СОДЕРЖАНИЕ

_

Том 76, номер 4, 2021

обзоры

Разделение, характеризация и анализ нано- и микрочастиц окружающей среды: современные методы и подходы	
А. И. Иванеев, М. С. Ермолин, П. С. Федотов	291
ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ	
Исследование антитиреоидных и антиоксидантных свойств цистеина, глутатиона и метионина методами спектрофотометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии	
А. А. Щербатых, М. С. Черновьянц	313
Определение метамизола натрия с учетом его разложения в водных растворах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии при изучении профилей растворения	
А. В. Егорова, Г. В. Мальцев, Ю. В. Скрипинец, О. Д. Войтюк, С. Н. Кашуцкий, И. В. Умецкая, В. П. Антонович	324
Особенности образования и хроматографического детектирования гидратов органических соединений	
И. Г. Зенкевич, Д. А. Никитина, А. Деруиш	331
Влияние взаимного расположения заместителей в молекуле аминобензойной кислоты на аналитические характеристики безметочного электрохимического иммуносенсора с ковалентно-иммобилизованным рецепторным слоем	
Т. С. Свалова, Р. А. Зайдуллина, Н. Н. Малышева, С. Ю. Сараева, А. И. Матерн, А. Н. Козицина	342
Биосенсоры на основе пероксидазы хрена с различными типами нанотрансдъюсеров для определения пероксида водорода	
К. Г. Николаев, С. С. Ермаков, Ю. Е. Ермоленко, Д. В. Наволоцкая, А. Оффенхойзер, Ю. Г. Мурзина	350
Отношения стабильных изотопов ¹³ C/ ¹² C и ¹⁵ N/ ¹⁴ N в образцах подмора медоносных пчел и в продуктах их жизнедеятельности	
Д. А. Калашникова, Г. В. Симонова	359
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ПРИБОРЫ	
Какие аналитические приборы производят в России?	
Г. И. Цизин, Ю. А. Золотов	369
В НАУЧНОМ СОВЕТЕ РАН ПО АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ	
44-я Годичная сессия совета	380
Вступительное слово председателя Научного совета РАН по аналитической химии академика Ю.А. Золотова на Годичной сессии 29 сентября 2020 г.	382
ХРОНИКА	
Памяти В. П. Фадеевой	384

———— ОБЗОРЫ ——

УДК 543

РАЗДЕЛЕНИЕ, ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ И АНАЛИЗ НАНО- И МИКРОЧАСТИЦ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ: СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ И ПОДХОДЫ

© 2021 г. А. И. Иванеев^{а, *}, М. С. Ермолин^а, П. С. Федотов^а

^аИнститут геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского Российской академии наук ул. Косыгина, 19, Москва, 119991 Россия *e-mail: aiivaneev@geokhi.ru Поступила в редакцию 24.09.2020 г. После доработки 17.11.2020 г.

Принята к публикации 24.11.2020 г.

Обобщены современные подходы к изучению природных и антропогенных нано- и микрочастиц частиц окружающей среды. Рассмотрены методы разделения (седиментация, мембранная фильтрация, проточное фракционирование в поперечном силовом поле), методы оценки размера и морфологии частиц (электронная микроскопия, динамическое и статическое светорассеяние), а также методы их элементного анализа (атомно-эмиссионная и масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой, атомно-абсорбционная спектрометрия, рентгеновская дисперсионная спектроскопия). Приведен ряд конкретных примеров исследования природных частиц пыли, вулканического пепла, природных вод, а также синтетических наночастиц в объектах окружающей среды. Показана необходимость применения комплекса взаимодополняющих методов разделения, характеризации и анализа при исследовании частиц окружающей среды. Особое внимание уделено гибридным методам, позволяющим проводить разделение, оценку размера и анализ частиц в режиме онлайн. Сформулированы основные проблемы характеризации и анализа природных наночастиц, предложены возможные пути их решения.

Ключевые слова: наночастицы, микрочастицы, фракционирование, пыль, вулканический пепел, почва. **DOI:** 10.31857/S0044450221040058

Полидисперсные объекты окружающей среды, например почва, пепел и пыль, содержат твердые частицы различного размера, которые образуются в результате естественных и антропогенных процессов. Частицы постоянно перемещаются между атмосферой, гидросферой и педосферой и могут переносить различные токсичные и питательные элементы и вещества [1]. Химические и физические свойства частиц окружающей среды могут изменяться в результате процессов "старения" под воздействием природных и антропогенных условий [1, 2]. Степень потенциальной опасности твердых частиц для экосистем и живых организмов напрямую связана с их структурой, составом и размером.

При исследовании полидисперсных объектов окружающей среды особого внимания требуют наночастицы. Согласно общепринятому определению, наночастица — это объект, размер которого хотя бы в одном из измерений составляет от 1 до 100 нм [3]. Следует отметить, что частицы окружающей среды в нанометровом диапазоне обладают различной морфологией (наностержни, наносферы, нанопластины, нановолкна и др.) и могут образовывать скопления (агломераты), свойства и ха-

рактеристики которых отличны от свойств и характеристик образующих их частиц [4]. Таким образом, при изучении наночастиц нельзя упускать из вида их агломераты в субмикронном диапазоне размеров (≤1000 нм) [5]. Необходимо подчеркнуть, что удельная площадь поверхности наночастиц значительно превышает аналогичный показатель для микрочастиц. Таким образом, большая площадь поверхности становится доступной для химических реакций [2]. В связи с этим наночастицы обладают чрезвычайно высокой способностью сорбировать потенциально токсичные вещества и элементы, а также высокой биодоступностью в окружающей среде [6, 7]. Помимо этого, частицы в нанометровом диапазоне размеров, в отличие от микро- и макрочастиц, обладают высокой подвижностью в окружающей среде [1, 2]. Наночастицы могут переноситься на значительные расстояния с воздушными и водными потоками и проникать в живые организмы [2, 8, 9]. Следует отметить, что наночастицы, являясь частью полидисперсных образцов окружающей среды, имеют различные источники происхождения (извержения вулканов, пожары, промышленные выбросы, горное дело и т.д.) [2, 5]. Можно выделить два основных типа наночастиц: антропогенные и природные.

Антропогенные наночастицы, в свою очередь, делятся на два подтипа: синтетические (engineered) и "случайные" (incidental) [10]. Синтетические наночастицы находят широкое применение в различных областях науки, таких как биология, химия, физика и медицина [11, 12]. Кроме этого, они стали частью повседневной жизни людей в качестве компонентов электроники (элементы и покрытия электронных схем и процессоров), косметических продуктов, пищевых добавок, систем для доставки лекарств, сенсоров для распознавания бактерий и других биологических компонентов и т.д. [2, 13, 14]. В настоящее время объемы производства синтетических наночастиц постоянно растут, а область их применения непрерывно расширяется. Несмотря на очевидные преимущества их использования, данные наночастицы могут быть чрезвычайно опасны для здоровья человека и состояния экосистем [2, 8]. Основными источниками синтетических наночастиц в окружающей среде являются процессы обращения с ними (производство, транспортировка, применение и утилизация), а также использование косметических средств и предметов личной гигиены, солержаших наночастицы (солнцезашитный крем и зубная паста) [15, 16]. Несмотря на широкое применение наночастиц в различных областях науки и техники, их взаимодействие с окружающей средой изучено недостаточно [2, 4, 8].

Промышленные выбросы, добыча полезных ископаемых, износ деталей автомашин и авиационных двигателей, использование ископаемого топлива в тепловых электростанциях и многие другие антропогенные процессы являются источниками образования "случайных" наночастиц, которые могут нести в себе потенциальную угрозу для здоровья человека и состояния экосистем [4, 5, 17]. "Случайные" наночастицы имеют непредсказуемый или переменный состав, который может зависеть не только от промышленной технологии, но и от взаимодействия этих частиц с окружающей средой. Следует отметить, что в городской среде случайные наночастицы в основном образуются в результате промышленной и строительной деятельности, износа и коррозии деталей автотранспорта и различных строительных сооружений, а также в результате обращения с отходами [2, 4, 8]. Случайные наночастицы в конечном итоге оседают на поверхностях наземных и водных экосистем и загрязняют почву, поверхностные и подземные воды [17, 18]. Следует подчеркнуть, что как случайные, так и синтетические наночастицы могут легко перемещаться в окружающей среде с помощью воздушных и водных потоков и, попадая в окружающую среду, становятся частью природных полидисперсных образцов [2, 8]. Однако, несмотря на существенную степень индустриализации современной жизни, по некоторым оценкам доля случайных наночастиц в атмосфере составляет всего лишь 10%, тогда как остальные 90% — это наночастицы естественного происхождения или природные наночастицы [2].

Естественные процессы, происходящие на Земле, являются источниками образования природных наночастиц. Можно выделить различные виды природных наночастиц в окружающей среде в зависимости от источников их происхождения: наночастицы, образующиеся в результате вулканических извержений, песчаных бурь, лесных и торфяных пожаров, фрагментации метеоритов, входящих в атмосферу Земли, а также наночастицы морских аэрозолей, образовавшихся над поверхностью морей и океана. Биогенные объекты, такие как частицы растений, фрагменты животных, вирусы, также могут являться природными наночастицами [19-22]. Природные наночастицы отличаются разнообразным элементным составом и широкой вариацией структуры [2, 8].

Изучение наночастиц окружающей среды является сложной задачей аналитической химии [5]. Основными этапами их исследования являются выделение и последующие характеризация и анализ. При этом следует принимать во внимание, что наночастицы, содержащиеся в полидисперсных образцах окружающих среды, могут составлять только 0.01% (или меньше) от исходного образца [17], поэтому методы разделения частиц играют основополагающую роль при исследовании наночастиц окружающей среды. Примеры применения взаимодополняющих методов разделения, характеризации и анализа нано- и микрочастиц окружающей среды систематизированы в табл. 1.

МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И РАЗДЕЛЕНИЯ НАНО- И МИКРОЧАСТИЦ

Для фракционирования полидисперсных образцов окружающей среды используют разнообразные методы, отличающиеся по положенному в их основу принципу фракционирования и диапазону размеров разделяемых частиц [17, 111]. Для фракционирования частиц размером более 100 мкм, как правило, используют методы мокрого и сухого просеивания. Частицы с размером менее 100 мкм могут быть разделены методами мембранной фильтрации, седиментации и проточного фракционирования в поперечном силовом поле. Рабочие диапазоны методов разделения, применяемых для фракционирования частиц окружающей среды, и диапазоны размеров нанои микрочастиц показаны на рис. 1.

Седиментация. В процессе седиментации частицы разделяют в поле гравитационных сил Земли. Метод седиментации подробно описан и

Литера- тура	Mn, [23]	[24]	Pb, [25–28]	[29]	i, Pb, [30]	Ga, [31] Sb,	[32]	[33]	Ni [34]	[35]	[36]	o, Ni, [37] W,	[38]	[39]	4n, [7, 9, 40, , Cd, 41] , T1,	[42-44]	- - -
Определяемые элементы**	Ag, As, Zn, Pb, Cu, Cd, Cr, Ni, Co, Hg, Sb, Ni	Pb	Al, As, Ba, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, I Ti. V. Zn. Fe. K. Ca. Na. Mn. Mg. Si	Al, Cr, Fe, Cu	Al, As, Ca, Cd, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Ni S, Sb, Sn, Zn	Ag, Al, As, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, C Hg, K, La, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, Sr, Th, Ti, V, W, Zn	Al, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb	Pb, Cu, Zn, Cd	Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Ca, Zn, Mn, Pb,	Fe, Mn, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Sb, Zn	Ι	Na, Mg, Al, P, S, K, Ca, Ti, V, Cr, Fe, Co Cu, Zn, Ga, As, Cd, Sn, Sb, Ba, La, Ce, Hg, Tl, Pb, Bi	I	Fe, Ca, Mg, Mn, Zn, Cr, Cu, Cd	Na, Ba, Mg, Al, Si, P, S, Cr, K, Ca, Ti, N Fe, Ni, Cu, Sr, Zn, Ni, Co, As, Se, Y, Ag, Sn, Te, La, Ce, Pr, Nd, Gd, Dy, Ho, Hg, Pb, Bi, Th, U	I	
Диапазон размеров исследуемых фракций частиц*, мкм	<38 и <2000	<63 и <500	<44 и <1000	<20	<37 и 75–100	<147	<425	<2 и 850—2000	<2	<2.5 и 200–2000	0.2-3 и >10	<0.45 и 2.5-10	<50	<10.3 и 10.3–44	<0.3 и 10-100	<0.07 и >25	
Методы анализа	AAC	ААС, MC-ИСП	РФС	РДС	АЭС-ИСП, РДС	МС-ИСП	РДС, МС-ИСП	AAC	AAC	AAC	I	АЭС-ИСП, МС- ИСП	I	АЭС-ИСП	АЭС-ИСП, МС-ИСП	Ι	
Методы характеризации	I	I	I	ПЭМ, СЭМ-ЭДС	сэм-эдс	СЭМ-ЭДС	сэм-эдс	СЭМ-ЭДС	I	I	COM	ДП	Оптическая микроскопия	СЭМ-ЭДС	СЭМ, ЛД	Ι	
Методы разделения	Просеивание							Просеивание, Седиментация	Седиментация	Седиментация, Центрифугирование	ФМ		СедПФП		BCK	Разделение	
Исследуемые частицы окружающей среды	Пыль																

Таблица 1. Комбинированные и гибридные методы изучения нано- и микрочастиц окружающей среды

293

Литера- тура	i, [46] e, a,	[47]	s, [49]),	[51]	; [52]	, [6, 53– s, 55] d, u,	[56]	[57]		[58]	[59, 60]	[61]	[62]
Определяемые элементы**	Si, Al, Ca, K, Na, Mg, Fe, P, S, Li, Sc, Ti V, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Ge, As, S Rb, Sr, Y, Zr, Nb, Mo, Cd, Sn, Sb, Cs, Bê La, Ce, Hf, W, Pb, Bi, Th, U	– As. Cd. Cr. Cu. Hg. Ni. Pb. Sb. U. V. Zn	Mg, Al, Ca, Fe, V, Cr, Mn, Co, Ni, Zn, A, Pb, Hg	Si, Fe, Al, Ca, Mg, Na, K, Ti, P, Mn, Sr, Ba, V, Zr, Cr, Ni, Zn, Ce, Cu, Rb, La, Co Nb, Y, Pb	Hg	Al, Fe, Y, La, Ce, Pr, Gd, Ho, Ni, Cu, Se Sn, Te, Tl, Pb, Bi, Th	Li, Be, B, Na, Mg, Al, Si, P, S, K, Ca, Sc, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, A, Se, Rb, Sr, Y, Zr, Nb, Mo, Rh, Pd, Ag, Cd Sn, Sb, Te, Cs, Ba, La, Ce, Pr, Nd, Sm, El, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu, Hf, Ta, W, Re, Ir, Pt, Au, He, Tl, Pb, Bi, Th, U		Ι		As, Pb, Fe, Al	Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Zn	Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn	Fe, Al, Ca, Mg
Диапазон размеров исследуемых фракций частиц*, мкм	<10	<1 и 1–10 <36 и 150–300	<74	06>	<63 и 90-125	<1	<0.2	<0.83	<50		<0.10 и 75—2000	<0.2 и>10	<0.2 и 3-50	<1
Методы анализа	АЭС-ИСП, МС-ИСП, РФС, ионная хромато- графия	РДС МС-ИСП	АЭС-ИСП, МС-ИСП, ААС	РДС, РФС, АЭС-ИСП	РДС, РФС, ААС	МС-ИСП	аэс-исп, мс- исп	I	Рамановская	спектроскопия	МС-ИСП	РДС, АЭС-ИСП	РДС, АЭС-ИСП	АЭС-ИСП
Методы характеризации	ДС	СЭМ-ЭДС –	I	СЭМ, ПЭМ, ДС	CЭМ	ЛД, СЭМ	лд, сэм	СЭМ, ЛД, КЭ	I		I	ДП	МЄП	I
Методы разделения	Разделение в импак- торе (с предвари- тельным ресуспендирова- нием осевшей пыли)	Просеивание	4			Седиментация	BCK, МФ	BCK	Разделение в импак-	Tope	Просеивание, Цен- трифугирование, МФ	Седиментация, цен- трифугирование	Центрифугирова- ние с непрерывным	потоком Центрифугирова- ние. МФ
Исследуемые частицы окружающей среды		Вулканический	пепел								Почва			
					жν	рнап	аналитическ	ΩЙ	хи	м	И тог	м 76	No 4	2021

294

Таблица 1. Продолжение

ИВАНЕЕВ и др.

Исследуемые частицы окружающей среды	Методы разделения	Методы характеризации	Методы анализа	Диапазон размеров исследуемых фракций частиц*, мкм	Определяемые элементы**	Литера- тура
		лд, сэм	AAC	<1	Al, Si, Pb	[63]
	ФМ	ПЭМ-ЭДС	МС-ИСП	<0.002 и 0.2-5	La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu	[64]
		МЕП	РДС	0.001-0.025 и 0.45-2	I	[65]
	СедПФП	COM	МС-ИСП	<1	Al:Si:Fe:Ba:Sr:Ti:Mg:Rb:Ce:Nd	[99]
			(онлайн), РДС			
		СЭМ-ЭДС	AAC	<5	Hg	[67]
	ПФП-СП	ДП	Ι	<1	Ι	[68]
		Ι	АЭС-ИСП	<1	Cu: Mn: Pb: Zn: Mg	[69]
			(онлайн)			
	ПФП-АП	ПЭМ-ЭДС	MC-ИСП	<1	As : Fe;	[70]
			(онлайн), АЭС- ИСП		As, Fe, Ca, Al, Cu, Zn, Pb	
		МУС (онлайн с	MC-MCII	<0.45	Fe:AI:Ca:Mg:Ti:U	[71, 72]
		ПФП), КЭ	(онлайн с ПФП и с КЭ)			1
	BCK	COM	МС-ИСП	0.1-2 и 10-20	Cu, Zn, Cd, Pb	[73, 74]
Минеральные		ПЭМ, СЭМ-ЭДС	РДС	I	Al, Cu, Si, Fe, Zn, Cd, Hg, V, Ni	[75]
частицы	СедПФП	MED	АЭС-ИСП	Средний размер фракций: 0.06 и 0.25	Si, Al, Ca, Mg, Fe	[76]
		СЭМ, ДС	I	<1.2	I	[77]
		Ι	МС-ИСП	<1	AI: Mg: Fe: Sr: Rb	[78]
			(онлайн)			
	ПФП-АП	COM (ESEM)-	МС-ИСП	<1	Al: Fe: As;	[62]
		ЭДС, ПЭМ	(онлайн и		Al, Mn, Fe, Cu, Zn, As, Pb	
			офлайн)			
Коллоидные	СедПФП	COM	МС-ИСП	<1	A1: Fe: Mg;	[80]
частицы в природ-			(онлайн и		Al, Fe, Mg, Cu, Pb, Cr, Cd	
ных водах			офлайн), ААС			
			(онлайн и			
			офлайн)			

РАЗДЕЛЕНИЕ, ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ И АНАЛИЗ НАНО- И МИКРОЧАСТИЦ

ЖУРНАЛ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ том 76 № 4 2021

анапити

Таблица 1. Продолжение

Методы тегоды разделения Методы характеризации Диапазон размеров иследуемых фракций частиц*, мкм ФП-АП – АЭС-ИСП, <1	Методы Методы Методы анализа Диапазон размеров исследуемых фракций частиц*, мкм – АЭС-ИСП, <	Методы анализа исследуемых фражций частиц [*] , мкм АЭС-ИСП, <1	Диапазон размеров исследуемых фракций частиц*, мкм <1		Определяемые элементы** Al : Fe, Cu : Zn;	Литера- тура [81]
мс-исп, мс	МС-ИСП (онлайн и офлайн)	МС-ИСП (онлайн и офлайн)	7		Fe, Al, Cu, Mn, Ba, Zn, Pb, V, Ni, As, Cr, Y, Cd, Sc, Pd, U, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu	<u>2</u>
 – МС-ИСП <0.4 офлайн и 	 – МС-ИСП <0.4 (онлайн и офлайн) 	МС-ИСП <0.4 (онлайн и офлайн)	<0.4	5	As : Co : Fe : Ni : Mn : Pb : Th : U : Zn; Li, Mg, Al, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Sr, Y, Mo, Ag, Cd, Sb, Ba, Tl, Pb, Th, U	[82]
МУС (онлайн), ДС МС-ИСП <0.	МУС (онлайн), ДС МС-ИСП <0. (онлайн)	МС-ИСП <0. (онлайн)	<0>	45	Al : Mn : Fe : Cu : As : Zn : Pb	[83]
– – МС-ИСП-ЕЧ, <0 АЭС-ИСП	– MC-ИСП-ЕЧ, <0 АЭС-ИСП	МС-ИСП-ЕЧ, <0 АЭС-ИСП	0>	.12	Au, Ag	[84]
- CƏM (ASEM), - < CƏM, IIƏM	CЭМ (ASEM), – < < CЭМ, ПЭМ	Г	V	0.1	I	[85]
– СЭМ МС-ИСП-ЕЧ <	сэм MC-ИСП-ЕЧ <	МС-ИСП-ЕЧ	V	U	Au, Zr, U, Th	[86-89]
– ПЭМ, ДС МС-ИСП-ЕЧ	ПЭМ, ДС МС-ИСП-ЕЧ	мс-исп-еч	v	<0.1	Ti, Ag	[06]
– СЭМ-ЭДС МС-ИСП-ЕЧ	сэм-эдс мс-исп-еч	МС-ИСП-ЕЧ		<0.2	Zn, Ce	[91]
ентрифугирование ДС МС-ИСП-ЕЧ, <	дс MC-ИСП-ЕЧ, <	мс-исп-еч, <	v	<32	Si, Al, Fe, Mg, Mn, Ni, Zn, Cu	[92]
энальное ПЭМ МС-ИСП, Средн энтрифутирование МС-ИСП-ЕЧ фракции	ПЭМ МС-ИСП, Средн МС-ИСП-ЕЧ фракции	МС-ИСП, Средн МС-ИСП-ЕЧ фракциі	Средн фракциј	ий размер й: 0.02 и 0.15	Аи	[93]
CЭМ, ПЭМ – <0.0-	СЭМ, ПЭМ – <0.0-	- <0.0	<0.0	4 и >0.75	Ι	[94–96]
Ф ПЭМ-ЭДС МС-ИСП, МС-ИСП-ЕЧ МС-ИСП-ЕЧ	ПЭМ-ЭДС МС-ИСП, МС-ИСП-ЕЧ	МС-ИСП, МС-ИСП-ЕЧ		√1	Ţ	[79]
едПФП ПЭМ, ДС МС-ИСП-ЕЧ	ПЭМ, ДС МС-ИСП-ЕЧ	МС-ИСП-ЕЧ		<0.5	Ag, Ti, Zn, Ce	[86]
СЭМ (ESEM), – ПЭМ, ДС	СЭМ (ESEM), – ПЭМ, ДС	1		<0.08	I	[66]
СЭМ, ДС МС-ИСП-ЕЧ	сэм, дс мс-исп-еч	МС-ИСП-ЕЧ		<0.2	Ti	[100]

ИВАНЕЕВ и др.

296

Таблица 1. Продолжение

энты** Литера- тура	[101, 102]	[103, 104]	[105]	[106]	[107]	[108]	[109]	[110]
Определяемые элеме	I	Ι	Ag : Ce : La : Fe	Au	Ag	Se : Cd : Zn : Al	Ag	Ag, Si
Диапазон размеров исследуемых фракций частиц*, мкм	<0.4	<0.2	<0.2	<0.1	<0.1	<0.06	<0.1	<0.14
Методы анализа	Ι	Ι	МС-ИСП (онлайн), МС-ИСП-ЕЧ	МС-ИСП (онлайн)	МС-ИСП (онлайн), МС- ИСП-ЕЧ	МС-ИСП (онлайн)	МС-ИСП-ЕЧ	МС-ИСП-ЕЧ (онлайн)
Методы характеризации	сэм, пэм	ПЭМ, ДСС	Меп	I	I	МУС (онлайн), ПЭМ-ЭДС	МУС (онлайн), ДС (онлайн), ПЭМ	Меп
Методы разделения	ПФП-СП, СедПФП	ПФП-АП, СедПФП	ПФП-АП					
Исследуемые частицы окружающей среды								

том 76

Nº 4

2021

Таблица 1. Окончание

ЖУРНАЛ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ

РДС – рентгеновская дифракционная спектроскопия, РФС – рентгеновская флуоресцентная спектроскопия, ААС – атомно-абсорбционная спектроскопия, АЭСфракционирование во вращающейся спиральной колонке, ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия, СЭМ – сканирующая электронная микроскопия, ЭДС – энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия, ЛД – лазерная дифракция, МУС – многоугловое светорассеяние, ДС – динамическое светорассеяние, 1 ИСП – атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно связанной плазмой, МС-ИСП – масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой, МС-ИСП-ЕЧ масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой в режиме анализа единичных частиц.

* В случае исследования нескольких фракций частиц различного размера в таблице приведены минимальное и максимальное значения размеров данных фракций. В случае исследования одной фракции частиц в таблице приведено соответствующее значение размера данной фракции.

** Элементы, разделенные в таблице двоегочием (например Se : Cd : Zn : Al), определяли гибридным методом анализа одновременно с разделением.



Рис. 1. Рабочие диапазоны методов разделения, применяемых для фракционирования частиц окружающей среды, и диапазоны размеров нано- и микрочастиц.

прост в применении [17]. Время, необходимое для выделения фракции частиц определенного размера, может быть рассчитано по закону Стокса. Однако данный процесс длителен (до нескольких дней). Седиментация в поле центробежных сил (центрифугирование) позволяет сократить время разделения, при этом меняется диапазон размеров выделяемых частиц (рис. 2а). Седиментацию и центрифугирование обычно используют для разіделения образцов почвы, городской пыли и вулканического пепла [34, 35, 52, 59, 60]. В частности, методы седиментации и центрифугирования применя)ли для изучения транспорта металлов коллоидными частицами почв; из образцов почвы выделяли фракции частиц размером >10, 10-1, 1-0.45, 0.45-0.2 и <0.2 мкм для оценки распределения различных элементов между почвенными частицами различного размера [59, 60]. Кроме этого, метод седиментации использовали для выделения наночастиц вулканического пепла при оценке возможностей прямого анализа данных частиц методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (МС-ИСП) [52].

Центрифугирование с градиентом плотности – разновидность метода центрифугирования, который также можно применять для разделения ча-

стиц. Можно выделить два вида центрифугирования с градиентом плотности: зональное и изопикническое (рис. 2) [17, 111]. Зональное центрифугирование позволяет разделять частицы в соответствии с их размером, формой и плотностью. Центрифужную пробирку предварительно заполняют несмешивающимися жидкостями с различной плотностью, начиная с жидкости с наибольшей плотностью и заканчивая жидкостью с наименьшей плотностью. Число используемых жидкостей, а также их плотность выбирают в зависимости от целей исследования и параметров изучаемого полидисперсного образца, подлежащего разделению. После этого разделяемый образец вводят тонким слоем в верхнюю часть градиента плотности (рис. 2б). Затем заполненную пробирку помещают в ротор центрифуги. Разделение происходит в результате движения частиц через градиент плотности в процессе центрифугирования. Зональное центрифугирование обычно используют для разделения биогенных частиц, например клеток, органелл, бактерий, вирусов [17, 112]. Тем не менее наночастицы золота [93], кремния [94], серебра [95] и углеродные нанотрубки [96] можно разделить с помощью зонального центрифугирования, что указывает на



Рис. 2. Принципы центрифугирования (а), а также зонального (б) и изопикнического (в) режимов центрифугирования.

возможность использования данного метода и для исследования наночастиц окружающей среды.

Изопикническое центрифугирование позволяет разделить частицы только в соответствии с их плотностью (рис. 2в). На данный момент изопикническое центрифугирование не используют для разделения наночастиц окружающей среды [17].

Центрифугирование с непрерывным потоком также является методом разделения, который можно применять при исследовании полидисперсных образцов окружающей среды [61]. Данный метод позволяет фракционировать суспензию объемом до нескольких литров, при этом исключаются длительные процедуры заполнения и декантирования множества центрифужных пробирок. Суспензию разделяемых частиц прокачивают через ротор центрифуги. Фракционирование частиц происходит за счет изменения скорости вращения центрифуги. Центрифугирование с непрерывным потоком использовали для выделения из образцов почвы фракций частиц размером <0.2, <0.6 и <1 мкм для их последующего изучения [61].

Основными недостатками методов седиментации и центрифугирования являются низкие разрешающая способность и эффективность разделения. Фракцию частиц с узким размерным распределением практически невозможно выделить с помощью данных методов из-за наличия побочных процессов, таких как соосаждение частиц разного размера, агломерация и агрегация [17, 111]. Несмотря на это, седиментация и центрифугирование доступны практически в любой исследовательской лаборатории и широко применяются при исследовании полидисперсных образцов окружающей среды различной природы [17, 35, 59, 60, 111].

Мембранная фильтрация. Метод мембранной фильтрации основан на использовании мембран с различными размерами пор лля вылеления фракций частиц различного размера. Метод можно использовать для разделения частиц окружающей среды в жидких средах [11, 17, 36, 37, 62, 64, 113]. Например, фракцию наночастиц городской пыли, осевшей на поверхности листьев деревьев, выделяли с использованием фильтра с размером пор 0.2 мкм с целью изучения элементного состава частиц [36]. Мембранную фильтрацию через мембраны 5 и 0.2 мкм и ультрафильтрацию через мембраны 30 и 3 кДа (~4 и 2 нм соответственно) успешно применяли при выделении наночастиц из образцов почвы для изучения распределения редкоземельных элементов между фракциями различного размера [64]. Многоступенчатую мембранную фильтрацию (0.45, 2.5 и 10 мкм) использовали при оценке вклада металлургического предприятия в загрязнение нано- и микрочастиц городской пыли [37].

Разделение методом мембранной фильтрации является сложным процессом, результаты которого могут быть искажены за счет образования осадка на фильтре, забивания мембранных пор и физико-химического взаимодействия между материалом мембраны и разделяемыми частицами [17, 58, 111]. Результаты мембранной фильтрации также сильно зависят от материала мембраны (стекло, поликарбонат, целлюлоза и т.д.) [58, 63]. Среди преимуществ мембранной фильтрации можно выделить большой объем фракционируемого образца, который может достигать несколько литров, доступность требуемого оборудования и быстрота фракционирования. Процесс фильтрации обычно занимает не более одного часа [17, 111].

Мембранную фильтрацию часто используют в комбинации с методами седиментации и центри-



Рис. 3. Принцип разделения частиц методом проточного фракционирования в поперечном силовом поле.

фугирования. С помощью фильтрации фракция более крупных частиц может быть отделена от фракции наночастиц [17, 63]. Например, сочетание методов мембранной фильтрации и центрифугирования применяли для оценки влияния биомассы на выщелачивание коллоидного фосфора из почв [62].

Проточное фракционирование в поперечном силовом поле ($\Pi \Phi \Pi$) объединяет группу методов разделения, обладающих высокой селективностью, разрешающей способностью и широкой областью применения. Теория метода ПФП была предложена Дж. К. Гиддингсом в 1960-х гг. [114]. Образцы различной природы, включая биологические клетки, частицы и макромолекулы, могут быть разделены в соответствии с их физическими и/или физико-химическими характеристиками, такими как размер, электрофоретическая подвижность и коэффициент термодиффузии, в различных жидких подвижных фазах (водной, органическом растворителе и др.). В отличие от хроматографии, в ПФП отсутствует стационарная фаза, что минимизирует потери образца, возникающие из-за сорбционных процессов. Разделение происходит в узком (обычно 0.05-0.5 мм) щелевидном канале за счет совместного действия силового поля, приложенного под прямым углом к каналу, и неоднородного профиля скорости подвижной фазы (рис. 3). Нижняя стенка канала, которая взаимодействует с разделяемыми частицами, называется аккумулирующей. ПФП позволяет разделять частицы в диапазоне размеров от 1 нм до 100 мкм [111, 115]. В зависимости от природы приложенного поля можно выделить седиментационное ПФП, ПФП с поперечным потоком и др. [111, 115, 116].

