

СОДЕРЖАНИЕ

Том 77, номер 9, 2022

Развитие аналитической химии в Саратове (продолжение). Редактор-составитель – Т.Ю. Русанова

ОБЗОРЫ

Теоретический анализ структуры и реакционной способности как инструмент интерпретации и прогнозирования свойств аналитических реагентов и форм

А. Н. Панкратов

777

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Спектрофотометрическое определение Азорубина и Понсо 4R в лекарственных препаратах с применением мицеллярной экстракции

Н. Б. Шестопалова, Ю. А. Фомина, Р. К. Чернова

788

ОБЗОРЫ

Использование эффекта возникающей флуоресценции в химическом и биохимическом анализе

А. Ю. Оленин, В. В. Ягов

798

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Определение амитриптилина методом поляризационного флуоресцентного иммуноанализа

*Э. П. Медянцева, Э. Р. Газизуллина, Д. В. Брусницын, С. В. Федоренко,
А. Р. Мустафина, С. А. Еремин*

828

Способ корректировки результатов электронно-зондового энергодисперсионного элементного анализа порошковых материалов

Д. Э. Пухов, А. А. Лаптева

837

Сорбенты с ковалентно привитым полимерным слоем для гидрофильной хроматографии

А. С. Попов, Г. С. Максимов, О. А. Шпигун, А. В. Чернобровкина

849

Обнаружение примесей в метилметакрилате высокой степени чистоты методом хроматодистилляции в сочетании с масс-спектрометрией с фотохимической ионизацией при атмосферном давлении

И. А. Ревельский, Ю. С. Яшин, Д. А. Чепелянский, А. С. Самохин, А. И. Ревельский

861

Определение перфторорганических соединений в цельной крови и тканях органов лабораторных животных методом газожидкостной хромато-масс-спектрометрии

*И. К. Журкович, В. А. Утсаль, Е. В. Островидова, В. А. Баринов, Н. В. Луговкина,
Е. Ю. Бонитенко, Н. А. Белякова, В. В. Баринов*

864

УДК 543+54-4+539.193+541.6

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ И РЕАКЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ КАК ИНСТРУМЕНТ ИНТЕРПРЕТАЦИИ И ПРОГНОЗИРОВАНИЯ СВОЙСТВ АНАЛИТИЧЕСКИХ РЕАГЕНТОВ И ФОРМ

© 2022 г. А. Н. Панкратов*

Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского
ул. Астраханская, 83, Саратов, 410012 Россия

*e-mail: PankratovAN@info.sgu.ru

Поступила в редакцию 06.07.2021 г.

После доработки 16.08.2021 г.

Принята к публикации 17.08.2021 г.

Представлено одно из научных направлений кафедры аналитической химии и химической экологии Саратовского университета – установление связи физико-химических, аналитических и иных свойств, реакционной способности, биологической активности веществ с энергетикой, пространственным и электронным строением, дескрипторами молекул реагентов, переходных состояний, интермедиатов, нанокластеров в основном и возбужденных состояниях, обобщение воззрений на механизмы и регионаправленность реакций, изучение влияния электростатического и гидрофобного факторов, среды на различные свойства и протекание химических процессов; квантовохимическое исследование электронных эффектов атомных групп в молекулах, водородной связи; выявление природы взаимодействий между валентно несвязанными атомами в небольших и/или напряженных молекулярных системах, в малых и средних квазициклах; выяснение (на основе НВО-анализа гибридизации) вопроса о дифференциальном участии неподеленных электронных пар гетероатомов в реакциях с электрофильными агентами; прогноз возможности формирования и устойчивости ионных ассоциатов, их способности к экстракции; рассмотрение факторов стабилизации ионных ассоциатов (включая значимые для аналитической химии) и систем с открытой электронной оболочкой (в том числе аналитических реагентов); нахождение количественных соотношений структура–свойство; развитие теории строения и действия аналитических реагентов; молекулярное моделирование аналитически значимого биоспецифического белок-лигандного взаимодействия.

Ключевые слова: теория строения и действия аналитических реагентов, реакционная способность и механизмы реакций, факторы стабилизации ионных ассоциатов и радикалов, электронные эффекты и электроотрицательность атомных групп, количественные соотношения структура–свойство, молекулярное моделирование биоспецифического взаимодействия.

DOI: 10.31857/S0044450222090092

Общие замечания. На кафедре аналитической химии и химической экологии Саратовского университета под руководством автора этой статьи на протяжении ряда лет развивается направление, связывающее аналитическую химию с химией теоретической. Это направление включает следующие аспекты:

- установление связи физико-химических, аналитических и иных свойств, реакционной способности, биологической активности веществ с энергетикой, пространственным и электронным строением, дескрипторами молекул или других структурных единиц, ассоциатов, нанокластеров, реакционных интермедиатов в основном и возбужденных состояниях на основе углубле-

ния представлений об электронных эффектах, электроотрицательности атомных групп, водородной связи, выявления природы взаимодействий между валентно несвязанными атомами в небольших и/или напряженных молекулярных системах, в малых и средних квазициклах, выяснения вопроса о дифференциальном участии несвязывающих (неподеленных) электронных пар гетероатомов в реакциях с электрофильными агентами – жесткими и мягкими кислотами Льюиса, прогноза возможности формирования и устойчивости ионных ассоциатов, их способности к экстракции, рассмотрения факторов стабилизации ионных ассоциатов (в том числе значимых для аналитической химии) и молекулярных

систем с открытой электронной оболочкой, обобщения воззрений на механизмы и региональность реакций (включая окисление и восстановление, нитрозирование, нитрование, азосочетание, галогенирование, алкоксилирование, конденсации, другие электрофильные, нуклеофильные и радикальные процессы, комплексообразование, обмен лигандов, молекулярную и ионную ассоциацию, диссоциацию, таутомерию и двойственную реакционную способность, изомеризацию, перенос протона, атома водорода и “гидрид-аниона”), на региоселективность реакций гомолитического (радикального) окислительного и восстановительного сочетания (димеризации) веществ различных классов;

- изучение влияния среды на свойства и протекание химических процессов;
- нахождение количественных соотношений структура—свойство в рядах неорганических, органических, элементоорганических, координационных соединений;
- развитие теории строения и действия аналитических реагентов;
- молекулярное моделирование биоспецифического (аффинного) белок-лигандного взаимодействия;
- развитие физической химии морфообразующих белков и процессов жизнедеятельности высших грибов, квантовая химия низкомолекулярных эффекторов;
- систематизация и обобщение сведений об информационных ресурсах по естественным наукам, по экологии.

В рамках обозначенного научного направления изучаются в том числе процессы, протекающие в живых организмах.

На разных этапах исследования осуществлялись и/или проводятся различными методами, среди которых — методы квантовой химии (*ab initio*, DFT, HMDFT и др., полуэмпирические), молекулярной механики, QM/MM, молекулярной динамики, QSAR/QSPR-моделирования, молекулярного докинга; корреляционный анализ; электронная абсорбционная и флуоресцентная, рентгенофлуоресцентная, энергодисперсионная рентгеновская, ИК-, КР-, ЯМР-, ЯКР-, ЭПР-спектроскопия; мессбаэровская спектроскопия (ядерный гамма-резонанс); масс-спектрометрия, хроматография (газовая, газожидкостная, высокоэффективная жидкостная, эксклюзионная (гель-проникающая) и др.), хромато-масс-спектрометрия, денситометрия; вольтамперометрия, полярография, потенциометрия, электрофорез; вискозиметрия; измерение акустических свойств тонких пленок с помощью пьезоэлектрических резонаторов и фиттинговое моделирование; рентгенофазовый и рентгеноструктурный анализ; сканирующая и просвечивающая (трансмиссионная) элек-

тронная микроскопия; метод динамического рассеяния света (динамическое светорассеяние, фотонная корреляционная спектроскопия) с использованием технологии NIBS (неинвазивного обратного рассеяния), метод электрофоретического рассеяния света с применением технологии M3-PALS; рассмотрение кинетики реакций; препаративный синтез; экстракция; сорбция и др.

В соответствии со спецификой конкретных задач применяются квантовохимические методы различной иерархии и разного уровня теории, от полуэмпирических до модернизированных *ab initio*, DFT, HMDFT и др., а также современные подходы и методики, включая NBO-анализ, исключение энергетических вкладов, QTAIM, исследование орбитального взаимодействия, электростатического потенциала, расчет колебательных, электронных абсорбционных, ЯМР-спектров, масштабирование колебательных частот, разделение и анализ нормальных колебаний, учет ZPVE-, термических и BSSE-поправок, построение профилей поверхностей потенциальной энергии химических реакций, локализация переходных состояний, IRC, SCRF и т.д.

Столь широкий охват тем и подходов кажется автору оправданным. “Природа не знает о нашем делении на науки. Она едина. А это означает, что истинное познание ее законов требует коллективных усилий многих наук, иначе мы будем видеть только одну сторону явления и ничего не знать о других. Вот почему самые интересные открытия часто рождаются именно на стыках наук” [1].

Низкий поклон учителям — профессору Светлане Петровне Муштаковой и члену-корреспонденту РАН Льву Александровичу Грибову.

Основные результаты. Главная задача теоретической химии — предсказать течение химического процесса во времени и его конечный результат на основе сведений об энергии, строении и свойствах реагентов, интермедиатов, продуктов с учетом влияния среды (растворителя). На первый план сегодня выдвигаются задачи направленного конструирования (молекулярного дизайна) веществ и материалов с заданными характеристиками.

Перечислим здесь лишь основные научные результаты, полученные автором лично, а также совместно с учениками и коллегами.

Аналитические редокс-реагенты. Обоснованы механизмы химического и электрохимического окисления ароматических и гетероциклических аминсоединений, многие из которых являются аналитическими редокс-реагентами. Реакции окисления дифениламина (C_6H_5)₂NH и его производных, трифениламина (C_6H_5)₃N, карбазола, акридола, феноксазина, фенотиазина и его замещенных в кислых, нейтральных, щелочных вод-

ных, кислых водно-органических средах разными окислителями включают бимолекулярную лимитирующую стадию, образование катион-радикалов или аминильных радикалов, способных к димеризации; процесс носит одно- или двухэлектронный характер. Константа скорости второго порядка зависит от кислотности среды, что связано с участием окислителей и/или субстратов в протолитических равновесиях ([2–5] и др.).

Аналитический редокс-реагент 4-амино-4'-метоксибензиламин (вариаминовый синий, вариаминовый голубой) $4'-\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4\text{NHC}_6\text{H}_4\text{NH}_2$ окисляется в умеренно кислых водных и водно-органических растворах в две одноэлектронные стадии до мономерного иминохиноидного катиона; в случае электроокисления на вращающемся дисковом электроде из стеклографита вторая стадия — скоростьопределяющая. Как показано для водно-диметилформамидных растворов, повышение pH от 2.45 до 4.52 сопровождается сменой лимитирующей стадии [4].

Процесс одноэлектронного электроокисления карбазола на вращающемся дисковом электроде из стеклографита в сернокислых водно-этанольных растворах в целом подчиняется смешанному (диффузионному и стадии переноса электрона) контролю. Происходит пассивация электрода вследствие осаждения на его поверхности димера, олигомера или полимера карбазола [3]. Покажем в этой связи вольт-амперные кривые редко встречающегося типа (рис. 1).

Выяснена общность механизма окисления различных аминсоединений, которая обусловлена близким положением соответствующих азотсодержащих группировок в рядах изменения электронных эффектов, электроотрицательности заместителей, сходным характером распределения спиновой плотности в катион-радикалах и аминильных радикалах.

Развит подход к прогнозу селективности и молекулярному дизайну аналитических редокс-реагентов [6, 7].

Региоселективность реакций гомолитического сочетания. Сформулированы закономерности, регулирующие реакционную способность и региональность гомолитического (радикального) окислительного и восстановительного сочетания (димеризации) органических веществ. Показано, что региоселективность реакций гомолитического сочетания регулируется в основном распределением спиновой плотности в радикальных интермедиатах [2].

Симбатность направлений электрофильных или нуклеофильных процессов и реакций окислительного либо восстановительного сочетания тиомочевин $(\text{H}_2\text{N})_2\text{C}=\text{S} \rightleftharpoons \text{HN}=\text{C}(\text{NH}_2)\text{SH}$, N-фенилтиомочевин, многих соединений $\text{C}_6\text{H}_5\text{X}$, нафталина, антрацена, фенантрена, карбазола,

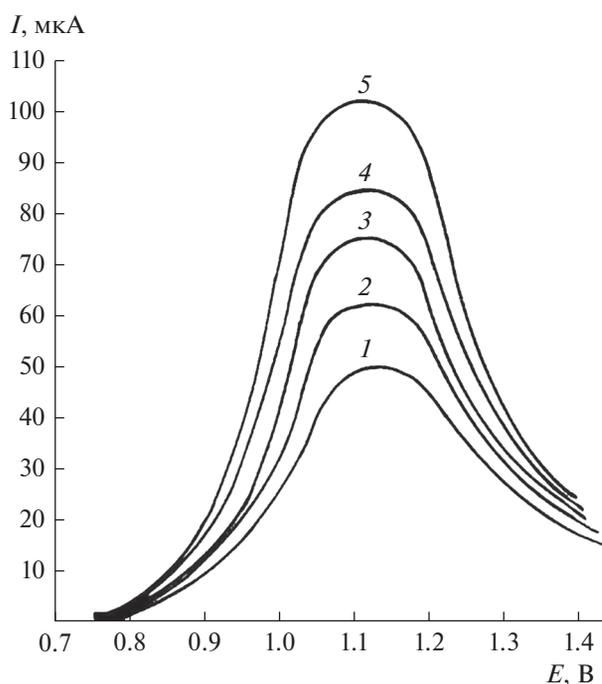


Рис. 1. Кривые анодного окисления 1 мМ раствора карбазола на вращающемся дисковом электроде из стеклографита в смеси 5.25 М H_2SO_4 –этанол (1 : 1, по объему) на фоне 0.3 М LiCl при различных значениях угловой скорости вращения электрода ω (рад/с): 1 – 87.2, 2 – 117.3, 3 – 167.6, 4 – 209.4, 5 – 303.7. Обозначения: I – сила анодного тока, E – потенциал относительно насыщенного хлоридсеребряного электрода.

акридана, акридона, 5,10-дигидрофеназина, фенотиазина, фенотиазина, акридина, катионов N-метилпиридиния, пирилия, тиопирилия закладывается на уровне качественного сходства распределения электронной плотности в молекулах субстратов и спиновой плотности в радикальных интермедиатах [2].

Аналитические характеристики реакций азосочетания. Обратимся теперь к примерам гетеролитических реакций. Тандем реакций диазотирования и азосочетания широко используется в производстве красителей, а также в аналитической химии. Нами созданы научные основы прогноза аналитических характеристик реакций азосочетания. Выяснено, в частности, что региоселективность реакций однозначно определяется термодинамикой интермедиатов — σ -комплексов, а также влиянием водной среды. Последняя обуславливает высокую позиционную селективность, обеспечивая выбор одного из двух возможных реакционных каналов, предсказанных на основе квантовохимических расчетов изолированных молекулярных систем. Кроме того, водная среда осуществляет селекцию аналитических форм — протонированных по β -атому азота азогруппы продуктов азосочетания, имеющих хинонгидазонное строение (пример — на схемах 1 и 2) [8, 9].

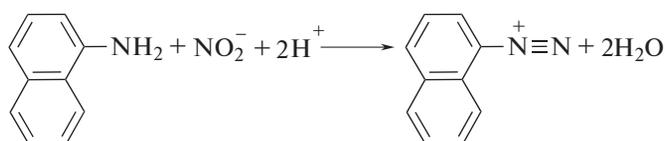


Схема 1. Диазотирование 1-аминонафталина.

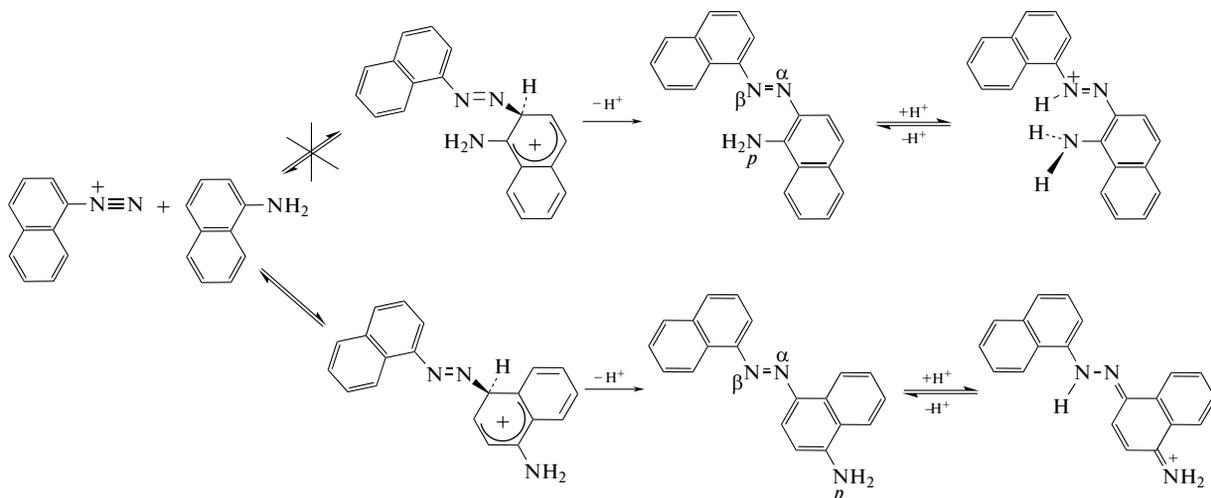


Схема 2. Азосочетание: возможные направления взаимодействия 1-аминонафталина с катионом нафталин-1-дiazония; региоселективность протонирования аминоазонафталинов.

Установлены закономерности, открывающие возможность предсказывать реакционную способность, выход аналитических форм реакций азосочетания с различными азо- и диазосоставляющими и, в конечном итоге, сравнительные аналитические характеристики реакций [8, 9].

Предложена вероятная схема реакции азосочетания 4-дiazонийбензолсульфоната с 1-аминонафталином (1-нафтиламин). Первоначально возникает π -комплекс I, предшествующий двум

изомерным σ -комплексам II, III, которые трансформируются в *син*- и *анти*-азосоединения, каждое из которых при протонировании переходит в регистрируемый конечный продукт IV (аналитическую форму), представляющий собой сопряженную кислоту аминоазосоединения, имеющую хинонгидразонное строение (схема 3). *Син*- σ -комплекс II стабилизирован внутримолекулярной водородной связью N—H \cdots O.

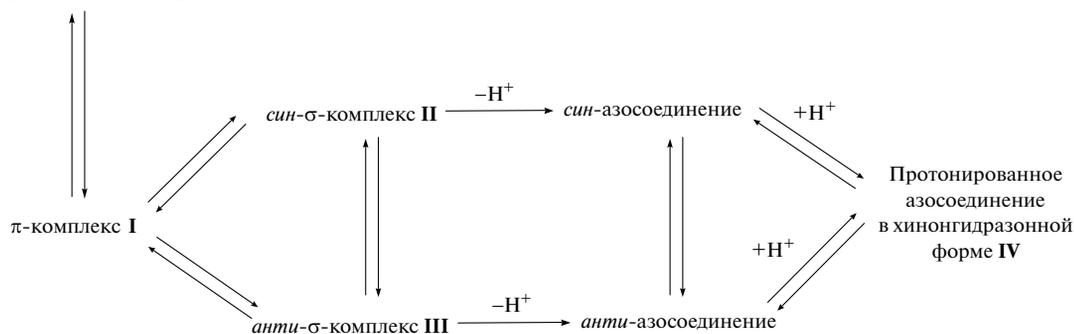


Схема 3. Азосочетание 4-дiazонийбензолсульфоната с 1-нафтиламином.

Теоретическое моделирование комплексообразования и других реакций. Многие положения аналитической химии основываются на ионных равновесиях в растворах. Изучено поведение тетрахлоропалладата(II) калия $\text{K}_2[\text{PdCl}_4]$ в средах,

моделирующих биологические жидкости. Показано, что в водных растворах хлорида натрия скорость акватации выше, чем скорость вхождения лиганда Cl^- во внутреннюю координационную сферу атома палладия. В растворах хлороводород-

ной кислоты, напротив, доминирует процесс образования хлорокомплексов палладия. Вероятно, последнее обусловлено протонированием молекулы воды в составе аквакомплексов. Квантово-химически исследованы внутримолекулярная водородная связь, реакции замещения лигандов — молекулы воды и катиона гидроксония — в планарных комплексах палладия(II) на хлорид-анион. По первым трем ступеням замещение катиона гидроксония во внутренней сфере атома палладия термодинамически благоприятнее по сравнению с вытеснением из координационной сферы молекулы воды. Установлено, что логарифмы ступенчатых констант устойчивости хлоридных комплексов палладия(II) линейно коррелируют с энтальпией реакций замещения молекул воды на хлорид-ион [10].

Объяснена стереонаправленность комплексообразования палладия(II) с хлорид-анионом и пирролин-2-олом (L) — таутомером 2-пирролидона. Термодинамически менее стабильный биологически активный *цис*-изомер комплекса [PdCl₂L₂] образуется вследствие того, что ему структурно предшествует энергетически наиболее предпочтительный тетрагонально-пирамидальный интермедиат ассоциативного нуклеофильного замещения. На надмолекулярном уровне *цис*-продукт

стабилизируется межмолекулярной диполь-дипольной ассоциацией в кристалле [11].

Разработана методология квантовохимического исследования переноса “гидрид-иона”, основанная на анализе соответствия последовательности изменения энергии (потенциала) ионизации, энтальпии и свободной энергии сродства к гидрид-иону, атому водорода и протону молекул субстратов, а также производных от них катионов, катион-радикалов, радикалов, анионов, экспериментально обоснованным рядом “гидридной” подвижности [12].

Выяснена химическая сущность реакции между 1,5-дифенилселенопентандионом-1,5 C₆H₅COCH₂SeCH₂COC₆H₅ и L-цистеином H₂NCH(CH₂SH)COOH ⇌ H₃N⁺CH(CH₂SH)COO⁻ с образованием ацетофенона C₆H₅COCH₃, элементного селена и L-цистина HOOCCH(NH₂)-CH₂SSCH₂CH(NH₂)COOH.

Водородная связь, протонный перенос, таутомерия. Изучен двойной протонный перенос (по типу бифункционального катализа) для водородосвязанного комплекса 8-меркаптохинолина с одной молекулой воды в газовой фазе и в растворе (схема 4):

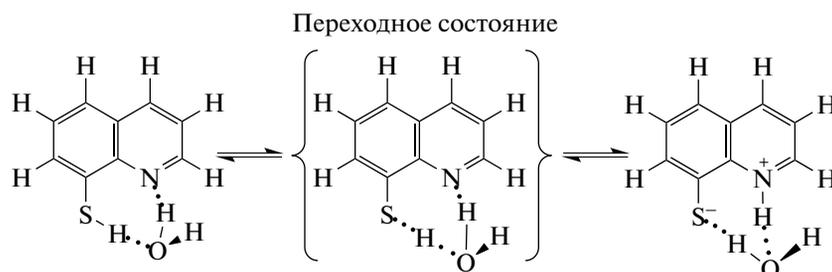


Схема 4. Перенос протона в молекуле 8-меркаптохинолина с участием воды.

Превращение с участием воды кинетически менее, а термодинамически более предпочтительно по сравнению с переносом одного протона без содействия молекулы воды [13].

Налицо принципиальное различие в степени влияния электростатических эффектов растворителя на относительную устойчивость различных форм 8-гидроксихинолина [14] и 8-меркаптохинолина [13]. Для первого из названных аналитических реагентов определяющим является вклад в устойчивость, внутренне присущий самим протонным структурам. Напротив, в случае 8-меркаптохинолина полярная среда играет решающую роль в определении относительной стабильности различных форм.

Известно, что специфическое взаимодействие с растворителем в основном может быть учтено, если моделировать в явном виде комплекс изуча-

емой молекулы с одной молекулой растворителя. Рассмотрение переноса протона с содействием воды и помещение комплекса 8-меркаптохинолина с молекулой воды в диэлектрический континуум растворителя позволяют одновременно учесть влияние специфической и универсальной сольватации на реакционную способность в рамках дискретно-континуального подхода. Результаты изучения реакции с участием воды показывают возможность эстафетной передачи протона, как это происходит в воде с ее сложной структурой, выраженными элементами структурной упорядоченности в жидком состоянии.

Внутримолекулярный перенос протона в мономере 2-пирролидона имеет барьер ~50 ккал/моль и практически не зависит от растворителя. Двойной протонный перенос в водородосвязанных димерах происходит concertно и синхронно с

низким барьером. Таким образом, прототропная таутомеризация 2-пирролидон–пирролин-2-ол протекает по межмолекулярному механизму [15].

Статья [16], посвященная конформационному анализу, рассмотрению электронной структуры, топологии распределения электронной плотности, внутримолекулярной водородной связи, таутомерии, спектров ЯМР на ядрах ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O и реакционной способности окисляющих и хелатообразующих аналитических реагентов 2-нитрозофенола и *орто*-нитрозоафтаолов, в том числе с учетом влияния среды, признана одной из вызвавших наибольший интерес читателей (most-accessed articles) в 2007 г.

Изучено (*ab initio* и DFT) влияние внутримолекулярной водородной связи (ВВС) на электронное строение молекул с плоским квазициклом. Установлено, что ВВС приводит к локальному электронному перераспределению в квазицикле по сравнению с конформером без ВВС и соответствующим *пара*-изомером (в случае замещенных бензолов) [13, 14, 16, 17]. По-видимому, ВВС не влияет на механизм хелатообразования органических соединений (в том числе аналитических реагентов) с ионами металлов. Однако разрыв ее [17, 18] включается в энергетический эффект реакции, что важно для целевого конструирования аналитических реагентов [17].

Квантовохимически исследованы колебательные спектры салицилового альдегида 2-НОС₆Н₄СН=О, салициловой кислоты 2-НОС₆Н₄СООН, 1-нитрозо-2-нафтаола, 2-нитрофенола 2-О₂NC₆Н₄ОН, пирокатехина 1,2-С₆Н₄(ОН)₂, гваякола 2-СН₃ОС₆Н₄ОН, 8-гидроксихинолина, трополона. Наиболее сильные сдвиги частот при образовании ВВС испытывают три колебания, связанные с движением гидроксильного протона: валентное $q(\text{OH})$ (частота уменьшается), плоское угловое $\beta(\text{OH})$ (частота незначительно повышается), неплоское движение связи ОН типа кручения $\rho(\text{OH})$ (частота возрастает). Следует ожидать влияния ВВС на реакционную способность изученных соединений именно в реакциях с участием ОН-группы, что подтверждается, в частности, зависимостью кислотно-основных свойств от ВВС. Небольшие ($\sim 40 \text{ см}^{-1}$) и, как правило, низкочастотные сдвиги наблюдаются у колебаний, локализованных на протоноакцепторной группировке. Для большинства колебаний ароматического цикла частоты повышаются ($\Delta\nu \leq 10\text{--}15 \text{ см}^{-1}$). Отмеченные особенности имеют место для всего изученного ряда. Понижение частоты валентного колебания $q(\text{OH})$ и повышение частоты неплоского колебания $\rho(\text{OH})$ коррелируют с величиной энтальпии водородной связи (ΔH). Например, для 2-нитрофенола $\Delta H = -10.3 \text{ ккал/моль}$, $\Delta\nu(q(\text{OH})) = -341 \text{ см}^{-1}$, $\Delta\nu(\rho(\text{OH})) = +361 \text{ см}^{-1}$; а для гваякола $\Delta H = -4.43 \text{ ккал/моль}$, $\Delta\nu(q(\text{OH})) = -55 \text{ см}^{-1}$,

$\Delta\nu(\rho(\text{OH})) = +203 \text{ см}^{-1}$. В области проявления валентных колебаний ОН экспериментальных ИК-спектров пирокатехина и гваякола имеются две полосы, отстоящие друг от друга на величину $\sim 50 \text{ см}^{-1}$. Этот сдвиг хорошо согласуется с величинами, полученными из квантовохимических расчетов: $\Delta\nu = -41 \text{ см}^{-1}$ (пирокатехин), -49 см^{-1} (гваякол), и свидетельствует о наличии в газовой фазе одновременно двух ротамеров названных веществ. В спектре пирокатехина (конформера с ВВС) имеется полоса валентного колебания $q(\text{OH})$ второй (свободной) ОН-группы, причем $\Delta\nu = +56 \text{ см}^{-1}$ по сравнению с полосой ассоциированной гидроксильной группы. Для 2-нитрофенола и всех других исследованных соединений с $\Delta H < -5 \text{ ккал/моль}$ в газофазных ИК-спектрах наблюдается только одна интенсивная полоса, отвечающая конформеру с ВВС.

Факторы стабилизации ионных ассоциатов. Методом рентгеноструктурного анализа установлена молекулярная и кристаллическая структура ионного ассоциата катиона 2-аминобензимидазолия, моносольтватированного диметилсульфоксидом $(\text{CH}_3)_2\text{S} \rightarrow \text{O}$, с амбидентным анионом (V) кето-енольной триады 3,3'-(фенилметил)бис-4-гидрокси-2*H*-хромен-2-она (Ph = C₆H₅) (схема 5), возникающего в результате конкурентной кротонной конденсации в реакционной *one-pot* системе 4-гидрокси-2*H*-хромен-2-он–2-аминобензимидазол–бензальдегид C₆H₅СН=О наряду с региоизомерными дигидрохроменопиримидобензимидазолонами, формирующимися по механизму реакции Биджинелли. На примере названной молекулярной системы развита методология рассмотрения факторов стабилизации ионных ассоциатов (включая значимые для аналитической химии), связанных с катионной и анионной частями, аттрактивным взаимодействием катиона с анионом, с эффектами стабилизации ионной пары в целом и ее составных частей кристаллическим полем и сольватацией. Показана необратимость образования 3-[2,4-диоксо-(3*H*-хромен-3-ил)(фенил)метил]-2-оксо-2*H*-хромен-4-олат-аниона в *one-pot* реакции [19].

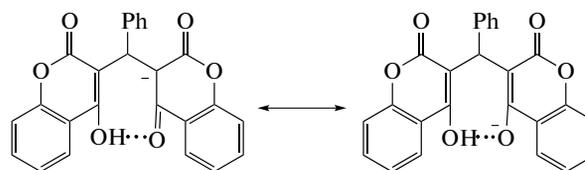


Схема 5. Резонансные структуры, отражающие делокализацию отрицательного заряда в анионе V (Ph = C₆H₅).

Стабилизация систем с открытой электронной оболочкой. На уровне теории UB3LYP/6-311++G(3df,3pd) с привлечением NBO-анализа обоснованы факторы стабилизации свободного

радикала 1,1-дифенил-2-пикрилгидразила (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил, N,N-дифенил-N'-пикрилгидразил, ДФПГ, DPPH) $(C_6H_5)_2N-N^{\cdot}-C_6H_2(NO_2)_3-2,4,6$ – мягкого дегидрирующего средства, ингибитора гомолитических реакций, аналитического реагента, стандарта в спектроскопии ЭПР: делокализация электронной и спиновой плотности, отрицательный заряд на радикальном и аминном N-центрах, стерическое экранирование радикального и аминного атомов азота. Рассмотрение данных литературы позволило выявить такие факторы, как ассоциация в монокристаллах в антиферромагнитные димеры без спаривания спинов электронов и образования новой связи N–N и сольватация. Выявленные нами факторы стабилизации радикала ДФПГ могут быть положены в основу методологии дизайна стабильных свободных радикалов и ион-радикалов различного строения.

Количественные соотношения структура–свойство. Доказано существование молекул $(C_6H_5)_3AsCl_2$, $(C_6H_5)_3Sb(OH)Cl$, $(C_6H_5)_3SbCl_2$, $(C_6H_5)_3Bi(ONO_2)_2$, $(C_6H_5)_3BiCl_2$ соединений пентакоординированных мышьяка, сурьмы и висмута в растворах в форме тригональной бипирамиды с аксиальными неорганическими лигандами (см. например, [20]).

Установлены количественные соотношения (сотни зависимостей для сотен молекулярных систем), имеющие четко выраженный физический смысл и дающие возможность *a priori* оценивать теплоту и свободную энергию образования, энтропию, значения энергии (потенциала) ионизации, сродства к электрону, потенциала химического и электрохимического окисления и восстановления, величины pK_a , константы устойчивости, значения дипольного момента, частоты колебательных спектров, электроотрицательность, индуктивные и мезомерные параметры атомных групп и другие свойства неорганических, органических, элементоорганических, координационных соединений, выход продуктов и скорость реакций электрофильного и нуклеофильного ароматического замещения, скорость ферментативного окисления аминов и фенольных субстратов, переноса ионов поверхностью-активных веществ через нанопольтрационные мембраны (молекулярные сита) ([6, 7, 10, 20–24] и др.).

Развита методология простой теоретической оценки теплоты образования химических соединений в конденсированном состоянии [24].

Электроотрицательность и другие эффекты заместителей в молекулах. Взаимосвязанные концепции жесткости (мягкости) и электроотрицательности приобретают все большее значение в химии для реализации единого подхода к двум важнейшим химическим проблемам – конструированию барьеров реакций и молекулярному ди-

зайну, для объяснения региоселективности и амбивалентности (нуклеофильно-электрофильной дихотомии) ([25–27] и др.), для описания и моделирования химической связи, свойств молекул и кристаллов, межмолекулярного взаимодействия [28], сольватации, экстракции [29, 30].

Концепция электроотрицательности (в том числе в связи с принципом жестких и мягких кислот и оснований), особенно в варианте переменной орбитальной электроотрицательности, охватывается по существу именно тем языком химии, благодаря которому она легко встраивается в общую теорию систем. Действительно, отчетливая периодичность электроотрицательности и подчеркнутая ею контрастность свойств (электроположительные и электроотрицательные элементы, жесткие и мягкие кислоты и основания) лежат в основе природы химического взаимодействия и появления новых качеств в результате выравнивания электроотрицательности (или электронного химического потенциала), погашения противоположностей в ходе кислотно-основных реакций и т.п. [28].

Аналитические свойства органических реагентов зависят от электронной структуры их молекул, электроотрицательности атомных групп. Не всегда роль последнего фактора прослеживается в явном виде. Существуют, однако, и количественные соотношения подобного рода. Например, экстракционная способность коррелирует с электроотрицательностью заместителей в молекулах экстрагентов [29].

Многосторонне, в том числе с позиций жесткости (мягкости) (связанной с электроотрицательностью) трактуются реакции комплексообразования, экстракционная и сорбционная аналитическая химия комплексов ионов металлов с макроциклическими лигандами [31].

Для решения разнообразных химических задач построены различные эмпирические и теоретические шкалы электроотрицательности. Нами установлены 90 прогностических линейных корреляций, связывающих электроотрицательность, индуктивный параметр *юта* и мезомерный дипольный момент атомных групп (величины, имеющие ясный физический смысл, в отличие от констант заместителей, базирующихся на принципе линейности свободных энергий) с индексамми электронной структуры молекул [21].

Выяснены дальность и специфика действия эффекта электроотрицательности атомных групп в насыщенных системах. Дальность не превышает трех атомов углерода и не связана прямо с общей электроноакцепторной способностью заместителя. Считается и пишется в учебниках, что под влиянием названного эффекта происходит альтернирование (чередование) знака заряда углеродных атомов алифатической цепи. На самом

деле имеет место альтернирование знака изменений натурального заряда [32].

Для многих органических соединений химические сдвиги в спектрах ЯМР ^{13}C линейно коррелируют с натуральным зарядом на атомах углерода. α - и β -Эффекты в спектроскопии ЯМР ^1H широко распространены, но не являются универсальными, так как не во всех случаях введение заместителя приводит к уменьшению электронной плотности на атоме α -C и к увеличению ее на атоме β -C [32].

Показано, что заместители в молекулах влияют на реакционную способность мостиковых дифенилов в электрофильных реакциях (протонирование, ацилирование), на скорость окисления диариламинов в основном посредством эффекта поля независимо от природы мостиковых групп (CH_2 , $\text{CH}=\text{CH}$, NH , O , S).

Молекулярное моделирование белок–лигандно-го взаимодействия. Биоспецифическое (аффинное) взаимодействие (фермент–субстрат или ингибитор, антиген–антитело, рецептор–лиганд (например, гормон), белок–белок, белок (в наибольшей степени лектин)–углевод, белок–липид, белок–нуклеотид, нуклеотид–нуклеотид и др.) играет важнейшую роль в живой природе, лежит в основе современных методов и подходов аналитической химии (иммунохимические методы анализа, аффинная хроматография и т.п.), в которых достигается специфичность как предельное выражение селективности. Молекулярное распознавание специфическими мишенями занимает центральное положение в процессе адресной доставки лекарств.

Методом QM/MM нами осуществлено моделирование взаимодействия лектина арахиса с семью углеводами, молекулы которых включают звенья D-галактозы (рис. 2) и D-глюкозы. При этом квантовохимической подсистемой служили аминокислотные фрагменты сайта связывания и молекула углевода. В качестве критерия углеводной специфичности предложена величина энергии образования комплекса (конъюгата) лектин–углевод из его составных частей. Дано теоретическое обоснование наибольшей специфичности лектина арахиса по отношению к β -аномерным галактобиозам, а также большей специфичности к производным галактозы по сравнению с производными глюкозы [33].

Проведен QTAIM-анализ взаимодействия между гидроксильными группами углевода и полярными (амидными, карбоксильными, гидроксильными) группами белка. Установлено, что это взаимодействие удовлетворяет критериям водородного связывания. Анализ топологических свойств электронной плотности указывает на доминирующую роль остатков L-аспарагиновой $\text{H}_2\text{NCH}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{COOH} \rightleftharpoons$

$\rightleftharpoons \text{H}_3\text{N}^+\text{CH}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{COO}^-$ и L-глутаминовой $\text{H}_2\text{NCH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{COOH} \rightleftharpoons \rightleftharpoons \text{H}_3\text{N}^+\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{COO}^-$ кислот в белок-углеводном связывании. Результаты молекулярного моделирования коррелируют с данными экспериментов по углеводной специфичности, а также вкладу в нее природы аномеров углеводов и звеньев L-глутаминовой кислоты. Последнее подтверждает предсказательную силу метода QM/MM в целом, энергии образования конъюгата белок–углевод как критерия углеводной специфичности, а также электронной плотности в критической точке связи и лапласиана этой величины в отношении установления ключевых для проявления лектиновой активности аминокислотных остатков [33].

Результаты проведенных исследований и обобщения (включая классификационные) находят отражение в учебных пособиях и монографиях в пограничном поле различных областей науки и знаний ([34–37] и др.). Такие издания призваны “наводить мосты” между разными сторонами постижения действительности, способствуют формированию единой картины мира, пониманию сущности явлений и процессов в их единстве и многообразии.

* * *

В ходе наших исследований, наряду с другими научными результатами, разработана методология решения ряда прогностических, структурных, динамических и интерпретационных задач химии: априорного предсказания разнообразных характеристик веществ, молекул и атомных групп; простой теоретической оценки теплоты образования химических соединений в конденсированном состоянии; выяснения дальности и специфики действия эффекта электроотрицательности заместителей в молекулах; выявления природы взаимодействий между валентно несвязанными атомами в молекулярных системах некоторых типов; обсуждения участия несвязывающих (неподеленных) электронных пар гетероатомов в реакциях с электрофильными агентами; количественного предсказания абсорбционных максимумов в электронных спектрах ненасыщенных соединений; прогноза селективности и молекулярного дизайна аналитических редокс-реактивов; обоснования региоселективности реакций гомолитического окислительного и восстановительного сочетания соединений различных классов (в том числе еще в 1980-е годы – вытекающей из химической неэквивалентности ароматических колец замещенных соединений ряда дифениламина); изучения влияния энергетики, геометрии, электронной структуры, дескрипторов молекул реактантов, переходных состояний, интермедиатов, продуктов, водородной

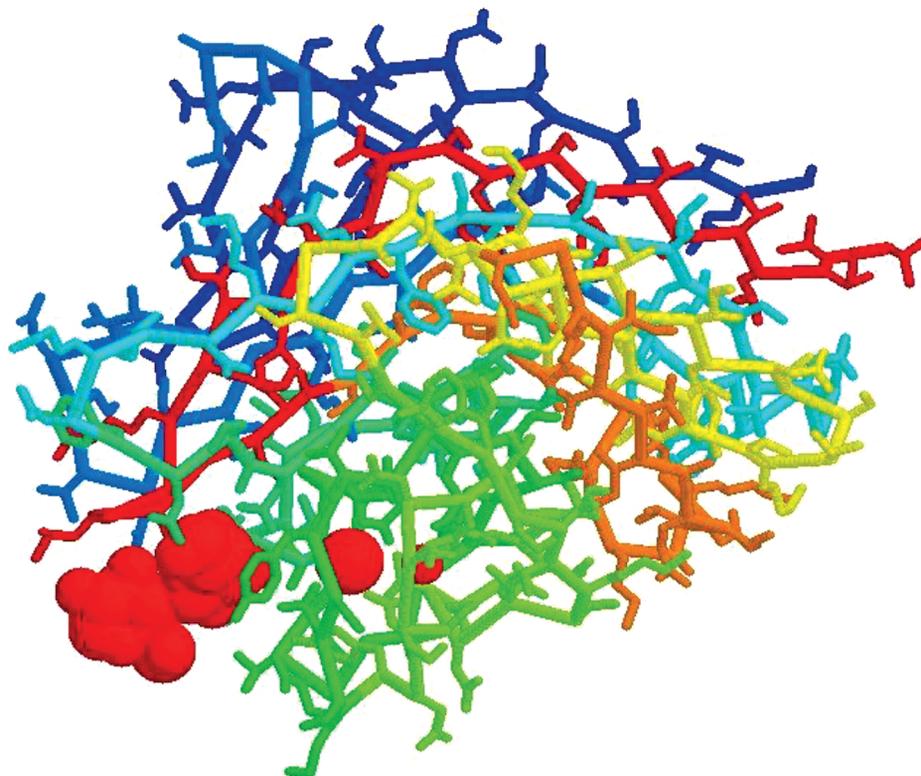


Рис. 2. Макромолекула лектина арахиса в комплексе с β -1,4-D-галактобиозой (одна четвертая элементарной ячейки кристалла). В нижней левой части рисунка скопление красных шаров соответствует молекуле β -1,4-D-галактобиозы. В нижней части рисунка крупные красные шары обозначают: слева – ион кальция, справа – ион марганца(II). Не показаны атомы водорода. Цвет полипептидной цепи постепенно меняется с красного на синий (красный C-конец, синий N-конец).

связи, электростатического, гидрофобного факторов, гидратации, сольватации на реакционную способность химических соединений, механизмы, регионаправленность и аналитические параметры реакций; обсуждения участия тех или иных несвязывающих (неподеленных) электронных пар гетероатомов в реакциях с электрофильными агентами; оценки дифференциального влияния растворителей на кислотно-основные свойства; прогноза возможности формирования и устойчивости ионных ассоциатов, их способности к экстракции; рассмотрения факторов стабилизации ионных ассоциатов и систем с открытой электронной оболочкой; установления структуры соединений пентакоординированных мышьяка, сурьмы и висмута в растворах; квантовохимического исследования переноса “гидрид-иона”; аналитического определения дисульфидов в препаратах соединений с тиольной функцией (спектроскопия КР, ЯМР ^1H , высокоэффективная жидкостная хроматография); молекулярного моделирования (QM/MM, QTAIM) биоспецифического (аффинного) взаимодействия (на примере систем лектин–углевод) и др. Прогноз свойств молекул и веществ может служить основанием для решения о целесообразности синтеза тех или

иных соединений. Получаемые научные результаты имеют значение для управления химическими процессами и аналитическими эффектами, создания новых аналитических реагентов, других практически ценных веществ и материалов. Рассмотрение тонких деталей биоспецифического (аффинного) взаимодействия делают принципиально возможными разработку высокоспецифичных способов определения различных аналитов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Семенов Н.Н. Многообещающий союз наук // Наука и жизнь. 1968. № 3. С. 3.
2. Pankratov A.N. Trends in spin density distribution in radical intermediates in connection with homolytic coupling directions of organic compounds // J. Mol. Struct.: THEOCHEM. 1994. V. 315. № 1. P. 179. [https://doi.org/10.1016/0166-1280\(94\)03779-K](https://doi.org/10.1016/0166-1280(94)03779-K)
3. Pankratov A.N., Stepanov A.N. Oxidation and homolytic coupling regioselectivity of carbazole in acidic media // Croat. Chem. Acta. 1997. V. 70. № 2. P. 585.
4. Pankratov A.N., Bilenko O.A., Mushtakova S.P. Oxidation of 4-amino-4'-methoxydiphenylamine in aqueous and organo-aqueous media // Afinidad. 2000. Т. 57. № 487. P. 201.

5. Панкратов А.Н. Структура продукта окисления дифениламина — родоначального представителя ряда аналитических редокс-реагентов // Журн. аналит. химии. 2001. Т. 56. № 2. С. 161. (Pankratov A.N. Structure of the products of the oxidation of diphenylamine, the first member in a family of analytical redox reagents // J. Anal. Chem. 2001. V. 56. № 2. P. 140.) <https://doi.org/10.1023/A:1009494602408>
6. Pankratov A.N., Shchavlev A.E. Semiempirical quantum chemical PM3 computations and evaluations of redox potentials, basicities and dipole moments of the diphenylamine series as analytical reagents // Canad. J. Chem. 1999. V. 77. № 12. P. 2053. <https://doi.org/10.1139/v99-206>
7. Панкратов А.Н., Шавлев А.Е. Протолитические, окислительно-восстановительные и полярные свойства реагентов ряда дифениламина: квантово-химическая оценка // Журн. аналит. химии. 2001. Т. 56. № 2. С. 143. (Pankratov A.N., Shchavlev A.E. Protolytic, redox, and polar properties of diphenylamine and related reagents: quantum-chemical evaluation // J. Anal. Chem. 2001. V. 56. № 2. P. 123.) <https://doi.org/10.1023/A:1009438517429>
8. Pankratov A.N. Azo-coupling reactions used in analytical chemistry: The role of reactants, intermediates, and aqueous medium // Helvetica Chim. Acta. 2004. V. 87. № 6. P. 1561. <https://doi.org/10.1002/hlca.200490143>
9. Панкратов А.Н. Аналитические реакции азосочетания: взгляд с точки зрения квантовой химии // Журн. аналит. химии. 2005. Т. 60. № 10. С. 1036. (Pankratov A.N. Analytical azo coupling reactions: A quantum-chemical consideration // J. Anal. Chem. 2005. V. 60. № 10. P. 920.) <https://doi.org/10.1007/s10809-005-0210-y>
10. Панкратов А.Н., Бородулин В.Б., Чаплыгина О.А. Обмен лигандов в системах Pd(II)—NaCl—H₂O и Pd(II)—HCl—H₂O: квантово-химическое рассмотрение // Коорд. химия. 2005. Т. 31. № 9. С. 696. (Pankratov A.N., Borodulin V.B., Chaplygina O.A. Ligand exchange in Pd(II)—NaCl—H₂O и Pd(II)—HCl—H₂O systems: Quantum-chemical consideration // Russ. J. Coord. Chem. 2005. V. 31. № 9. P. 660.) <https://doi.org/10.1007/s11173-005-0152-9>
11. Панкратов А.Н., Бородулин В.Б., Чаплыгина О.А. Таутомерия и региоселективность протонирования 2-пирролидона. Стереонаправленность комплексообразования палладия(II) с хлорид-ионом и 2-пирролидоном // Коорд. химия. 2005. Т. 31. № 7. С. 523. (Pankratov A.N., Borodulin V.B., Chaplygina O.A. Tautomerism and regioselectivity of the protonation of 2-pyrrolidone. Stereoselectivity of complexation between palladium(II), chloride ion, and 2-pyrrolidone // Russ. J. Coord. Chem. 2005. V. 31. № 7. P. 494.) <https://doi.org/10.1007/s11173-005-0125-z>
12. Панкратов А.Н., Древки Б.И. Квантово-химическое изучение “гидридной” подвижности в молекулах халькогенопиранов // Химия гетероцикл. соедин. 2005. № 9. С. 1305. (Pankratov A.N., Drevko B.I. Quantum-chemical study of “hydride” mobility in the molecules of chalcogenopyrans // Chem. Heterocycl. Compd. 2005. V. 41. № 9. P. 1105.) <https://doi.org/10.1007/s10593-005-0287-0>
13. Shchavlev A.E., Pankratov A.N., Shalabay A.V. Theoretical studies on the intramolecular hydrogen bond and tautomerism of 8-mercaptoquinoline in the gaseous phase and in solution using modern DFT methods // J. Phys. Chem. A. 2005. V. 109. № 18. P. 4137. <https://doi.org/10.1021/jp050838e>
14. Shchavlev A.E., Pankratov A.N., Shalabay A.V. DFT computational studies on rotation barriers, tautomerism, intramolecular hydrogen bond, and solvent effects in 8-hydroxyquinoline // Int. J. Quantum Chem. 2006. V. 106. № 4. P. 876. <https://doi.org/10.1002/qua.20759>
15. Shchavlev A.E., Pankratov A.N., Borodulin V.B., Chaplygina O.A. DFT Study of the monomers and dimers of 2-pyrrolidone: Equilibrium structures, vibrational, orbital, topological, and NBO analysis of hydrogen-bonded interactions // J. Phys. Chem. A. 2005. V. 109. № 48. P. 10982. <https://doi.org/10.1021/jp053753m>
16. Shchavlev A.E., Pankratov A.N., Enchev V. Intramolecular hydrogen-bonding interactions in 2-nitrosophenol and nitrosophenols: *Ab initio*, density functional, and nuclear magnetic resonance theoretical study // J. Phys. Chem. A. 2007. V. 111. № 30. P. 7112. <https://doi.org/10.1021/jp068540r>
17. Панкратов А.Н., Шалабай А.В. Влияние внутримолекулярной водородной связи на электронное строение органических молекул с планарным квазициклом // Журн. структ. химии. 2007. Т. 48. № 3. С. 472. (Pankratov A.N., Shalabay A.V. Effect of the intramolecular hydrogen bond on the electronic structure of organic molecules with a planar quasicycle // J. Struct. Chem. 2007. V. 48. № 3. P. 427.) <https://doi.org/10.1007/s10947-007-0064-2>
18. Fedorov E.E., Makarov O.E., Pankratov A.N., Grinev V.S. Gas-liquid chromatography-obtained differences in the dissolution enthalpy between two positional isomers in a polar stationary phase: A measure of the inter- or intramolecular hydrogen bond energy? // J. Chromatogr. A. 2012. V. 1241. P. 76. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.04.010>
19. Панкратов А.Н., Федотова О.В., Озерова А.Г., Мажукина О.А., Страшилина И.В. Структура и факторы стабилизации ионного ассоциата катиона 2-аминобензимидазолия с анионом 3,3'-(фенилметил)бис(4-гидрокси-2H-хромен-2-она), образующегося в системе 4-гидрокси-2H-хромен-2-он—2-аминобензимидазол—бензальдегид // Журн. орг. химии. 2016. Т. 52. № 9. С. 1338. (Pankratov A.N., Fedotova O.V., Ozerova A.G., Mazhukina O.A., Strashilina I.V. Structure and stabilization factors of the 2-aminobenzimidazolium—3,3'-(phenylmethylene)-bis(4-hydroxy-2H-chromen-2-one) anion associate in the system 4-hydroxy-2H-chromen-2-one—benzimidazole-2-amine—benzaldehyde // Russ. J. Org. Chem. 2016. V. 52. № 9. P. 1326.) <https://doi.org/10.1134/S107042801609013X>
20. Панкратов А.Н., Учаева И.М. Термодинамические свойства соединений висмута и конфигурация молекул (C₆H₅)₃BiX₂ (X = Cl, ONO₂) по данным квантово-химических исследований // Журн. неорг. химии. 2004. Т. 49. № 9. С. 1520. (Pankratov A.N., Uchaeva I.M. Thermodynamic properties of bismuth

- compounds and the configuration of $(C_6H_5)_3BiX_2$ ($X = Cl, ONO_2$) molecules from quantum-chemical data // Russ. J. Inorg. Chem. 2004. V. 49. № 9. P. 1403.)
21. *Pankratov A.N., Shchavlev A.E.* Group electronegativities, inductive and mesomeric parameters from semiempirical quantum chemical computations // Monatsh. Chem. 1998. V. 129. № 10. P. 1007. <https://doi.org/10.1007/PL00010111>
22. *Панкратов А.Н.* Количественные соотношения структура—свойство в ряду катионов диазония — полупродуктов синтеза аналитических форм и красителей // Журн. аналит. химии. 2005. Т. 60. № 2. С. 149. (*Pankratov A.N.* Quantitative structure—property relationships in the series of diazonium cations, intermediate products in the synthesis of analytical forms and dyes // J. Anal. Chem. 2005. V. 60. № 2. P. 130.) <https://doi.org/10.1007/s10809-005-0038-5>
23. *Панкратов А.Н., Шалабай А.В.* Квантовохимическая оценка протолитических свойств тиофенолов // Журн. структ. химии. 2004. Т. 45. № 5. С. 800. (*Pankratov A.N., Shalabai A.V.* Quantum-chemical evaluation of the protolytic properties of thiophenols // J. Struct. Chem. 2004. V. 45. № 5. P. 756.) <https://doi.org/10.1007/s10947-005-0055-0>
24. *Панкратов А.Н.* Методология простой квантовохимической оценки твердофазных теплот образования при постоянстве межмолекулярных взаимодействий в рядах соединений (на примере хинонов) // Журн. структ. химии. 2007. Т. 48. № 3. С. 478. (*Pankratov A.N.* Methodology of simple quantum chemical estimation of solid-phase heats of formation with constant intermolecular interactions over the series of compounds (by the example of quinones) // J. Struct. Chem. 2007. V. 48. № 3. P. 433.) <https://doi.org/10.1007/s10947-007-0065-1>
25. *Воловик С.В., Дядюша Г.Г., Станинец В.И.* Региоселективность и реакционная способность свободных радикалов в процессах присоединения и ароматического замещения / Под ред. Походенко В.Д. Киев: Наукова думка, 1988. 112 с.
26. *Воловик С.В., Станинец В.И., Зефирова Н.С.* Природа эффектов амбивалентности в химической реакционной способности // Теор. эксп. химия. 1990. Т. 26. № 4. С. 413. (*Volovik S.V., Staninets V.I., Zefirova N.S.* Nature of ambivalence effects in chemical reactivity // Theor. Exp. Chem. 1990. V. 26. № 4. P. 390.) <https://doi.org/10.1007/BF00530251>
27. *Воловик С.В., Станинец В.И., Зефирова Н.С.* К интерпретации природы химических реакций в рамках теории функционала плотности // Докл. АН (Россия). 1993. Т. 330. № 3. С. 321.
28. *Урусов В.С.* Концепция орбитальной электроотрицательности и ее место в энергетической кристаллохимии // Журн. структ. химии. 1994. Т. 35. № 1. С. 111. (*Urusov V.S.* Orbital electronegativity concept and its role in energetic crystal chemistry // J. Struct. Chem. 1994. V. 35. № 1. P. 101.) <https://doi.org/10.1007/BF02578507>
29. *Розен А.М., Крупнов Б.В.* Зависимость экстракционной способности органических соединений от их строения // Успехи химии. 1996. Т. 65. № 11. С. 1052. (*Rozen A.M., Krupnov B.V.* Dependence of the extraction ability of organic compounds on their structure // Russ. Chem. Rev. 1996. V. 65. № 11. P. 973.) <https://doi.org/10.1070/RC1996v065n11ABEH000241>
30. *Бучихин Е.П., Чекмарев А.М., Бобыренко Н.А.* Параметры “жесткости” и “мягкости” катионов и их применение для расчета констант экстракции // Журн. неорг. химии. 2010. Т. 55. № 5. С. 847. (*Buchikhin E.P., Chekmarev A.M., Bobyrenko N.A.* Parameters of cation “hardness” and “softness” and application thereof for calculation of extraction constants // Russ. J. Inorg. Chem. 2010. V. 55. № 5. P. 790.) <https://doi.org/10.1134/s0036023610050219>
31. *Золотов Ю.А., Формановский А.А., Плетнев И.В., Дмитриенко С.Г., Беклемишев М.К., Исакова Н.В., Моросанова Е.И., Пасекова Н.А., Шпигун Л.К., Цингарелли Р.Д., Торочешникова И.И.* Макроциклические соединения в аналитической химии / Под ред. Золотова Ю.А., Кузьмина Н.М. М.: Наука, 1993. 320 с.
32. *Pankratov A.N.* Electronic structure and reactivity of inorganic, organic, organoelement and coordination compounds: An experience in the area of applied quantum chemistry / Quantum Chemistry Research Trends / Ed. Kaisas M.P. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2007. P. 57.
33. *Панкратов А.Н., Бычков Н.А., Цивилева О.М.* Методология QM/MM-обоснования углеводной специфичности белков (на примере лектина арахиса) // Прикл. аналит. химия. 2014. № 1 (11). С. 26.
34. *Панкратов А.Н.* Кислоты и основания в химии. Саратов: Изд-во Саратовск. ун-та, 2006. 196 с.
35. *Панкратов А.Н.* Избранные главы электрохимии органических соединений. Ионные жидкости. Саратов: Изд-во Саратовск. ун-та, 2011. 132 с.
36. *Бурмистрова Н.А., Панкратов А.Н., Муштакова С.П.* Ароматические амины: структура, реакции окисления, применение в аналитической химии. Саратов: Изд-во Саратовск. ун-та, 2016. 108 с.
37. *Панкратов А.Н., Учаева И.М.* Реакции окисления-восстановления в окружающей среде. М.: Изд-во “Перо”, 2020. 256 с.

