методов разделения и концентрирования, в укрепление связей вузовской и академической науки, научных центров, в повышение уровня подготовки специалистов в области микро-аналитического контроля. Участники признали симпозиум успешным, научную программу выполненной полностью; отметили высокий уровень докладов; выразили благодарность оргкомитету, Кубанскому университету и ОК “Орбита” за организацию и проведение симпозиума; признательность организациям, оказавшим финансовую поддержку симпозиуму, – ООО “НКЦ “ЛАБТЕСТ”, ООО “Физлабприбор”, ООО “Брукер”, компании “Merck”, ООО “СокТрейд Ко”, ООО “Метром РУС”, ООО “НПО “Спектрон”, АО “БиоХимМак СТ”, ЗАО СКБ “Хроматэк”, ООО “Энерголаб”, ООО “ЭКРОСХИМ”, компании “ГАЛАХИМ”, группе компаний “Бентонит”, ООО “АВРОРА”.

З.А. Темердашев, Г.И. Цизин

ПАМЯТИ М.С. ЧЕРНОВЬЯНЦ

DOI: 10.31857/S0044450222050115



29 ноября 2021 г. ушла из жизни Маргарита Сергеевна Черновьянц, доктор химических наук, профессор химического факультета Южного федерального университета.

М.С. Черновьянц родилась 28 августа 1938 г. в Свердловске. Почти весь профессиональный жизненный путь Маргариты Сергеевны связан с Ростовским государственным университетом, в который она поступила в 1956 г. и где через 14 лет защитила кандидатскую диссертацию, посвященную исследованию электролиза меди и никеля. Затем долгие годы научный интерес М.С. Черновьянц был связан с направленным синтезом новых аналитических органических реагентов и координационной химией цианоксимов азотсодержащих гетероциклов и их структурных аналогов. Ею совместно с аспирантами и сотрудниками было предложено аналитическое применение комплексов переноса заряда и ионных ассоциатов с металлами. Расчетными и экспериментальными методами определена структура хелатного узла и найдены закономерности изменения устойчивости хелатов, связанные с

тонкой структурой лигандов, процессами сольватации и самоассоциации. Итогом этих исследований стала защита в 1995 г. докторской диссертации “Оксимы и цианиновые красители на основе азотсодержащих гетероциклов и их применение в спектрофотометрическом анализе”.

На химическом факультете Ростовского государственного университета (с 2006 г. – Южного федерального университета) Маргарита Сергеевна прошла путь от ассистента до профессора. Разработанные ею курсы лекций по спектрофотометрическому анализу, строению и свойствам органических реагентов, анализу лекарственных средств многие годы входят в учебный план кафедры аналитической химии, которой Маргарита Сергеевна руководила с 1996 по 2016 г. Совместно с коллегами она разрабатывала и обеспечивала реализацию программы развития кафедры, определяла тематику и программы курсов и семинаров, дипломных и курсовых работ, производственных практик. Под руководством М.С. Черновьянц на кафедре начали успешно развиваться новые научные направления, связанные с исследованием органических иодогалогенидов – препаратов активного иода и гетероароматических тиамидов, антигиперлипидных лекарственных средств. Исследования проводились с применением новейших спектроскопических, масс-спектрометрических и магнитно-резонансных методов в сочетании с современными методами разделения. Было выполнено химико-фармацевтическое исследование новых лекарственных препаратов на основе производных бензимидазола, проводился анализ растительного сырья, разрабатывались методики определения биологически активных соединений. В эти годы на химическом факультете была открыта специализация “Химия окружающей среды и химическая экспертиза”. На кафедре успешно начались работы по экологической тематике, в дальнейшем исследования переросли в тесное многолетнее сотрудничество с Гидрохимическим институтом и Азовским научно-исследовательским институтом рыбного хозяйства.

Под руководством М.С. Черновьянц защищено 15 кандидатских диссертаций. Маргарита Сергеевна была членом Научного совета РАН по ана-

литической химии, членом диссертационного совета Кубанского государственного университета. В 2004 г. под ее редакцией было подготовлено учебное пособие “Систематические и случайные погрешности химического анализа”. За последние 10 лет в соавторстве с аспирантами и сотрудниками опубликованы десятки статей в высокорейтинговых журналах. Ее работы активно цитируются и служат примером для студентов, желающих заниматься наукой.

Жизненная энергия Маргариты Сергеевны, профессиональные и душевные качества, эрудиция и любовь к искусству всегда привлекали к ней. Высочайшая требовательность ее к себе и окружающим поражала и вызывала уважение. Для сотрудников и студентов химического факультета университета она запомнится жизнерадостным, добрым и отзывчивым человеком, принципиальным, но всегда готовым оказать помощь.