Седиментационное ПФП применяют для разделения полидисперсных образцов с широким диапазоном размеров (от 10 нм до нескольких микрометров) под действием поля центробежных сил. Фракционирование частиц различной природы (неорганические коллоиды, пыль, донные отложения, вирусы, клетки) происходит в плоском канале, помещенном на внутреннюю стенку барабана центрифуги [115, 116]. Следует отметить, что в случае седиментационного ПФП разделение происходит в зависимости как от размера, так и от плотности частиц. Кроме этого, седиментационное ПФП, благодаря полноценному теоретическому описанию процессов разделения, можно использовать не только для разделения, но и для определения гранулометрического состава полидисперсных образцов окружающей среды. Например, методом седиментационного ПФП определяли гранулометрический состав частиц песка (10-50 мкм) [38] и пепла (<45 мкм), выброшенного из трубы термоэлектрической станции [39]. Фракции частиц различного размера также выделяли из образцов почв при помощи данного метода и анализировали методом атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (АЭС-ИСП) для оценки распределения токсичных элементов между различными размерными фракциями [38, 39].

Седиментационное ПФП успешно использовали для разделения, характеризации и анализа полидисперсных образцов почв [38] и пыли [67]. Аккумулирование ртути на частицах илистой фракции (<2 мкм), выделенной из образцов загрязненных почв промышленного района, изучали при помощи метода седиментационного ПФП и метода атомно-абсорбционной спектрометрии с пиролитической приставкой. Результаты исследования показали, что ртуть в основном связана с фракцией частиц размером от 400 до 700 нм [67]. Седиментационное ПФП в сочетании с АЭС-ИСП также использовали для разделения, характеризации и анализа частиц (<60 и <250 нм) илистой фракции почвы с целью изучения их геологических свойств, элементного состава и таких параметров, как способность к набуханию и расслоению в зависимости от размера частиц [76].

ПФП с поперечным потоком — наиболее универсальный метод среди группы методов ПФП, в котором в качестве силового поля используют поперечный поток. К каналу приложено неспецифическое гидродинамическое силовое поле, образованное за счет второго потока подвижной фа-

зы. Разделяемые частицы переносятся за счет действия поперечного потока вдоль поверхности аккумулирующей стенки канала (проницаемая мембрана). Процесс разделения основан на разнице в коэффициентах диффузии, которые зависят от положения разделяемых частиц в профиле ламинарного потока подвижной фазы. Выбор материала используемой мембраны зависит от природы разделяемых частиц. Мембрана должна быть плоской и гладкой, потому что любые дефекты мембраны могут повлиять на процесс разделения. Наиболее распространено использование мембран из регенерированной целлюлозы. Разделение частиц в ПФП с поперечным потоком происходит в зависимости от их размера и независимо от их плотности [111, 115].

Могут быть выделены два типа ПФП с поперечным потоком: ПФП с симметричным и асимметричным поперечным потоком. В случае ПФП с симметричным поперечный потоком обе стенки проницаемы и поперечный поток проходит перпендикулярно основному потоку через верхнюю и нижнюю стенки разделительного канала. Необходимо отметить, что ультрафильтрационную мембрану, не пропускающую разделяемые частицы, помещают только на аккумулирующей стенке [111, 115]. ПФП с симметричным поперечным потоком применяют для разделения образцов различной природы, включая вирусы, органические вещества, коллоиды и синтетические наночастицы [111, 115].

В ПФП с асимметричным поперечным потоком (наиболее распространений тип ПФП с поперечным потоком) только аккумулирующая стенка канала проницаема для подвижной фазы. Поперечный поток формируется за счет прохождения основного потока через аккумулирующую стенку. Канал имеет трапециевидную форму во избежание потери осевого потока подвижной фазы вдоль канала. Следует отметить, что эффективность разделения напрямую зависит от геометрии канала [111, 115]. Данный вид ПФП широко применяют в исследованиях образцов окружающей среды, а также при изучении биологических и синтетических частиц [70, 82, 108, 117]. Данный метод, так же как и седиментационное $\Pi \Phi \Pi$, используют для определения гранулометрического состава исследуемых образцов [70, 82, 108, 117]. ПФП с асимметричным поперечным потоком успешно использовали при изучении поведения квантовых точек CdSe/ZnS в почве и оценке их потенциального воздействия на организм человека [108]. Кроме этого, в качестве примера можно привести исследование, в котором с помощью асимметричного ПФП изучали аккумулирование мышьяка и железа в коллоидной фракции частиц почвы и донных отложений, отобранных в зоне воздействия горнодобывающей шахты [70]. Данный метод успешно используют для оценки распределения микроэлементов в природных коллоидных частицах различного размера [81, 82].

Перед использованием методов ПФП обычно требуется предварительно удалить крупные частицы (>100 мкм) из полидисперсных образцов окружающей среды. Методы седиментации и/или мембранной фильтрации часто используют для подготовки образцов перед исследованием методами ПФП [70, 71, 81, 82, 108]. Следует отметить, что стадия пробоподготовки может исказить результаты исследования образцов окружающей среды методами ПФП. Например, извлечение фракции частиц определенного размера методом мембранной фильтрации может быть неполным, что впоследствии исказит результаты исследования [17, 58, 68].

Проточное фракционирование в поперечном силовом поле является мощным аналитическим инструментом, применяемым при исследовании образцов окружающей среды [111, 115]. Кроме того, системы ПФП можно соединить онлайн с различными видами детекторов для более подробной характеризации исследуемых образцов [118]. Однако методы ПФП обладают одним значительным ограничением. Масса вводимого образца обычно не должна превышать 1 мг, чтобы избежать перегрузки системы. В свою очередь, методы, применяемые для характеризации и анализа после разделения ПФП, должны обладать высокой чувствительностью. Исходные образцы также должны быть достаточно однородными, чтобы результаты исследования были достоверными [17, 111].

Фракционирование во вращающейся спиральной колонке (**BCK**), которое также относится к группе методов ПФП, позволяет увеличить массу разделяемого образца до 1 г и более. Данный метод можно применять для разделения образцов почв, городской пыли и вулканического пепла на фракции частиц разного размера [6, 7].

Метод фракционирования в ВСК является нетрадиционным вариантом реализации седиментационного ПФП. В работе [119] подробно описаны возможности и принципы методов седиментационного ПФП и фракционирования в ВСК. В отличие от традиционного седиментационного ПФП, разделительный канал в ВСК намотан на цилиндрический сердечник планетарной центрифуги. Спиральная колонка вращается вокруг своей оси и одновременно обращается вокруг центральной оси центрифуги за счет планетарной передачи. Оси вращения и обращения параллельны (рис. 4). Процесс разделения частиц в ВСК имеет два существенных отличия от седиментационного ПФП. В случае с ВСК разделяемый образец не вводится в тонкий канал, а прокачивается с помощью подвижной фазы через вращающуюся спиральную колонку (внутренний объем



Рис. 4. Планетарная центрифуга, оснащенная вращающейся спиральной колонкой. Фотография (а) и принципиальная схема (б).

аналитической колонки обычно варьируется от 20 до 25 мл). Разделение в ВСК осуществляется под действием сложного асимметричного поля центробежных сил, формирующихся в планетарной центрифуге [120]. Таким образом, поведение частиц внутри ВСК намного сложнее, чем в канале седиментационного ПФП.

Метод разделения частиц в ВСК успешно использовали при исследовании полидисперсных образцов окружающей среды. Выделены весовые количества фракций нано-, субмикро- и микрочастиц из исходных образцов для их последующих характеризации и количественного анализа. Фракции частиц размером <0.3, 0.3-1, 1-10, 10-100 мкм выделяли из 100 мг образцов городской пыли и количественно анализировали методами АЭС-ИСП и МС-ИСП. В результате обнаружено неравномерное распределение токсичных элементов между фракциями частиц различного размера. Концентрация данных элементов увеличивается с уменьшением размеров частиц, что объясняется высокой сорбционной способностью более мелких частиц [7]. ВСК также использовали для разделения, характеризации и анализа частиц вулканического пепла [6, 53–55]. Кроме этого, разработанный подход использовали для решения ряда задач экологического мониторинга на примере различных образцов городской пыли [9, 40, 41].

Вращающуюся спиральную колонку применяли и для фракционирования микрочастиц. Например, были успешно разделены частицы кварцевого песка размером от 1 до 20 мкм [73]. Разделение в данном диапазоне размеров может представлять интерес при изучении образцов окружающей среды, поскольку кварцевый песок присутствует в составе многих почв. Кроме этого, ВСК применяли для разделения почв на илистую (<2 мкм), пылеватую (2–50 мкм) и песчаную (>50 мкм) фракции, которые в дальнейшем использовали для изучения распределения различных форм тяжелых металлов в зависимости от размера фракций [74].

Высокая емкость ВСК позволяет выделять весовые количества фракций нано- и субмикрочастиц. Выделенные фракции можно охарактеризовать и количественно проанализировать после разложения. Кроме того, при использовании метода фракционирования в ВСК не требуется проведение этапа предварительной подготовки образца, поскольку образцы с широким размерным распределением могут быть напрямую введены в спиральную колонку. Несмотря на преимущества, ВСК обладает более низкой разрешающей способностью по сравнению с традиционными методами ПФП. ПФП позволяет выделить узкие фракции частиц в нанометровом диапазоне. Тем не менее фракционирование в ВСК является перспективным методом фракционирования полидисперсных образцов окружающей среды [17, 111, 121].

Другие методы разделения. При изучении частиц, находящихся во взвешенном состоянии в атмосфере, часто используют методы разделения в газовых средах. Разделение основано на использовании специальных устройств – импакторов. Импакторы позволяют определить гранулометрический состав частиц и их концентрацию в газовых суспензиях. Разделение частиц происходит в соответствии с их аэродинамическим радиусом за счет прокачивания большого объема воздуха через импактор [17, 122, 123]. Импакторы используют для изучения распределения токсичных элементов между частицами пыли различного размера [42-44]. Их также применяют для определения элементного состава аэрозольных частиц пыли и вулканического пепла [45, 57]. Применение импакторов позволяет выделить фракции частиц различного размера: <0.07, 0.07-0.5 и 0.5-1.0 мкм [42]; и <0.25, 0.25-0.5 и 0.5-1 мкм [45]. Следует отметить, что импакторы можно использовать для разделения не только аэрозольных частиц, но и частиц, уже осевших на какой-либо поверхности. В этом случае требуется использование дополнительного оборудования, переводящего частицы во взвешенное состояние [47, 124].

МЕТОДЫ ХАРАКТЕРИЗАЦИИ ЧАСТИЦ

Как отмечено выше, одни из главных параметров частиц окружающей среды — их размер и гранулометрический состав. Для оценки морфологии, размера и гранулометрического состава частиц окружающей среды, в частности наночастиц, используют такие методы, как электронная микроскопия, динамическое и статическое светорассеяние, ПФП и капиллярный электрофорез [17, 56, 105]. Проточное фракционирование в поперечном силовом поле. Данная группа методов ПФП может быть использована не только для разделения частиц, но также и для определения их размера. Размер частиц можно определить по времени их удерживания. Время удерживания частиц в зависимости от их размера внутри разделительного канала седиментационного ПФП рассчитывают следующим образом [115]:

$$t_{R} = \frac{t_{0}}{6(a-a^{2}) + 9\frac{kT}{2w\pi r_{p}^{3}(\rho'-\rho)g}(1-2a)\left\{\operatorname{cth}\left[\frac{2w\pi r_{p}^{3}(\rho'-\rho)g}{3kT}(1-2a)\right] - \frac{3kT}{2(1-2a)w\pi r_{p}^{3}(\rho'-\rho)g}\right\}, \quad (1)$$

где t_R — время удерживание частицы, t_0 — мертвое время, w — высота разделительного канала, ρ' плотность частицы, ρ — плотность подвижной фазы, T — температура, r_p — радиус частицы, k постоянная Больцмана, g — центробежное ускорение, a — отношение между радиусом частицы и высотой разделительного канала (r_p/w).

Время удерживания частиц в случае ПФП с поперечным потоком рассчитывают по формуле [115]:

$$t_{R} = \frac{t_{0}}{6(a-a^{2}) + 6\frac{DV_{0}}{w^{2}Q_{c}}(1-2a)\left\{\operatorname{cth}\left[\frac{w^{2}Q_{c}}{2DV_{0}}(1-2a)\right] - \frac{2DV_{0}}{(1-2a)w^{2}Q_{c}}\right\},$$
(2)

где D — коэффициент диффузии, V_0 — мертвый объем, Q_c — скорость поперечного потока.

Таким образом, седиментационное ПФП и ассиметричное ПФП с поперечным потоком успешно использовали для определения размеров фракций наночастиц различной природы [77, 98–101, 103–107]. Результаты определения гранулометрического состава обычно хорошо согласуются с данными, полученными методами светорассеяния и микроскопии. В некоторых работах показано, что размерная характеризация методами ПФП имеет преимущество перед методами светорассеяния и микроскопии при изучении фракций частиц с широким размерным диапазоном [77, 103, 106, 107, 125].

Следует отметить, что теория определения гранулометрического состава методами ПФП основана на допущении о сферичности частиц, вследствие чего результаты характеризации наночастиц окружающей среды, отличающихся сложной морфологией, могут быть искажены [17].

Электронная микроскопия. Метод электронной микроскопии включает просвечивающую электронную микроскопию (ПЭМ), сканирующую электронную микроскопию (СЭМ), а также методы СЭМ, позволяющие исследовать образцы при низком вакууме или даже атмосферном давлении (atmospheric scanning electron microscopy

(ASEM) и environmental scanning electron microsсору (ESEM)). Методы СЭМ и ПЭМ широко применяют при изучении морфологии и размера частиц окружающей среды [33, 55, 72, 102, 126]. Методы ASEM и ESEM, позволяющие исследовать частицы в контролируемой газовой среде, подходят для изучения сложных полидисперсных образцов окружающей среды за счет использования более высокого давления в измерительной камере, чем в традиционных приборах СЭМ [99]. Данные методы дают возможность изучать сухие, влажные и даже жидкие образцы в исходных условиях [85]. Методами ASEM и ESEM изучают частицы образцов почв и донных отложений [85, 99].

Перечисленные методы электронной микроскопии позволяют визуализировать наночастицы, изучать морфологию и "напрямую" определять их размер без применения математических расчетов, используемых в методах ПФП и светорассеяния. Применение электронных микроскопов, оснащенных детектором энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭДС), делает возможным определение элементного состава отдельных частиц. Методы электронной микроскопии применяют для исследования сухих образцов, поэтому исходные параметры и свойства частиц, находящихся в суспензии, могут значительно изменяться из-за агрегирования частиц при высушивании [17, 111]. Следует отметить, что результаты определения гранулометрического состава исследуемой фракции могут быть неточными вследствие недостаточной представительности изучаемой пробы. Качество микрофотографий также может быть искажено из-за эффекта разрядки (в СЭМ), возникающего в непроводящих образцах, например в почвах в условиях высокого вакуума (~10⁻³ Па) [99].

Методы светорассеяния, которые включают лазерную дифракцию (ЛД, также известную как статическое светорассеяние), многоугловое светорассеяние (МУС) и динамическое светорассеяние (ДС, также известное как фотонная корреляционная спектроскопия), позволяют оценивать гранулометрический состав фракции частиц, суспендированных в жидкости [17].

Методы ЛД и МУС основаны на рассеянии анализируемыми частицами лазерного пучка. Согласно теории Фраунгофера, частицы рассеивают свет с определенной интенсивностью, которая пропорциональна их размеру, и угол рассеяния лазерного пучка уменьшается с увеличением размеров частиц и наоборот. Метод МУС обеспечивает одновременное измерение нескольких углов рассеивания [127].

В свою очередь, метод ДС основан на Броуновском движении частиц и его корреляции с размером. Частицы разного размера обладают разной скоростью движения в жидкости и рассеивают свет с разной интенсивностью. Гранулометрический состав фракций частиц определяется в результате анализа флуктуаций интенсивности рассеиваемого света согласно закону Стокса– Эйнштейна. Следует отметить, что размер частиц, найденный методом ДС, представлен в виде их гидродинамического радиуса и, следовательно, может быть больше размера частиц, полученного электронной микроскопией [127].

Методы светорассеяния широко используют для оценки гранулометрического состава и гидродинамического радиуса частиц окружающей среды в широком диапазоне размеров от нанометров до микрометров [50, 61, 71, 72, 108]. Необходимо подчеркнуть, что перечисленные методы светорассеяния могут быть использованы в онлайн и офлайн режимах с некоторым методами разделения, например ПФП [17, 111].

Капиллярный электрофорез — это метод разделения, обладающий уникальными возможностями при исследовании наночастиц окружающей среды. Он позволяет разделить наночастицы в зависимости от их электрофоретической подвижности и размера. Разделяемые частицы перемещаются в проводящей жидкости под действием приложенного электрического поля. Метод капиллярного электрофореза обладает широкими возможностями при исследовании наночастиц различной природы и позволяет изучить их поверхностные свойства: знак заряда и дзета-потенциал [23, 76, 95]. Тем не менее следует отметить ограничение метода капиллярного электрофореза, а именно небольшой объем исследуемого образца, который обычно составляет от 1 до 5 нл, в редких случаях до 20 нл, что может отразиться на представительности анализируемой пробы [111, 128].

Метод капиллярного электрофореза успешно использовали для фракционирования и характеризации наночастиц вулканического пепла [56]. Определен дзета-потенциал и устойчивость наночастиц пепла при различных pH, а также показана возможность прямого превращения электрофореграмм в размерные распределения частиц [56].

МЕТОДЫ ЭЛЕМЕНТНОГО АНАЛИЗА ЧАСТИЦ

Для оценки элементного и минерального состава наночастиц окружающей среды используют различные аналитические методы. Это – рентгеновская спектроскопия (рентгеновский энергодисперсионный микроанализ, рентгеновский дифракционный анализ), масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой, атомно-эмиссионная спектрометрию с индуктивно связанной плазмой, атомно-абсорбционная спектрометрия (**AAC**).

Рентгеновскую спектроскопию используют для оценки элементного и минерального состава материалов различной природы. Следует подчеркнуть, что данный метод широко применяют в исследованиях частиц окружающей среды [9, 29, 33, 45, 50, 65, 75].

Выше отмечено, что приставку ЭДС, которая является частью электронного микроскопа (СЭМ или ПЭМ), используют для определения элементного состава частиц окружающей среды [29-33, 45, 50, 75]. Метод СЭМ-ЭДС можно применять для изучения нано- и микрочастиц без предварительного фракционирования исходного образца [29, 75]. Метод позволяет изучать состав частиц на качественном или полуколичественном уровне, при этом возможно определение только основных элементов частиц. Метод СЭМ-ЭДС позволяет изучать отдельные частицы, что может не совсем корректно отражать состав образца в целом вследствие недостаточной представительности пробы. Таким образом, оценка элементного состава фракций частиц различного размера методом ЭДС представляет собой сложную задачу.

Рентгеновскую дифракционную спектроскопию (РДС) используют для изучения минерального состава и структуры частиц окружающей среды. Например, данным методом изучали минеральный состав фракций частиц различного размера (1–100, 100–450 и 450–2000 нм), извлеченных из образцов почв [65]. РДС также использовали при исследованиях почвенных частиц, разделенных на фракции размером <0.2 и 0.2–3 мкм [61].

Рентгеновскую флуоресцентную спектроскопию широко применяют для определения содержания As, Ba, Bi, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, Ti, Zn, Fe, K, Ca, Na, Mg, Al, Si, в образцах окружающей среды, например пыли и вулканического пепла [25–28, 46, 50, 51].

Масс-спектрометрию с индуктивно связанной плазмой широко используют для определения содержания микроэлементов (Cu, Zn, Pb, Co, Cd, Bi, Ni, Cr и др.) в наночастицах окружающей среды различной природы [6, 48, 85, 105, 108, 129].

МС-ИСП в режиме измерения единичных (отдельных) частиц (МС-ИСП-ЕЧ, англ.: single particle-ICP-MS) – относительно новый метод анализа, который применяют для изучения антропогенных наночастиц в окружающей среде [97, 105, 130]. Данный метод успешно использовали для определения наночастиц U, Zr, Th и Au в суспензиях [86-89]. В настоящее время нанотехнологии постоянно развиваются, вследствие чего непрерывно растет количество синтезируемых наночастиц и увеличивается их поступление в окружающую среду. Все это послужило причиной развития метода МС-ИСП-ЕЧ, который используют для изучения синтетических наночастиц, а также для оценки их поведения в окружающей среде [84, 90, 97, 105, 130, 131]. С помощью данного метода можно определить концентрацию наночастиц в исследуемой суспензии и их размер. Характеризация частиц основана на том, что каждый зарегистрированный импульс представляет отдельную частицу. Соответственно, частота импульсов напрямую связана с концентрацией частиц, а интенсивность каждого импульса пропорциональна массе элемента в детектируемой частице и, следовательно, ее размеру [17, 130].

Метод МС-ИСП-ЕЧ можно также использовать для определения растворимых форм элементов, содержащихся в суспензиях. Растворимая форма элемента равномерно распределена в анализируемой суспензии, поэтому масса данного элемента, вводимого в плазму в единицу времени и перемещающегося к детекторам в виде ионов, постоянна, вследствие чего в МС-ИСП-ЕЧ формируется "устойчивый" сигнал [130]. В свою очередь, в случае попадания соответствующей наночастицы в плазму масса данного элемента перестает быть однородной и представляет дискретные группы атомов [17, 130].

Тем не менее следует отметить, что метод МС-ИСП-ЕЧ обладает некоторыми ограничениями. Для определения размера исследуемых частиц необходимо учитывать их состав, плотность и форму, которые трудно определить при изучении наночастиц окружающей среды, отличающихся сложными составом и морфологией [130]. Таким образом, метод МС-ИСП-ЕЧ следует использовать в сочетании с другими методами определения размеров частиц, например СЭМ, позволяющей определять физический размер частиц и оценивать их морфологию [17, 130].

К настоящему времени метод МС-ИСП-ЕЧ применяли для характеризации и определения концентрации наночастиц Cu, TiO₂, Ag, Au, Fe₂O₃, CeO₂ в образцах окружающей среды, таких как природные воды и почвы [84, 90–92, 97, 109]. Кроме этого, метод МС-ИСП-ЕЧ использовали в сочетании с методом рентгеновской спектроскопии для оценки распределения мышьяка в коллоидных частицах почвы [79].

Атомно-эмиссионную спектрометрию с индуктивно связанной плазмой можно использовать для элементного анализа частиц окружающей среды. Методом АЭС-ИСП определяли, например, содержание макроэлементов (K, Na, Al, Ca, Fe, и Mg) во фракциях частиц различного размера, извлеченных из образцов окружающей среды (почва, пыль и вулканический пепел) [6, 9, 49, 61, 85].

Атомно-абсорбционную спектроскопию применяют для определения элементного состава частиц окружающей среды. ААС с пламенной и электротермической атомизацией используют для определения концентрации микроэлементов (Hg, Pb, Cu, Zn, Cd, Cr и т.д.) в образцах почв и городской пыли [23, 24, 33, 34, 63, 126]. ААС с пиролитической приставкой использовали для изучения распределения ртути между частицами почвы различного размера [126].

ГИБРИДНЫЕ МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ, ХАРАКТЕРИЗАЦИИ И АНАЛИЗА ЧАСТИЦ

Гибридные методы являются мощным инструментом для разделения, характеризации и/или анализа сложных полидисперсных образцов окружающей среды. Они основаны на сочетании методов разделения, характеризации и/или анализа в режиме онлайн. Применение данных методов сокращает время исследования и минимизирует погрешности, которые могут возникать на промежуточных стадиях исследования образцов. Также гибридные методы обеспечивают получение комплекса данных о наночастицах окружающей среды за счет одновременной характеризации и анализа [17, 118].

Выше отмечено, что группа методов ПФП может служить основой для создания и развития различных гибридных методов, используемых для исследования частиц окружающей среды. Возможности и особенности гибридных методов, созданных на основе ПФП, достаточно подробно рассмотрены в обзорах [23, 118, 132]. Метод ПФП можно сочетать онлайн с различными методами характеризации и анализа: спектрофотометрией, МУС, ДС, флуоресцентным детектором, АЭС-ИСП и МС-ИСП. Следует отметить, что МУС и спектрофотометрию обычно используют в гибридных методах для детектирования частиц и определения их размеров. Методы анализа в сочетании с ПФП позволяют определять содержание элементов (обычно не более 10) в разделяемых частицах.

Седиментационное ПФП в сочетании с МС-ИСП и ААС успешно использовали для изучения наночастиц окружающей среды [66, 78, 80]. В работах [66, 78] показана возможность использования гибридного метода, основанного на онлайн объединении седиментационного ПФП и МС-ИСП, при исследовании распределения Al, Si, Fe, Mg, Sr и Rb между минеральными частицами различного размера (от 0.05 до 2 мкм) и при изучении распределения Al, Si, Fe, Ba, Sr, Ti, Mg, Rb, Ce и Nd между частицами почв (от 0.08 до 1 мкм). Кроме этого, гибридный метод, основанный на онлайн соединении седиментационного ПФП и ААС с электротермической атомизацией, успешно применяли в работе [80] при исследовании распределения Al. Fe и Mg в природных частицах размером менее 0.8 мкм, отобранных в речной воде. Полученные результаты были сопоставимы с данными, полученными при онлайн сочетании селиментационного ПФП и МС-ИСП.

Широкое распространение в анализе наночастиц окружающей среды получил гибридный метод, основанный на сочетании асимметричного ПФП с поперечным потоком с МС-ИСП или АЭС-ИСП [69, 71, 72, 83, 108]. Гибридный метод, основанный на онлайн сочетании асимметричного ПФП с поперечным потоком и МС-ИСП. использовали для оценки потенциальной опасности квантовых точек (CdSe/ZnS), содержащихся в почвах [108]. Данный гибридный метод также применяли для изучения распределения урана [71, 72] и меди [83] между почвенными частицами различного размера. Гибридный метод, основанный на онлайн сочетании асимметричного ПФП с поперечным потоком и АЭС-ИСП, применяли для определения содержания Cu, Mn, Pb, Zn и Mg в частицах почвы [69]. Кроме этого, в работе [110] была показана возможность использования МС-ИСП-ЕЧ в качестве детектора в гибридных методах анализа при изучении природных частиц. Онлайн сочетание методов ПФП и МС-ИСП-ЕЧ успешно использовали для детектирования и характеризации наночастиц серебра в природных водах [110].

Гибридный метод анализа можно также реализовать на основе онлайн сочетания капиллярного электрофореза со спектрофотометрией и МС-ИСП [71, 133]. Онлайн сочетание капиллярного электрофореза с МС-ИСП успешно использовали при изучении частиц почвы размером <1 мкм [71] и при исследовании наночастиц золота [133].

ОСОБЕННОСТИ ХАРАКТЕРИЗАЦИИ И АНАЛИЗА НАНОЧАСТИЦ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Оценка результатов разделения, характеризации и анализа наночастиц окружающей среды осложнена отсутствием в настоящее время стандартных образцов природных минеральных наночастиц, создание которых является сложной и актуальной задачей [17].

При оценке результатов разделения частиц определение размеров необходимо осуществлять взаимодополняющими методами светорассеяния (ЛД, ДС и МУС) и электронной микроскопии (СЭМ и ПЭМ) (табл. 1). Следует подчеркнуть, что гранулометрический состав определяют методами светорассеяния с допущением о сферичности частиц, вследствие чего результаты определения могут быть несколько искажены. Результаты, полученные методами светорассеяния, можно подтвердить методами электронной микроскопии. Характеризация методами электронной микроскопии предоставляет точную информацию о морфологии, форме и размерах частиц за счет их визуализации.

Методы ПФП являются наиболее универсальными среди рассмотренных методов разделения, поскольку их можно использовать для одновременного разделения и характеризации наночастиц. Тем не менее теория методов ПФП также основана на некоторых допущениях, поэтому результаты разделения и характеризации должны быть подтверждены упомянутыми выше методами микроскопии и/или светорассеяния (табл. 1).

Следует также обратить внимание на метод мембранной фильтрации, который обладает определенными особенностями. Размер пор мембран можно использовать как верхнее пороговое значение гранулометрического состава частиц, пропущенных через данные поры. Мембранная фильтрация обеспечивает выделение фракции частиц размером меньше размера мембранных пор. Результаты разделения методом мембранной фильтрации, как и в случае других методов разделения, необходимо подтверждать методами микроскопии и/или светорассеяния. Следует отметить, что разделение в импакторах осуществляется в соответствии с аэродинамическим диаметром частиц, величину которого, аналогично мембранной фильтрации, можно использовать как верхнее пороговое значение гранулометрического состава частиц.

Для оценки результатов элементного анализа рекомендуется определять концентрации некоторых элементов в исследуемых наночастицах окружающей среды двумя независимыми методами анализа. Это позволит контролировать пра-

2021

вильность измерений путем статического сравнения концентраций элементов, полученных двумя независимыми методами.

* * *

Таким образом, изучение наночастиц окружающей среды необходимо как для понимания естественных геохимических процессов, так и при оценке их потенциальной опасности для человека и экосистем. В отличие от микрочастиц окружающей среды, наночастицы на сегодняшний день остаются малоизученными, что связано с рядом сложностей при их выделении и анализе. Следует подчеркнуть, что содержание наночастиц в полилисперсных образцах окружающей среды очень низкое и обычно не превышает 0.01%. Основными этапами исследования наночастиц являются их выделение из образцов окружающей среды, последующие характеризация и элементный анализ. В настоящее время унифицированная методология, которую можно использовать для изучения наночастиц окружающей среды, отсутствует. Рассмотренные выше методы разделения и анализа наночастиц обладают как преимуществами, так и ограничениями. При выборе методов разделения, характеризации и анализа необходимо учитывать различные параметры образцов окружающей среды, размер разделяемых частиц, их свойства, а также определяемые элементы. В большинстве случаев различные методы разделения, характеризации и анализа следует применять в сочетании друг с другом для достижения надежных результатов.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 20-03-00274). Исследование соответствует теме № 0116-2019-0010 ГЕОХИ РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Wilkinson K.J., Lead J.R. Environmental Colloids and Particles: Behaviour, Separation and Characterisation. San Francisco: John Wiley & Sons, 2007. P. 470.
- 2. *Buzea C., Pacheco I.I., Robbie K.* Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity // Biointerphases. 2007. V. 2. № 4. P. MR17.
- 3. ISO/TS 80004-2: Nanotechnologies, Vocabulary, Part 2: Nano-objects. International Organization for Standardization. 2015. 10 p.
- Jeevanandam J., Barhoum A., Chan Y.S., Dufresne A., Danquah M.K. Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations // Beilstein J. Nanotechnol. 2018. V. 9. № 1. P. 1050.
- 5. *Faucher S., Le Coustumer P., Lespes G.* Nanoanalytics: History, concepts, and specificities // Environ. Sci. Pollut. Res. 2018. V. 26. № 6. P. 5267.
- 6. Ermolin M.S., Fedotov P.S., Malik N.A., Karandashev V.K. Nanoparticles of volcanic ash as a carrier

for toxic elements on the global scale // Chemo-sphere. 2018. V. 200. P. 16.