УДК 543.054:543.422.3

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АЗОРУБИНА И ПОНСО 4R В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ С ПРИМЕНЕНИЕМ МИЦЕЛЛЯРНОЙ ЭКСТРАКЦИИ

© 2022 г. Н. Б. Шестопалова^{а, *}, Ю. А. Фомина^а, Р. К. Чернова^б

^аСаратовский государственный медицинский университет
им. В.И. Разумовского Минздрава России, фармацевтический факультет
ул. Большая Казачья, 112, Саратов, 410012 Россия

^бСаратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского, Институт химии
ул. Астраханская, 183, Саратов, 410012 Россия

*e-mail: shestopalovanb@yandex.ru

Поступила в редакцию 20.09.2021 г.

После доработки 13.11.2021 г.

Принята к публикации 15.11.2021 г.

Проведено сравнение возможностей экстракционных систем на основе полиоксиэтилированных алкилфенолов Тритона X-100 и ОП-10 для извлечения синтетических пищевых красителей Азорубина и Понсо 4R при различных режимах фазового разделения: температуре помутнения и высаливания сульфатом натрия. Изучено влияние температуры, pH, концентрации ПАВ и электролита на физико-химические характеристики мицеллярной фазы и скорость установления фазового равновесия. Предложен простой и эффективный способ проведения экстракционной процедуры при “высаливании”. Определены оптимальные условия максимального извлечения красителей ($R > 98\%$) в различных режимах: при температуре помутнения – Азорубина, при высаливании – Понсо 4R. Разработаны методики спектрофотометрического определения аналитов в сиропах и пастилках для рассасывания с предварительным мицеллярно-экстракционным концентрированием.

Ключевые слова: экстракция “в точке помутнения”, водные двухфазные системы, Тритон X-100, ОП-10, Азорубин, Понсо 4R, спектрофотометрия.

DOI: 10.31857/S0044450222080138

Современные лекарственные препараты (ЛП) представляют собой сложные терапевтические системы, содержащие наряду с действующими фармакологически активными веществами различные вспомогательные компоненты [1]. Синтетические пищевые красители (СПК) применяют для придания нужного цвета, обозначения терапевтической группы, маркировки дозы в сиропах, таблетках, капсулах, суспензиях [2]. Использование СПК в фармацевтической отрасли технологически и экономически оправдано их стабильностью при производстве и хранении, фото-, термо- и кислотоустойчивостью, низкой стоимостью [3].

Необходимость аналитического контроля содержания СПК в ЛП обусловлена высокими требованиями, предъявляемыми к безопасности не только действующих, но и вспомогательных веществ. Однако в Государственной Фармакопее РФ отсутствуют единые утвержденные методики определения СПК в лекарственных формах [4], несмотря на их возможное негативное влияние на

здоровье человека [5–8], а содержание нормировано только в различной пищевой продукции [9]. Это становится особенно важным при регулярном приеме лекарств. На фармацевтическом рынке широко представлены препараты, в составе которых часто встречаются азокрасители Желтый “солнечный закат” FCF, Азорубин, Понсо 4R, Красный очаровательный AC [10], которые могут восстанавливаться до токсичных аминов [5].

Широко доступным и аппаратурно оснащенным методом, удовлетворяющим требованиям контроля качества фармацевтической продукции, является спектрофотометрия [11]. Однако применение этого метода для анализа углеводсодержащих ЛП (сиропа, таблетки и пастилки для рассасывания) затруднено оптической непрозрачностью растворов; требуется обязательная стадия предварительного отделения целевых аналитов от матрицы сложного состава. В связи с этим разработка простых и доступных подходов к эффективному извлечению СПК из ЛП, отвечающих современным требованиям экологической

безопасности, экономической целесообразности и совместимых со спектрофотометрическим методом, является актуальной задачей.

Практический интерес представляют экстракционные системы на основе нетоксичных, малолетучих неионных поверхностно-активных веществ (**нПАВ**) как экологически безопасная альтернатива жидкостно-жидкостной экстракции органическими растворителями, соответствующая принципам “зеленой химии” [12]. В качестве экстрагентов в основном применяют полиоксипропилированные алкилфенолы (Тритон X-100, Тритон X-114) и их промышленные аналоги (ОП-7, ОП-10), водные растворы которых образуют двухфазные системы при достижении определенной температуры (температуры помутнения, $t_{\text{пом}}$) [13] или добавлении электролитов (“высаливание”) [12]. Выделяют два вида экстракции в зависимости от фактора, приводящего к разделению фаз в водных растворах указанных соединений. Если фазообразование происходит под действием температуры, то говорят об экстракции “в точке помутнения” (cloud point extraction, **CPE**) [14, 15], если только под действием неорганических солей – о водных двухфазных системах (aqueous biphasic systems, aqueous two-phase systems, **ATPS**) [16]. В последнем случае расслоение происходит при более низких температурах – 20–25°C.

Применению ПАВ-экстрагентов для извлечения СПК с последующим спектрофотометрическим определением посвящено ограниченное число работ, причем только с использованием технологии **CPE** [17–22]. Отсутствие систематических исследований не позволяет объективно оценить эффективность экстракционных систем в отношении этих аналитов, которая зависит не только от природы экстрагентов и извлекаемых соединений, но и от условий проведения экстракционной процедуры [15].

Цель настоящей работы состояла в сравнении эффективности экстракционных систем на основе Тритона X-100 и ОП-10 для извлечения Азурбина и Понсо 4R по технологиям экстракции “в точке помутнения” и “высаливания”; оптимизации проведения экстракционной процедуры при различных условиях фазового разделения; разработке простых и экономичных методик определения синтетических красителей в лекарственных препаратах экстракционно-спектрофотометрическим методом.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты и аппаратура. Использовали Азурбин (E122) (Sigma-Aldrich, США) и Понсо 4R (E124) (Sigma-Aldrich, США); неионные ПАВ: Тритон X-100 (Sigma-Aldrich, США) и ОП-10 (Реахим, Россия). Исходные растворы красите-

лей (0.1 г/л) и нПАВ (20%) готовили растворением точных навесок в дистиллированной воде. Рабочие растворы СПК (1–10 мг/л) и нПАВ (1–10%) готовили разбавлением исходных растворов дистиллированной водой. В качестве высаливателя использовали безводный Na_2SO_4 (ч.д.а.), предварительно просушенный до постоянной массы, и его 1 М раствор, приготовленный растворением точной навески в дистиллированной воде. Необходимое значение pH создавали добавлением 0.1 М растворов HCl и NaOH.

Электронные спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре SHIMADZU UV-1800 (Япония) с программным обеспечением UVProbe-2.31 в диапазоне 350–750 нм, $l = 1$ см. Кислотность среды контролировали pH-метром рХ-150 МП со стеклянным электродом и хлорсеребряным электродом сравнения. Взвешивание проводили на аналитических весах HR-200 (A&D, Япония, ± 0.0001 г).

Хроматографическое определение проводили по методике [23] на высокоэффективном хроматографе SHIMADZU LC-20A (Япония) в обращенно-фазовом варианте с диодно-матричным детектором (UV SPD-20A). Для анализа применяли колонку Supelco LC 18 (150×4.66 мм) с размером частиц 5 мкм. В качестве подвижной фазы использовали смесь 0.05 М фосфатного буферного раствора (pH 4.5) с ацетонитрилом (80 : 20, по объему); скорость подачи элюента – 1 мл/мин; длина волны детектирования – 500 нм.

Методика эксперимента. Оптимальные параметры фазового расслоения определяли в двух режимах для систем состава нПАВ– H_2O и нПАВ– H_2O – Na_2SO_4 , варьируя температуру, концентрации ПАВ и соли при постоянном объеме раствора – 10 мл. Межфазное распределение СПК контролировали спектрофотометрически. Эффективность экстракции оценивали по величине степени извлечения ($R, \%$) [24], экстракционную процедуру – по объемам образующихся фаз, вязкости мицеллярной фазы и скорости ее формирования.

Режим 1, соответствующий технологии **CPE**: градуированные пробирки, содержащие необходимые компоненты (аликвоты 20%-ного раствора нПАВ, исходного раствора СПК, 1 М раствора Na_2SO_4 и дистиллированная вода до общего объема 10 мл) помещали в водяную баню и нагревали до необходимой температуры помутнения или расслоения, которую контролировали термометром. После охлаждения раствора фазы разделяли декантацией. На каждом этапе измеряли объемы образующихся фаз. Спектры поглощения мицеллярной фазы регистрировали после ее разбавления дистиллированной водой до 5 мл при нагревании до 40–50°C.

Режим 2, соответствующий технологии **ATPS**: в градуированные пробирки помещали необхо-

Таблица 1. Некоторые характеристики исследованных растворов неионных поверхностно-активных веществ

нПАВ (содержание основного вещества)	<i>n</i>	<i>m</i>	$t_{\text{пом}}, ^\circ\text{C}$		$t_{\text{рас}}, ^\circ\text{C}$	
			водный раствор	при добавлении 0.2 М Na ₂ SO ₄	водный раствор	при добавлении 0.2 М Na ₂ SO ₄
Тритон X-100 (98%)	8–9	10	70–80	55–65	75–85	58–68
ОП-10 (80%)	8–10	10–12	80–90	65–75	85–95	69–79

димые компоненты: аликвоты исходных растворов нПАВ и красителя; навеску сухого безводного Na₂SO₄, необходимую для фазового разделения; дистиллированную воду до общего объема 10 мл. Полученную смесь тщательно перемешивали до полного растворения соли и выдерживали на водяной бане при 25°C 30 мин. По мере установления фазового равновесия фиксировали объемы образующихся фаз, которые в дальнейшем разделяли. Содержание красителей в мицеллярной фазе определяли после ее разбавления до 5 мл дистиллированной водой и измерения оптической плотности полученного раствора.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Основными этапами экстракционной процедуры с помощью нПАВ являются: растворение объекта анализа, содержащего аналит, в водном растворе нПАВ с концентрацией выше критической концентрации мицеллообразования (ККМ); иницирование фазового расслоения; отделение ПАВ-обогащенной фазы (мицеллярной фазы, МФ) с извлеченным аналитом от водной фазы (ВФ) с концентрацией нПАВ ниже ККМ; разбавление экстракта для последующего инструментального анализа [17–22]. Для аналитических целей на стадии фазового расслоения важное значение имеют скорость формирования фазы и ее объем, вязкость и компактность, а также ее оптическая прозрачность в УФ- и видимой областях спектра. Выбранные в качестве экстрагентов оксиэтилированные производные алкилфенолов, Тритон X-100 и его промышленный аналог ОП-10 с общей формулой C_nH_{2n+1}C₆H₄O(C₂H₄O)_mH, имеют в структуре ароматический фрагмент, что приводит к поглощению в УФ-области, а при высокой концентрации ПАВ в МФ – увеличению оптической плотности ее водных растворов. Отсутствие поглощения выше 350 нм позволяет применять эти нПАВ для спектрофотометрического определения окрашенных соединений. Время установления фазового равновесия и физико-химические характеристики образующихся фаз зависят от факторов, приводящих к расслоению, поэтому оптимальные условия определяли для каждого режима; в качестве модельного соединения выбрали ОП-10.

Оптимизация параметров фазового расслоения при экстракции “в точке помутнения”. Индивидуальной характеристикой исследуемых нПАВ является температура помутнения ($t_{\text{пом}}$) водных растворов (система нПАВ–H₂O), зависящая от строения углеводородного радикала и длины оксиэтиленовой цепи, концентрации ПАВ, присутствия различных добавок. Повышение температуры приводит к уменьшению прочности водородных связей между молекулами воды и оксиэтильными группами, дегидратации мицелл нПАВ и понижению их растворимости и, как следствие, к выделению в виде отдельной фазы. Однако достижение $t_{\text{пом}}$ на практике не приводит к расслоению системы и при охлаждении раствор снова становится гомогенным. Формирование компактной МФ, локализуемой в нижней части раствора, происходит только при нагревании до температуры выше $t_{\text{пом}}$ на 3–5°C (температура расслоения, $t_{\text{рас}}$) [20]. Диапазоны температур, при которых наблюдается образование двухфазных систем исследуемых нПАВ (1–10% растворы), приведены в табл. 1. Растворы ОП-10 характеризуются более высокими $t_{\text{пом}}$ и $t_{\text{рас}}$, чем Тритона X-100, поскольку ОП-10 представляет смесь полимергомологов с различными примесями, образующимися в результате синтеза. Определение $t_{\text{пом}}$ водных растворов нескольких партий ОП-10, отличающихся датой изготовления и сроком хранения, показало, что варьирование основных физико-химических параметров фазового расслоения незначительно. Общими закономерностями для обоих нПАВ являются: уменьшение $t_{\text{рас}}$, увеличение объема и скорости формирования МФ при увеличении концентрации нПАВ. Однако отделение МФ декантацией затруднительно вследствие ее невысокой вязкости.

Ранее установлено [21], что добавление в систему ОП-10–H₂O неорганических солей приводит к снижению $t_{\text{пом}}$, причем наибольшее влияние оказывают соли щелочных металлов (фосфаты, карбонаты, сульфаты), особенно соли натрия. Изучение влияния Na₂SO₄ на параметры фазового расслоения 10%-ного раствора ОП-10 (система нПАВ–H₂O–Na₂SO₄) в диапазоне концентраций соли 0.1–0.5 М показало, что увеличение содержания электролита приводит не только к значи-

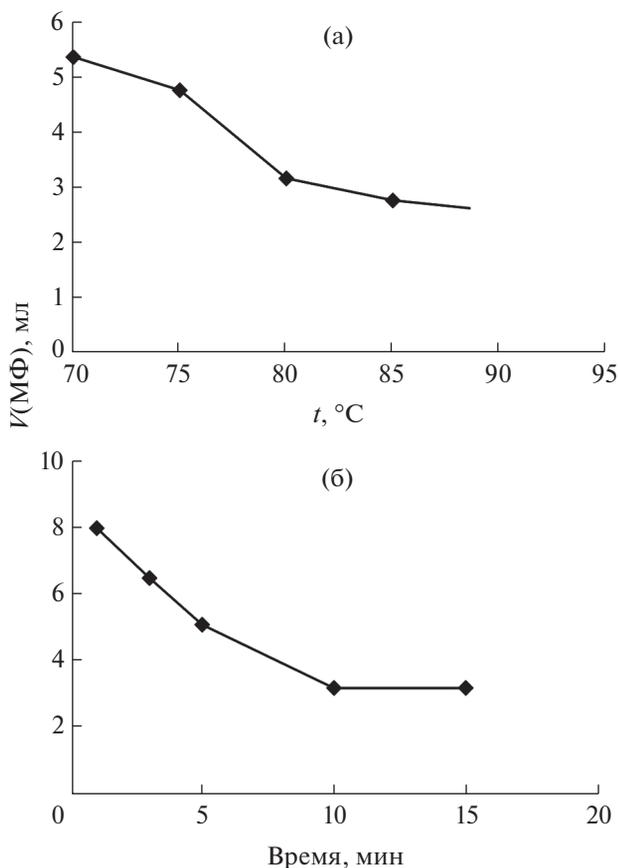


Рис. 1. Зависимость объема мицеллярной фазы в системе ОП-10–H₂O–Na₂SO₄ от температуры (а) и времени экспозиции (б) при 80 °С. $c(\text{ОП-10}) = 10\%$, $c(\text{Na}_2\text{SO}_4) = 0.2 \text{ M}$, $V_0 = 10 \text{ мл}$.

тельному уменьшению $t_{\text{пом}}$ (табл. 1), но и к образованию меньшей по объему и более вязкой МФ. Это объясняется дополнительной дегидратацией полиоксиэтиленовых цепей за счет гидратации ионов вводимых солей, т.е. “высаливающим” эффектом. Количество введенного в систему электролита влияет на локализацию МФ: при 0–0.2 М – в нижней части раствора, при 0.3–0.4 М – распределена во всем объеме, при 0.5 М – в верхней части раствора. Таким образом, в качестве оптимальной для дальнейших исследований выбрали концентрацию 0.2 М Na₂SO₄, при которой $t_{\text{пом}}$ и $t_{\text{рас}}$ 10%-ного раствора ОП-10 составляли соответственно (66 ± 1) и (69 ± 1) °С.

Установили, что температура влияет на скорость формирования и физико-химические характеристики МФ. Изучение влияния режима нагрева и охлаждения показало, что выдерживание в течение 5 мин водно-солевого раствора ОП-10 при температурах от 70 до 90 °С приводит к уменьшению объема МФ (рис. 1а), а выдерживание при фиксированной температуре – установлению фазового равновесия в течение 10–15 мин

(рис. 1б). При нагревании раствора до $t_{\text{рас}}$ со скоростью 1 °С/мин с последующим быстрым охлаждением при 15 °С формируется МФ объемом (3.2 ± 0.2) мл (из 10%-ного раствора ОП-10), а оптимальным является выдерживание растворов при 80 °С в течение 10 мин также с последующим быстрым охлаждением, приводящее к образованию более вязкой, гелеобразной МФ объемом (2.8 ± 0.2) мл, не смешивающейся с ВФ в течение длительного времени и легко отделяющейся от нее декантацией. Однако высокая вязкость МФ не позволяет непосредственно измерять ее оптическую плотность, необходимы разбавление и гомогенизация при нагревании до 40–50 °С.

Оптимизация параметров фазового расслоения при технологии АТРС. Единственным фактором, вызывающим расслоение при 20–25 °С, является добавление сильного электролита – высаливателя. Ранее нами установлено [25], что добавление некоторых солей натрия вызывает расслоение водных растворов ОП-10 с концентрацией от 0.5 до 25% при 25 °С; получен лиотропный ряд анионов-высаливателей: $\text{PO}_4^{3-} > \text{HPO}_4^{2-} > \text{CO}_3^{2-} > \text{SO}_4^{2-} > \text{H}_2\text{PO}_4^- > \text{HSO}_4^-$. Для выбранного высаливателя Na₂SO₄ расслоение 1%-ного раствора ОП-10 наблюдается при содержании соли в системе около 9%, расслоение 10%-ного раствора ОП-10 требует около 7%. Следует отметить, что при “высаливании” ПАВ-обогащенная фаза локализуется компактно в верхней части раствора; водная фаза, обогащенная солью, – в нижней части. Образующиеся МФ в режиме АТРС имеют несколько больший объем и меньшую вязкость по сравнению с режимом СРЕ, что можно объяснить наличием только “высаливания” в качестве фактора, дегидратирующего оксиэтиленовые цепи.

Помутнение раствора при соответствующих соотношениях nПАВ и соли (система nПАВ–H₂O–Na₂SO₄), установленное методом изотермического титрования, не приводит сразу к расслоению в системе, для некоторых концентраций его фиксировали только спустя сутки. Помутнение при высаливании также как и при СРЕ является обратимым процессом, понижение температуры приводит к гомогенизации системы. В связи с этим представляло интерес оценить влияние концентрации соли на фазовое расслоение. Исследование проводили для 10%-ного раствора ОП-10, помутнение которого наблюдается при добавлении 0.72 г Na₂SO₄. Установлено, что увеличение массы соли до 0.84 г приводит к уменьшению времени начала расслоения и более быстрому формированию МФ с меньшим объемом. Как видно из рис. 2, быстрее всего фазовое равновесие устанавливается при добавлении 0.80–0.84 г соли. При этом объем МФ остается практически неизменным спустя 5 мин после смешивания компо-

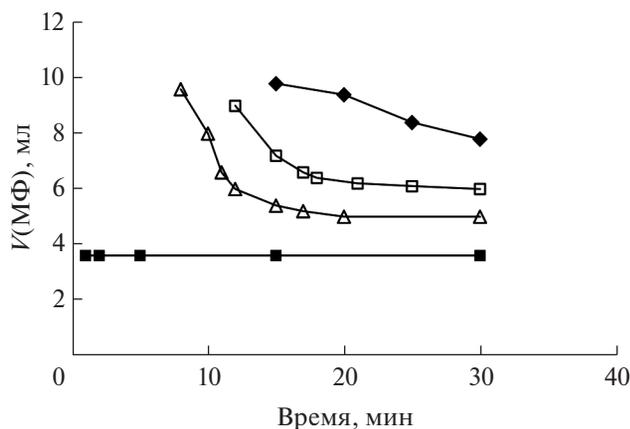


Рис. 2. Зависимость объема мицеллярной фазы от времени в системе ОП-10–H₂O–Na₂SO₄ при разных массах соли, г: (◆) – 0,72, (□) – 0,74, (△) – 0,75, (■) – 0,84. $t = 25^{\circ}\text{C}$; $c(\text{ОП-10}) = 10\%$, $V_0 = 10$ мл.

нентов, а вязкость МФ позволяет разбавлять ее дистиллированной водой без дополнительного нагревания, что является оптимальным для этого режима. Увеличение массы добавляемой соли приводит к образованию мутной МФ.

Основной трудностью при “высаливании” является разделение фаз, так как МФ с анализом локализуется в верхней части раствора и отделение ее может приводить к смешиванию с ВФ. Для решения этой проблемы нами предложен способ проведения экстракционной процедуры “в шприцах” (“in-syringe”), схема которого представлена на рис. 3. В пробирку № 1 помещают исследуемый раствор, содержащий анализ, необходимое для расслоения количество соли, предварительно взвешенное с точностью ± 0.0001 г и добавляют дистиллированной воды до общего объема 5 мл. Полученную смесь тщательно пере-

мешивают до полного растворения соли и набирают в шприц объемом 10 мл. В пробирку № 2 помещают 5 мл раствора нПАВ необходимой концентрации и набирают в тот же шприц. Тщательно перемешивают содержимое шприца интенсивными движениями вверх–вниз в течение 1–2 мин до помутнения. Затем помещают шприц в водяную баню с контролируемой температурой 25°C и выдерживают необходимое время. После установления фазового равновесия верхний слой – ПАВ-обогащенная фаза с извлеченным анализом, нижний слой – водная фаза. Разделение фаз проводят последовательно: сначала водную, а затем мицеллярную фазу удаляют из шприца в градуированные пробирки, измеряют их объемы. Для дальнейшего проведения инструментального анализа МФ разбавляют до необходимого объема подходящим растворителем.

Следует отметить, что такой способ проведения экстракции в режиме АТРС позволяет варьировать общий объем раствора, объемы солевого и ПАВ-раствора. Определяющим является соотношение ПАВ : соль, необходимое для образования двухфазной системы, которое должно быть предварительно установлено. Граница между фазами в прозрачных шприцах визуалью хорошо фиксируется, при разделении фазы не перемешиваются. Дальнейшие исследования в режиме АТРС проводили предложенным способом.

Оценка эффективности экстракционных систем. Переход анализов в МФ зависит от ряда факторов: природы аналита, рН среды, концентрации ПАВ, количества введенного в систему электролита. Азорубин и Понсо 4R относятся к сульфированным производным моноазокрасителей, в молекулах которых нафталиновые кольца связаны азогруппой, различаются только числом и положением сульфогрупп (схема 1).

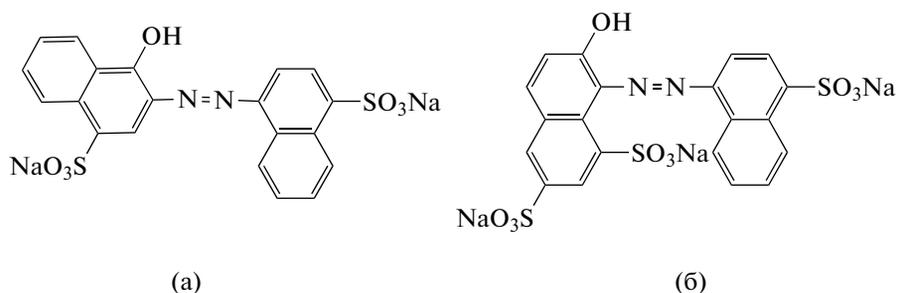


Схема 1. Структурные формулы синтетических пищевых красителей Азорубина (а) и Понсо 4R (б).

Электронные спектры поглощения водных растворов (рис. 4а, 4б, спектр 1) в диапазоне 350–750 нм характеризуются наличием одной широкой полосы. Несмотря на одинаковый хромофорный фрагмент, форма полос и максимумы поглощения отличаются, что невозможно объяс-

нить только числом сульфогрупп, которые отвечают в основном за растворимость соединений. Положение максимума поглощения Понсо 4R в более коротковолновой области ($\lambda_{\text{max}} = 507$ нм), вероятно, связано с пространственным расположением азо- и одной из сульфогрупп, выведени-

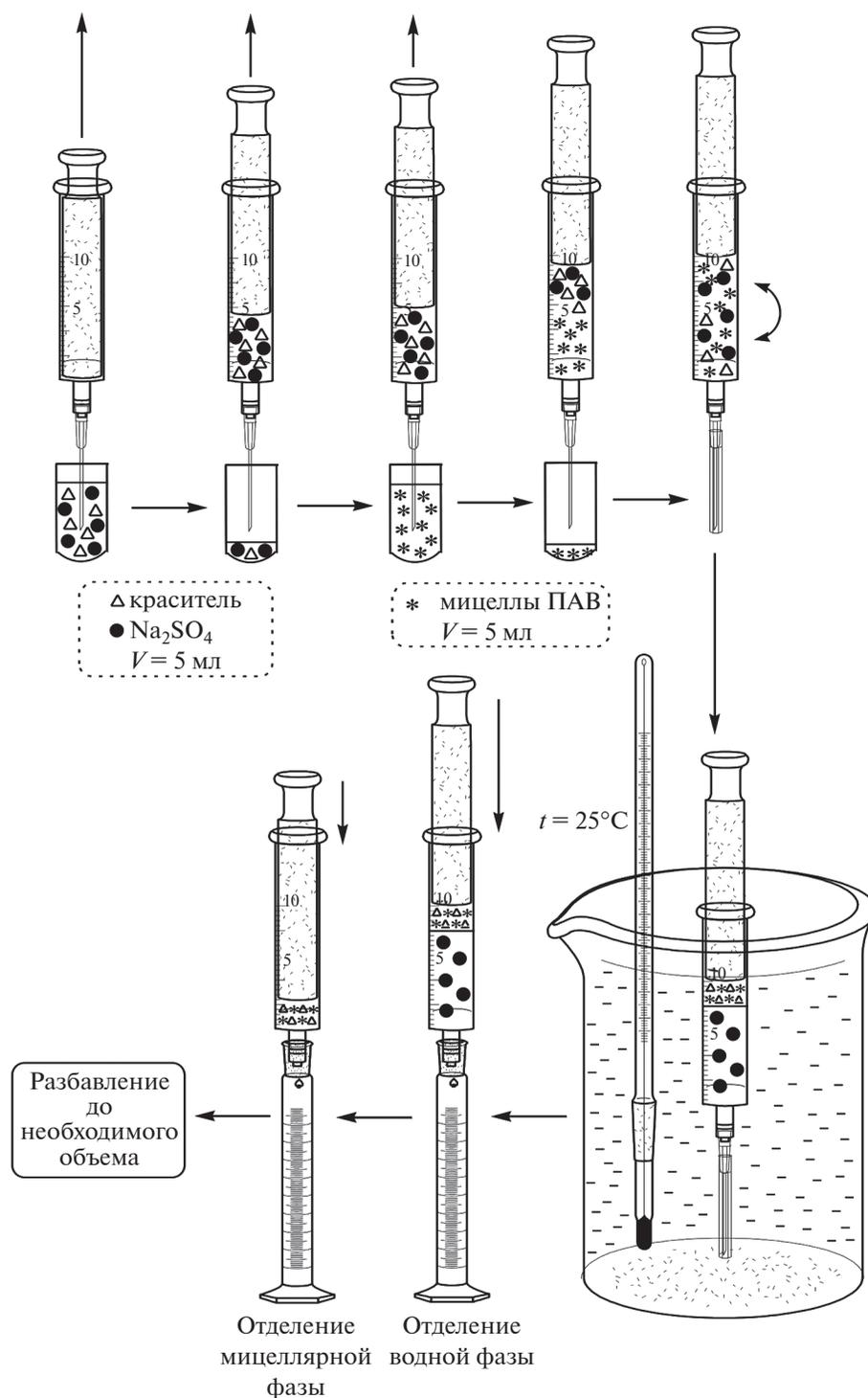


Рис. 3. Схема проведения экстракционной процедуры по технологии “высаливания”.

ем фрагмента молекулы из плоскости сопряжения и затруднением $\pi \rightarrow \pi^*$ перехода. В молекуле Азорубина нафталиновые ядра могут находиться в одной плоскости с π -электронами азогруппы и образовывать единое электронное облако, что приводит к удлинению цепи сопряжения и сдвигу

максимума поглощения в более длинноволновую область ($\lambda_{\text{max}} = 516$ нм).

Изучение влияния кислотности среды на состояние исследуемых СПК в водном растворе показало, что при pH 1–10 они диссоциирует с образованием 2-зарядного (E122) и 3-зарядного (E124)

анионов, форма электронных спектров поглощения остается практически неизменной. При $\text{pH} > 10$ наблюдается гипсохромный сдвиг, изменение формы спектра и интенсивности поглощения, что связано с диссоциацией OH -группы, приводящей к образованию 3-зарядного (E122) и 4-зарядного (E124) анионов (рис. 4а, 4б, спектр 2).

Изучение влияния мицелл ПАВ на состояние СПК в растворе (pH 6–8) показало небольшие bathохромные сдвиги полос поглощения при сохранении формы спектров (рис. 4а, 4б, спектр 3). Изменение спектральных характеристик может свидетельствовать о взаимодействии функциональных групп красителей, сопряженных с их хромофорной системой (группа $-\text{OH}$), с атомами кислорода полиоксиэтиленовых цепей нПАВ.

Оценку эффективности технологии экстракции “в точке помутнения” проводили в системах нПАВ– H_2O и нПАВ– H_2O – Na_2SO_4 для обоих экстрагентов при варьировании концентрации ПАВ, высаливателя и кислотности среды. Изучение влияния pH в диапазоне 1–13 показало, что добавление соответствующих количеств HCl , NaOH и красителей не изменяют параметры фазового расслоения. Системы состава нПАВ– H_2O в диапазоне pH 1–9 извлекают из водных растворов до 86% E122 и 72% E124 (табл. 2). При наличии в структуре одинаковых гидрофобных фрагментов такое различие в степенях извлечения может быть связано с разными зарядами анионов красителей: чем выше заряд, тем ниже степень извлечения. Это подтверждается уменьшением R до 79 и 65% соответственно для E122 и E124 при $\text{pH} > 10$, поскольку в этих условиях увеличивается заряд ионной формы каждого красителя.

Существенное влияние на эффективность извлечения оказывает концентрация высаливателя. Добавление Na_2SO_4 в концентрации 0.2 М увеличивает R для E122 до 98%, а для E124 – до 83%, что может быть связано с усилением гидрофобных взаимодействий ПАВ–СПК. Аналогичное влияние оказывает и температура, увеличение которой от 70 до 90°C приводит к более полному переходу СПК в МФ; при температуре 80°C и выше

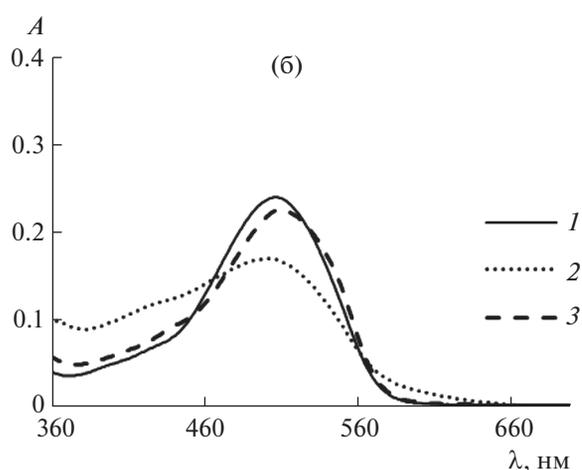
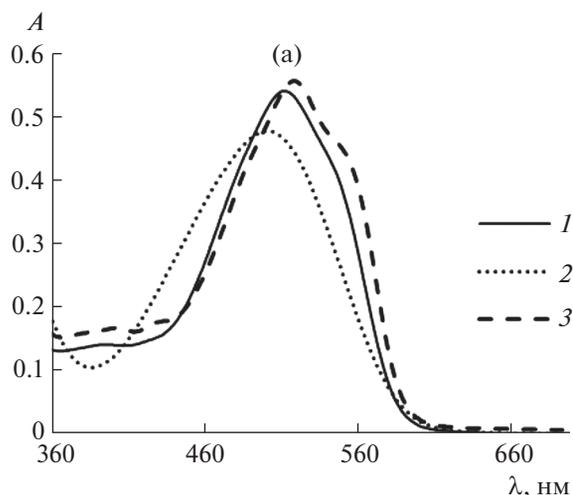


Рис 4. Электронные спектры поглощения растворов Азорубина (а) и Понсо 4R (б) при различной кислотности среды и в присутствии неионного ПАВ: 1 – pH 6–8, 2 – pH 11–12, 3 – 10%-ный раствор ОП-10.

достигается максимально возможное значение R для каждого красителя.

Изучение влияния концентрации нПАВ в растворе (от 1 до 10%) показало, что в более концентрированных растворах R выше, т.е. большее количество мицелл способно сольбилизовать большее количество красителя (рис. 5). Соответ-

Таблица 2. Степени извлечения (%) Азорубина и Понсо 4R при различных режимах фазового расслоения ($c(\text{СПК}) = 5$ мг/л, $c(\text{ПАВ}) = 10\%$, pH 6–8, $n = 3$, $P = 0.95$)

Экстракционная система	Азорубин		Понсо 4R	
	CPE	ATPS	CPE	ATPS
ОП-10– H_2O	84 ± 2	–	70 ± 1	–
Тритон X-100– H_2O	86 ± 1	–	72 ± 2	–
ОП-10– H_2O – Na_2SO_4	96 ± 2	97 ± 1	83 ± 3	95 ± 1
Тритон X-100– H_2O – Na_2SO_4	97 ± 1	98 ± 1	85 ± 2	96 ± 2

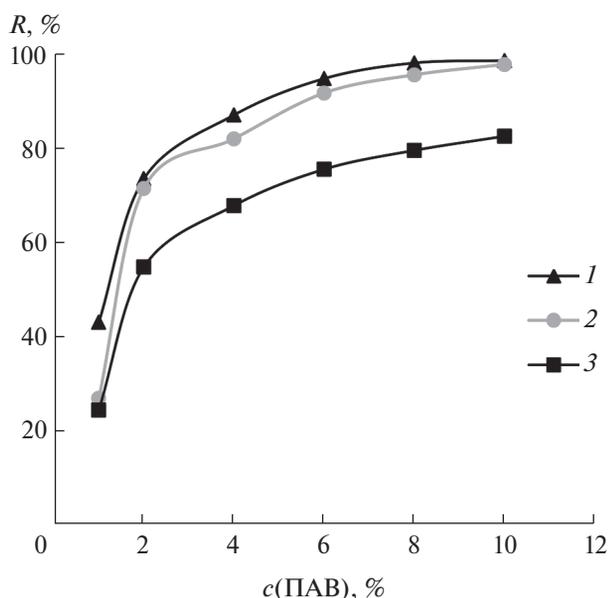


Рис. 5. Зависимость степени извлечения красителей Азурубина (1, 2) и Понсо 4R (3) от концентрации неионных ПАВ: 1 – Тритон X-100; 2, 3 – ОП-10. $c(\text{СПК}) = 5 \text{ мг/л}$, $c(\text{Na}_2\text{SO}_4) = 0.2 \text{ М}$.

ственно, увеличение концентрации красителя приводит к уменьшению R , поэтому экстракцию целесообразнее проводить из разбавленных растворов более концентрированными растворами нПАВ. Следует отметить, что экстракционные возможности ОП-10 и Тритона X-100 практически равнозначны.

Оценку эффективности технологии высаливания проводили для наиболее гидрофильного E124 при варьировании концентрации ОП-10, красителя и массы Na_2SO_4 . Закономерности влияния этих факторов на R аналогичны технологии СРЕ, наилучшими экстракционными характеристиками также обладали 10%-ные растворы нПАВ. Поскольку добавление электролита приводит к усилению гидрофобных взаимодействий ПАВ–СПК, увеличение массы высаливателя повышает концентрацию красителя в МФ и при добавлении 0.84 г соли R возрастает до 96% при кон-

центрации красителя 5 мг/л. Из более разбавленных растворов (1 мг/л) E124 извлекается практически полностью ($R = 98\text{--}99\%$). В табл. 2 приведены степени извлечения E122 и E124 экстракционными системами в различных режимах фазового расслоения: для наиболее гидрофобного Азурубина практически полное однократное извлечение возможно при использовании как режима СРЕ, так и АТРС; для более гидрофильного Понсо 4R наилучшими экстракционными характеристиками обладает режим АТРС.

Экстракционно-фотометрическое определение красителей в лекарственных препаратах. При переходе в МФ форма электронных спектров поглощения СПК остается практически неизменной; это свойство использовали для их идентификации в анализируемых объектах спектрофотометрическим методом. С ростом концентрации СПК наблюдается увеличение оптической плотности раствора МФ. Зависимость между ее значениями в максимуме поглощения спектра каждого соединения и концентрациями красителей в растворе линейна, что использовали для количественного определения. Уравнения градуировочных зависимостей для режима АТРС, приведенные в табл. 3, показывают, что для целей экстракции возможности Тритона X-100 и ОП-10 практически одинаковы. Можно отметить, что для Тритона X-100 фазовое равновесие наступает быстрее, и образующиеся МФ несколько меньше по объему.

В качестве объектов анализа выбрали сиропы “Гексо Бронхо” (Франция) и “Либексин Муко” (Германия), растительные пастилки от кашля “Доктор МОМ” с малиновым вкусом (Индия). Выбор способа проведения экстракционной процедуры обусловлен не только природой analyта (для более гидрофильных соединений предпочтителен режим АТРС), но и матрицей анализируемого объекта (состав может влиять на локализацию МФ). Оценили возможности применения способа СРЕ и АТРС. В режиме СРЕ установлена инверсия фаз. В связи с этим для анализа выбрали режим АТРС, в качестве экстрагента – Тритон X-100.

Таблица 3. Уравнения градуировочных зависимостей оптической плотности раствора мицеллярной фазы (A) от концентрации (c , мг/л) красителей в водном растворе. ($c(\text{ПАВ}) = 10\%$, $m(\text{Na}_2\text{SO}_4) = 0.84 \text{ г}$, объем раствора – 10 мл, 25°C)

Экстракционная система	СПК	λ_{max} , нм	Градуировочная зависимость	R^2
ОП-10– H_2O – Na_2SO_4	E122	522	$A = 0.0675c + 0.0243$	0.998
ОП-10– H_2O – Na_2SO_4	E124	513	$A = 0.0573c + 0.0252$	0.997
Тритон X-100– H_2O – Na_2SO_4	E122	522	$A = 0.0763c + 0.0261$	0.998
Тритон X-100– H_2O – Na_2SO_4	E124	513	$A = 0.0691c + 0.0328$	0.996

Таблица 4. Результаты (мг/л) определения Понсо 4 R в лекарственных сиропах методами мицеллярно-экстракционно-фотометрическим и ВЭЖХ ($n = 3$, $P = 0.95$, $t_{\text{табл}} = 2.78$, $F_{\text{табл}} = 19.2$)

Анализируемый сироп	Мицеллярно-экстракционно-фотометрический метод		ВЭЖХ		$t_{\text{эксп}}$	$F_{\text{эксп}}$
	$X_{\text{ср}} \pm \Delta X$, мг/л	s_r	$X_{\text{ср}} \pm \Delta X$, мг/л	s_r		
“Гексо Бронхо”	39.8 ± 6.2	0.04	39.5 ± 2.0	0.01	0.35	3.2
“Либексин Муко”	38.6 ± 7.5	0.05	40.2 ± 2.9	0.02	1.49	2.6

Определение Понсо 4R в сиропах. Аликвоту сиропа (1–3 мл) помещали в пробирку и добавляли дистиллированной воды до общего объема 5 мл. К полученному раствору добавляли 0.84 г (точная навеска) безводного Na_2SO_4 , смесь тщательно перемешивали до полного растворения соли. Полученный раствор набирали в шприц объемом 10 мл. В этот же шприц набирали 5 мл 20%-ного раствора Тритона X-100. Смесь в шприце тщательно перемешивали до помутнения (1–2 мин) и выдерживали на водяной бане течение 30 мин при 25°C. Водную фазу отделяли, а мицеллярную фазу помещали в мерную колбу емк. 5 мл, добавляли дистиллированную воду до метки, перемешивали и измеряли оптическую плотность полученного раствора. Краситель идентифицировали сравнением спектров поглощения растворов мицеллярной фазы после экстракции и рабочего раствора красителя Понсо 4R. Количественное определение проводили по градуировочной зависимости, аналитическая длина волны – 513 нм.

Результаты определения Понсо 4R в сиропах от кашля и данные проверки правильности [23] представлены в табл. 4. Полученные данные подтвердили пригодность режима ATPS для отделения красителя от матрицы сиропов, вспомогательные компоненты не оказывали мешающего действия. Сопоставление результатов двух методов по F - и t -критериям подтвердило отсутствие систематической погрешности.

Определение Азорубина в пастилках для рассасывания. Одну пастилку ($m \approx 2.5$ г) растворяли при перемешивании в 25 мл дистиллированной воды. Полученный раствор анализировали аналогично описанной экстракционной процедуре для сиропов. Краситель идентифицировали сравнением

Таблица 5. Результаты определения Азорубина в пастилках “Доктор МОМ” способом введено–найденно ($n = 3$, $P = 0.95$)

Введено, мкг	Найдено, мкг	s_r
–	130 ± 11	0.02
50	172 ± 13	0.03
100	218 ± 10	0.02

спектров поглощения растворов мицеллярной фазы и рабочего раствора красителя Азорубина. Для количественного определения использовали градуировочную зависимость, аналитическая длина волны – 522 нм.

Правильность определения проверяли методом введено–найденно, результаты представлены в табл. 5. Статистическая обработка результатов определения показала возможность определения Азорубина в пастилках для рассасывания с погрешностью, не превышающей 5%.

Таким образом, установлено, что на эффективность извлечения синтетических красителей Азорубина и Понсо 4R из водных растворов существенно влияют режим фазового разделения и концентрация высаливателя. Наилучшими экстракционными характеристиками обладают системы состава $n\text{ПАВ}-\text{H}_2\text{O}-\text{Na}_2\text{SO}_4$ при использовании технологии “высаливания”. Оптимизированы условия проведения экстракции по технологии SPE путем добавления электролита, снижающего температуру помутнения; выдерживания растворов при фиксированной температуре, на 10°C превышающей температуру расслоения; охлаждения при 15°C. Для экстракционной процедуры по технологии ATPS определено количество высаливателя, обеспечивающее быстрое установление фазового равновесия при 25°C. Для этого режима предложен способ экстракции “в шприцах”, позволяющий просто и эффективно проводить как саму процедуру фазового расслоения в небольших объемах, так и разделение фаз. Разработаны экспрессные методики, позволяющие применять экологически безопасные и доступные неионные ПАВ Тритон X-100 и ОП-10 для экстракционно-спектрофотометрического определения Азорубина и Понсо 4R в лекарственных препаратах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Меньшутина Н.В., Мишина Ю.В., Алвес С.В.* Инновационные технологии и оборудование фармацев-

- тического производства. Т. 1. М: БИНОМ, 2016. 328 с.
2. Чуешов В.И., Гладух Е.В., Сайко И.В., Ляпунова О.А., Сичкарь А.А., Крутских Т.В., Рубан Е.А., Черняев С.В. Технология лекарств промышленного производства. Винница: Нова Книга, 2014. 696 с.
 3. Сарафанова Л.А. Пищевые добавки: Энциклопедия. СПб: ГИОРД, 2003. 688 с.
 4. Государственная фармакопея Российской Федерации. В 4-х тт. XIV изд. <http://www.femb.ru/femb/pharmасореа.php> (дата обращения 17.09.2021).
 5. Смирнов Е.В. Пищевые красители. Справочник. СПб: Профессия, 2009. 352 с.
 6. Песня Д.С., Романовский А.В., Прохорова И.М. Исследование токсического и генотоксического эффектов синтетических пищевых красителей Allium test // Ярославский педагогический вестник. 2012. Т. 3. № 3. С. 86.
 7. Титова Н.Д. Пищевые добавки как алиментарные аллергены // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2008. № 2. С. 41.
 8. Рудометова Н.В. безопасность пищевых продуктов: контроль применения синтетических красителей // Пищевая промышленность. 2010. № 12. С. 64.
 9. Гигиенические требования по применению пищевых добавок. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы. СанПиН 2.3.2.1293-03. М.: Минздрав России, 2003.
 10. Государственный реестр лекарственных средств: <https://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx> (дата обращения 17.09.2021).
 11. Руководство по инструментальным методам исследования при разработке и экспертизе качества лекарственных препаратов / Под ред. Быковского С.Н., Василенко И.А., Харченко М.И., Белова А.Б., Шохина И.Е., Дориной Е.А. М.: Перо, 2014. 656 с.
 12. Петров Б.И., Леснов А.Е. Современное состояние экстракционного метода: Учебное пособие. СПб: Лань, 2018. 356 с.
 13. Куцевская Н.Ф., Дорошук В.А., Гобачевский А.Н. Мицеллярно-экстракционное концентрирование микрокомпонентов фазами неионных ПАВ при температуре помутнения // Химия и технология воды. 2008. Т. 30. № 5. С. 551.
 14. Yazdi A.S. Surfactant-based extraction methods // Trends Anal. Chem. 2011. V. 30. № 6. P. 918.
 15. Paleologos E.K., Giokas D.L., Karayannis M.I. Micelle-mediated separation and cloud-point extraction // Trends Anal. Chem. 2005. V. 24. № 5. P. 426.
 16. Hatti-Kaul R. Aqueous two-phase systems // Mol. Biotechnol. 2001. V. 19. P. 269.
 17. Pourreza N., Rastegarzadeh S., Larki A. Determination of Allura red in food samples after cloud point extraction using mixed micelles // Food Chem. 2011. V. 126. P. 1465.
 18. Pourreza N., Ghomi M. Simultaneous cloud point extraction and spectrophotometric determination of carmoisine and brilliant blue FCF in food samples // Talanta. 2011. V. 84. P. 240.
 19. El-Shahawi M.S., Hamza A., Al-Sibaai A.A., Basham-makh A.S., Al-Saidi H.M. A new method for analysis of sunset yellow in food samples based on cloud point extraction prior to spectrophotometric determination // J. Ind. Eng. Chem. 2013. V. 19. № 2. P. 529.
 20. Чернова Р.К., Шестопалова Н.Б., Козлова Л.М. Фазовое разделение в системе (ОП-10)–H₂O и “cloud point” экстракция некоторых красителей // Изв. Саратовского ун-та. Сер. Химия. Биология. Экология. 2012. Т. 12. Вып. 3. С. 32.
 21. Чернова Р.К., Шестопалова Н.Б., Козлова Л.М. Некоторые аспекты влияния электролитов на фазовое разделение и “cloud point” экстракцию азорубина в системе (ОП-10)–H₂O // Изв. Саратовского ун-та. Сер. Химия. Биология. Экология. 2012. Т. 12. Вып. 4. С. 11.
 22. Güray T., Menevşe B., Yavuz A.A. Determination of optimization parameters based on the Box-Behnken design for cloud point extraction of quinoline yellow using Brij 58 and application of this method to real samples // Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc. 2020. V. 243. Article 118800.
 23. Руководство Р.4.1.1672-03 по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище. М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. 240 с.
 24. Основы аналитической химии. Т. 1 / Под ред. Золотова Ю.А. М.: Высшая школа, 1996. 384 с.
 25. Шестопалова Н.Б., Чернова Р.К. Влияние солей натрия на фазовое разделение в системе (ОП-10)–H₂O // Вестн. Тамбовского гос. техн. ун-та. 2014. Т. 20. № 2. С. 322.

УДК 543-1:543.426:543.7/.79:543.8:543.066

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭФФЕКТА ВОЗНИКАЮЩЕЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ В ХИМИЧЕСКОМ И БИОХИМИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ

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

*e-mail: olenin@geokhi.ru

Поступила в редакцию 19.10.2021 г.

После доработки 16.02.2022 г.

Принята к публикации 24.02.2022 г.

В последнее время в люминесцентном анализе широко применяется термин “turn-on fluorescence”, которому на русском языке соответствует название “возникающая флуоресценция” (ВФ). В настоящей работе представлен обзор реагентов и аналитов, а также дана оценка возможностей ВФ в химическом и биохимическом анализе, в том числе реальных объектов сложного химического состава. Далеко не все эффекты, объединенные под названием “turn-on fluorescence”, являются качественно новыми; одна из целей настоящей работы состояла в согласовании терминологии, применяемой в современных англоязычных публикациях, с терминологией, принятой в отечественной литературе по люминесценции. Реагент с ВФ – это хороший люминофор со структурным “дефектом”, снижающим квантовый выход: незамкнутым циклом, нарушением в системе сопряженных связей или присоединенным тушителем. В ходе реакции с аналитом “дефект” устраняется и образуется интенсивно люминесцирующий продукт. Типы “дефектов” и реакций их “исправления” положены в основу предлагаемой классификации реагентов с ВФ.

Ключевые слова: флуоресцентный анализ, возникающая флуоресценция, формирование аналитического сигнала.

DOI: 10.31857/S0044450222090080

Флуоресцентные методы – важная область аналитической химии, особую динамику развития которой определяют работы по созданию химических сенсоров и биомедицинские исследования [1–32]. Явление флуоресценции присуще многим ароматическим соединениям; оно может служить средством прямого инструментального анализа благодаря высокой чувствительности и специфичности, связанной с возможностями спектральной селекции по возбуждению и испусканию, а также временной селекции. Люминесцентные методы нашли широкое практическое применение для определения неорганических катионов [20–22, 33–39], биополимеров [40, 41], активных форм кислорода [33, 34, 42, 43], загрязнителей окружающей среды [21, 39, 44–46], взрывчатых веществ [47], фосфорорганических токсикантов [48], биомаркеров [49], для контрастирования биообъектов [18, 29, 30, 33, 50–52], для исследования распределения медицинских препаратов [24, 53–57], контроля качества пищевых продуктов [58]. В последние 15 лет наблюдается бурный рост числа работ, в которых встречается термин “turn-on fluorescence”, который практически не использовался до 2005 г. В настоящее время новая статья,

посвященная “turn-on fluorescence”, появляется в среднем каждые 1.5 дня (рис. 1).

Можно сформулировать две главные цели обзора. Во-первых, это обобщение и анализ современной литературы, включающей термин “turn-on fluorescence”. Фактического материала опубликовано довольно много, в разных областях. Во-вторых, попытка упорядочить термины, используемые авторами различных работ. Зачастую одним и тем же термином описывают различные явления и, наоборот, для аналогичных по своей сути процессов используют несколько названий.