- 7. Fedotov P.S., Ermolin M.S., Karandashev V.K., Ladonin D.V. Characterization of size, morphology and elemental composition of nano-, submicron, and micron particles of street dust separated using fieldflow fractionation in a rotating coiled column // Talanta. 2014. V. 130. P. 1.
- Ray P.C., Yu H., Fu P.P. Toxicity and environmental risks of nanomaterials: Challenges and future needs // J. Environ. Sci. Heal. Part C. 2009. V. 27. № 1. P. 1.
- Ermolin M.S., Fedotov P.S., Ivaneev A.I., Karandashev V.K., Burmistrov A.A., Tatsy Y.G. Assessment of elemental composition and properties of copper smelter-affected dust and its nano- and micron size fractions // Environ. Sci. Pollut. Res. 2016. V. 23. № 23. P. 2378.
- 10. *Gottschalk F., Nowack B.* The release of engineered nanomaterials to the environment // J. Environ. Monit. 2011. V. 13. № 5. P. 1145.
- Lee S., Shin S., Lee S., Seo J., Lee J., Son S., Cho H.J., Algadi H., Al-Sayari S., Kim D.E., Lee T. Ag nanowire reinforced highly stretchable conductive fibers for wearable electronics // Adv. Funct. Mater. 2015. V. 25. № 21. P. 3114.
- 12. Shi J., Kantoff P.W., Wooster R., Farokhzad O.C. Cancer nanomedicine: Progress, challenges and opportunities // Nat. Rev. Cancer. 2017. V. 17. № 1. P. 20.
- 13. *Kaur J., Kaur G., Sharma S., Jeet K.* Cereal starch nanoparticles A prospective food additive: A review // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2018. V. 58. № 7. P. 1097.
- Liu Y., Deng Y., Dong H., Liu K., He N. Progress on sensors based on nanomaterials for rapid detection of heavy metal ions // Sci. China Chem. 2017. V. 60. № 3. P. 329.
- 15. *Contado C*. Nanomaterials in consumer products: A challenging analytical problem // Front. Chem. 2015. V. 3. № 48.
- Dan Y., Shi H., Stephan C., Liang X. Rapid analysis of titanium dioxide nanoparticles in sunscreens using single particle inductively coupled plasma-mass spectrometry // Microchem. J. 2015. V. 122. P. 119.
- 17. *Ermolin M.S., Fedotov P.S.* Separation and characterization of environmental nano- and submicron particles // Rev. Anal. Chem. 2016. V. 35. № 4. P. 185.
- Coll C., Notter D., Gottschalk F., Sun T., Som C., Nowack B. Probabilistic environmental risk assessment of five nanomaterials (nano-TiO 2, nano-Ag, nano-ZnO, CNT, and fullerenes) // Nanotoxicology. 2016. V. 10. № 4. P. 436.
- Dadashazar H., Ma L., Sorooshian A. Sources of pollution and interrelationships between aerosol and precipitation chemistry at a central California site // Sci. Total Environ. 2019. V. 651. P. 1776.
- Butwin M.K., von Löwis S., Pfeffer M.A., Thorsteinsson T. The effects of volcanic eruptions on the frequency of particulate matter suspension events in Iceland // J. Aerosol Sci. 2019. V. 128. P. 99.
- Swet N., Elperin T., Kok J.F., Martin R.L., Yizhaq H., Katra I. Can active sands generate dust particles by wind-induced processes? // Earth Planet. Sci. Lett. 2019. V. 506. P. 371.

ЖУРНАЛ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ том 76 № 4 2021

- Ansmann A., Baars H., Chudnovsky A., Mattis I., Veselovskii I., Haarig M., Seifert P., Engelmann R., Wandinger U. Extreme levels of Canadian wildfire smoke in the stratosphere over central Europe on 21– 22 August 2017 // Atmos. Chem. Phys. 2018. V. 18. № 16. P. 11831.
- Acosta J.A., Gabarrón M., Faz A., Martínez-Martínez S., Zornoza R., Arocena J.M. Influence of population density on the concentration and speciation of metals in the soil and street dust from urban areas // Chemosphere. 2015. V. 134. P. 328.
- 24. Zhou Q., Zheng N., Liu J., Wang Y., Sun C., Liu Q., Wang H., Zhang J. Residents health risk of Pb, Cd and Cu exposure to street dust based on different particle sizes around zinc smelting plant, Northeast of China // Environ. Geochem. Health. 2015. V. 37. № 2. P. 207.
- 25. *Wang Q., Lu X., Pan H.* Analysis of heavy metals in the re-suspended road dusts from different functional areas in Xi'an, China // Environ. Sci. Pollut. Res. 2016. V. 23. № 19. P. 19838.
- 26. *Ahmed F., Ishiga H.* Trace metal concentrations in street dusts of Dhaka city, Bangladesh // Atmos. Environ. 2006. V. 40. № 21. P. 3835.
- Wang G., Oldfield F., Xia D., Chen F., Liu X., Zhang W. Magnetic properties and correlation with heavy metals in urban street dust: A case study from the city of Lanzhou, China // Atmos. Environ. 2011. V. 46. P. 289.
- 28. García-Rico L., Meza-Figueroa D., Jay Gandolfi A., Del Río-Salas R., Romero F.M., Meza-Montenegro M.M. Dust-metal sources in an urbanized arid zone: Implications for health-risk assessments // Arch. Environ. Contam. Toxicol. 2016. V. 70. № 3. P. 522.
- Shi Z., Krom M.D., Bonneville S., Baker A.R., Jickells T.D., Benning L.G. Formation of iron nanoparticles and increase in iron reactivity in mineral dust during simulated cloud processing // Environ. Sci. Technol. 2009. V. 43. № 17. P. 6592.
- Fujiwara F., Rebagliati R.J., Dawidowski L., Gómez D., Polla G., Pereyra V., Smichowski P. Spatial and chemical patterns of size fractionated road dust collected in a megacitiy // Atmos. Environ. 2011. V. 45. № 8. P. 1497.
- Ordóñez A., Álvarez R., De Miguel E., Charlesworth S. Spatial and temporal variations of trace element distribution in soils and street dust of an industrial town in NW Spain: 15 years of study // Sci. Total Environ. 2015. V. 524–525. P. 93.
- 32. Gunawardana C., Goonetilleke A., Egodawatta P., Dawes L., Kokot S. Source characterisation of road dust based on chemical and mineralogical composition // Chemosphere. 2012. V. 87. № 2. P. 163.
- Acosta J.A., Faz Á., Kalbitz K., Jansen B., Martínez-Martínez S. Heavy metal concentrations in particle size fractions from street dust of Murcia (Spain) as the basis for risk assessment // J. Environ. Monit. 2011. V. 13. № 11. P. 3087.
- 34. *Nazzal Y., Rosen M.A., Al-Rawabdeh A.M.* Assessment of metal pollution in urban road dusts from selected highways of the Greater Toronto Area in Canada // Environ. Monit. Assess. 2013. V. 185. № 2. P. 1847.
- 35. Padoan E., Romè C., Ajmone-Marsan F. Bioaccessibility and size distribution of metals in road dust and

roadside soils along a peri-urban transect // Sci. Total Environ. 2017. V. 601–602. P. 89.

- 36. Hofman J., Bartholomeus H., Janssen S., Calders K., Wuyts K., Van Wittenberghe S., Samson R. Influence of tree crown characteristics on the local PM 10 distribution inside an urban street canyon in Antwerp (Belgium): A model and experimental approach // Urban For. Urban Green. 2016. V. 20. № 2016. P. 265.
- 37. Ермолин М.С., Федотов П.С., Карандашев В.К., Дженлода Р.Х., Иванеев А.И., Буркат Т.В., Буркат В.С. Фракционирование, характеризация и анализ нано- и микрочастиц при оценке вклада металлургического предприятия в загрязнение городской пыли // Журн. аналит. химии. 2020. Т. 75. № 9. С. 844. (Ermolin M.S., Fedotov P.S., Karandashev V.K., Dzhenloda R.Kh., Ivaneev A.I., Burkat T.V., Burkat V.S. Fractionation, characterization, and analysis of nano- and microparticles in the estimation of the contribution of a metallurgical enterprise to the pollution of urban dust // J. Anal. Chem. 2020. V. 75. № 9. Р. 1227.)
- Eum C.H., Kim B.K., Kang D.Y., Lee S. Characterization of Asian dust using steric mode of sedimentation field-flow fractionation (Sd/StFFF) // Anal. Sci. Technol. 2012. V. 25. № 6. P. 476.
- 39. Kang D.Y., Eum C.H., Lee S. Characterization of fly ash by field-flow fractionation combined with SPLITT fractionation and compositional analysis by ICP-OES // Bull. Korean Chem. Soc. 2014. V. 35. № 1. P. 69.
- 40. Ермолин М.С., Федотов П.С., Иванеев А.И., Карандашев В.К., Федюнина Н.Н., Еськина В.В. Выделение и количественный анализ наночастиц дорожной пыли // Журн. аналит. химии. 2017. Т. 72. № 5. С. 448. (Ermolin M.S., Fedotov P.S., Ivaneev A.I., Karandashev V.K., Fedyunina N.N., Eskina V.V. Isolation and quantitative analysis of road dust nanoparticles // J. Anal. Chem. 2017. V. 72. № 5. Р. 520.)
- 41. Ermolin M.S., Fedotov P.S., Ivaneev A.I., Karandashev V.K., Fedyunina N.N., Burmistrov A.A. A contribution of nanoscale particles of road-deposited sediments to the pollution of urban runoff by heavy metals // Chemosphere. 2018. V. 210. P. 65.
- 42. *Hata M., Zhang T., Bao L., Otani Y., Bai Y., Furuuchi M.* Characteristics of the nanoparticles in a road tunnel // Aerosol Air Qual. Res. 2013. V. 13. № 1. P. 194.
- Yu K.M., Wu Y.-L., Fang K., Lin M. Particle size distribution of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in the ambient air of an electric-arc furnace-dust treatment plant // Environ. Eng. Sci. 2009. V. 26. № 12. P. 1713.
- Ooki A., Nishioka J., Ono T., Noriki S. Size dependence of iron solubility of Asian mineral dust particles // J. Geophys. Res. 2009. V. 114. P. 3202.
- 45. Geng H., Hwang H., Liu X., Dong S., Ro C.U. Investigation of aged aerosols in size-resolved Asian dust storm particles transported from Beijing, China, to Incheon, Korea, using low-Z particle EPMA // Atmos. Chem. Phys. 2014. V. 14. № 7. P. 3307.
- 46. Amato F., Pandolfi M., Moreno T., Furger M., Pey J., Alastuey A., Bukowiecki N., Prevot A.S.H., Baltensperger U., Querol X. Sources and variability of inhalable

road dust particles in three European cities // Atmos. Environ. Pergamon. 2011. V. 45. № 37. P. 6777.

- Jancsek-Turóczi B., Hoffer A., Nyírő-Kósa I., Gelencsér A. Sampling and characterization of resuspended and respirable road dust // J. Aerosol Sci. 2013. V. 65. P. 69.
- Smichowski P. Trace elements content in size-classified volcanic ashes as determined by inductively coupled plasma-mass spectrometry // Microchem. J. 2003. V. 75. № 2. P. 109.
- Ohki A., Nakajima T., Hayashi K., Taniguchi H., Haraguchi K., Takanashi H. Levels of Hg and other chemical elements in volcanic ash fall samples erupted from Mt. Sakurajima, Japan // Toxicol. Environ. Chem. 2016. V. 2248. P. 1.
- Kadar E., Fisher A., Stolpe B., Calabrese S., Lead J., Valsami-Jones E., Shi Z. Colloidal stability of nanoparticles derived from simulated cloud-processed mineral dusts // Sci. Total Environ. 2014. V. 466–467. P. 864.
- Stracquadanio M., Dinelli E., Trombini C. Role of volcanic dust in the atmospheric transport and deposition of polycyclic aromatic hydrocarbons and mercury // J. Environ. Monit. 2003. V. 5. № 6. P. 984.
- 52. Ivaneev A.I., Faucher S., Fedyunina N.N., Karandashev V.K., Ermolin M.S., Fedotov P.S., Lespes G. Reliability of the direct ICP-MS analysis of volcanic ash nanoparticles // Int. J. Environ. Anal. Chem. 2019. V. 99. № 4. P. 369.
- 53. Ермолин М.С., Федотов П.С., Карандашев В.К., Шкинев В.М. Методология выделения и элементного анализа наночастиц вулканического пепла // Журн. аналит. химии. 2017. Т. 72. № 5. С. 462. (*Ermolin M.S., Fedotov P.S., Karandashev V.K., Shkinev V.M.* Methodology for separation and elemental analysis of volcanic ash nanoparticles // J. Anal. Chem. 2017. V. 72. № 5. Р. 533.)
- 54. Shkinev V.M., Ermolin M.S., Fedotov P.S., Borisov A.P., Karandashev V.K., Spivakov B.Y. A set of analytical methods for the estimation of elemental and grain-size composition of volcanic ash // Geochem. Int. 2016. V. 54. № 13. P. 1252.
- 55. *Ivaneev A.I., Faucher S., Ermolin M.S., Karandashev V.K., Fedotov P.S., Lespes G.* Separation of nanoparticles from polydisperse environmental samples: comparative study of filtration, sedimentation, and coiled tube field-flow fractionation // Anal. Bioanal. Chem. 2019. V. 411. P. 411.
- 56. Джераян Т.Г., Ермолин М.С., Ванифатова Н.Г. Эффективность одновременного применения капиллярного зонного электрофореза и статического светорассеяния при изучении нано- и субмикрочастиц вулканического пепла // Журн. аналит. химии. 2020. Т. 75. № 1. Р. 48. (Dzherayan T.G., Ermolin M.S., Vanifatova N.G. Effectiveness of the simultaneous application of capillary zone electrophoresis and static light scattering in the study of volcanic ash nano- and submicroparticles // J. Anal. Chem. 2020. V. 75. № 1. Р. 67.)
- 57. Ivleva N.P., Huckele S., Weinzierl B., Niessner R., Haisch C., Baumann T. Identification and characterization of individual airborne volcanic ash particles by Raman microspectroscopy // Anal. Bioanal. Chem. 2013. V. 405. № 28. P. 9071.

- Imoto Y., Yasutaka T., Someya M., Higashino K. Influence of solid-liquid separation method parameters employed in soil leaching tests on apparent metal concentration // Sci. Total Environ. 2018. V. 624. P. 96.
- Liu G., Wang J., Liu X., Liu X., Li X., Ren Y., Wang J., Dong L. Partitioning and geochemical fractions of heavy metals from geogenic and anthropogenic sources in various soil particle size fractions // Geoderma. 2018. V. 312. P. 104.
- 60. Liu G., Wang J., Xue W., Zhao J., Wang J., Liu X. Effect of the size of variable charge soil particles on cadmium accumulation and adsorption // J. Soils Sediments. 2017. V. 17. № 12. P. 2810.
- Zhang H., Luo Y., Makino T., Wu L., Nanzyo M. The heavy metal partition in size-fractions of the fine particles in agricultural soils contaminated by waste water and smelter dust // J. Hazard. Mater. 2013. V. 248– 249. P. 303.
- Niyungeko C., Liang X., Liu C., Liu Z., Sheteiwy M., Zhang H., Zhou J., Tian G. Effect of biogas slurry application rate on colloidal phosphorus leaching in paddy soil: A column study // Geoderma. 2018. V. 325. P. 117.
- 63. Zirkler D., Lang F., Kaupenjohann M. "Lost in filtration"—The separation of soil colloids from larger particles // Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp. 2012. V. 399. № 399. P. 35.
- 64. Guénet H., Demangeat E., Davranche M., Vantelon D., Pierson-Wickmann A.-C., Jardé E., Bouhnik-Le Coz M., Lotfi E., Dia A., Jestin J. Experimental evidence of REE size fraction redistribution during redox variation in wetland soil // Sci. Total Environ. 2018. V. 631– 632. P. 580.
- 65. *Tsao T., Chen Y., Sheu H., Tzou Y., Chou Y., Wang M.* Separation and identification of soil nanoparticles by conventional and synchrotron X-ray diffraction // Appl. Clay Sci. 2013. V. 85 № 1. P. 1.
- 66. *Ranville J.F., Chittleborough D.J., Shanks F., Morrison R.J.S., Harris T., Doss F., Beckett R.* Development of sedimentation field-flow fractionation-inductively coupled plasma mass-spectrometry for the characterization of environmental colloids // Anal. Chim. Acta. 1999. V. 381. № 2–3. P. 315.
- 67. Santoro A., Terzano R., Medici L., Beciani M., Pagnoni A., Blo G. Colloidal mercury (Hg) distribution in soil samples by sedimentation field-flow fractionation coupled to mercury cold vapour generation atomic absorption spectroscopy // J. Environ. Monit. 2012. V. 14. № 1. P. 138.
- 68. *Gimbert L.J., Haygarth P.M., Worsfold P.J.* Application of flow field-flow fractionation and laser sizing to characterize soil colloids in drained and undrained lysimeters // J. Environ. Qual. 2008. V. 37. № 4. P. 1656.
- 69. Sangsawong S., Waiyawat W., Shiowatana J., Siripinyanond A. Field-flow fractionation: An efficient approach for matrix removal of soil extract for inductively coupled plasma optical emission spectrometry // Spectrochim. Acta B. At. Spectrosc. 2011. V. 66. № 6. P. 476.
- Serrano S., Gomez-Gonzalez M.A., O'Day P.A., Laborda F., Bolea E., Garrido F., O'Day P.A., Laborda F., Bolea E., Garrido F. Arsenic speciation in the dispers-

ЖУРНАЛ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ том 76 № 4 2021

ible colloidal fraction of soils from a mine-impacted creek // J. Hazard. Mater. 2015. V. 286. P. 30.

- Claveranne-Lamolre C., Aupiais J., Lespes G., Frayret J., Pili E., Pointurier F., Potin-Gautier M. Investigation of uranium-colloid interactions in soil by dual field-flow fractionation/capillary electrophoresis hyphenated with inductively coupled plasma-mass spectrometry // Talanta. 2011. V. 85. № 5. P. 2504.
- Claveranne-Lamolère C., Lespes G., Dubascoux S., Aupiais J., Pointurier F, Potin-Gautier M. Colloidal transport of uranium in soil: Size fractionation and characterization by field-flow fractionation-multi-detection // J. Chromatogr. A. 2009. V. 1216. № 52. P. 9113.
- 73. Катасонова О.Н., Федотов П.С., Спиваков Б.Я., Филиппов М.Н. Некоторые закономерности поведения твердых микрочастиц при их фракционировании во вращающейся спиральной колонке // Журн. аналит. химии. 2003. Т. 58. № 5. С. 529. (Katasonova O.N., Fedotov P.S., Spivakov B.Y., Filippov M.N. Behavior of solid microparticles in their fractionation on a rotating coiled column // J. Anal. Chem. 2003. V. 58. № 5. Р. 473.)
- 74. Катасонова О.Н., Федотов П.С., Карандашев В.К., Спиваков Б.Я. Применение вращающихся спиральных колонок для фракционирования частиц почвы и последовательного экстрагирования форм тяжелых металлов из илистой, пылеватой и песчаной фракций // Журн. аналит. химии. 2005. Т. 60. № 7. С. 765. (Katasonova O.N., Fedotov P.S., Karandashev V.K., Spivakov B.Y. Application of rotating coiled columns to the fractionation of soil particles and to the sequential extraction of heavy-metal species from silty, dusty, and sandy fractions // J. Anal. Chem. 2005. V. 60. № 7. P. 684.)
- Dalmora A.C., Ramos C.G., Oliveira M.L.S., Teixeira E.C., Kautzmann R.M., Taffarel S.R., de Brum I.A.S., Silva L.F.O. Chemical characterization, nano-particle mineralogy and particle size distribution of basalt dust wastes // Sci. Total Environ. 2016. V. 539. P. 560.
- 76. Assemi S., Sharma S., Tadjiki S., Prisbrey K., Ranville J., Miller J.D. Effect of surface charge and elemental composition on the swelling and delamination of montmorillonite nanoclays using sedimentation field-flow fractionation and mass spectroscopy // Clays Clay Miner. 2015. V. 63. № 6. P. 457.
- 77. Dou H., Bai G., Ding L., Li Y., Lee S. Sedimentation field-flow fractionation for characterization of citric acid-modified Hβ zeolite particles: Effect of particle dispersion and carrier composition // J. Chromatogr. A. 2015. V. 1422. P. 253.
- Murphy D.M., Garbarino J.R., Taylor H.E., Hart B.T., Beckett R. Determination of size and element composition distributions of complex colloids by sedimentation field-flow fractionation–inductively coupled plasma mass spectrometry // J. Chromatogr. A. 1993. V. 642. № 1–2. P. 459.
- Gomez-Gonzalez M.A., Villalobos M., Marco J.F., Garcia-Guinea J., Bolea E., Laborda F., Garrido F. Iron oxide-clay composite vectors on long-distance transport of arsenic and toxic metals in mining-affected areas // Chemosphere. 2018. V. 197. P. 759.

- 80. Contado C., Blo G., Fagioli F., Dondi F., Beckett R. Characterisation of River Po particles by sedimentation field-flow fractionation coupled to GFAAS and ICP-MS // Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp. 1997. V. 120. № 1–3. P. 47.
- Kuhn K.M., Neubauer E., Hofmann T., von der Kammer F., Aiken G.R., Maurice P.A. Concentrations and distributions of metals associated with dissolved organic matter from the Suwannee River (GA, USA) // Environ. Eng. Sci. 2015. V. 32. № 1. P. 54.
- Cuss C.W., Donner M.W., Grant-Weaver I., Noemberg T., Pelletier R., Sinnatamby R.N., Shotyk W. Measuring the distribution of trace elements amongst dissolved colloidal species as a fingerprint for the contribution of tributaries to large boreal rivers // Sci. Total Environ. 2018. V. 642. P. 1242.
- 83. El Hadri H., Lespes G., Chéry P., Potin-Gautier M. Asymmetric flow-field flow fractionation-multidetection coupling for assessing colloidal copper in drain waters from a Bordeaux wine-growing area // Anal. Bioanal. Chem. 2014. V. 406. № 4. P. 1111.
- Yang Y., Long C.-L., Li H.-P., Wang Q., Yang Z.-G. Analysis of silver and gold nanoparticles in environmental water using single particle-inductively coupled plasma-mass spectrometry // Sci. Total Environ. 2016. V. 563–564. P. 996.
- 85. Luo P., Morrison I., Dudkiewicz A., Tiede K., Boyes E., O'toole P., Park S., Boxall A.B.B., O'toole P., Park S., Boxall A.B.B. Visualization and characterization of engineered nanoparticles in complex environmental and food matrices using atmospheric scanning electron microscopy // J. Microsc. 2013. V. 250. № 1. P. 32.
- 86. *Degueldre C., Favarger P.-Y.* Thorium colloid analysis by single particle inductively coupled plasma-mass spectrometry. // Talanta. 2004. V. 62. № 5. P. 1051.
- Degueldre C., Favarger P.-Y., Bitea C. Zirconia colloid analysis by single particle inductively coupled plasma-mass spectrometry // Anal. Chim. Acta. 2004. V. 518. № 1–2. P. 137.
- Degueldre C., Favarger P.-Y., Rossé R., Wold S. Uranium colloid analysis by single particle inductively coupled plasma-mass spectrometry. // Talanta. 2006. V. 68. № 3. P. 623.
- 89. Degueldre C., Favarger P.-Y., Wold S. Gold colloid analysis by inductively coupled plasma-mass spectrometry in a single particle mode // Anal. Chim. Acta. 2006. V. 555. № 2. P. 263.
- 90. Hsiao I.-L., Bierkandt F.S., Reichardt P., Luch A., Huang Y.-J., Jakubowski N., Tentschert J., Haase A. Quantification and visualization of cellular uptake of TiO₂ and Ag nanoparticles: comparison of different ICP-MS techniques // J. Nanobiotechnol. 2016. V. 14. № 1. P. 50.
- 91. Donovan A.R., Adams C.D., Ma Y., Stephan C., Eichholz T., Shi H. Detection of zinc oxide and cerium dioxide nanoparticles during drinking water treatment by rapid single particle ICP-MS methods // Anal. Bioanal. Chem. 2016. V. 408. № 19. P. 5137.
- 92. Navratilova J., Praetorius A., Gondikas A., Fabienke W., Von der Kammer F., Hofmann T. Detection of engineered copper nanoparticles in soil using single parti-

<u>№</u> 4

2021

cle ICP-MS // Int. J. Environ. Res. 2015. V. 12. № 12. P. 15756.

- 93. Johnson M.E., Montoro Bustos A.R., Winchester M.R. Practical utilization of spICP-MS to study sucrose density gradient centrifugation for the separation of nanoparticles // Anal. Bioanal. Chem. 2016. V. 408. № 27. P. 7629.
- 94. Hu C., Chen Y. Uniformization of silica particles by theory directed rate-zonal centrifugation to build high quality photonic crystals // Chem. Eng. J. 2015. V. 271. P. 128.
- 95. Lee S.H., Salunke B.K., Kim B.S. Sucrose density gradient centrifugation separation of gold and silver nanoparticles synthesized using Magnolia kobus plant leaf extracts // Biotechnol. Bioprocess Eng. 2014. V. 19. № 1. P. 169.
- 96. Deng X., Xiong D., Wang H., Chen D., Jiao Z., Zhang H., Wu M. Bulk enrichment and separation of multi-walled carbon nanotubes by density gradient centrifugation // Carbon. 2009. V. 47. № 6. P. 1608.
- Wu S., Zhang S., Gong Y., Shi L., Zhou B. Identification and quantification of titanium nanoparticles in surface water: A case study in Lake Taihu, China // J. Hazard. Mater. 2020. V. 382. P. 121045.
- 98. Reed R.B., Higgins C.P., Westerhoff P., Tadjiki S., Ranville J.F. Overcoming challenges in analysis of polydisperse metal-containing nanoparticles by single particle inductively coupled plasma mass spectrometry // J. Anal. At. Spectrom. 2012. V. 27. № 7. P. 1093.
- 99. Tuoriniemi J., Johnsson A.C.J.H., Holmberg J.P., Gustafsson S., Gallego-Urrea J.A., Olsson E., Pettersson J.B.C.C., Hassellöv M. Intermethod comparison of the particle size distributions of colloidal silica nanoparticles // Sci. Technol. Adv. Mater. 2014. V. 15. № 3. P. 035009.
- 100. Kim S. T., Kim H.K., Han S.H., Jung E.C., Lee S. Determination of size distribution of colloidal TiO₂ nanoparticles using sedimentation field-flow fractionation combined with single particle mode of inductively coupled plasma-mass spectrometry // Microchem. J. 2013. V. 110. P. 636.
- Contado C., Argazzi R., Amendola V. Sedimentation field flow fractionation and optical absorption spectroscopy for a quantitative size characterization of silver nanoparticles // J. Chromatogr. A. 2016. V. 1471. P. 178.
- 102. Domingos R.F., Baalousha M.A., Ju-Nam Y., Reid M.M., Tufenkji N., Lead J.R., Leppard G.G., Wilkinson K.J. Characterizing manufactured nanoparticles in the environment: multimethod determination of particle sizes // Environ. Sci. Technol. 2009. V. 43. № 19. P. 7277.
- 103. Choi J., Kwen H.D., Kim Y.S., Choi S.H., Lee S. γ-ray synthesis and size characterization of CdS quantum dot (QD) particles using flow and sedimentation fieldflow fractionation (FFF) // Microchem. J. 2014. V. 117. P. 34.
- 104. *Cascio C., Gilliland D., Rossi F., Calzolai L., Contado C.* Critical experimental evaluation of key methods to detect, size and quantify nanoparticulate silver // Anal. Chem. 2014. V. 86. № 24. P. 12143.

- 105. Loosli F, Wang J., Sikder M., Afshinnia K., Baalousha M. Analysis of engineered nanomaterials (Ag, CeO₂ and Fe₂O₃) in spiked surface waters at environmentally relevant particle concentrations // Sci. Total Environ. 2020. V. 715. P. 136927.
- 106. Gray E.P., Bruton T.A., Higgins C.P., Halden R.U., Westerhoff P., Ranville J.F. Analysis of gold nanoparticle mixtures: A comparison of hydrodynamic chromatography (HDC) and asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4) coupled to ICP-MS // J. Anal. At. Spectrom. 2012. V. 27. № 9. P. 1532.
- 107. *Mitrano D.M., Barber A., Bednar A., Westerhoff P., Higgins C.P., Ranville J.F.* Silver nanoparticle characterization using single particle ICP-MS (SP-ICP-MS) and asymmetrical flow field flow fractionation ICP-MS (AF4-ICP-MS) // J. Anal. At. Spectrom. 2012. V. 27. № 7. P. 1131.
- 108. Faucher S., Charron G., Lützen E., Le Coustumer P., Schaumlöffel D., Sivry Y., Lespes G. Characterization of polymer-coated CdSe/ZnS quantum dots and investigation of their behaviour in soil solution at relevant concentration by asymmetric flow field-flow fractionation – multi angle light scattering – inductively coupled plasma-mass spectrometry // Anal. Chim. Acta. 2018. V. 1028. P. 104.
- 109. Lee WC.C., Lee B.T.T., Lee S.W.W.S., Hwang Y.S., Jo E., Eom I.C.C., Lee S.W.W.S., Kim S.O.O. Optimisation, evaluation and application of asymmetrical flow fieldflow fractionation with single particle inductively coupled plasma mass spectrometry (SP-ICP-MS) to characterise silver nanoparticles in environmental media // Microchem. J. 2016. V. 129. P. 219.
- 110. Huynh K.A., Siska E., Heithmar E., Tadjiki S., Pergantis S.A. Detection and quantification of silver nanoparticles at environmentally relevant concentrations using asymmetric flow field-flow fractionation online with single particle inductively coupled plasma mass spectrometry // Anal. Chem. 2016. V. 88. № 9. P. 4909.
- Fedotov P.S., Vanifatova N.G., Shkinev V.M., Spivakov B.Y. Fractionation and characterization of nano- and microparticles in liquid media // Anal. Bioanal. Chem. 2011. V. 400. № 6. P. 1787.
- 112. *Jie C., Shu X., Bian-ying F., Jian-bang W.* Purification of rectangle DNA origami by rate-zonal centrifugation // Nucl. Sci. Tech. 2015. V. 26. № 5. P. 50504.
- Nowack B., Bucheli T.D. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment // Environ. Pollut. 2007. V. 150. № 1. P. 5.
- 114. *Giddings J.C.* A New separation concept based on a coupling of concentration and flow nonuniformities // Sep. Sci. 1966. V. 1. № 1. P. 123.
- Lespes G., Gigault J., Battu S. Field Flow Fractionation. Analytical Separation Science. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2015. P. 1143.
- 116. Contado C. Field flow fractionation techniques to explore the "nano-world" // Anal. Bioanal. Chem. 2017. V. 409. № 10. P. 2501.
- 117. Bria C.R.M., Afshinnia F., Skelly P.W., Rajendiran T.M., Kayampilly P., Thomas T.P., Andreev V.P., Pennathur S., Kim R.W.S. Asymmetrical flow field-flow fraction-

ЖУРНАЛ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ том 76 № 4 2021

ation for improved characterization of human plasma lipoproteins // Anal. Bioanal. Chem. 2019. V. 411. N_{\odot} 3. P. 777.

- Lespes G., Gigault J. Hyphenated analytical techniques for multidimensional characterisation of submicron particles: A review // Anal. Chim. Acta. 2011. V. 692. № 1–2. P. 26.
- 119. *Ivaneev A.I., Ermolin M.S., Fedotov P.S., Faucher S., Lespes G.* Sedimentation field-flow fractionation in thin channels and rotating coiled columns: From analytical to preparative scale separations // Sep. Purif. Rev. 2020. P. 1.
- 120. *Ito Y*. Trends in countercurrent chromatography // Trends Anal. Chem. 1986. V. 5. № 6. P. 142.
- 121. Fedotov P.S., Ermolin M.S., Katasonova O.N. Fieldflow fractionation of nano- and microparticles in rotating coiled columns // J. Chromatogr. A. 2015. V. 1381. P. 202.
- Tsai C.J., Lin T.Y. Particle collection efficiency of different impactor designs // Sep. Sci. Technol. 2000. V. 35. № 16. P. 2639.
- 123. *Büttner H.* Size separation of particles from aerosol samples using impactors and cyclones // Part. Part. Syst. Charact. 1988. V. 5. № 2. P. 87.
- 124. *Zhao P., Feng Y., Zhu T., Wu J.* Characterizations of resuspended dust in six cities of North China // Atmos. Environ. 2006. V. 40. № 30. P. 5807.
- 125. Kato H., Nakamura A., Takahashi K., Kinugasa S. Accurate size and size-distribution determination of polystyrene latex nanoparticles in aqueous medium using dynamic light scattering and asymmetrical flow field flow fractionation with multi-angle light scattering // Nanomaterials. 2012. V. 2. № 1. P. 15.

- 126. *Zheng L., Tang Q., Fan J., Huang X., Jiang C., Cheng H.* Distribution and health risk assessment of mercury in urban street dust from coal energy dominant Huainan City, China // Environ. Sci. Pollut. Res. 2015. V. 22. № 12. P. 9316.
- 127. Xu R. Particle Characterization: Light Scattering Methods. 1st Ed. New York: Kluwer Academic Publisher, 2000. P. 410.
- 128. Rudnev A.V., Ermolin M.S., Dzherajan T.G., Vanifatova N.G., Fedotov P.S. Characterization of a hydroxyapatite suspension by capillary zone electrophoresis after fractionation in a rotating coiled column // Mendeleev Commun. 2011. V. 21. № 4. P. 212.
- 129. *Tepe N., Bau M.* Importance of nanoparticles and colloids from volcanic ash for riverine transport of trace elements to the ocean: Evidence from glacial-fed rivers after the 2010 eruption of Eyjafjallajkull Volcano, Iceland // Sci. Total Environ. 2014. V. 488–489. № 1. P. 243.
- 130. *Laborda F., Bolea E., Jiménez-Lamana J.* Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry for the analysis of inorganic engineered nanoparticles in environmental samples // Trends Environ. Anal. Chem. 2016. V. 9. P. 15.
- 131. *Meermann B., Nischwitz V.* ICP-MS for the analysis at the nanoscale A tutorial review // J. Anal. At. Spectrom. 2018. V. 33. № 9. P. 1432.
- 132. Dubascoux S., Le Hécho I., Hassellöv M., Von Der Kammer F, Potin Gautier M., Lespes G. Field-flow fractionation and inductively coupled plasma mass spectrometer coupling: History, development and applications // J. Anal. At. Spectrom. 2010. V. 25. № 5. P. 613.
- 133. Helfrich A., Brüchert W., Bettmer J. Size characterisation of Au nanoparticles by ICP-MS coupling techniques // J. Anal. At. Spectrom. 2006. V. 21. № 4. P. 431.

—— ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ ——

УДК 543.062;543.422.3;543.544.5;54.04

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИТИРЕОИДНЫХ И АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ ЦИСТЕИНА, ГЛУТАТИОНА И МЕТИОНИНА МЕТОДАМИ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ И ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

© 2021 г. А.А. Щербатых^{а, *}, М. С. Черновьянц^а

^аЮжный федеральный университет, химический факультет ул. Р. Зорге, 7, Ростов-на-Дону, 344090 Россия *e-mail: sherbatyh@sfedu.ru Поступила в редакцию 30.07.2020 г. После доработки 15.10.2020 г. Принята к публикации 24.10.2020 г.

Изучены антитиреоидные свойства серосодержащих аминокислот цистеина и метионина и трипептида глутатиона путем оценки кинетических и термодинамических параметров взаимодействия аналитов с анионными комплексами иода (I_3 и I_2Cl^-). Максимальной, сопоставимой с константами скоростей физиологических процессов, является константа скорости реакции второго порядка между цистеином и трииодидом. Антиоксидантная активность цистеина и глутатиона оценена кинетическим методом со спектрофотометрическим контролем скорости реакции с использованием реакционной константы скорости второго порядка с хромоген-радикалом 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразилом (ДФПГ) и времени реакционного полупревращения в спиртовых средах. Антиоксидантные свойства цистеина и глутатиона, проявляемые в реакции с ДФПГ, положены в основу разработки простого и чувствительного метода их количественного определения с использованием константы скорости псевдопервого порядка. Изучение реакции аналитов с хромоген-радикалом позволило оценить их антирадикальную активность средствами спектрофотометрического анализа, дополненного ВЭЖХ.

Ключевые слова: цистеин, глутатион, метионин, аминотиолы, антиоксидантная активность, антитиреоидная активность, кинетический метод со спектрофотометрическим контролем скорости реакции, высокоэффективная жидкостная хроматография со спектрофотометрическим детектированием. **DOI:** 10.31857/S0044450221040125

Цистеин и глутатион – серосодержащие аминокислоту и трипептил, присутствующие в организме в больших концентрациях (нормальное содержание цистеина в клетках составляет 30-200 мкМ, глутатиона – 1–10 мМ [1–3]). Они участвуют в синтезе белков, метаболических процессах [4, 5], служат индикаторами нарушения обмена веществ [6, 7], поддерживают постоянство редоксстатуса клетки [8, 9]. В организмах млекопитающих цистеин образуется из незаменимой кислоты метионина и заменимой аминокислоты серина. Метионин поставляет для синтеза цистеина атом серы, а серин — углеродный скелет. Конечный результат сложной последовательности реакций заключается в замене ОН-группы серина на SH-группу, получаемую от метионина, что приводит к образованию цистеина [10]. Цистеин, в свою очередь, участвует в биосинтезе глутатиона, объединяясь на первой стадии с глутаминовой кислотой в у-глутамилцистеин, который на второй стадии присоединяет фрагмент глицина [11]. Сильные антиоксидантные свойства цистеина и глутатиона лежат в основе их важнейшей функции — работе защитной системы организма для контроля оксидативного стресса [12]. При этом они реагируют со свободно-радикальными частицами и реактивными формами кислорода [4, 13, 14], окисляясь до дисульфидов [15, 16]. Метионин как синтетический предшественник цистеина также является частью антиоксидантной системы организма, поскольку от него зависит синтез и внутриклеточная концентрация цистеина и глутатиона [17].

От присутствующих в организме окислителей (таких как свободные радикалы) зависит протекание ряда важнейших физиологических процессов. Так, например, реактивные формы кислорода являются сигнальными молекулами [18, 19], участвуют в процессе мутагенного ответа [20], а также защищают клетки от патогенов [21, 22]. С другой стороны, нарушение баланса генерации и

удаления окислителей в клетках может привести к резкому росту концентрации оксидантов, что вызывает оксидативный стресс [23-25]. Этот процесс негативно влияет на метаболизм, так как приводит к неконтролируемому окислению липидов, нуклеиновых кислот и протеинов, разрушению ДНК, нарушению работы защитных ферментов, увеличивая риск развития таких заболеваний, как атеросклероз, болезнь Альцгеймера, рак, катаракта, сердечно-сосудистые заболевания и т.д. [26, 27]. Кроме того, оксидативный стресс нарушает синтез гормонов щитовидной железы и может привести к развитию в организме гипотиреоза (тиреодит Хашимото) [28, 29], либо гипертиреоза (болезнь Грейвса) [30-32]. Для регулирования концентрации окислителей и контроля оксидативного стресса клетки генерируют антиоксиданты [33]. Антиоксиданты могут отличаться друг от друга химической природой и механизмом действия [34]. Например, в качестве антиоксидантов, непосредственно взаимодействующих со свободными радикалами и прерывающих окислительную цепь, могут выступать низкомолекулярные аминотиолы, обладающие сильными восстановительными свойствами. Такими веществами являются цистеин и глутатион.

Работы по оценке антиоксидантной активности аминотиолов включают целый ряд оптических методов. Среди них метод CUPRAC (cupric reducing antioxidant capacity): с его помощью авторы работы [35] исследовали вклад цистеина и глутатиона в величину общей антиоксидантной активности (TAC, total antioxidant capacity). Для оценки уровня антиоксидантов, включая цистеин, в продуктах питания, использовали метод FRAP (ferric reducing ability of plasma) [36]. Для изучения кинетики свободно-радикальной реакции с участием цистеина и глутатиона применен метод ABTS (2,2H-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) [37].

В особую группу следует выделить методы, использующие 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразил (ДФПГ) – стабильный свободный хромоген-радикал, поглощающий излучение при 517 нм, что позволяет легко отслеживать его концентрацию в анализируемой системе [38, 39]. ДФПГ используют в качестве окислителя при моделировании оксидативного стресса in vitro и для оценки активности антиоксидантов с применением кинетических методов и ВЭЖХ со спектрофотометрическим и массспектрометрическим детектированием [40–46].

В перечисленных выше работах содержатся результаты оценки антиоксидантной активности цистеина и глутатиона, выраженные в единицах антирадикальной активности (RS), количества антиоксиданта, необходимого для уменьшения концентрации окислителя на 50% (EC_{50}) и константы скорости окислительно-восстановительного процесса (k).

Высокая реакционная активность цистеина и глутатиона по отношению к различным формам свободных радикалов [4, 14] может быть обусловлена подвижностью атома водорода тиольной группы. Интересно, что это не первый пример проявления биологической активности веществами, содержащими SH-группу, и их производными. например такими как тиоамиды. Известно, что тиоамиды также проявляют антиоксидантную активность, а кроме того, и тиреостатическую активность [46-49]. Метионин, в отличие от цистеина и глутатиона, не относится к аминотиолам, однако проявляет антиоксидантную активность по отношению к некоторым окислителям [50]. Представляет интерес оценка кинетических параметров взаимодействия метионина - синтетического предшественника цистеина с активными формами иода.

В настоящей работе впервые применен кинетический метол со спектрофотометрическим контролем скорости реакции для оценки антиоксидантной активности in vitro цистеина и глутатиона в водной и спиртовой средах. Для сравнительной оценки антирадикальной активности (RS) и расчета EC_{50} оптимизированы известные методики ВЭЖХ- и спектрофотометрического определения этих параметров [44, 51]. Цель работы – разработка методов оценки антиоксидантной активности аминотиолов, основанных на точных и належных параметрах кинетического метода. К ним относятся константа скорости (k) и время уменьшения концентрации окислителя на 50% (*T_{EC50}*). Для исследования возможной тиреостатической активности шистеина и глутатиона изучен механизм и термодинамические параметры реакции аминотиолов с молекулярным иодом (степень реакционного превращения, ω , % и энергия активации, E_a, кДж/моль). Задачей исследования была также разработка кинетического метода количественного определения цистеина и глутатиона со спектрофотометрическим контролем скорости реакции. Наряду с цистеином и глутатионом исследовали свойства серосодержащей аминокислоты метионина.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы и оборудование. В работе использовали L-цистеин, 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразил (ДФПГ) и L-метионин (Sigma-Aldrich, США) и L-глутатион (Alfa Aesar, США).

Электронные спектры поглощения соединений и значения оптической плотности записывали на спектрофотометре Cary 50, снабженном Пельтьетермостатом (Varian, США). Протолитические свойства тиольной группы аналитов исследовали с использованием иономера pH-150M с индикаторным стеклянным электродом и хлоридсеребряным электродом сравнения. Для определения степени реакционного превращения применяли иономер ЭВ-74 в режиме вольтметра. Для проведения окислительно-восстановительного титрования в качестве индикаторного электрода использовали платиновый электрод.

Точные навески препаратов взвешивали на весах специального класса точности MB 210-A (Сартогосм, Россия) с погрешностью измерения 0.0001 г.

Анализ методом ВЭЖХ проводили на жидкостном изократическом хроматографе Стайер со спектрофотометрическим детектором UVV 104 М, дегазатором DG 18, термостатом колонок TS 10 и с аналитической колонкой Phenomenex Luna 5µm C18(2) 100 Å (США) с неподвижной фазой – октадецилсиланом (C18), химически связанным силикагелем (250 × 4.6 мм, 5 мкм).

В качестве растворителей использовали этанол и изопропанол отечественного производства квалификации не ниже х. ч. после очистки двукратной перегонкой. Метанол для ВЭЖХ производства "J.T. Baker" (Avantor Performance Material, Нидерланды) применяли без дополнительной очистки.

Приготовление растворов. Для оценки значений р K_a готовили 0.100 М раствор гидроксида натрия из фиксанала и стандартизовали его титрованием 0.100 М H₂SO₄. Для оценки степени реакционного превращения аналитов с иодом готовили 0.100 М раствор тиосульфата натрия из фиксанала и стандартизовали по дихромату калия. Исходный 0.050 М раствор иода стандартизовали титрованием тиосульфатом натрия. Для изучения взаимодействия аналитов с трииодид- и дииодхлорид-анионами готовили растворы растворением точных навесок цистеина, глутатиона, метионина, иода и иодида калия, иода и хлорида натрия в деионизированной воде.

Протолитические свойства SH-группы цистеина и глутатиона. Для оценки константы диссоциации SH-группы цистеина и глутатиона методом потенциометрического титрования готовили водный раствор, содержащий 0.20 ммоль аминотиола ($V_{\rm общ} = 25.0$ мл). Для поддержания постоянной ионной силы раствора ($\mu = 0.1$) добавляли раствор KCl. Титрование проводили 0.100 M раствором NaOH при перемешивании.

Взаимодействие цистеина, метионина и глутатиона с молекулярным иодом в водном растворе изучали методом обратного потенциометрического титрования. Для этого точные навески исследуемых соединений растворяли в 25 мл дистиллированной воды, добавляли избыток трииодида калия (0.50 ммоль). В случае цистеина [52] добавляли к реакционной смеси еще 0.800 г КІ и 0.60 мл 0.100 M HCl, охлаждали в емкости со льдом. В случае метионина [53] добавляли к реакционной смеси 0.5 г KH₂PO₄, 0.2 г K₂HPO₄ и 0.200 г КІ. Реакционные смеси оставляли в темноте на 15 мин, непрореагировавший иод титровали раствором тиосульфата натрия с точно установленной концентрацией (0.100 М). Точку эквивалентности фиксировали иономером в режиме вольтметра и визуально по обесцвечиванию титруемого раствора. Проводили по четыре параллельных измерения. Степень реакционного превращения (ω , %) рассчитывали по формуле:

$$\omega = \frac{\left(c_{I_2}V_{I_2} - c_{Na_2S_2O_3}V_{Na_2S_2O_3}\right)}{v} \times 100\%, \tag{1}$$

где c_{l_2} и $c_{Na_2S_2O_3}$ – концентрации иода и тиосульфата, М; V_{l_2} и $V_{Na_2S_2O_3}$ – объемы иода и тиосульфата, мл; υ – количество вещества препарата, ммоль.

Изучение взаимодействия аналитов с анионными комплексами иода кинетическим методом. Для оценки констант скорости реакций аналитов с комплексами иода использовали изомолярные концентрации (1.0 × 10⁻⁴ M) водных растворов цистеина, глутатиона, метионина, трииодид-аниона и дииодхлорид-аниона.

Кинетические зависимости получали при 25 и 37°С (метионин), а также в диапазоне температур от 4 до 25°С (цистеин и глутатион), светопоглощение иода в составе трииодид- (351 нм) и дииодхлорид-анионов (246 нм) фиксировали с интервалом 1 с. Об антиоксидантной активности аналитов судили по величине констант скорости их взаимодействия с окислителями в водных растворах при различных температурах. Зависимость этих величин от температуры позволила оценить энергии активации исследуемых процессов.

Кинетика взаимодействия аналитов с 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразилом. Исходные 4.0×10^{-4} M растворы цистеина, глутатиона и метионина готовили растворением точных навесок в минимальном объеме 0.40 мл дистиллированной воды и разбавлением органическим растворителем (этанолом, метанолом, изопропанолом) до необходимого объема 50 мл. Исходный 4.0×10^{-4} M раствор ДФПГ готовили растворением точной навески препарата в соответствующем спирте.

Для оценки констант скорости реакций использовали растворы с одинаковыми концентрациями компонентов реакции 8.0 × 10⁻⁵ М.

Период от смешивания реагентов до начала регистрации кинетической кривой составлял 49 с. Кинетические зависимости получали при 25 и 37°С, при этом светопоглощение хромоген-радикала фиксировали с интервалом 1 мин (цистеин, метионин) и 5 мин (глутатион). Об антирадикальной активности препаратов судили по величине констант скорости реакции второго порядка $(k, M^{-1} мин^{-1})$ с хромоген-радикалом.

Оценка антирадикальной активности цистеина и глутатиона спектрофотометрическим методом в сочетании с ВЭЖХ. Исходные 4.0×10^{-4} М растворы цистеина, глутатиона и метионина готовили растворением точных навесок в минимальном объеме (0.40 мл) дистиллированной воды и разбавле-

нием органическим растворителем (этанолом, метанолом, изопропанолом) до необходимого объема 50 мл. Исходный 4.0×10^{-4} М раствор ДФПГ готовили растворением точной навески препарата в соответствующем спирте. При анализе методом ВЭЖХ все растворы фильтровали через нейлоновый фильтр с диаметром пор 0.45 мкм.

Для оценки антирадикальной активности смешивали 6.0×10^{-6} — 4.0×10^{-5} М растворы аминотиола с 8.0×10^{-5} М раствором хромоген-радикала. Реакционную смесь оставляли на 30 мин в темноте при постоянной температуре 25 или 37°С. Контрольный опыт проводили с 8.0×10^{-5} М раствором ДФПГ в соответствующем спирте.

При спектрофотометрическом анализе регистрировали электронные спектры поглощения раствора ДФПГ (контрольный опыт) и реакционной смеси при 517 нм.

О свойствах препаратов судили по величине *RS* [51], которую рассчитывали по формуле:

$$RS = \left[\frac{A_{\rm C} - A_{\rm S}}{A_{\rm C}}\right] \times 100\%,\tag{2}$$

где $A_{\rm C}$ – оптическая плотность ДФПГ в контрольном опыте, $A_{\rm S}$ – оптическая плотность ДФПГ в реакционной смеси при $\lambda_{\rm max}$ = 517 нм.

Для повышения точности результатов (например, в случае анализа сложных или окрашенных смесей) целесообразно использовать метод ВЭЖХ. Для ВЭЖХ-анализа раствор ДФПГ (контрольный опыт) или реакционную смесь вводили вручную микрошприцем в хроматографическую систему (объем петли дозатора хроматографа 20 мкл). В качестве подвижной фазы использовали смесь спирта (этанол, метанол, изопропанол) и бидистиллированной воды. Детектирование проводили при 517 нм.

О свойствах препаратов судили по величине *RS* [51], которую рассчитывали по формуле:

$$RS = \left[\frac{PA_{\rm C} - PA_{\rm S}}{PA_{\rm C}}\right] \times 100\%,\tag{3}$$

где $PA_{\rm C}$ – площадь пика, соответствующего ДФПГ на хроматограмме контрольного опыта, $PA_{\rm S}$ – площадь пика, соответствующего ДФПГ на хроматограмме реакционной смеси.

Количественное определение цистеина и глутатиона кинетическим методом. Готовили рабочие 6.0×10^{-6} —4.0 $\times 10^{-5}$ М растворы аналитов объемом 50 мл в этаноле, метаноле и изопропаноле с предварительным растворением в минимальном объеме 0.40 мл дистиллированной воды и рабочие 8.0×10^{-5} М растворы хромоген-радикала в соответствующих спиртах. В указанных интервалах концентраций уменьшение светопоглощения раствора хромоген-радикала в зависимости от времени коррелирует с концентрацией препарата в растворе (*R* в диапазоне 0.97—0.99).

Кинетические зависимости получали при 25° С, светопоглощение хромоген-радикала фиксировали с интервалом: для цистеина — 0.5 мин (этанол, метанол) и 1 мин (изопропанол), для глутатиона — 5 мин (этанол, метанол) и 2 мин (изопропанол).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Кинетика взаимодействия аналитов с 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразилом. Взаимодействие цистеина и глутатиона с хромоген-радикалом протекает согласно схеме 1:



$$2R-S=R-S-S-R$$
, где R:



Схема 1. Взаимодействие цистеина и глутатиона со свободным хромоген-радикалом 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразилом.



Рис. 1. Электронные спектры поглощения 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразила в метаноле при 37° С в присутствии равной концентрации глутатиона (8.0 × 10^{-5} М) и графическое представление уравнения (4). Электронные спектры поглощения регистрировали каждые 5 мин.

При одинаковых исходных концентрациях цистеина (глутатиона) и хромоген-радикала их взаимодействие описывается кинетическим уравнением реакции второго порядка:

$$\frac{1}{c^0 - x} = kt + \frac{1}{c^0},\tag{4}$$

где c^0 — начальная концентрация компонентов реакции, M; *x* — координата реакции, M; *t* — время, мин; *k* — константа скорости, M⁻¹ мин⁻¹.

Значения T_{EC50} (время уменьшения концентрации свободного радикала на 50%, мин) рассчитывали по формуле:

$$T_{EC50} = \frac{1}{kc^0};$$
 (5)

значения K_{RAA} (константа относительной антиоксидантной активности по отношению к стандартному антиоксиданту тролоксу) — по формуле:

$$K_{RAA} = \frac{k}{k_{\rm Tr}} \times 100\%, \tag{6}$$

где $k_{\rm Tr}$ — константа скорости окисления тролокса хромоген-радикалом, равная 6.37 × 10⁴ М⁻¹ мин⁻¹ (этанол, [46]), 4.43 × 10⁴ М⁻¹ мин⁻¹ (метанол), 3.54 × 10⁴ М⁻¹ мин⁻¹ (изопропанол).

Антиоксидантную активность аналитов оценивали, используя константу скорости k окислительно-восстановительного процесса, и для наглядности выражали через значения T_{EC50} и относительную константу K_{RAA} , сравнивая с распространенным эффективным антиоксидантом тролоксом. Последний часто используют в качестве стандарта при исследованиях свойств антиоксидантов [44, 46, 51, 54]. Указанные параметры рассчитывали по формулам (4)—(6) на основании спектрофотометрических измерений при 25 и 37°С. Снижение интенсивности собственного поглощения ДФПГ при $\lambda_{max} = 517$ нм (в этаноле $\varepsilon =$ = 9109.7 М⁻¹ см⁻¹, в метаноле $\varepsilon =$ 10238.1 М⁻¹ см⁻¹, в изопропаноле $\varepsilon =$ 9174.6 М⁻¹ см⁻¹) позволяет судить о степени протекания реакции между радикалом и антиоксидантом и рассчитать константу скорости. На рис. 1 уравнение (4) представлено в виде v = bx + a гле x = t $v = \frac{1}{2}$ b = k $a = 1/c^0$

виде y = bx + a, где x = t, $y = \frac{1}{C^0 - X}$, b = k, $a = 1/c^0$, и решено методом наименьших квадратов.

Установлено, что метионин в исследуемых условиях не реагирует с хромоген-радикалом, что, вероятно, связано с отсутствием SH-группы в молекуле метионина.

Рассчитанные кинетические параметры антиоксидантной активности цистеина и глутатиона приведены в табл. 1. Константы скорости взаимодействия аналитов с хромоген-радикалом измерены при комнатной температуре и при температуре физиологических условий (37°С). Скорость взаимодействия аминокислоты цистеина с ДФПГ выше, чем в случае трипептида глутатиона и менее подвержена влиянию температуры. С ростом температуры от 25 до 37°С константа скорости взаимодействия глутатиона с хромоген-радикалом увеличивается почти в 2 раза в этаноле, в 1.5 раза в метаноле и в 3 раза в изопропаноле. В случае же цистеина увеличение скорости взаимодействия незначительно и мало зависит от природы растворителя.

Взаимодействие тиольной группировки с хромоген-радикалом зависит также от подвижности протона при атоме серы в молекулах цистеина и глутатиона, поэтому важной характеристикой свойств аналитов могут служить значения р K_a (-SH). Значения концентрационных констант (р K_a) 8.28 и 9.05 для цистеина и глутатиона соответственно, определенные методом потенциометрического титро-

Исследуемое соединение	Растворитель	Температура, °С	k, M^{-1} мин ⁻¹	<i>K_{RAA}</i> , %	<i>T_{EC50}</i> , мин
Цистеин	C ₂ H ₅ OH	25	6.52×10^{3}	9.72	1.92
		37	7.46×10^{3}	11.08	1.68
Глутатион		25	92.7	0.14	134.79
		37	181	0.27	69.22
Цистеин	CH ₃ OH	25	4.66×10^{3}	10.53	2.68
		37	5.62×10^{3}	12.69	2.22
Глутатион		25	34.2	0.08	365.18
		37	43.3	0.10	288.88
Цистеин	(CH ₃) ₂ CHOH	25	1.28×10^{3}	3.62	9.74
		37	1.68×10^{3}	4.74	7.45
Глутатион		25	304	0.86	41.12
		37	901	2.55	13.87

Таблица 1. Кинетические параметры антиоксидантной активности цистеина и глутатиона в присутствии 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразила в равной концентрации

вания со стеклянным индикаторным электродом, хорошо согласуются со значениями 8.27 и 9.20, найденными с использованием метода Рамана [55, 56].

Кинетический метод изучения взаимодействия цистеина, глутатиона и метионина с анионными комплексами иода. Для разработки методик определения цистеина, глутатиона и метионина, а также для изучения возможности применения этих веществ в качестве антиоксидантных и антитиреоидных препаратов необходимо располагать сведениями о кинетике реакций цистеина, глутатиона и метионина с молекулярным иодом. Анализ указанных взаимодействий позволит определить степень реакционного превращения, а также оценить энергию активации процесса.

Взаимодействие цистеина, глутатиона и метионина с трииодид- и дииодхлорид-анионами при равных концентрациях компонентов реакции описывается уравнением реакции второго порядка (4) [57] согласно схеме 2:

 $KI_3+2R-SH \rightarrow 2HI+KI+2R-S^{\bullet}$, где R – остатки цистеина и глутатиона,

NITT

$$2CH_{3}-S-CH_{2}-CH_{2}-CH-C \xrightarrow{O}_{NH_{2}}^{O} + KI_{3} \longrightarrow \begin{cases} S-CH_{2}-CH_{2}-CH-C \xrightarrow{O}_{NH_{2}}^{O} + 2CH_{3}I + KI \\ S-CH_{2}-CH_{2}-CH-C \xrightarrow{O}_{NH_{2}}^{O} + OH \end{cases}$$

Схема 2. Взаимодействие цистеина, глутатиона и метионина с трииодидом калия.

Как и при изучении реакции с ДФПГ, антиоксидантную активность аналитов по отношению к анионным комплексам иода оценивали, используя константу скорости окислительно-восстановительного процесса и величину T_{EC50} . Указанные параметры рассчитывали по формулам (4), (5) на основании спектрофотометрических измерений.

Реакцию метионина с комплексами иода изучали при 25 и 37°С. Рассчитанные значения константы скорости второго порядка (k, M^{-1} мин⁻¹) составили: для трииодид-аниона 230 при 25°С и

770 при 37°С; для дииодхлорид-аниона 104 при 25°С и 199 при 37°С.

В случае цистеина и глутатиона при 37°С (физиологические условия) из-за высокой скорости реакции точная оценка константы скорости кинетическим методом затруднена. В связи с этим оптическую плотность растворов трииодид-иона ($\lambda_{max} = 351$ нм, $\varepsilon = 9964$ M⁻¹ см⁻¹) и дииодхлоридиона ($\lambda_{max} = 246$ нм, $\varepsilon = 13992$ M⁻¹ см⁻¹) измеряли в диапазоне температур от 4 до 25°С. Рассчитанные значения константы скорости окислительновосстановительного процесса позволили полу-

Ион	Цистеин	Глутатион
I_3^-	$\ln k = -9859 \left(\frac{1}{T}\right) + 48.535$ $R = 0.9872$	$\ln k = -5706 \left(\frac{1}{T}\right) + 31.689$ $R = 0.9909$
	$k (310 \text{ K}) = 1.84 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$ $E_a = 81.97 \text{ кДж/моль}$ $T_{EC50} = 5.43 \times 10^{-4} \text{ мин}$	$k (310 \text{ K}) = 5.86 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$ $E_a = 47.44 \text{ кДж/моль}$ $T_{EC50} = 1.71 \times 10^{-2} \text{ мин}$
I ₂ Cl ⁻	$\ln k = -8080 \left(\frac{1}{T}\right) + 39.622$ $R = 0.9809$	$\ln k = -3069 \left(\frac{1}{T}\right) + 22.140$ $R = 0.9948$
	$k (310 \text{ K}) = 7.72 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$ $E_a = 67.18 \text{ кДж/моль}$ $T_{EC50} = 1.30 \times 10^{-2} \text{ мин}$	$k (310 \text{ K}) = 2.07 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$ $E_a = 25.51 \text{ кДж/моль}$ $T_{EC50} = 4.83 \times 10^{-2} \text{ мин}$

Таблица 2. Кинетические параметры, температурные зависимости и энергии активации взаимодействия цистеина и глутатиона с трииодид- и дииодхлорид-ионами

чить температурные зависимости с использованием уравнения Аррениуса:

$$\ln k = -\frac{E_{\rm a}}{R} \left(\frac{1}{T}\right) + \ln A,\tag{7}$$

где k — константа скорости, M^{-1} мин⁻¹; T — температура, K; A — предэкспоненциальный множитель, M^{-1} мин⁻¹; E_a — энергия активация, Дж/моль; здесь R — универсальная газовая постоянная (8.314 Дж/(моль K)).

Из полученных температурных зависимостей рассчитали энергии активации окислительновосстановительных процессов и константы антиоксидантной активности при физиологических условиях, а также значения T_{EC50} . Результаты приведены в табл. 2. Увеличение скорости взаимодействия аналитов с комплексами иода сопровождается ростом величины энергии активации соответствующих процессов.

Таким образом, максимальной является скорость взаимодействия цистеина с трииодидом. Константа скорости этой реакции сопоставима с константами скоростей физиологических процессов [58–62]. Выполненный in vitro анализ подчеркивает роль цистеина в окислительно-восстановительных физиологических процессах, протекающих в организме.

Определена степень реакционного превращения препаратов в реакции с молекулярным иодом (ω , %) методом иодиметрического титрования в водной среде при комнатной температуре. Значения ω составили $87 \pm 1\%$ для цистеина, $100 \pm 2\%$ для глутатиона, $92 \pm 1\%$ для метионина. Очевидно, что полнота реакционного превращения мало зависит от размера молекул и наличия тиольной группы (ω метионина выше, чем аминотиола цистеина, а ω трипептида глутатиона выше, чем каждого из исследуемых пептидов).

Оценка антираликальной активности пистеина и глутатиона спектрофотометрическим методом в сочетании с ВЭЖХ. Оптимизация условий хроматографического определения. Для оптимизации значений некоторых хроматографических параметров (состав подвижной фазы, температура колонки, скорость потока элюента) оценивали время выхода ДФПГ и соотношение сигнал/шум. В качестве компонентов подвижной фазы использовали смесь (5:95, по объему) вода-органический растворитель (метанол, этанол и изопропанол), в котором готовили растворы аналитов и ДФПГ. Установлено, что оптимальными условиями хроматографического определения ДФПГ являются скорость потока элюента 1 мл/мин, температура 37°С и составе подвижной фазы спирт-вода (95:5, по объему). При этом общая продолжительность хроматографического анализа составила 5.5 мин (этанол), 6.5 мин (метанол) и 4 мин (изопропанол). Пример хроматограммы представлен на рис. 2.

Расчет значений антиоксидантной активности (*RS*) и концентрации аминотиола, необходимой для уменьшения концентрации 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразила на 50% (*IC*₅₀). Зависимость *RS* от концентрации антиоксиданта имеет линейный характер (*R* в диапазоне 0.96–0.99) в выбранном диапазоне концентраций от 6.0 × 10⁻⁶ до 2.0 × 10⁻⁵ M. На основании полученных зависимостей вида *RS* = = bc^0 + а рассчитали величины *IC*₅₀. Результаты для ВЭЖХ- и спектрофотометрического анализа приведены в табл. 3.

Можно отметить, что близкие величины IC_{50} реализуются в этаноле. При этом коэффициент корреляции зависимости $RS = f(c^0)$ в выбранном диапазоне в случае ВЭЖХ ближе к единице, чем при использовании спектрофотометрического метода.



Рис. 2. Хроматограммы 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразила в изопропаноле (*1*), этаноле (*2*) и метаноле (*3*). Состав элюента спирт—вода (95 : 5, по объему), колонка C18 (250 × 4.6 мм, 5 мкм), температура термостата колонки 37°С, концентрация 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразила 8.0 × 10⁻⁵ М.

Количественное определение цистеина и глутатиона кинетическим методом. Кинетика взаимодействия хромоген-радикала с цистеином и глутатионом при избыточной концентрации ДФПГ описывается уравнением реакции псевдопервого порядка по реагирующим компонентам:

$$\ln \frac{c^0}{c^0 - x} = kt,\tag{8}$$

где c^0 – исходная концентрация ДФПГ, М; x – координата реакции, t – время, мин; k – константа скорости, мин⁻¹.

По уравнению реакции псевдопервого порядка рассчитали константы скорости реакций цистеина и глутатиона с ДФПГ в метаноле, этаноле и изопропаноле, параметры градуировочных графиков (k = bc + a) и метрологические характеристики количественного определения цистеина и глутатиона кинетическим методом со спектрофотометрическим контролем скорости реакции (табл. 4).

Таким образом, высокая антиоксидантная активность цистеина и глутатиона по отношению к свободному хромоген-радикалу позволила разработать простой и чувствительный метод их кинетического определения.