В обзоре на русском языке [59] в качестве эквивалента “turn-on luminescent sensor” предложен термин “включающийся” люминесцентный молекулярный сенсор (ЛМС). Рассмотрены молекулы, содержащие флуорофор и макроциклический лиганд, способный к селективному связыванию неорганического катиона. Как отмечают авторы, “наиболее перспективными с практической точки зрения считаются ЛМС, которые сильно люминесцируют только в составе комплекса, т.е. после селективного связывания субстрата, а в отсутствие субстрата не люминесцируют либо показывают очень слабую люминесценцию”. Это

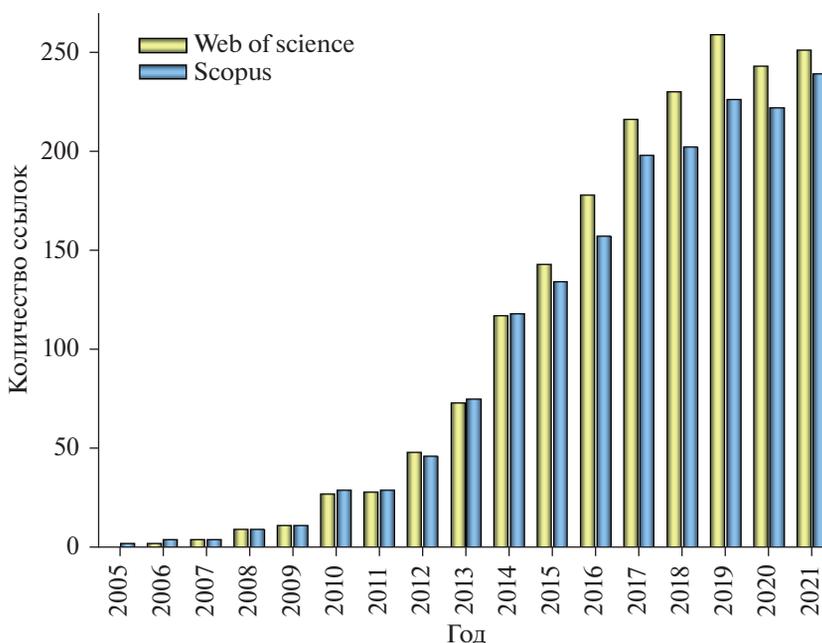


Рис. 1. Динамика количества публикаций, включающих термин “turn-on fluorescence”, в ведущих наукометрических базах данных.

определение “включающихся” ЛМС в точности соответствует теме настоящего обзора с тем отличием, что мы не будем ограничиваться комплексообразованием, а попытаемся охватить все типы аналитически полезных реакций, приводящих к усилению флуоресценции.

Следует отметить различие в употреблении казалось бы эквивалентных терминов “sensor” и “сенсор” в работах по люминесценции. Если на русском языке “люминесцентный сенсор” воспринимается как устройство, то в англоязычной литературе “luminescent sensor” – это, как правило, молекула, реагент для люминесцентного анализа.

В традиционных для русскоязычной литературы терминах “turn-on fluorescence” можно перевести как “возникающая флуоресценция” (ВФ), в отличие от типичных систем, в которых добавление аналита вызывает сдвиг максимума спектра излучения без существенного изменения квантового выхода. Для подобных систем в англоязычной литературе используют термин “ratiometric fluorescent sensor” [18], который подразумевает измерение отношения интенсивности пика чистого реагента к интенсивности пика реагента с аналитом. Родственный по смыслу термин “turn-off fluorescence” относится к случаю, когда аналит тушит свечение люминофора.

В настоящее время большинство публикаций содержит не только необходимую информацию о методе определения аналита, такую как описание процесса пробоподготовки, получения градуировочных зависимостей, определения аналитиче-

ских характеристик, но и примеры практического использования для анализа реальных объектов, многие из которых являются сложными и требуют понимания их специфики.

За последние пять лет опубликованы десятки обзорных статей по ВФ, посвященных физико-химическим основам явления [60–63]; материалам, проявляющим этот эффект [61, 64–68]; областям практического использования, таким как контрастирование биологических объектов [64, 69, 70], экология [65, 70], химическая и биологическая сенсорика [64, 66, 69, 71]. Применение в аналитической химии рассмотрено в единичных публикациях, например, в работе [67] описано флуоресцентное детектирование аминов. Систематический обзор, посвященный применению явления ВФ в аналитической химии, в настоящее время отсутствует.

ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ, ПРИВОДЯЩИЕ К “ВОЗНИКАЮЩЕЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ”

“Turn-on” или ВФ-реагент – это либо чуть-чуть “недоделанный”, либо слегка испорченный хороший люминофор. “Чуть-чуть” и “слегка” надо понимать в том смысле, что указанные недостатки должны исчезнуть в результате быстро протекающей реакции с аналитом в мягких условиях. “Недоделка” обычно состоит в наличии в молекуле подготовленного к замыканию в цикл, но все же незамкнутого фрагмента. Самый известный и широко используемый способ устранения такого рода “дефекта” люминофора – обра-

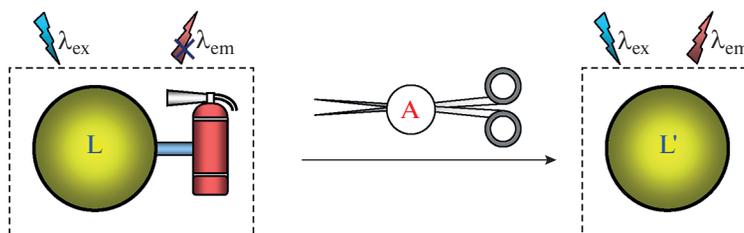


Рис. 2. Схема возникновения флуоресценции за счет удаления тушащей функциональной группы из молекулы флуорофора (L) под действием анализита (A).

зование хелатного комплекса с неорганическим катионом. К другому роду “несовершенств” молекул люминофора можно отнести ковалентно или координационно связанные с ними тушители, отравляющие люминесцентную жизнь ароматической системы. Нарушение системы сопряженных связей за счет одиночных гидрированных фрагментов можно рассматривать и как недоделку, и как излишество: в любом случае способность светиться реагенту может вернуть аналит-окислитель. В идеале создатель хорошего turn-on реагента должен так срежиссировать структуру ароматического соединения, чтобы особенности анализита делали его единственным героем, который способен вернуть свет потушенному люминофору.

Можно выделить три основных типа химических превращений, приводящих к ВФ: удлинение ковалентной цепи сопряжения, удаление внутримолекулярного тушителя и комплексообразование.

Наиболее существенное изменение структура органического реагента претерпевает в ходе реакций, сопровождающихся удлинением цепи сопряжения. Чаще всего увеличение размеров ароматического фрагмента, понимаемого как система сопряженных связей, происходит за счет образования новых циклов. При определении ряда органических и неорганических соединений усиление люминесценции реагента происходит вследствие встраивания фрагмента анализита в молекулу люминофора. Такого рода процессы будем называть структурной циклизацией (СЦ). Этот подход применим для анализитов, содержащих несколько реакционноспособных функциональных групп, присутствующих в молекулах гидразина [72], аминокислот [73–75] и т.п. Наиболее часто в литературе встречаются реакции конденсации, такие как формирование оснований Шиффа, циклизация с участием гетероатомов (как правило, азота и серы) и подобные им.

Наряду с реакциями СЦ описаны системы, в которых анализит лишь косвенно участвует в трансформации ароматической системы в качестве окислителя или восстановителя. Авторы работ по окислительной (ОЦ) или восстановительной циклизации (ВЦ) используют в качестве исход-

ных веществ молекулы-предшественники люминофоров, в которых под действием анализита происходит замыкание цикла (как правило, содержащего один или несколько гетероатомов). Анализит, окислитель или восстановитель, выполняет роль “спускового крючка” процесса. Во многих работах, ставящих в качестве конечной задачи химический анализ, синтез такого реагента является ключевым элементом исследования.

Разумеется, окислительно-восстановительные реакции (ОВР) могут усиливать флуоресценцию без образования новых циклов [34, 76]. Например, возможна ароматизация вследствие дегидрирования (hydrogen abstraction), окислительного гидроксирования ароматических соединений или, наоборот, восстановления функциональных групп, которые тушат люминесценцию. В системах, содержащих неорганические анализиты, возможен перевод катиона в подходящую для люминесценции валентную форму. Относя такие процессы к ОВР, мы имеем в виду только те реакции, которые не сопровождаются существенными изменениями в скелете люминофора.

Удаление внутримолекулярного тушителя — самый популярный тип реакций с ВФ. В ряде случаев анализит способен к реакции элиминирования (Э) функциональных групп-тушителей, содержащихся в органическом соединении. В результате интенсивность флуоресценции существенно возрастает (рис. 2).

В англоязычной литературе (см. например, [77]) для таких реакций часто используется термин “deprotection”. Удаление тушителя может происходить по разным механизмам, это направление интенсивно развивается в последнее время. Синтезировано большое количество новых реагентов, причем многие из них относятся к люминофорам с аномально большим стоксовым сдвигом, вызванным переносом протона в возбужденном состоянии ESIPT [62, 78–82]. Нередко используют реакции, сочетающие увеличение размера ароматической системы с удалением тушителей.

Помимо перестройки системы ковалентных связей, ВФ может быть вызвана комплексообразованием ароматического реагента с анализитом. Чаще всего речь идет о взаимодействии металл-лиганд, однако имеются примеры усиления све-

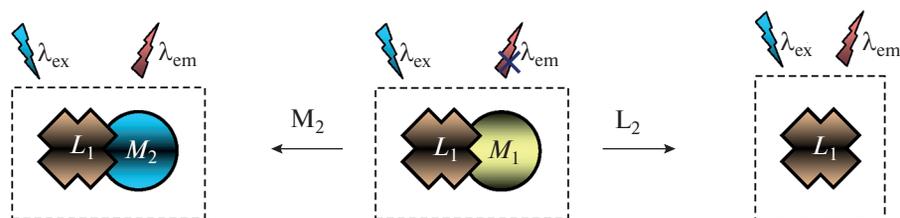


Рис. 3. Схемы возникновения флуоресценции в результате удаления катиона-тушителя.

чения при образовании комплексов органических реагентов с анионами или нейтральными молекулами.

В реакциях комплексообразования (КО), сопровождающихся ВФ, нередко по аналогии с описанными выше превращениями для ковалентных связей происходит увеличение протяженности цепи сопряжения и удаление тушителей. Увеличение протяженности π -системы связано с образованием дополнительного цикла при связывании неорганического катиона ароматическим хелатом. Удаление металла-тушителя реализуется в реакциях конкурентного КО. Нелюминесцирующий комплекс M_1L_1 ароматического хелата L_1 с катионом-тушителем M_1 может быть ВФ-реагентом для определения ионов металлов M_2 (рис. 3). Для определения катиона M_2 необходимо, чтобы он был способен вытеснить M_1 из комплекса M_1L_1 и усилить (или хотя бы не так сильно, как M_1 , тушить) флуоресценцию L_1 . Работоспособными также являются системы, основанные на конкуренции между лигандами. Для определения лиганда L_2 необходимо, чтобы комплекс L_2M_1 был прочнее, чем L_1M_1 и чтобы лиганд L_1 был способен к флуоресценции в свободном состоянии.

Для определения анионов применяют также системы с люминесцирующими разнолигандными комплексами.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНАЛИТОВ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ НА ОСНОВЕ ЭФФЕКТА «ВОЗНИКАЮЩЕЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ»

Методы качественного и количественного анализа, основанные на ВФ, в период после 2010 г. интенсивно развивались. Не последнюю роль в этом сыграла насыщенность оборудованием лабораторий, целью которых являются решение как фундаментальных, так и прикладных задач, наличие в них высококвалифицированного персонала. Можно выделить три основные группы аналитов — неорганические (табл. 1), органические (табл. 2) и биоорганические (табл. 3), для определения которых может быть применен метод ВФ.

Одной из причин ВФ органического соединения является КО с катионами металлов [81, 83–

91]. В большинстве случаев аналиты представляют собой катионы переходных металлов. В функциональных группах органического соединения (лиганда) имеются электронодонорные фрагменты, содержащие гетероатомы (азот, кислород): гидроксил [81, 83, 84], карбонил [81, 87, 89], аминогруппы [81, 85, 86, 88–90] или иминогруппы (гидразины) [83, 87], атомы азота гетероциклов [83–85, 87]. Наряду с ними в комплексообразовании принимают участие фрагменты лигандов, содержащие двойные связи $C=N$ как в основной цепи [81, 83, 85, 86, 91], так и в гетероциклических фрагментах [83–85, 87].

Нефлуоресцирующие замещенные пиколингидразиды способны к образованию комплексов с ионами Cu^{2+} и Hg^{2+} [87] (схема 1).

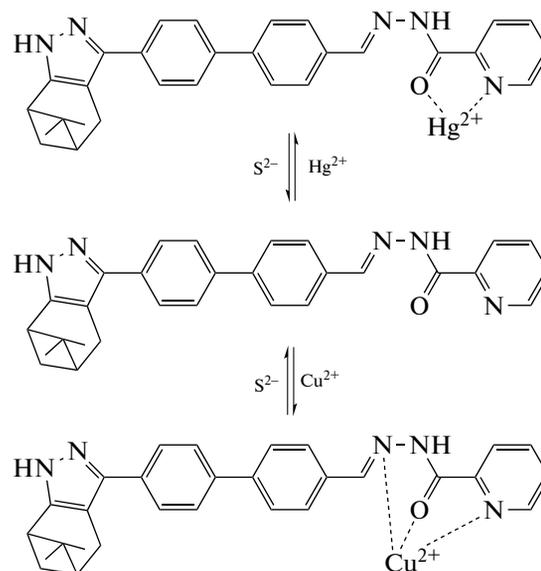


Схема 1. Формирование комплексов пиколингидразидов с ионами Cu^{2+} и Hg^{2+} .

Максимум полосы флуоресценции этих комплексов как для Cu^{2+} , так и Hg^{2+} лежит в одной области, что не позволяет одновременно определять их с использованием описываемого метода.

Комплексообразование аналита с исходным соединением может приводить к последующему удалению из молекулы фрагментов (функциональных групп), тушащих флуоресценцию [80] (схема 2).

Таблица 1. Методики количественного флуоресцентного определения неорганических аналитов на основе “возникающей флуоресценции”

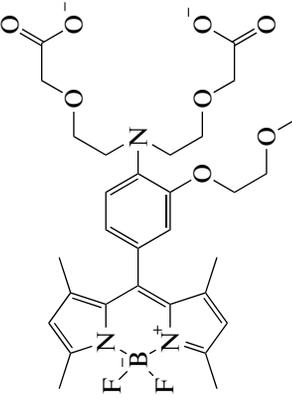
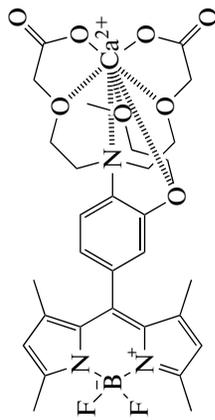
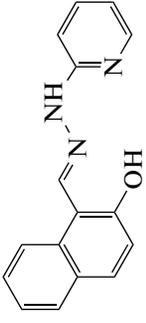
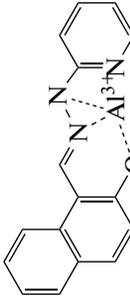
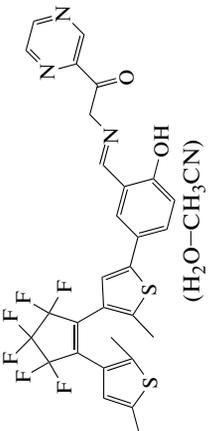
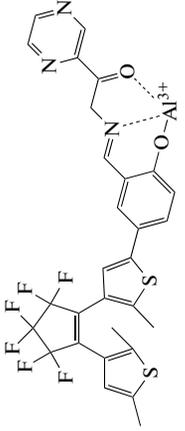
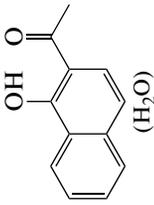
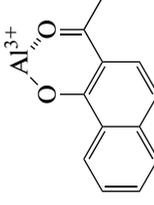
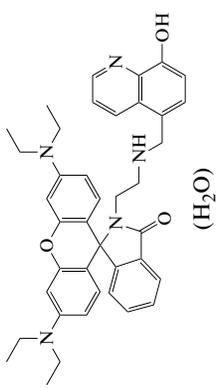
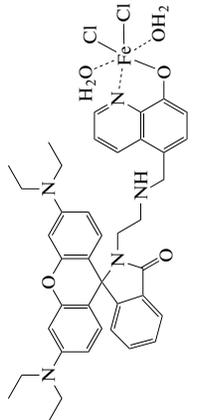
Аналит (тип реакции)	Реагент (реакционная среда*)	Продукт	λ_{ex} нм	λ_{em} (λ_{max}), нм	Диапазон линейности, М	Минимальная определяемая концентрация, М	Литера- тура
Ca^{2+} (КО)	 (H_2O)		—**	510	1×10^{-4} — 1×10^{-3}	—	[125]
Al^{3+} (КО)	 (H_2O , MeOH)		420	460	1×10^{-6} — 4×10^{-5}	6×10^{-8}	[83]
Al^{3+} (КО)	 (H_2O — CH_3CN)		350	541	—	1.7×10^{-8}	[81]
Al^{3+} (КО)	 (H_2O)		385	481	5×10^{-8} — 1.2×10^{-6}	4.2×10^{-8}	[82]
Fe^{3+} (КО)	 (H_2O)		510	578	5×10^{-6} — 2.5×10^{-5}	1.9×10^{-7}	[84]

Таблица 1. Продолжение

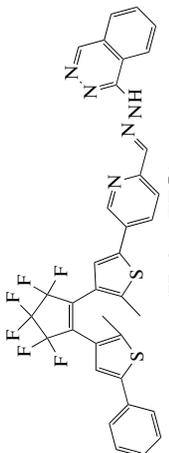
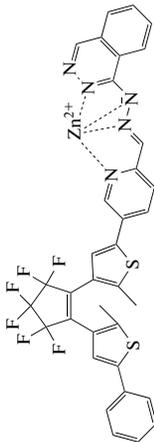
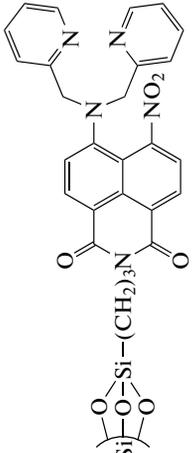
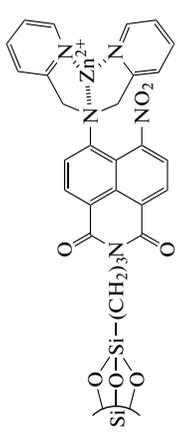
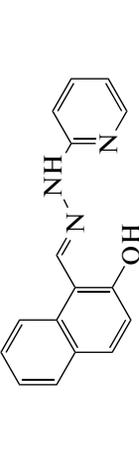
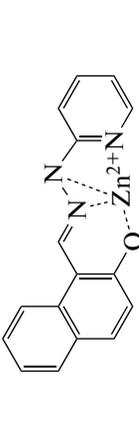
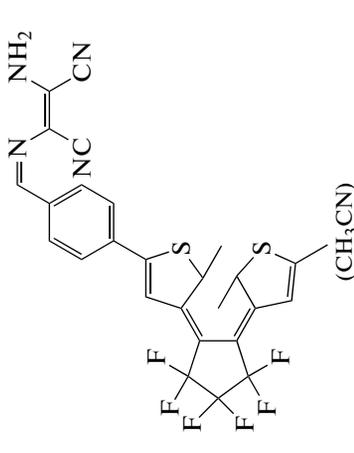
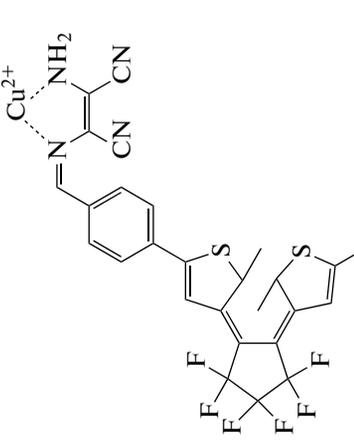
Аналит (тип реакции)	Реагент (реакционная среда*)	Продукт	λ_{exc} , нм	λ_{em} (λ_{max}), нм	Диапазон линейности, М	Минимальная определяемая концентрация, М	Литера- тура
Zn^{2+} (КО)	 (H_2O – ТГФ)		400	594	–	–	[85]
Zn^{2+} (КО)	 (H_2O)		475	534	5×10^{-7} – 2×10^{-5}	1×10^{-7}	[126]
Zn^{2+} (КО)	 (H_2O , MeOH)		420	510	1.0×10^{-6} – 4×10^{-5}	3.7×10^{-7}	[83]
Cu^{2+} (КО)	 (CH_3CN)		338, 365	443–468	2×10^{-6} – 8×10^{-6}	1.8×10^{-8}	[86]

Таблица 1. Продолжение

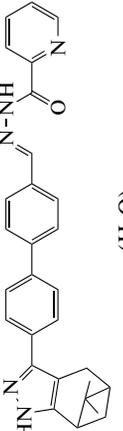
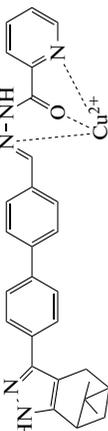
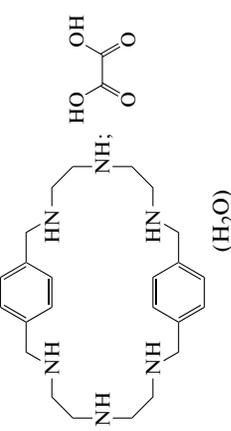
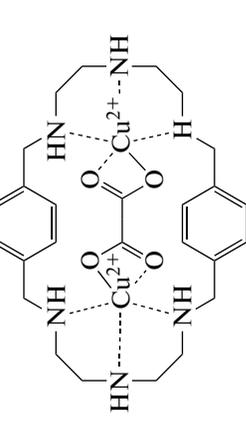
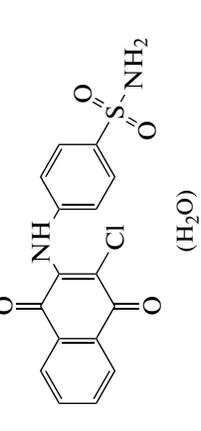
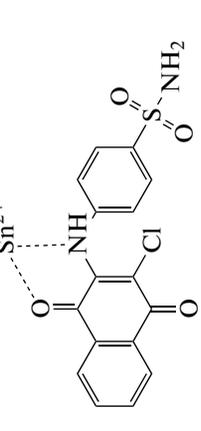
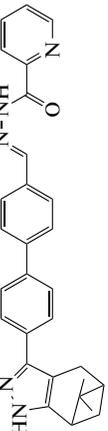
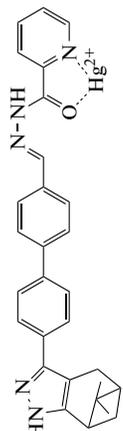
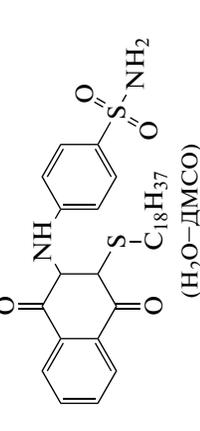
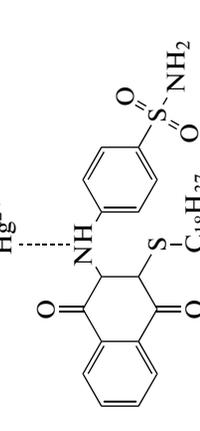
Аналит (тип реакции)	Реагент (реакционная среда*)	Продукт	λ_{ex} , нм	λ_{em} (λ_{max}), нм	Диапазон линейности, М	Минимальная определяемая концентрация, М	Литера- тура
Cu^{2+} (КО)	 (H_2O)		365	460	$1.0 \times 10^{-6} - 2.0 \times 10^{-5}$	1.7×10^{-7}	[87]
Cu^{2+} (КО)	 (H_2O)		485	528	$1.0 \times 10^{-6} - 1.2 \times 10^{-4}$	6×10^{-7}	[88]
Sn^{2+} (КО)	 (H_2O)		280	397	$1 \times 10^{-7} - 6 \times 10^{-5}$	1.2×10^{-7}	[89]
Hg^{2+} (КО)	 (H_2O)		365	460	$1 \times 10^{-6} - 2 \times 10^{-5}$	1.5×10^{-7}	[87]
Hg^{2+} (КО)	 ($\text{H}_2\text{O}-\text{DMCO}$)		270	330, 470	$1.25 \times 10^{-4} - 1.25 \times 10^{-3}$	4.5×10^{-7}	[90]

Таблица 1. Продолжение

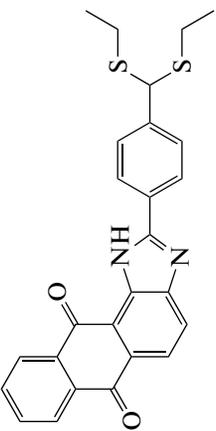
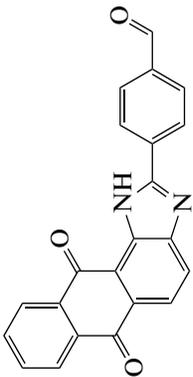
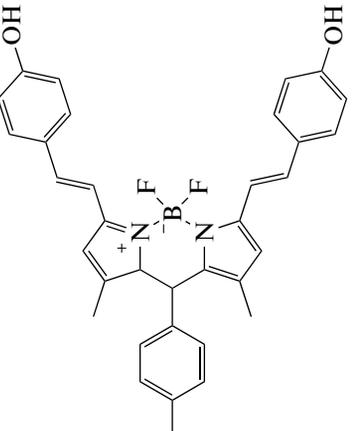
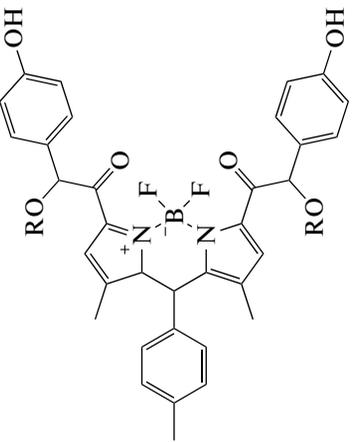
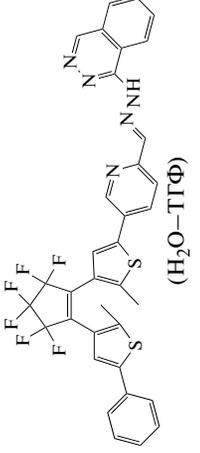
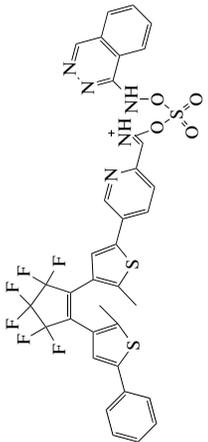
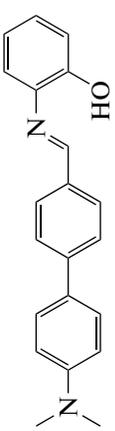
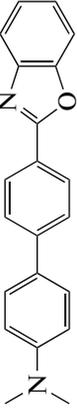
Аналит (тип реакции)	Реагент (реакционная среда*)	Продукт	λ_{ex} , нм	λ_{em} (λ_{max}), нм	Диапазон линейности, М	Минимальная определяемая концентрация, М	Литера- тура
Hg^{2+} (9)	 ($\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{OH}$)		390	544	1×10^{-8} – 1×10^{-6}	8.2×10^{-9}	[127]
Au^{3+} (ОВР)	 ($\text{H}_2\text{O}, \text{CH}_3\text{OH}$)		540	590	2.5×10^{-6} – 7.5×10^{-6}	9.4×10^{-9}	[92]
HSO_4^- (КО)	 ($\text{H}_2\text{O}-\text{ТГФ}$)		400	491	–	–	[85]
HCN (ОЦ)	 ($\text{H}_2\text{O}-\text{ТГФ}$)		365	477	1×10^{-7} – 1×10^{-6}	6.4×10^{-9}	[128]

Таблица 1. Продолжение

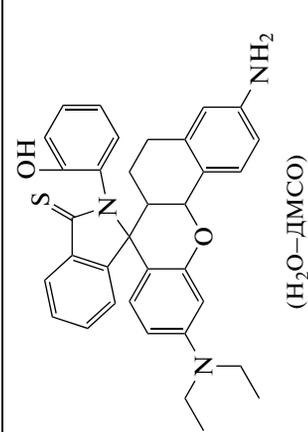
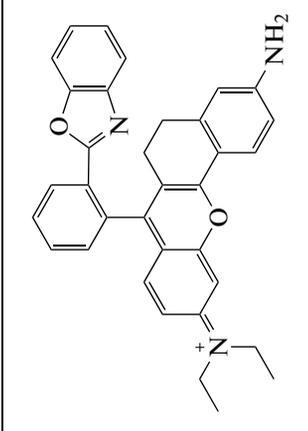
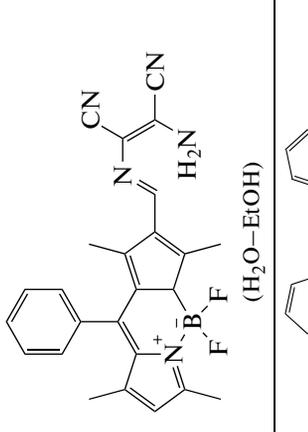
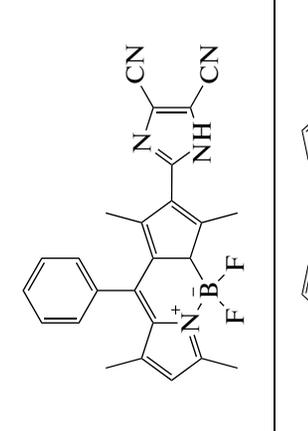
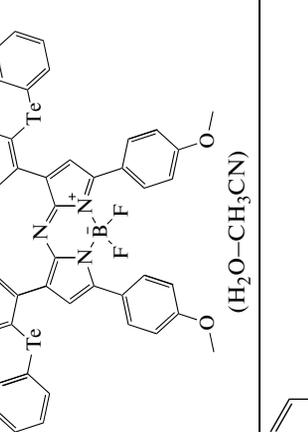
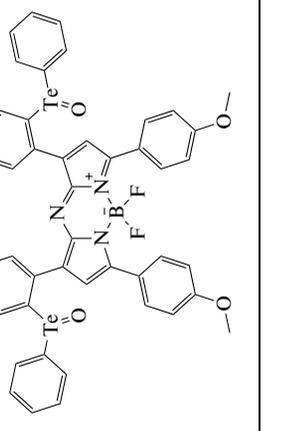
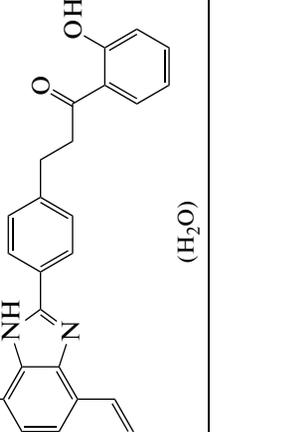
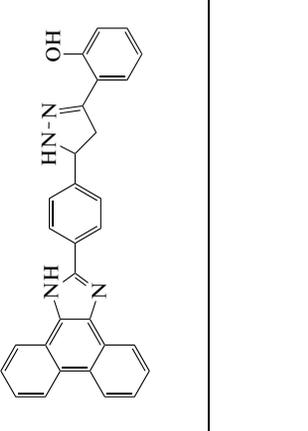
Аналит (тип реакции)	Реагент (реакционная среда*)	Продукт	λ_{ex} , нм	λ_{em} (λ_{max}), нм	Диапазон линейности, М	Минимальная определяемая концентрация, М	Литера- тура
HClO (ОЦ)	 (H ₂ O-DMCO)		550	630	1×10^{-7} – 2×10^{-6}	4×10^{-8}	[94]
HClO (ОЦ)	 (H ₂ O-EtOH)		485	508	1×10^{-6} – 2.5×10^{-4}	1.2×10^{-7}	[95]
HClO (ОВР)	 (H ₂ O-CH ₃ CN)		630	738	1×10^{-6} – 3×10^{-5}	9×10^{-8}	[76]
N ₂ H ₄ (СЦ)	 (H ₂ O)		380	440, 565	1×10^{-6} – 1×10^{-4}	7.4×10^{-8}	[72]

Таблица 1. Продолжение

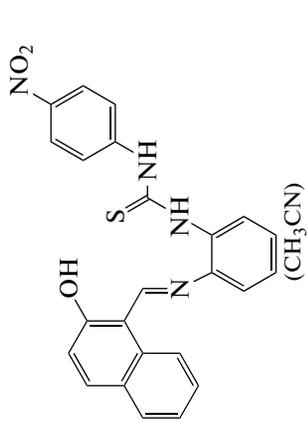
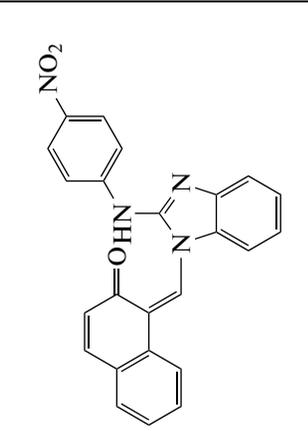
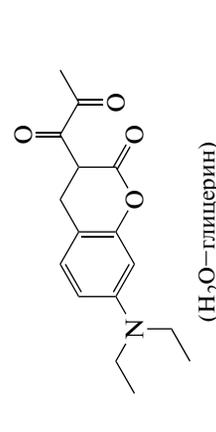
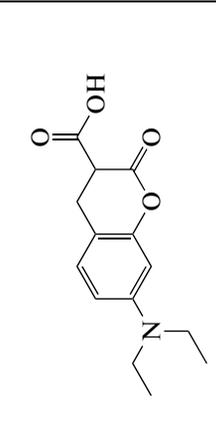
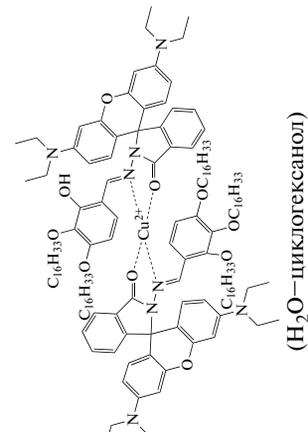
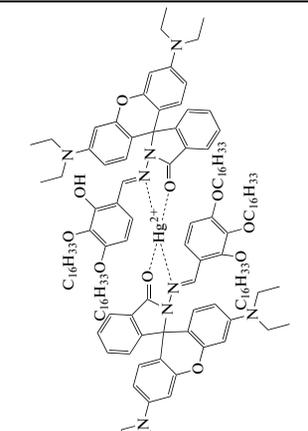
Аналит (тип реакции)	Реагент (реакционная среда*)	Продукт	λ_{ex} , нм	λ_{em} (λ_{max}), нм	Диапазон линейности, М	Минимальная определяемая концентрация, М	Литера- тура
Hg^{2+} (Э)			350	390, 458, 510	1×10^{-6} – 1×10^{-5} 1×10^{-5} – 4×10^{-5}	4×10^{-8}	[80]
NO_2^- (Э)	 (H_2O –глицерин)		–	490	1×10^{-6} – 1×10^{-4}	1×10^{-8}	[106]
Hg^{2+} (КО)	 (H_2O –циклогексанол)		530	580	–	5.7×10^{-10}	[104]
H_2PO_4^- (Э)	$\text{ZrO}_2 \cdot \text{Yb}_2 \text{Er} @ \text{ZrO}_2 - \text{FG}^{***}$ (H_2O)	$\text{ZrO}_2 \cdot \text{Yb} (\text{Er} @ \text{ZrO}_2) \text{H}_2\text{PO}_4^-$	975	620, 730****	2×10^{-8} – 1×10^{-6}	2×10^{-8}	[129]

Таблица 1. Продолжение

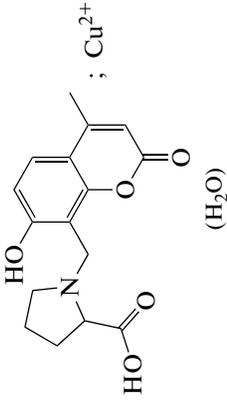
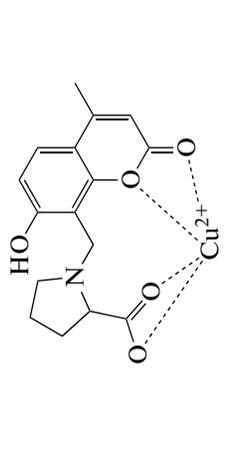
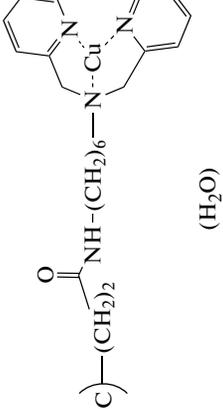
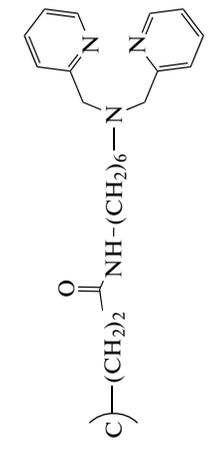
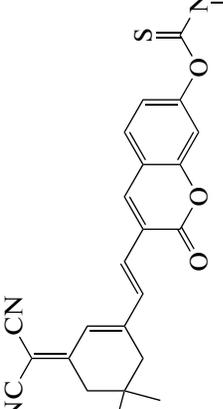
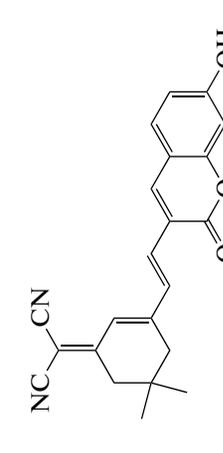
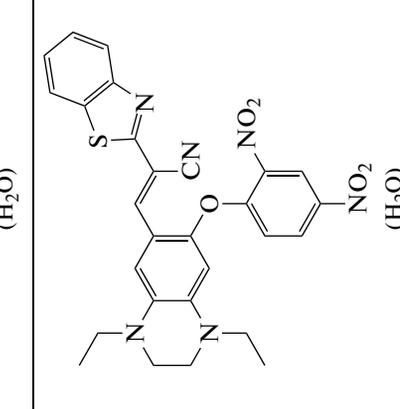
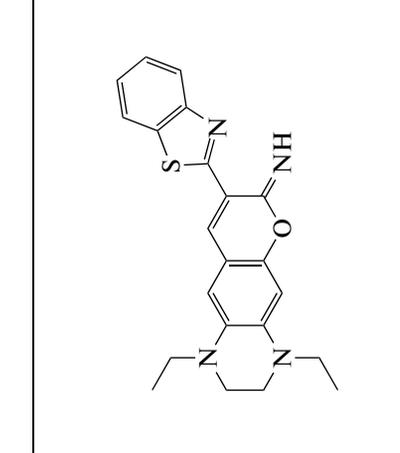
Аналит (тип реакции)	Реагент (реакционная среда*)	Продукт	λ_{ex} , нм	λ_{em} (λ_{max}), нм	Диапазон линейности, М	Минимальная определяемая концентрация, М	Литера- тура
$\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ (КО)	 ; Cu^{2+} (H_2O)		316	445	2×10^{-6} – 4×10^{-5}	4.5×10^{-7}	[107]
$\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ (КО)	 (H_2O)		340	450	2×10^{-6} – 1.8×10^{-4}	2.5×10^{-8}	[105]
HClO (Э)	 (H_2O)		510	700	1×10^{-7} – 4×10^{-6}	4×10^{-9}	[96]
H_2S (Э, ВЦ)	 (H_2O)		526	652	2×10^{-5} – 7×10^{-5}	3.8×10^{-8}	[100]

Таблица 1. Продолжение

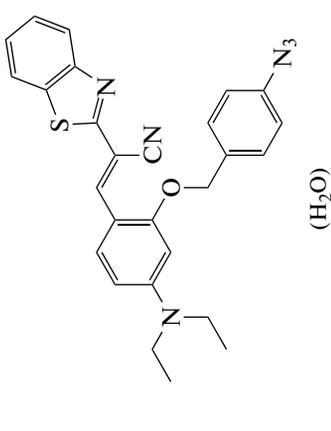
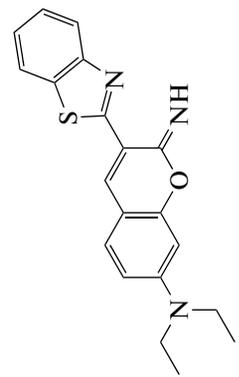
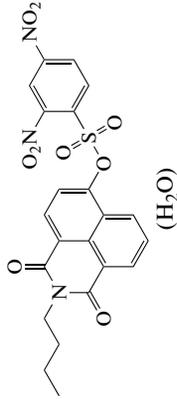
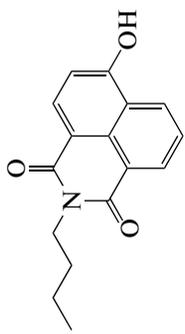
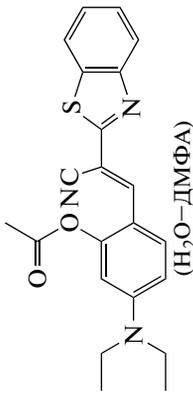
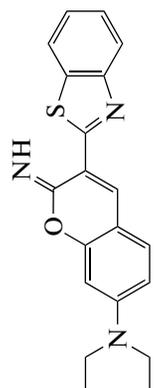
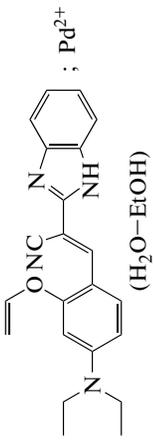
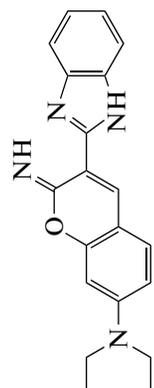
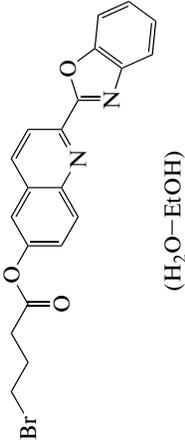
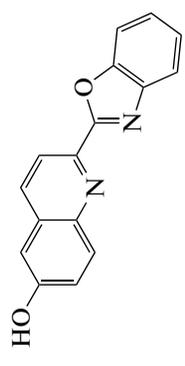
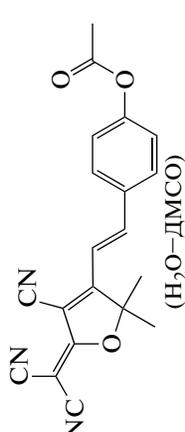
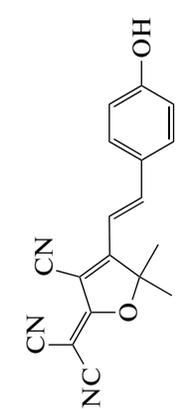
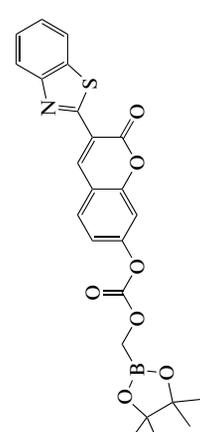
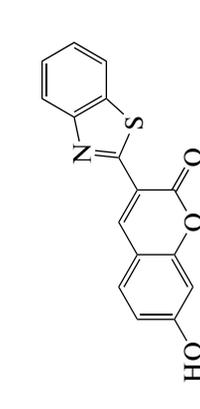
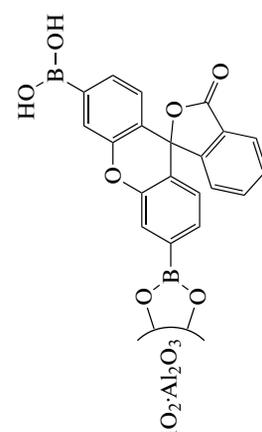
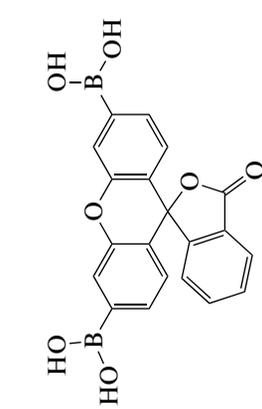
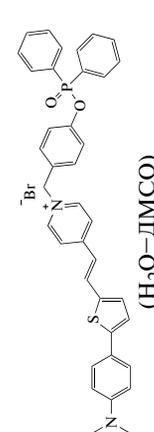
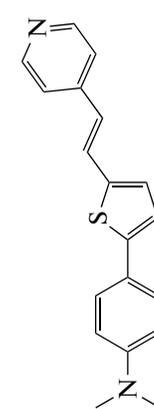
Аналит (тип реакции)	Реагент (реакционная среда*)	Продукт	λ_{exc} , нм	λ_{em} (λ_{max}), нм	Диапазон линейности, М	Минимальная определяемая концентрация, М	Литера- тура
H_2S (Э, ВЦ)	 (H_2O)		465	520	1×10^{-6} – 1×10^{-4}	1.5×10^{-7}	[101]
H_2S (Э)	 (H_2O)		450	560	1×10^{-6} – 5×10^{-5}	8×10^{-8}	[97]
N_2H_4 (Э, ВЦ)	 (H_2O -ДМФА)		420	522	1.4×10^{-7} – 1.2×10^{-4}	4×10^{-8}	[102]
N_2H_4 (Э, ВЦ)	 (H_2O -EtOH)		430	519	1×10^{-7} – 1×10^{-5}	2.6×10^{-8}	[103]
N_2H_4 (Э)	 (H_2O -EtOH)		360	387, 521	1×10^{-6} – 5×10^{-5}	5.8×10^{-9}	[98]

Таблица 1. Окончание

Аналит (тип реакции)	Реагент (реакционная среда*)	Продукт	λ_{exc} , нм	λ_{em} (λ_{max}), нм	Диапазон линейности, М	Минимальная определяемая концентрация, М	Литера- тура
N_2H_4 (Э)	 ($H_2O-DMSO$)		580	610	$1 \times 10^{-6} - 5 \times 10^{-5}$	1.6×10^{-7}	[99]
H_2O_2 (Э)	 ($H_2O-DMSO$)		475	495	$1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-4}$	4.7×10^{-7}	[130]
H_2O_2 (Э)	 (H_2O)		488	510	$5 \times 10^{-5} - 5 \times 10^{-3}$	1×10^{-7}	[131]
HO_2 (Э)	 ($H_2O-DMSO$)		418	635	$3 \times 10^{-5} - 7 \times 10^{-5}$	2.2×10^{-8}	[112]

* Состав растворителя, в котором происходит флуоресцентное определение аналита.

** "—" — нет данных.

*** Водный золь наночастиц $ZrO_2:Yb,Er@ZrO_2$, стабилизированных красителем fast green FCF (FG-3).

**** Для построения градуировочной зависимости использована суммарная интенсивность излучения при 620 и 730 нм.

Таблица 2. Методики количественного флуоресцентного "turn-on" определения органических аналитов

Аналит (тип реакции)	Реагент (реакционная среда*)	Продукт	λ_{ex} , нм	λ_{em} (λ_{max}), нм	Диапазон линейности, M^{**}	Минимальная определяемая концентрация, M	Литера- тура
 (KO)	 (H_2O)		516	613	—	—	[108]
 (KO)	 (H_2O -ДМСО)		450	515	1×10^{-6} – 5×10^{-5}	3.7×10^{-8}	[109]
 (KO)	 (H_2O -ДМСО)		450	515	1×10^{-6} – 5×10^{-5}	5.2×10^{-8}	[109]
 (KO)	 (H_2O)		330	450	5×10^{-6} – 1×10^{-4}	4×10^{-7}	[110]

Таблица 2. Продолжение

Аналит (тип реакции)	Реагент (реакционная среда*)	Продукт	λ_{ex} , нм	λ_{em} (λ_{max}), нм	Диапазон линейности, М**	Минимальная определяемая концентрация, М	Литера- тура
(КО)	ДНК, модифицированная 2-аминопурином; Hg ²⁺ (H ₂ O)		300	368	4×10^{-10} – 4×10^{-8}	1.6×10^{-10}	[111]
(OBP)	 (H ₂ O–CH ₃ CN)		400	560	1×10^{-6} – 4×10^{-5}	6×10^{-9}	[112]
(КО)	 (H ₂ O)		499	513	4×10^{-6} – 1.2×10^{-5}	3×10^{-9}	[133]
(Э)	 (H ₂ O–EtOH)		480	640	1×10^{-6} – 4×10^{-5}	7.2×10^{-6}	[113]
(Э)	 (H ₂ O)		390	485	5×10^{-7} – 1×10^{-5}	2.6×10^{-8}	[114]

Таблица 2. Продолжение

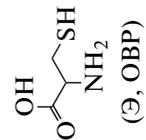
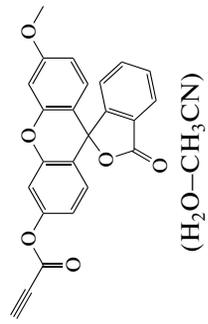
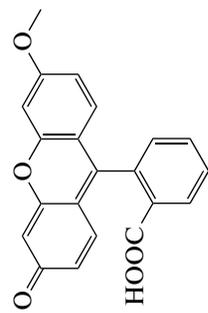
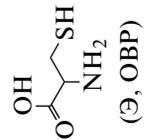
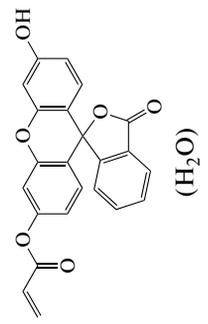
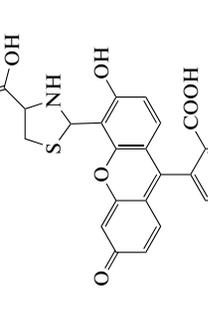
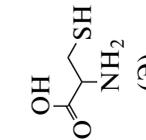
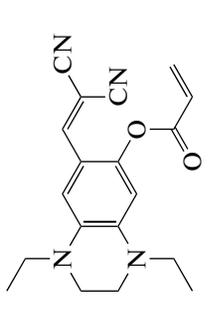
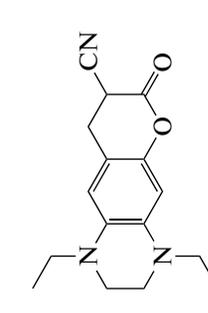
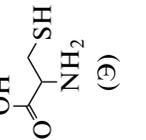
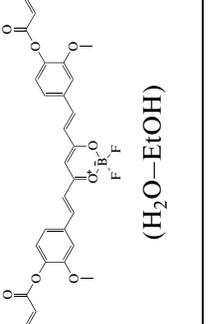
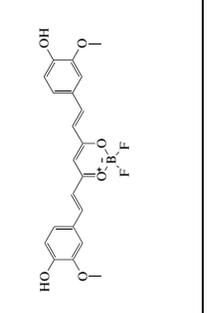
Аналит (тип реакции)	Реагент (реакционная среда*)	Продукт	λ_{exc} , нм	λ_{em} (λ_{max}), нм	Диапазон линейности, M^{**}	Минимальная определяемая концентрация, M	Литера- тура
 (Э, ОВР)	 (H_2O-CH_3CN)		460	515	$1 \times 10^{-7} - 9 \times 10^{-7}$	1.8×10^{-8}	[73]
 (Э, ОВР)	 (H_2O)		365	525	$1 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-5}$	6.2×10^{-8}	[74]
 (Э)	 (H_2O)		471	637	—	2.5×10^{-7}	[75]
 (Э)	 ($H_2O-EtOH$)		520	615	$3 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-4}$	1.6×10^{-6}	[115]

Таблица 2. Продолжение

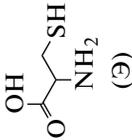
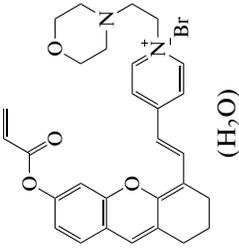
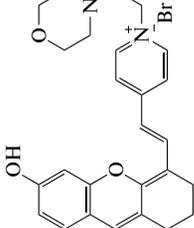
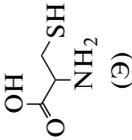
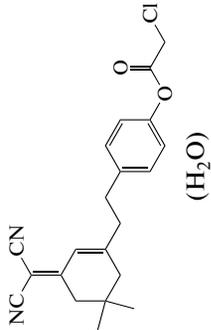
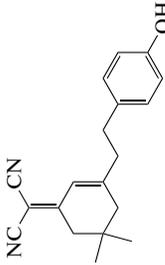
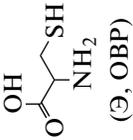
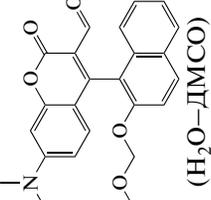
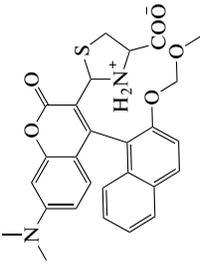
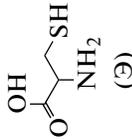
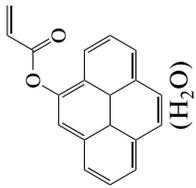
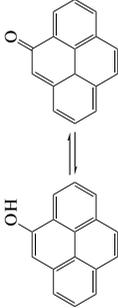
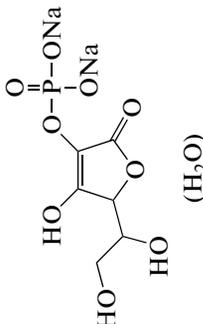
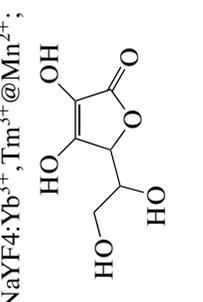
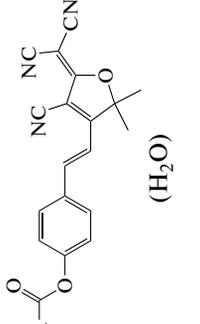
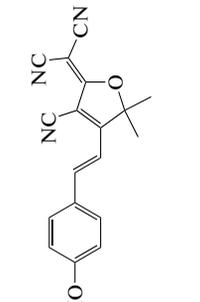
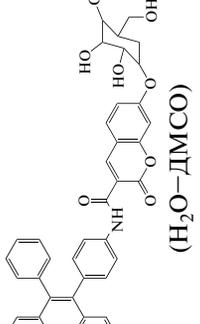
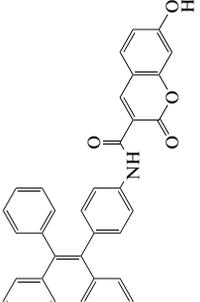
Аналит (тип реакции)	Реагент (реакционная среда*)	Продукт	λ_{ex} , нм	λ_{em} (λ_{max}), нм	Диапазон линейности, М**	Минимальная определяемая концентрация, М	Литера- тура
 (\ominus)	 (H_2O)		—	674	$1 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-5}$	9.6×10^{-7}	[116]
 (\ominus)	 (H_2O)		414	590	$1 \times 10^{-6} - 3 \times 10^{-5}$	7×10^{-7}	[117]
 (\ominus , ОВР)	 (H_2O -ДМСО)		370	470	—	—	[118]
 (\ominus)	 (H_2O)		365	512	$2 \times 10^{-6} - 2 \times 10^{-5}$	6.2×10^{-8}	[119]

Таблица 2. Окончание

Аналит (тип реакции)	Реагент (реакционная среда*)	Продукт	λ_{ex} , нм	λ_{em} (λ_{max}), нм	Диапазон линейности, M ^{**}	Минимальная определяемая концентрация, M	Литера- тура
			540– 565	605–660	1×10^{-6} – 4×10^{-5}	1.9×10^{-8}	[120]
			337	420	1×10^{-6} – 1.5×10^{-5}	4.5×10^{-8}	[134]
			350	470	5×10^{-8} – 4×10^{-5}	1.2×10^{-8}	[135]

* Состав растворителя, в котором происходит флуоресцентное определение аналита. ** “–” — нет данных.