* * *

Таким образом, в настоящей работе использованы независимые, точные и надежные методы оценки антиоксидантной активности метионина, цистеина и глутатиона, основанные на кинетических параметрах реакций аналитов с хромогенрадикалом и иодом (константа скорости k, время уменьшения концентрации окислителя на 50% T_{EC50}). Получены температурные зависимости констант антиоксидантной активности цистеина

	Спирт		ВЭЖ	κx		Спектрофотометрия					
Аналит		-	$RS = bc^0 + a$		IC on M	RS	$S = bc^0 + bc^0$	a	<i>IC</i> 50, M		
		b	а	R	- 307	b	а	R	502		
Цистеин	CH ₃ OH	8.6×10^{5}	43	0.989	8.1×10^{-6}	1.1×10^{6}	28	0.984	2.0×10^{-5}		
	C ₂ H ₅ OH	1.3×10^{6}	25	0.977	1.9×10^{-5}	1.7×10^{6}	16	0.977	2.0×10^{-5}		
	(CH ₃) ₂ CHOH	7.6×10^{5}	19	0.971	4.1×10^{-5}	6.0×10^{5}	15	0.968	5.8×10^{-5}		
Глутатион	CH ₃ OH	6.2×10^{5}	24	0.987	4.2×10^{-5}	8.1×10^{5}	4.7	0.975	5.6×10^{-5}		
	C ₂ H ₅ OH	1.7×10^{6}	-1.2×10^{-2}	0.988	2.9×10^{-5}	1.4×10^{6}	5.1	0.977	3.1×10^{-5}		
	(CH ₃) ₂ CHOH	8.0×10^{5}	7.1	0.993	5.4×10^{-5}	1.6×10^{6}	-3.1	0.964	3.2×10^{-5}		

Таблица 3. Оценка параметров функции антиоксидантной активности цистеина и глутатиона

Соелинение	Растворитель	k =	bc + a	Врелено	Найлено	R	s %	c M
Соединение	Тастворитель	b	а	выдено	паидено	Λ	5 _r ,70	Смин, 111
Цистеин	CH ₃ OH	2.0×10^{3}	2.9×10^{-4}	1.0×10^{-5}	9.8×10^{-6}	0.998	2.1	4.0×10^{-6}
Глутатион		30	1.7×10^{-4}	3.0×10^{-5}	2.8×10^{-5}	0.998	2.7	4.0×10^{-6}
Цистеин	C ₂ H ₅ OH	3.1×10^{3}	-1.0×10^{-2}	$8.0 imes 10^{-6}$	7.6×10^{-6}	0.993	0.61	5.4×10^{-6}
Глутатион		55	2.0×10^{-4}	1.8×10^{-5}	1.8×10^{-5}	0.995	2.3	5.0×10^{-6}
Цистеин	(CH ₃) ₂ CHOH	8.7×10^2	-2.4×10^{-3}	1.5×10^{-5}	1.4×10^{-5}	0.999	1.6	2.6×10^{-6}
Глутатион		2.9×10^2	-3.3×10^{-4}	1.5×10^{-5}	1.6×10^{-5}	0.994	3.9	3.6×10^{-6}

Таблица 4. Параметры градуировочных функций и результаты (М) определения цистеина и глутатиона с 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразилом в спиртовых средах

Примечание. *R* – коэффициент корреляции; *s*_r – относительное стандартное отклонение; *с*_{мин} – предел обнаружения [63].

и глутатиона по отношению к иоду в составе трииодид- и дииодхлорид-анионов, что позволило рассчитать значения энергии активации редокспроцессов при физиологических условиях (37° C). Антиоксидантные свойства цистеина и глутатиона, проявляемые ими в реакции с ДФПГ, использованы для разработки простого и чувствительного метода их количественного определения, характеризующегося высокой точностью. Интенсивное светопоглощение ДФПГ при 517 нм в спиртовых средах позволяет также оценить антиоксидантную активность средствами спектрофотометрии в сочетании ВЭЖХ. Оба метода дают сходящиеся результаты и дополняют друг друга.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Yang Y., Feng Y., Qiu F., Iqbal K., Wang Y., Song X., Wang Y., Zhang G.L., Liu W. Dual-site and dual-excitation fluorescent probe that can be turned for discriminative detection of cysteine, homocystein, and thiophenols // Anal. Chem. 2018. V. 90. № 23. P. 14048.
- Zhang S., Ong C.-N., Shen H.-M. Critical roles of intracellular thiols and calcium in parthenolide-induced apoptosis in human colorectal cancer cells // Cancer. Lett. 2004. V. 208. P. 143.
- Jung H.S., Chen X., Kim J.S., Yoon J. Recent progress in luminescent and colorimetric chemosensors for detection of thiols // Chem. Soc. Rev. 2013. V. 42. P. 6.
- Droge W., Hack V., Breitkreutz R., Holm E., Shubinski G., Schmid E., Galter D. Role of cysteine and glutathione in signal transduction, immunopathology and cachexia // BioFactors. 1998. V. 8. P. 97.
- Meister A., Anderson M. Glutathione // Annu. Rev. Biochem. 1983. V. 52. P. 711.
- Goodman M.T., McDuffie K., Hernandez B., Wilkens L.R., Selhub J. Case-control study of plasma folate, homocysteine, vitamin B₁₂, and cysteine as markers of cervical dysplasia // Cancer. 2000. V. 89. P. 376.
- Estrela J.M., Ortega A., Obrador E. Glutathione in cancer biologe and therapy // Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 2006. V. 43. P. 143.

- Jones D.P., Liang Y. Measuring the poise of thiol/disulfide couples in vivo // Free Radical Biol. Med. 2009. V. 47. № 10. P. 1329.
- Halvey P.J., Watson W.H., Hansen J.M., Go Y.-M., Samali A., Jones D.P. Compartmental oxidation of thiol– disulphide redox couples during epidermal growth factor signalling // Biochem. J. 2005. V. 386. P. 215.
- Ленинджер А. Основы биохимии: В 3-х тт. М.: Мир, 1985. С. 656.
- 11. White C.C., Viernes H., Krejsa C.M., Botta D., Kavanagh T.J. Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate-cysteine ligase activity // Anal. Biochem. 2003. V. 318. № 2. P. 175.
- 12. Valencia E., Marin A., Hardy G. Glutathione nutritional and pharmacologic viewpoints // Nutrition. 2002. V. 18. P. 291.
- 13. *Yin F., Sancheti H., Cadenas E.* Mitochondrial thiols in the regulation of cell death pathways // Antioxid. Redox Signal. 2012. V. 17. № 12. P. 1714.
- Pastore A., Federici G., Bertini E., Piemonte F. Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification // Clin. Chim. Acta. 2003. V. 333. P. 19.
- Jones D.P. Redox potential of GSH/GSSG couple: Assay and biological significance // Methods Enzymol. 2002. V. 348. P. 93.
- Toyo'oka T. Recent advances in separation and detection methods for thiol compounds in biological samples // J. Chromatogr. 2009. V. 877. P. 3318.
- Pinnen F., Cacciatore I., Cornacchia C., Sozio P., Cerasa L.S., Iannitelli A., Nasuti C., Cantalamessa F., Sekar D., Gabbianelli R., Falcioni M.L., Stefano A.D. Codrugs linking L-dopa and sulfur-containing antioxidants: New pharmacological tools against Parkinson's disease // J. Med. Chem. 2009. V. 52. P. 559.
- Sena L.A., Chandel N.S. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species // Mol. Cell. 2012. V. 48. № 2. P. 158.
- 19. *Droge W*. Free radicals in the physiological control of cell function // Physiol. Rev. 2002. V. 82. P. 47.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M., Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease // Int. J. Biochem. Cell. Biol. 2007. V. 39. P. 44.

ЖУРНАЛ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ том 76 № 4 2021

- Emre Y., Hurtaud C., Nübel T., Criscuolo F., Ricquier D., Cassard Doulcier A.-M. Mitochondria contribute to LPS-induced MAPK activation via uncoupling protein UCP2 in macrophages // Biochem. J. 2007. V. 402. P. 271.
- Kizaki T., Suzuki K., Hitomi Y., Taniguchi N., Saitoh D., Watanabe K., Onoe' K., Day N. K., Good R.A., Ohno H. Uncoupling protein 2 plays an important role in nitric oxide production of lipopolysaccharide-stimulated macrophages // PNAS. 2002. V. 99. № 14. P. 9392.
- 23. *Trachootham D., Alexandre J., Huang P.* Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: A radical therapeutic approach? // Nat. Rev. Drug Discovery. 2009. V. 8. № 7. P. 579.
- 24. *Pelicano H., Carney D., Huang P.* ROS stress in cancer cells and therapeutic implications // Drug Resist. Updates. 2004. V. 7. № 2. P. 597.
- 25. *Sies H.* Oxidative Stress: Introductory Remarks. London: Academic Press, 1985. P. 8.
- Mayne S.T. Antioxidant nutrients and chronic disease: Use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research // J. Nutr. 2003. V. 133. P. 933.
- Moriarty S.E., Shah J.H., Lynn M., Jiang S., Openo K., Jones D.P., Sternberg P. Oxidation of glutathione and cysteine in human plasma associated with smoking // Free Radical Biol. Med. 2003. V. 35. № 12. P. 1582.
- Ruggeri R.M., Vicchio T.M., Cristani M., Certo R., Caccamo D., Alibrandi A., Giovinazzo S., Saija A., Campenni A., Trimarchi F., Gangemi S. Oxidative stress and advanced glycation end products (AGEs) in Hashimoto's thyroiditis // Thyroid. 2016. V. 26. № 4. P. 504.
- 29. *Nanda N*. Oxidative stress in hypothyroidism // Int. J. Clin. Exp. Physiol. 2016. V. 3. P. 4.
- Aslan M., Cosar N., Celik H., Aksoy N., Dulger A.C., Begenik H., Soyoral Y.U., Kucukoglu M.E., Selek S. Evaluation of oxidative status in patients with hyperthyroidism // Endocrine. 2011. V. 40. P. 285.
- Marcocci C., Bartalena L. Role of oxidative stress and selenium in Graves' hyperthyroidism and orbitopathy // J. Endocrinol. Invest. 2013. V. 36. P. 15.
- Bianchi G., Solaroli E., Zaccheroni V., Grossi G., Bargossi A.M., Melchionda N., Marchesini G. Oxidative stress and anti-oxidant metabolites in patients with hyperthyroidism: Effect of treatment // Horm. Metab. Res. 1999. V. 31. P. 620.
- 33. Harris I.S., Treloar A.E., Inoue S., Sasaki M., Gorrini C., Lee K.C., Yung K.Y., Brenner D., Knobbe-Thomsen C.B., Cox M.A., Elia A., Berger T., Cescon D.W., Adeoye A., Brustle A., Molyneux S.D., Mason J.M., Li W.Y., Yamamoto K., Wakeham A., Berman H.K., Khokha R., Done S.J., Kavanagh T.J., Lam C.W., Mak T.W. Glutathione and thioredoxin antioxidant pathways synergize to drive cancer initiation and progression // Cancer Cell. 2015. V. 27. № 2. P. 211.
- Antolovich M., Prenzler P.D., Patsalides E., McDonald S., Robards K. Methods for testing antioxidant activity // Analyst. 2002. V. 127. P. 183.
- 35. *Çekiç S.D., Başkan K.S., Tütem E., Apak R.* Modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) assay for measuring the antioxidant capacities of thiol-con-

taining proteins in admixture with polyphenols // Talanta. 2009. V. 79. № 2. P. 344.

- 36. Zardo D.M., Silva K.M., Guyot S., Nogueira A. Phenolic profile and antioxidant capacity of the principal apples produced in Brazil // Int. J. Food Sci. Nutr. 2013. V. 64. № 5. P. 611.
- Valent I., Topol'ská D., Valachová K., Bujdák J., Šoltés L. Kinetics of ABTS derived radical cation scavenging by bucillamine, cysteine, and glutathione. Catalytic effect of Cu²⁺ ions // Biophys. Chem. 2016. V. 212. P. 9.
- Kovatcheva E.G., Koleva I.I., Ilieva M., Pavlov A., Mincheva M., Konushlieva M. Antioxidant activity of extracts from Lavandula vera MM cell cultures // Food Chem. 2001. V. 72. P. 295.
- Chen J.H., Ho C.-T. Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds // J. Agric. Food Chem. 1997. V. 45. P. 2374.
- Ohnishi M., Morishita H., Iwahashi H., Toda S., Shirataki Y., Kimura M., Kido R. Inhibitory effects of chlorogenic acids on linoleic acids peroxidation and haemolysis // Phytochemistry. 1994. V. 36. P. 579.
- 41. *Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C.* Use of free radical method to evaluate antioxidant activity // Lebensm.-Wiss. Technol. 1995. V. 28. P. 25.
- Bonina F., Puglia C., Tomaino A., Saija A., Mulinacci N., Romani A., Vincieri F. F. In-vitro antioxidant and in-vivo photoprotective effect of three lyophilized extracts of sedum telephium L. leaves // J. Pharm. Pharmacol. 2000. V. 52. P. 1279.
- 43. *Krings U., Berger R.G.* Antioxidant activity of some roasted foods // Food Chem. 2001. V. 72. P. 223.
- 44. Koleva I.I., Niederlander H.A.G., Beek T.A. An on-line HPLC method for detection of radical scavenging compounds in complex mixtures // Anal. Chem. 2000. V. 72. P. 2323.
- 45. Orsini F., Vovk I., Glavnik V., Jug U., Corradini D. HPTLC, HPTLC-MS/MS and HPTLC-DPPH methods for analyses of flavonoids and their antioxidant activity in Cyclanthera pedata leaves, fruits and dietary supplement // J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 2019. V. 42. P. 290.
- 46. Chernovyants M.S., Kolesnikova T.S., Karguinova A.O. Thioamides as radical scavenging compounds: Methods for screening antioxidant activity and detection // Talanta. 2016. V. 149. P. 319.
- 47. Долинкин А.О., Черновьянц М.С. Анализ гетероароматических тиоамидов-препаратов тиреостатического действия // Хим.-фарм. журн. 2010. Т. 44. № 2. С. 46.
- Chernovyants M.S., Starikova Z.A., Karguinova A.O., Kolesnikova T.S., Terznikov A.Yu. Spectroscopic and structural investigation of interaction product of 8mercaptoquinoline with molecular iodine // Spectrochim. Acta A. 2013. V. 115. P. 861.
- 49. Черновьянц М.С., Алешина Н.В. Исследование антиоксидантной активности и определение тиоамидов на основе азотсодержащих пятичленных гетероциклов кинетическим методом // Журн. аналит. химии. 2012. Т. 67. № 3. С. 253. (Chernovyants M.S., Aleshina N.V. Study on the antioxidant activity and quantification of thioamides based on ni-

trogen five-membered heterocycles by the kinetic technique // J. Anal. Chem. 2012. V. 67. № 3. P. 214.)

- Triantis T.M., Yannakopoulou E., Nikokavoura A., Dimotikali D., Papadopoulos K. Chemiluminescent studies on the antioxidant activity of amino acids // Anal. Chim. Acta. 2007. V. 591. P. 106.
- Chandrasekar D., Madhusudhana K., Ramakrishna S., Diwan P.V. Determination of DPPH free radical scavenging activity by reversed-phase HPLC: A sensitive screening method for polyherbal formulations // J. Pharm. Biomed. Anal. 2006. V. 40. № 2. P. 460.
- 52. British Pharmacopoeia Commission British Pharmacopeia. London: Stationery Office, 2008.
- 53. Государственная фармакопея СССР IX издания. М.: Медгиз, 1961. 914 с.
- Benzie I.F.F., Strain J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay // Anal. Biochem. 1996. V. 239. P. 70.
- 55. Suwandaratne N., Hu J., Siriwardana K., Gadogbe M., Zhang D. Evaluation of thiol Raman activities and pK_a values using internally referenced Raman-based pH titration // Anal. Chem. 2016. V. 88. P. 3624.
- 56. Якубке Х.-Д., Эшкайт Х. Аминокислоты, пептиды, белки. М.: Мир, 1985. 456 с.
- 57. Беликов В.Г. Фармацевтическая химия. В 2-х ч.: Учебн. пособие. М.: МЕДпресс-информ, 2007. 624 с.

- Ładyżyński P., Wójcicki J.M., Bąk M.I., Sabalinska S., Kawiak J., Foltynski P., Krzymien J., Karnafel W. Hemoglobin glycation rate constant in non-diabetic individuals // Ann. Biomed. Eng. V. 39. P. 2721.
- 59. Захарченко Н.Л., Ермакова Е.А., Зуев Ю.Ф. Влияние микроокружения трипсина на константы скорости элементарных стадий реакции гидролиза этилового эфира N-бензоил-L-аргинина // Биоорг. химия. 2008. Т. 34. № 3. С. 404. (Zakharchenko N.L., Ermakova E.A, Zuev Y.F. Effect of trypsin microenvironment on the rate constants of elementary stages of the hydrolysis reaction of N^α -benzoyl-L-arginine ethyl ester // Russ. J. Bioorg. Chem. 2008. V. 34. № 3. Р. 364.)
- 60. *Tian W.X., Tsou C.L.* Determination of the rate constant of enzyme modification by measuring the substrate reaction in the presence of the modifier // Biochemistry. 1982. V. 21. № 5. P. 1028.
- 61. *Rigg T., Taylor W., Weiss J.* The rate constant of the bimolecular reaction between hydrogen peroxide and ferrous ion // Experientia. 1954. V. 10. № 5. P. 202.
- 62. *Hargrove M.S., Barrick D., Olson J.S.* The association rate constant for heme binding to globin is independent of protein structure // Biochemistry. 1996. V. 35. № 35. P. 11293.
- 63. Булатов М.И., Калинкин И.П. Практическое руководство по фотометрическим методам анализа. Л.: Химия, 1986. 432 с.

323

— ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ —

УДК 615.07:543.544.5.068.7

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕТАМИЗОЛА НАТРИЯ С УЧЕТОМ ЕГО РАЗЛОЖЕНИЯ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ПРИ ИЗУЧЕНИИ ПРОФИЛЕЙ РАСТВОРЕНИЯ

© 2021 г. А. В. Егорова^{*a*, *}, Г. В. Мальцев^{*b*}, Ю. В. Скрипинец^{*a*}, О. Д. Войтюк^{*b*}, С. Н. Кашуцкий^{*b*}, И. В. Умецкая^{*b*}, В. П. Антонович^{*a*}

^аФизико-химический институт им. А.В. Богатского Национальной академии наук Украины

Люстдорфская дорога, 86, Одесса, 65080 Украина ^bОДО "ИНТЕРХИМ" Люстдорфская дорога, 86, Одесса, 65080 Украина *e-mail: yegorova@interchem.com.ua Поступила в редакцию 18.06.2020 г. После доработки 03.08.2020 г. Принята к публикации 20.08.2020 г.

Разработана и валидирована методика количественного ВЭЖХ-определения метамизола натрия для изучения профилей растворения лекарственного препарата ПЕНТАЛГИН IC[®], таблетки, с учетом разложения метамизола натрия в водных растворах. При изучении профилей растворения, наряду с процессом высвобождения метамизола натрия из готовой лекарственной формы, происходит его гидролиз до продукта разложения — метиламинофеназона. Реакция разложения является мономолекулярной, поэтому на хроматограммах испытуемых растворов и растворов сравнения имеются два пика, соответствующие метамизолу и метиламинофеназону. Показано, что для корректного расчета количества метамизола натрия, перешедшего в раствор из таблетки, необходимо определять его по сумме площадей обоих пиков с учетом факторов отклика детектора.

Ключевые слова: метамизол натрия, высокоэффективная жидкостная хроматография, валидация. **DOI:** 10.31857/S0044450221020055

Для подтверждения биоэквивалентности лекарственных препаратов (ЛП) проводят сравнительные фармакокинетические исследования на людях или испытания in vitro по тесту "Растворение", которые дают возможность оценить качество и эффективность препарата, а также характеризуют скорость и степень высвобождения активного вещества из пероральных лекарственных форм в модельных условиях. При установлении эквивалентности дженерики можно сравнивать со стандартом (оригинальный препарат или ЛП, признанный в качестве препарата сравнения) не только по растворению за определенный промежуток времени (по одной точке), но и по профилю растворения, получаемому по 3-6 точкам с использованием расчетных коэффициентов подобия, рекомендуемых FDA [1]. Следует отметить, что в последние годы возросло количество публикаций по изучению качества дженериков с использованием теста "Растворение" [2-5].

Определение эквивалентности *in vitro* — это испытание, предназначенное для оценки эквива-

лентности профилей растворения в трех средах со значениями рН 1.2, 4.5 и 6.8 изучаемого и референтного ЛП. При построении профилей растворения необходимо выполнять ряд условий: количество применяемых в расчете точек должно быть не менее трех; условия испытания сравниваемых лекарственных препаратов должны быть одинаковыми; отбор проб следует проводить через одинаковые промежутки времени; после достижения уровня высвобождения 85% из обоих ЛП в расчет следует принимать все точки до этого уровня и одну следующую; коэффициент вариации для первой временной точки не должен превышать 20%, для последующих -10%. Для сравнения профилей растворения использует коэффициент различия (f_1) и коэффициент подобия (f_2) . Для профилей, которые считаются подобными, значение f_1 должно быть близко к 0, а значение $f_2 - \kappa$ 100. Значение f_1 , находящееся в пределах от 0 до 15, а значение f_2 – в пределах от 50 до 100, гарантирует сходство или эквивалентность двух профилей, и, следовательно, эквивалентность фармакологиче-
ского действия испытуемого препарата и препарата сравнения [6].

Метамизол натрия (**МА** известен как "анальгин") — лекарственное средство, анальгетик и антипиретик из группы пиразолонов. Установлено, что в водных и буферных растворах происходит превращение (гидролиз) метамизола натрия до его продукта разложения метиламинофеназона (**МАФ**). Реакция разложения является мономолекулярной (схема 1) [7].



Схема 1. Схема разложения метамизола натрия.

Влияние основных факторов на скорость разложения метамизола натрия в водных растворах и способы его стабилизации изучены методом обращенно-фазовой ВЭЖХ [8–10]. Для замедления разложения метамизола натрия в анализируемых растворах рекомендуется использовать содержание ацетонитрила на уровне 30–40% (по объему) и стабилизатора (метабисульфита натрия) 1.0– 2.0 мг/мл. Стабилизация невозможна при проведении испытания "Профили растворения".

Следует отметить, что в работе [11] по изучению профилей растворения однокомпонентного препарата метамизола натрия в 0.1 М HCl методом спектрофотометрии вопросы деградации не обсуждались.

Цель данной работы — разработка и валидация методики количественного определения метамизола натрия для изучения профилей растворения лекарственного препарата ПЕНТАЛГИН IC[®] (таблетки) с учетом разложения метамизола натрия в водных растворах.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и методы. Использовали реактивы квалификации х. ч., для ВЭЖХ-анализа, бидистиллированную воду и воду для хроматографии.

Для приготовления растворов сравнения использовали вторичные рабочие стандартные образцы (**PCO**) парацетамола, кодеина фосфата гемигидрата, кофеин-бензоата натрия, фенобарбитала, метамизола натрия производства ОДО "ИНТЕРХИМ" (Украина).

Аппаратура. Хроматограммы регистрировали на жидкостном хроматографе Agilent 1260 Infinity 2D LC System с УФ-детектором. Использовали весы лабораторные электронные AUX220 (SHI- МАDZU, Япония) и магнитную мешалку ARE (VELP Scientifica, Италия). Воду для хроматографии получали с использованием системы очистки воды arium[®] pro UV/UF фирмы Sartorius. pH буферных растворов измеряли pH-метром серии Seven Easy фирмы "Mettler Toledo" (Швейцария). Пробоподготовку профилей растворения выполняли с использованием системы для определения степени растворения твердых дозированных форм ER-WEKA тип DT 1612.

Методика определения метамизола натрия. Для изучения профилей растворения используют прибор с лопастью-мешалкой. Среды растворения — 0.1 М HCl, ацетатный буферный раствор с рН 4.5, фосфатный буферный раствор с рН 6.8 [12], температура среды $37.0 \pm 0.5^{\circ}$ С, объем — 500 мл, скорость вращения лопасти — 50 об/мин, время растворения — 45 мин.

Исследуемый раствор. В цилиндрическую посуду полуавтоматического прибора с лопастьюмешалкой помещают 1 таблетку. Через 10, 15, 30, 45 мин после начала растворения пробы автоматически отбираются и фильтруются через мембранные фильтры (0.20 мкм) в пробирки емк. 10.0 мл.

Раствор сравнения. 200.0 мг РСО парацетамола, 9.5 мг РСО кодеина фосфата гемигидрата, 50.0 мг РСО кофеин-бензоата натрия, 300.0 мг РСО метамизола натрия, 10.0 мг РСО фенобарбитала помещают в мерную колбу емк. 100.0 мл, добавляют 70 мл метанола, перемешивают в течение 15 мин, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. 10.0 мл полученного раствора разбавляют до 50.0 мл соответствующей средой растворения, фильтруют через мембранный фильтр (0.20 мкм, RC). Растворы используют свежеприготовленными. Буферный раствор. 5.44 г дигидрофосфата калия помещают в мерную колбу емк. 1000.0 мл, растворяют в 900 мл воды для хроматографии и доводят объем водой для хроматографии до метки, перемешивают. Создают значение pH раствора 5.4 добавлением 0.5 М раствора КОН.

Парацетамол, кодеин основание, кофеин, метамизол натрия и фенобарбитал определяют хроматографированием на жидкостном хроматографе с УФ-детектором при следующих условиях: колонка из нержавеющей стали размером 0.15 м × × 4.6 мм, заполненная силикагелем для хроматографии октадецилсилильным с размером частиц 5 мкм (Zorbax Eclipse XDB-C₁₈); подвижная фаза A: буферный раствор-метанол (800 : 200, по объему); подвижная фаза Б: метанол; скорость подвижной фазы 2.0 мл/мин; температура колонки 30° С; детектирование при длине волны 210 нм; объем инжектируемой пробы 5 мкл.

Используют следующую программу градиента:

Время, мин	Подвижная фаза А, % (по объему)	Подвижная фаза Б % (по объему)
0-4.7	100	0
4.7-5.7	$100 \rightarrow 75$	$0 \rightarrow 25$
5.7-9	75	25
9-10	$75 \rightarrow 100$	$25 \rightarrow 0$

Предлагается после завершения программы градиента осуществлять переход на первоначальное соотношение подвижных фаз в течение 2 мин (время промывки колонки после анализа).

Хроматографируют раствор сравнения и исследуемый раствор. Хроматографическая система считается пригодной, если коэффициенты разделения пиков кофеина и метамизола, продукта разложения метамизола натрия и фенобарбитала на хроматограммах раствора сравнения составляют не менее 2.0.

Количество метамизола натрия (X, %), перешедшее в раствор из таблетки в каждой временной точке пробоотбора, вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_{1}m_{0} \times 10V_{n} \times 100P}{S_{0}\left(a - \sum_{1}^{n} b_{n}\right)100 \times 50 \times 100} = \frac{(\varphi A_{MA} + A_{MA\Phi})m_{0}V_{n}P}{(\varphi A_{0MA} + A_{0MA\Phi})\left(a - \sum_{1}^{n} b_{n}\right) \times 500},$$

где n — порядковый номер пробоотбора; S_1 — сумма площадей пиков метамизола и продукта его разложения на хроматограмме исследуемого раствора с учетом относительного молярного фактора отклика метиламинофеназона относительно метамизола натрия ($\varphi A_{MA} + A_{MA\Phi}$); φ — молярный

фактор отклика метиламинофеназона относительно метамизола натрия; $A_{\rm MA}$ – площадь пика метамизола на хроматограмме исследуемого раствора; A_{МАФ} – площадь пика метиламинофеназона на хроматограмме исследуемого раствора; S_0 – сумма площадей пиков метамизола и продукта его разложения на хроматограмме раствора сравнения с учетом молярного фактора отклика метиламинофеназона относительно метамизола натрия ($\phi A_{0MA} + A_{0MA\Phi}$); $A_{0MA} -$ площадь пика мета-мизола на хроматограмме раствора сравнения; *А*_{0МАФ} – площадь пика метиламинофеназона на хроматограмме раствора сравнения; *m*₀ – масса навески РСО метамизола натрия, мг; а – содержание метамизола натрия в одной таблетке - 300 мг; Р содержание основного вешества в РСО метамизола натрия, %; V_n – объем растворителя в *n*-ой точке пробоотбора, мл; b_n – убыль вещества при осуществлении пробоотбора, вычисляемая по формуле:

$$b_n = \frac{aX_{n-1}d \times 0.01}{V_{n-1}},$$

где d – объем аликвоты, мл (в данном случае 10.0 мл).

Таким образом, при расчете количества компонента в каждой временной точке учитывается уменьшение объема раствора и убыль вещества при пробоотборе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Специфичность методики основана на возможности достоверно определять содержание парацетамола, кодеина основания, кофеина, метамизола натрия и фенобарбитала, перешедших в раствор из таблеток, в присутствии вспомогательных веществ, что достигается путем использования внешних стандартов.

Известно, что метамизол натрия неустойчив в водных и водно-органических растворах. При изучении профилей растворения, наряду с высвобождением метамизола натрия из готовой лекарственной формы, происходит его гидролиз до продукта разложения – метиламинофеназона. Реакция разложения является мономолекулярной, поэтому на хроматограммах испытуемых растворов и растворов сравнения наблюдаются два пика, соответствующие метамизолу ($t_{\rm удерж} \approx$ ≈ 6.3 мин) и метиламинофеназону (t_{yaepx} ≈ 8.1 мин). По этой причине для корректного расчета количества метамизола натрия, перешедшего в раствор из таблетки, необходимо определять его по сумме площадей обоих пиков с учетом факторов отклика детектора.

На рис. 1—3 представлены хроматограммы исследуемых растворов на 45-ой минуте пробоотбора в различных буферных растворах.



Рис. 1. Хроматограмма исследуемого раствора в 0.1 М HCl: *1* – парацетамол, *2* – кодеин, *3* – бензоат, *4* – кофеин, *5* – метамизол, *6* – метиламинофеназон, *7* – фенобарбитал.



Рис. 2. Хроматограмма испытуемого раствора в ацетатном буферном растворе с рН 4.5. Отнесение пиков см. в подписи к рис. 1.

Методика расчета фактора отклика детектора. В растворе с исходной (аналитической) концентрацией метамизола натрия (MA) n М через некоторое время происходит накопление продукта его разложения (MAФ) с концентрацией $n_{\rm MAΦ}$, М и остается $n_{\rm MA}$, М метамизол натрия:

$$n = n_{\rm MA} + n_{\rm MA\Phi},\tag{1}$$

где n — общая исходная (аналитическая) концентрация метамизола натрия в растворе, М; $n_{\rm MA}$ — концентрация метамизола натрия в растворе после частичного разложения, М; $n_{\rm MA\Phi}$ — концентрация продукта разложения (метиламинофеназона) в растворе, М.

На хроматограмме раствора метамизола натрия имеются два пика: пик метамизола площадью $A_{\rm MA}$ и пик метиламинофеназона площадью $A_{\rm MA\Phi}$. Площади пиков прямо пропорциональны концентрациям веществ:

$$A = \chi_{\rm MA} n_{\rm MA}, \tag{2}$$

$$A = \chi_{\rm MA\Phi} n_{\rm MA\Phi}, \tag{3}$$

где χ_{MA} — молярный фактор отклика метамизола натрия, AU, с л/моль; $\chi_{MA\Phi}$ — молярный фактор отклика метиламинофеназона, AU, с л/моль.

Из уравнений (2) и (3) можно получить выражение для молярной концентрации метамизола натрия в растворе после частичного разложения:

$$n_{\rm MA} = \frac{\chi_{\rm MA\Phi}}{\chi_{\rm MA}} \frac{A_{\rm MA}}{A_{\rm MA\Phi}} n_{\rm MA\Phi} = \varphi \frac{A_{\rm MA}}{A_{\rm MA\Phi}} n_{\rm MA\Phi}, \qquad (4)$$

где $\phi = \chi_{MA\Phi} / \chi_{MA}$ — молярный фактор отклика метиламинофеназона относительно метамизола натрия.

Подставляя выражение (4) для n_{MA} в уравнение материального баланса (1), получим:

Интенсивность, mAU 500 400 300 200 100 2 0 7 1 2 3 5 6 8 9 4 Время, мин

Рис. 3. Хроматограмма исследуемого раствора в фосфатном буферном растворе с pH 6.8. Отнесение пиков см. в подписи к рис. 1.

$$n = \left(\varphi \frac{A_{\rm MA}}{A_{\rm MA\Phi}} + 1\right) n_{\rm MA\Phi}.$$
 (5)

Раствор сравнения метиламинофеназона готовят из раствора метамизола натрия с известной концентрацией $n_{PCO MA}$ (M) и подвергают деструкции до исчезновения пика метамизола [13]. Тогда концетрация метиламинофеназона n_{PCO} _{MAФ} (M) в растворе сравнения:

$$n_{\rm PCO MA\Phi} = n_{\rm PCO MA} = n_0. \tag{6}$$

Концентрацию метиламинофеназона можно найти из площадей пиков метиламинофеназона на хроматограммах испытуемого раствора и раствора сравнения:

$$n_{\rm MA\Phi} = \frac{A_{\rm MA\Phi}}{A_0} n_0, \tag{7}$$

где A_0 — площадь пика метиламинофеназона на хроматограмме раствора сравнения.