Таблица 3. Методики количественного определения биоорганических аналитов на основе “возникающей флуоресценции”

Аналит (тип реакции)	Реагент (реакционная среда*)	Продукт	λ_{ex} , нм	λ_{em} (λ_{max}), нм	Диапазон линейности	Минимальная определяемая концентрация	Литература
Щелочная фосфатаза (Э)	$NaYF_4:Yb^{3+}, Tm^{3+}@MnO_2;$  (H_2O)	$NaYF_4:Yb^{3+}, Tm^{3+}@Mn^{2+};$ 	980	471	0.25–150 мЕд/мл	0.045 мЕд/мл	[124]
Эстераза печени свиный (Э)	 (H_2O)		542	606	1–100 мЕд/мл	0.45 мЕд/мл	[121]
β -Галактозидаза (Э)	 $(H_2O-DMSO)$		380	445	50–400 мЕд/мл	0.084 мЕд/мл	[122]

* Состав растворителя, в котором происходит флуоресцентное определение аналита.

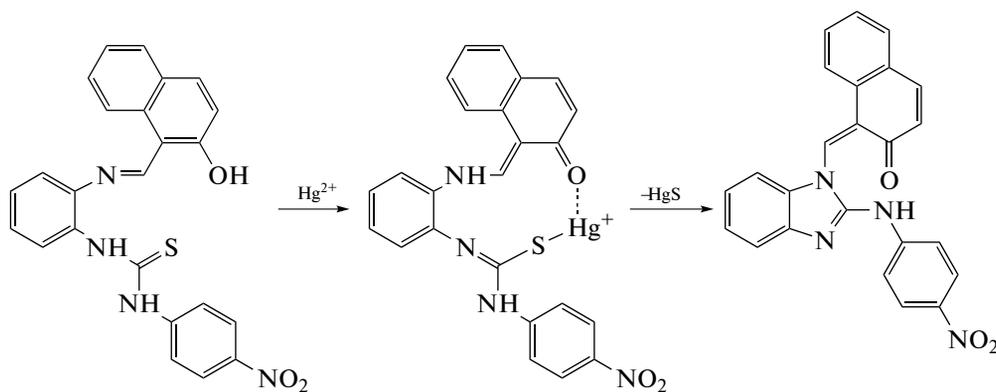


Схема 2. Формирование комплексов ионов Hg^{2+} и производных тиомочевины.

Подобное поведение аналита делает это превращение похожим на реакции, в которых он выполняет роль агента, способствующего удалению из молекулы тушащих флуоресценцию функциональных групп.

Окислительно-восстановительные реакции с участием ионов Au^{3+} также могут быть использованы для трансформаций органических соединений, приводящих к формированию флуорофоров с существенно большим квантовым выходом [92] (схема 3).

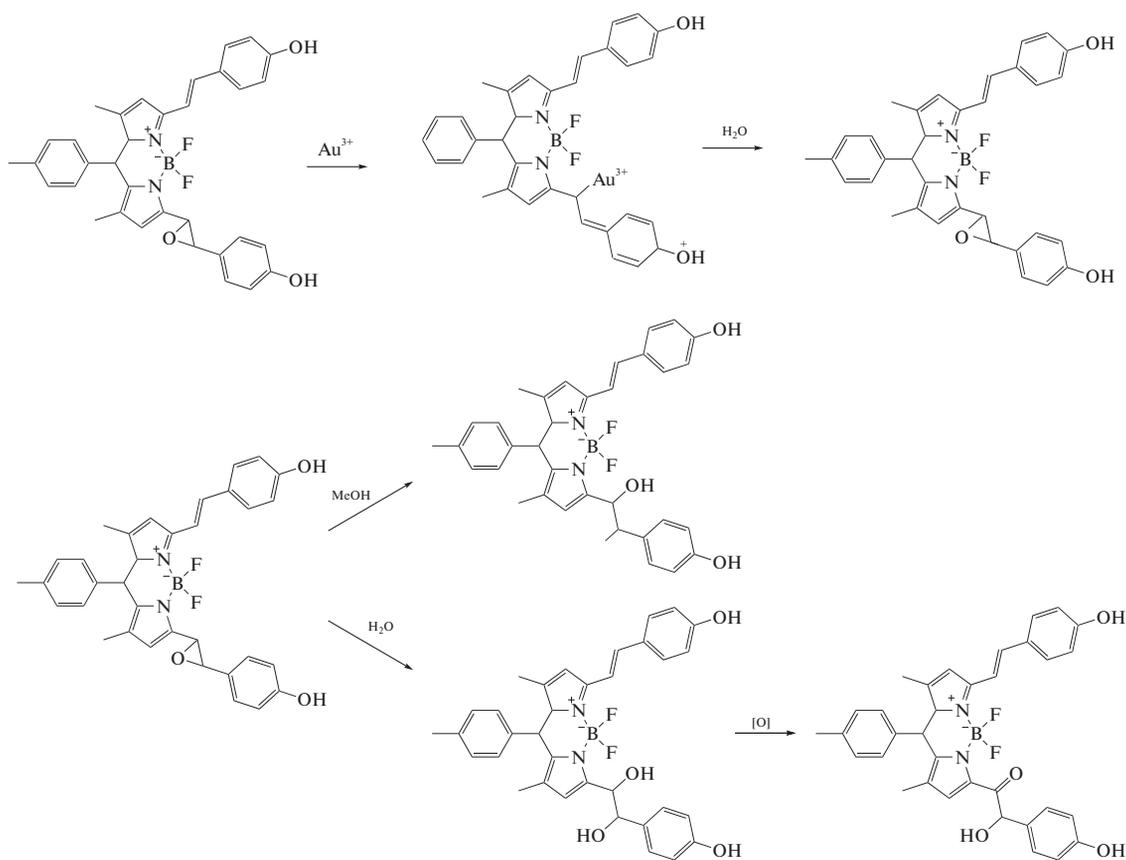


Схема 3. Получение производных органических красителей, обладающих высоким квантовым выходом, путем окислительно-восстановительных реакций с ионами Au^{3+} .

Интересной разновидностью реакций КО является связывание анионов с ароматическими реа-

гентами. К этому типу относится взаимодействие замещенного гидразина с анионом гидросульфата

[85] и ассоциация ионов дигидрофосфата с производными карбазолов [93]. Природа ВФ при образовании межмолекулярного комплекса аниона с органическим соединением остается не вполне понятной. Указание на образование водородных связей само по себе не объясняет эффекта: в упомянутых работах определение проводили в водно-органических растворах, соответственно можно гово-

рить лишь о замене одних водородных связей другими.

В ряде случаев окислительные свойства аналита могут быть использованы для получения целевого продукта с удлиненной цепью сопряжения. Так гипохлорит-ион определяют по ВФ на основе реакций с образованием новых кислород- или азотсодержащих циклов [94, 95] (схема 4).

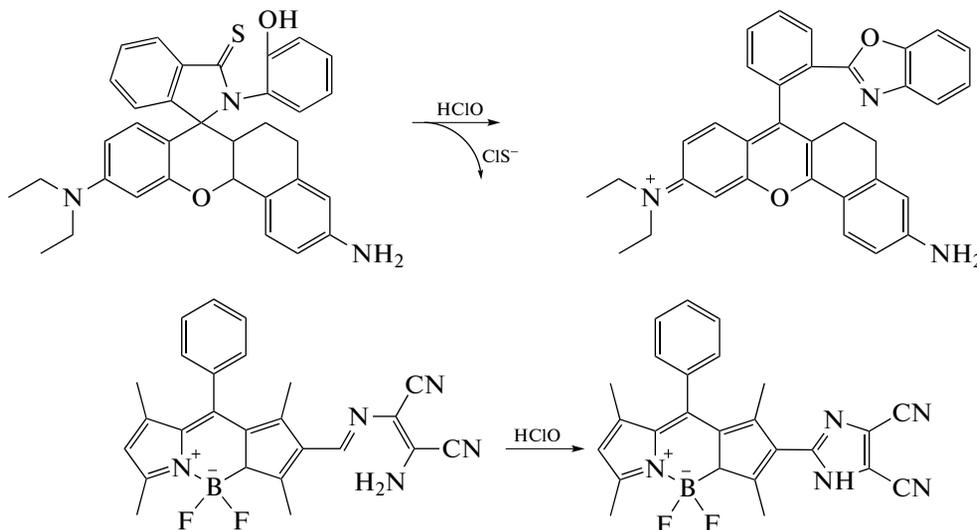


Схема 4. Реакции окислительной гетероциклизации с участием гипохлорит-ионов.

Приведенные химические превращения сочетают расширение системы сопряженных связей с удалением тушащих функциональных групп. Авторами работ [94, 95] разработаны методики определения гипохлорит-ионов в области низких концентраций.

Этерификация гидроксильных групп в ароматических соединениях обычно снижает интенсивность излучения по отношению к исходным фенолам. В ряде работ [96–99] авторы используют реакции разрушения сложных эфиров с целью повышения квантового выхода флуоресценции.

Формирование новых структурных фрагментов, обладающих интенсивной флуоресценцией, возможно за счет реакций циклизации, происходящих при участии аналита [97, 100–103]. К отдельному типу взаимодействий можно отнести реакции конкурентного комплексообразования, приводящие к существенному увеличению флуоресценции ее продуктов [104, 105].

Наличие в окружающей среде аниона пероксинитрита способствует окислению diketonoвого фрагмента до карбоксила [106] (схема 5).

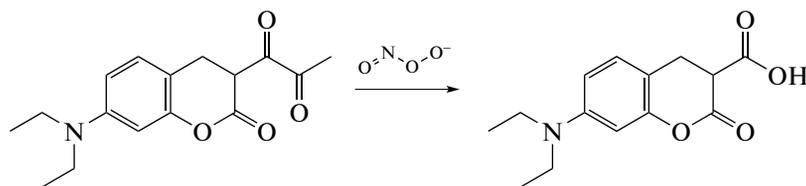


Схема 5. Окисление diketонов ионами пероксинитрита.

Интенсивность флуоресценции в области 490 нм возрастает на два порядка при наличии в пробе пероксинитрита на уровне 10 мкМ. Анион пероксинитрита образуется при реакции оксида азота(II) с анион-радикалом O_2^- . Эта методика может быть использована для их определения.

Винильные производные орто-замещенных фенолов не обладают интенсивной флуоресценцией. Их взаимодействие с сероводородом или сульфид-ионом приводит к формированию гетероциклических кислородсодержащих соединений [100, 101] (схема 6).

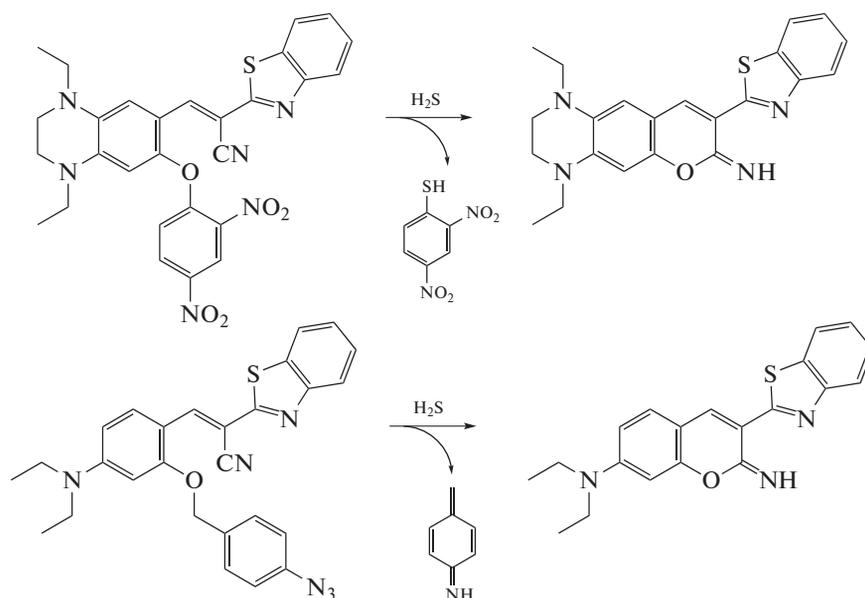


Схема 6. Реакции гетероциклизации, происходящие с участием сульфидов.

В отличие от исходных соединений, продукты реакции под действием внешнего излучения способны к флуоресценции, что может быть положено в основу методики определения сероводорода или сульфидов на микромолярном уровне.

Взаимодействие гидразина с нефлуоресцирующими простыми и сложными эфирами фенолов приводит к циклизации и освобождению ОН-групп [98, 99, 102, 103]. В результате образуются продукты, обладающие интенсивной флуоресценцией (схема 7).

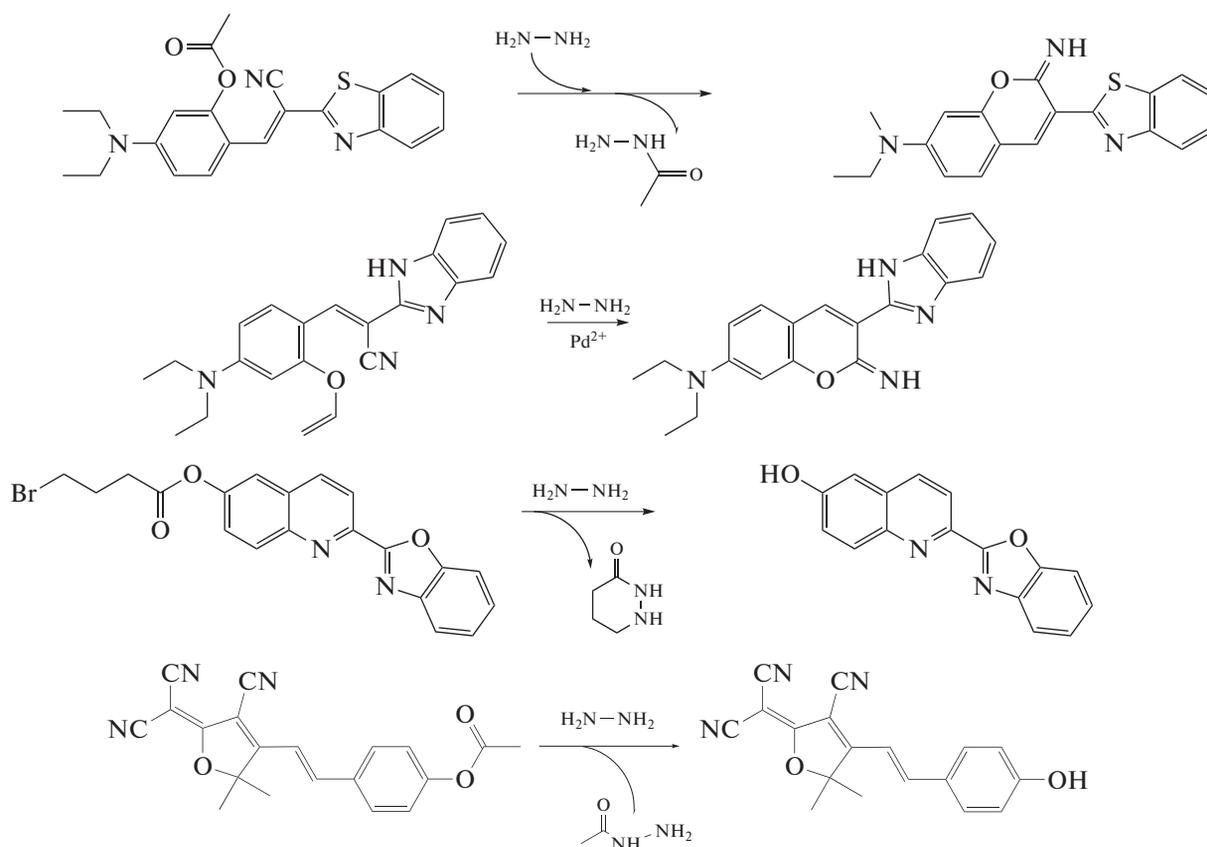


Схема 7. Реакции элиминирования подавляющих флуоресценцию фрагментов с участием гидразина.

Наличие следовых количеств катионов Hg^{2+} может быть зафиксировано за счет обменной ре-

акции комплексов Cu^{2+} с замещенными родаминами [104] (схема 8).

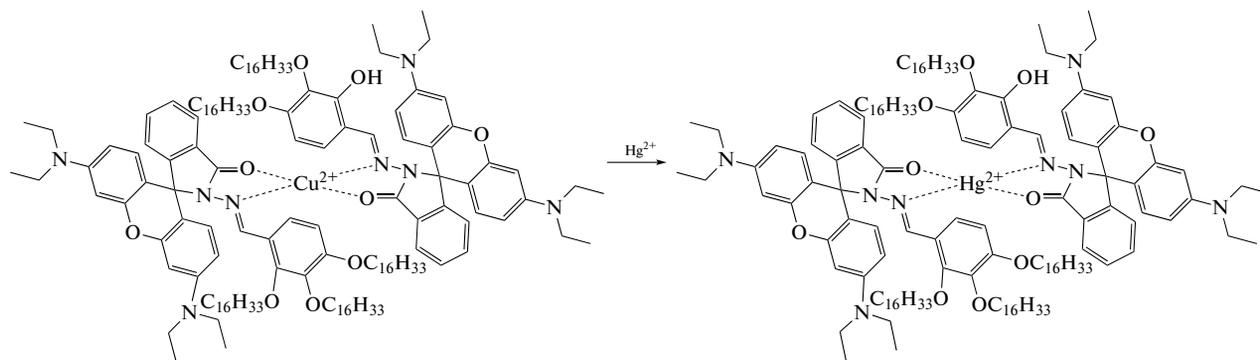


Схема 8. Конкурентное комплексообразование между ионами Cu^{2+} и Hg^{2+} .

Интенсивность флуоресценции при замещении центрального иона меди(II) ионом ртути(II) возрастает примерно на порядок в области следовых концентраций. Предел обнаружения методики составляет менее 1 нМ.

Авторы работы [107] предложили подобный синтетический подход. Исходное соединение

– краситель, обладающий собственной интенсивной флуоресценцией, обрабатывают соединениями меди. Полученный таким образом нефлуоресцирующий комплекс способен к селективной реакции с ионами пирофосфата (схема 9).

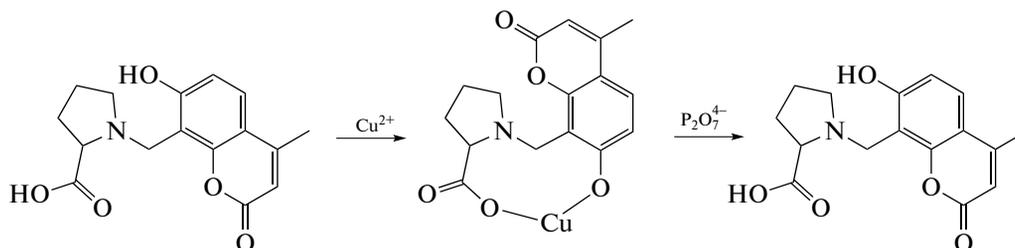


Схема 9. Определение ионов пирофосфата за счет разрушения нефлуоресцирующих комплексов меди.

В ходе этого взаимодействия происходит необратимое связывание ионов меди и пирофосфата, удаление полученного продукта из ближней сферы коррелирует с количественным содержанием пирофосфата в области следовых концентраций. Примеры ВФ, описанные в работах [104, 107], соответствуют схеме, представленной на рис. 3.

Использование гетерогенных систем – золь неорганических наночастиц, содержащих на поверхности привитой слой, имеет свои особенности. До взаимодействия с аналитом такие системы могут либо вовсе не обладать собственной флуоресценцией, либо она может существенно тушиться за счет безызлучательного переноса энергии возбужденного состояния. Трехкомпонентный наноконкомпозит, включающий наночастицы магнетита, наночастицы золота и изотиоцианат флуоресцина, обладает собственной флуоресценцией с максимумом в области 520 нм. В присутствии ионов Pb^{2+} и тиосульфата происходит резкое увеличение интенсивности флуо-

ресценции [91]. Этот эффект авторы связывают с вытеснением с поверхности наноконкомпозита в объем раствора изотиоцианата флуоресцина с сопутствующим снижением вероятности безызлучательного переноса энергии между возбужденным состоянием красителя и наночастицами золота.

Изложенные выше общие принципы неорганического и органического анализа практически не различаются. Комплексообразование между флуорофором и аналитом, приводящее к существенному увеличению интенсивности свечения, с успехом может быть применено в органическом анализе. Так, продукт тройного взаимодействия макроциклического лиганда с ионами никеля и щавелевой кислотой используют для определения последней [108]. Деление анализа на органический и неорганический в этом случае весьма условно, так как в предыдущем разделе обзора описан сходный комплекс ионов меди с оксалатом [88]. При образовании комплексов аргинина и лизина с замещенными гидразонами интенсив-

ность флуоресценции последних возрастает более чем на порядок в области концентраций аминокислот на уровне единиц—десятков мкМ [109]. Формирование межмолекулярных комплексов фолиевой кислоты с замещенными флуоренами повышает квантовый выход флуоресценции последних на два порядка величины [110]. Модифицированная 2-аминопурином ДНК в сочетании с ионами ртути способна к селективному взаимодействию с цистеином, продуктом которого является тройной комплекс, обладающий достаточно высокими значениями квантового выхода флуоресценции [111]. Это позволяет количественно

определять цистеин (в том числе в биообъектах) на наномолярном уровне.

Химические реакции с участием органических аналитов способны приводить к образованию продуктов, обладающих интенсивной флуоресценцией. Так, ОВР между фенантролиновыми комплексами иридия и глутатионом представляет собой триггерный хемилюминесцентный процесс, количественные характеристики которого могут быть использованы в органическом анализе [112] (схема 10).

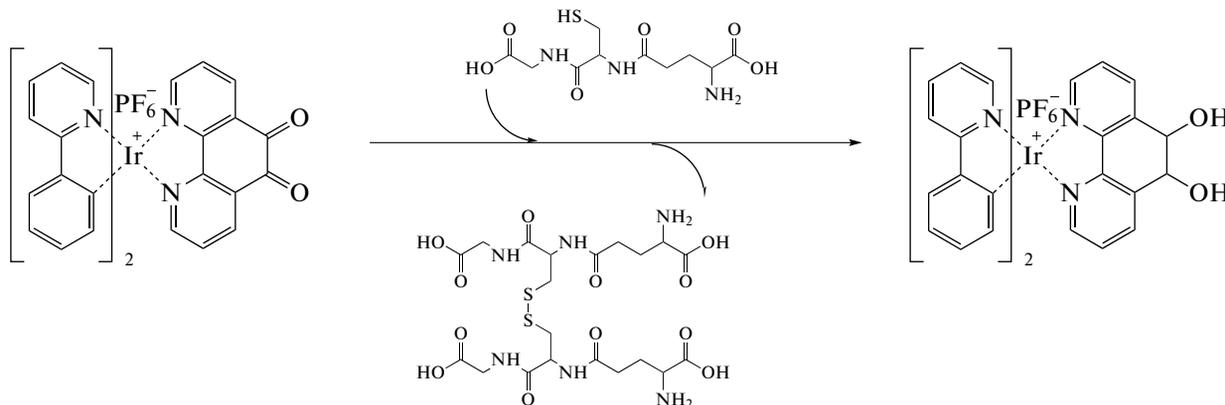


Схема 10. Определение глутатиона за счет окислительно-восстановительной реакции, приводящей к комплексу иридия, обладающим интенсивной флуоресценцией.

Как отмечено выше в связи с определением гидразина, сложноэфирные группы, связанные непосредственно с бензольным кольцом или полициклическим ароматическим фрагментом, часто снижают квантовый выход флуоресценции.

Цистеин при взаимодействии с этими группами образует семичленное гетероциклическое соединение, за счет чего происходит освобождение фенольного гидроксила [113] и возникает ВФ (схема 11).

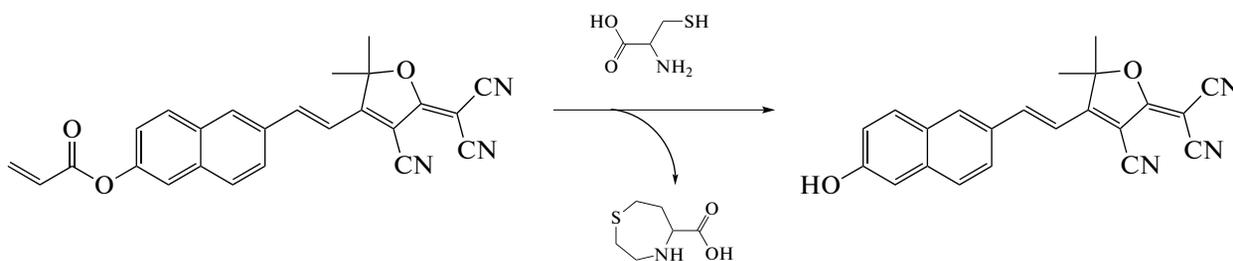


Схема 11. Определение цистеина за счет реакции элиминирования тушащей флуоресценцию функциональной группы красителя.

Такого рода превращения могут лежать в основе методик флуоресцентного определения цистеина [73–75, 113–119] или его селенсодержащего аналога [120].

Упоминание эффекта ВФ в биоорганическом анализе в настоящее время встречается в единичных работах [121–123]. Соответствующие методики представляют собой адаптацию аналогов, используемых в неорганическом или органическом анализе. Так, аскорбиновая кислота или фенолсодержащий краситель генерируются за счет раз-

рушения эфиров фосфорной или карбоновой кислот под действием щелочной фосфатазы [124], эстеразы [121], β -галактозидазы [122]. Далее фактически определяют продукты реакции – аскорбиновую кислоту или нативный флуорофор (краситель). В работе [124] использовали весьма необычный вид элиминирования тушителя. Фосфорилированная аскорбиновая кислота не восстанавливает MnO_2 , входящий в состав наночастиц. Под действием щелочной фосфатазы образуется свободная аскорбиновая кислота, кото-

рая реагирует с диоксидом марганца с образованием ионов Mn^{2+} , что сопровождается ВФ. Авторами в этом случае использована антистоксова флуоресценция наночастиц (upconversion nanoparticles).

* * *

Термин “возникающая флуоресценция” (ВФ) (turn-on fluorescence) объединяет работы существенно различного направления и степени новизны. Сюда относят как новые (но по духу традиционные) ароматические хелаты для определения неорганических катионов, так и селективные реагенты на органические аналиты, действие которых основано на межмолекулярных взаимодействиях, природа которых не всегда понятна. Появление или существенное повышение интенсивности собственной флуоресценции органического соединения при взаимодействии с аналитом может быть обусловлено либо разрушением исходных структур, либо синтезом новых. К первому случаю можно отнести элиминирование функциональных групп, обладающих тушащим эффектом, ко второму – формирование новых структурных фрагментов (обычно новых циклов), повышающих интенсивность излучения. Оба процесса допускают ковалентную и координационную реализацию. Нередко они протекают одновременно. Отдельный интересный раздел – ВФ при образовании межмолекулярных комплексов без изменения системы ковалентных и координационных связей. Такие системы, пока немногочисленные, применяются для определения некоторых анионов или нейтральных органических молекул по ВФ ароматических реагентов.

Практически неисследованной в настоящее время остается область, в которой аналит является катализатором целевой реакции. Пока что в литературе имеются лишь единичные работы по этой тематике, причем в них описываются биоорганические катализаторы – ферменты. Поиск традиционных катализаторов реакций с ВФ, их практическое использование могут лежать в основе нового направления определения сверхмалых содержаний вещества.

Работа выполнена по теме госзадания ГЕОХИ РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Константинова-Шлезингер М.А. Люминесцентный анализ. М.: Изд-во АН СССР, 1951. 66 с.
2. Гладков А.А. Люминесцентный анализ в медицине. Кишинев: КГУ, 1958. 389 с.
3. Божевольнов Е.А. Люминесцентный анализ неорганических веществ. М.: Химия, 1966. 416 с.
4. Головина А.П., Левшин Л.В. Химический люминесцентный анализ неорганических веществ. М.: Химия, 1978. 248 с.
5. Красников В.В., Тимошкин Е.И., Туткова А.В. Спектральный люминесцентный анализ пищевых продуктов. М.: Агропромиздат, 1987. 288 с.
6. Люминесцентный анализ в медико-биологических исследованиях / Под ред. Соминского В.Н. Рига: РМИ, 1990. 145 с.
7. Gooijer C., Kozijn I., Velthorst N.H. Shpol'skii spectrometry, a distinct method in environmental analysis // Mikrochim. Acta. 1997. V. 127. P. 149. <https://doi.org/10.1007/BF01242719>
8. Fletcher K.A., Fakayode S.O., Lowry M., Tucker S.A., Neal S.L., Kimaru I.W., McCarroll M.E., Patonay G., Oldham P.B., Rusin O., Strongin R.M., Warner I.M. Molecular fluorescence, phosphorescence, and chemiluminescence spectrometry // Anal. Chem. 2006. V. 78. № 12. P. 4047. <https://doi.org/10.1021/ac060683m>
9. Гришаева Т.И. Методы люминесцентного анализа. СПб: АНО НПО “Профессионал”, 2003. 226 с.
10. Siraj N., El-Zahab B., Hamdan S., Karam T.E., Haber L.H., Li M., Fakayode S.O., Das S., Valle B., Strongin R.M., Patonay G., Sintim H.O., Baker G.A., Powe A., Lowry M., Karolin J.O., Geddes C.D., Warner I.M. Fluorescence, phosphorescence, and chemiluminescence // Anal. Chem. 2016. V. 88. № 1. P. 170. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04109>
11. Rodríguez J.J.S., Halko R., Rodríguez J.R.B., Aaron J.J. Environmental analysis based on luminescence in organized supramolecular systems // Anal. Bioanal. Chem. 2006. V. 385. № 3. P. 525. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0342-4>
12. Штыков С.Н., Горячева И.Ю. Аналитическая люминесцентная спектроскопия в микрогетерогенных супра- и надмолекулярных самоассоциирующих организованных средах // Оптика и спектроскопия. 1997. Т. 83. № 4. С. 698 (Shtykov S.N., Goryacheva I.Yu. Luminescent analytical spectroscopy in microheterogeneous supra- and supermolecular self-assembled organized media // Opt. Spectrosc. 1997. V. 83. No 4. P. 645)
13. Абрамова А.М., Горячева О.А., Дрозд Д.Д., Новикова А.С., Пономарева Т.С., Строкін П.Д., Горячева И.Ю. Люминесцентные полупроводниковые квантовые точки в химическом анализе // Журн. аналит. химии. 2021. Т. 76. № 3. С. 19. (Abramova A.M., Goryacheva O.A., Drozd D.D., Novikova A.S., Ponomareva T.S., Strokin P.D., Goryacheva I.Yu. Luminescence semiconductor quantum dots in chemical analysis // J. Anal. Chem. 2021. V. 76. № 3. P. 273. doi: <https://doi.org/10.1134/S1061934821030023>) <https://doi.org/10.31857/S0044450221030026>
14. Smirnova T.D., Shtykov S.N., Zhelobitskaya E.A. Energy transfer in liquid and solid nanoobjects: application in luminescent analysis // Phys. Sci. Rev. 2018. V. 4. № 3. Article 20189981. <https://doi.org/10.1515/psr-2018-9981>
15. Ruedas-Rama M.J., Walters J.D., Orte A., Hall E.A.H. Fluorescent nanoparticles for intracellular sensing: A review // Anal. Chim. Acta. 2012. V. 751. P. 1. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.09.025>
16. Nsibandе S.A., Montaseri H., Forbes P.B.C. Advances in the application of nanomaterial-based sensors for detection of polycyclic aromatic hydrocarbons in aquatic systems // Trends Anal. Chem. 2019. V. 115. P. 52. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.03.029>

17. Zhang Q., Liu P., Li S., Zhang X., Chen M. Progress in the analytical research methods of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) // *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2020. V. 43. № 13–14. P. 425.
<https://doi.org/10.1080/10826076.2020.1746668>
18. Bigdeli A., Ghasemi F., Abbasi-Moayed S., Shahrajabi-an M., Fahimi-Kashani N., Jafarinejad S., Nejad M.A.F., Hormozi-Nezhad M.R. Ratiometric fluorescent nanopores for visual detection: Design principles and recent advances – A review // *Anal. Chim. Acta.* 2019. V. 1079. P. 30.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.06.035>
19. Nawaz H., Zhang X., Chen S., You T., Xu F. Recent studies on cellulose-based fluorescent smart materials and their applications: A comprehensive review // *Carbohydr. Polym.* 2021. V. 267. Article 118135.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118135>
20. Tu D., Zheng W., Huang P., Chen X. Europium-activated luminescent nanopores: From fundamentals to bioapplications // *Coord. Chem. Rev.* 2019. V. 378. P. 104.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.10.027>
21. Rasheed T., Nabeel F. Luminescent metal-organic frameworks as potential sensory materials for various environmental toxic agents // *Coord. Chem. Rev.* 2019. V. 401. Article 213065.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2019.213065>
22. Paderni D., Giorgi L., Fusi V., Formica M., Ambrosi G., Micheloni M. Chemical sensors for rare earth metal ions // *Coord. Chem. Rev.* 2021. V. 429. Article 213639.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213639>
23. Brzechwa-Chodzyńska A., Drożdż W., Harrowfield J., Stefankiewicz A.R. Fluorescent sensors: A bright future for cages // *Coord. Chem. Rev.* 2021. V. 434. Article 213820.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2021.213820>
24. Lakshmi P.R., Nanjan P., Kannan S., Shanmugaraju S. Recent advances in luminescent metal-organic frameworks (LMOFs) based fluorescent sensors for antibiotics // *Coord. Chem. Rev.* 2021. V. 435. Article 213793.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2021.213793>
25. Guo L., Yang L., Li M., Kuang L., Song Y., Wang L. Covalent organic frameworks for fluorescent sensing: Recent developments and future challenges // *Coord. Chem. Rev.* 2021. V. 440. Article 213957.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2021.213957>
26. Hao Z., Zhu R., Chen P.R. Genetically encoded fluorescent sensors for measuring transition and heavy metals in biological systems // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2018. V. 43. P. 87.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.12.002>
27. Zhang H., Ju Q., Pang S., Wei N., Zhang Y. Recent progress of fluorescent probes for the detection of alkaline phosphatase (ALP): A review // *Dyes Pigm.* 2021. V. 194. Article 109569.
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2021.109569>
28. Yang Y., Tu D., Zhang Y., Zhang P., Chen X. Recent advances in design of lanthanide-containing NIR-II luminescent nanopores // *iScience.* 2021. V. 24. Article 102062.
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102062>
29. Mehta V.N., Desai M.L., Basu H., Singhal R.K., Kailasa S.K. Recent developments on fluorescent hybrid nanomaterials for metal ions sensing and bioimaging applications: A review // *J. Mol. Liq.* 2021. V. 333. Article 15950.
<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.115950>
30. Mizukami S. Targetable fluorescent sensors for advanced cell function analysis // *J. Photochem. Photobiol. C.* 2017. V. 30. P. 24.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2017.01.003>
31. Patel S., Jamunkar R., Sinha D., Monisha, Patle T.K., Kant T., Dewangan K., Shrivastava K. Recent development in nanomaterials fabricated paper-based colorimetric and fluorescent sensors: A review // *Trends Env. Anal. Chem.* 2021. V. 31. Article e00136.
<https://doi.org/10.1016/j.teac.2021.e00136>
32. Guo C., Sedgwick A.C., Hirao T., Sessler J.L. Supramolecular fluorescent sensors: An historical overview and update // *Coord. Chem. Rev.* 2021. V. 427. Article 213560.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213560>
33. Hyman L.M., Franz K.J. Probing oxidative stress: Small molecule fluorescent sensors of metal ions, reactive oxygen species, and thiols // *Coord. Chem. Rev.* 2012. V. 256. № 19–20. P. 2333.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.03.009>
34. Kwon N., Kim D., Swamy K.M.K., Yoon J. Metal-coordinated fluorescent and luminescent probes for reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) // *Coord. Chem. Rev.* 2021. V. 427. Article 213581.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213581>
35. Qiao M., Ding L., Lv F. Surfactant assemblies encapsulating fluorescent probes as selective and discriminative sensors for metal ions // *Coord. Chem. Rev.* 2021. V. 432. Article 213696.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213696>
36. Sharma S., Ghosh K.S. Overview on recently reported fluorometric sensors for the detection of copper ion based on internal charge transfer (ICT), paramagnetic effect and aggregation induced emission (AIE) mechanisms // *J. Mol. Struct.* 2021. V. 1237. Article 30324.
<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.130324>
37. Fang Y., Dehaen W. Small-molecule-based fluorescent probes for f-block metal ions: A new frontier in chemosensors // *Coord. Chem. Rev.* 2021. V. 427. Article 213524.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213524>
38. Singh H., Bamrah A., Bhardwaj S.K., Deep A., Khatri M., Kim K.-H., Bhardwaj N. Nanomaterial-based fluorescent sensors for the detection of lead ions // *J. Hazard. Mater.* 2021. V. 407. Article 124379.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124379>
39. Rasheed T., Bilal M., Nabeel F., Iqbal H.M.N., Li C., Zhou Y. Fluorescent sensor based models for the detection of environmentally-related toxic heavy metals // *Sci. Total Environ.* 2018. V. 615. P. 476.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.126>
40. Geraghty C., Wynne C., Elmes R.B.P. 1,8-Naphthalimide based fluorescent sensors for enzymes // *Coord. Chem. Rev.* 2021. V. 437. Article 213713.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213713>
41. Tong X., Shi S., Tong C., Iftikhar A., Long R., Zhu Y. Quantum/carbon dots-based fluorescent assays for enzyme activity // *Trends Anal. Chem.* 2020. V. 131. Article 116008.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116008>
42. Hou J.-T., Zhang M., Liu Y., Ma X., Duan R., Cao X., Yuan F., Liao Y.-X., Wang S., Ren W.X. Fluorescent de-

- tectors for hydroxyl radical and their applications in bioimaging: A review // *Coord. Chem. Rev.* 2020. V. 421. Article 213457.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213457>
43. Zhang Z., Fan J., Du J., Peng X. Two-channel responsive luminescent chemosensors for dioxygen species: Molecular oxygen, singlet oxygen and superoxide anion // *Coord. Chem. Rev.* 2021. V. 427. Article 213575.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213575>
 44. Zhang X.-Y., Yang Y.-S., Wang W., Jiao Q.-C., Zhu H.-L. Fluorescent sensors for the detection of hydrazine in environmental and biological systems: Recent advances and future prospects // *Coord. Chem. Rev.* 2020. V. 417. Article 213367.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213367>
 45. Wan H., Xu Q., Gu, P. Li H., Chen D., Li N., He J., Lu J. AIE-based fluorescent sensors for low concentration toxic ion detection in water // *J. Hazard. Mater.* 2021. V. 403. Article 123656.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123656>
 46. Rasheed T., Li C., Bilal M., Yu C., Iqbal H.M.N. Potentially toxic elements and environmentally-related pollutants recognition using colorimetric and ratiometric fluorescent probes // *Sci. Total Environ.* 2018. V. 640–641. P. 174.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.232>
 47. Verbitskiy E.V., Rusinov G.L., Chupakhin O.N., Charushin V.N. Design of fluorescent sensors based on azaheterocyclic push-pull systems towards nitroaromatic explosives and related compounds: A review // *Dyes Pigm.* 2020. V. 180. Article 108414.
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.108414>
 48. Chen Q., Sun Y., Liu S., Zhang J., Zhang C., Jiang H., Han X., He L., Wang S., Zhang K. Colorimetric and fluorescent sensors for detection of nerve agents and organophosphorus pesticides // *Sens. Actuators. B.* 2021. V. 344. Article 130278.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.130278>
 49. Zhao X., Dai X., Zhao S., Cui X., Gong T., Song Z., Meng H., Zhang X., Yu B. Aptamer-based fluorescent sensors for the detection of cancer biomarkers // *Spectrochim. Acta A.* 2021. V. 247. Article 119038.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.119038>
 50. Kumari R., Sunil D., Ningthoujam R.S. Naphthalimides in fluorescent imaging of tumor hypoxia – An up-to-date review // *Bioorg. Chem.* 2019. V. 88. Article 102979.
<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.102979>
 51. Wang H., Jing M., Li Y. Lighting up the brain: genetically encoded fluorescent sensors for imaging neurotransmitters and neuromodulators // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2018. V. 50. P. 171.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.03.010>
 52. Barooah N., Mohanty J., Bhasikuttan A.C. Fluorescent probes for the stabilization and detection of G-quadruplexes and their prospective applications // *J. Ind. Chem. Soc.* 2021. V. 98. Article 100078.
<https://doi.org/10.1016/j.jics.2021.100078>
 53. Mochida A., Ogata F., Nagaya T., Choyke P.L., Kobayashi H. Activatable fluorescent probes in fluorescence-guided surgery: Practical considerations // *Bioorg. Med. Chem.* 2018. V. 26. № 4. P. 925.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.12.002>
 54. Koveal D., Díaz-García C.M., Yellen G. Fluorescent biosensors for neuronal metabolism and the challenges of quantitation // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2020. V. 63. P. 111.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2020.02.011>
 55. O'Banion C.P., Yasuda R. Fluorescent sensors for neuronal signaling // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2020. V. 63. P. 31.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2020.02.007>
 56. Wang H., Su H., Wang N., Wang J., Zhang J., Wang J.-H., Zhao W. Recent development of reactional small-molecule fluorescent probes based on resorufin // *Dyes Pigm.* 2021. V. 191. Article 109351.
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2021.109351>
 57. Li Z., Wang C., Zhang M., Li S., Mao Z., Liu Z. Activatable luminescent probes for imaging brain diseases // *Nano Today.* 2021. V. 39. Article 101239.
<https://doi.org/10.1016/j.nantod.2021.101239>
 58. Luo X., Han Y., Chen X., Tang W., Yue T., Li Z. Carbon dots derived fluorescent nanosensors as versatile tools for food quality and safety assessment: A review // *Trends Food Sci. Technol.* 2020. V. 95. P. 149.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.11.017>
 59. Ушаков Е.Н., Алфимов М.В., Громов С.П. Принципы дизайна оптических молекулярных сенсоров и фотоуправляемых рецепторов на основе краун-эфиров // *Успехи химии.* 2008. Т. 77. № 1. С. 39. doi: (Ushakov E.N., Alfimov M.V., Gromov S.P. Design principles for optical molecular sensors and photocontrolled receptors based on crown ethers // *Russ. Chem. Rev.* 2008. V. 77. № 1. P. 39. doi:
<https://doi.org/10.1070/RC2008v077n01ABEH003757>)
 60. Wang X., Shen C., Zhou C., Bu Y., Yan X. Methods, principles and applications of optical detection of metal ions // *Chem. Eng. J.* 2021. V. 417. Article 129125.
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.129125>
 61. Li P., Li S.F.Y. Recent advances in fluorescence probes based on carbon dots for sensing and speciation of heavy metals // *Nanophotonics.* 2021. V. 10. № 2. P. 877.
<https://doi.org/10.1515/nanoph-2020-0507>
 62. Sharma S., Ghosh K.S. Recent advances (2017–20) in the detection of copper ion by using fluorescence sensors working through transfer of photo-induced electron (PET), excited-state intramolecular proton (ESIPT) and Förster resonance energy (FRET) // *Spectrochim. Acta A.* 2021. V. 254. Article 119610.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.119610>
 63. Han S., Zhao Y., Zhang Z., Xu G. Recent Advances in electrochemiluminescence and chemiluminescence of metal nanoclusters // *Molecules.* 2020. V. 25. № 21. Article 5208.
<https://doi.org/10.3390/molecules25215208>
 64. Rajasekar M. Recent Trends in Rhodamine derivatives as fluorescent probes for biomaterial applications // *J. Mol. Struct.* 2021. V. 1235. Article 130232.
<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.130232>
 65. Nagarajan R., Varadaraju C., Lee K.H. Recent advancements in the role of N-Heterocyclic receptors on heavy metal ion sensing *Dyes Pigm.* 2021. V. 191. Article 109331.
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2021.109331>
 66. Zhang H.-C., Guo Y.-M. Advances of Carbon quantum dots for fluorescence turn-on detection of reductive small biomolecules // *Chinese J. Anal. Chem.* 2021. V. 49. № 1. P. 14.
[https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(20\)60070-6](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(20)60070-6)
 67. Gupta A. Aggregation-induced emission: A tool for sensitive detection of amines // *ChemistrySelect.*

2019. V. 4. № 44. P. 12848.
<https://doi.org/10.1002/slct.201903248>
68. *Karmakar A., Samanta P., Dutta S., Ghosh S.K.* Fluorescent “turn-on” sensing based on metal–organic frameworks (MOFs) // *Chem. Asian J.* 2019. V. 14. № 24. P. 4506.
<https://doi.org/10.1002/asia.201901168>
69. *Chen C., Tian R., Zeng Y., Chu C., Liu G.* Activatable fluorescence probes for “turn-on” and ratiometric biosensing and bioimaging: From NIR-I to NIR-II // *Bioconjug. Chem.* 2020. V. 31. № 2. P. 276.
<https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00734>
70. *Tarnowska M., Krawczyk T.* Click chemistry as a tool in biosensing systems for sensitive copper detection // *Biosens. Bioelectr.* 2020. V. 169. Article 112614.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112614>
71. *Feng Y., Su Y., Liu R., Lv Y.* Engineering activatable nanoprobe based on time-resolved luminescence for chemo/biosensing // *Trends. Anal. Chem.* 2021. V. 140. Article 116283.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116283>
72. *Xu H., Gu B., Li Y., Huang Z., Su W., Duan X., Yin P., Li H., Yao S.* A highly selective, colorimetric and ratiometric fluorescent probe for NH_2NH_2 and its bioimaging // *Talanta.* 2018. V. 180. P. 199.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.12.039>
73. *Karakuş E., Sayar M., Dartar S., Kaya B.U., Emrullahoğlu M.* Fluorescein propiolate: a propiolate-decorated fluorescent probe with remarkable selectivity towards cysteine // *Chem. Commun.* 2019. V. 55. № 34. P. 4937.
<https://doi.org/10.1039/c9cc01774g>
74. *Wang B.-J., Liu R.-J., Fang J., Wang Y.-W., Peng Y.* A water-soluble dual-site fluorescent probe for the rapid detection of cysteine with high sensitivity and specificity // *Chem. Commun.* 2019. V. 55. № 78. P. 11762.
<https://doi.org/10.1039/c9cc06468k>
75. *Kim Y., Choi M., Mulay S.V., Jang M., Kim J.Y., Lee W.-H., Jon S., Churchill D.G.* Aqueous red-emissive probe for the selective fluorescent detection of cysteine by deprotection/cyclization cascade resulting in large Stokes’ shift // *Chem. Eur. J.* 2018. V. 24. № 21. P. 5623.
<https://doi.org/10.1002/chem.201706073>
76. *Shi W.-J., Feng L.-X., Wang X., Huang Y., Wei Y.-F., Huang Y.-Y., Ma H.-J., Wang W., Xiang M., Gao L.* A near-infrared-emission aza-BODIPY-based fluorescent probe for fast, selective, and “turn-on” detection of HClO/ClO^- // *Talanta.* 2021. V. 233. Article 122581.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122581>
77. *Bhattacharyya A., Makhal S.C., Guchhait N.* Fate of protected HBT based chemodosimeters after undergoing deprotection: Restoration of ESIPT or generation of emissive phenoxide? // *Chem. Phys.* 2019. V. 520. P. 61–69.
<https://doi.org/10.1016/j.chemphys.2019.01.008>
78. *Болотин С.Н.* Органические люминофоры с аномально большим сдвигом Стокса / Люминесцентный анализ. Проблемы аналитической химии. Т. 19 / Под ред. Романовской Г.И. М.: Наука, 2015. С. 84.
79. *Kyrychenko A., Karpushina G.V., Svechkarev D., Kolo-dezny D., Bogatyrenko S.I., Kryshal A.P., Doroshenko A.O.* Fluorescence probing of thiol-functionalized gold nanoparticles: Is alkylthiol coating of a nanoparticle as hydrophobic as expected? // *J. Phys. Chem. C.* 2012. V. 116. № 39. P. 21059.
<https://doi.org/10.1021/jp3060813>
80. *Singh H., Bhargava G., Kumar S., Singh P.* Microstructural (self-assembly) and optical based discrimination of Hg^{2+} , CN^- and $\text{Hg}(\text{CN})_2$ ion-pair; Hg^{2+} promoted-ESIPT assisted guanylation of thiourea // *Sens. Actuators. B.* 2018. V. 272. P. 43.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.05.104>
81. *Pan W., Zheng C., Liao G., Liu G., Pu S.* A H_2O -induced fluorescence turn-on diarylethene derivative and its fluorescent sensing Al^{3+} // *Microchem. J.* 2021. V. 163. Article 105887.
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105887>
82. *Malini J., Sayed M.* 1'-hydroxy-2'-acetonephthone: A simple fluorescence turn-on signaling probe with high selectivity and sensitivity for Al^{3+} in pure water // *J. Photochem. Photobiol. A.* 2021. V. 418. Article 113431.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2021.113431>
83. *Mudi N., Hazra P., Shyamal M., Maity S., Giri P.K., Samanta S.S., Mandal D., Misra A.* Designed synthesis of fluorescence “Turn-on” dual sensor for selective detection of Al^{3+} and Zn^{2+} in water // *J. Fluoresc.* 2021. V. 31. № 2. P. 315.
<https://doi.org/10.1007/s10895-020-02664-2>
84. *Badekar P.S., Thakur G.C.N., Varma M.E., Ghatpande N.S., Kulkarni P.P., Kumbhar A.A.* Rhodamine-based fluorescence “turn-on” chemosensor: detection of Fe^{3+} ion in aqueous medium and MCF-7 live cells // *ChemistrySelect.* 2021. V. 6. № 9. P. 2373.
<https://doi.org/10.1002/slct.202004640>
85. *Cui S., Qiu S., Lu R., Pu S.* A multi-functional fluorescent sensor for Zn^{2+} and HSO_4^- based on a new diarylethene derivative // *Tetrahedron Lett.* 2018. V. 59. № 36. P. 3365.
<https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2018.07.057>
86. *Liu X., Liu H., Tang X., Liu G., Pu S.* A highly selective colorimetric and fluorescent probe for Cu^{2+} based diarylethene with a diaminomaleonitrile unit // *Tetrahedron.* 2021. V. 78. Article 131788.
<https://doi.org/10.1016/j.tet.2020.131788>
87. *Li M., Ruan S., Yang H., Zhang Y., Yang Y., Song J., Xu X., Wang Z., Wang S.* Nopinone-based AIE-active dual-functional fluorescent chemosensor for Hg^{2+} and Cu^{2+} and its environmental and biological applications // *Dalton Trans.* 2020. V. 49. № 43. P. 15299.
<https://doi.org/10.1039/d0dt02888f>
88. *Hontz D., Hensley J., Hiryak K., Lee J., Luchetta J., Torsiello M., Venditto M., Lucent D., Terzaghi W., Mencer D., Bommarreddy A., VanWert A.L.* A copper(II) macrocycle complex for sensing biologically relevant organic anions in a competitive fluorescence assay: Oxalate sensor or urate sensor? // *ACS Omega.* 2020. V. 5. № 31. P. 19469.
<https://doi.org/10.1021/acsomega.0c01655>
89. *Ravichandiran P., Kaliannagounder V.K., Bella A.P., Boguszewska-Czubara A., Maslyk M., Kim C.S., Park C.H., Johnson P.M., Park B.-H., Han M.-K., Kim A.R., Yoo D.J.* Simple Colorimetric and fluorescence chemosensing probe for selective detection of Sn^{2+} ions in an aqueous solution: Evaluation of the novel sensing mechanism and its bioimaging applications // *Anal. Chem.* 2021. V. 93. № 2. P. 801.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c03196>