Подставляя выражение (7) в выражение (5), получим:

$$n = \left(\frac{\varphi A_{\rm MA} + A_{\rm MA\Phi}}{A_0}\right) n_0. \tag{8}$$

Разделив левую и правую части уравнения (8) на молярную массу метамизола натрия, получим выражение для концентрации метамизола натрия в испытуемом растворе, выраженную в г/л или в мг/мл:

$$c = \left(\frac{\phi A_{\rm MA} + A_{\rm MA\Phi}}{A_0}\right) c_0. \tag{9}$$

Выражение (9) можно использовать для расчета молярного фактора отклика метиламинофеназона относительно метамизола натрия. Для этого выражение (9) следует представить в виде:

$$\frac{cA_0}{c_0A_{\rm MA\Phi}} = \varphi \frac{A_{\rm MA}}{A_{\rm MA\Phi}} + 1.(10) \tag{10}$$

Для определения φ готовили серию растворов метамизола натрия различных концентраций c_i и растворы поочередно хроматографировали. Затем строили зависимость, для которой на оси абсцисс откладываются значения $A_{MA_i}/A_{MA\Phi_i}$ (X), на оси ординат – значения $c_i A_0/c_0 A_{MA\Phi_i}$ (Y). Полученные данные аппроксимировали прямолинейной зависимостью Y = a + bX. Значение относительного молярного фактора отклика метиламинофеназона φ определяли как угловой коэффициент этой линейной зависимости (табл. 1).

Таблица 1. Параметры градуировочных графиков для различных сред растворения (*n* = 5)

	Y = a	+ bX	14
Среда растворения	а	b	,
0.1 M HCl	0.969 ± 0.004	0.839 ± 0.047	0.99536
Ацетатный буферный раствор с рН 4.5	0.952 ± 0.028	0.833 ± 0.007	0.99989
Фосфатный буферный раствор с рН 6.8	1.128 ± 0.113	0.857 ± 0.015	0.99951

600

Масса навески и. мг	Площадь пика метамизола	Площадь пика метиламинофеназона на	φ <i>A</i> _{0MA} +	$-A_{0MA\Phi}$
	на хроматограмме, $A_{0\mathrm{MA}}$	хроматограмме, $A_{0 MA\Phi}$	$\phi = 1$	$\phi = 0.857$
300.0	2065.97	1003.95	3069.92	2774.19
	2050.20	1022.40	3072.60	2779.12
Среднее значение			3071.26	2776.65
<i>s</i> _r , %			0.06	0.13

Таблица 2. Значения площадей пиков метамизола и метиламинофеназона на хроматограммах раствора сравнения

Таблица 3. Проверка правильности и прецизионности

	$\phi = 1$			$\phi = 0.857$	
введено, мг	найдено, мг	Z^*	введено, мг	найдено, мг	Z*
30.0	28.2	93.84	30.0	30.1	100.43
60.0	54.8	91.31	60.0	58.2	96.93
90.0	84.7	94.14	90.0	89.4	99.36
150.0	143.1	95.43	150.0	149.0	99.36
240.0	233.7	97.36	240.0	239.2	99.69
270.0	264.4	97.92	270.0	269.9	99.97
300.0	296.2	98.72	300.0	301.4	100.48
330.0	328.1	99.43	330.0	332.7	100.81
390.0	387.8	99.44	390.0	390.1	100.03
$\overline{Z}, \%$		96.40			99.67
s, %		2.86			1.14
$\Delta_Z = 1.86s, \%$		5.32			2.13
Критерий: $\Delta_Z \leq 3\%$		Не соответствует			Соответствует
$\delta = \left \overline{Z} - 100 \right , \%$		3.60			0.33
Статистический крит	герий: $\delta \leq \frac{\Delta_Z}{\sqrt{n}} = 1.77$	Не соответствует			Соответствует
Практический крите	рий: δ ≤ 0.96	Не соответствует			Соответствует

* Z = (найдено/введено) × 100%.

φ	= 1	φ=0	0.857
$X_i, \%$	$Y_i, \%$	$X_i, \%$	$Y_i, \%$
10.00	9.38	10.00	10.04
20.00	18.26	20.00	19.39
30.00	28.24	30.00	29.81
50.00	47.72	50.00	49.68
80.00	77.89	80.00	79.75
90.00	88.13	90.00	89.97
100.00	98.72	100.00	100.48
110.00	109.38	110.00	110.89
130.00	129.27	130.00	130.04

Таблица 4. Значения нормализованных координат для проверки линейности

Рассчитанные значения относительного молярного фактора отклика метиламинофеназона ф в различных буферных растворах составили 0.839 — в 0.1 M HCl, 0.833 — в ацетатном буферном растворе с pH 4.5, 0.857 — в фосфатном буферном растворе с pH 6.8. Полученные значения ф близки между собой, но значимо отличаются от единицы.

Проверка линейности, правильности и прецизионности определения метамизола натрия в фосфатном буферном растворе с pH 6.8. Результаты проверки представлены в табл. 2–5.

Для проверки линейности вводят нормализованные координаты:

$$X_{i} = \frac{m_{i}}{m_{0}} \times 100\%, \quad Y_{i} = \frac{\phi A_{i \text{ MA}} + A_{i \text{ MA}\Phi}}{\phi A_{0 \text{ MA}} + A_{0 \text{ MA}\Phi}} \times 100\%.$$
(11)

ЖУРНАЛ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ том 76 № 4 2021

Параметр	Знач	ение	Критерий	Выв	од
Параметр	$\phi = 1$	$\phi = 0.857$	незначимости	$\phi = 1$	$\phi = 0.857$
a	1.73	0.42	≤1.07	Не соответствует	Соответствует
b	1.0041	1.0062			
1 - b	0.0041	0.0062	≤0.0157	Соответствует	Соответствует
S_0	0.67	0.38	≤1.58	Соответствует	Соответствует
r	0.99989	0.99997	≥0.99932	Соответствует	Соответствует
r^2	0.99979	0.99993	≥0.96305	Соответствует	Соответствует
ПО, %	1.469	0.837	≤10.67	Соответствует	Соответствует
ПКО, %	4.408	2.512	≤32	Соответствует	Соответствует

Таблица 5. Значения параметров линейности и их соответствие критериям приемлемости

Полученные несоответствия при проверке линейности и правильности ($\phi = 1$) связаны с тем, что не были учтены относительные молярные факторы отклика метиламинофеназона. В случае учета фактора отклика детектора ($\phi = 0.857$) валидационные характеристики методики удовлетворяют соответствующим критериям приемлемости (табл. 3–5).

* * *

Таким образом, разработана и валидирована ВЭЖХ-методика количественного определения метамизола натрия для изучения профилей растворения лекарственного препарата ПЕНТАЛ-ГИН IC[®] (таблетки) с учетом разложения метамизола натрия в водных растворах. Определены относительные молярные факторы отклика продукта разложения метамизола натрия метиламинофеназона в различных буферных растворах. На примере результатов, полученных в фосфатном буфере с рН 6.8, проведена проверка линейности, правильности и прецизионности определения метамизола натрия. Показано, что без учета фактора отклика детектора валидационные характеристики методики не удовлетворяют соответствующим критериям приемлемости.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. U.S. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for industry: Waiver of *in vivo* bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a Biopharmaceutics Classification System. 2017. www. fda.gov/downloads/Drugs/Guidance (12.26.2017).
- Medina J.R., Salazar D.K., Hurtado M., Cortes A.R., Dominguez-Ramirez A.M. Comparative in vitro dissolution study of carbamazepine immediate-release products using the USP paddles method and the flow-through cell system // Saudi Pharm. J. 2014.V. 22. P. 141. https://doi.org/10.1016/j.jsps.2013.02.001
- 3. *Hassouna M.E.M., Issa Y.M., Zayed A.G.* A comparative study of the in-vitro dissolution profiles of paracetamol and caffeine combination in different formulations using

HPLC // J. Appl. Pharm. Sci. 2012. V. 2. № 5. P. 52. https://doi.org/10.7324/JAPS.2012.2531

- 4. Шамаль Л.Л., Шохин И.Е., Ярушок Т.А., Савченко А.Ю. Тест сравнительной кинетики растворения для стратегически значимого противоопухолевого лекарственного средства – темозоломида // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2012. Т. 2. № 3. С. 54.
- Василенко Г.Ф., Раменская Г.В., Шохин И.Е., Малашенко Е.А. Оценка возможности замены исследований биоэквивалентности in vivo на изучение сравнительной кинетики эквивалентности in vitro (процедура "Биовейвер") при определении взаимозаменяемости лекарственных средств ("Дженериков") // Хим.-фарм. журн. 2011. Т. 2. С. 46.
- 6. *Guidance on the Investigation of Bioequivalence*. European Medicines Agency (EMA). Committee for Medicinal Products of Human Use (CHMP). 2010.
- 7. *Мкртичян М.А.* Фотометрическое исследование водных растворов метамизола натрия // Уч. зап. Ереванского гос. ун-та. 2010. Т. 2. С. 24.
- 8. Голубицкий Г.Б., Коспарной А.В., Будко Е.В., Иванов В.М., Басова Е.М. Разложение анальгина в водно-ацетонитрильных растворах // Журн. аналит. химии. 2006. Т. 61. № 10. С. 1081.
- 9. Голубицкий Г.Б., Будко Е.В., Иванов В.М. Количественный анализ таблеток "Пенталгин Н" методами градиентной и изократической высокоэффективной жидкостной хроматографии // Журн. аналит. химии. 2006. Т. 61. №1. С. 74.
- 10. Голубицкий Г.Б., Басова Е.М., Иванов В.М. Влияние нагрузки на колонку на правильность результатов анализа таблеток "Пенталгин Н" методом градиентной высокоэффективной жидкостной хроматографии // Журн. аналит. химии. 2008. Т. 63. № 3. С. 279.
- 11. *Giordani M.A., de Melo E.B.* Comparative study of the pharmacopeial quality and dissolution profiles of generic and other drug forms of sodium metamizole (dipyrone) sold in Brazil // Rev. Ciênc. Farm. Basica Apl. 2012. V. 33. № 3. P. 347.
- Державна Фармакопея України / Державне підприємство "Науково-експертний фармакопейний центр". 1-е вид. Доповнення 2. Харків: Державне підприємство "Науково-експертний фармакопейний центр", 2008. 620 с.
- 13. *Мелентьева Г.А.* Фармацевтическая химия. М: Медицина, 1976. С. 398.

—— ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ ——

УДК 543.544.5:661.7:66.093.(41/43)

ОСОБЕННОСТИ ОБРАЗОВАНИЯ И ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ДЕТЕКТИРОВАНИЯ ГИДРАТОВ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

© 2021 г. И. Г. Зенкевич^{а,} *, Д. А. Никитина^а, А. Деруиш^а

^аСанкт-Петербургский государственный университет, Институт химии Университетский просп., 26, Санкт-Петербург, 198504 Россия *e-mail: izenkevich@yandex.ru Поступила в редакцию 17.10.2020 г.

После доработки 15.11.2020 г. Принята к публикации 15.11.2020 г.

Образование гидратов неорганических соединений хорошо известно и широко обсуждается в современной литературе. Проанализированы причины недостаточно подробной характеристики не менее многочисленных известных гидратов органических соединений, главная из которых заключается в их нестабильности. Подтверждением интереса к таким гидратам можно считать присвоенные многим из них номера CAS. Показано, что обратимое образование гидратов органических соединений различной химической природы может быть одной из причин аномалий зависимостей их параметров удерживания (t_R) от содержания органического модификатора элюента (c) в обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. Наиболее эффективным способом выявления подобных аномалий является рекуррентная аппроксимация параметров удерживания, $t_R(c + \Delta c) = at_R(c) + b$ (*), где $\Delta c = \text{const} - \text{постоянный шаг изменения } c$. Для соединений, у которых вариации c и, следовательно, содержания воды в элюенте (1 - c) влияют на положение равновесия $X + nH_2O \rightleftharpoons X \cdot nH_2O$, наблюдаются отклонения зависимостей вида (*) от линейности.

Ключевые слова: органические соединения, гидраты, высокоэффективная жидкостная хроматография, аномалии параметров удерживания, рекуррентная аппроксимация. DOI: 10.31857/S0044450221040174

Образование гидратов (в общем случае – сольватов) неорганическими соединениями (прежде всего, солями) в кристаллическом состоянии и в водных растворах хорошо известно [1]. Многие неорганические гидраты могут быть выделены в индивидуальном состоянии и охарактеризованы различными методами. Что же касается ковалентно не связанных гидратов различных органических соединений ($X \cdot nH_2O$), то они не менее многочисленны, но характеристика таких соединений чаще всего осложнена их относительно низкой стабильностью:

$$X + nH_2O \rightleftharpoons X \cdot nH_2O.$$
(1)

В сочетании с малой растворимостью гидрофобных органических соединений в водных средах подтверждение образования подобных гидратов может стать сложной задачей.

В справочной литературе (см., например, издания [2–5] и др.) возможность образования гидратов обычно не упоминают в ряду других свойств органических соединений. Более того, их образование относительно редко принимают во внимание даже в тех случаях, когда это представляется безусловно необходимым, в том числе в обращенно-фазовой ВЭЖХ. Обычно (по умолчанию) в этом аналитическом методе аналитам приписывают структуры безводных форм, несмотря на то, что на выходе хроматографической колонки они являются компонентами водно-органических растворов и могут существовать в форме гидратов. Поскольку свойства полярных гидратов существенно отличаются от свойств менее полярных негидратированных аналогов, их обратимое образование может быть одной из главных причин аномалий хроматографического удерживания аналитов в обращенно-фазовой ВЭЖХ. Этим же объясняется относительно невысокая эффективность предсказания параметров удерживания в этом методе по расчетным значениям факторов гидрофобности негидратированных форм (lgP) [6]. Кроме того, вариации содержания гидратной воды в составе веществ приводят к закономерному межлабораторному разбросу значений их растворимости в воде, что необходимо учитывать при обработке данных [7]. Небезынтересным примером несколько "пренебрежительного" отношения к гидратам органических соединений является отсутствие соответствующей им рубри-

Тривиальное название, CAS №	Молекулярная формула	Структурная формула
Гефитиниб (I) (Gefitinib) CAS № 184475-35-2	C ₂₂ H ₂₄ ClFN ₄ O ₃	CH ₃ O N O HN Cl F
Пазопаниб (II) (Pazopanib) CAS № 444731-52-6	$C_{21}H_{23}N_7O_2S$	$H_{3}C$ O $H_{2}N$ O $H_{2}N$ O $H_{2}N$ O H

Таблица 1. Модельные аналиты для характеристики зависимостей параметров удерживания от содержания органического компонента элюента

кации в Универсальной десятичной классификации (УДК).

Несмотря на относительно редкое упоминание гидратов органических соединений, в настоящее время их образование известно или предполагается для большого числа соединений различной химической природы. Их наиболее объективной характеристикой являются константы гидратации, $K_{равн}$, но из-за экспериментальных сложностей они определены лишь для небольшого числа соединений [8]:

$$K_{\text{равн}} = [\mathbf{X} \cdot n\mathbf{H}_2\mathbf{O}] / \{ [\mathbf{X}] \cdot [\mathbf{H}_2\mathbf{O}]^n \}.$$
(2)

Если значения $K_{\text{равн}} \ll 1$, то присутствием гидратов в растворах чаще всего можно пренебречь, но если $K_{\text{равн}} \gg 1$, то пренебречь можно уже наличием безводных форм аналитов.

Образование гидратных форм аналитов в обращенно-фазовой ВЭЖХ может приводить к аномалиям зависимостей их параметров удерживания (t_R) от содержания органического компонента (*c*) в элюенте, $t_{\rm R} = f(c)$. Недавно показано, что выявление подобных аномалий возможно в результате рекуррентной аппроксимации указанных зависимостей [9, 10]. Однако для лучшего понимания возможностей такого способа обработки данных необходимо более детальное рассмотрение общих вопросов образования гидратов органических соединений, что и является одной из задач настоящей работы. Особенности рекуррентной аппроксимации параметров удерживания в ВЭЖХ подробно рассмотрены на примере двух лекарственных препаратов противоопухолевого действия.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выбор модельных аналитов. Для характеристики зависимостей параметров удерживания от содержания органического компонента элюента (ацетонитрил) выбраны два препарата противоопухолевого действия с тривиальными названиями гефитиниб (I) и пазопаниб (II) (табл. 1), выпускаемые ЗАО "Биокад" (Санкт-Петербург).

Хроматографическое определение соединений (I) и (II) выполняли на жидкостном хроматографе Agilent 1260 Infinity с диодно-матричным детектором с использованием колонок InfinityLab-Poroshell 120 EC-C18, 50 × 3.0 мм, размер частиц сорбента 2.7 мкм (для соединения I) и XBridge, WatersPhenvl. 50×4.6 мм (3.5 мкм) (для соединения II) в водно-ацетонитрильных подвижных фазах с добавками ацетата аммония или муравьиной и трифторуксусной кислот в нескольких изократических режимах с интервалами концентраций органического компонента 5% при расходе элюента 0.4 мл/мин и температуре колонки 40°С. Объем проб составлял 5 мкл. Число параллельных измерений времен удерживания - три. Более обширный набор соединений охарактеризован в работе [10].

Обработка результатов. Для рекуррентной аппроксимации данных и построения графиков регрессионных уравнений использовали программное обеспечение ORIGIN (версии 4.1 и 8.1).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Общие особенности образования гидратов органических соединений. Реальные структуры многих природных и синтетических органических соединений в водных растворах не всегда соответствуют их номинальным структурным формулам, что обусловлено несколькими причинами, в том числе образованием гидратов аналитов и изменением положения таутомерных равновесий. Для характеристики проблемы целесообразно начать ее обсуждение с многообразия органических соединений, для которых существование гидратов предполагается или доказано.

Обсуждаемая информация систематизирована в табл. 2 и 3. В табл. 2 перечислены 52 соединения (без учета дополнительных сведений в примечании), гидраты которых в водных растворах нестабильны. Для каждого из соединений указаны молекулярная масса безводной формы, номер CAS и некоторые наиболее характеристические свойства (прежде всего, температуры плавления, $T_{пл}$, и кипения, $T_{\text{кип}}$), а для гидратов – номер CAS (при наличии), стехиометрический состав (количество связанных молекул воды) и (редко) некоторые дополнительные данные. В последней графе "Источники информации" приведены доступные ссылки на оригинальные публикации, однако из-за их ограниченного количества в большинстве случаев указаны лишь названия сайтов, где упомянуты те или иные гидраты. Расположение соединений соответствует различным классам органических соединений, а именно ароматическим углеводородам, карбонильным соединениям, фенолам, карбоновым кислотам, амидам кислот и далее (без специальной систематизации) соединениям различной химической природы. Кроме того, в табл. 2 для сравнения упомянуты несколько соединений близкой химической природы (3,4-дихлорфенол, салициловая кислота, теобромин и диметилсульфон), для которых сведений об образовании гидратов найти не удалось.

Представленные в табл. 2 нестабильные гидраты по объективным причинам не могут быть охарактеризованы значениями каких-либо физикохимических свойств. По этой причине в графе "Состав" указаны только стехиометрические соотношения компонентов гидрата и, в отдельных случаях, особенности их состава (например, факт образования гидратов олигомеров) и (для пяти их приведенных примеров) константы равновесия [уравнение (2)]. Напротив, в табл. 3 приведены примеры стабильных гидратов органических соединений, что позволяет определять их физикохимические характеристики, прежде всего, Т_{плавл} и T_{кип}. Во многих случаях (8 из 14) они образуются в результате нуклеофильного присоединения воды к карбонильным группам.

Сравнительная характеристика данных табл. 2 позволяет заключить, что наиболее информативным критерием подтверждения предположений о существовании гидратов органических соединений представляется наличие соответствующих им номеров CAS (иногда таких номеров несколько). Для 21 из 52 соединений существование гидратов предполагается, но номера CAS им не присвоены. Необходимо заметить, что наличие таких номеров не является критерием выделения гидратов в виде индивидуальных веществ; они могут существовать как нестабильные компоненты растворов в состоянии динамического равновесия (1) со своими безводными формами и растворителем (вода). Для сравнения можно привести еще несколько примеров нестабильных органических соединений, которым присвоены номера CAS (табл. 4).

Количественной характеристикой стабильности гидратов являются значения $K_{\text{равн}}$ (уравнение (2)) при комнатной температуре. Из перечисленных в табл. 2 примеров они известны всего для пяти веществ, однако на основании даже столь ограниченной информации можно заключить, что признак нестабильности гидратов — условие $K_{\text{равн}} \leq 10^{-2}$. Для формальдегида $K_{\text{равн}} \sim 10^3$, но препаративное выделение его гидрата(ов) из водных растворов невозможно из-за смещения равновесия (1) влево.

В отличие от нестабильных гидратов, номера CAS закономерно приписаны всем реально существующим гидратным формам, перечисленным в табл. 3. Восемь из них – ковалентные соединения (продукты нуклеофильного присоединения воды), а шесть других – молекулярные гидраты с неопределенным характером ее связывания. Для 12 из 14 гидратов в табл. 3 определены значения физико-химические свойств (прежде всего, $T_{\rm кип}$ и $T_{\rm min}$), существенно отличающиеся от соответствующих характеристик безводных аналогов. Для двух соединений (1,2,3,4-тетраоксотетралин и 1,1,1-трифтор-2,2-дихлорацетон) гидратные формы настолько устойчивы, что сложности представляет характеристика уже не гидратов, а их безводных аналогов. Еще одним любопытным подтверждением образования гидратов является наличие констант кислотности (значений pK_a) у соединений, безводные формы которых не имеют активных атомов водорода. Примерами являются значения р $K_a = 8.47$ 1,2,3-индантриона (нингидрин), который в водных средах существует исключительно в форме 2,2-дигидрокси-1,3-индандиона, и трихлорацетальдегида (р $K_a = 9.7-11.3$). Во втором случае обращает на себя внимание значительный диапазон вариаций значений р $K_{\rm a}$, обусловленный, скорее всего, вариациями соотношения альдегида и его гидратной формы в зависимости от концентрации вещества в растворе.

Значение $K_{\text{равн}} \sim 10^6$ для одного из фторпроизводных карбонильных соединений — гексафторацетона, образующего стабильный гидрат (перегоняется без разложения при атмосферном давле-

ЗЕНКЕВИЧ и др.

-			-			
	Мол	Безво	цная форма	Гі	идрат	Истоциники
Соединение	масса	CAS №	некоторые свойства	CAS №	состав	информации
Антрацен	178	120-12-7	<i>Т</i> _{кип} 340°С	188974-01-8	1:1	PubChem
Фенантрен	178	85-01-8	<i>Т</i> _{кип} 340°С	919080-09-4	1:1	PubChem, ChemSpider
Формальдегид*	30	50-00-0	$T_{\mathrm{кип}}$ —20 ± 1°C	463-57-0; 53280-35-6; 53280-36-7	1 : 1; гидраты олигомеров (<i>n</i> : 1); К _{равн} ~ 10 ³	[11–13]; PubChem, ChemSpider
Ацетальдегид	44	75-07-0	<i>T</i> _{кип} 22°С	_	1:1	[14, 15]; ChemSpider
Глиоксаль	58	107-22-2	<i>T</i> _{пл} 15°С; <i>T</i> _{кип} 51°С	4405-13-4 (дигидрат три- мера)	Гидраты олигоме- ров (<i>n</i> : <i>x</i> , <i>x</i> ≥ 1)	PubChem. ChemBook
Бензальдегид**	106	100-52-7	<i>Т</i> _{кип} 179°С	4403-72-9	2:1; p K_{a} 14.9; K_{pabh} ~ 1 × 10 ⁻²	[8], ChemSpider, Pub- Chem, MolBase и др.
Дифторхлораце- тальдегид	114	811-96-1	<i>Т</i> _{кип} 17.8°С	63034-47-9	-	PubChem, ChemSpi- der, MolBase и др.
Ацетон	58	67-64-1	<i>Т</i> _{кип} 56.1°С	18879-06-6 (гидрат-клатрат)	1:1;1:n (гидрат-клатрат); $K_{\text{равн}} \sim 1.4 \times 10^{-3}$	[8, 16–19]; Chemical Encyclopedia
2-Бутанон	72	78-93-3	<i>Т</i> _{кип} 79.6°С	—	1:1	PubChem
1,1,1-Трифтора- цетон	112	421-50-1	<i>Т</i> _{кип} 22°С	_	1:1	Spectra Base
Циклогексанон	98	108-94-1	<i>Т</i> _{кип} 155.6°C	28553-75-5	1:1	ChemSpider
Ацетофенон	120	98-86-2	<i>Т</i> _{кип} 202°С	_	$K_{ m pabh} \sim 6.6 \times 10^{-6}$	[8], PubChem, Sigma- Aldrich
2-Гидроксиаце- тофенон	136	118-93-4; 582-24-1	<i>T</i> _{пл} 4.5°С; <i>T</i> _{кип} 213—218°С	_	1:1	PubChem, ChemSpi- der, Sigma-Aldrich
Ванилин	152	121-33-5	<i>T</i> _{пл} 81–83°С	_	_	HydrateWeb
Бензофенон	182	119-61-9	Т _{пл} 48.5°С; Т _{кип} 305°С	_	$K_{ m pabh} \sim 1.7 \times 10^{-7}$	[8], Sigma-Aldrich, ChemSpider
Фенол	94	108-95-2	<i>Т</i> _{пл} 40.5°С; <i>Т</i> _{кип} 181.7°С	217182-78-0; 144796-97-4	1:1	PubChem, ChemSpi- der, Sigma-Aldrich
2,3-Дихлорфе- нол	162	576-24-9	<i>T</i> _{пл} 56°С	848169-92-6	1:1	ChemSpider
2,4-Дихлорфе- нол	162	120-83-2	<i>T</i> _{пл} 41—45°С	_	1:1	PubChem
3,4-Дихлорфе- нол	162	95-77-2	<i>T</i> _{пл} 65–68°С		Нет данных	
Уксусная кис- лота	60	64-19-7	Т _{кип} 118—119°С; Т _{пл} 16—17°С	19215-29-3; 99294-94-7	1 : 1; 1 : 2	ChemSpider, PubChem
Пропионовая кислота	74	79-09-4	<i>Т</i> _{кип} 141.1°C	-	1:1	PubChem, Sigma- Aldrich
Бензойная кис- лота	122	65-85-0	<i>T</i> _{пл} 122°С; <i>T</i> _{кип} 250°С	_	1:1	PubChem, Sigma- Aldrich, SynQuest

Таблица 2. Характеристика нестабильных гидратов некоторых органических соединений

Таблица 2. Продолжение

	Мал	Безвод	цная форма	Г	идрат	Истолици
Соединение	масса	CAS №	некоторые свойства	CAS №	состав	информации
2-Гидроксибен- зойная (салици- ловая) кислота	138	69-72-7	<i>Т</i> _{пл} 158.6°С; <i>Т</i> _{кип} разл.		Нет данных	
3-Гидроксибен- зойная кислота	138	99-96-7	<i>T</i> _{пл} 200–203°С	_	1:1	PubChem
4-Гидроксибен- зойная кислота	138	99-06-9	<i>T</i> _{пл} 214.5°C	26158-92-9	1:1	ChemSpider, PubChem
Формамид	45	75-12-7	<i>Т</i> _{кип} 288°С	56827-75-9	1:1	PubChem, ChemSpider
Ацетамид	59	60-35-5	<i>Т</i> _{пл} 79-81°С; <i>Т</i> _{кип} 221.2°С	137547-89-3	1:1	PubChem
Пропионамид	73	79-05-0	<i>T</i> _{пл} 80°С; <i>T</i> _{кип} 213°С	_	1:1	PubChem
Бензамид	121	55-21-0	<i>T</i> _{пл} 127—130°С; <i>T</i> _{кип} 288°С	_	1:1	PubChem
Мочевина	60	57-13-6	<i>T</i> _{пл} 133°C (разл)	163931-63-3 (1:1)	1:1;2:1	PubChem, ChemSpider
Этаноламин	61	141-43-5	<i>Т</i> _{кип} 171°С	922193-26-8	1:1	PubChem
Метилгидразин	46	_	<i>T</i> _{кип} 87–88°С	_	1:1	PubChem
Триэтилфосфат	182	78-40-0	<i>Т</i> _{кип} 215°С	114019-85-1	2:1	ChemSpider, ChemSrc
Трибутилфосфат	266	126-73-8	<i>Т</i> _{кип} 289°С	19517-53-4	1:1	ChemSpider, ChemSrc
Кофеин***	194	58-08-2	$T_{\Pi\Pi} 234^{\circ}\text{C};$ RI (ГЖХ) 1793 ± 19; lg <i>P</i> -0.07, 0.54, 1.10; p K_a 0.60	5743-12-4	1 : 1; RI(ВЭЖХ) 633 ± 27	[20, 21]; PubChem, ChemSpider, Kegg Drugs, Fisher Scien- tific, MolBase
Теобромин	180	83-67-0	<i>T</i> _{пл} 345–350°С; RI(ВЭЖХ) 586		Нет данных	I
Теофиллин	180	58-55-9	<i>T</i> _{пл} 272°С; 271–273°С	5967-84-0	1 : 1; RI(ВЭЖХ) 580 ± 24	[22–27]; PubChem
Сульфамид***	172	63-74-1	<i>Т</i> _{пл} 165°С	_	1 : 1; RI(ВЭЖХ) 481 ± 22	PubChem, HydrateWeb
Пирацетам***	142	74791-74-9	RI(ΓЖΧ) 1649 [ref – NIST]	68497-62-1	2 : 1; 1 : 1; RI(ВЭЖХ) 474	[28]; ChemSpider, HydrateWeb
Диметилсуль- фоксид	78	67-68-5	<i>Т</i> _{кип} 189°С		1:1;1: <i>n</i>	[18, 29]; PubChem, HydrateWeb
Диметилсульфон	94	67-71-0	$T_{\rm KMII}$ 236 ± 2°C		Нет данных	
Нитрометан	61	75-52-5	<i>Т</i> _{кип} 101.2°C	_	1:1	PubChem
Трихлорнитро- метан	163	76-06-2	<i>Т</i> _{кип} 112°С	_	1:1	PubChem
Хлороформ	118	67-66-3	<i>T</i> _{кип} 61.2°C	_	1:1	[30]; PubChem
Ацетонитрил	41	75-05-8	<i>T</i> _{кип} 82°С	128870-13-3	1:1	PubChem, ChemSpider
1,3-Диоксолан	74	646-06-0	<i>T</i> _{кип} 75.1°C	34776-95-9	1:1	PubChem
1,4-Диоксан	88	123-91-1	<i>T</i> _{кип} 101.3°C	16468-05-6	1:1	[31–34]; ChemSpider

	Мол	Безвод	цная форма	Г	идрат	Источники
Соединение	масса	CAS №	некоторые свойства	CAS №	состав	информации
Бензол-1,2- дикарбоновая (фталевая) кис- лота	166	88-99-3	<i>Т</i> _{пл} 191°С	_	1:1	ChemSpider
4-Нитроаналин	138	100-01-6	<i>T</i> _{пл} 48°С	—	1:1	PubChem
4-Нитрофенол	139	100-02-7	<i>T</i> _{пл} 113–114°С	—	1:1	PubChem

Таблица 2. Окончание

3-Фенил-3-этил- 217

2,6-пиперидиндион (Глутетимид)***

Флороглюцин

*Для формальдегида кроме $K_{\text{равн}}$ определена константа скорости гидратации $K = \exp(3769/T-5.494)$ [13], где T – абсолютная температура (K).

60490-74-6

6099-90-7

(1:2)

** Помимо бензальдегида образование моногидратов подтверждено для многочисленных замещенных бензальдегидов RC₆H₄CHO, где R = 4-CH₃ (CAS № 45792-02-7), 2-Cl (CAS № 80950-29-4), 3-Cl (CAS № 85152-57-4), 4-CF₃ (CAS № 85152-58-5), а также для арилглиоксалей общей формулы RC₆H₄COCHO, где R = 4-CH₃ (CAS № 7466-72-0), 4-OH (CAS № 197447-05-5 и 24645-80-5), 4-NO₂ (CAS № 4974-57-6), 4-C₃H₇O (CAS № 99433-68-8), 3,4-(CH₃O)₂ (CAS № 163428-90-8), 3,4-(C₂H₅O)₂ (CAS № 952-17-0), 2-CF₃ (CAS № 745783-91-9), 3-CF₃ (CAS № 38923-38-5), 4-CF₃ (CAS № 1736-56-7) и других. Образование гидратов различных карбонильных соединений обсуждается в работе [36] и на сайте [37].