90. Ravichandiran P., Kaliannagounder V.K., Maroli N., Boguszewska-Czubara A., Maslyk M., Kim A.R., Park B.-H., Han M.-K., Kim C.S., Park C.H., Yoo D.J. A dual-channel colorimetric and ratiometric fluorescence chemosensor for detection of Hg²⁺ ion and its bioimaging applications // *Spectrochim. Acta A*. 2021. V. 257. Article 119776. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.119776>
91. Cai Y., Ren B., Peng C., Zhang C., Wei X. Highly sensitive and selective fluorescence “turn-on” detection of Pb (II) based on Fe₃O₄@Au–FITC nanocomposite // *Molecules*. 2021. V. 26. № 11. Article 3180. <https://doi.org/10.3390/molecules26113180>
92. Jantra S., Palaga T., Rashatasakhon P., Sukwattanasinitt M., Wacharasindhu S. A “turn on” fluorometric and colorimetric probe based on vinylphenol-BODIPY for selective detection of Au(III) ion in solution and in living cells // *Dyes Pigm.* 2021. V. 191. Article 109341. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2021.109341>
93. Shang X., Li X., Han J., Jia S., Zhang J., Xu X. Colorimetric and fluorescence turn-on sensor for biologically important anions based on carbazole derivative // *Inorg. Chem. Commun.* 2012. V. 16. P. 37. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2011.11.025>
94. Gong Y.-J., Lv M.-K., Zhang M.-L., Kong Z.-Z., Mao G.-J. A novel two-photon fluorescent probe with long-wavelength emission for monitoring HClO in living cells and tissues // *Talanta*. 2019. V. 192. P. 128. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.08.089>
95. Chen B., Fu H., Lv Y., Li X., Han Y. An oxidative cyclization reaction based fluorescent “Turn-On” probe for highly selective and rapid detection of hypochlorous acid // *Tetrahedron Lett.* 2018. V. 59. № 12. P. 1116. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2018.02.018>
96. Zhang H., Yin X., Hong J., Deng Y., Feng G. A NIR fluorescence probe having significant fluorescence turn-on signal at 700 nm and large Stokes shift for rapid detection of HOCl *in vivo* // *Talanta*. 2021. V. 223. Article 121768. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121768>
97. Sun Q., Liu H., Qiu Y., Chen J., Wu F.-S., Luo X.-G., Wang D.-W. A highly sensitive and selective fluorescence turn-on probe for the sensing of H₂S *in vitro* and *in vivo* // *Spectrochim. Acta A*. 2021. V. 254. Article 119620. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.119620>
98. Wu Q., Zheng J., Zhang W., Wang J., Liang W., Stadler F.J. A new quinoline-derived highly-sensitive fluorescent probe for the detection of hydrazine with excellent large-emission-shift ratiometric response // *Talanta*. 2019. V. 195. P. 857. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.12.015>
99. Hao Y., Zhang Y., Ruan K., Meng F., Li T., Guan J., Du L., Qu P., Xu M. A highly selective long-wavelength fluorescent probe for hydrazine and its application in living cell imaging // *Spectrochim. Acta A*. 2017. V. 184. P. 355. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.04.041>
100. Zhong K., He Y., Deng L., Yan X., Li X., Tang Y., Hou S., Tang L. A near-infrared fluorescent probe for H₂S based on tandem reaction to construct iminocoumarin-benzothiazole and its application in food, water, living cells // *Anal. Chim. Acta*. 2020. V. 1127. P. 49. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.06.050>
101. Zhang H., Xie Y., Wang P., Chen G., Liu R., Lam Y.-W., Hu Y., Zhu Q., Sun H. An iminocoumarin benzothiazole-based fluorescent probe for imaging hydrogen sulfide in living cells // *Talanta*. 2015. V. 135. P. 149. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.12.044>
102. Xu W., Li X., Han M., Zhou T., Yang Y., Li W. A new “turn-on” fluorescence probe based on hydrazine-triggered tandem reaction // *Spectrochim. Acta A*. 2020. V. 228. Article 117754. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117754>
103. Cui J., Cao L., Wang G., Ji W., Nie H., Yang C., Zhang X. A fast-responding, highly sensitive detection system consisting of a fluorescent probe and palladium ions for N₂H₄ in environmental water and living cells // *Anal. Methods*. 2019. V. 11. № 39. P. 5023. <https://doi.org/10.1039/c9ay01555h>
104. Wei T.-B., Zhao Q., Li Z.-H., Dai X.-Y., Niu Y.-B., Yao H., Zhang Y.-M., Qu W.-J., Lin Q. Supramolecular organogel with aggregation-induced emission for ultrasensitive detection and effective removal of Cu²⁺ and Hg²⁺ from aqueous solution // *Dyes Pigm.* 2021. V. 192. Article 109436. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2021.109436>
105. Yang Y., Chen P., Liu Y., Cai Z., Wang X., Me Y., Ding X., Lin L., Jiang H., Zhang Z., Ju Y. A colorimetric indicator-displacement assay based on stable Cu²⁺ selective carbon dots for fluorescence turn-on detection of pyrophosphate anions in urine // *Spectrochim. Acta A*. 2021. V. 251. Article 119479. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.119479>
106. Yang R., Dou Y., Zhang Y., Qu L., Sun Y., Li Z. A facile and highly efficient fluorescent turn-on switch strategy based on diketone isomerization and its application in peroxydinitrite fluorescent imaging // *Sens. Actuators B*. 2021. V. 337. Article 129805. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.129805>
107. Chen L., Qi W., Du C., Wang Y., Liu C., Huang X., Chang X. A novel copper ion sensing fluorescent probe for fast detection of pyrophosphate and alkaline phosphatase // *New J. Chem.* 2021. V. 45. № 7. P. 3727. <https://doi.org/10.1039/d1nj00075f>
108. Rhaman M.M., Fronczek F.R., Powell D.R., Hossain M.A. Colourimetric and fluorescent detection of oxalate in water by a new macrocycle-based dinuclear nickel complex: A remarkable red shift of the fluorescence band // *Dalton Trans.* 2014. V. 43. № 12. P. 4618. <https://doi.org/10.1039/c3dt53467g>
109. Wang T., Pang Q., Tong Z., Xiang H., Xiao N. A hydrazine-based spectroscopic off-on probe for sensing of basic arginine and lysine // *Spectrochim. Acta A*. 2021. V. 258. Article 119824. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.119824>
110. Basak M., Halder S., Das G. Folic acid induced disassembly of self-assembled fluorene-naphthalene based receptor and contemporaneous detection of folic acid in aqueous medium // *J. Photochem. Photobiol. A*. 2021. V. 414. Article 113292. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2021.113292>
111. Liu X., Dong L., Wang L., Xu H., Gao S., Zhong L., Zhang S., Jiang T. 2-Aminopurine modified DNA probe for rapid and sensitive detection of L-cysteine // *Talanta*. 2019. V. 202. P. 520. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.05.007>
112. No H.S., Kim T., Hong J.-I. Iridium(III) complex-based phosphorescent and electrochemiluminescent dual sensor for selective detection of glutathione //

- Sens. Actuators. B. 2021. V. 342. Article 129868. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.129868>
113. *Chen D., Long Z., Dang Y., Chen L.* A novel fluorescent probe with red emission and a large Stokes shift for selective imaging of endogenous cysteine in living cells // *Analyst*. 2018. V. 143. № 23. P. 5779. <https://doi.org/10.1039/c8an01657g>
114. *Ma Y., Zhao Y., Xia L., Huang J., Gu Y., Wang P.* A novel one- and two-photon fluorescent probe induced by light for selective imaging of Cys in living cells and tissues // *Anal. Chim. Acta*. 2018. V. 1035. P. 161. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.06.036>
115. *Chen D., Long Z., Dang Y., Chen L.* A new fluorescent probe for specific detection of cysteine with facile preparation and living cell imaging // *Dyes Pigm.* 2019. V. 166. P. 266. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2019.03.051>
116. *Zhang S., Wu D., Wu J., Xia Q., Jia X., Song X., Zeng L., Yuan Y.* A water-soluble near-infrared fluorescent probe for sensitive and selective detection of cysteine // *Talanta*. 2019. V. 204. P. 747. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.06.074>
117. *Hou J., Cai P., Wang C., Shen Y.* A novel fluorescent probe with a large Stokes shift for cysteine based on dicyanoisophorone // *Tetrahedron Lett.* 2018. V. 59. № 26. P. 2581. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2018.05.057>
118. *Xiao Y., Guo K., Wei J., Gao X., Yi D., Li Y., Yu X., Zhang C., Wang Q.* Selective detection of Cys and GSH by using one fluorescent probe at two excitation wavelengths // *Tetrahedron Lett.* 2020. V. 61. № 44. Article 152462. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2020.152462>
119. *Sun W., Tang X., Li J., He M., Zhang R., Han X., Zhao Y., Ni Z.* A novel 4-hydroxypyrene-based “off-on” fluorescent probe with large Stokes shift for detecting cysteine and its application in living cells // *Tetrahedron Lett.* 2020. V. 61. № 6. Article 151467. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2019.151467>
120. *Wang Z., Yang S., Liu X., Yang T., Han T., He X., Jiang Y., Hao Y.* A near-infrared turn-on fluorescent probe for the rapid detection of selenocysteine and its application of imaging in living cells and mice // *Microchem. J.* 2021. V. 170. Article 10668. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106681>
121. *Gwynne L., Williams G.T., Yan K.-C., Gardiner J.E., Hilton K.L.F., Patenall B.L., Hiscock J.R., Maillard J.-Y., He X.-P., James T.D., Sedgwick A.C., Jenkins A.T.A.* The evaluation of ester functionalised TCF-based fluorescent probes for the detection of bacterial species // *Isr. J. Chem.* 2021. V. 61. № 3–4. P. 234. <https://doi.org/10.1002/ijch.202000105>
122. *Niu Y., Wang H., Wang Y., Feng L.* A “turn-on” fluorescent probe for ultra-sensitive detection of β -galactosidase // *Microchem. J.* 2021. V. 166. Article 106205. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106205>
123. *Pinto I.A., Toloza C.A.T., Almeida J.M.S., da Silva A.R., Larrude D.G., Aucélio R.Q.* Quantification of neomycin in rubella vaccine by off/on metal ion mediated photoluminescence from functionalized graphene quantum dots // *Spectrochim. Acta A.* 2019. V. 220. Article 117139. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117139>
124. *Liang M.-Y., Zhao B., Xiong Y., Chen W.-X., Huo J.-Z., Zhang F., Wang L., Li Y.* A “turn-on” sensor based on MnO₂ coated UCNPs for detection of alkaline phosphatase and ascorbic acid // *Dalton Trans.* 2019. V. 48. № 43. P. 16199. <https://doi.org/10.1039/c9dt02971k>
125. *Sui B., Liu X., Wang M., Belfield K.D.* A Highly selective fluorescence turn-on sensor for extracellular calcium ion detection // *Chem. Eur. J.* 2016. V. 22. № 30. P. 10351. <https://doi.org/10.1002/chem.201602162>
126. *Xu W., Mu L., Yuan H., Zhang T., Shi W.* Silicon nanowires for ‘turn-on’ fluorescence detection of Zn(II) // *Appl. Surf. Sci.* 2010. V. 256. № 24. P. 7565. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2010.06.003>
127. *Ma Z., Zhang D., Guo J., Li M., Wang T., Yin H., Wang H., Liu J.* An anthraquinone-based “turn-on” fluorescence probe for Hg²⁺ detection and its application in cell imaging // *Inorg. Chem. Commun.* 2021. V. 130. Article 108753. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2021.108753>
128. *Gupta R.C., Dwivedi S.K., Ali R., Misra A.* An efficient molecular scaffold exhibiting fluorescence “turn-on” response for cyanide and HCN // *Chemistry Select.* 2018. V. 3. № 7. P. 2025. <https://doi.org/10.1002/slct.201702901>
129. *Ramírez-García G., Cervantes E.D., Mounzer O., De la Rosa E., Luke T.L., De la Cruz F.N.* A turn-on luminescence method for phosphate determination based on fast green-functionalized ZrO₂:Yb,Er@ZrO₂ Core@Shell upconversion nanoparticles // *Anal. Chem.* 2019. V. 91. № 22. P. 14657. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b03817>
130. *Wang Y.-B., Luo H.-Z., Wang C.-Y., Guo Z.-Q., Zhu W.-H.* A turn-on fluorescent probe based on π -extended coumarin for imaging endogenous hydrogen peroxide in RAW 264.7 cells // *J. Photochem. Photobiol. A.* 2021. V. 414. Article 113270. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2021.113270>
131. *Dong J., Zhao Z., Liu R., Zhang H., Wu Y., Ba X.* Investigation of a halloysite-based fluorescence probe with a highly selective and sensitive “turn-on” response upon hydrogen peroxide // *RSC Adv.* 2017. V. 7. № 87. P. 55067. <https://doi.org/10.1039/c7ra10210k>
132. *Xu C., Xu W., Yang Z., Li S., Wang Y., Hua J.* A turn-on mitochondria-targeted near-infrared fluorescent probe with a large Stokes shift for detecting and imaging endogenous superoxide anion in cells // *J. Photochem. Photobiol. A.* 2021. V. 415. Article 113304. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2021.113304>
133. *Erande Y., Chemate S., More A., Sekar N.* PET governed fluorescence “turn on” BODIPY probe for selective detection of picric acid // *RSC Adv.* 2015. V. 5. № 109. P. 89482. <https://doi.org/10.1039/c5ra17932g>
134. *Wang J.-Z., Li F., Xiao M.-M., Ma C.-R., Cheng G.-Q., Zhao B.-X.* A new turn-on fluorescent probe for sensing 4-methylbenzenethiol in real water samples // *Spectrochim. Acta A.* 2021. V. 260. Article 119947. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.119947>
135. *Nsanjamahoro S., Zhang Y., Wang W.-F., Ding Y.-Z., Shi Y.-P., Yang J.-L.* Fluorescence “turn-on” of silicon-containing nanoparticles for the determination of resorcinol // *Microchim. Acta.* 2021. V. 188. № 2. Article 46. <https://doi.org/10.1007/s00604-021-04700-9>

УДК 543.866

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИТРИПТИЛИНА МЕТОДОМ ПОЛЯРИЗАЦИОННОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ИММУНОАНАЛИЗА© 2022 г. Э. П. Медянцева^а, *, Э. Р. Газизуллина^а, Д. В. Брусницын^а,
С. В. Федоренко^б, А. Р. Мустафина^б, С. А. Еремин^с^аКазанский (Приволжский) федеральный университет, Химический институт им. А.М. Бутлерова
ул. Кремлевская, 18, Казань 420008 Россия^бИнститут органической и физической химии им. А.Е. Арбузова, Федеральный исследовательский центр
Казанский научный центр Российской академии наук
ул. Ак. Арбузова, 8, Казань 420088 Россия^сМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет
Ленинские горы, 1, Москва 119991 Россия

*e-mail: emedyant@gmail.com

Поступила в редакцию 08.10.2021 г.

После доработки 30.12.2021 г.

Принята к публикации 05.01.2022 г.

Разработан способ определения трициклического антидепрессанта амитриптилина с помощью поляризационного флуоресцентного иммуноанализа на фоне буферного раствора, урины и грудного молока с относительным стандартным отклонением не более 0.050. Синтезированы трейсеры путем нековалентной сорбции амитриптилина на поверхности силикатных наночастиц, допированных комплексами рутения(II). Для эффективного функционирования предложенного способа подобраны оптимальные концентрации трейсера и антител путем разведения. Подбор количеств реагентов осуществляли на основании получаемых значений интенсивности флуоресценции и поляризации флуоресценции. Согласно требованиям чувствительности трейсера выбрано разведение 1 : 2, интенсивность флуоресценции которого 10-кратно превышает фоновое значение, при этом оптимальное значение поляризации флуоресценции фиксируется на уровне 32. Оптимальное разведение антител, которое соответствует 70%-ному значению поляризации флуоресценции от максимального сигнала, составило 1 : 200. Диапазон рабочих концентраций амитриптилина составил 1×10^{-10} – 1×10^{-5} М, нижние границы определяемых содержаний на уровне $(7-8) \times 10^{-11}$ М. Полученные результаты перспективны для контроля содержания амитриптилина как в фармацевтическом препарате, так и в биологических жидкостях для установления эффективности проводимых терапевтических назначений и в медико-криминалистических целях.

Ключевые слова: поляризационный флуоресцентный иммуноанализ, рутениевые силикатные наночастицы, амитриптилин.

DOI: 10.31857/S0044450222070088

Депрессия – психическое расстройство, характеризующееся общим эмоциональным подавленным состоянием в течение длительного периода, сопровождающееся апатией, нарушением сна и аппетита, снижением самооценки, в некоторых случаях и суицидальными мыслями [1]. В зависимости от тяжести депрессии составляется план лечения пациента, включающий в себя только психотерапию или психотерапию в сочетании с фармакотерапией, основу которой составляют антидепрессанты, регулирующие активность биогенных аминов [2].

Развитие депрессии связывают с дефицитом нейромедиаторов аминов в синаптических щелях центральной нервной системы. Антидепрессанты

повышают уровень нейромедиаторов путем ингибирования активности ферментов, которые их расщепляют, блокирования их обратного нейронального захвата или увеличения числа высвобождаемых нейромедиаторов от участков пресинаптических нервных окончаний [3]. Мониторинг содержания антидепрессантов, в частности трициклических (ТЦА), в биологических материалах человека осуществляется в основном хроматографическими методами [4–7].

В то же время актуально применение поляризационного флуоресцентного иммуноанализа (ПФИА), который представляет собой конкурентный гомогенный метод иммуноанализа, основанный на конкуренции определяемого антигена и

трейсера (меченого антигена) за ограниченное число центров связывания специфических антител [8]. Метод позволяет экспрессно определять лекарственные соединения с высокими чувствительностью и селективностью, а также с минимальной пробоподготовкой и использованием малых объемов проб и реагентов. Это связано как с контролем качества выпускаемой фармацевтической продукции, так и с медицинским и ветеринарным применением.

В последнее время активно разрабатываются способы поляризационного флуоресцентного иммунохимического определения в продуктах животного происхождения антибиотиков: хлорамфеникола [9], гентамицина [10], гентамицина и канамицина [11], клинафлоксацина [12], орбифлоксацина [13] и цефалексина [14], поскольку неправильное и чрезмерное применение антибиотиков для лечения и профилактики инфекционных заболеваний крупного рогатого скота, птиц и пчел приводит к кумуляции этих веществ в мышечных тканях животных, молоке, яйцах и меде с последующим негативным воздействием на здоровье человека и появлением антибиотикорезистентных микроорганизмов [15].

Нарастает и проблема загрязнения воды фармакологически активными соединениями, так как препараты пагубно влияют на экосистему уже при достаточно низких концентрациях [16]. Экологический мониторинг с использованием ПФИА позволяет эффективно и быстро определять содержание лекарственных соединений в сточных и поверхностных водах без какой-либо сложной предварительной обработки (применяют только фильтрацию) [17–19].

Анализ литературы показал, что в качестве трейсеров в основном используют антигены, меченные флуоресцеинизотиоцианатом или его производными. Нековалентная модификация силикатных рутениевых наночастиц амитриптилином для поляризационного флуоресцентного определения трициклического антидепрессанта использована впервые, что может расширить аналитические возможности метода.

Цель настоящего исследования заключалась в разработке поляризационного флуоресцентного иммунохимического определения трициклического антидепрессанта (амитриптилина) в биологических жидкостях (урина, грудное молоко) с использованием силикатных наночастиц $[\text{Ru}(\text{dipy})_3]\text{Cl}_2@\text{SiO}_2$.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Многофункциональный планшетный анализатор “PolarStarOmega” и 96-луночный планшет (BMGLabtech, Германия) применяли для измерений методом ПФИА. Планшетный анализатор в

базовой конфигурации позволяет проводить измерения интенсивности флуоресценции, поляризации флуоресценции, люминесценции, регистрировать УФ-спектры поглощения.

Рутениевые силикатные наночастицы (НЧ) $([\text{Ru}(\text{dipy})_3]\text{Cl}_2@\text{SiO}_2)$ и трейсеры на основе амитриптилина, меченного данными НЧ, синтезированы, охарактеризованы и предоставлены ст. науч. сотр. С.В. Федоренко (ИОФХ им. А.Е. Арбузова КНЦ РАН). НЧ SiO_2 и $[\text{Ru}(\text{dipy})_3]\text{Cl}_2@\text{SiO}_2$ получали по известным методикам [20, 21]. Водную дисперсию $[\text{Ru}(\text{dipy})_3]\text{Cl}_2@\text{SiO}_2$ использовали в качестве флуоресцентной метки.

Методика синтеза трейсеров № 1, № 2, № 3. Водную дисперсию $[\text{Ru}(\text{dipy})_3]\text{Cl}_2@\text{SiO}_2$ (4 г/л, 1 мл) центрифугировали (15000 об/мин, 20 мин, 4°C), отделяли 0.86 мл супернатанта. К 0.14 мл дисперсии добавляли по 0.2 мл раствора амитриптилина в этаноле ($c_{\text{исх}} = 0.06 \text{ М}$) для трейсера № 1 (по 0.05 и 0.25 мл для трейсеров № 2 и № 3 соответственно). Подвергали ультразвуковому воздействию в течение 20 мин. После 6.5, 4.5 или 4 ч перемешивания при комнатной температуре соответственно в случае трейсера № добавляли 0.66 мл воды, в случае трейсеров № 2 и № 3 доводили до 1.2 мл водой. Затем центрифугировали (15000 об/мин, 20 мин, 4°C). Промывали 10-кратно водой от излишка амитриптилина с попеременным использованием ультразвука и центрифугирования. Конечную дисперсию доводили до объема 1 мл.

Количество адсорбированного на силикатной поверхности рутениевых НЧ амитриптилина определяли путем оценки его концентрации в смывах. Остаточную концентрацию амитриптилина оценивали с использованием градуировочных зависимостей тока от концентрации амитриптилина, полученных с помощью амперометрических иммуносенсоров на основе печатных графитовых электродов, модифицированных гибридными наноматериалами: оксидом графена с цианидными гексарениевыми кластерами $(\text{K}_4\{\text{Re}_6\text{S}_8\}(\text{CN})_6)$:

$$I^* = (204 \pm 11) + (-20.2 \pm 1.0)(-\lg c),$$

и восстановленным оксидом графена с $\text{K}_4\{\text{Re}_6\text{S}_8\}(\text{CN})_6$:

$$I^* = (204 \pm 10) + (-18.2 \pm 0.8)(-\lg c),$$

с диапазонами рабочих концентраций соответственно $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-5}$ и $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-6} \text{ М}$.

Имуносенсоры опускали в электрохимическую ячейку, содержащую аликвоту смыва и фосфатный буферный раствор с рН 7.5. Регистрировали аналитический сигнал (ток окисления гексарениевых кластеров I^*), по величине которого рассчитывали концентрацию амитриптилина.

Изучение смывов показало, что для трейсера № 1 характерно вымывание амитриптилина на уровне 0.6×10^{-4} М, для трейсера № 2 — 1.3×10^{-4} М, для трейсера № 3 — 1.1×10^{-4} М.

В качестве модификаторов поверхности использовали оксид графена и восстановленный оксид графена (Sigma Aldrich, США), цианидные гексарениевые халькогенидные кластеры $K_4\{[Re_6S_8](CN)_6\} \cdot 8H_2O$ (синтезированы, охарактеризованы и предоставлены лабораторией “Синтеза кластерных соединений и материалов” Института неорганической химии им. А.В. Николаева СО РАН). Для более прочного закрепления на поверхности электрода углеродные модификаторы наносили в составе аминопроизводного на платформе полиэфирополиола второй генерации ($H_{20}-NH_2$) (модифицированы на кафедре неорганической химии КФУ, Россия).

В работе использовали тетраэтилортосилан (98%), водный раствор аммиака (28–30%), $[Ru(dipy)_3]Cl_2$, Triton X-100 фирмы “Acros Organics” (США), *n*-гептанол (98%), циклогексан (99%) фирмы “Acros” (США).

Поликлональные антитела (Аг) против ТЦА предоставлены MicroPharm Ltd (Великобритания).

Объект анализа: лекарственное соединение амитриптилин (Sigma-Aldrich, США) и содержащий его фармацевтический препарат “Амитриптилин” производства “ЗиО-Здоровье” (Подольск, Россия). Серию стандартных растворов лекарств готовили по точно взятой навеске с последующим минимальным количеством разбавлений в диапазоне от 10^{-10} до 10^{-4} М.

Фосфатные буферные растворы с рН 6.0–7.5 и боратный буферный раствор с рН 8.0–9.0 готовили из препаратов х. ч. и ч. д. а. (ЗАО “Лаверна”, Россия).

Для приготовления модельной урины с рН 6.0 применяли мочевины, креатинин, хлорид натрия, хлорид аммония, сульфат натрия, хлорид кальция, хлорид калия, гидрофосфат калия марок ч. и х. ч. (ООО НПФ “Татхимпродукт”, ООО АО “Рехахим”, Россия).

Для пробоподготовки грудного молока использовали концентрированную соляную кислоту и хлорид калия марки х. ч. (ООО НПФ “Татхимпродукт”, Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Явление поляризации флуоресценции связано с одновременным протеканием таких процессов, как поглощение или эмиссия квантов света и вращательная диффузия молекул в растворе. В результате возбуждения флуорофоров плоскополяризованным светом степень поляризации испускаемого излучения определяется углом поворота

молекулы за промежуток времени между поглощением и последующим испусканием фотона. Так, ориентация больших по размерам молекул практически не меняется, и наблюдается высокая степень поляризации флуоресценции, а при вращении небольших молекул, успевающих равномерно принимать любую ориентацию, — низкая.

Таким образом, ПФИА позволяет исследовать взаимодействия сильно отличающихся по размерам молекул, в частности, антигена (Аг) с Ат. Несвязанный трейсер вращается в растворе быстро, излучаемый им свет сильно деполяризован, значение поляризации флуоресценции низкое. Взаимодействие трейсера со специфическим Ат приводит к образованию комплекса, который в растворе вращается медленнее, свет поляризован, поляризация флуоресценции высокая. Добавление целевого анализа приводит к снижению поляризации флуоресценции, что обусловлено связыванием Аг с Ат и, следовательно, увеличением количества свободного трейсера в растворе [22].

Оптимальные условия проведения поляризационного флуоресцентного иммуноанализа. *Характеристика флуоресцентных наночастиц.* В ПФИА имеется перечень требований к выбору флуоресцентной метки: высокая интенсивность флуоресценции, химическая и фотоустойчивость, наличие функциональных групп для связывания с Аг, отсутствие влияния на протекание иммунохимической реакции. В связи с этим в качестве метки выбрали силикатные НЧ (диаметр — 46 нм, рис. 1), допированные высоколюминесцентными комплексами $[Ru(dipy)_3]Cl_2@SiO_2$, свойства которых согласуются со многими перечисленными выше требованиями.

Данные атомно-эмиссионной спектроскопии для силикатных НЧ: содержание ($\pm 10\%$) Si (251.6 нм) 53.5 мг/л и Ru (267.9 нм) 1.96 мг/л. Мольное соотношение Si : Ru составило 1 : 100.

В спектрах поглощения водной дисперсии НЧ $[Ru(dipy)_3]Cl_2@SiO_2$ имеются полосы при 244, 252, 285, 424, 451 нм, характеристичные для комплекса Ru(II).

Наночастицы $[Ru(dipy)_3]Cl_2@SiO_2$ характеризуются относительно небольшим отрицательным ζ -потенциалом (–20.7 мВ при рН ~7.0) по сравнению с аналогичными НЧ, не содержащими $[Ru(dipy)_3]^{2+}$ (–48 мВ при рН ~7.0), что обусловлено частичной компенсацией заряда силикатной поверхности катионами комплекса.

Тестирование флуоресцентных наночастиц. Интенсивность флуоресценции (FI) НЧ уменьшается с увеличением разбавления, что видно из рис. 2, причем при разбавлении в более чем 100 раз наблюдается резкое падение FI. FI 10-кратно разбавленных НЧ в 25 раз превышает фо-

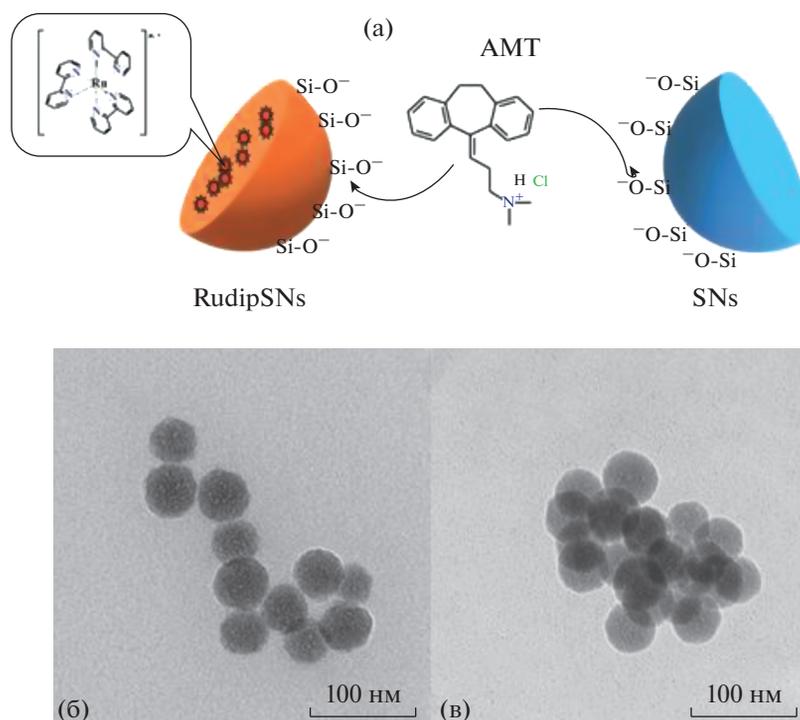


Рис. 1. (а): Схема адсорбции амитриптилина на силикатной поверхности рутениевых наночастиц; ПЭМ-микрофотографии: (б) – амитриптилин- $[\text{Ru}(\text{dipy})_3]\text{Cl}_2@\text{SiO}_2$ и (в) – амитриптилин- SiO_2 .

новое значение FI (FI_0), при этом степень поляризации флуоресценции (FP) равна 32, поэтому $c_{\text{НЧ}} = 0.49$ г/л выбрана в качестве рабочей.

Характеристика реагентов для иммуноанализа.
В качестве реагентов для иммуноанализа исполь-

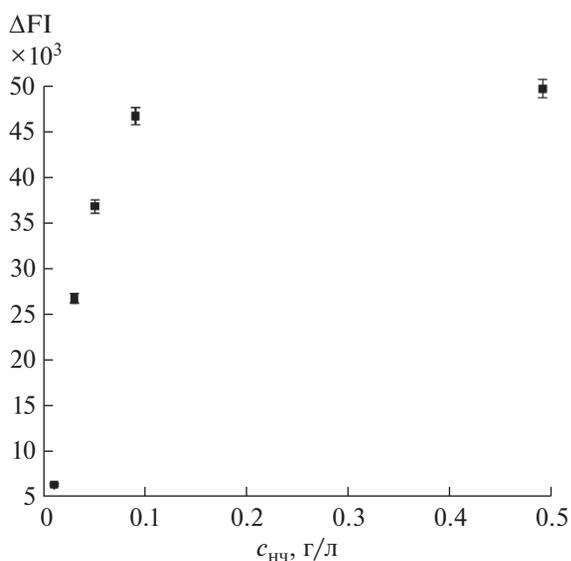


Рис. 2. Зависимость $\Delta \text{FI} = \text{FI} - \text{FI}_0$ от концентрации флуоресцентных наночастиц, фосфатный буферный раствор с pH 7.5.

зовали поликлональные Ат против ТЦА и трейсер на основе нековалентно амитриптилин-модифицированных силикатных НЧ. Модификацию осуществляли путем адсорбции амитриптилина на силикатную поверхность за счет электростатических или координационных взаимодействий, что является перспективным способом получения композитных НЧ.

Поскольку амитриптилин имеет полосы поглощения в области 200–300 нм, как и комплекс трис-дипиридила рутения(II), то метод УФ-спектроскопии не позволяет однозначно рассчитать концентрацию адсорбированного ТЦА.

В качестве модельной системы для изучения адсорбции амитриптилина выбрали немодифицированные силикатные НЧ SiO_2 (диаметр – 47 нм, рис. 1).

В соответствие с микрофотографиями, полученными методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) (рис. 1), адсорбция амитриптилина на силикатной поверхности $[\text{Ru}(\text{dipy})_3]\text{Cl}_2@\text{SiO}_2$ и SiO_2 не приводит к изменениям ПЭМ полученных образцов-по причине низкой концентрации амитриптилина на силикатной поверхности, необходимой для метода ПФИА.

Косвенным подтверждением адсорбции ТЦА могут служить данные динамического светорассеяния, в частности, изменение дзета-потенциа-

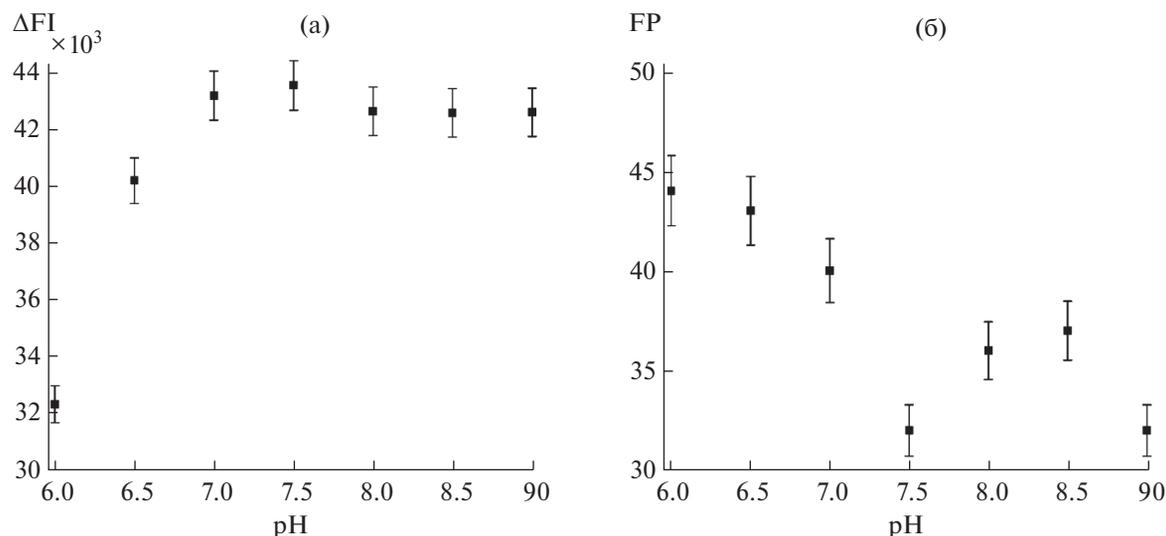


Рис. 3. Зависимость $\Delta FI = FI - FI_0$ (а) и FP (б) от pH буферного раствора. Трейсер № 1.

ла с -48 до -37 мВ для SiO_2 и с -20.7 до -8 мВ для НЧ $[Ru(dipy)_3]Cl_2@SiO_2$.

Для определения остаточного количества антидепрессанта в смывах использовали градуировочные зависимости тока от концентрации амитриптилина, полученные с помощью амперометрических иммуносенсоров на основе печатных графитовых электродов, модифицированных гибридными наноматериалами: оксидом графена с цианидными гексарениевыми кластерами ($K_4[Re_6S_8(CN)_6]$):

$$I^* = (204 \pm 11) + (-20.2 \pm 1.0)(-lgc),$$

и восстановленным оксидом графена с $K_4[Re_6S_8(CN)_6]$:

$$I^* = (204 \pm 10) + (-18.2 \pm 0.8)(-lgc),$$

с диапазонами рабочих концентраций соответственно $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-5}$ и $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-6}$ М.

Иммуносенсоры опускали в электрохимическую ячейку, содержащую аликвоту смыва и фосфатный буферный раствор с pH 7.5. Регистрировали аналитический сигнал (ток окисления гексарениевых кластеров I^*), по величине которого рассчитывали концентрацию амитриптилина.

Изучение смывов показало, что для трейсера № 1 характерно вымывание амитриптилина на уровне 0.6×10^{-4} М, для трейсера № 2 — 1.3×10^{-4} М, для трейсера № 3 — 1.1×10^{-4} М.

По методике, подробно описанной в “Экспериментальной части”, определили концентрации амитриптилина в трейсерах № 1, 2 и 3: 6.9×10^{-11} , 1.4×10^{-11} и 7.5×10^{-11} М соответственно.

Таким образом, можно судить о достаточной адсорбции амитриптилина на силикатной по-

верхности рутениевых НЧ, необходимой для функционирования трейсера.

Тестирование иммунореактивов. В ячейках планшета проводили последовательное разведение трейсеров в буферном растворе. Регистрировали FI и FP. Согласно требованиям чувствительности трейсера (S менее 5 FP) [23, 24] для трейсера № 1 выбрали разведение 1 : 1, для трейсера № 2 — 1 : 2, для трейсера № 3 — 1 : 5, FI которого 10-кратно превышает FI_0 , при этом оптимальное значение FP фиксируется на уровне 32.

Изучено влияние pH буферного раствора на активность флуорофора. Оптимальные значения FP регистрируются при pH 7.5 и 9.0 (рис. 3б), однако максимум FI наблюдается только при pH 7.5 (рис. 3а), поэтому последний выбран в качестве рабочего pH, что также согласуется с данными, полученными для люминесцентных НЧ на основе $[Ru(dipy)_3]^{2+}$ [25].

Следующим этапом проводили последовательное разведение Аг в фосфатном буферном растворе с pH 7.5 при фиксированной концентрации трейсеров (рис. 4), после чего измеряли FP. Оптимальным выбрано разведение, соответствующее 70%-ному значению FP от максимального сигнала — 1 : 200 (для всех трейсеров) [25].

Иммунохимическое определение антидепрессантов в режиме поляризационного флуоресцентного иммуноанализа. В лунки планшета к Аг добавляли аликвоты растворов трейсера и Аг в выбранных ранее разведениях, доводили до 200 мкл фосфатным буферным раствором с pH 7.5 и регистрировали зависимость изменения FP от концентрации лекарственного соединения. Время инкубации — 5 мин.

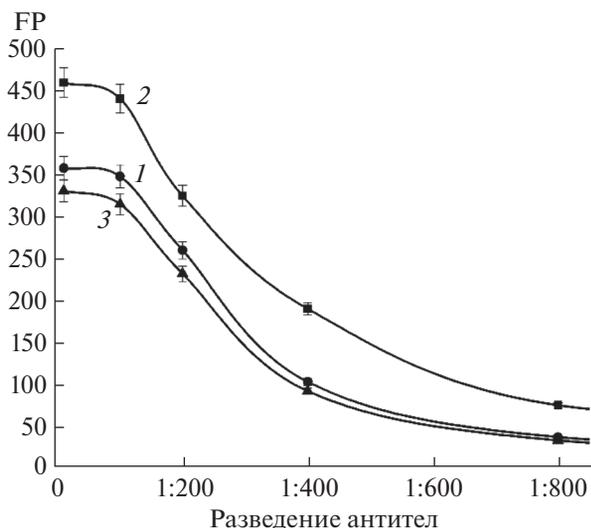


Рис. 4. Кривые зависимости поляризации флуоресценции от разведения антител при фиксированной концентрации трейсеров № 1 (1), № 2 (2) и № 3 (3), фосфатный буферный раствор с рН 7.5.

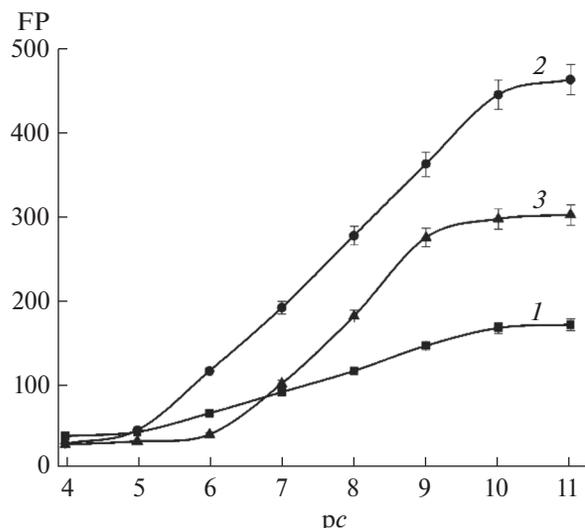


Рис. 5. Градуировочные зависимости для определения амитриптилина методом поляризационного флуоресцентного иммуноанализа с использованием трейсеров № 1 (1), № 2 (2) и № 3 (3), фосфатный буферный раствор с рН 7.5.

Наибольшая чувствительность характерна для трейсера № 2, содержащего наименьшее количество Аг. При сканировании диапазона концентраций амитриптилина от 10^{-11} до 10^{-4} М наблюдался линейный участок с высокой чувствительностью в интервале от 1×10^{-10} до 1×10^{-5} М (рис. 5, табл. 1), выбранный в качестве области рабочих концентраций.

Для проверки правильности результатов использовали способ введено-найдено (табл. 2). Относительное стандартное отклонение (s_r) не превышает 0.042.

Определение лекарственного вещества в моче. Выведение антидепрессантов из организма происходит через мочевыделительную систему, поэтому актуальна разработка методик их определения в моче в режиме ПФИА.

Амитриптилин определяли в модельном растворе урины (рН 6.0) (табл. 3) [26] (рН мочи в норме от 5.0 до 6.5).

Методика определения. В ячейки планшета к Аг добавляли аликвоты растворов трейсера и Аг в выбранных ранее разведениях, модельной урины, доводили до метки фосфатным буферным раствором с рН 7.5 и регистрировали зависимость изменения FP от концентрации лекарственного соединения. Время инкубации – 5 мин.

Определение лекарственного вещества в грудном молоке. Амитриптилин может назначаться при тяжелой форме послеродовой депрессии и способен проникать в грудное молоко. Кормление возможно при отсутствии побочных эффектов у младенца [27]. Таким образом, вопрос о мо-

Таблица 1. Аналитические возможности определения амитриптилина методом поляризационного флуоресцентного иммуноанализа с использованием различных трейсеров на фоне фосфатного буферного раствора с рН 7.5 ($n = 5, P = 0.95$)

Область рабочих концентраций, М	Уравнение градуировочной зависимости $FP = (A \pm \delta) + (B \pm \delta)(-\lg c)$			c_H, M
	$A \pm \delta$	$B \pm \delta$	r	
$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-5}$	С использованием трейсера № 1			
	-85 ± 4	25 ± 1	0.9990	6×10^{-11}
$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-5}$	С использованием трейсера № 2			
	-363 ± 18	80 ± 4	0.9993	7×10^{-11}
$1 \times 10^{-9} - 1 \times 10^{-6}$	С использованием трейсера № 3			
	-436 ± 22	78 ± 4	0.9955	8×10^{-10}

Таблица 2. Результаты определения амитриптилина методом поляризационного флуоресцентного иммуноанализа (трейсер № 2, $n = 5$, $P = 0.95$)

Введено, М	Найдено, М	s_r
Фосфатный буферный раствор с pH 7.5		
1×10^{-8}	$(1.04 \pm 0.05) \times 10^{-8}$	0.042
1×10^{-7}	$(1.00 \pm 0.04) \times 10^{-7}$	0.036
Модельная урина		
1×10^{-8}	$(1.01 \pm 0.05) \times 10^{-8}$	0.047
1×10^{-7}	$(0.99 \pm 0.04) \times 10^{-7}$	0.040
Грудное молоко		
1×10^{-8}	$(1.05 \pm 0.05) \times 10^{-8}$	0.049
1×10^{-7}	$(1.01 \pm 0.04) \times 10^{-7}$	0.041

Таблица 3. Аналитические возможности определения амитриптилина методом поляризационного флуоресцентного иммуноанализа на фоне модельной урины и грудного молока (трейсер № 2, $n = 5$, $P = 0.95$)

Область рабочих концентраций, М	Уравнение градуировочной зависимости $FP = (A \pm \delta) + (B \pm \delta)(-\lg c)$			c_H , М
	$A \pm \delta$	$B \pm \delta$	r	
Модельная урина				
$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-5}$	-403 ± 20	92 ± 5	0.9993	8×10^{-11}
Грудное молоко				
$1 \times 10^{-9} - 1 \times 10^{-5}$	-451 ± 23	97 ± 5	0.9983	7×10^{-10}

ниторинге содержания амитриптилина в грудном молоке с помощью ПФИА является актуальным.

Амитриптилин определяли на фоне грудного молока (табл. 3).

Пробоподготовка. Пробу грудного молока (1500 мкл) помещали в центрифужную пробирку, приливали 50 мкл концентрированной соляной кислоты для гидролиза белка и центрифугировали в течение 20 мин при скорости 6000 об/мин. Затем добавляли навеску (0.5 г) хлорида щелочного или щелочноземельного металла (хлорида калия) для осаждения белка и отстаивали в течение 5 мин. После повторного центрифугирования при аналогичных условиях центрифугат фильтровали через двойной бумажный фильтр. Полученный фильтрат является подготовленной пробой [28].

Методика определения. В ячейки планшета к Ag добавляли аликвоты растворов трейсера и Ат в выбранных ранее разведениях, грудного молока, доводили до метки фосфатным буферным раствором с pH 7.5 и регистрировали зависимость изменения FP от концентрации лекарственного соединения. Время инкубации – 5 мин.

Для проверки правильности результатов использовали способ введено–найдено (табл. 2). Относительное стандартное отклонение (s_r) не превышает 0.050.

Поскольку в литературе отсутствуют сведения о поляризационном флуоресцентном иммунохимическом определении амитриптилина с использованием рутинных силикатных наночастиц в качестве метки, предложенные методики анализа перспективны для решения поставленных в работе задач, что подтверждают также данные по сопоставлению аналитических возможностей существующих и предложенного способов определения антидепрессанта (табл. 4).

Исследование выполнено в рамках Программы развития Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета “Будущее планеты и глобальные изменения окружающей среды”.

Авторы благодарят ЦКП-САЦ ФИЦ КазНЦ РАН за техническую поддержку проведенных исследований. Работа А.Р. Мустафиной и С.В. Федоренко осуществлялась за счет средств субсидии, выделенной ФИЦ КазНЦРАН для выполнения государ-

Таблица 4. Аналитические характеристики определения трициклических антидепрессантов разными методами

Метод	Интервал рабочих концентраций, нг/мл	Предел обнаружения, нг/мл	Литература
Газовая хроматография	10–1000	1–3	[29]
Жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией	160–2000	50	[30]
Высокоэффективная жидкостная хроматография	5–800	2–4	[31]
Масс-спектрометрия	Не указано	5.2–8.6	[32]
Капиллярный электрофорез	500–30000	20–150	[33]
Спектрофотометрия	1–5	0.19–0.90	[34]
ПФИА с трейсером № 2	0.03–3139	0.02	Данная работа

ственной задания в сфере научной деятельности (рег. № АААА-А18-118041760011-2).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Thokchom M., Ray S.* A study to assess the level of depression among depressed patients // *Eur. J. Mol. Clin. Med.* 2020. V. 7. № 11. P. 33.
2. *Vardanyan R., Hruby V.* Antidepressants / *Synthesis of Best-Seller Drugs.* Academic Press, 2016. Ch. 7. P. 111.
3. *Ghafoor R., Rasool F.* Antidepressants and antipsychotics: Anaesthetic implications // *Anaesth. Intensive Care Med.: Pharmacol.* 2017. V. 18. № 7. P. 340.
4. *Feng Y., Zheng M., Zhang X., Kang K., Kang W., Lian K., Yang J.* Analysis of four antidepressants in plasma and urine by gas chromatography-mass spectrometry combined with sensitive and selective derivatization // *J. Chromatogr. A.* 2019. V. 1600. P. 33.
5. *Kasagic-Vujanovic I., Jancic-Stojanovic B.* Quality by design oriented development of hydrophilic interaction liquid chromatography method for the analysis of amitriptyline and its impurities // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2019. V. 173. P. 86.
6. *Fernandez-Lopez L., Pellegrini M., Rotolo M.C., Maldonado A.L., Falcon M., Mancini R.* Development and validation of a method for analysing of duloxetine, venlafaxine and amitriptyline in human bone // *Forensic Sci. Int.* 2019. V. 299. P. 154.
7. *Karami M., Yamini Y.* On-disc electromembrane extraction-dispersive liquid-liquid microextraction: A fast and effective method for extraction and determination of ionic target analytes from complex biofluids by GC/MS // *Anal. Chim. Acta.* 2020. V. 1105. P. 95.
8. *Chen Y., He Q., Shen D., Jiang Z., Eremin S.A., Zhao S.* Fluorescence polarization immunoassay based on a new monoclonal antibody for the detection of the diisobutyl phthalate in yoghurt // *Food Control.* 2019. V. 105. P. 38.
9. *Eremin S.A., Khan O.Y., Pisarev V.V., Zvereva E.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B.* Fluorescence polarization immunoassay, for express control of antibiotic levels: design and characteristics for chloramphenicol, as an example // *Antibiot. Chemother.* 2016. V. 61. № 9. P. 22.
10. *Beloglazova N.V., Shmelin P.S., Eremin S.A.* Sensitive immunochemical approaches for quantitative (FPIA) and qualitative (lateral flow tests) determination of gentamicin in milk // *Talanta.* 2016. V. 149. P. 217.
11. *Li C., Zhang Y., Eremin S.A., Yakup O., Yao G., Zhang X.* Detection of kanamycin and gentamicin residues in animal-derived food using IgY antibody based ic-ELISA and FPIA // *Food Chem.* 2017. V. 227. P. 48.
12. *Chen J., Lv S., Wang Q., Xu Z., Yang J., Shen Y., Wang H., Sun Y., Lei H.* A specific and high-throughput fluorescence polarization immunoassay for surveillance screening of clinafloxacin in milk // *Food Anal. Methods.* 2014. V. 8. № 6. P. 14.
13. *Mi T., Liang X., Ding L., Zhang S., Eremin S.A., Beier R.C., Shena J., Wang Z.* Development and optimization of a fluorescence polarization immunoassay for orbifloxacin in milk // *Anal. Methods.* 2014. V. 6. № 11. P. 3849.
14. *Beloglazova N.V., Eremin S.A.* Design of a sensitive fluorescent polarization immunoassay for rapid screening of milk for cephalixin // *Anal. Bioanal. Chem.* 2015. V. 407. № 28. P. 8525.
15. *Фарафонова О.В., Васильев С.В., Еремин С.А., Ермолаева Т.Н.* Определение аминокликозидных антибиотиков в пищевых продуктах методом поляризационного флуоресцентного иммуноанализа // *Международный научно-исследовательский журнал.* 2015. Т. 7. № 38. С. 65.
16. *Ferreira J.C.R., Neuffer D., do Amaral K.J.* Evaluation of the use of activated carbon powder for removal of emerging micropollutants from sewage wastewater // *Env. Ecol. Res.* 2017. V. 5. № 3. P. 178.
17. *Oberleitner L., Eremin S.A., Lehmann A., Garbe L.A., Schneider R.J.* Fluorescence polarization immunoassays for carbamazepine – comparison of tracers and formats // *Anal. Methods.* 2015. V. 7. № 14. P. 5854.
18. *Oberleitner L., Dahmen-Levison U., Garbe L.A., Schneider R.J.* Application of fluorescence polarization immunoassay for determination of carbamazepine in wastewater // *J. Env. Manage.* 2017. V. 193. P. 92.
19. *Raysyan A., Moerer R., Coesfeld B., Eremin S.A., Schneider R.J.* Fluorescence polarization immunoassay for the determination of diclofenac in wastewater // *Anal. Bioanal. Chem.* 2021. V. 413. № 4. P. 999.

20. *Mustafina A.R., Fedorenko S.V., Konovalova O.D., Menshikova A.Yu., Shevchenko N.N., Soloveva S.E., Konovalov A.I., Antipin I.S.* Novel highly charged silica-coated Tb(III) nanoparticles with fluorescent properties sensitive to ion exchange and energy transfer processes in aqueous dispersions // *Langmuir*. 2009. V. 25. № 5. P. 3146.
21. *Fedorenko S.V., Bochkova O.D., Mustafina A.R., Burirov V.A., Kadirov M.K., Holin C.V., Nizameev I.R., Skripacheva V.V., Menshikova A.Y., Antipin I.S., Konovalov A.I.* Dual visible and near-infrared luminescent silica nanoparticles. Synthesis and aggregation stability // *J. Phys. Chem. C*. 2010. V. 114. № 14. P. 6350.
22. *He Q., Cui X., Shen D., Chen Y., Jiang Z., Lv R., Eremin S.A., Zhao S.* Development of a simple, rapid and high-throughput fluorescence polarization immunoassay for glycocholic acid in human urine // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2018. V. 158. P. 431.
23. *Beloglazova N.V., Eremin S.A.* Rapid screening of aflatoxin B1 in beer by fluorescence polarization immunoassay // *Talanta*. 2015. V. 142. P. 170.
24. *Zhang H., Yang S., Beier R.C., Beloglazova N.V., Lei H., Sun X., Ke Y., Zhang S., Wang Z.* Simple, high efficiency detection of microcystins and nodularin-R in water by fluorescence polarization immunoassay // *Anal. Chim. Acta*. 2017. V. 992. P. 119.
25. *Wang Y., Zhao G., Li X., Liu L., Cao W., Wei Q.* Electrochemiluminescent competitive immunosensor based on polyethyleneimine capped SiO₂ nanomaterials as labels to release Ru (bpy)₃²⁺ fixed in 3D Cu/Ni oxalate for the detection of aflatoxin B1 // *Biosens. Bioelectron.* 2018. V. 101. P. 290.
26. *Pietrzyńska M., Voelkel A.* Stability of simulated body fluids such as blood plasma, artificial urine and artificial saliva // *Microchem. J.* 2017. V. 134. № 6. P. 197.
27. *Аргунова И.А.* Послеродовая депрессия. На стыке общей врачебной практики, акушерства и психиатрии // *Российский семейный врач*. 2010. Т. 14. № 1. С. 4.
28. *Слепченко Г.Б., Мартынюк О.А., Шелеметьева О.В.* Разработка методик определения в грудном молоке витаминов группы В // *Изв. Томск. политех. ун-та*. 2008. Т. 312. № 3. С. 58.
29. *Tabani H., Shokri A., Tizro S., Nojavan S., Varanusupakul P., Alexovič M.* Evaluation of dispersive liquid-liquid microextraction by coupling with green-based agarose gel-electromembrane extraction: An efficient method to the tandem extraction of basic drugs from biological fluids // *Talanta*. 2019. V. 199. P. 329.
30. *Ide A.H., Nogueira J.M.F.* New-generation bar adsorptive microextraction (BAE) devices for a better eco-user-friendly analytical approach – Application for the determination of antidepressant pharmaceuticals in biological fluids // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2018. V. 153. P. 126.
31. *Safari M., Shahlaei M., Yamini Y., Shakorian M., Arkan E.* Magnetic framework composite as sorbent for magnetic solid phase extraction coupled with high performance liquid chromatography for simultaneous extraction and determination of tricyclic antidepressants // *Anal. Chim. Acta*. 2018. V. 1034. P. 204.
32. *de Oliveira F.M., Scheel G.L., Augusti R., Tarley C.R.T., Nascentes C.C.* Supramolecular microextraction combined with paper spray ionization mass spectrometry for sensitive determination of tricyclic antidepressants in urine // *Anal. Chim. Acta*. 2020. V. 1106. P. 52.
33. *Rysavá L., Dvorák M., Kubán P.* The effect of membrane thickness on supported liquid membrane extractions in-line coupled to capillary electrophoresis for analyses of complex samples // *J. Chromatogr. A*. 2019. V. 1596. P. 226.
34. *Farnoudian-Habibi A., Massoumi B., Jaymand M.* A novel strategy for spectrophotometric simultaneous determination of amitriptyline and nortriptyline based on derivation with a quinonoid compound in serum samples // *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 2016. V. 168. P. 235.

УДК 539.18:543.42:54.062

СПОСОБ КОРРЕКТИРОВКИ РЕЗУЛЬТАТОВ ЭЛЕКТРОННО-ЗОНДОВОГО ЭНЕРГОДИСПЕРСИОННОГО ЭЛЕМЕНТНОГО АНАЛИЗА ПОРОШКОВЫХ МАТЕРИАЛОВ

© 2022 г. Д. Э. Пухов^а*, А. А. Лаптева^б^аЯрославский филиал Физико-технологического института имени К.А. Валиева Российской академии наук
ул. Университетская, 21, Ярославль, 150007 Россия^бЯрославский государственный университет им. П.Г. Демидова
ул. Советская, 14, Ярославль, 150003 Россия*e-mail: puhov2005@yandex.ru

Поступила в редакцию 30.10.2021 г.

После доработки 24.11.2021 г.

Принята к публикации 01.12.2021 г.

Установлены основные закономерности количественных изменений в энергодисперсионных спектрах при определении элементного состава порошкообразных материалов. Показано, что в большинстве случаев при определенной энергии зондирующих электронов расчет относительных массовых долей элементов в образцах порошков приводит к результатам, не отличающимся от полученных на эталонных полированных поверхностях образцов. При обобщении экспериментальных данных получена эмпирическая зависимость, связывающая параметры характеристических фотонов с величиной ускоряющего напряжения, необходимого для получения корректного соотношения массовых концентраций элементов при анализе порошкообразных материалов. Предложена методика корректировки результатов элементного анализа порошковых образцов.

Ключевые слова: энергодисперсионный спектр, интенсивности диагностических линий, элементный анализ, ускоряющее напряжение, энергия характеристических фотонов, ослабление рентгеновского излучения, расчет массовых долей.

DOI: 10.31857/S0044450222090110

Электронно-зондовый энергодисперсионный анализ – распространенный и достаточно эффективный экспресс-метод определения элементного состава материалов. Системы энергодисперсионного микроанализа компактны, легко интегрируемы в электронно-микроскопические системы. Детекторы рентгеновских фотонов позволяют обнаруживать примесные элементы с пределом детектирования около 0.05–0.1 мас. % и проводить анализ с относительной погрешностью в пределах 10% для элементов с концентрацией 1–10 мас. % [1–4].

Общими неизменными требованиями для получения корректных результатов расчета относительных долей элементов являются однородность состава в пределах зоны генерации рентгеновских фотонов, строго определенная ориентация плоскости поверхности образца и высокая степень ее гладкости, обычно достигаемая разными способами полирования. В большинстве случаев неидеальная гладкость поверхности образца является главной причиной смещения результата количественного анализа. При этом качество обработки поверхности влияет в большей степе-

ни на рентгеновские диагностические линии с небольшой энергией. Так, моделирование методами Монте-Карло показывает, что борозды глубиной и шириной около 100 нм, ориентированные перпендикулярно направлению движения фотонов от поверхности образца к детектору, приводят к относительному занижению на 5% интенсивностей К-линий кислорода (0.51 кэВ) и L-линий железа (0.71 кэВ) в спектре оксида железа. Занижение интенсивностей на величину менее 1% достигается лишь при уменьшении размеров таких неровностей до 20 нм [4, 5]. При анализе в точке может наблюдаться как завышение, так и занижение интенсивности низкоэнергетической линии относительно более высоко энергетической в зависимости от положения точки анализа относительно направления на детектор. Это сопровождается отклонениями результатов вычисления массового содержания элементов от нескольких десятков до сотни процентов [1, 4]. При сканировании вдоль линии или растром геометрические эффекты вследствие усреднения ориентации локальных участков поверхности сказываются в меньшей степени.

Наиболее сильно влияние геометрии поверхности должно сказываться при количественном анализе по характеристическим линиям с энергией менее 200 эВ, включая К-линию лития. В последние годы показана возможность диагностирования фотонов с такими энергиями с использованием детекторов большой площади с низким уровнем шума [6–8]. Геометрические неоднородности должны влиять на результаты определения легких элементов в максимальной степени при локальном сканировании по участкам с размером менее 50 нм, достигаемом в низковольтной сканирующей микроскопии [9].

В целом трудности количественного электронно-зондового анализа порошковых образцов обсуждаются уже около 50 лет [10]. Выделяют следующие основные причины их возникновения. Во-первых, это так называемый массовый эффект или эффект уменьшения области генерации рентгеновских фотонов, связанный с увеличением доли отраженных электронов при падении на неровности или грани отдельных частиц, ориентация которых по отношению к электронному зонду отличается от нормальной [4, 11, 12]. Массовый эффект наблюдается и для индивидуальных микрочастиц, если их объем меньше области генерации рентгеновского излучения. В таком случае область генерации имеет обрыв, а измеряемая интенсивность характеристической линии занижена по сравнению с интенсивностью, измеренной при тех же условиях на массивном полированном образце.

Во-вторых, в зависимости от положения точки анализа на неровной поверхности по отношению к детектору пробег фотона в материале может уменьшаться или увеличиваться. Отношение регистрируемых интенсивностей низкоэнергетических линий к интенсивностям линий с высокой энергией может быть в разы больше или меньше отношения, наблюдаемого для образца с гладкой поверхностью вследствие сильно различающихся коэффициентов поглощения [4, 5, 11]. Данная закономерность носит название “эффект поглощения”.

В качестве третьего и менее значимого фактора указывается обрыв области генерации флуоресцентного излучения даже для достаточно крупных частиц с размерами порядка десятков микрометров. Данный эффект обуславливает необходимость дополнительной корректировки при анализе отдельных частиц, спектр характеристического рентгеновского излучения которых содержит близкие по энергии диагностические линии [4, 10].

Одним из возможных способов достижения удовлетворительных результатов элементного анализа в случае неровных поверхностей и индивидуальных частиц является использование метода пик/фон. В его основе лежит наблюдаемое яв-

ление, состоящее в том, что отношение интенсивностей характеристического и тормозного излучений с одинаковой энергией мало зависит от формы и размеров образца. Метод заключается во введении поправки в интенсивность характеристической линии элемента в составе исследуемого неровного образца в виде коэффициента, являющегося отношением интенсивности тормозного фона для массивного полированного образца и исследуемого материала [4]. Интенсивность тормозного излучения от полированного образца измеряется на одноэлементных стандартах или стандартах, близких по составу к исследуемому веществу. В другом случае она может быть получена моделированием на основе закономерностей возникновения непрерывного рентгеновского излучения [11, 13, 14]. Однако отмечается, что в случае малых частиц, для которых сильно выражен массовый эффект, наблюдается анизотропия генерации характеристического и непрерывного рентгеновского излучения [13]. Это требует внесения дополнительных изменений в экспериментально определяемую интенсивность фона с учетом размеров и геометрии частиц. Также к сложностям правильного подбора аппроксимирующей кривой для фона тормозного излучения приводит использование низких ускоряющих электронных зонд напряжений, снижающих проявление массового эффекта [15]. Кроме того, во всех случаях анализа частиц или массивных образцов с шероховатой поверхностью вследствие относительно низкой детектируемой интенсивности непрерывного фонового излучения неизбежно возникает существенная погрешность при определении отношения пик/фон. Это влечет необходимость значительного увеличения времени набора энергодисперсионного спектра. В целом же метод пик/фон достаточно эффективен, позволяет уменьшить относительную погрешность расчета концентрации элементов до величин в пределах от нескольких до десяти процентов в зависимости от содержания элементов в материале.

Другим подходом для учета массового эффекта и эффекта поглощения является теоретическое моделирование, учитывающее ограничения поверхностью частицы зоны генерации и поглощения рентгеновских фотонов. Подобные исследования ведутся с 70-х годов прошлого века [10, 16–19]. Теоретическая корректировка особенностей геометрии образца является трудоемкой и дает хорошие результаты с относительной погрешностью порядка 1–3% лишь при исследовании состава одиночных частиц строго определенных формы и размеров в матрице известного состава [20].

В качестве альтернативного пути предлагается корректировка экспериментальных спектров на основании постоянно пополняющихся баз экспериментальных данных и данных о моделировании генерации и поглощения рентгеновских фо-

тонов для частиц разного состава и морфологии [21]. Относительно практического применения для анализа такой подход предполагает, что среди моделированных и/или экспериментальных данных должны обнаруживаться энергодисперсионные спектры материалов, которые при огромном разнообразии возможных форм и размеров частиц близко совпадают по геометрии с исследуемым образцом.

В случае с порошковыми материалами геометрия поверхности образца носит случайный характер. В работе [22] предложено теоретическое определение отношения интенсивностей линий элементов методом интегрирования с учетом моделируемого распределения плотности генерации характеристического излучения под наклонной плоскостью со случайным углом наклона и ориентацией относительно детектора рентгеновских фотонов. Получено совпадение с экспериментальными зависимостями относительных интенсивностей от энергии электронов. Трудоемкость и длительность расчетов может вызвать затруднения для включения описываемого теоретического аппарата в алгоритмы автоматической корректировки результатов анализа. Тем не менее одним из важных выявленных фактов является то, что при некоторых энергиях зондирующих электронов отношения интенсивностей диагностических линий некоторых или всех пар элементов в порошковых материалах совпадают с таковыми для плоскополированных образцов того же состава. Это предполагает возможность получения более точных результатов количественного анализа при определенных значениях ускоряющего напряжения.

В данной работе рассматривается способ элементного дисперсионного анализа порошкообразных материалов на основании эмпирического подбора энергии сканирующих электронов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Аппаратура. Энергодисперсионные спектры получали на двулучевой СЭМ-ФИП системе Quanta 3D 200i (FEI, Нидерланды) с приставкой элементного анализа EDAX Apollo X (Ametek Inc., США). Диапазон ускоряющих напряжений 3–30 кВ, рабочий отрезок при наборе энергодисперсионных спектров 15 мм, угол сбора рентгеновских фотонов относительно направления движения электронов зонда 50.5°. Использовали режимы высокого вакуума для полупроводниковых образцов и низкого вакуума с заполнением рабочей камеры парами воды под давлением 70–80 Па для диэлектрических материалов. Спектры обрабатывали в программной среде EDAX Genesis (Ametek Inc., США). Для вычисления массовых долей элементов использовали метод ZAF-коррекции. Количественный анализ в случае наличия низкоэнергетических диагностических линий (менее

0.8 кэВ) проводили с использованием эталонных образцов в виде соединений.

Объекты анализа. В качестве анализируемых материалов выбрали образцы, содержащие менее 1 мас. % примесных элементов. Использовали полупроводниковые материалы: карбид кремния (SiC) в виде шлифовальных порошков механических фракций F220, F600, F1200, F2000 и полированной поверхности муассанита; минералы касситерит (SnO₂), стибнит (Sb₂S₃), пирит (FeS₂), куприт (Cu₂O), цинкит (ZnO), халькопирит (CuFeS₂), арсенипирит (FeAsS), теннантит (Cu₁₂As₄S₁₃), дискразит (Ag₃Sb), Zn-замещенный минерал изоморфного ряда тетраэдрит-теннантит (Cu_(3-x)Zn_xSbS_(3-y)As_y). Диэлектрические минералы: кварц (SiO₂), корунд (Al₂O₃), кианит (Al₂O(SiO₄)), флюорит (CaF₂), исландский шпат (CaCO₃), целестин (SrSO₄), виллемит (Zn₂SiO₄), микроклин (KAlSi₃O₈), сколецит (CaAl₂Si₃O₁₀·3H₂O), энстатит (Mg_{1.92}Fe_{0.08}(Si₂O₆)), спессартин (Ca_{0.17}Mg_{0.70}Mn_{2.31}Al₂(SiO₄)₃). В качестве контрольных использовали полированные поверхности образцов, перевод в порошкообразное состояние проводили дроблением и растиранием в агатовой ступке, для минералов с высокой твердостью применяли шлифовальную резку инструментами с алмазными абразивами. Поверхность порошков в кювете выравнивали полированной пластиной из поликристаллического корунда. Визуально контролировали горизонтальность поверхности при размещении в камере микроскопа и отсутствие неровностей более 300 мкм в зоне сканирования.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Общие закономерности изменения интенсивностей диагностических линий на примере бинарных соединений. Относительные отклонения регистрируемых интенсивностей диагностических рентгеновских линий в энергодисперсионных спектрах порошкообразных образцов оценивали попарно по величине K :

$$K = \frac{I_1/I_2}{I_1^0/I_2^0}, \quad (1)$$

где I_1 и I_2 – интенсивности диагностических линий элементов соответственно с меньшей и большей энергий для порошкового материала, I_1^0 и I_2^0 – интенсивности тех же линий в контрольном спектре, полученном с полированной поверхности.

Такой подход позволяет избежать влияния таких факторов, как непропорциональное изменение интенсивностей линий с разными энергиями при изменении энергии зондирующих электронов, различий в чувствительности детектора к рентгеновским фотонам разных энергий. Ис-

пользование величины K также допускает получение спектров контрольного и порошкообразного образца при разных значениях силы тока сканирующего электронного пучка.

Наиболее сильное искажение относительных величин диагностических пиков наблюдается для карбида кремния. Исследованы несколько размерных фракций порошка (рис. 1). Величина K , рассчитанная для линий углерода $C(K-L_3)$ и суммарной линии кремния $Si(K-L_3, K-M_3)$, зависит от энергии зондирующих электронов, как показано на рис. 2а. В зависимости от энергии зондирующих электронов может происходить как относительное занижение рефлекса углерода, так и завышение. Соответственно в результатах количественного анализа доля углерода может оказаться завышенной или заниженной. Не обнаружена зависимость величины K от среднего размера частиц в порошке, за исключением самой мелкозернистой фракции. Этот факт мы объясняем тем, что для мелких фракций материала сильно сказывается массовый эффект, когда для большого количества частиц размеры зоны генерации рентгеновского излучения начинают превосходить размеры самих частиц. Область генерации в таком случае переходит через поверхность соседней частицы, которая может оказаться ориентированной на детектор и обеспечить слабое поглощение фотонов. Частичным подтверждением этому является результат моделирования размера области генерации излучения углерода (рис. 2б) методами Монте-Карло с помощью программы CASINO v.2.48. (<https://www.gel.usherbrooke.ca/casino/>). Описание программного продукта приведено в работах [23–26].

Резкие различия в поведении характеристики K для мелкозернистой фракции проявляются в тот момент, когда глубина и сопоставимый с ней радиус области генерации характеристического излучения углерода начинают превосходить средний размер частицы. Аналогично массовый эффект присутствует и для линии кремния. Но вследствие больших различий в массовых коэффициентах поглощения $C(K-L_3)$ и $Si(K-L_3, K-M_3)$, 25200 и 390 см²/г соответственно, относительное уменьшение поглощения характеристических фотонов кремния пренебрежимо мало.

По результатам прочих экспериментов какой-либо зависимости характеристики K от размера частиц порошка не обнаружено. Так, в случае порошков SnO₂, полученных дроблением и дополнительным растиранием, зависимости величины K , определенной для интенсивностей линий $O(K-L_3)$ и суммарных $Sn(L_3-M_{5,4}; L_3-N_5; L_2-M_4; L_1-M_3)$, от энергии зондирующих электронов идентичны (рис. 3).

Еще одной особенностью отношения интенсивностей K является то, что зависимость K от энергии электронов зонда может практически от-

сутствовать, если энергии диагностических линий и коэффициенты поглощения в образце соответствующих фотонов отличаются на небольшую величину. Так, при анализе порошка дискразита (Ag₃Sb) определенной достоверной зависимости не установлено для линий L-серии серебра $Ag(L_3-M_{5,4}; L_3-N_5; L_2-M_4; L_1-M_3)$ и L-серии сурьмы $Sb(L_3-M_{5,4}; L_3-N_5; L_2-M_4; L_1-M_3)$ с энергиями максимального пика 2.98 и 3.61 кэВ (рис. 4а). При этом для основной линии серии сурьмы вследствие близости к краю поглощения серебра полный коэффициент ослабления $(\mu/\rho)_{Sb(L)} = 1290$ см²/г превосходит таковой для серебра $(\mu/\rho)_{Ag(L)} = 580$ см²/г. Если рентгеновские излучательные серии имеют более значимые различия по энергиям, наложения энергии высокоэнергетических фотонов на край поглощения более легким элементом не происходит. В таком случае зависимость относительных интенсивностей K от энергии зондирующих электронов становится более выраженной. Для примера на рис. 4а данная зависимость показана для K-серии серы $S(K-L_3, -M_3)$ и L-серии сурьмы $Sb(L_3-M_{5,4}; L_3-N_5; L_2-M_4; L_1-M_3)$ с энергиями основной линии 2.31 и 3.61 кэВ соответственно. Равенство $K = 1$ задает интервал ускоряющих напряжений, требуемых для корректного элементного анализа Sb₂S₃, 27–30 кВ. Действительно, анализ при энергии электронов зонда 28 кэВ приводит к результатам, соответствующим стехиометрии стибнита.

Элементы Si и Al имеют соседние порядковые номера. Это обуславливает в соответствующих оксидах SiO₂ и Al₂O₃ близость коэффициентов ослабления для диагностической линии $O(K-L_3)$ и схожие зависимости параметра K для пар линий $O(K)/Si(K)$ и $O(K)/Al(K)$ от ускоряющего напряжения. Кроме того, практически неразличимы размеры и форма областей генерации характеристических фотонов элементов. В данном и подобных случаях алгоритмы корректировки результатов расчета содержания соседствующих по порядковому номеру элементов могут быть одинаковыми. В частности, правильные результаты количественного определения элементов в порошке (и SiO₂, и Al₂O₃) достигаются при ускоряющем напряжении 17 ± 0.5 кВ.

Напротив, зависимости интенсивностей диагностических линий соседних по порядку элементов Cu и Zn в оксидах Cu₂O и ZnO по отношению к линии кислорода от энергии индуцирующих излучение электронов несколько различаются (рис. 4б). Коэффициенты ослабления для диагностических линий $O(K-L_3)$, Cu, Zn($L_3-M_{4,5}; L_2-M_4; L_3-M_1$), Cu, Zn($K-L_{2,3}; K-M_3$) в соответствующих оксидах имеют лишь небольшие отличия. Но при этом глубина области генерации для характеристических фотонов в Cu₂O и ZnO имеет существенные различия. Так, например, при модели-

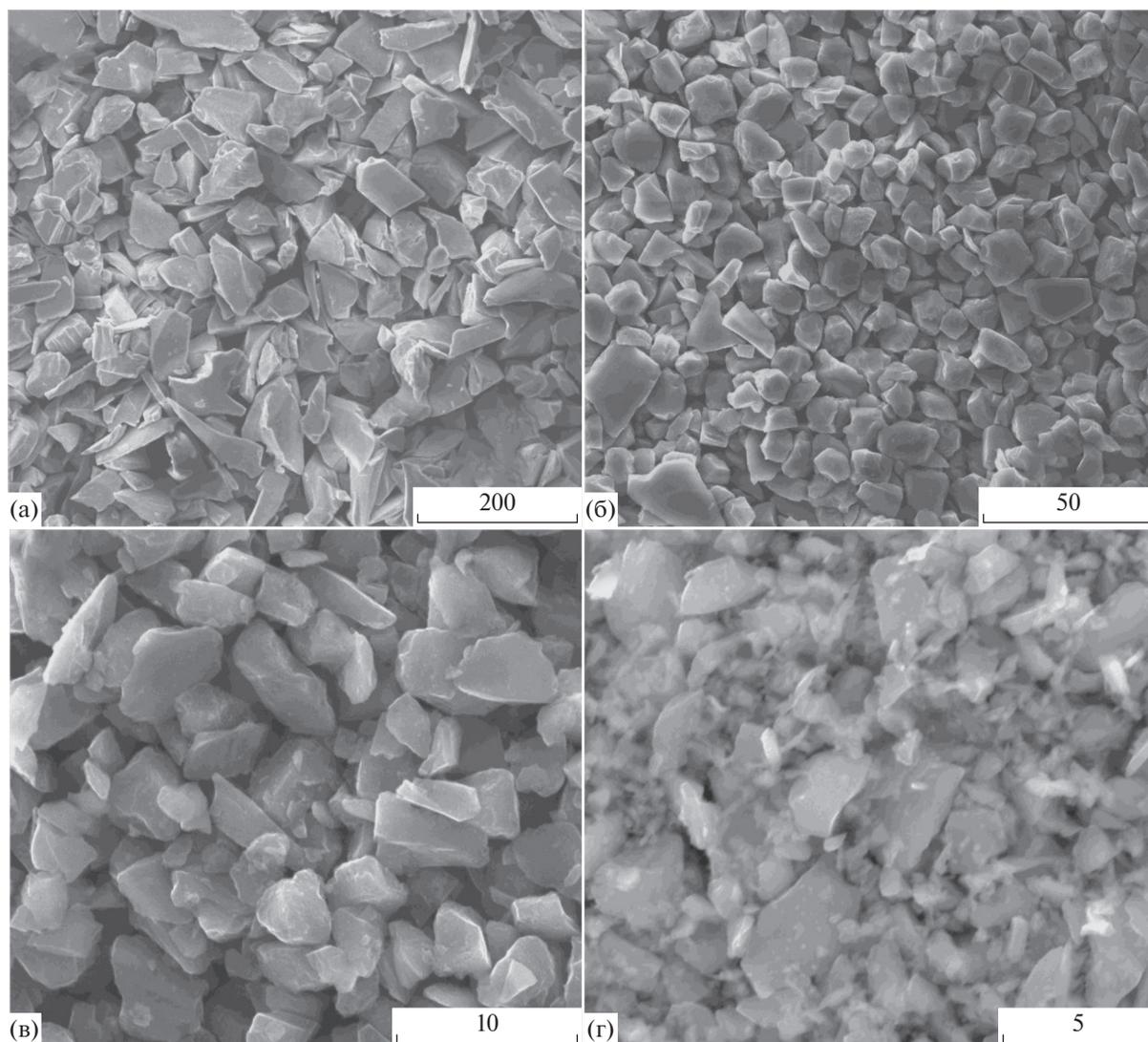


Рис. 1. СЭМ-изображения порошков SiC со средними линейными размерами частиц 62 мкм (а), 11 мкм (б), 3,4 мкм (в), 1,4 мкм (г); длина масштабного отрезка приведена в микрометрах.

ровании области генерации рентгеновского излучения максимум плотности и максимальная глубина генерации для линии Zn(K-L_{2,3}; K-M₃) в оксиде цинка при энергии электронов 15 кэВ составляют 190 и 950 нм. В оксиде меди для линии Cu(K-L_{2,3}; K-M₃), имеющей меньшую энергию, соответствующие параметры имеют значения 140 и 760 нм. Таким образом, в материалах, резко отличающихся по поглощению и рассеиванию первичных электронов зонда, для количественного определения близких и даже совпадающих по порядковому номеру элементов оптимальные значения энергии электронов зонда могут не совпадать.

Многоэлементные соединения. В отличие от бинарных, в многоэлементных соединениях равенство $K = 1$ для интенсивностей диагностических линий двух элементов при определенном ускоря-

ющем напряжении не означает, что при данном напряжении правильным окажется также отношение рассчитанных массовых долей этих элементов. Результат расчета также определяется количеством прочих элементов в составе. В качестве примера на рис. 5а приведены зависимости параметра от энергии зондирующих электронов для пар диагностических линий O(K-L₃)/Ca(K-L_{2,3}; K-M₃) и C(K-L₃)/O(K-L₃) в порошке исландского шпата (CaCO₃).

Корректные по сравнению с полированным образцом отношения интенсивностей линий O(K)/Ca(K) и C(K)/O(K) наблюдаются при ускоряющих напряжениях 22,5 и 10 кВ соответственно. Отношения рассчитанных массовых долей Wt_O/Wt_{Ca} и Wt_C/Wt_O оказались соответствующими стехиометрии CaCO₃ при близких, но не-

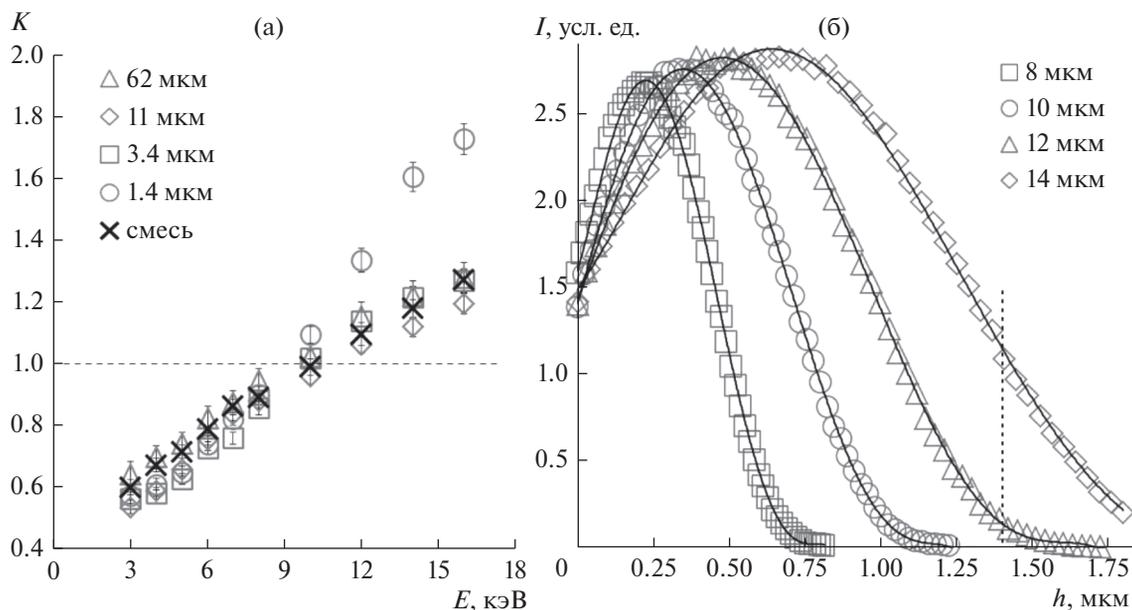


Рис. 2. Зависимость характеристики K от энергии электронного зонда для разных размерных фракций частиц SiC и их смеси одинаковых пропорций по массе (а); моделирование глубины генерации характеристического излучения углерода в составе SiC в зависимости от энергии индуцирующих электронов (б).

сколько отличающихся значениях ускоряющего напряжения 21.5 и 9 кВ соответственно. При этом правильному отношению $Wt_{\text{O}}/Wt_{\text{Ca}}$ в результатах расчета сопутствует занижение количества углерода, правильному отношению $Wt_{\text{C}}/Wt_{\text{O}}$ – завышение кальция. Полностью скорректированный результат получается при совместном решении уравнений

$$\begin{aligned} \text{а) } Wt_{\text{O}}/Wt_{\text{Ca}} &= Z_{\text{O,Ca}}(21 \text{ кВ}); \\ \text{б) } Wt_{\text{C}}/Wt_{\text{O}} &= Z_{\text{C,O}}(9 \text{ кВ}); \\ \text{в) } Wt_{\text{C}} + Wt_{\text{O}} + Wt_{\text{Ca}} &= 1. \end{aligned} \quad (2)$$

Таким образом, для уточнения результатов анализа трехэлементных порошковых материалов достаточно при определенных ускоряющих напряжениях определить правильные отношения массовых долей двух пар элементов.

При наличии в составе элементов, соседствующих в периодической системе, но при отсутствии в энергодисперсионном спектре краев поглощения около диагностических линий, можно считать, что отношения массовых долей этих элементов будут правильными в широком диапазоне ускоряющих напряжений (рис. 5а). Так при анализе спектров порошка кианита ($\text{Al}_2\text{O}(\text{SiO}_4)$) установлено, что для корректировки результатов элементного анализа достаточно подобрать ускоряющее напряжение, при котором в правильном соотношении находятся массовые доли пар элементов Wt_{O} и Wt_{Si} или Wt_{O} и Wt_{Al} . В случае с $\text{Al}_2\text{O}(\text{SiO}_4)$ это напряжение составляет 17.5 кВ и численно совпадает с энергией электронов 17.5 кэВ,

при которой выполняется равенство $K = 1$ для пары линий $\text{O}(K)/\text{Si}(K)$.

Аналогичный пример представлен на рис. 5б для порошкообразного сколецита ($\text{CaAl}_2\text{Si}_3\text{O}_{10} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), имеющего в составе четыре диагностируемых энергодисперсионным методом элемента. В случае четырехэлементного состава достаточно определить корректные отношения массовых долей для трех независимых пар элементов. Правильное в пределах погрешности эксперимента соотношение массовых долей Al и Si получено во всем использованном диапазоне ускоряющих напряжений. Отношения массовых долей $Wt_{\text{O}}/Wt_{\text{Ca}}$ и $Wt_{\text{O}}/Wt_{\text{Si}}$ совпадают с эталонными при энергиях зондирующих электронов 19 и 16 кэВ.

Для соединений элементов, допускающих анализ по диагностическим линиям двух серий излучения, спектр возможных комбинаций пар линий значительно расширяется. На рис. 6 представлены зависимости параметра K от энергии электронов зонда нескольких пар характеристических линий в энергодисперсионных спектрах халькопирита (CuFeS_2) и арсенопирита (FeAsS). При количественной обработке спектров CuFeS_2 правильный результат по составу можно получить, используя девять комбинаций отношений массовых долей элементов. Аналогичный расчет для FeAsS оказался возможен лишь по семи комбинациям. Найденный для интенсивностей диагностических линий мышьяка L-серии $\text{As}(L_3\text{-}M_{5,4}; L_2\text{-}M_4; L_1\text{-}M_2; L_3\text{-}M_1)$ и железа K-серии $\text{Fe}(K\text{-}L_{2,3}; K\text{-}M_3)$ параметр K не принимает единичного зна-

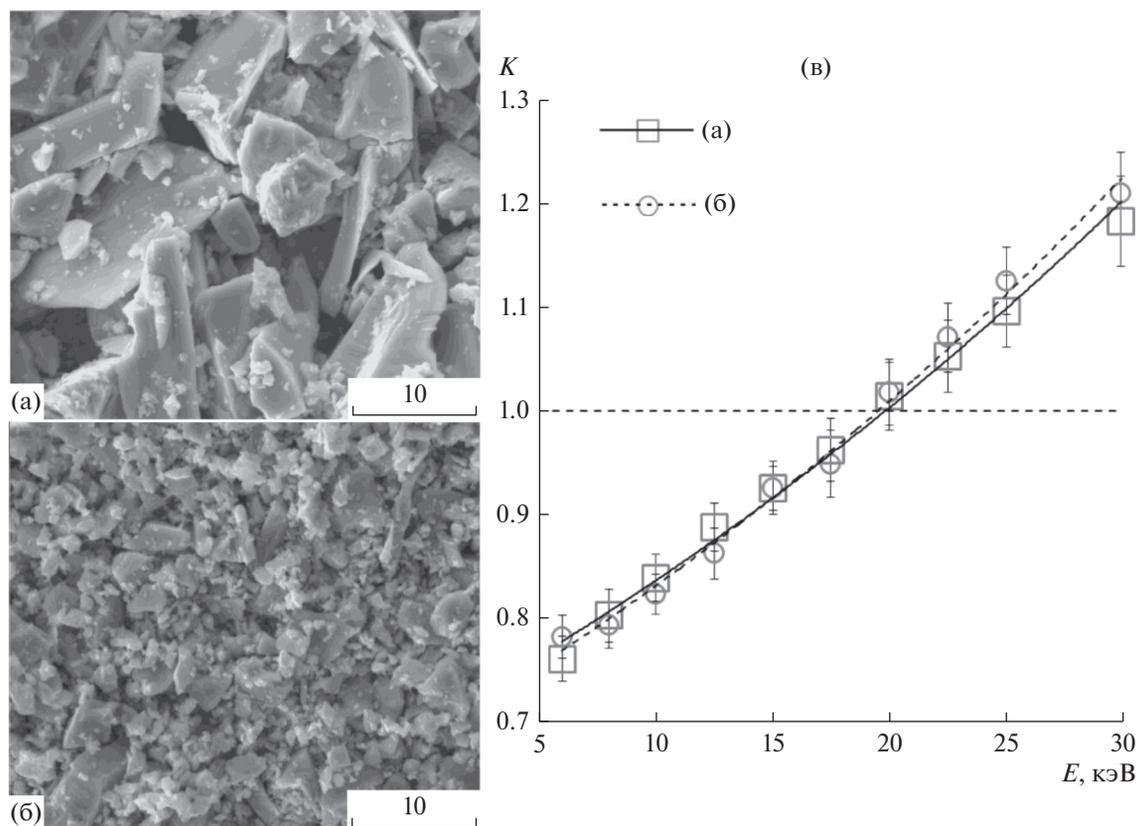


Рис. 3. СЭМ-изображения порошков SnO₂, полученных дроблением (а) и дополнительным растиранием (б); соответствующие зависимости характеристики K от энергии электронов зонда (в). Длина масштабного штриха указана в микрометрах.

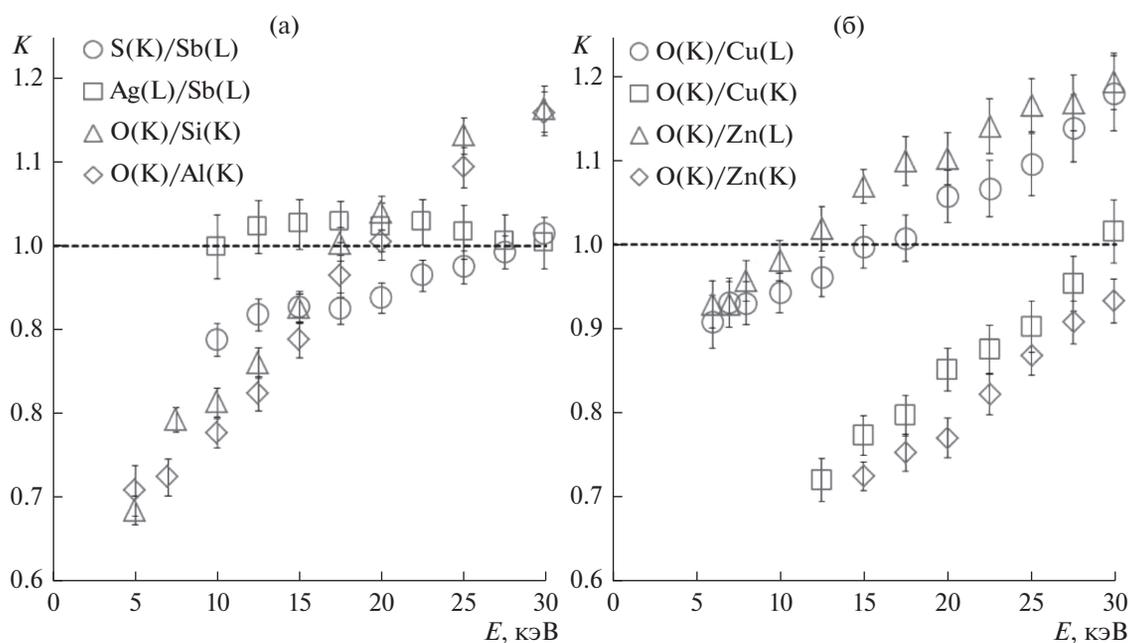


Рис. 4. Зависимость характеристики K от энергии электронного зонда для пар диагностических линий, полученная для порошков Sb₂S₃, Ag₃Sb, SiO₂, Al₂O₃ (а) и Cu₂O, ZnO (б).

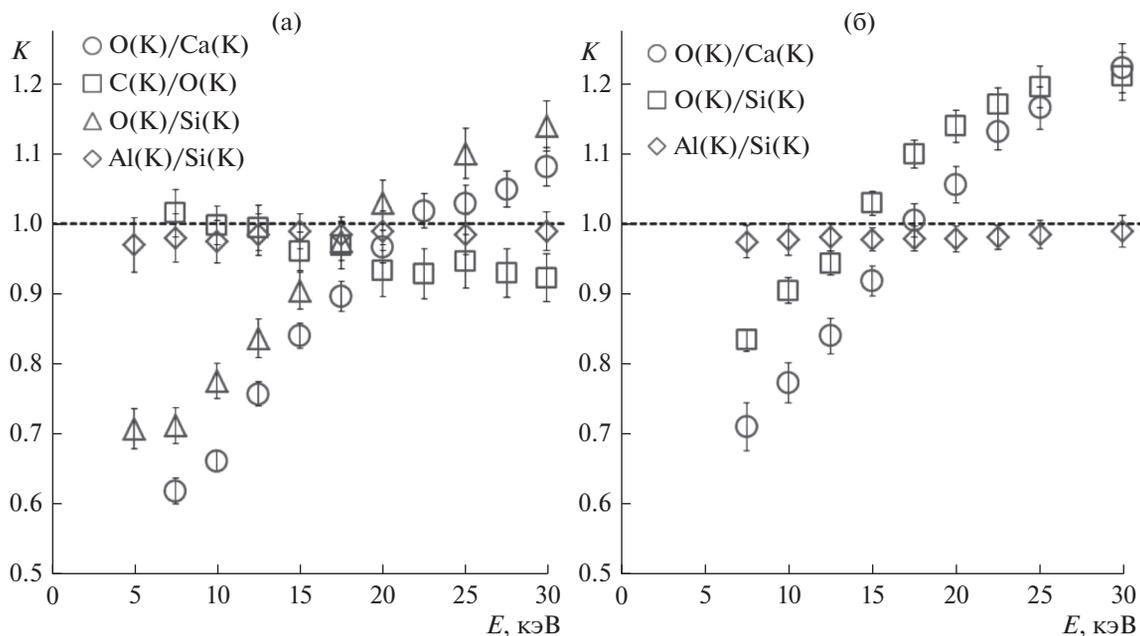


Рис. 5. Зависимость характеристики K от энергии электронного зонда для пар диагностических линий, полученная для порошков CaCO_3 , $\text{Al}_2\text{O}(\text{SiO}_4)$ (а) и $\text{CaAl}_2\text{Si}_3\text{O}_{10} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (б).

чения в доступном интервале энергий зондирующих электронов. Также и отношение массовых долей $W_{\text{As}}/W_{\text{Fe}}$, определенное по указанным выше линиям, оказалось заниженным по сравнению с результатами анализа на эталоне вплоть до ускоряющего напряжения 30 кВ.

Обобщение экспериментальных данных. Первостепенными факторами, влияющими на генерацию характеристических рентгеновских фотонов и на регистрируемую интенсивность диагностических линий, являются объем области генерации и коэффициент ослабления μ/ρ потока фотонов в веществе. В свою очередь глубина и радиальный размер области генерации в данном материале и при заданной энергии индуцирующих электронов определяется энергией E характеристических фотонов. По совокупности проведенных измерений для каждой пары элементов в составе порошковых образцов определили энергии E_0 зондирующих электронов, при которых рассчитываемые массовые доли элементов W_{i_j} и W_{i_j} находятся в таком же соотношении, как для полированных образцов того же состава. Эмпирически подобрана функция $f(\mu/\rho, E)$ параметров характеристических фотонов, имеющая экспериментально установленную связь с энергией E_0 . Функция имеет следующий вид:

$$f\left(\frac{\mu}{\rho}, E\right) = \left[\ln \left(\left(\frac{\mu}{\rho} \right)_i - \left(\frac{\mu}{\rho} \right)_j \right) \right]^{1.5} \sqrt{\frac{(E_j/E_i)^{0.5}}{E_j - E_i}}, \quad (3)$$

где $E_{i,j}$ и $(\mu/\rho)_{i,j}$ — энергии (кэВ) и массовые коэффициенты ослабления ($\text{см}^2/\text{г}$) характеристиче-

ских фотонов элементов i и j соответственно. Связь $f(\mu/\rho, E)$ и E_0 показана на рис. 7.

Фактически приведенная графическая зависимость выступает в роли градуировочного графика для подбора ускоряющего напряжения, при котором вычисляемые массовые доли пары элементов находятся в правильном соотношении между собой. При этом возникает несколько ограничений и допущений. Во-первых, для характеристических фотонов с энергиями E_i и E_j должно выполняться условие

$$E_i < E_j \text{ и } (\mu/r)_i > (\mu/r)_j. \quad (4)$$

Это означает, что фотоны с меньшей энергией должны испытывать большее ослабление. Так, не были приняты в расчет такие комбинации диагностических линий, как $\text{C}(\text{K})/\text{O}(\text{K})$ в CaCO_3 , $\text{Al}(\text{K})/\text{Si}(\text{K})$ для некоторых включающих одновременно оба элемента материалов, как это наблюдается для кианита ($\text{Al}_2\text{O}(\text{SiO}_4)$) и микроклина (KAlSi_3O_8). Однако в большинстве случаев, когда значение энергии диагностической линии одного элемента не находится близко к краю поглощения в другом элементе, условие (4) выполняется.

Во-вторых, отношение вычисляемых массовых долей элементов W_{i_j}/W_{i_j} должно иметь явную зависимость от ускоряющего напряжения с достоверно фиксируемым значением E_0 . Например, в рассмотрение не вошла пара элементов Al и Si при их совместном нахождении в образце и выполнении условия (4) в случае сколе-

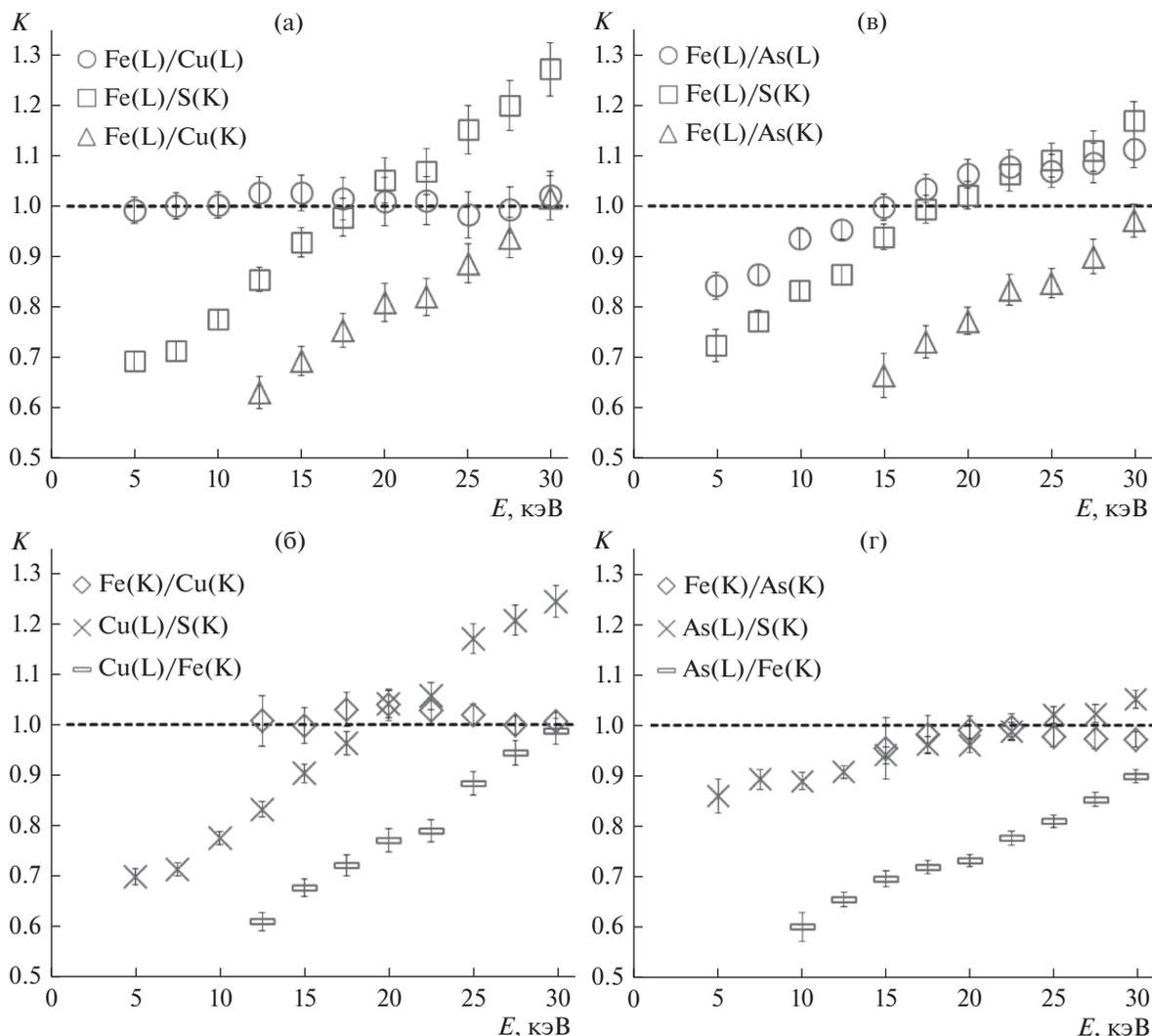


Рис. 6. Зависимость характеристики K от энергии электронного зонда для пар диагностических линий, полученная для порошков CuFeS_2 (а), (б) и FeAsS (в), (г).

цита ($\text{CaAl}_2\text{Si}_3\text{O}_{10} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) и спессартина ($\text{Ca}_{0.17}\text{Mg}_{0.70}\text{Mn}_{2.31}\text{Al}_2(\text{SiO}_4)_3$). Также для спессартина к таким комбинациям линий относится $\text{Mg}(\text{K})/\text{Al}(\text{K})$. В подобных ситуациях параметр относительных интенсивностей K близок к единице, а отношение W_{t_i}/W_{t_j} в порошковом образце совпадает с эталонным в широком интервале энергий электронного пучка. Дополнительной иллюстрацией данного ограничения являются пары характеристических линий $\text{Fe}(\text{L})/\text{Cu}(\text{L})$ и $\text{Fe}(\text{K})/\text{Cu}(\text{K})$ на рис. 6. В целом для выраженной зависимости от ускоряющего напряжения отношения W_{t_i}/W_{t_j} , вычисляемого по линиям с близкой энергией, коэффициенты ослабления для данных линий должны различаться между собой не менее чем на 30%.

В-третьих, в качестве максимальной величины E_0 принято значение не более 31 кВ, получаемое в

ряде случаев ближней аппроксимацией зависимости W_{t_i}/W_{t_j} от ускоряющего напряжения до достижения величиной W_{t_i}/W_{t_j} эталонного значения.

Эмпирический метод корректировки результатов анализа. Анализ однородных порошковых материалов предлагается осуществлять по следующей схеме.

1) Энергодисперсионные спектры образца собираются при двух или нескольких значениях ускоряющего напряжения. Сканирование следует осуществлять растром по максимально доступной площади материала. В соответствии с общими принципами энергодисперсионного анализа минимальная энергия электронного пучка должна вдвое превышать энергию индуцируемых характеристических фотонов. В то же время по возможности следует избегать двадцатикратного и

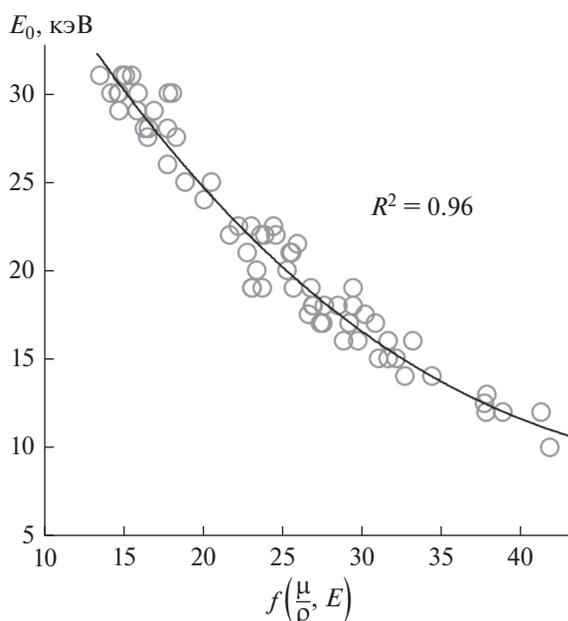


Рис. 7. Эмпирическая зависимость ускоряющего напряжения, при котором определяются корректные отношения массовых долей элементов, от функции параметров характеристических фотонов.

более превышения энергии, если в дальнейшем предполагается расчет содержания элементов без использования эталонных спектров. Спектры обрабатываются количественно, определяются концентрации элементов, производится усреднение. В зависимости от энергии электронов зонда вычисляемая доля элемента в порошке может быть завышена или занижена. Поэтому Wt_{cp} в ряде случаев может оказаться очень близкой к величине Wt_0 , полученной при анализе полированного образца. По той же причине установленные на этом этапе значения Wt_{cp} массовых долей характеризуются относительно широким доверительным интервалом случайной погрешности. В табл. 1 сравниваются результаты Wt_{cp} и Wt_0 , полученные для трех случайно выбранных ускоряющих напряжений на порошковом и полированном образцах соответственно для нескольких материалов. Отличия вычисляемых усредненных концентраций элементов Wt_{cp} и в дальнейшем их скорректированных величин $Wt_{корр}$ от эталонных значений Wt_0 охарактеризованы через среднее относительное отклонение

$$\varepsilon_{(cp, корр)} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{|Wt_{(cp, корр)i} - Wt_{0i}|}{Wt_{0i}} \times 100\%. \quad (5)$$

Значения Wt_{cp} являются первыми приближениями для вычисления коэффициентов ослабления характеристических линий в образце.

2) По значениям Wt_{cp} для пар диагностических линий с энергиями E_{ij} на основании справочных

данных определяются массовые коэффициенты ослабления $(\mu/\rho)_{ij}$ и в соответствии с выражением (3) вычисляется функция $f(\mu/\rho, E)$. Отвечающее функции $f(\mu/\rho, E)$ значение E_0 (рис. 7) принимается в качестве ускоряющего напряжения, при котором для данной пары диагностических линий будет получено скорректированное отношение Wt_i/Wt_j соответствующих элементов. Для бинарных соединений достаточно провести анализ и расчет состава при найденном таким образом значении E_0 . Так, единичный анализ порошка CaF_2 при ускоряющем напряжении 22.5 кВ привел к значениям $Wt_{корр}$, не отличающимся в пределах погрешности эксперимента от Wt_0 для полированного образца (табл. 1).

3) Вычисление $f(\mu/\rho, E)$ невозможно, если для данных диагностических линий не выполнено условие (4). Если нет возможности уточнения результатов анализа по другой комбинации энергодисперсионных пиков, то анализ можно ограничить определением Wt_{cp} .

4) В ряде случаев $f(\mu/\rho, E)$ может принимать значения, выходящие из интервала, для которого установлена экспериментальная зависимость $f(\mu/\rho, E)$ и E_0 . Примером из табл. 1 являются пары линий элементов Zn(L)/Si(K), Si(K)/Zn(K) в Zn_2SiO_4 и линий элементов S(K)/Cu(K), S(K)/Zn(K) в образце $Cu_{(3-x)}Zn_xSbS_{(3-y)}As_y$. Значения функции $f(\mu/\rho, E)$ для них составили менее 12. В такой ситуации дальнейший расчет состава следует проводить по другим комбинациям диагностических линий или использовать минимальные или максимальные доступные значения ускоряющего напряжения.

5) Для состава материала, включающего n элементов, достаточной для анализа является $n - 1$ независимая комбинация диагностических линий. Для выбранных комбинаций линий и при соответствующих значениях E_0 проводят повторный набор энергодисперсионных спектров, из которых определяют уточненные отношения массовых долей $Wt_i/Wt_j = Z_{i,j}$. Окончательно элементный состав материала рассчитывается решением системы уравнений, аналогичной (2):

$$\begin{cases} Wt_1/Wt_2 = Z_{1,2} \\ \dots \\ Wt_{n-1}/Wt_n = Z_{n-1,n} \\ \sum_{i=1}^n Wt_i = 1 \end{cases} \quad (6)$$

Вычисленные величины Wt_i будут являться скорректированными значениями массовых долей элементов. Примеры единичных расчетов уточненных значений массовых долей приведены в табл. 1. Лучший результат достигается при использовании комбинаций характеристических линий с меньшим диапазоном энергий.

Таблица 1. Результат корректировки количественного анализа для нескольких порошкообразных материалов и наборов диагностических линий

Элемент (серия)/энергия, кэВ	$W_{i0}, \%$	$W_{i_{cp}}, \%$	$\varepsilon_{cp}, \%$	$W_{i_{корр}}, \%$	$\varepsilon_{корр}, \%$
CaF_2					
F(K)/0.67	48.62 ± 0.23	46.61 ± 6.4	4.0	48.44*	0.36
Ca(K)/3.69	51.38 ± 0.26	53.39 ± 6.4		51.56*	
Zn_2SiO_4					
O(K)/0.52	28.75 ± 0.19	29.82 ± 1.3	2.2	28.77*	0.53
Si(K)/1.74	12.54 ± 0.09	12.35 ± 0.50		12.38	
Zn(L)/1.01	58.71 ± 0.31	57.83 ± 0.81		58.84*	
Zn_2SiO_4					
O(K)/0.52	28.64 ± 0.20	26.61 ± 2.1	8.7	28.36	1.3
Si(K)/1.74	12.42 ± 0.09	10.81 ± 0.41		12.17	
Zn(K)/8.64	58.94 ± 0.35	62.59 ± 2.5		59.45	
$Cu_{(3-x)}Zn_xSbS_{(3-y)}As_y^{**}$					
Cu(L)/0.93	37.68 ± 0.22	36.86 ± 0.65	1.1	37.56*	0.60
Zn(L)/1.01	6.72 ± 0.43	$6.56^* \pm 2.0$		6.64*	
As(L)/1.28	14.15 ± 0.20	$14.28^* \pm 1.4$		14.36	
S(K)/2.31	28.89 ± 0.18	$28.76^* \pm 0.48$		28.85*	
Sb(L)/3.61	12.66 ± 0.16	13.13 ± 1.4		12.59*	
$Cu_{(3-x)}Zn_xSbS_{(3-y)}As_y^{**}$					
Cu(K)/8.05	39.82 ± 0.18	42.28 ± 1.0	3.4	40.62	1.3
Zn(K)/8.64	7.52 ± 0.33	8.00 ± 0.7		7.77*	
As(L)/1.28	13.65 ± 0.21	13.07 ± 1.3		13.47*	
S(K)/2.31	27.35 ± 0.16	24.15 ± 1.2		26.28	
Sb(L)/3.61	11.66 ± 0.16	12.49 ± 0.6		11.86	

* Значения не выходят за пределы доверительного интервала $W_{i0} \pm \Delta(W_{i0})_{сл}$.