*** Образование гидратов лекарственных препаратов рассмотрено в специальном обзоре [38].

*T*_{пл} 215−220°С

нии), существенно превышает значения $K_{\text{равн}}$ нестабильных гидратов. Следовательно, границу устойчивости гидратов можно приблизительно оценить диапазоном $K_{\text{равн}}$: ~10³ (формальдегид) – ≥10⁶.

18389-24-7;

77-21-4

108-73-6

126

Проявление гидратации аналитов в обращеннофазовой ВЭЖХ. Во всех методах хроматографического разделения уравнения, связывающие параметры удерживания аналитов с характеристиками процесса разделения, относятся к важнейшим соотношениям. В газовой хроматографии влияние температуры (T) на параметры удерживания (времена удерживания, $t_{\rm R}$) описывают соотношениями вида уравнения Антуана (3). В обращеннофазовой ВЭЖХ зависимости времен удерживания от содержания органического компонента элюента (c) аппроксимируют логарифмическими (Снайдера и Снайдера–Сочевинского) (4) или гиперболическими уравнениями (Скотта–Кучеры) (5) соотношениями:

$$\lg t_{\rm R} = a/T + b, \qquad (3)$$

$$\lg t'_{\rm R} = a + bc, \tag{4}$$

$$1/t'_{\rm R} = a + bc. \tag{5}$$

Все перечисленные зависимости нелинейны, что затрудняет выявление каких-либо аномалий хроматографического удерживания. Однако использование такой формы представления данных, как рекуррентная аппроксимация параметров удерживания позволяет привести не только зависимости $t_{\rm R}(T)$ в газовой, но и зависимости $t_{\rm R}(c)$ в обращено-фазовой (**ОФ**) ВЭЖХ к линейному виду [40–42]:

1:1

1:1:1:2

$$t_{\rm R}\left(Y + \Delta Y\right) = at_{\rm R}\left(Y\right) + b,\tag{6}$$

PubChem

[35]; PubChem

где Y = T или c (в рассматриваемом нами случае Y = c), $\Delta Y = \text{const} - \text{постоянный "шаг" изменения концентрации органического компонента элю$ $ента (<math>\Delta c = 5\%$), a и b – коэффициенты, вычисляемые методом наименьших квадратов.

Рекуррентные соотношения объединяют свойства арифметических и геометрических прогрессий [40–42], что объясняет их уникальные аппроксимирующие свойства. Важная особенность графиков рекуррентных зависимостей состоит в том, что число точек на них на единицу меньше числа используемых для их построения значений функции, причем каждая точка одновременно соответствует двум значениям функции, тогда как значения аргумента на графиках вовсе не представлены.

Аппроксимирующие возможности рекуррентных соотношений велики, но не безграничны. Если на "нормальные" зависимости параметров удерживания в ОФ ВЭЖХ, аппроксимируемые уравнениями (4) или (5), накладывается влияние

	F					
	Мол	Безво	дная форма	Γι	идрат	Источники
Соединение	масса	CAS №	некоторые свойства	CAS №	состав и некоторые свойства	информации
Пирен	202	129-00-0	Т _{пл} 145–148°С; Т _{кип} 404°С;	64201-64-5; 1613-37-2	1 : 1; <i>T</i> _{пл} 50–55°С	ChemBook, ACROS Organics, ChemSpi- der, Sigma-Aldrich
1,2,3-Индан- трион (Нин- гидрин)	160	938-24-9	<i>T</i> _{пл} 250°С; RI 1574	485-47-2; 2462-59-1	1 : 1; p K_a 8.47; RI(B \ni XX) 574 \pm 17	Sigma-Aldrich, Pub- Chem, Merck и др.
1,2,3,4-Тетра- оксотетралин (Оксолин)	188	30266-58-1	_*	34333-95-4	1 : 2; $\lg P = -0.55$	PubChem, Chem- Book и др.
Трифтораце- тальдегид	98	75-90-1	<i>Т</i> _{кип} — 19.4 ± 1.4°С	421-53-4; 33953-86-5	1 : 1; <i>Т</i> _{кип} 105 ± 1°С	[39]; PubChem, ChemSpider, Mol- Base и др.
Пентафторпро- паналь	148	422-06-0	<i>Т</i> _{кип} +2°С	422-63-9	1 : 1; <i>Т</i> _{кип} 92°С	Alfa Aesar и др.
Гептафторбута- наль	198	375-02-0	<i>Т</i> _{кип} 28.2—29.0°С	375-02-0	1 : 1; <i>Т</i> _{кип} 95 ± 1°С	Alfa Aesar и др.
Трихлораце- тальдегид	146	75-87-6	<i>Т_{кип}</i> 97.8°С; <i>Т_{плав}</i> —57.5°С	302-17-0	1 : 1; <i>T</i> _{кип} 96.3°C; <i>T</i> _{пл} 57°C; р <i>K</i> _a 9.66; 10.0–11.3	PubChem, Sigma- Aldrich и др.
Гексафтораце- тон	166	684-16-2	<i>Т</i> _{кип} −27.6 ± 0.3°С	677-71-4; 10543-95-0; тригидрат 34202-69-2; сесквигидрат 13098-39-0	1:1; $T_{\text{кип}}$ 100 ± 7°С; $K_{\text{равн}} \sim 10^6$; тригид- рат $T_{\text{пл}}$ 18–21°С; сесквигидрат $T_{\text{плавл}}$ 11–20°С	PubChem, Drug- Bank, Cameo Chemicals, Chem- Spider и др.
1,1,1-Трифтор- 3,3-дихлораце- тон	180	_	_*	126266-75-9; 1049731-87-4	1 : 1; <i>Т</i> _{кип} 103°С	PubChem, Sigma- Aldrich, ChemSpi- der, ChemBook, SynQuest и др.
Глюкоза	180	50-99-7	<i>Т</i> _{пл} 150°С	77938-63-7; 14431-43-7	1 : 1; <i>T</i> _{пл} 83–92°С	ChemSpider, Drug- Bank, SigmaAl- drich, BioChemica
Этилендиамин	60	107-15-3	<i>Т</i> _{кип} 116°С	6780-13-8	1 : 1; <i>Т</i> _{кип} 118°С; <i>n</i> ²⁰ _D 1.448–1.451; <i>d</i> ²⁰ 0.96	ChemBook, Pub- Chem, ChemSpider и др.
Пиперазин	86	110-85-0	<i>Т</i> _{кип} 145—146°С; <i>Т</i> _{пл} 42—44°С	16832-43-2 (1 : 1); 142-63-2 (1 : 6)	1 : 1; 1 : 6; <i>T</i> _{кип} 125–130°С; <i>T</i> _{пл} 42–46°С	PubChem, Sigma- Aldrich, DrugBank, ChemSpider и др.
Гидразин**	32	302-01-2	<i>Т</i> _{кип} 113.5–114°С	7803-57-8	1 : 1; <i>T</i> _{кип} 120–121°C	[2-5]
Бензолсульфо- кислота	158	98-11-3	<i>T</i> _{пл} 51°С	26158-00-9	<i>T</i> _{пл} 42–49°С	PubChem. Sigma- Aldrich

I worming of A aparticipation and part of a state of a
--

* Охарактеризованы только устойчивые гидратные формы. ** Для сравнения приведены характеристики неорганического соединения (возможно образование азеотропа с *T*_{кип} выше, чем *T*_{кип} его компонентов).

ЗЕНКЕВИЧ и др.

	-		
Соединение	Структура	Причина нестабильности	CAS №
Виниловый спирт	СH ₂ =СН–ОН	Изомеризуется в ацетальдегид	557-75-5; 9002-89-5
1,2-Этилендиол	НО-СН=СН-ОН	Изомеризуется в глиоксаль	1571-60-4
Нитрозометан	CH ₃ –NO	Изомеризуется в оксим формальдегида или образует димер	865-40-7
Фторметанол	FCH ₂ –OH	Отщепляет НF с образованием формальдегида	420-03-1
Хлорметанол	ClCH ₂ –OH	Отщепляет HCl с образованием формальдегида	15454-33-8
Бромметанол	BrCH ₂ –OH	Отщепляет НВг с образованием формальдегида	50398-29-3

Таблица 4. Примеры некоторых нестабильных соединений, имеющих номера CAS

равновесия (1), то эффективность этих уравнений снижается:

$$t_{R}(X \rightleftharpoons X \cdot nH_{2}O) \neq t_{R}(X) \neq t_{R}(X \cdot nH_{2}O).$$
(6)

Параметры удерживания безводной и гидратной форм аналитов в общем случае неолинаковы. но зависимости их значений от концентрации органического растворителя в элюенте (и, следовательно, от содержания в нем воды) для каждой из них могут быть приведены к линейному виду с использованием рекуррентной аппроксимации [40-42]. Если же эти формы в растворе существуют в состоянии динамического равновесия (1), то это приводит к искажениям не только зависимостей (4) или (5), но и рекуррентной аппроксимации (6). Таким образом, можно полагать, что выявление отклонений рекуррентных зависимостей (6) от линейности представляет собой эффективный способ выявления аномалий хроматографического удерживания в ОФ ВЭЖХ, в том числе за счет образования гидратных форм аналитов. Для иллюстрации возможностей этого способа рассмотрим обработку данных по параметрам удерживания двух лекарственных препаратов с тривиальными названиями гефитиниб (I) и пазопаниб (II) (табл. 1). Более обширный набор соединений охарактеризован в работе [10].

Графики зависимостей абсолютных времен удерживания (I) и (II) от содержания ацетонитрила в элюенте (с, об. %) имеют ожидаемый логарифмический или гиперболический вид, соответствующий уравнениям (4) или (5) (рис. 1а, 1б), что не позволяет предполагать какие-либо особенности их хроматографического удерживания. Однако представление этих же данных в виде рекуррентных зависимостей вида (6) (рис. 2а, 2б) позволяет выявить их принципиальные отличия. В случае гефитиниба (рис. 2а) все шесть точек соответствуют уравнению линейной регрессии с параметрами: $a = 0.555 \pm 0.007$, $b = 0.372 \pm 0.016$, R = $= 0.9996, s_0 = 0.017$. Это означает, что в интервале концентраций CH₃CN в элюенте от 35 до 65% соединение существует в одной и той же форме, соответствующей структуре, приведенной в табл. 1. В случае, представленном на рис. 26, только четыре точки, отвечающие минимальным временам удерживания (наибольшей концентрации CH₃CN в элюенте), лучше всего соответствуют уравнению линейной регрессии с параметрами $a = 0.687 \pm 0.008, b = 0.277 \pm 0.009, R = 0.9998, s_0 =$ = 0.002. Две другие точки (в области содержаний CH₃CN менее 30%) заметно отклоняются от линии регрессии, причем степень отклонений возрастает при увеличении содержания воды в элюенте.

Объяснение наблюдаемых аномалий даже для достаточно сложных полифункциональных органических соединений связано с образованием их гидратов. Молекула пазопаниба (II) содержит сульфонамидный фрагмент структуры -SO₂-NH- (табл. 1). Известно, что полярные амиды карбоновых кислот и тем более еще более полярные сульфонамиды как в кристаллическом состоянии, так и в водных растворах могут образовывать достаточно устойчивые гидраты [43]. В ОФ ВЭЖХ при уменьшении содержания CH₃CN в элюенте равновесие (1) сдвигается в сторону образования гидрата. Это означает, что формы пазопаниба (II) в элюентах разного состава могут быть не идентичны друг другу; содержание его гидрата увеличивается в элюентах с большим содержанием воды. Гефитиниб (I) не содержит столь полярных фрагментов структуры, в результате чего рекуррентная зависимость (6) для него не имеет искажений (практически линейна).

Подобный способ выявления обратимого образования гидратов аналитов в элюенте может быть распространен и на другие соединения. В работе [10] эта проблема рассмотрена на примере бо́льшего числа лекарственных препаратов. Следовательно, рекуррентная аппроксимация параметров удерживания в ОФ ВЭЖХ может быть рекомендована как способ выявления обратимого образования гидратов органических соединений в водных растворах.



Рис. 1. Графики зависимостей времен удерживания (t_R , мин) гефитиниба (I) (а) и пазопаниба (II) (б) от содержания ацетонитрила в элюенте (c, об. %), $t_R = f(c)$.



Рис. 2. Графики рекуррентных зависимостей $t_{R}(c + 5\%) = at_{R}(c) + b$ гефитиниба (I) (a) и пазопаниба (II) (б).

* * *

Таким образом, можно отметить, что в настоящее время образование гидратных форм известно или предполагается для многочисленных органических соединений, но на практике эти эффекты чаще всего не принимают во внимание из-за малой стабильности многих таких гидратов. Константы гидратации определены только для небольшого числа соединений. Однако для представителей некоторых классов веществ именно образование гидратов в водных средах позволяет объяснить аномалии зависимостей параметров их удерживания в ОФ ВЭЖХ от содержания органического модификатора элюента. Наиболее эффективным способом выявления подобных аномалий

ЖУРНАЛ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ том 76 № 4 2021

представляется рекуррентная аппроксимация зависимостей хроматографических параметров удерживания от содержания органического компонента элюента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Griesser U.J. The importance of solvates. Ch. 8. / Polymorphism in the Pharmaceutical Industry / Ed. Hilfiket R. N.Y.: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2006. 414 p. https://doi.org/10.1002/3527607889.ch8
- Справочник химика. Т. 2. Основные свойства неорганических и органических соединений. Л.: Химия, 1971. 1168 с.
- 3. *The Merck Index.* An Encyclopedia of chemicals and drugs. 9th Edn. Merck & Co., Inc. 1976. 1313 p.

- 4. Свойства органических соединений. Справочник / Под ред. Потехина А.А. Л.: Химия, 1984. 519 с.
- 5. Handbook of Chemistry and Physics / Ed. Lide D.R. Boca Raton: Taylor & Francis, Version 2006. (CD-ROM).
- 6. Sangster J. Octanol-water partition coefficients: fundamentals and physical chemistry. N.Y.: J. Wiley & Sons, 1997. 178 p.
- 7. Зенкевич И.Г., Олисов Д.А., Шафигуллин Р.В., Буланова А.В. Новый подход к хроматографическому определению растворимости кверцетина в воде // Аналитика и контроль. 2019. Т. 23. № 3. С. 386. https://doi.org/10.15826/analitika.2019.23.3.013
- 8. Rawn J.D., Quellette R. Organic Chemistry. 2nd Ed. N.Y.: Acad. Press, 2019. 1056 p.
- 9. Зенкевич И.Г., Никитина Д.А. Выявление обратимого образования гидратов лекарственных препаратов рекуррентной аппроксимацией их параметров удерживания в обращенно-фазовой ВЭЖХ / Тез. докл. IV Всерос. конф. молодых ученых "Медико-биологические аспекты химической безопасности". СПб: 18-20 сент. 2020 г. МЕД-LINE.RU. t11. 5 c.
- 10. Зенкевич И.Г., Никитина Д.А. Особенности рекуррентной аппроксимации параметров удерживания полифункциональных соединений в обращеннофазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии // Журн. физ. химии. 2021. Т. 95. № 2. C. 285. (Zenkevich I.G., Nikitina D.A. Features of recurrent approximation of retention parameters of polyfunctional compounds in reversed phase HPLC // J. Phys. Chem. A. 2021. V. 95. № 2. P. 395.) https://doi.org/10.31857/S004445372102028X
- 11. Martin R. The dissociation constant of methylene glycol (formaldehyde hydrate) // Austr. J. Chem. 1954. V. 7. № 4. P. 400. https://doi.org/10.1071/CH9540400
- 12. Zavitas A.A., Coffiner M., Wiseman T., Zavitas L.R. Reversible hydration of formaldehyde. Thermodynamic parameters // J. Phys. Chem. 1970. V. 74. № 14. P. 2746.

https://doi.org/10.1021/j100708a003

- 13. Winkelman L.G.M., Voorwinde O.K., Ottens M., Beenackers A.A.C.M., Janssen L.P.B.M. Kinetics and chemical equilibrium of the hydration of formaldehyde // Chem. Eng. Sci. 2002. V. 57. P. 4067.
- 14. Bell R.P., Higginsen W.C.E. The catalytic dehydration of acetaldehyde hydrate, and the effect of structure on the velocity of photolytic reactions // Proc. Royal Soc. London. Ser. A. Methods Phys. Sci. 1949. V. 197. № 1047. P. 141.
- 15. Scheithauer A., Grutzner T., Rijksen C., Zollinger D., Thiel W.R. ¹H and ¹³C-NMR spectroscopic study of chemical equilibria in the system acetaldehyde + water // AIChE J. 2015. V. 61. № 1. P. 177. https://doi.org/10.1002/aic.14623
- 16. Wilson G.J., Davidson D.W. Dielectric evidence for acetone hydrate // Can. J. Chem. 1963. V. 41. № 2. P. 264. doi 19.1138/v63-041
- 17. Yamamuro O., Kuratomi N., Matsuo T., Suga H. Heat capacity and phase transition of acetone clatrate hydrate // Solid State Commun. 1990. V. 73. № 4. P. 317.

- 18. McLain S.E., Soper A.K., Luzar A. Investigations on the structure of dimethyl sulfoxide and acetone in aqueous solutions // J. Chem. Phys. 2007. V. 127. Paper № 174515. https://doi.org/10.1063/1.2784555
- 19. Du J., Kiang D.-O., Li D.-L., Li X.-J. Phase equilibrium data of binary hydrate in the system hydrogen plus acetone plus water // J. Chem. Eng. Data. 2010. V. 55. № 10. P. 4532.
- 20. Edwards H.G., Lawson E., Matas M., Shields L., York P. Metamorphosis of caffeine hydrate and anhydrous caffeine // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2. 1997. № 10. P. 1985. https://doi.org/10.1039//A702041D
- 21. Hedoux A., Paccou L., Derollez P., Guinet Y. Dehydration mechanism of caffeine hydrate and structural description of driven metastable anhydrates analyzed by micro Raman spectroscopy // Int. J. Pharm. 2015. № 1-2. P. 331.

https://doi.org/10.1016/ijpharm.2015.04.001

- 22. Suzuki E., Shimomura K., Sekiguchi K. Thermochemical study of theopjylline and its hydrate // Chem. Pharm. Bull. 1989. V. 37. № 1. P. 493. https://doi.org/10.1248/cpb37.493
- 23. Gould P.L., Howard J.R., Oldenshaw G.A. The effect of hydrate formation on the solubility of theophylline in binary aqueous cosolvent systems // Int. J. Pharm. 1989. V. 51. № 3. P. 195. https://doi.org/10.1016/0378-5173(89)90192-0
- 24. Agbada C.O., York P. Theophylline hydrate/anhydrous system: effect of water of hydration on mechanical properties of compacted beams // J. Pharm. Pharmacol. 1990. V. 42. № S1. P. 76P. https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1990.tb14449.x
- 25. Rodriguez-Hornedo N., Wu H.-J. Crystal growth kinetics of theophylline monohydrate // Pharm. Res. 1991. V. 8. P. 643.
- 26. Sun C.C., Zhou D., Grant D.J.W., Young V.G. Theophylline monohydrate // Acta Crystallogr. 2002. V. 58. № 4. P. 0368. https://doi.org/10.1107/S1600536802002921
- 27. Gonzalez-Gonzalez J.S., Zuniga-Lemus O., Hernandez-Galindo M. del C. Hydrated solid forms of theophylline and caffeine obtained by mechanochemistry // IOSR J. Pharm. 2017. V. 7. № 5. P. 28.
- Shcherbakov A.A., Danilov I.P., Sazhin V.A., Petrov V.I. 28. Investigation of the effect of hydration and amphyphilic properties of nootropic drugs of piracetam and pramiracetam // Theor. Exp. Chem. 1993. V. 28. № 4. P. 277

https://doi.org/10.1007/BF00530289

- 29. Scott H. Extent of hydration of dimethyl sulfoxide in aqueous solution // J. Pharm. Sci. 1969. V. 58. № 8. P. 946. https://doi.org/10.1002/jps.2600580807
- 30. Tester J.W., Wiegandt H.F. The fluid hydrates of methylene chloride and chloroform: Their phase equilibria and behavior as influences by hexane // AIChEJ. 1969. V. 15. № 2. P. 239.

https://doi.org/10.1002/aic.690150221

31. Nakayama H., Tahara M. Hydrates of organic compounds. I. Solid-liquid phase equilibria in the water +

1,4-dioxane system and some properties of 1,4-dioxane hydrate // Bull. Chem. Soc. Japan. 1973. V. 46. P. 2965. doi 19.1246/bcsi. 46.2965

- 32. Gough S.R., Ripmeester J.A., Davidson D.W. 1.4-Dioxane hydrate: dielectric absorption by a nondipolar enclathrated molecule // Can. J. Chem. 1075. V. 53. № 15. P. 2216.
- 33. Kamran-Pirzaman A., Pahlavanzadeh H., Mohammadi A.H. Hydrate phase equilibria of furan, acetone, 1,4-dioxane, TBAC and TBAF // J. Chem. Thermodyn. 2013. V. 45. № 21. P. 151. https://doi.org/10.1016/j.jct.2013.04.012
- 34. Пчелкин В.Н., Торяник А.И. Исследование методом Монте-Карло гидратации 1,4-диоксана в конформациях "кресло" и "ванна" // Журн. структ. химии. 1991. Т. 32. № 2. С. 88.
- 35. Braun D., Tocher D.A., Price S.L., Griesser U.J. The complexity of hydration of phloroglucinol: a comprehensive structural and thermodynamic characterization // J. Phys. Chem. 2012. V. 116. № 3. P. 3361. https://doi.org/10.1021/jp211948q
- 36. Buschmann H.-J., Fuldner H.-H., Knocke W. The reversible hydration of carbonyl compounds in aqueous solutions. Part I. The keto-gem-diol equilibrium // Berichte. 1980. V. 84. № 1. P. 41. https://doi.org/10.1002/bbpc.19800840109
- 37. Web-page: ebi.ac.uk/chebi/searched.do?chebiId=63733 (дата обращения: октябрь 2020 г.).

- 38. Heady A.M., Worku Z.A., Kumar D., Madi A.M. Pharmaceutical solvents, hydrates and amorphous forms: A special emphasis on cocrystals // Adv. Drug. Deliv. Rev. 2017. V. 117. P. 25. doi . 2017. 03.002 https://doi.org/10.1016/j.addr
- 39. Funabiki K., Matsunaga K., Nojiri M., Hashimoto W. The use of trifluoroacetaldehyde ethyl hemiacetal or hydrate in a simple and practical regioselective synthesis of β -hydroxy- β -trifluoromethyl ketones from enamines and imines // J. Org. Chem. 2003. V. 68. № 7. P. 2853. https://doi.org/10.1021/jo026697
- 40. Зенкевич И.Г. Применение рекуррентных соотношений в хроматографии // Журн. физ. химии. 2008. T. 82. № 6. C. 1012. (Zenkevich I.G. Application of recurrent relations in chromatography // J. Phys. Chem. A. 2008. V. 82. № 6. P. 886). https://doi.org/10.1134/S0036024408060022
- 41. Zenkevich I.G. Application of recurrent relationships in chromatography // J. Chemom. 2009. V. 23. P. 179. https://doi.org/10.1002/cem.1214
- 42. Zenkevich I.G. Recurrent relationships in separation science. Ch. 24 / Chemometrics in Chromatography / Eds. Komsta L., Heyden Y.V., Sherma J. London: CRC Press. 2018. P. 449.
- 43. Kobayashi M., Nishioka K. Hydration of N-monosubstituted amides in the binary solvents dioxane-water-d2 and dioxane-water // J. Phys. Chem. 1987. V. 91. № 5. P. 1247.

https://doi.org/10.1021/j100289a041

УДК 543.55

ВЛИЯНИЕ ВЗАИМНОГО РАСПОЛОЖЕНИЯ ЗАМЕСТИТЕЛЕЙ В МОЛЕКУЛЕ АМИНОБЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ НА АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ БЕЗМЕТОЧНОГО ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО ИММУНОСЕНСОРА С КОВАЛЕНТНО-ИММОБИЛИЗОВАННЫМ РЕЦЕПТОРНЫМ СЛОЕМ

© 2021 г. Т. С. Свалова^{*a*, *}, Р. А. Зайдуллина^{*a*}, Н. Н. Малышева^{*a*}, С. Ю. Сараева^{*a*}, А. И. Матерн^{*a*}, А. Н. Козицина^{*a*}

^аУральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, Химико-технологический институт ул. Мира, 28, Екатеринбург, 620002 Россия *e-mail: t.s.svalova@urfu.ru Поступила в редакцию 10.06.2020 г. После доработки 22.07.2020 г. Принята к публикации 17.08.2020 г.

Исследовано влияние взаимного расположения заместителей в молекуле аминобензойной кислоты на аналитические характеристики определения бактерий *Staphylococcus aureus* с использованием безметочного электрохимического иммуносенсора. Наилучшие аналитические характеристики продемонстрировал безметочный электрохимический иммуносенор на основе *мета*-аминобензойной кислоты. По-видимому, это обусловлено наилучшим сочетанием плотности формируемого в результате электрохимического осаждения покрытия и доступности функциональных карбоксильных групп для карбодиимидной сшивки с иммунорецептором.

Ключевые слова: иммуноанализ, иммуносенсор, антитела, *Staphylococcus aureus*, электрографтинг. **DOI**: 10.31857/S0044450221020122

Экспрессное, чувствительное и надежное определение инфекционных агентов является одной из наиболее актуальных задач современной диагностики. Staphylococcus aureus (золотистый стафилококк) – одна из самых распространенных бактерий-комменсалов: колонизирует кожу и поверхности слизистых оболочек организма, может вызывать различные кожные заболевания, а также при наступлении благоприятных условий возбуждать хронические заболевания. В то же время S. aureus является частой причиной внутрибольничных инфекций (пневмонии, сепсиса и других послеоперационных осложнений) вследствие своей способности поражать практически любой орган и систему организма. Многие штаммы проявляют резистентность к традиционно используемым антибиотикам пенициллинового ряда [1, 2].

Традиционно используемым методом обнаружения бактериальных патогенов является бактериальный посев, главные недостатки которого – длительность процедуры, а также невысокая чувствительность. Метод позволяет достоверно обнаруживать лишь более чем 1000 КОЕ/мл, тогда как в ряде случае для заражения достаточно нескольких десятков [3]. Другие распространенные способы диагностики – иммуноферментный анализ и ДНК-тесты, однако они дороги в обслуживании и могут быть реализованы только в хорошо оснащенных лабораториях высококвалифицированными специалистами [4]. В связи с этим актуальной задачей является разработка портативных тест-систем и (био)сенсоров [5-7]. Безметочные электрохимические иммуносенсоры, благодаря уникальному сочетанию ультраспецифичности иммунореакции, высокой надежности, чувствительности электрохимических методов, а также экспрессности и экономичности безметочных процедур анализа, по праву занимают лидирующие позиции среди современных разработок в области создания тест-систем [8].

Ключевую роль в обеспечении требуемых аналитических характеристик определения с помощью электрохимических иммуносенсоров играет способ иммобилизации рецепторного слоя [9, 10]. Ковалентные методы иммобилизации с использованием кросс-линкеров позволяют прочно закрепить один из компонентов иммунореакции на поверхности рабочего электрода [11]. На сегодня наиболее широко распространен метод карбодиимидной сшивки. Взаимодействие карбоксильных и аминогрупп молекул кросс-линкера, предварительно иммобилизованных на поверхности рабочего электрода, с иммунорецептором происходит в "мягких", близких к физиологическим условиях, а потому не приводит к денатурации последнего. Эффективность реакции увеличивается при добавлении в реакционную смесь катализатора пары 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид/*н*-гидроксисукцинимид (EDC/NHS) [12].

Предложен [13] электрохимический иммуносенсор для определения бактерий *Legionella pneumophila*. Монослой 16-амино-1-гексаканетиола, ковалентно иммобилизованного на поверхности золотого электрода, использован в качестве кросс-линкера для карбодиимидной сшивки с антителами. Безметочный электрохимический иммуносенсор для экспресс-определения вируса *Citrus tristeza* представлен в работе [14]. Моноклональные антитела иммобилизованы методом карбодиимидной сшивки на поверхности золотого электрода, модифицированного 11-меркаптоундекановой и 3-меркаптопропионовой кислотами. Аналитический сигнал регистрировали вольтамперометрически с использованием $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6].$

В качестве кросс-линкеров для карбодиимидной сшивки нередко применяют карбоновые кислоты, амины и аминокислоты, иммобилизованные на поверхности электрода, в частности, посредством электрохимического осаждения [15]. Предложенный Пинсоном метод электрографтинга [16] сегодня приобретает все большую популярность при разработке биосенсоров и тест-систем, поскольку позволяет создавать на поверхности электрода функциональные слои различной толщины и емкости, пригодные для биоконъюгации. Выделяют восстановительный и окислительный электрографтинг.

Среди множества публикаций по электрографтингу более половины посвящено электрохимическому восстановлению солей арилдиазония [17-20]. Авторами работы [21] предложен способ ковалентной иммобилизации рецептора для определения простатспецифического антигена на основе электрографтинга 4-азидофенилдиазония. Оригинальный подход позволяет контролировать плотность иммобилизации рецепторного слоя и реализовать безреагентное и ультрачувствительное (до 10⁻¹² М) определение онкомаркера. Ранее нами показано [22], что структурирование рецепторного слоя безметочного электрохимического иммуносенсора посредством электрографтинга хлорида *п*-нитрофенилдиазония и последующей карбодиимидной иммобилизацией антител позволяет улучшить чувствительность определения антител к вирусу кори по отношению к аналогичному иммуносенсору, но с капельно-иммобилизованным рецепторным слоем. К ограничениям метода большинство авторов относят крайне низкую стабильность солей диазония. Поверхностные характеристики модифицированных электродов в значительной степени определяются условиями электровосстановления, природой радикала и фонового электролита [23]. Так, например, электрографтинг солей диазония с отличным от бензольного радикалом позволил сформировать на поверхности электрода тонкий функциональный слой и улучшить аналитические характеристики иммуносенсора для определения карциноэмбрионального антигена [24].

В настоящее время все большее внимание исследователей привлекают методы окислительного электрографтинга. Известны реакции электрохимического окисления органических аминов [25, 26], спиртов, карбоновых кислот [27], сопровождающиеся образованием ковалентной связи органической молекулы с поверхностью рабочего электрода. Окислительный электрографтинг аминов представляет особый интерес. Установлено, что ароматические амины легче алифатических подвергаются электрохимическому окислению. Изучены процессы электрографтинга *n*-аминосульфоновой, *п*-аминобензилфосфоной и других ароматических аминокислот на поверхности металлических и углеродсодержащих электродов в водной среде [28-31]. Толщина, сплошность, проводимость покрытий, а также карбодиимидная емкость (количество функциональных амино-/карбоксильных групп) модифицированных электродов определенно зависит от взаимного расположения заместителей в органической молекуле и во многом определяет аналитические характеристики биосенсоров.

Цель настоящего исследования — оценка влияния взаимного расположения заместителей в молекуле аминобензойной кислоты, электрохимически осажденной на поверхности платинового электрода, на аналитические характеристики безметочного электрохимического иммуносенсора для определения бактерий *S. aureus* в водной среде.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы и рабочие растворы. Все реактивы были предоставлены фирмой "Sigma-Aldrich" (США): 2-аминобензойная кислота (*о*-АБК), 3-аминобензойная кислота (*м*-АБК), 4-аминобензойная кислота (*п*-АБК), хлорид калия, калия гексацианоферрат(II/III), аминоферроцен, N-гидроксисукцинимид (NHS), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC), антитела против *Staphylococcus aureus* (1 мг/мл), бактерии *Staphylococcus aureus*, фосфатные буферные растворы с рН 5.0–7.0 (К₂HPO₄/KH₂PO₄, 0.067 М, приготовлены по стандартной методике).

Методики эксперимента. Электрографтинг аминобензойных кислот. Рабочую поверхность

планарного платинового электрода тщательно полировали оксидом алюминия и промывали водой. Полировку проводили до тех пор, пока не получали типичные циклические вольтамперограммы $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (5 мМ), характерные для "чистого электрода". Аминобензойную кислоту (5 мМ) растворяли в 0.1 М растворе КСІ при активном перемешивании. Электрод выдерживали в растворе аминобензойной кислоты при линейно изменяющемся потенциале. Регистрировали 1 цикл с разверткой потенциала от 0.5 до 1.2 В, со скоростью сканирования 10 мВ/с.