** Расчет состава проводили без использования стандартов.

Предлагаемый на основе исследования особенностей энергодисперсионных спектров однородных порошковых материалов способ уточнения результатов анализа их элементного состава не требует трудоемких вычислений. Он может быть интегрирован в качестве дополнительного алгоритма в программное обеспечение энергодисперсионных анализаторов для автоматического подбора оптимальных ускоряющих напряжений и расчета скорректированных концентраций элементов.

К недостаткам изложенного метода относится приверженность представленной на рис. 7 функциональной связи параметров характеристических фотонов и оптимальных для анализа энергий электронов зонда определенной аппаратной геометрии. В представленном виде эта зависимость справедлива для небольшого интервала углов между направлением сбора рентгеновских фотонов и направлением сканирующего зонда вблизи 50° при условии, что электронный пучок падает нормально к поверхности образца. Однако

подобные обсуждаемым экспериментальные данные могут быть получены и обобщены для любой другой геометрии аналитической аппаратной схемы.

Использовали аналитическое оборудование Центра коллективного пользования "Диагностика микро- и наноструктур" (Facilities Sharing Centre "Diagnostics of Micro- and Nano Structures").

Работа выполнена в рамках государственного задания Ярославскому Филиалу Физико-технологического института им. К.А. Валиева РАН (Valiev Institute of Physics and Technology of RAS, Yaroslavl Branch) от Минобрнауки РФ по теме № FFNN-2022-0018.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Newbury D.E., Ritchie N.W.M. Performing elemental microanalysis with high accuracy and high precision by scanning electron microscopy/silicon drift detector energy-dispersive X-ray spectrometry (SEM/SDD-EDS) // J. Mater. Sci. 2015. V. 50. № 2. P. 493. <https://doi.org/10.1007/s10853-014-8685-2>
2. Newbury D.E., Ritchie N.W.M. Is scanning electron spectroscopy/energy dispersive X-ray spectrometry

- (SEM/EDS) quantitative? // *Scanning*. 2013. V. 35. № 3. P. 141.
<https://doi.org/10.1002/sca.21041>
3. *Лаврентьев Ю.Г., Карманов Н.С., Усова Л.В.* Электронно-зондовое определение состава минералов: Микроанализатор или сканирующий электронный микроскоп? // *Геология и геофизика*. 2015. Т. 56. № 8. С. 1473. DOI: (*Lavrent'ev Y.G., Karmanov N.S., Usova L.V.* Electron probe microanalysis of minerals: Microanalyzer or scanning electron microscope? // *Russ. Geol. Geophys.* 2015. V. 56. № 8. P. 1154.
<https://doi.org/10.1016/j.rgg.2015.07.006>
<https://doi.org/10.15372/GiG20150806>
 4. *Goldstein J.I., Newbury D.E., Michael J.R., Ritchie N.W.M., Scott J.H.J., Joy D.C.* Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis, 4rd Ed. New York: Springer, 2018. 550 p.
<https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6676-9>
 5. *Newbury D.E., Ritchie N.W.M.* Quantitative SEM/EDS, step 1: What constitutes a sufficiently flat specimen? // *Microsc. Microanal.* 2013. V. 19. № 2. P. 1244.
<https://doi.org/10.1017/S1431927613008210>
 6. *Hovington P., Timoshevskii V., Burgess S., Demers H., Statham P., Gauvin R., Zaghbi K.* Can we detect Li K X-ray in lithium compounds using energy dispersive spectroscopy? // *Scanning*. 2016. V. 38. № 6. P. 571.
<https://doi.org/10.1002/sca.21302>
 7. *Béranger M.* Study on the use of silicon drift detector to get information on light emitted by luminescent materials // *AJPA*. 2019. V. 7. № 2. P. 34.
<https://doi.org/10.11648/j.ajpa.20190702.11>
 8. *Li X., Holland J., Burgess S., Bhadare S., Yamaguchi S., Birtwistle D., Statham P., Rowlands N.* Detection of lithium X-rays by EDS // *Microsc. Microanal.* 2013. V. 19. № 2. P. 1136.
<https://doi.org/10.1017/S1431927613007678>
 9. *Burgess S., Li X., Holland J.* High spatial resolution energy dispersive X-ray spectrometry in the SEM and the detection of light elements including lithium // *Microsc. Microanal.* 2013. V. 27. № 4. P. 8.
 10. *Armstrong J.T., Buseck P.R.* Quantitative chemical analysis of individual microparticles using the electron microprobe: Theoretical // *Anal. Chem.* 1975. V. 47. № 13. P. 2178.
<https://doi.org/10.1021/ac60363a033>
 11. *Newbury D.E.* Electron probe microanalysis of rough targets: Testing the peak-to-local background method // *Scanning*. 2004. V. 26. № 3. P. 103.
<https://doi.org/10.1002/sca.4950260302>
 12. *Small J.A.* The analysis of particles at low accelerating voltages (≤ 10 kV) with energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS) // *J. Res. Natl. Inst. Stan.* 2002. V. 107. № 6. P. 555.
<https://doi.org/10.6028/jres.107.047>
 13. *Trincavelli J., Van Grieken R.E.* Peak-to-background method for standardless electron microprobe analysis of particles // *X-Ray Spectrom.* 1994. V. 23. P. 254.
<https://doi.org/10.1002/xrs.1300230605>
 14. *Labar J.L., Torok S.B.* A Peak-to-background method for electron-probe X-ray microanalysis applied to individual small particles // *X-Ray Spectrom.* 1992. V. 21. P. 183.
<https://doi.org/10.1002/xrs.1300210407>
 15. *Hovington P., Lagace M., Rodrigue L.* X-ray analysis of rough surfaces at low energy // *Microsc. Microanal.* 2002. V. 8. № 2. P. 1472.
<https://doi.org/10.1017/S1431927602103990>
 16. *Armstrong J.T., Buseck P.R.* A general characteristic fluorescence correction for the quantitative electron microbeam analysis of thick specimens, thin films and particles // *X-Ray Spectrom.* 1985. V. 14. № 4. P. 172.
<https://doi.org/10.1002/xrs.1300140408>
 17. *Armstrong J.T.* Quantitative elemental analysis of individual microparticles with electron beam instruments / *Electron Probe Quantification* / Eds. Heinrich K.J.F., Newbury D.E. New York: Plenum Press., 1991. P. 261.
<https://doi.org/10.1007/978-1-4899-2617-315>
 18. *Gauvin R., Hovington P., Drouin D.* Quantification of spherical inclusions in the scanning electron microscope using Monte Carlo simulations // *Scanning*. 1995. V. 17. № 4. P. 202.
<https://doi.org/10.1002/sca.4950170401>
 19. *Storms H.M., Janssens K.H., Torok S.B., Van Grieken R.E.* Evaluation of the Armstrong-Buseck correction for automated electron probe X-ray microanalysis of particles // *X-Ray Spectrom.* 1989. V. 18. P. 45.
<https://doi.org/10.1002/xrs.1300180203>
 20. *Paoletti A., Bruni B.M., Gianfagna A., Mazziotti-Tagliani S., Pacella A.* Quantitative energy dispersive X-ray analysis of submicrometric particles using a scanning electron microscope // *Microsc. Microanal.* 2011. V. 12. № 5. P. 710.
<https://doi.org/10.1017/S1431927611000432>
 21. *Ritchie N.W.M.* Using DTSA-II to simulate and interpret energy dispersive spectra from particles // *Microsc. Microanal.* 2010. V. 16. № 3. P. 248.
<https://doi.org/10.1017/S1431927610000243>
 22. *Пухов Д.Э., Лантеева А.А.* Учет неровности поверхности при электронно-зондовом энергодисперсионном анализе материалов в виде порошков // *Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования*. 2020. № 9. С. 28. (*Pukhov D.E., Lapteva A.A.* Taking into account the surface roughness in the electron-probe energy-dispersive analysis of powder materials // *J. Surf. Investig.-X-Ray*. 2020. V. 14. № 5. P. 889.
<https://doi.org/10.1134/S1027451020050146>
<https://doi.org/10.31857/S1028096020090149>
 23. *Drouin D., Couture A.R., Joly D., Tastet X., Aimez V., Gauvin R.* CASINO V2.42 – A fast and easy-to-use modeling tool for scanning electron microscopy and microanalysis users // *Scanning*. 2007. V. 29. № 3. P. 92.
<https://doi.org/10.1002/sca.20000>
 24. *Drouin D., Hovington P., Gauvin R.* CASINO: A new Monte Carlo code in C language for electron beam interaction – Part II: Tabulated values of Mott cross section // *Scanning*. 1997. V. 19. № 1. P. 20.
<https://doi.org/10.1002/sca.4950190103>
 25. *Hovington P., Drouin D., Gauvin R.* CASINO: A new Monte Carlo code in C language for electron beam interaction – Part I: Description of the program // *Scanning*. 1997. V. 19. № 1. P. 1.
<https://doi.org/10.1002/sca.4950190101>
 26. *Hovington P., Drouin D., Gauvin R., Joy D.C., Evans N.* CASINO: A new Monte Carlo code in C language for electron beam interaction – Part III: Stopping power at low energies // *Scanning*. 1997. V. 19. № 1. P. 29.
<https://doi.org/10.1002/sca.4950190104>

УДК 543.544

СОРБЕНТЫ С КОВАЛЕНТНО ПРИВЫТЫМ ПОЛИМЕРНЫМ СЛОЕМ ДЛЯ ГИДРОФИЛЬНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

© 2022 г. А. С. Попов^а, Г. С. Максимов^а, О. А. Шпигун^а, А. В. Чернобровкина^{а, *}^аМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет
Ленинские горы, 1, стр. 3, Москва, 119991 Россия

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

Поступила в редакцию 03.12.2021 г.

После доработки 27.03.2022 г.

Принята к публикации 27.03.2022 г.

Получены неподвижные фазы на основе силикагеля, модифицированного поливинилпиридином и различным по структуре полиэтиленимином, с использованием 1,4-бутандиолдиглицидилового эфира в качестве спейсера. Изучение и сравнение хроматографических свойств сорбентов, модифицированных полиаминами и полиэтиленгликолем, проведено с использованием теста Танака для гидрофильных неподвижных фаз и на примере разделения модельных смесей сахаров, аминокислот и водорастворимых витаминов. Показано, что природа и структура полимера в функциональном слое влияет и на селективность, и на эффективность по полярным соединениям в режиме гидрофильной хроматографии.

Ключевые слова: гидрофильная хроматография, синтез сорбентов, гидрофильные полимеры, определение полярных аналитов.

DOI: 10.31857/S0044450222090109

Гидрофильная хроматография (ГИХ) как самостоятельный метод разделения полярных соединений был предложен в 1990 г. [1]. Использование полярных неподвижных фаз в сочетании с водно-органическими смесями в качестве элюентов позволяет определять полярные нейтральные и заряженные соединения, а также обеспечивает иную селективность по сравнению с традиционно используемой обращенно-фазовой ВЭЖХ [2], возможности которой при разделении полярных аналитов ограничены. Правильный выбор сорбента является ключевым моментом в хроматографии в целом и в ГИХ в частности [3], поэтому синтез новых неподвижных фаз с улучшенной эффективностью и иной селективностью был и остается основным инструментом дальнейшего развития метода.

Формирование функционального слоя на поверхности сорбентов путем ковалентного закрепления полярных полимеров — перспективный подход к получению новых неподвижных фаз для ГИХ [4–6], поскольку обеспечивает гидрофилизацию, а также экранирование матрицы, что приводит к снижению ее влияния на удерживание аналитов и изменению селективности. Более того, использование гидрофильных полимеров может способствовать переходу в режиме ГИХ к матрицам, альтернативным силикагелю и пре-

восходящим его по гидролитической устойчивости.

Перспективным полимером создания сорбентов для ГИХ является полиэтиленимин (ПЭИ), который может иметь как линейную, так и разветвленную структуру. Разветвленный ПЭИ нашел множество применений в синтезе новых сорбентов. Так, капилляры с модифицированными ПЭИ внутренними стенками для капиллярного электрофореза использовали для разделения белков [7, 8], органических кислот и неорганических анионов [9–11]. Кроме того, ПЭИ неоднократно применяли для создания анионообменников [12–16]. Основное преимущество использования ПЭИ для создания анионообменного функционального слоя заключается в простоте синтеза и высокой воспроизводимости его результата, так как традиционно формирование гиперразветвленного слоя посредством чередования стадий алкилирования диглицидиловыми эфирами и аминирования включает до десяти стадий и более. Одним из первых упоминаний использования ПЭИ при создании сорбентов для ГИХ является работа [17], в которой описано применение в гидрофильном режиме капиллярных колонок, модифицированных наночастицами золота с адсорбированным слоем ПЭИ. Получение более стабильных сорбентов путем ковалентного закрепления ПЭИ описано в недав-

них работах [6, 18]. Авторы отмечают, что модифицирование полиамином обеспечивает не только высокую гидрофильность, но и анионообменные свойства, благодаря чему становится возможным одновременное определение полярных соединений и неорганических анионов, разделение пяти органических либо пяти аминокислот [6]. Однако специфический набор модельных аналитов не позволяет в полной мере оценить достоинства таких колонок по сравнению с силикагелем, аминофазой или другими гидрофильными неподвижными фазами.

Еще одним подходящим полимером представляется поливинилпиридин (ПВП). Сорбенты, полученные с его использованием, нашли широкое применение как в ионной [19, 20], так и в сверхкритической флюидной хроматографии [21–23]. Данные о применении модифицированных ПВП неподвижных фаз в гидрофильной хроматографии отсутствуют. Стоит отметить, что меньшая гидрофильность ПВП по сравнению с ПЭИ и полиэтиленгликолем (ПЭГ) может быть компенсирована вкладом гидрофобных и π - π взаимодействий при удерживании слабо полярных аналитов.

Одним из самых простых, а поэтому широко используемым способом описания свойств неподвижных фаз является изучение хроматографического поведения модельных аналитов. Такие данные позволяют классифицировать и сравнивать между собой синтезированные и уже существующие сорбенты. Однако информация об удерживании гомологов или соединений одного класса не может дать полного представления о вкладе различных вторичных взаимодействий в сложный механизм удерживания в ГИХ. Авторами работы [24] предложен тест Танака для гидрофильных неподвижных фаз, в котором набор используемых модельных аналитов позволяет количественно оценить следующие параметры: гидрофильность поверхности сорбента $k(U)$ – определяется как фактор удерживания уридина; селективность по отношению к гомологам $\alpha(CH_2)$; селективность по отношению к гидроксильной группе $\alpha(OH)$; способность к разделению пространственных изомеров $\alpha(V/A)$; анионо- и катионообменные свойства – $\alpha(AX)$ и $\alpha(CX)$ соответственно; кислотно-основную природу поверхности сорбента $\alpha(Tb/Tr)$. В работах [24, 25] представлены данные по различным типам селективности для множества коммерчески доступных гидрофильных колонок, которые можно использовать для сравнения и оценки свойств новых сорбентов. Так, для аминофаз характерны высокие значения параметра анионообменной селективности. Так, в работе [6] сорбент, полученный модифицированием 3-глицидилпропилсиликагеля разветвленным ПЭИ, продемонстрировал высокие значения параметров $k(U)$ и $\alpha(AX)$ по

результатам теста Игрума для гидрофильных неподвижных фаз [26]. Увеличение гидрофильности поверхности и вклада анионообменных взаимодействий способствовало разделению модельной смеси пяти аминокислот менее чем за 16 мин в режиме ГИХ и семи неорганических ионов за 40 мин в режиме ионной хроматографии. Достичь таких результатов в идентичных условиях на коммерческой аминофазе Unitary NH_2 авторам не удалось, что продемонстрировало преимущества модифицирования матрицы силикагеля полиэтиленмином.

Цель настоящей работы – получение новых сорбентов путем ковалентного модифицирования 3-аминопропилсиликагеля гидрофильными полимерами, такими как поливинилпиридин, линейный и разветвленный полиэтиленмин (ПЭИ_{лин} и ПЭИ_{разв} соответственно) с использованием 1,4-бутандиолдиглицидилового эфира (1,4-БДДГЭ) в качестве спейсера. Хроматографические свойства неподвижных фаз, модифицированных разными полимерами, изучали и сравнивали на примере разделения модельных смесей полярных веществ нескольких классов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Приборы и материалы. В работе использовали D-(+)-рибозу, D-(+)-глюкозу, D-(+)-фруктозу, D-(+)-лактозы моногидрат, D-(+)-мальтозы моногидрат, D-(+)-сахарозу, D-(+)-ксилозу, рибофлавин, пиридоксина гидрохлорид, цианокобаламин, аскорбиновую кислоту, тиамин, аденозин, урацил, теобромин, теофиллин, уридин, видарабин, моногидрат, 5-метилуридин, 2'-дезоксисуридин, N,N,N'-триметилфениламмоний хлорид, *n*-толуолсульфонат натрия (>98.0%, "ТСИ", Япония); D,L-фенилаланин, D,L-пролин, D,L-серин, L-изолейцин, L-лейцин, L-метионин, L-аспарагиновую кислоту, L-глутаминовую кислоту, L-гистидин, L-лизин, L-аргинин х. ч. (Serva, Германия); L-аспарагин, β -аланин, глицин х. ч. (Merck, Германия); L-глутамин, L-валин х. ч. (Reanal, Венгрия); никотинамид, никотиновую кислоту (>99%, Sigma-Aldrich, США); толуол х. ч. (Компонент-Реактив, Россия), ацетонитрил HPLCgradientgrade (Panreac, Германия); ледяную уксусную кислоту (99.5%), ортофосфорную кислоту (85%) х. ч., хлорид калия ч. д. а. (Panreac, Испания); этанол ч. д. а., ацетат аммония ч. (Лабтех, Россия); ацетон ч. д. а. (ХимМед, Россия); 1,4-диоксан ч.д.а. (Компонент-Реактив, Россия); разветвленный полиэтиленмин ($M_w = 800$, $M_n = 600$, Sigma-Aldrich, США), линейный полиэтиленмин ($M_n = 5000$, Sigma-Aldrich, США), поли-4-винилпиридин ($M_n = 6000$, Sigma-Aldrich, США), диглицидиловый эфир полиэтиленгликоля ($M_w = 500$, Sigma-Aldrich, США).

Таблица 1. Структура и обозначения изученных сорбентов*

Спейсер	Полимер	Обозначение
–	Полиэтиленгликоль	С-ПЭГ
1,4-БДДГЭ	Поливинилпиридин	С-Б-ПВП
1,4-БДДГЭ	Разветвленный полиэтиленимин	С-Б-ПЭИ _{разв}
1,4-БДДГЭ	Линейный полиэтиленимин	С-Б-ПЭИ _{лин}

* Матрица – 3-аминопропилсилакагель.

Для синтеза сорбентов использовали силикагель с привитыми аминопропильными радикалами Диасфер-110-Амин (БиоХиммак СТ, Россия) со сферическими частицами диаметром 5 мкм, 1.52% N.

Эксперименты проводили с использованием системы ВЭЖХ, состоящей из хроматографа Dionex 3000 с двухканальным градиентным насосом, автоматической системой ввода пробы, термостатом колонки и диодно-матричным детектором. Хроматограммы регистрировали с помощью персонального компьютера и программного пакета Chromeleon 7 (Thermo Fisher Scientific, США). Для определения сахаров использовали систему ВЭЖХ, состоящую из изократического ВЭЖХ-насоса, шестиходового крана-дозатора и рефрактометрического детектора (Agilent Technologies, США). Хроматограммы регистрировали с помощью персонального компьютера и программного пакета ChemStation (Agilent Technologies, США).

Для синтеза сорбентов применяли следующее оборудование: термостат ("Memmert", Германия), вакуумный насос серии "Laborport" ("KNF Neuberger", Германия), механическую мешалку Eurostar (КА- Werke, Германия). В работе использовали стальные колонки размером 100 × 3 мм, которые заполняли при помощи пневмонасоса Knauer K-1900 (Knauer, Германия).

Синтез сорбентов и заполнение хроматографических колонок. На первой стадии точную навеску аминопропилсилакагеля помещали в круглодонную колбу объемом 100 мл, добавляли 1,4-БДДГЭ (40 мМ на 1 г матрицы), растворенный в деионизованной воде из расчета 20 мл на 1 г матрицы. Суспензию непрерывно перемешивали в течение 60 мин механической мешалкой при 60°C. Продукт отфильтровывали на стеклянном фильтре и промывали большим объемом воды, затем сушили на воздухе. На второй стадии полученный продукт помещали в круглодонную колбу объемом 100 мл, добавляли поливинилпиридин/линейный полиэтиленимин/разветвленный полиэтиленимин, взятый в массовом соотношении матрица : полимер 1 : 0.1 и растворенный в деионизованной воде из расчета 20 мл на 1 г матрицы. Суспензию непрерывно перемешивали в течение

60 мин механической мешалкой при 60°C. Продукт отфильтровывали на стеклянном фильтре и промывали большим количеством воды, затем сушили на воздухе. Хроматографические колонки заполняли суспензионным способом при давлении 250 бар, используя в качестве подвижной фазы ацетонитрил. Предполагаемые структуры сорбентов и их обозначения представлены в табл. 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Синтезировали три неподвижные фазы на основе 3-аминопропилсилакагеля путем ковалентного присоединения поли-4-винилпиридина, а также линейного и разветвленного полиэтиленимина, в качестве спейсера использовали бифункциональный 1,4-бутандиолдиглицидиловый эфир. Условия проведения синтеза, обеспечивающие получение неподвижных фаз с наилучшими для ГИХ свойствами, а также хроматографические характеристики сорбента С-ПЭГ [4] использовали для сравнения. Природу и структуру полимера, формирующего поверхностный слой, варьировали для установления факторов, влияющих на селективность и эффективность сорбентов, а также получения неподвижной фазы с лучшими параметрами для ГИХ. Для изучения хроматографических характеристик новых сорбентов использовали тест Танака для гидрофильных неподвижных фаз [24, 25] на примере разделения различных классов полярных соединений: сахаров, аминокислот и водорастворимых витаминов.

Результаты теста Танака представлены в табл. 2. Как видно, ковалентное присоединение полимеров приводит к увеличению гидрофильности $k(U)$ поверхности неподвижных фаз, оцениваемой как фактор удерживания уридина, по сравнению с матрицей для всех сорбентов, кроме модифицированного поливинилпиридином С-Б-ПВП. Наибольшие значения гидрофильности демонстрируют сорбенты С-ПЭГ и С-Б-ПЭИ_{лин}, модифицированные линейными гидрофильными полимерами. При этом для С-Б-ПЭИ_{разв}, полученного в результате присоединения разветвленного ПЭИ, характерно несколько меньшее значение $k(U)$ по сравнению с сорбентом с ПЭИ_{лин}. Это может быть следствием формирования тонкого по-

Таблица 2. Результаты теста Танака для гидрофильных неподвижных фаз

Селективность	Сорбент				
	матрица	С-ПЭГ	С-Б-ПВП	С-Б-ПЭИ _{разв}	С-Б-ПЭИ _{лин}
$k(U)$	1.94	2.88	2.09	2.40	3.15
$\alpha(CH_2)$	1.27	1.32	1.18	1.50	1.25
$\alpha(OH)$	1.94	1.87	1.67	1.90	1.99
$\alpha(V/A)$	1.23	1.37	0.98	1.40	1.55
$\alpha(AX)$	2.98	20.23	17.20	28.00	15.90
$\alpha(CX)$	1.12	0	0	0	0.29
$\alpha(Tb/Tr)$	0.82	0.64	0.57	0.45	0.61

Примечание: подвижная фаза – 20 мМ аммонийно-ацетатный буферный раствор (рН 4.7)–ацетонитрил (10 : 90, по объему), скорость потока 0.5 мл/мин, УФ-детектирование, 254 нм.

верхностного слоя в случае линейного полимера, в то время как разветвленный ПЭИ способствует образованию большего по толщине и более конформационно подвижного функционального слоя, массоперенос в котором затруднен. Кроме того, на поверхности сорбента с ПЭИ_{разв} больше стерически доступных гидрофобных этиленовых фрагментов, что также может вносить вклад в уменьшение гидрофильности неподвижной фазы. Таким образом, следует учитывать, что толщина функционального слоя оказывает влияние на вклады различных взаимодействий в механизм удерживания для сорбентов, полученных с использованием одинаковых по природе, но различных по пространственной структуре полимеров.

Все четыре сорбента обладают сопоставимыми значениями параметров метиленовой $\alpha(CH_2)$ и гидроксильной $\alpha(OH)$ селективности, отличными от единицы и схожими с данными для матрицы. Это позволяет предположить хорошую селективность рассматриваемых сорбентов по отношению к полярным соединениям одного гомологического ряда, а также олиго- и полиолам, таким как углеводы или многоатомные спирты. Кроме того, для всех сорбентов характерны несколько более высокие значения пространственной селективности $\alpha(V/A)$, кроме С-Б-ПВП с $\alpha(V/A) \approx 1$. В результате модифицирования поливинилпиридином происходит увеличение удерживания аденозина А (по сравнению с матрицей значение k' увеличивается от 2.61 до 3.38), в то время как фактор удерживания видарабина V практически не меняется: $k'(V)$ составляет 3.21 и 3.32 для матрицы и С-Б-ПВП соответственно. Стоит отметить, что различие в структуре полимеров, формирующих функциональный слой сорбентов С-Б-ПЭИ_{разв} и С-Б-ПЭИ_{лин}, не влияет на рассмотренные параметры.

Для всех четырех сорбентов характерен значительный вклад анионообменных взаимодействий в механизм удерживания – параметр $\alpha(AX)$ в

5–10 раз больше, чем для матрицы. Это ожидаемое следствие увеличения степени замещения атомов азота матрицы, в том числе формирования аммониевых групп в функциональном слое сорбентов в результате ковалентного модифицирования аминопропилсиликагеля. Однако высокое значение параметра $\alpha(AX)$ в случае сорбента С-Б-ПВП может являться следствием не только большого вклада электростатических взаимодействий, но и удерживания за счет дополнительных π – π взаимодействий между модифицированной поливинилпиридином поверхностью и *n*-толуолсульфонатом – маркером параметра $\alpha(AX)$. Одновременно с этим присоединение полимеров к матрице приводит к устранению вклада катионообменных взаимодействий $\alpha(CX)$, что свидетельствует об экранировании диссоциировавших силанольных групп. Такой подход – модифицирование путем присоединения гидрофильного полимера – может быть использован при необходимости контроля вклада катионообменных взаимодействий или заряда матрицы при создании сорбентов для решения конкретных прикладных задач. Кроме того, малые значения параметра кислотно-основных свойств поверхности сорбентов $\alpha(Tb/Tr) < 1$ и их уменьшение по сравнению с матрицей дополнительно свидетельствуют об основной природе поверхности неподвижных фаз и увеличении степени замещенности атомов азота 3-аминопропилсиликагеля.

Полученные величины параметров гидрофильности $k(U)$ и анионообменных свойств $\alpha(AX)$ для С-Б-ПЭИ_{разв} согласуются со значениями этих параметров для сорбента на основе силикагеля, модифицированного разветвленным ПЭИ, полученными в работе [6].

Углеводы. Сахара – моно- и олигосахариды – полярные вещества, являющиеся удобными аналитами для изучения свойств новых неподвижных фаз в режиме гидрофильной хроматографии. В ГИХ удерживание полярных нейтральных со-

Таблица 3. Параметры гидрофобности модельных аналитов

Углеводы		Аминокислоты			
аналит	$\lg P^*$	аналит	$\lg P^*$	аналит	$\lg P^*$
Рибоза	-2.66	Фенилаланин	-1.51	Пролин	-2.38
Фруктоза	-1.78	Изолейцин	-1.82	Аспарагин	-5.22
Глюкоза	-3.12	Метионин	-2.64	Гистидин	-3.45
Сахароза	-4.50	Лейцин	-1.82	Глицин	-3.64
Мальтоза	-5.26	Валин	-2.31	Аланин	-3.22
Лактоза	-5.26	Тирозин	-1.99	Серин	-3.69

* Рассчитано при помощи EpiWeb 4.1.

единений, таких как углеводы, реализуется преимущественно по распределительному механизму. Отмечается также вклад образования водородных связей [27], адсорбционных взаимодействий [28, 29], замедленной мутаротации [30, 31] в удерживание сахаров.

Шкалы селективности относительно рибозы и эффективности по углеводам представлены на рис. 1. Показано, что для всех четырех сорбентов характерен порядок удерживания сахаров, ожидаемо коррелирующий с увеличением гидрофильности аналитов (табл. 3). Более того, времена удерживания дисахаридов увеличиваются с ростом гидрофильности поверхности сорбентов: С-Б-ПВП < С-Б-ПЭИ_{разв} < С-Б-ПЭИ_{лин} ≈ С-ПЭГ. Стоит отметить, что в случае С-ПЭГ наблюдали лучшее разрешение и иной порядок элюирования пары мальтоза/лактоза, чем для других сорбентов, модифицированных азотосодержащими полимерами. Однако при этом С-ПЭГ обеспечивал худшее разрешение пары рибоза/фруктоза. Из представленных данных видно, что сорбенты С-Б-ПВП и С-Б-ПЭИ_{разв} демонстрируют меньшие времена удерживания сахаров и несколько худшую селективность в отношении пар рибоза/фруктоза, фруктоза/глюкоза, мальтоза/лактоза по сравнению с С-Б-ПЭИ_{лин} и С-ПЭГ, что согласуется с уменьшением их гидрофильности по результатам теста Танака (табл. 1). Кроме того, модифицирование линейными гидрофильными полимерами, такими как ПЭГ и ПЭИ_{лин}, способствует получению сорбентов с более высокой эффективностью по сахарам – до 16000 и 12000 тт/м соответственно, в то время как присоединение разветвленного полиэтиленimina обеспечивает эффективность до 5000 тт/м. Это может быть следствием уменьшения сопротивления массопереносу при уменьшении толщины функционального слоя в случае использования линейных полимеров. Хроматограммы модельной смеси углеводов представлены на рис. 2. В случае сорбента С-Б-ПВП ввиду низкой селективности и эффективности добиться разделения смеси сахаров не удалось.

Аминокислоты. Аминокислоты, представляющие собой класс полярных цвиттер-ионных соединений, также являются удобной группой модельных аналитов для изучения свойств новых сорбентов в режиме гидрофильной хроматографии. Популярность метода ГИХ при определении аминокислот обусловлена отсутствием стадии дериватизации во время пробоподготовки. В качестве подвижной фазы использовали 5 мМ фосфатный буферный раствор с рН 6.5 [4].

Из представленных шкал селективности (рис. 3) видно, что С-ПЭГ обеспечивает лучшую селективность по отношению к аминокислотам среди серии сорбентов. С-Б-ПЭИ_{разв} также продемонстрировал селективность по отношению к наиболее полярным аминокислотам – аспарагину, гистидину, глицину, аланину и серину, однако эффективность не превысила 12000 тт/м. Сочетание высокой эффективности (до 35000 тт/м) и достаточной селективности обеспечило разрешение семи аминокислот на сорбенте С-Б-ПЭИ_{лин} (рис. 4).

Все четыре сорбента характеризуются схожим порядком удерживания, в целом коррелирующим с уменьшением параметра гидрофобности Ханша аналитов (табл. 3). Факторы удерживания наиболее гидрофильных аминокислот – аспарагина, гистидина, глицина, аланина и серина – на сорбентах, модифицированных полиаминами, коррелируют с параметром гидрофильности по тесту Танака (k_U) и увеличиваются в ряду: С-Б-ПВП < С-Б-ПЭИ_{разв} < С-Б-ПЭИ_{лин} < С-ПЭГ, как и в случае сахаров. Таким образом, наилучшее удерживание аминокислот обеспечивает использование ПЭГ в функциональном слое неподвижной фазы. Кроме того, для сорбентов, модифицированных ПЭИ, наблюдали обратный по сравнению с двумя другими неподвижными фазами порядок удерживания пролина и тирозина, при котором менее гидрофильный тирозин имеет большие факторы удерживания, чем пролин. Такая селективность может быть вызвана вкладом водородных связей ОН-группы тирозина с аминокислотными группами фаз, модифицированных полиэтилен-

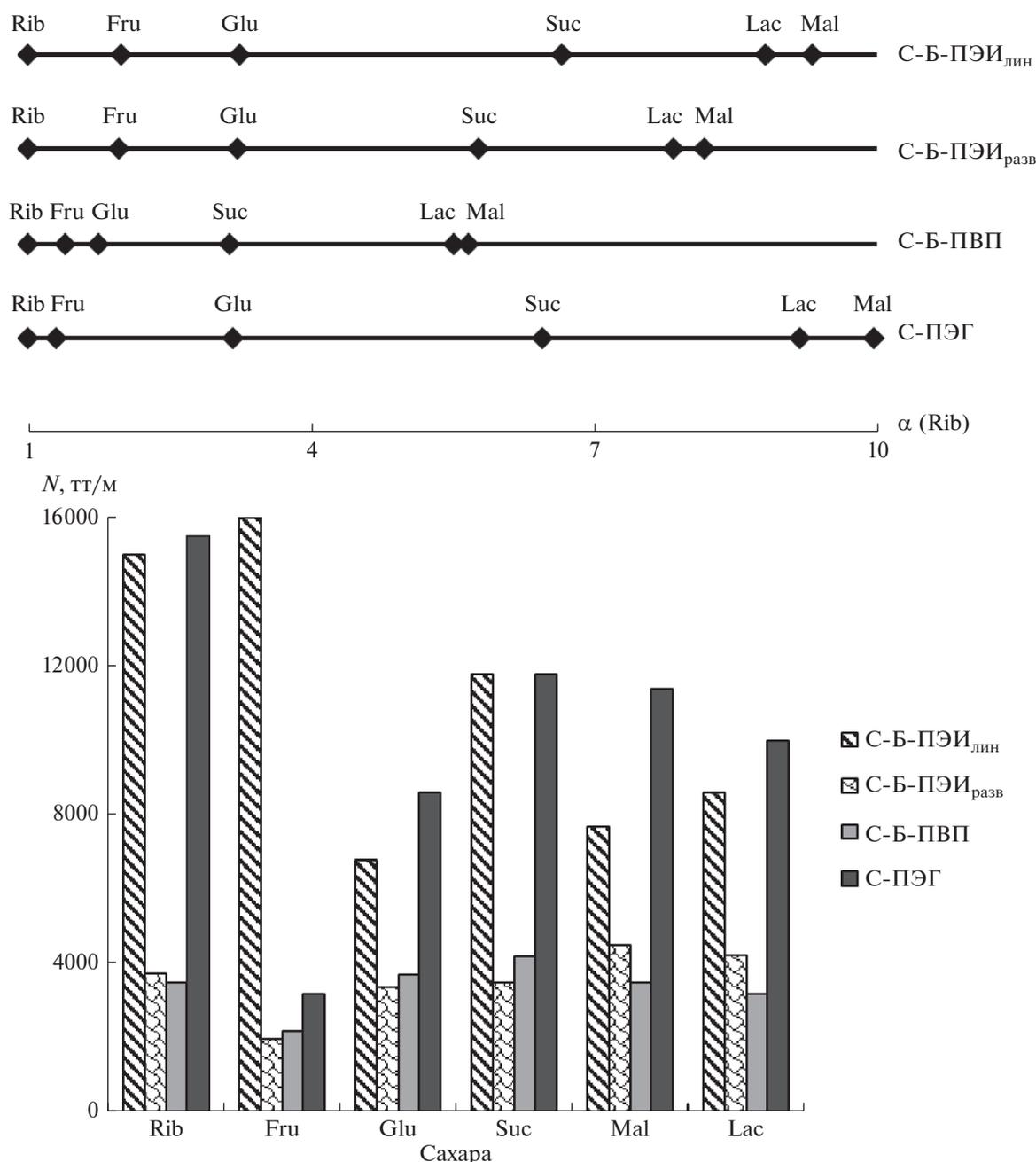


Рис. 1. Шкалы селективности относительно рибозы и диаграммы эффективности по сахарам (Rib – рибоза, Fru – фруктоза, Glu – глюкоза, Suc – сахароза, Mal – мальтоза, Lac – лактоза). Подвижная фаза – деионизованная вода–ацетонитрил (15 : 85, по объему), скорость потока 1 мл/мин, рефрактометрическое детектирование.

мином. Более того, модифицирование разветвленным полиэтиленмином привело к обратному порядку элюирования пары изолейцин/лейцин по сравнению с матрицей и сорбентами, модифицированными линейными полимерами (рис. 3), включая ПЭИ_{лин}. Это, как видно, не связано со структурой полимера и может быть следствием лучшего экранирования матрицы полиамином разветвленной структуры.

Сорбент С-Б-ПВП продемонстрировал слабое удерживание аминокислот и низкую эффективность до 8000 тт/м, в результате чего достигнуть разделения модельной смеси не удалось. Модифицирование разветвленным ПЭИ привело к получению сорбента с несколько лучшей селективностью в отношении аминокислот и эффективностью до 12000 тт/м, что обеспечило разделение семи аминокислот за 18 мин с использованием смеси 1 мМ фосфатного буферного раствора и

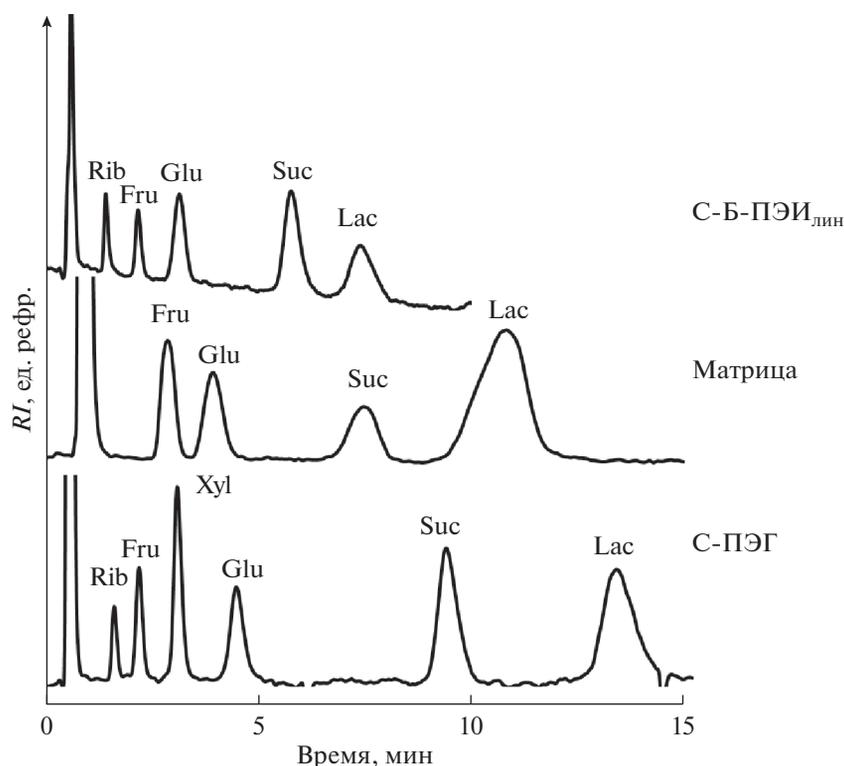


Рис. 2. Хроматограммы модельной смеси углеводов (500–1000 мг/л; Xyl – ксилоза). Объем пробы – 20 мкл. Подвижная фаза – деионизованная вода–ацетонитрил (15 : 85, по объему), скорость потока 1 мл/мин, рефрактометрическое детектирование.

ацетонитрила в соотношении 15 : 85 (по объему). Лучшая эффективность – до 40000 тт/м – достигнута для колонки с сорбентом С-ПЭГ, однако время разделения модельной смеси восьми аминокислот в изократическом режиме составило 40 мин, чтобы обеспечить разделение аланина и серина. Использование сорбента С-Б-ПЭИ_{лин} позволило разделить аналогичную смесь из восьми аминокислот в тех же условиях в два раза быстрее (менее чем за 20 мин) с эффективностью до 35000 тт/м. Стоит отметить, что С-ПЭГ обладает лучшей селективностью в отношении пары фенилаланин/метионин и трудноразделимой пары изолейцин/лейцин, однако характеризуется низким разрешением пары тирозин/пролин, в результате чего их одновременное определение невозможно. В то же время использование сорбента С-Б-ПЭИ_{лин}, демонстрирующего иной порядок удерживания аминокислот валин-пролин-тирозин, позволило достичь разделения пары тирозин/пролин, однако неразрешимой оказалась пара валин/пролин, разделяемая до базовой линии на С-ПЭГ. Таким образом, при анализе реальных объектов выбор С-ПЭГ или С-Б-ПЭИ_{лин} будет обусловлен набором разделяемых аминокислот. Хроматограммы модельной смеси аминокислот для полученных сорбентов и исходной матрицы представлены на рис. 4. Модифициро-

вание аминопропилсиликагеля ПЭИ_{лин} позволило повысить селективность для пары аланин/серин, а также эффективность по отношению к аминокислотам.

Водорастворимые витамины. Водорастворимые витамины характеризуются большим разнообразием структур, физико-химических свойств и гидрофильностью, поэтому широко применяются для демонстрации возможностей неподвижных фаз для ГИХ. Использование витаминов в качестве модельных анализов для тестирования сорбентов может дать полезную информацию для оценки вкладов различных типов взаимодействий, а также позволит оценить разделяющие способности изучаемых сорбентов по сравнению с коммерчески доступными, возможности которых также продемонстрированы в литературе на примере витаминов. Для сравнения рассматриваемых неподвижных фаз хроматографические параметры удерживания витаминов определяли с использованием в качестве подвижной фазы смеси 100 мМ ацетатно-аммонийного буферного раствора с рН 5.8 и ацетонитрила (10 : 90, по объему). Выбор природы буферного раствора обусловлен хорошей растворимостью ацетата аммония в растворах с высоким содержанием ацетонитрила. УФ-детектирование осуществляли при длине волны 270 нм.

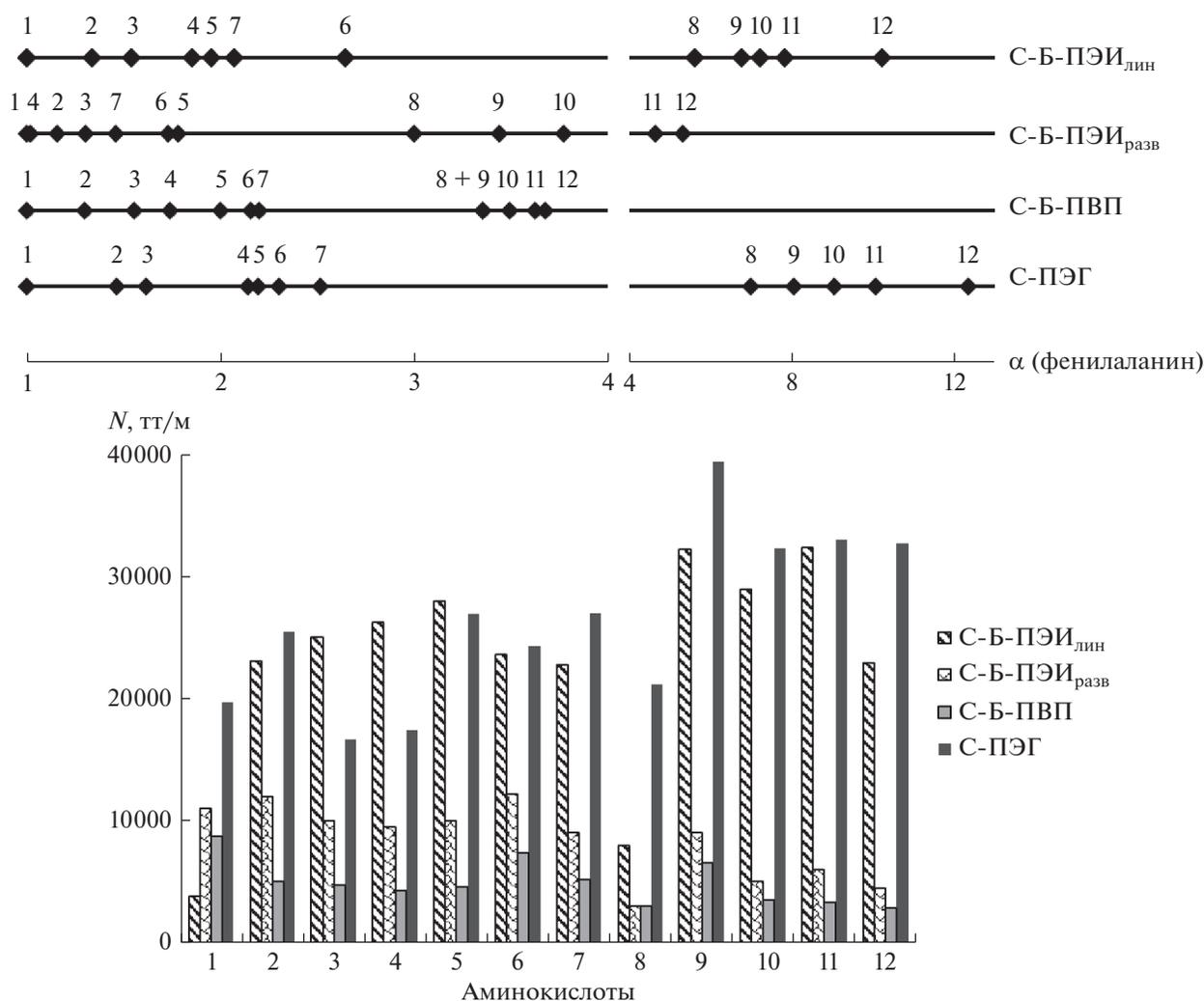


Рис. 3. Шкалы селективности относительно фенилаланина и диаграммы эффективности по аминокислотам (1 – фенилаланин, 2 – изолейцин, 3 – метионин, 4 – лейцин, 5 – валин, 6 – тирозин, 7 – пролин, 8 – аспарагин, 9 – гистидин, 10 – глицин, 11 – аланин, 12 – серин). Подвижная фаза – 5 мМ фосфатный буферный раствор (рН 6.5)–ацетонитрил (15 : 85, по объему), скорость потока 1 мл/мин, УФ-детектирование, 210 нм.

Как видно из представленных на рис. 5 данных, для всех четырех сорбентов порядок элюирования витаминов в режиме ГИХ согласуется со свойствами сформированных функциональных слоев, которые подтверждены параметрами теста Танака. Так, наиболее гидрофильный тиамин ($\lg P = -4.8$) имеет малые факторы удерживания на всех сорбентах и в зависимости от природы привитого полимера его удерживание изменяется в ряду C-Б-ПЭИ < C-Б-ПВП < C-ПЭГ, что, по-видимому, вызвано уменьшением числа пространственно доступных аммониевых групп в структуре функционального слоя сорбентов. Увеличение степени замещения аминогрупп матрицы в результате модифицирования, а также присоединения ПЭИ, в том числе образование четвертичных аммониевых групп, приводит к

увеличению положительного заряда поверхности. В выбранных условиях анализа удерживание тиамин, также несущего положительный заряд, регулируется в большей степени силами электростатического отталкивания [32], тем самым обеспечивая альтернативный порядок по сравнению с немодифицированным силикагелем [33]. Следует отметить, что удерживание цианокобаламина V_{12} согласуется с гидрофильностью сорбента и увеличивается в ряду: C-Б-ПВП < C-Б-ПЭИ_{разв} < C-Б-ПЭИ_{лин} < C-ПЭГ, что может свидетельствовать о большом вкладе распределительного механизма в его удерживание. Кроме того, высокая анионообменная селективность всех четырех сорбентов, установленная по результатам теста Танака (табл. 2), обуславливает сильное удержание аскорбиновой и никотиновой кислот, по-

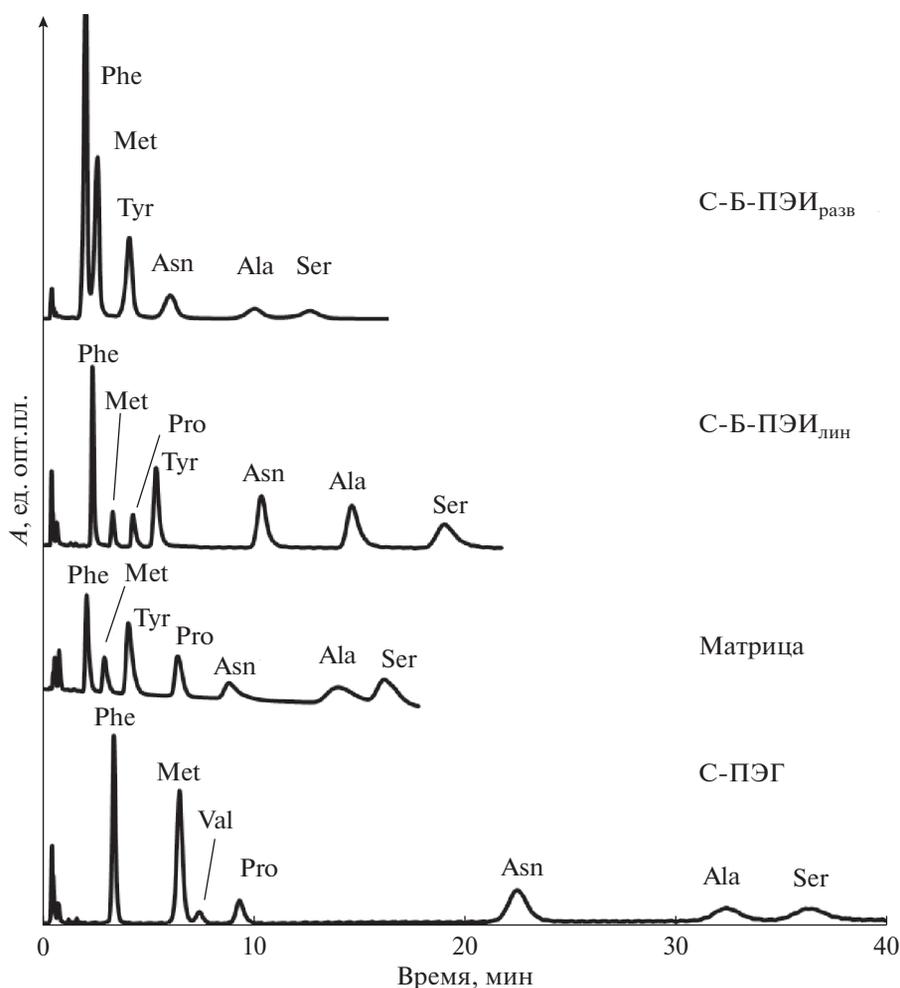


Рис. 4. Хроматограммы модельных смесей аминокислот (фенилаланин – 10 мг/л, тирозин – 100 мг/л, остальные – 200 мг/л). Объем пробы – 20 мкл. Подвижная фаза – 5 мМ фосфатный буферный раствор (рН 6.5)–ацетонитрил (15 : 85, по объему), скорость потока 1 мл/мин, УФ-детектирование, 254 нм.

этому разделению модельной смеси семи витаминов во всех случаях достигали с использованием градиентного режима.

Для экспрессного разделения слабоудерживаемых витаминов (никотинамид, B_1 , B_2 и B_6) варьировали долю водной фазы в составе элюента в диапазоне 8–12 об. %. Таким образом было достигнуто приемлемое разрешение $R_s > 1.4$ пары тиамин/рибофлавин на С-ПЭГ, а также пары пиридоксин/тиамин на С-Б-ПЭИ_{разв}. Во всех случаях при увеличении доли воды в подвижной фазе наблюдали ожидаемое для ГИХ уменьшение времен удерживания витаминов. Оптимальное содержание водной фазы составило: 4 об. % – для С-Б-ПЭИ_{разв}, 8 об. % – для С-ПЭГ и 12 об. % – для С-Б-ПЭИ_{лин}. Достичь полного разделения модельной смеси на С-Б-ПВП не удалось из-за низкой эффективности 3000–11 000 тт/м. На сор-

бенте, модифицированном разветвленным ПЭИ, время разделения витаминов в градиентном режиме составило 25 мин с эффективностью до 21 000 тт/м. Высокая эффективность сорбентов С-ПЭГ и С-Б-ПЭИ_{лин} (до 35 000 тт/м) позволила улучшить разрешение и уменьшить продолжительность анализа анализа до 16 мин. Хроматограммы витаминов представлены на рис. 6. Следует добавить, что при уменьшении доли буферного раствора на первом шаге градиентного элюирования на сорбенте С-ПЭГ стало возможным разделение тиамин и рибофлавина до базовой линии, а также изменение их порядка удерживания по сравнению с данными рис. 5 вследствие большего вклада электростатического отталкивания тиамин при уменьшении концентрации противоиона, экранирующего положительно заряженные группы в функциональном слое сорбента.

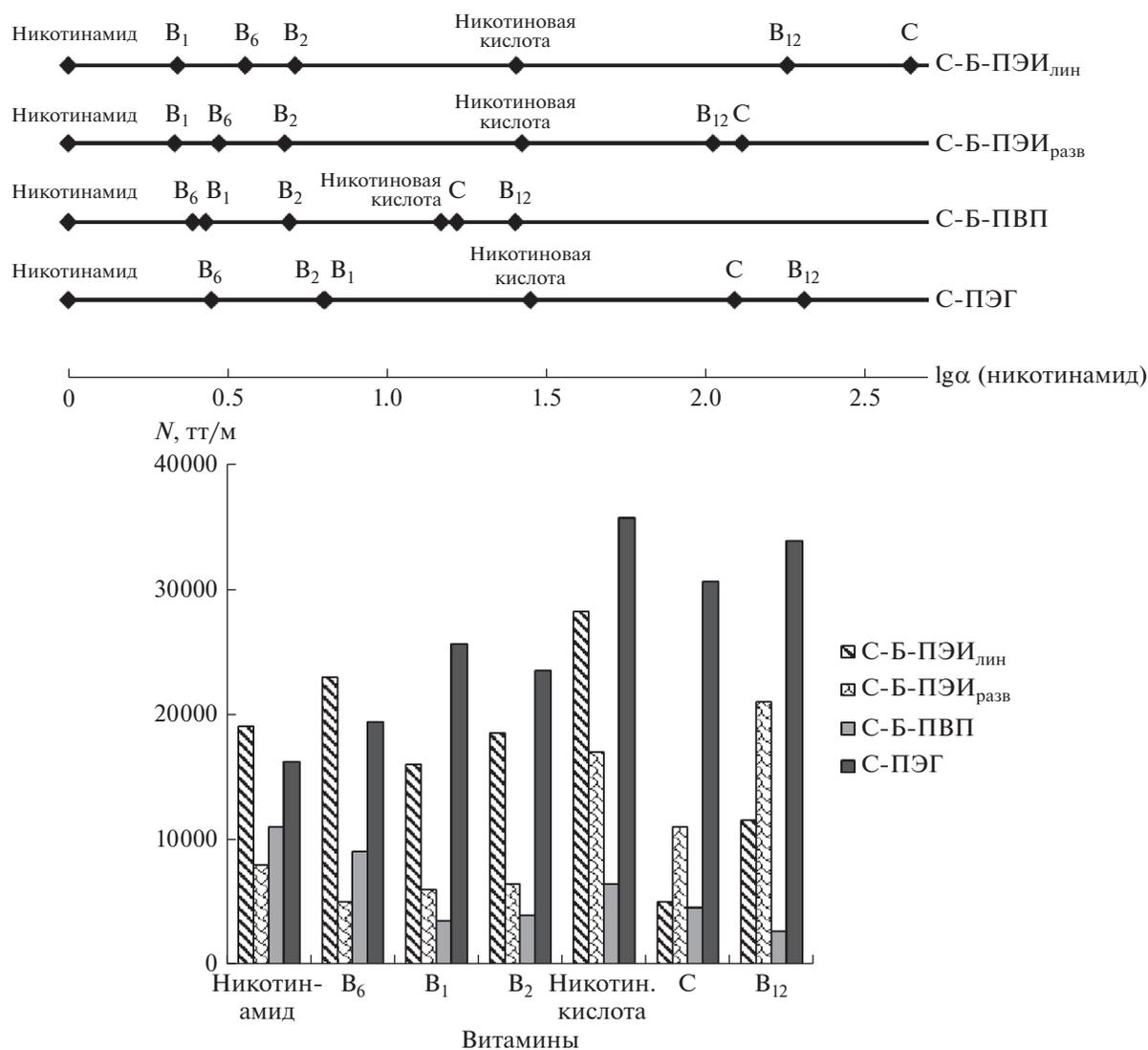


Рис. 5. Шкалы селективности относительно никотинамида и диаграммы эффективности по витаминам. Подвижная фаза – 100 мМ ацетатно-аммонийный буферный раствор (рН 5.8)–ацетонитрил (10 : 90, по объему), скорость потока 1 мл/мин, УФ-детектирование, 270 нм.

Таким образом, сравнение хроматографических характеристик неподвижных фаз, полученных на основе 3-аминопропилсиликагеля путем ковалентного присоединения различных по природе, структуре и гидрофильности полимеров, показало, что увеличение времен удерживания полярных соединений различных классов коррелирует с ростом гидрофильности поверхности сорбентов. Использование наиболее гидрофобного поливинилпиридина привело к получению неподвижной фазы с невысокими эффективностью и селективностью в ГИХ. Модифицирование разветвленным полиэтиленимином в наибольшей степени способствует изменению селек-

тивности по сравнению с матрицей. При этом использование полимеров с линейной структурой (ПЭИ_{лин} и ПЭГ) приводит к значительному росту эффективности синтезируемых сорбентов по сахарам, аминокислотам и витаминам. Предлагаемый подход к получению неподвижных фаз обеспечивает высокую анионообменную селективность сорбентов, что является интересной альтернативой коммерчески доступным гидрофильным сорбентам на основе силикагеля благодаря иной селективности по отношению к заряженным анализам.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 20-13-00140) с использованием оборудования, приобретенного за счет

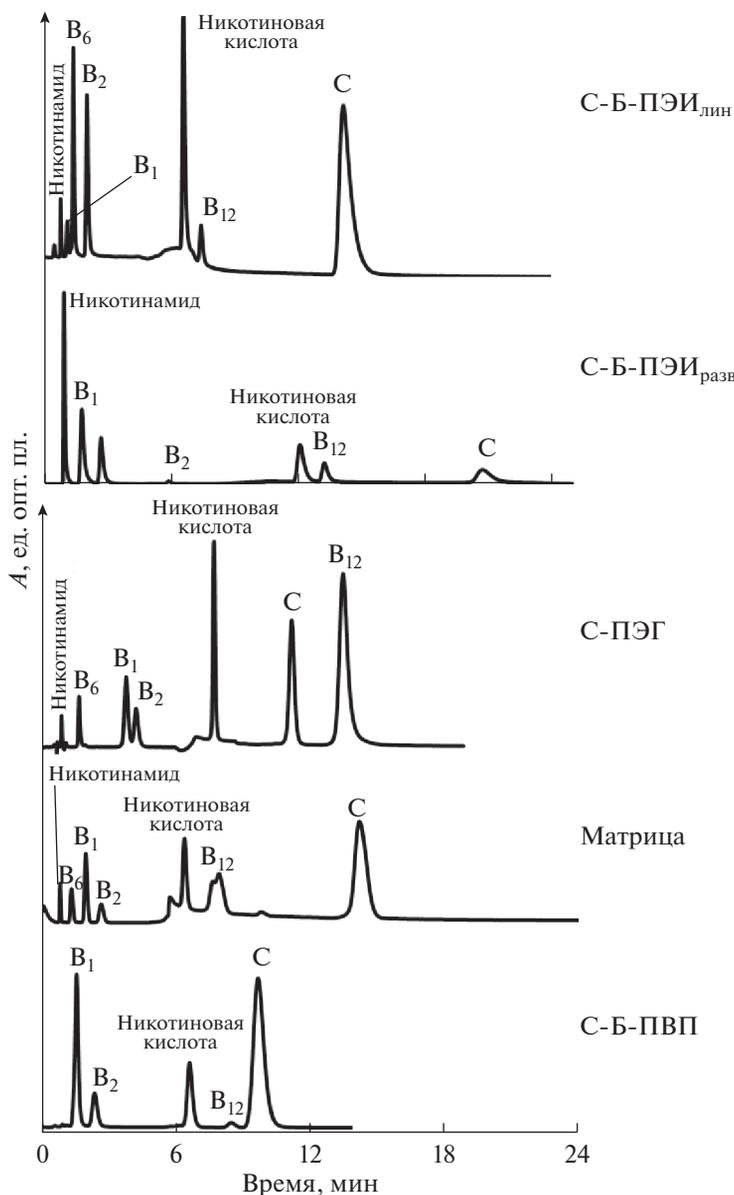


Рис. 6. Хроматограммы модельных смесей витаминов (рибофлавин – 4 мг/л, никотинамид – 10 мг/л, остальные – 50–200 мг/л). Подвижная фаза – 100 мМ ацетатно-аммонийный буферный раствор (рН 5.8)–ацетонитрил, градиентный режим: для С-ПЭГ: 0–5 мин 8% буферного раствора, 5–6 мин 8–20% буферного раствора, 6–16 мин 20% буферного раствора; для С-Б-ПЭИ_{лин}: 0–4 мин 12% буферного раствора, 4–6 мин 12–20% буферного раствора, 6–16 мин 20% буферного раствора; для С-ПВП: 0–3 мин 10% буферного раствора, 3–4 мин 10–20% буферного раствора, 4–10 мин 20% буферного раствора, 10–11 мин 20–10% буферного раствора, 11–20 мин 10% буферного раствора. Объем пробы – 20 мкл. Скорость потока 1 мл/мин, УФ-детектирование, 270 нм.

средств Программы развития Московского университета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Alpert A.J.* Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds // *J. Chromatogr. A.* 1990. V. 499. P. 177.
2. *Huber J.F.K., Pawlowska M., Markl P.* Selection of the solid support – A crucial step for the realization of solvent generated liquid-liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* 1990. V. 500. P. 280.
3. *Чернобровкина А.В., Смоленков А.Д., Шпигун О.А.* Гидрофильная хроматография – перспективный метод определения полярных веществ // *Лаборатория и производство.* 2018. № 4. С. 76.
4. *Попов А.С., Максимов Г.С., Смоленков А.Д., Шпигун О.А., Чернобровкина А.В.* Новые сорбенты для гидрофильной хроматографии на основе силикагеля, ковалентно модифицированного полиэти-

- ленгликолем // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2: Химия. 2021. Т. 62. С. 164.
5. Qiu H., Loukotková L., Sun P., Tesařová E., Bosáková Z., Armstrong D. W. Cyclofructan 6 based stationary phases for hydrophilic interaction liquid chromatography // J. Chromatogr. A. 2011. V. 1218. P. 270.
 6. Peng Ya., Hou Ya., Zhang F., Shen G., Yang B. A hyperbranched polyethylenimine functionalized stationary phase for hydrophilic interaction liquid chromatography // Anal. Bioanal. Chem. 2016. V. 408. P. 3633.
 7. Erim F.B., Cifuentes A., Poppe H., Kraak J.C. Performance of a physically adsorbed high-molecular-mass polyethylenimine layer as coating for the separation of basic proteins and peptides by capillary electrophoresis // J. Chromatogr. A. 1995. V. 708. P. 356.
 8. Towns J.K., Regnier F.E. Polyethylenimine-bonded phases in the separation of proteins by capillary electrophoresis // J. Chromatogr. A. 1990. V. 516. P. 69.
 9. Nutku M.S., Erim F.B. Polyethylenimine-coated capillary electrophoresis capillaries for the analysis of organic acids with an application to beverages // J. Microcolumn. Sep. 1999. V. 11. P. 541.
 10. Nutku M.S., Erim F.B. The use of cationic polymer for the separation of inorganic anions by capillary electrophoresis // J. High. Resolut. Chromatogr. 1998. V. 21. P. 505.
 11. Sedyohutomo A., Suzuki H., Fujimoto C. Determination of inorganic anions by capillary ion-exchange chromatography using polyethylenimine-coated octadecyl-bonded phases // Anal. Sci. 2012. V. 28. P. 625.
 12. Лошин, А.А., Глазков Е.С., Затираха А.В., Смоленков, А.Д., Шнигун О.А. Хроматографические свойства анионообменников на основе силикагеля, поверхностно модифицированных полиэтиленимином // Сорбционные и хроматографические процессы. 2015. Т. 15. С. 390.
 13. Alpert A.J., Regnier F.E. Preparation of a porous micro-particulate anion-exchange chromatography support for proteins // J. Chromatogr. 1979. V. 185. P. 375.
 14. Rounds M., Kopaciewicz W., Regnier F. Factors contributing to intrinsic loading capacity in silica-based packing materials for preparative anion-exchange protein chromatography. // J. Chromatogr. A. 1986. V. 362. P. 187.
 15. Pearson J., Regnier F. High-performance anion-exchange chromatography of oligonucleotides // J. Chromatogr. A. 1983. V. 255. P. 137.
 16. Drager R., Regnier F. High-performance anion-exchange chromatography of oligonucleotides // Anal. Biochem. 1985. V. 145. P. 47.
 17. Lv Y.Q., Lin Z.X., Svec F. Hypercrosslinked large surface area porous polymer monoliths for hydrophilic interaction liquid chromatography of small molecules featuring zwitterionic functionalities attached to gold nanoparticles held in layered structure // Anal. Chem. 2012. V. 84. P. 8457.
 18. Jiang L.W., Jin Y., Marcus R.K. Polyethylenimine modified poly (ethylene terephthalate) capillary channeled-polymer fibers for anion exchange chromatography of proteins // J. Chromatogr. A. 2015. V. 1410. P. 200.
 19. Takeuchi T., Kawasaki T., Lim L.W. Separation of inorganic anions on a pyridine stationary phase in ion chromatography // Anal. Sci. 2010. V. 26. P. 511.
 20. Auler L.M., Silva C.R., Collins K.E., Collins C.H. New stationary phase for anion-exchange chromatography // J. Chromatogr. A. 2005. V. 1073. P. 147.
 21. West C., Lemasson E., Nagai K., Shibata T., Franco P., Bertin S., Hennig P., Lesellier E. Characterization of novel polymer-based pyridine stationary phases for supercritical fluid chromatography // Chromatographia. 2019. V. 82. P. 143.
 22. Nagai K., Shibata T., Shinkura S., Ohnishi A. Poly (4-vinylpyridine) based novel stationary phase investigated under supercritical fluid chromatography conditions // J. Chromatogr. A. 2018. V. 1572. P. 119.
 23. Dunkle M., West C., Pereira A., der Plas S.V., Madder A., Farrell W. Synthesis of stationary phases containing pyridine, phenol, aniline and morpholine via click chemistry and their characterization and evaluation in supercritical fluid chromatography // Scientia Chromatographica. 2014. V. 6. P. 85.
 24. Kawachi Y., Ikegami T., Takubo H., Ikegami Y., Miyamoto M., Tanaka N. Chromatographic characterization of hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases: Hydrophilicity, charge effects, structural selectivity, and separation efficiency // J. Chromatogr. A. 2011. V. 1218. P. 5903.
 25. Dolci M., Chromatographic Characterization of Stationary Phases for Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography. Runcorn, Cheshire, UK: Thermo Fisher Scientific, 2013.
 26. Dinh N. P., Jonsson T., Igrum K. Probing the interaction mode in hydrophilic interaction chromatography // J. Chromatogr. A. 2011. V. 1218. P. 5880.
 27. Fu Q., Guo Z., Liang T., Zhang X., Xua Q., Liang X. Chemically bonded maltose via click chemistry as stationary phase for HILIC // Anal. Methods. 2010. V. 2. P. 217.
 28. Fu Q., Liang T., Zhang X., Du Yu., Guo Z., Liang X. Carbohydrate separation by hydrophilic interaction liquid chromatography on a 'click' maltose column // Carbohydr. Res. 2010. V. 345. P. 2690.
 29. Fu. Q., Tu L., Li Z., Xu X., Ke Ya., Jin Yu, Liang X. Separation of carbohydrates using hydrophilic interaction liquid chromatography // Carbohydr. Res. 2013. V. 379. P. 13.
 30. Kotoni D., D'Acquarica I., Cioglia A., Villani C., Capitani D., Gasparrini F. Design and evaluation of hydrolytically stable bidentate urea-type stationary phases for hydrophilic interaction chromatography // J. Chromatogr. A. 2012. V. 1232. P. 196.
 31. Jenkins K. HILIC separation of carbohydrates using ВЕН amide particle technology // J. Chromat. Today. 2015. V. 8. P. 13.
 32. Карцова Л.А., Бессонова Е.А., Сомова В.Д. Гидрофильная хроматография // Журн. аналит. химии. 2019. Т. 74. № 5. С. 323 (Kartsova L.A., Bessonova E.A., Somova V.D. Hydrophilic interaction chromatography // J. Anal. Chem. 2019. V. 74. P. 415.)
 33. Porter K., Lodge J. K. Determination of selected water-soluble vitamins (thiamine, riboflavin, nicotinamide and pyridoxine) from a food matrix using hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with mass spectroscopy // J. Chromatogr. B. 2021. V. 1171. Article 122541.

УДК 543.61+543.67+543.51

ОБНАРУЖЕНИЕ ПРИМЕСЕЙ В МЕТИЛМЕТАКРИЛАТЕ ВЫСОКОЙ СТЕПЕНИ ЧИСТОТЫ МЕТОДОМ ХРОМАДИСТИЛЛЯЦИИ В СОЧЕТАНИИ С МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЕЙ С ФОТОХИМИЧЕСКОЙ ИОНИЗАЦИЕЙ ПРИ АТМОСФЕРНОМ ДАВЛЕНИИ

© 2022 г. И. А. Ревельский^а, Ю. С. Яшин^а, Д. А. Чепелянский^а,
А. С. Самохин^а, А. И. Ревельский^{а, *}

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

*e-mail: sorbent@yandex.ru

Поступила в редакцию 20.09.2021 г.

После доработки 29.10.2021 г.

Принята к публикации 30.10.2021 г.

Обнаружение примесей в высокочистых веществах является актуальной задачей. В ее решении может помочь сочетание хромадистилляции и масс-спектрометрии с фото-ионизацией при атмосферном давлении. Сочетание этих методов позволяет регистрировать масс-спектры примесей, содержащихся в высокочистых органических веществах, не отделяя их от основного компонента. При этом ионы основного компонента, образовавшиеся в результате фотоионизации при атмосферном давлении, выполняют роль вещества-реагента для искомых примесей в режиме фотохимической ионизации при атмосферном давлении. Возможен выбор условий, при которых число пиков, регистрируемых в масс-спектре смеси, соответствует числу компонентов смеси, и каждый пик соответствует ионам M^+ либо MH^+ компонента смеси. Получаемая информация – число примесей в исследуемом веществе (в данной работе в метилметакрилате) и их целочисленные молекулярные массы.

Ключевые слова: хромадистилляция, масс-спектрометрия с фото- и фотохимической ионизацией при атмосферном давлении, высокочистые органические вещества, метилметакрилат, примеси.

DOI: 10.31857/S004445022207009X

Обнаружение низкомолекулярных летучих и среднелетучих примесей в высокочистых органических веществах, когда концентрация основного компонента много выше концентрации примесей, присутствующих в смеси, и число этих примесей и их природа неизвестны, представляет собой сложную задачу. При использовании для решения такой задачи метода газовой хроматографии-масс-спектрометрии (ГХ-МС) с электронной ионизацией во время выхода основного компонента из колонки поток газа-носителя желательнее перенаправить в другой детектор (например, пламенно-ионизационный) либо на сброс (например, с помощью системы переключения потоков Дина) [1]. Другой вариант – выключение катода источника ионов во время выхода основного компонента. В обоих случаях теряется информация о примесях, элюирующихся из колонки вместе с основным компонентом. При неизвестном составе примесей задача может быть не решаемая с помощью метода ГХ-МС.

Новые возможности регистрации аналитических сигналов примесей в высокочистых летучих

органических веществах на фоне основного компонента открываются при использовании метода хромадистилляции в сочетании с масс-спектрометрией с фотоионизацией при атмосферном давлении [2]. В этом методе при прохождении зоны паров основного компонента и примесей через камеру ионизации происходит их мягкая ионизация УФ-излучением и фотохимическая ионизация примесей образовавшимися ионами основного компонента [3]. В этом случае пары основного компонента выполняют роль вещества-реагента. Число пиков, регистрируемых в масс-спектре смеси, может соответствовать числу компонентов смеси и каждый пик может соответствовать ионам M^+ , либо MH^+ компонента смеси. Число регистрируемых в масс-спектре пиков может превышать число примесей за счет регистрации кластерных ионов основного компонента и примесей (M^+)_n, ($M^+Mпр$)_m, либо ($MH^+Mпр$)_n. Эти пики являются дополнительным доказательством регистрации ионов M^+ и MH^+ и соответственно молекулярных масс примесей. Кластерные ионы могут быть учтены и исключены из

масс-спектра за счет увеличения температуры источника ионов. Получаемые данные дают информацию и о числе коэлюируемых с основным компонентом примесей, что расширяет число обнаруживаемых компонентов анализируемой смеси неизвестного состава. Чувствительность регистрации примесей в этом случае может быть на два порядка выше, по сравнению с масс-спектрометрией с фотоионизацией (МС(ФИАД)) [4].

В отличие от хроматографии, разделение в хромадистилляции происходит в пустом кварцевом капилляре с градиентом температуры по его длине в потоке газа-носителя в результате многократно повторяющихся актов испарения и конденсации. Хромадистилляция обеспечивает формирование в газовом потоке ступени (зоны) постоянной концентрации паров основного по концентрации компонента в течение определенного времени, определяемого величиной анализируемой пробы [5], температурой конечной части капилляра и упругостью пара основного компонента при этой температуре.

Согласно теории хромадистилляции, фронтальная часть такой ступени должна быть обогащена более летучими примесями, чем основной компонент, а замыкающая часть — более высококипящими примесями [6]. Таким образом, происходит групповое разделение примесей без их полного отделения от основного компонента.

В случае сочетания хромадистилляции с МС(ФИАД) примеси регистрируются в процессе их фотохимической ионизации в источнике ионов без их предварительного отделения от основного компонента.

Целью настоящей работы являлась регистрация числа примесей в образце метилметакрилата (ММА) (с получением информации о предполагаемой целочисленной молекулярной массе) при использовании метода хромадистилляции в сочетании с масс-спектрометрией с фотохимической ионизацией при атмосферном давлении (ХД/МС(ФХИАД)).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали хромато-масс-спектрометр модели 4021 фирмы "Finnigan" (США), на котором был установлен разработанный нами источник ионов с фотоионизацией при атмосферном давлении (ФИАД) [7].

В качестве источника УФ-излучения использовали криптоновую газоразрядную лампу с энергией фотонов 10.6 эВ. Температура испарителя хроматографа и температура источника ионов — 250°C. Объем анализируемой пробы метилметакрилата (плотность — 0.94 г/мл, температура кипения — 101°C) составил 1 мкл. Для обеспечения режима хромадистилляции пробу ММА

вводили микрошрицем в испаритель газового хроматографа при 250°C. Пары ММА в потоке гелия поступали в охлажденный до комнатной температуры кварцевый капилляр внутренним диаметром 0.25 мм и длиной 2 м. Далее пары сконденсированного ММА в потоке газа-носителя по обогреваемой до 250°C линии поступали в ионизационную камеру источника ионов. В конце регистрируемой ступени проводили баллистический нагрев капилляра до температуры, равной 250°C, для быстрого испарения высококипящих примесей. Ионы, образующиеся в результате фотоионизации и фотохимической ионизации при атмосферном давлении (вещество-реагент — пары основного компонента), поступали в высоковакуумную область масс-анализатора (квадруполь). Регистрацию вели в режиме полного ионного тока. Масс-спектры сканировали в интервале значений m/z 40–500 а.е.м.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В масс-спектрах, зарегистрированных во время выхода хромадистилляционной ступени ММА, обнаружили целый ряд пиков с характеристическими значениями m/z (рассматривали пики с интенсивностью более 2 отн.%), предположительно соответствующими веществам-примесям с молекулярными массами в интервале от 68 до 242 а.е.м. (табл. 1). Такой вывод сделан на основании исследований масс-спектров ФХИАД различных известных соединений, выполненных нами ранее при температуре источника ионов 250°C. Эти исследования показали, что масс-спектры многих органических соединений состоят из одного пика иона M^+ и реже — из двух пиков — ионов M^+ и MH^+ . Эти данные позволили сделать предположения о значениях молекулярных масс обнаруженных примесей. Согласно ГОСТ 20370-74 [8] для ММА характерны восемь примесей с молекулярными массами 32, 58, 74, 86, 102, 110, 114 и 116, суммарная концентрация которых меньше 0.15%. Пять из них приведены в табл. 1. Кроме этих веществ, в результате данного исследования выявлено еще 29 компонентов.

Сочетание предложенного подхода с масс-спектрометрией высокого разрешения позволило бы с высокой вероятностью идентифицировать примеси, масс-спектры которых зарегистрированы в результате исследования. Информация о предполагаемой целочисленной молекулярной массе примесей также имеет практическое значение для специалистов, занимающихся синтезом, выделением и очисткой термостабильных органических веществ и синтезом из них других веществ. Эта информация важна как в случае совпадения (или различия в 1 а.е.м.) со значениями молекулярных масс применяемых в синтезе веществ или возможных побочных продуктов ре-

Таблица 1. Предполагаемые молекулярные массы* примесей в образце метилметакрилата, зарегистрированных методом хроматодистилляции в сочетании с масс-спектрометрией с фотохимической ионизацией при атмосферном давлении

№	Молекулярная масса	№	Молекулярная масса	№	Молекулярная масса	№	Молекулярная масса
1	68	10	110	19	120	28	178
2	72	11	112	20	144	29	180
3	78	12	114	21	146	30	186
4	84	13	116	22	154	31	196
5	86	14	118	23	156	32	218
6	96	15	120	24	158	33	220
7	100 (ММА)	16	126	25	162	34	242
8	102	17	128	26	168		
9	104	18	140	27	176		

* Молекулярные массы рассчитаны из предположения, что зарегистрированные значения m/z в масс-спектрах соответствуют M^+ либо M^+ и MH^+ .

акций, так и в случае обнаружения дополнительных неизвестных соединений. Предлагаемый подход – это своеобразный скрининг, позволяющий быстро (3–5 мин) выявлять число примесей в образцах химической продукции и их целочисленные молекулярные массы.

* * *

При исследовании образца метилметакрилата сочетание хроматодистилляции с МС(ФХИАД) позволяет зарегистрировать характеристичные значения m/z , соответствующие предполагаемым молекулярным массам 33 соединений. Это число заметно больше числа примесей, содержание которых допустимо в ММА согласно ГОСТу 20370-74 (восемь веществ) [8]. Достоинством предложенного подхода к выявлению примесей в высококачественном метилметакрилате является возможность регистрации соответствующих им аналитических сигналов (m/z) на фоне основного компонента. При этом основной компонент не только не мешает регистрации, но и играет важную роль (вещество-реагент) в создании условий фотохимической ионизации искомым веществ при атмосферном давлении и повышении чувствительности их обнаружения.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в соответствии с исследовательским проектом № 19-03-00732 А.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. David F., Jacq K., Sandra P., Baker A., Klee M.S. Analysis of potential genotoxic impurities in pharmaceuticals by two-dimensional gas chromatography with Deans switching and independent column temperature control using a low-thermal-mass oven module // *Anal. Bioanal. Chem.* 2010. V. 396. P. 1291. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3304-9>
2. Ревельский И.А., Яшин Ю.С., Жуховицкий А.А., Курочкин В.К., Костяновский Р.Г. Сочетание хроматодистилляции и хромато-хроматодистилляции с масс-спектрометрией // *Заводск. лаборатория.* 1990. Т. 56. № 7. С. 24.
3. Ревельский И.А., Яшин Ю.С., Курочкин В.К., Костяновский Р.Г. Масс-спектрометрия с фотоионизацией при атмосферном давлении и анализ многокомпонентных смесей без разделения // *Заводск. лаборатория.* 1991. Т. 57. № 3. С. 1.
4. Ревельский И.А., Яшин Ю.С., Вознесенский В.Н., Курочкин В.К., Костяновский Р.Г. Масс-спектрометрия с фотоионизацией при атмосферном давлении, анализ алканов, спиртов, кетонов, сложных эфиров и аминов // *Изв. АН СССР. Серия Химическая.* 1986. Т. 9. С. 1987.
5. Жуховицкий А.А., Яновский С.М. Применение хроматодистилляции // *Заводск. лаборатория.* 1981. Т. 47. № 2. С. 7.
6. Яновский С.М. Применение хроматодистилляции для дозирования больших проб в газовой хроматографии при определении примесей // *Успехи химии.* 1986. Т. 55. № 7. С. 1162.
7. Полякова А.А., Ревельский И.А., Токарев М.И., Яшин Ю.С., Коган Л.О., Тальрозе В.Л. Масс-спектральный анализ смесей с применением ион-молекулярных реакций / Под редакцией Поляковой А.А. М.: Химия, 1989. С. 240.
8. ГОСТ 20370-74. Эфир метиловый метакриловой кислоты. Технические условия (с изменениями № 1,2,3). Утвержден и введен в действие Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 19.12.74 № 2759. Разработан и внесен Министерством химической промышленности СССР. Москва: Издательство стандартов, 1989. 17 с.

УДК 54.061

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРФТОРОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ В ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ И ТКАНЯХ ОРГАНОВ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ МЕТОДОМ ГАЗОЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

© 2022 г. И. К. Журкович^а, В. А. Утсаль^а, Е. В. Островидова^{а, *}, В. А. Баринов^а,
Н. В. Луговкина^а, Е. Ю. Бонитенко^а, Н. А. Белякова^а, В. В. Баринов^а

^аНаучно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова

Федерального медико-биологического агентства
ул. Бехтерева, 1, Санкт-Петербурге 192019 Россия

*e-mail: yekaterina.ostrov@yandex.ru

Поступила в редакцию 08.10.2021 г.

После доработки 12.11.2021 г.

Принята к публикации 15.11.2021 г.

В опытах *in vitro* разработана методика определения группы перфторорганических соединений, перспективных для медицинского применения, в цельной крови и тканях органов лабораторных животных методом газожидкостной хромато-масс-спектрометрии. Оптимизирована процедура подготовки проб, основанная на жидкостной экстракции целевых соединений из биоматериала гепатом, содержащим в качестве внутреннего стандарта перфторбензол. Валидация методики и апробация в опытах *in vivo* проведена на примере перфтордекалина. Установлено время присутствия ксенобиотика в кровотоке и в различных органах мелких лабораторных животных при эндотрахеальном пути введения.

Ключевые слова: газожидкостная хромато-масс-спектрометрия, жидкостное дыхание, перфторорганические соединения, цельная кровь, ткани органов лабораторных животных, фармакокинетика.

DOI: 10.31857/S0044450222070143

Применение в современной медицинской практике перфторорганических соединений (ПФОС) в качестве кровезаменителей или дыхательных жидкостей требует их тщательного изучения как ксенобиотиков. Относительно новым направлением является применение ПФОС для доставки лекарственных препаратов в легкие. Их высокая растворяющая способность по отношению к кислороду и диоксиду углерода, низкое поверхностное натяжение и способность проникать в отделы легких, находящиеся в состоянии коллапса, способствуют лучшему распределению лекарства в пораженном органе. Эффективность такого подхода уже показана на примере транспорта антибиотиков, анестетиков и вазоактивных веществ [1].

Кроме того, при терапии синдрома респираторного дистресса, который может возникать при дефиците или дисфункции легочного сурфактанта, в том числе у новорожденных, практикуют введение искусственных добавок (например, фосфолипидов) в виде композиции с ПФОС [2].

В медико-биологических исследованиях значительное внимание уделяется оценке периодов циркуляции ксенобиотиков данного класса в кровотоке и удерживания в органах-депо. Эта информация особенно важна с точки зрения влияния на метаболические процессы, протекающие в крови, поскольку ПФОС могут служить сорбентом для некоторых биологически активных соединений, в том числе липидов и белков [3, 4]. Надежность полученных результатов в значительной степени определяется качеством химико-аналитического обеспечения. На сегодняшний день в научной литературе описан целый ряд методик, предназначенных для определения концентрации различных ПФОС в биологических образцах. Среди них перфтордекалин, соединения, содержащие третичную аминогруппу (например, перфтортрибутиламин и перфтор-N,N-диэтилциклогексиламин) или фурановый цикл (перфторбутилперфтортетрагидрофуран), а также их производные [5–9].

Наиболее подробные описания определения перфтордекалина и других перфторорганических соединений методом ГЖХ в биологических опы-

тах *in vivo* представлены Центральной исследовательской лабораторией японской компании Green Corporation в 1975 году [5–7]. Исследования выполнены с использованием хроматографической системы Shimadzu простейшей конфигурации, включающей обычную насадочную колонку и пламенно-ионизационный детектор. Независимо аналогичные разработки проводились в Американском детском госпитальном медицинском центре штата Цинциннати [10–12]. Однако они описаны менее подробно. В дальнейшем по мере развития аналитического приборостроения и совершенствования хроматографических фаз появились различные модификации первых методик с применением капиллярных колонок и новых типов детекторов [13].

Полный перечень исследованных в данной работе ПФОС включает перфтордекалин (ПФД),

перфтороктан (ПФО), Карбогал, 1-бромперфтор(4-метил-3,6-диоксаоктан) (ПФБДО) и перфтор(5-метил-3,6-диоксанонан) (ПФДО). Их структурные формулы представлены на схеме 1. В перечень включены производные, которые оказались наиболее перспективными по результатам медико-биологического исследования технологий на основе жидкостного дыхания и целевого транспорта лекарственных средств в легкие при ряде бронхолегочных заболеваний. Важным аргументом выбора целевых соединений является относительная доступность, поскольку их синтез и производство осуществляются в России. Это способствует более оперативному внедрению новых подходов в лечебную практику. За рубежом в аналогичных исследованиях применяют перфлуброн $C_8F_{17}Br$ (ПФБ).

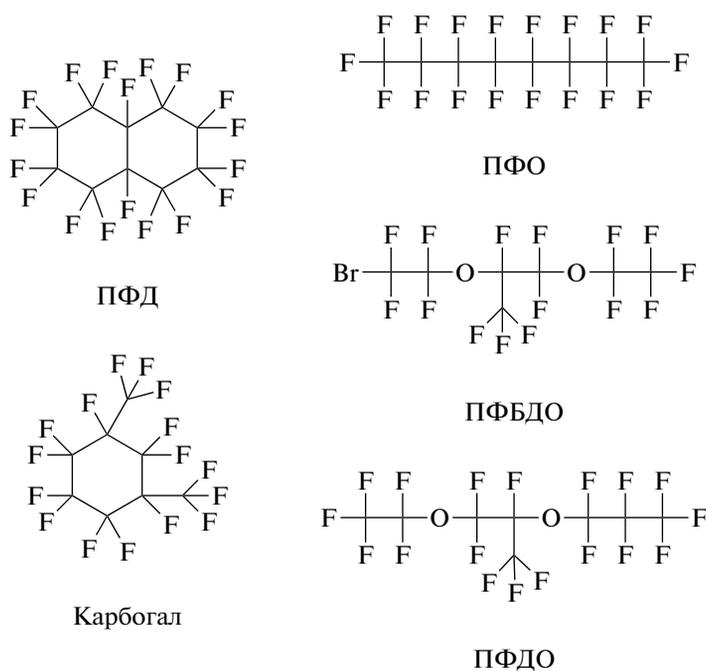


Схема 1. Структурные формулы перфтордекалина (ПФД) ($C_{10}F_{18}$), перфтороктана (ПФО) (C_8F_{18}), Карбогала (C_8F_{16}), 1-бромперфтор(4-метил-3,6-диоксаоктана) (ПФБДО) ($C_7F_{15}O_2Br$), перфтор(5-метил-3,6-диоксанонана) (ПФДО) ($C_8F_{18}O_2$).

Цель настоящего исследования состояла в разработке общей методики количественного определения ПФОС в образцах биоматериалов методом газожидкостной хромато-масс-спектрометрии (ГЖХ-МС) и ее апробация в опытах *in vivo* на примере ПФД. Аналитическую процедуру оптимизировали с учетом групповой специфичности некоторых физико-химических свойств, представленных в табл. 1. Перфторгексан (т. кип. $57^\circ C$) исключили из рассмотрения в связи с интенсивным газообразованием в опытах *in vivo*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Растворы и реагенты. Перфтордекалин (ФГБОУ ВО СибГМУ, Россия), перфторгексан, перфтороктан и карбогал (все ООО "ГалоПолимер", Россия), 1-бромперфтор(4-метил-3,6-диоксаоктан) и перфтор(5-метил-3,6-диоксанонан) (P&M Invest, Россия), гептан (Вектон, Россия), перфторбензол (ГИПХ, Санкт-Петербург), 0.001%-ный раствор перфторбензола в гептане (раствор внутреннего стандарта) готовили мето-

Таблица 1. Физико-химические свойства перфторорганических соединений

Показатель	Диапазон	Сравнительная оценка
Молекулярная масса, Да	400–488	ПФБ > ПФДО > ПФБДО > ПФД > ПФО > Карбогал
Температура кипения, °С	102–180	ПФБДО > ПФБ > ПФД > ПФДО > ПФО > Карбогал
Давление пара (37°С), кПа	0.1–8.0	ПФО > ПФД > ПФБ > ПФДО > ПФБДО
Плотность, г/мл	1.6–1.95	ПФД > ПФБ > Карбогал > ПФБДО > ПФО > ПФДО
Кинематическая вязкость (25°С), сСт	0.59–2.90	ПФД > Карбогал > ПФБ > ПФО > ПФБДО > ПФДО
Поверхностное натяжение (25°С), дин/см	10.0–18.0	ПФБ > ПФБДО > ПФД > ПФДО > ПФО
Растворимость O ₂ (25°С), мл газа/100 мл жидкости	48–54	Карбогал > ПФБ > ПФД > ПФО
Растворимость CO ₂ (25°С), мл газа/100 мл жидкости	140–210	ПФБ > Карбогал > ПФО > ПФД

дом растворением точных навесок перфторбензола в экстрагенте в день проведения измерений. Градуировочные образцы цельной крови лабораторных животных с внесением ПФОС *in vitro* с концентрацией в диапазоне от 0.1 до 20 мкг/мл готовили добавлением к 1 мл крови алиquot 0.1 или 0.01%-ных растворов индивидуальных экспериментальных образцов ПФОС в гептане.

Оборудование. Использовали газожидкостный хромато-масс-спектрометр GCMS-QP2010 Plus (Shimadzu, Япония) и капиллярную хроматографическую колонку Ultra-2 (25 м × 0.2 мм). Экспериментальные данные регистрировали и обрабатывали с помощью программы GS-MS Solutions.

Для подготовки проб использовали: весы лабораторные электронные, модель Adventurer AR 2140 (Ohaus, США) с точностью взвешивания 0.0001 г, центрифугу лабораторную, ОПН-8УХЛ4 (Россия), аппарат для встряхивания образцов (Chirana, Чехия), ультразвуковую баню D-7824 Singen/HTW (Elma, Германия), смеситель лабораторный MS 3 basic (IKA, США).

В ходе исследования выбрали условия пробоподготовки биологических образцов крови и тканей органов и хроматографического анализа проб в режиме электронной ионизации и селективного мониторинга характеристичных ионов определяемых соединений.

Подготовка биопроб и анализ. *Цельная кровь.* 1 мл крови помещали в стеклянную пробирку с завинчивающейся крышкой объемом 5 мл, прибавляли 1 мл раствора внутреннего стандарта. Пробу выдерживали в УЗ-бане в течение 10 мин при температуре не выше +5°С, перемешивали в течение 2 мин на лабораторном смесителе и центрифугировали 5 мин при скорости 3000 об/мин. Алиquotу верхнего слоя переносили в стеклянную хроматографическую вialу с завинчивающейся крышкой объемом 4 мл и анализировали методом ГЖХ-МС.

Ткани органов. Перед анализом температуру замороженных образцов поднимали до комнатной. Точные навески от 0.1 до 0.5 г переносили в стеклянные пробирки с завинчивающимися крышками и прибавляли 1 мл раствора внутреннего стандарта. Пробу выдерживали в УЗ-бане в течение 10 мин при температуре не выше +5°С, перемешивали в течение 2 мин на лабораторном смесителе и центрифугировали 5 мин при скорости 3000 об/мин. Алиquotу верхнего слоя переносили в стеклянную хроматографическую вialу с завинчивающейся крышкой объемом 4 мл и анализировали методом ГЖХ-МС.

Газожидкостный хромато-масс-спектрометрический анализ. Компоненты проб разделяли в условиях градиентного элюирования при температуре инжектора и детектора 280°С, начальной температуре колонки 80°С (2 мин), скорости нагрева 45°С/мин и конечной температуре колонки 280°С (15 мин), газ-носитель He, скорость потока 1 мл/мин, деление потока 1 : 10.

МС-детектирование проводили в условиях электронной ионизации при потенциале 70 eV в режиме сканирования SIM при температуре источника ионов и интерфейса 280°С. Аналитические сигналы регистрировали в интервале от 1 до 2 мин при отсечении шумов на уровне 50 усл. ед.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оптимизация процедуры подготовки биопроб. Для определения ПФОС в биоматериале использовали жидкостную экстракцию и метод внутреннего стандарта. Вследствие высокой гидрофобности и отсутствия межмолекулярного взаимодействия у перфторированных углеводородов в качестве экстрагента целесообразно использовать аполлярный апротонный растворитель по классификации Паркера [14]. К их числу относятся жидкости с низкой диэлектрической проницаемостью и слабым дипольным моментом, не

Таблица 2. Метрологические характеристики определения перфторорганических соединений в цельной крови методом ГЖХ-МС

ПФОС	Линейный диапазон, мкг/мл	Уравнение 1 порядка	Коэффициент корреляции	Предел обнаружения, мкг/мл
Перфтордекалин	0.5–20.0	$y = 0.0005x$	0.9983	0.05
Перфтороктан	0.5–20.0	$y = 0.0001x$	0.9946	0.02
Карбогал	0.5–20.0	$y = 0.0002x$	0.9996	0.02
ПФБДО	0.1–20.0	$y = 0.00006x$	0.9997	0.01
ПФДО	0.1–20.0	$y = 0.0001x$	0.9998	0.01

Таблица 3. Критерии идентификации перфторорганических соединений

Определяемое вещество	Время удерживания, мин	Детектируемый ион: m/z , Да
Перфтордекалин	1.60 ± 0.05 (<i>цис</i> -изомер) 1.63 ± 0.05 (<i>транс</i> -изомер)	$C_6F_9^+$:243, $C_7F_{11}^+$:293
Перфтороктан	1.45 ± 0.05	CF_3^+ :69
Карбогал	1.48 ± 0.05	CF_3^+ :69, $C_4F_7^+$:181
ПФБДО	1.50 ± 0.05	CF_3^+ :119
ПФДО	1.50 ± 0.05	CF_3^+ :119
Перфторбензол (внутренний стандарт)	1.82 ± 0.05	$C_6F_6^+$

склонные к образованию водородных связей, прежде всего, алифатические или ароматические углеводороды. Учитывая летучесть указанных углеводородов, в качестве оптимального экстрагента ПФОС из биоматериала выбрали *n*-гептан (т. кип. 98.4°C), а внутреннего стандарта – гексафторбензол (т. кип. 80.1°C).

Параметры жидкостной экстракции оптимизировали в опытах *in vitro*. Удалось подобрать оптимальные условия проведения процедуры: соотношение массы биологической пробы и объема экстрагента, температура УЗ-бани и время эксперимента. Однократная степень извлечения, установленная в опытах введено–найденно, составляет не менее 95% для всех исследуемых ПФОС. Подтверждением этих данных служат высокие значения коэффициентов корреляции линейных градуировочных графиков, представленных в табл. 2.

ПФОС в биообразцах идентифицировали по хроматографическим параметрам удерживания и значениям массовых чисел характеристических ионов. За результат идентификации принимали совпадение указанных характеристик на хроматограммах стандартного и испытуемого растворов. Соответствующие параметры для целевых соединений представлены на рис. 1 и в табл. 3.

Концентрацию (мкг/мл) ПФОС в пробах цельной крови определяли по градуировочной кривой как средний результат двух анализов.

Массовые концентрации ПФОС в тканях органов (*c*) вычисляли по формуле (1) как средний результат параллельных определений:

$$c = c_{тр} / m, \quad (1)$$

где $c_{тр}$ – концентрация ПФОС, найденная по градуировочной характеристике, мкг/мл; m – навеска испытуемого образца, г.

Метрологические характеристики и апробация методики на примере перфтордекалина в опытах *in vivo*. Градуировочные графики строили для каждого ПФОС, используя соответствующие градуировочные образцы цельной крови крыс. Пробоподготовку, а также анализ градуировочных и тестируемых биообразцов проводили с соблюдением описанных выше процедур. Метрологические характеристики определения целевых аналитов представлены в табл. 2.

Пределы обнаружения ПФОС, установленные для соотношения сигнал/шум более 3, превышают аналогичные показатели, приведенные в литературе, примерно в 1000 раз.

При апробации методики *in vivo* в качестве тест-системы выбрали белых крыс-самцов Вистар. Перфтордекалин вводили животным наношак однократно в дозе 19.4 мг/кг (10 мл/кг) эндотрахеально (э/т) через полимерную интубационную трубку при общей анестезии.

Кровь и органы (головной мозг, легкие, печень, селезенка, почка) отбирали через опреде-

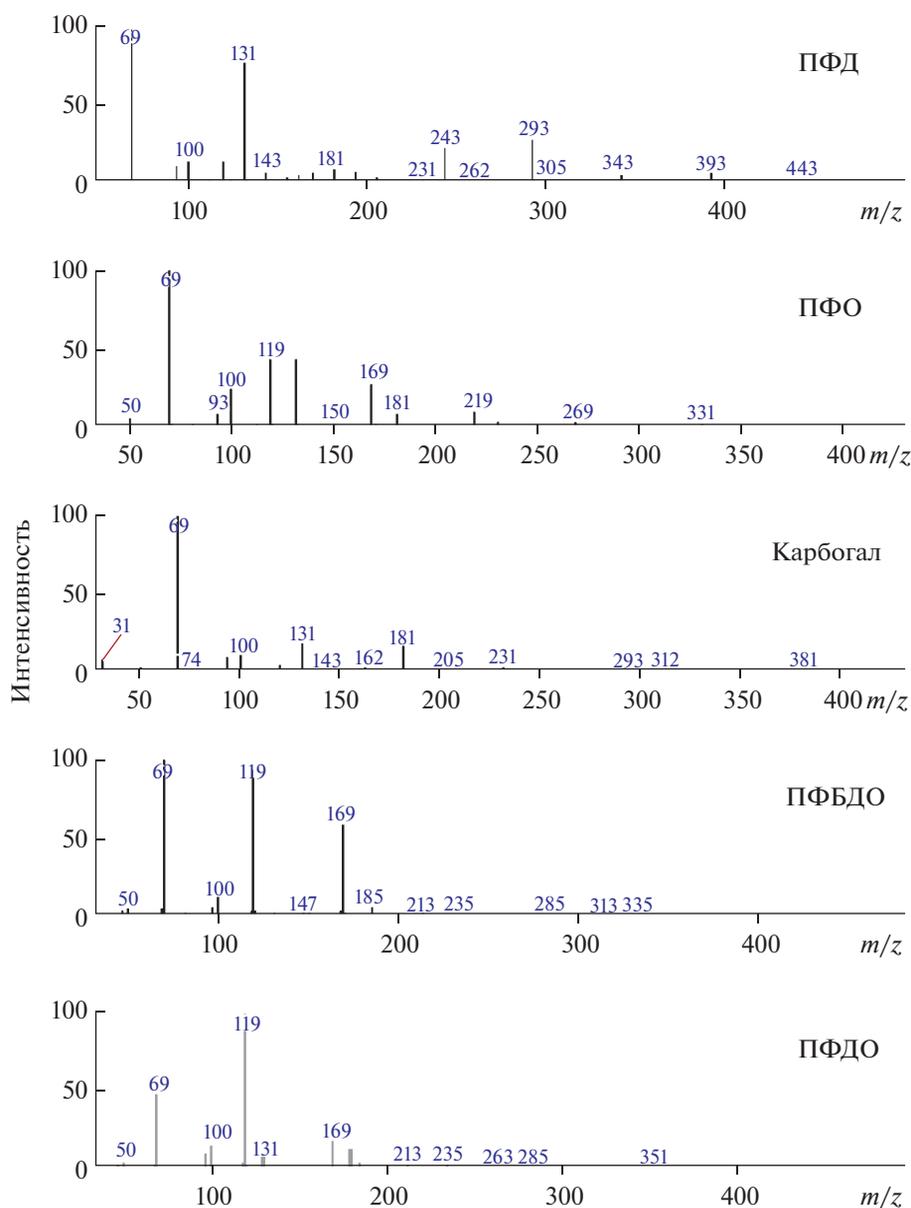


Рис. 1. Масс-спектры фрагментации ионов перфторорганических соединений, выбранных для их определения в режиме электронной ионизации.

ленные интервалы времени: 1 ч, 24 ч, 3 и 10 сут после введения перфтордекалина. Образцы крови лабораторных животных в объеме не менее 2 мл помещали в пробирки с Na-гепарином объемом 5.0–6.0 мл и хранили при температуре от -4 до -6°C в течение не более 1 сут. Фрагменты органов гомогенизировали в присутствии хладагента и хранили в морозильной камере при -45°C .

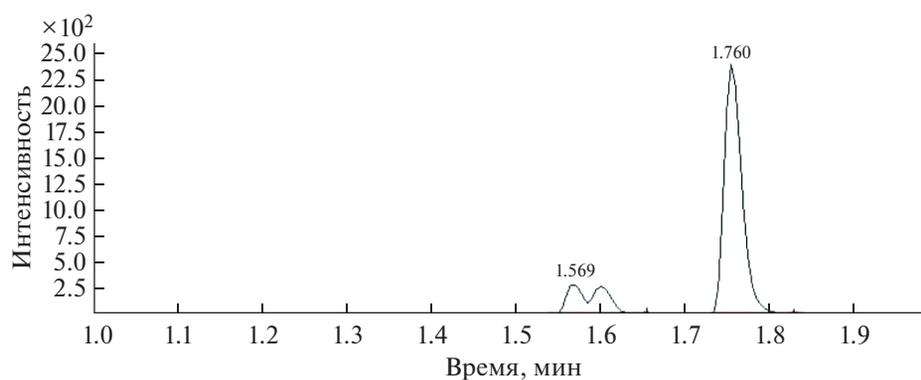
Концентрацию ПФД в каждой временной точке, определяли в пяти повторностях, используя биопробы, отобранные у пяти животных. Усредненные результаты анализа представлены в табл. 4.

Демонстрационные хроматограммы приведены на рис. 2 и 3. Сигналы со временем удерживания в диапазоне 1.55–1.65 мин соответствуют *цис*- и *транс*-изомерам ПФД, а сигнал со временем удерживания около 1.75–1.85 мин – внутреннему стандарту (перфтобензолу).

Полученные данные, свидетельствуют о крайне низкой биодоступности ПФД при эндотрахеальном пути введения, расчетные значения которой составляют не более 0.2%. Органом-депо для него являются легкие, где большая часть ксенобиотика содержится в альвеолярном пространстве при незначительном проникновении в легочную ткань. Более чем 200-кратное снижение

Таблица 4. Фармакокинетическое исследование перфтордекалина при эндотрахеальном способе введения крысам

Тест-объект	Содержание ПФД, мкг/мл			
	через 1 ч	через 24 ч	через 72 ч	через 240 ч
Цельная кровь	0.56	0.36	0.52	0.18
Легкие	490.0	2.49	3.53	0.56
Печень	0.88	0.49	0.49	0.29
Почка	1.12	0.38	0.49	0.23
Селезенка	1.04	0.65	0.77	0.49
Головной мозг	0.53	0.43	0.42	0.25

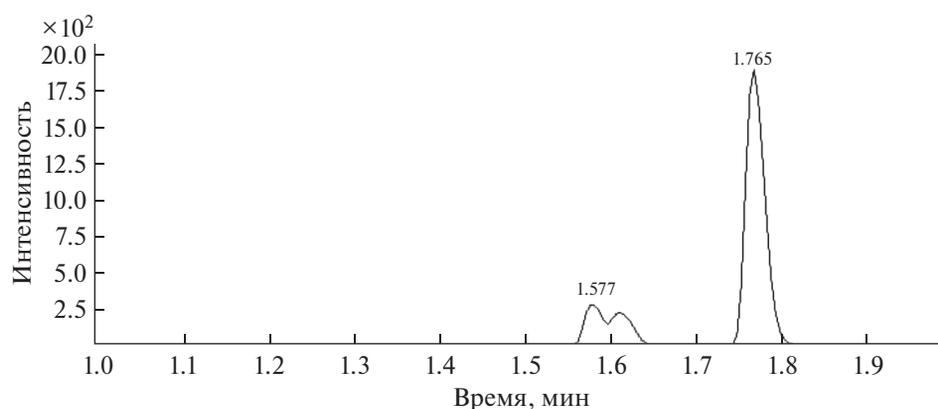
**Рис. 2.** Определение перфтордекалина в цельной крови кролика через трое суток после введения.

концентрации ПФД в легких через сутки после эндотрахеального введения свидетельствует о его быстрой элиминации с выдыхаемым воздухом. Через 10 сут концентрация ПФД в легких сопоставима со значениями концентраций в других исследованных органах.

Представленные экспериментальные данные позволяют интерпретировать фармакокинетику ПФОС как длительный процесс их циркуляции в

организме лабораторных животных при изученном способе введения. Это затрудняет применение стандартного набора кинетических параметров для классического описания абсорбции ксенобиотиков данного класса, а также особенностей распределения, метаболизма и элиминирования.

Важным результатом исследования *in vivo* является установление факта аккумуляции ПФД в тканях органов. Степень депонирования,

**Рис. 3.** Определение перфтордекалина в ткани мозга кролика через трое суток после введения.

по-видимому, характеризуется соответствующими коэффициентами распределения, которые зависят от содержания липидов в крови и в различных органах.

Таким образом, разработана современная высокочувствительная методика определения ПФОС, используемых в биомедицинских технологиях, и показана возможность ее применения в доклинических исследованиях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kaisers U.* British J. Liquid ventilation // Br. J. Anaesth. 2003. V. 91. P. 143.
2. Патент США № 5.853.003.
3. *Calderwood H., Ruiz B., Tham M.* Residual levels and biochemical changes after ventilation with perfluorinated liquids // J. Appl. Physiol. 1975. V. 39. P. 603.
4. *Kollpara S., Gandhi R.* Pharmacokinetic aspects and *in vitro-in vivo* correlation potential for lipid-based formulations // Acta Pharm. Sin. B. 2014. V. 4. № 5. P. 333.
5. *Yamanouchi K., Murashima R., Yokoyama K.* Determination of perfluorochemicals in organ and body fluids by gas chromatography // Chem. Pharm. Bull. 1975. V. 23. № 6. P. 1363.
6. *Yokoyama K., Yamanouchi K., Murashima R.* Excretion of perfluorochemicals after intravenous injection of their emulsion // Chem. Pharm. Bull. 1975. V. 23. № 6. P. 1368.
7. *Okamoto H., Yamanouchi K., Yokoyama K.* Retention of perfluorochemicals in circulating blood and organs of animals after intravenous injection of their emulsions // Chem. Pharm. Bull. 1975. V. 23. № 7. P. 1452.
8. *Yokoyama K., Yamanouchi K., Ohyanagi H., Mitsuno T.* Fate of perfluorochemicals after intravenous injection with their emulsions // Chem. Pharm. Bull. 1978. V. 26. № 6. P. 956.
9. *Holaday D., Fiserova-Bergerova V., Modell J.* Uptake, distribution and excretion of fluorocarbon FX-80 (perfluorobutyl perfluorotetrahydrofuran) during liquid breathing in dog // Anesthesiology. 1972. V. 37. № 4. P. 387.
10. *Shaffer T., Wolfson M., Greenspan J., Hoffman R., Davis S., Clark L.* Liquid ventilation in premature lambs: Uptake, biodistribution and elimination of perfluorodecalin liquid // Reprod. Fertill. Dev. 1996. № 8. P. 409.
11. *Clark L., Gollan F.* Survival of mammals breathing organic liquids equilibrated with oxygen at atmospheric pressure // Science. 1966. V. 152. P. 1755.
12. *Gollan F., Clark L.* Organ perfusion with fluorocarbon liquids // Physiologist. 1966. V. 9. P. 191 M.
13. *Audran M., Krafft M., Ceaurritz J., Maturin J.-C., Sicart M., Marion B., Bougard G., Bressolle F.* Determination of perfluorodecalin and perfluoro-N-methylcyclohexylpiperidine in rat blood by gas chromatography-mass spectrometry // J. Chromatogr. B. 2000. V. 745. P. 333.
14. *Райхардт К.* Растворители и эффекты среды в органической химии. М.: Мир, 1991. С. 759.