Карбодиимидная иммобилизация антител и формирование иммунокомплекса. Карбоксильные группы электроосажденного слоя активировали с использованием системы EDC/NHS. Инкубацию модифицированного платинового электрода проводили в растворе 100 мМ NHS и 400 мМ EDC в фосфатном буферном растворе с pH 5.0 (c 0.067 M) в течение 30 мин. Далее отмывали непрореагировавшие компоненты буферным раствором с рабочей поверхности электрода. После активации модифицированный электрод инкубировали в 50 мкл суспензии, содержащей антитела к S. aureus, при комнатной температуре в течение 30 мин. Непрореагировавшие карбоксильные группы блокировали путем инкубации электрода в 0.25%-ном растворе бычьего сывороточного альбумина. Далее электрод снова промывали буферным раствором и инкубировали в модельной суспензии бактерий при 37°С.

Приготовление стандартных суспензий бактерий S. aureus. Ночную культуру Staphylococcus aureus штамм B-1266 разводили с использованием стерильного физиологического раствора (pH 7.0–7.2) до 10⁵–10⁶ КОЕ/мл. Затем из полученной суспензии получали еще пять последовательных десятикратных разведений, аликвоты (10 мкл) каждой из которых высеивали на агаризованную среду для определения титра клеток в полученных разведениях.

Электрохимические измерения проводили с использованием потенциостата/гальваностата µАиtolab type III (Metrohm, Швейцария) со встроенным программным обеспечением Nova 1.11 в комплекте с трехэлектродной ячейкой. Рабочим электродом служил планарный платиновый электрод (геометрическая площадь поверхности 1 см²) на керамической подложке, изготовленный методом ступенчатого отжига (ООО НПП "Эльсенс", Екатеринбург), в качестве вспомогательного и электрода сравнения использовали стеклоуглеродный стержень и хлоридсеребряный электрод соответственно. Измерения методом электрохимической импедансной спектроскопии проводили при потенциале равновесия (0.35 В), изменяющемся с амплитудой 0.02 В в интервале частот 100 кГц-1 Гц.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Рабочую поверхность планарных платиновых электродов модифицировали путем электрохимического осаждения о-АБК, м-АБК и л-АБК (рис. 1). Известно [25, 26, 31], что электрохимическое окисление ароматических аминов протекает при потенциале около +1 В в водной или водноорганической среде и сопровождается формированием на поверхности рабочего электрода органического слоя. Как видно из рис. 1, при первичном циклировании потенциала на циклической вольтамперограмме (ЦВА) наблюдается выраженный анодный пик в области потенциалов 0.8-1 В (рис. 1а). На втором и последующих циклах ток окисления снижается, выраженного анодного пика не наблюдается (рис. 1б). При этом происходит закономерное снижение токов пиков K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] (рис. 1в) и увеличение сопротивления переноса заряда в эквивалентной ячейке Рэндлса *R*/*R*(*CW*)/ (рис. 1г). Электрохимически осаждаемые органические слои блокируют рабочую поверхность электрода, затрудняя процессы переноса заряда. По данным [25] электрохимическое окисление аминов представляет собой процесс, включающий перенос электрона с образованием катион-радикала, который затем депротонирует α-аминогруппу, обеспечивая ковалентное связывание с поверхностью электрода (схема 1). Толщина и сплошность осаждаемого покрытия зависит от параметров электролиза, состава фонового электролита и структуры линкера.

$$\operatorname{RCH}_{2}\operatorname{NH}_{2} \xrightarrow{-\operatorname{le}^{-}} \operatorname{RCH}_{2}\operatorname{NH}_{2}^{+} \xrightarrow{-\operatorname{H}^{+}} \xrightarrow{} \operatorname{RCH}_{2}\operatorname{NH}_{2}^{+} \xrightarrow{-\operatorname{H}^{+}} \xrightarrow{} \operatorname{NHCH}_{2}\operatorname{RCH}_{2}\operatorname{NH}_{2}^{+} \xrightarrow{-\operatorname{H}^{+}} \xrightarrow{} \operatorname{NHCH}_{2}\operatorname{RCH}_{2}\operatorname{NH}_{2}^{+} \xrightarrow{-\operatorname{H}^{+}} \xrightarrow{} \operatorname{NHCH}_{2}\operatorname{RCH}_{2}\operatorname{NH}_{2}^{+} \xrightarrow{-\operatorname{H}^{+}} \xrightarrow{-\operatorname{H}^{+}} \xrightarrow{} \operatorname{NHCH}_{2}\operatorname{NHCH}_{2}\operatorname{RCH}_{2}\operatorname{NHC}_{2}\operatorname{NHC$$

Схема 1. Механизм окислительного электрографтинга аминобензойной кислоты [25].

В настоящей работе в качестве аналитического сигнала использовали степень блокирования рабочей поверхности электрода (I^*), определяемую по снижению тока пика окисления K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] согласно уравнению (1):

$$I^* = \frac{I_0 - I}{I_0} \times 100\%,$$
 (1)

где I_0 — ток пика, зарегистрированный на немодифицированном электроде; I — ток пика, зарегистрированный на модифицированном электроде.

На рис. 2 приведены зависимости величины аналитического сигнала от потенциала, продолжительности электролиза и концентрации АБК. Как видно, оптимальными условиями электрографтинга АБК является электролиз в течение 3 с при потенциале, соответствующем пику на ЦВА, при концентрации не более 5×10^{-3} М. Установлено, что в выбранных условиях степень блоки-



Рис. 1. Анодные вольтамперограммы в растворах n- (I), M- (2), o-аминобензойной кислот (3) и в фоновом электролите (4) (a); циклические вольтамперограммы в растворе M-аминобензойной кислоты (3 цикла) (6); циклические вольтамперограммы $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ на немодифицированном (I) и модифицированном M-аминобензойной кислотой электродах (2) (B); диаграммы Найквиста на немодифицированном электроде (I), модифицированном n- (2), n- (3), o-аминобензойной кислотами (4) электродах. Рабочий электрод – планарный платиновый, концентрация аминобензойной кислоты 5 мМ, медиаторная система – 5 мМ раствор $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$, фоновый электролит 0.1 М раствор KCl.

рования поверхности платинового электрода возрастает в ряду *о*-АБК < *м*-АБК < *n*-АБК (табл. 1).

Модифицированные таким образом электроды показали стабильность аналитических характеристик при хранении как в фосфатном буферном растворе с pH 6.5 (0.067 M), так и на воздухе в течение 30 дней.

Для определения плотности карбоксильных групп на рабочей поверхности электрода, доступных для конъюгации с антителами, электроды с

Таблица 1. Изменение степени блокирования и импедиметрических характеристик планарного платинового электрода, модифицированного аминобензойной кислотой (n = 3, P = 0.95)

Вещество	I*, %	<i>R</i> , кОм
о-АБК	33 ± 3	3.1 ± 0.6
м-АБК	40 ± 4	3.8 ± 0.7
п-АБК	46 ± 5	4.3 ± 0.9

осажденным слоем АБК инкубировали в растворе аминоферроцена. После этого регистрировали ЦВА в 0.1 М растворе КСІ и оценивали эффективность протекания реакции по величине тока пика окисления ферроцена (рис. 3). Как видно, после успешного взаимодействия карбоксильной и аминогрупп наблюдается выраженный пик при потенциале -0.2 В, соответствующий электрохимическому окислению ферроцена. Величина пика зависит от структуры поверхностного слоя модифицированных электродов и продолжительности инкубации электрода в растворе аминоферроцена (рис. 3б). Наиболее быстро (в течение 5 мин) реакция протекает на электродах, модифицированных о-АБК; максимальная величина тока пика ферроцена зарегистрирована на электродах с электроосажденной *м*-АБК. Поверхностную концентрацию доступных для коньюгации функциональных карбоксильных групп рассчитывали по уравнению (2) (результаты приведены в табл. 2):



Рис. 2. Зависимости степени блокирования поверхности платинового электрода *n*- (1), *м*- (2), *о*-аминобензойной кислотами (3) от потенциала электролиза (а), времени электролиза (б), концентрации аминобензойной кислоты (в) (*n* = 3, *P* = 0.95).

$$\Gamma = \frac{Q}{nFA},\tag{2}$$

где Γ – поверхностная концентрация иммобилизованной АБК на поверхности платинового электрода, моль/см²; Q – количество электричества; Кл, n – число электронов, участвующих в реакции; F – постоянная Фарадея, равная 96485.3 Кл/моль; A – геометрическая площадь поверхности планарного платинового электрода (1 см²). Полученные средние расчетные значения приведены ниже (n = 3, P = 0.95):

Вещество	о-АБК	м-АБК	п-АБК
Г, моль/см ²	5.5×10^{-11}	7.1×10^{-11}	6.5×10^{-11}

Планарные платиновые электроды с электроосажденным слоем *м*-АБК характеризуются максимальным значением расчетной величины поверхностной концентрации карбоксильных групп, доступных для биоконъюгации. На рис. 4 приведены зависимости аналитического сигнала от условий иммобилизации антител и формирования иммунокомплекса на поверхности планарного платинового электрода, модифицированного АБК. Принимая во внимание характер полученных зависимостей, в дальнейшей работе рецепторный слой формировали в течение 30 мин в суспензии антител с концентра-

Таблица 2. Аналитические характеристики безметочных электрохимических иммуносенсоров для определения *S. aureus*¹ (n = 5, P = 0.95)

Вещество	Уравнение градуировочной зависимости	Предел обнаружения, КОЕ/мл	
о-АБК	$I^* = (2.5 \pm 0.3) \lg c + (69 \pm 5)$	16.4	
м-АБК	$I^* = (4.8 \pm 0.5) \lg c + (71 \pm 6)$	8.2	
п-АБК	$I^* = (3.9 \pm 0.4) \lg c + (82 \pm 7)$	12.6	

¹ Линейный диапазон для всех изомеров аминобензойной кислоты составил $10^2 - 10^5$ КОЕ/мл.



Рис. 3. Дифференциально-импульсные вольтамперограммы, зарегистрированные в 0.1 М растворе KCl после инкубации модифицированных электродов в растворе аминоферроцена (а); зависимости тока пика аминоферроцена от времени инкубации (б): 1 - m-аминобензойная кислота, 2 - n-аминобензойная кислота, 3 - o-аминобензойная кислота (n = 3, P = 0.95).



Рис. 4. Зависимости величины I^* от pH буферного раствора (а), концентрации антител к *S. aureus* (б), времени иммобилизации антител (*I*) и формирования иммунокомплекса (*2*) (в) (n = 3, P = 0.95).

цией 0.1 г/л, формирование иммунокомплекса осуществляли в течение 25 мин в фосфатном буферном растворе с pH 6.5 (0.067 M).

В выбранных условиях получены градуировочные зависимости величины аналитического сигнала безметочного электрохимического иммуносенсора от концентрации бактерий *S. aureus* в модельных суспензиях (рис. 5) и определены аналитические характеристики детектирования бактерий (табл. 2). Полученные результаты ука-

ЖУРНАЛ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ том 76 № 4 2021



Рис. 5. Градуировочные зависимости величины I^* от концентрации бактерий *S. aureus* в модельных суспензиях (n = 5, P = 0.95).

зывают на высокую чувствительность и точность определения бактерий *S. aureus* в модельных суспензиях. Наилучшие аналитические характеристики продемонстрировал безметочный электрохимический иммуносенор на основе *м*-АБК. Повидимому, это обусловлено наилучшим сочетанием плотности формируемого в результате электрохимического осаждения покрытия и доступности функциональных карбоксильных групп для карбодиимидной сшивки с иммунорецептором.

Работа выполнена при поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации (грант № MK-567.2020.3).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Bush L.M., Schmidt C.E., Perez M.T. Staphylococcus infections. https://www.merckmanuals.com/professional/infectious-diseases/gram-positive-cocci/staphylococcal-infections (26.05.2020).
- Moreillon P., Que Y.-A., Glauser M.P. Staphylococcus aureus (Including Staphylococcal Toxic Shock) / Principles and practice of infectious disease. 6th Ed. / Eds. Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2005. P. 2701.
- Vandepitte J., Engbaek K., Piot P. Heuck C.C. Основные методы лабораторных исследований в клинической бактериологии. М: Медицина, 1994. 132 с.
- 4. Struelens M.J., Hawkey P.M., French G.L., Witte W., Tacconelli E. Laboratory tools and strategies for methicillin-resistant Staphylococcus aureus screening, surveillance and typing: state of the art and unmet needs // Clin. Microbiol. Inf. 2009. V. 15. № 2. P. 112.
- Li L., Wang C., Nie Y., Yao B., Hu H. Nanofabrication enabled lab-on-a-chip technology for the manipulation and detection of bacteria // Trends Anal. Chem. 2020. V. 127. Article 115905.
- Rubab M., Shahbaz H. M., Olaimat A.N., Oh D.-H. Biosensors for rapid and sensitive detection of *Staphylococcus aureus* in food // Biosens. Bioelectron. 2018. V. 105. P. 49.

- Козицина А.Н. Электрохимические сенсорные системы на основе органических и неорганических наноразмерных модификаторов для бесферментного определения клинически значимых соединений. Дис. ... док. хим. наук. Екатеринбург: Уральский Федеральный университет, 2018. 343 с.
- 8. *Riu J., Giussani B.* Electrochemical biosensors for the detection of pathogenic bacteria in food // Trends Anal. Chem. 2020. V. 126. Article 115863.
- 9. Kokkinos C., Economou A., Prodromidis M.I. Electrochemical immunosensors: Critical survey of different architectures and transduction strategies // Trends Anal. Chem. 2016. T. 79. C. 88.
- Евтюгин Г.А., Будников Г.К., Стойкова Е.Е. Основы биосенсорики. Казань: Казанский гос. ун-т, 2007. 80 с.
- Kozitsina A., Svalova T., Malysheva N., Glazyrina Y., Matern A., Rusinov V. Determination of Staphylococcus aureus B-1266 by an enzyme-free electrochemical immunosensor incorporating magnetite nanoparticles // Anal. Lett. 2017. V. 50. № 6. P. 924.
- 12. *Hermanson G.T.* Bioconjugate Technique. Rockford, IL, USA: Pierce Biotechnology, 2013. C. 259.
- Laribi A., Allegra S., Souiri M., Mzoughi R., Othmane A., Girardot F. Legionella pneumophila sg1-sensing signal enhancement using a novel electrochemical immunosensor in dynamic detection mode // Talanta. 2020. V. 215. Article 120904.
- Haji-Hashemi H., Norouzi P., Safarnejad M.R., Ganjali M.R. Label-free electrochemical immunosensor for direct detection of *Citrus tristeza* virus using modified gold electrode // Sens. Actuators B. 2017. V. 244. P. 211.
- Mattson G., Conklin E., Desai S., Nielander G., Savage M.D., Morgensen S. A practical approach to crosslinking // Mol. Biol. Rep. 1993. V. 17. № 3. P. 167.
- Bélanger D., Pinson J. Electrografting: a powerful method for surface modification. // Chem. Soc. Rev. 2011. V. 40. № 7. P. 3995.
- 17. Cao C., Zhang Y., Jiang C., Qi M., Liu G. Advances on aryldiazonium salt chemistry based interfacial fabrication for sensing applications // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2017. T. 9. № 6. C. 5031.
- Shul G., Parent R., Mosqueda H.A., Bélanger D. Localized in situ generation of diazonium cations by electrocatalytic formation of a diazotization reagent // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2013. V. 5. № 4. P. 1468.
- Yáñez-Sedeño P., González-Cortés A., Campuzano S., Pingarrón J.M. Copper(I)-catalyzed click chemistry as a tool for the functionalization of nanomaterials and the preparation of electrochemical (bio)sensors // Sensors. 2019. V. 19. № 10. C. 2379.
- 20. *Menanteau T., Levillain E., Downard A.J., Breton T.* Evidence of monolayer formation via diazonium grafting with a radical scavenger: Electrochemical, AFM and XPS monitoring // Phys. Chem. Chem. Phys. 2015. V. 17. № 19. P. 13137.
- Nowicka A.M., Fau M., Rapecki T., Donten M. Polypyrrole-Au nanoparticles composite as suitable platform for DNA biosensor with electrochemical impedance spectroscopy detection // Electrochim. Acta. 2014. V. 140. P. 65.

- 22. Свалова Т.С., Малышева Н.Н., Бубекова А.К., Сайгушкина А.А., Медведева М.В., Козицина А.Н. Влияние способа иммобилизации рецепторного слоя на аналитические характеристики безметочного электрохимического иммуносенсора для определения антител к вирусу кори // Журн. аналит. химии. 2020. Т. 75. № 2. С. 162. (Svalova T.S., Malysheva N.N., Bubekova A.K., Saigushkina A.A., Medvedeva M.V., Kozitsina A.N. Effect of the method for immobilizing receptor layer on the analytical characteristics of a label-free electrochemical immunosensor for the determination of measles antibodies // J. Analyt. Chem. 2020. V. 75. № 2. P. 254.)
- Карякин А., Уласова Е., Вагин М., Карякина Е. Биосенсоры: устройство, классификация и функциональные характеристики // Сенсор. 2002. Т. 24. С. 1.
- 24. Svalova T.S., Saigushkina A.A., Medvedeva M.V., Malysheva N.N., Zhdanovskikh V.O., Kozitsin I.V., Kozitsina A.N. Modification of gold electrode via electrografting of the in situ generated 3-carboxy-1,2,4-triazoldiazonium salt for label-free determination of carcinoembryonic antigen // Electroanalysis. 2020. V. 32. № 4. P. 698.
- 25. Adenier A., Chehimi M. M., Gallardo I., Pinson J., Vilà N. Electrochemical oxidation of aliphatic amines and their attachment to carbon and metal surfaces // Langmuir. 2004. V. 20. № 19. P. 8243.
- 26. Yang G., Liu B., Dong S. Covalent modification of glassy carbon electrode during electrochemical oxidation process of 4-aminobenzylphosphonic acid in

aqueous solution // J. Electroanal. Chem. 2005. V. 585. N $_{2}$ 2. P. 301.

- 27. Randriamahazaka H., Ghilane J. Electrografting and controlled surface functionalization of carbon based surfaces for electroanalysis // Electroanalysis. 2016. V. 28. № 1. P. 13.
- Vanossi D., Benassi R., Parenti F., Tassinari F., Giovanardi R., Florini N., De Renzi V., Arnaud G., Fontanesi C. Functionalization of glassy carbon surface by means of aliphatic and aromatic amino acids. An experimental and theoretical integrated approach // Electrochim. Acta. 2012. V. 75. P. 49.
- 29. Yang G., Shen Y., Wang M., Chen H., Liu B., Dong S. Copper hexacyanoferrate multilayer films on glassy carbon electrode modified with 4-aminobenzoic acid in aqueous solution // Talanta. 2006. V. 68. № 3. C. 741.
- 30. Guerrero S., Agüí L., Yáñez-Sedeño P., Pingarrón J.M. Screen-printed gold electrodes functionalized with grafted p-aminobenzoic acid for the construction of electrochemical immunosensors. determination of TGF-β1 cytokine in human plasma // Electroanalysis. 2018. V. 30. № 7. P. 1327.
- 31. *Liu J., Cheng L., Liu B., Dong S.* Covalent modification of a glassy carbon surface by 4-aminobenzoic acid and its application in fabrication of a polyoxometalates-consisting monolayer and multilayer films // Langmuir. 2000. V. 16. № 19. P. 7471.

——— ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ ——

УДК 543.552,543.553,543.9

БИОСЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ ПЕРОКСИДАЗЫ ХРЕНА С РАЗЛИЧНЫМИ ТИПАМИ НАНОТРАНСДЪЮСЕРОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА

© 2021 г. К. Г. Николаев^{*a*}, С. С. Ермаков^{*b*}, Ю. Е. Ермоленко^{*b*}, Д. В. Наволоцкая^{*b*}, А. Оффенхойзер^{*c*}, Ю. Г. Мурзина^{*c*}, *

^аСанкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий,

механики и оптики ул. Ломоносова, 9, Санкт-Петербург, 191002 Россия ^bИнститут химии, Санкт-Петербургский государственный университет Университетская наб., 7/9, Санкт-Петербург, 199034 Россия ^cInstitute of Biological Information Processing (IBI-3) Forschungszentrum Jülich, Jülich, 52425 Germany *e-mail: y.mourzina@fz-juelich.de Поступила в редакцию 15.09.2020 г. После доработки 21.10.2020 г. Принята к публикации 02.11.2020 г.

Изучены методы *in situ* синтеза наноструктур золота на поверхности электродов и направленного электрохимического синтеза нанодендритов для создания биосенсоров на основе фермента пероксидазы хрена. Исследовано влияние наноструктурирования поверхности трансдъюсера и его последующей модификации на электроаналитические характеристики сенсоров для определения пероксида водорода. Использование данных методов позволяет существенно улучшить аналитические характеристики биосенсоров, такие как коэффициент чувствительности, предел обнаружения и стабильность в области микромолярных и субмикромолярных концентраций пероксида водорода. Для электродов, модифицированных с помощью метода *in situ* синтеза наноструктур с последующей обработкой реагентом Меервейна, а также для ультрамикроэлектродов, приготовленных методом направленного электрохимического синтеза, достигнуты низкие пределы обнаружения пероксида водорода 0.2 и 0.08 мкМ, а также высокие коэффициенты чувствительности 0.71 и 0.84 A M^{-1} см⁻² соответственно.

Ключевые слова: электрохимический биосенсор, модифицированный электрод, наноструктуры золота, пероксид водорода, пероксидаза, фермент. **DOI:** 10.31857/S0044450221040101

После изобретения в 1962 г. первого электрохимического ферментного сенсора для определения глюкозы [1] ведутся работы по иммобилизации ферментов, а также организации прямого и медиаторного переноса [2-5] для создания электрохимических ферментных биосенсоров. Наряду с интересом к пероксиду водорода как к самостоятельному аналиту, возможность использования его аналитического сигнала для определения таких веществ, как глюкоза, лактат, ацетилхолин, моноамины, являющихся субстратами соответствующих оксидоредуктаз [4, 6], способствовало развитию электрохимических сенсоров. Кроме того, сенсоры на пероксид водорода могут применяться для оценки антиоксидантной активности, а также для определения широкого круга токсичных аминов и фенолов в целях экологического контроля и мониторинга. Диапазоны определяемых концентраций пероксида водорода варьируются в широких пределах, от субмикромолярных и микромолярных до молярных [7, 8].

В настоящее время продолжаются разработки и исследования биосенсоров, основанных на явлении биоэлектрокатализа с использованием фермента пероксидазы хрена. Предложено несколько способов конструкции ферментных электродов: 1) модификация поверхности электрода адсорбированным или ковалентно связанным ферментом, 2) модификация поверхности электрода проводящими редокс-полимерами, в которых молекулы пероксидазы физически или химически связаны, 3) использование модифицированных композитных электродов, в которых молекулы пероксидазы однородно распределены в смеси проводящих и изоляционных материалов (на основе угольнопастовых электродов). Важным этапом являются серии работ, посвяшенных биосенсорам, основанным на ферменте пероксидазы, генетически модифицированном с целью повышения скорости прямого электронного переноса и стабильности электрода [2, 5].

Интересное направление в развитии биосенсоров – применение наноматериалов, в первую очередь, на основе металлов и углеродных материалов [9]. Применение наноматериалов в сочетании с биоэлектрокатализаторами позволило в ряде случаев реализовать схему прямого переноса в ферментных сенсорах, хотя ланные работы сопряжены со множеством артефактов [10, 11]. Кроме того, использование трехмерного наноструктурирования поверхностей позволяет увеличить эффективную поверхность электрода при практически одинаковой геометрической поверхности и, следовательно, увеличить чувствительность на единицу геометрической поверхности, а также повысить стабильность иммобилизованного фермента.

Наши предыдущие работы посвящены синтезу наноструктур золота с использованием олеиламина в качестве восстановителя и стабилизирующего агента (ОА-Аи НС), а также методам иммобилизации наноструктур на электроде и модификации поверхности для создания биосенсоров на основе пероксидазы [12–14]. В данной работе мы использовали следующие методы: 1) in situ синтез наноструктур непосредственно на поверхности электрода в сочетании с обработкой поверхности электрода реагентом Меервейна (активация поверхности) и 2) направленный электрохимический синтез нанодендритов в качестве ультрамикроэлектродов (УМЕ) для создания биосенсоров на основе пероксидазы.

Настоящая работа посвящена сравнению аналитических характеристик различных типов сенсоров на основе наноструктурированных трансдъюсеров с целью изучения влияния способа наноструктурирования поверхности трансдъюсера на аналитические характеристики сенсоров (коэффициент чувствительности, предел обнаружения, диапазон определяемых концентраций, воспроизводимость и стабильность отклика).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты и аппаратура. Использовали трехэлектродную электрохимическую ячейку и потенциостат AUTOLAB (PGSTAT 302, Нидерланды). Диаметр рабочего электрода в электрохимической ячейке для измерений с тонкопленочными электродами составлял 0.5 см. Объем ячейки для измерений УМЕ, полученных методом направленного электрохимического синтеза, составлял 100 мкл. Применяли хлоридсеребряный электрод сравнения Ag/AgCl (DRIREF-450, WPI), вспомогательным электродом являлся платиновый электрод.

Фермент пероксидаза хрена (тип VI-A) (ПХ), цистеамин, глутаровый альдегид, пероксид водорода, тетрахлорид золота(III) тригидрат и другие реактивы классификации ос. ч. приобретали у Sigma-Aldrich (США).

Наноструктурированные поверхности электродов анализировали методом сканирующей электронной микроскопии с использованием системы Magellan [™] XHR SEM.

Методы синтеза наноструктур. Золотые тонкопленочные электроды Si/SiO_2 (1 мкм)/Ti (10 нм)/Au (400 нм), 11 мм × 11 мм (**TПЭ**) для модификации наноструктурами золота in situ получали в чистой комнате класса ISO 5, как описано в работе [15]. Перед модификацией наноструктурами проводили химическую и электрохимическую очистку электродов, как описано в работе [12].

Модификацию предварительно очищенных электродов наноструктурами золота, стабилизированными олеиламином, проводили двумя способами: 1) адсорбцией заранее синтезированных наноструктур, как описано в работах [13, 14], 2) методом синтеза in situ путем помещения ТПЭ в колбу для синтеза по модифицированной методике, описанной в работах [16, 17]. В данной работе электроды для модификации in situ помещали в раствор для синтеза на 12 ч перед началом нагревания с обратным холодильником, что улучшало адгезию и стабильность наноструктур на поверхности тонких пленок. В колбу для синтеза с ТПЭ добавляли гомогенизированную смесь 35 мг тригидрата тетрахлорида золота, 400 мкл олеиламина и 40 мл толуола и оставляли на 12 ч. Далее смесь медленно нагревали до 105-110°С и выдерживали при этой температуре 35 мин, пока цвет раствора не становился слабо розовым, что свидетельствовало о начале образования наночастиц золота. После снижения температуры раствора до комнатной закрытый раствор оставляли на сутки, потом добавляли 25 мг аскорбиновой кислоты, что способствует образованию нанопроволок из наночастиц по механизму ориентированного присоединения наночастиц [18]. Раствор с электродами оставляли на сутки в темноте, при этом цвет раствора постепенно приобретал темно-фиолетовую окраску, после чего электроды промывали этанолом, водой и ацетоном.

В данной работе для удаления оболочки органических аминов на поверхности наноструктур с целью их последующего использования для иммобилизации фермента пероксидазы и электрохимических экспериментов использовали гексан и обработку в плазме кислорода (diener electronic), а также реагент Меервейна (тетрафторборат

триэтилоксония, $[(CH_3CH_2)_3O]^+BF_4^-$ в качестве окислителя [15, 19]. Модифицированные наночастицами золота электроды погружали в 0.1 М раствор реагента Меервейна в ацетонитриле на 10 мин, после чего промывали ацетонитрилом и водой.

Для синтеза наноструктурированных УМЭ использовали метод направленнго электрохимиче-



Рис. 1. Схема биосенсора на основе электрода, модифицированного пероксидазой, (а) и механизм отклика сенсора (б). Q – хинон, окисленная форма медиатора. Хинон восстанавливается на электроде, создавая катодный ток в качестве сигнала сенсора в схеме медиаторного переноса электронов.

ского синтеза нанодендритов из 0.01 М растворов тетрахлорида золота [20, 21].

Эффективную площадь поверхности электродов рассчитывали по пику восстановления оксидов золота из циклических вольтамперограмм в 0.1 M H₂SO₄ [20].

Иммобилизацию пероксидазы на поверхности электрода проводили методом ковалентного связывания фермента на поверхности тонкопленочных электродов, модифицированных наноструктурами золота, и наноструктурированных УМЭ. Для этого использовали метод хемосорбции тиольных групп цистеамина на поверхности золота, образующих самоорганизующиеся слои. Электроды, модифицированные наноструктурами золота, оставляли на 2 ч в 1 мМ растворе цистеамина в гексане при комнатной температуре; УМЭ оставляли на 30 мин в 1 мМ растворе цистеамина в гексане. Электроды промывали гексаном и 0.1 М фосфатным буферным раствором (ФБ) с рН 6.8. Далее проводили иммобилизацию гомобифункционального сшивающего реагента глутарового альдегида из его 2%ного раствора в 0.1 М ФБ в течение 2 ч при комнатной температуре, затем электроды промывали ФБ. Далее электроды помещали в раствор пероксидазы с концентрацией 5 мг/мл и оставляли на 20 мин при 25°С, а потом еще на 12 ч в при 4°С. Электроды промывали 0.1 М ФБ (pH 6.5) и хранили при 4°С во влажной атмосфере. На рис. 1 приведена схема модифицированного электрода. Электрохимические измерения проводили в 0.1 М ФБ, который содержал 1 мМ гидрохинона в качестве медиатора.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Микрофотографии наноструктур, использованных в данной работе для получения сенсоров на пероксид водорода, представлены на рис. 2а и 2б. Тонкопленочные электроды, модифицированные наноструктурами золота (**ОА-Аи HC**) in situ, до и после обработки реагентом Меервейна показывают образование на поверхности структур двух типов: стабилизированных олеиламином наночастиц (**ОА-Аи НЧ**) и ультратонких нанопроволок (**ОА-Аи НП**). На рис. 2в представлен образец нанодендритного золотого УМЭ, полученного методом направленного электрохимического синтеза нанопроволок.

Результаты электронной микроскопии свидетельствуют о том, что полученная методом in situ синтеза наноструктурированная поверхность сохраняется и после обработки реагентом Меервейна. Такая обработка приводит, с одной стороны, к частичной агрегации наноструктур, а с другой, – к удалению гидрофобной оболочки, что делает наноструктурированную поверхность доступной для дальнейшей модификации с целью получения электрохимических биосенсоров. В других экспериментах для удаления стабилизатора наноструктур с поверхности использовали очистку органическими растворителями и обработку в плазме кислорода, что привело к худшим результатам. Данные электронной микроскопии подтверждены результатами электрохимических измерений (рис. 3а), в которых определена эффективная площадь поверхности электродов при одинаковой геометрической площади, задаваемой электрохимической ячейкой. Эффективная площадь поверхности золотых электродов в зависимости от обработки поверхности составила 0.29 ± 0.01 см² для немодифицированного ТПЭ, 0.88 ± 0.16 см² для наноструктурированного электрода с обработкой поверхности после синтеза этанолом, водой и ацетоном, $1.4 \pm 0.08 \text{ см}^2$ при дополнительной обработке поверхности реагентом Меервейна и $(0.1 \pm 0.005) \times$ $\times 10^{-3}$ см² для УМЭ. Очевидно, что модификация наноструктурами и удаление органического стабилизатора наноструктур с поверхности электрода приводит к увеличению эффективной площади поверхности электрода.

Ковалентная иммобилизация ферментов на поверхности электрода улучшает стабильность и



Рис. 2. Микрофотографии наноструктур: (a) – поверхность тонкопленочного электрода, модифицированного наноструктурами золота in situ, без обработки поверхности; (б) – то же с обработкой поверхности реагентом Меервейна; (в) – нанодендритный золотой УМЭ, полученный методом направленного электрохимического синтеза, вставка показывает электрод с изоляцией и находящимися под слоем изолятора контактами.



Рис. 3. Циклические вольтамперограммы, полученные для (a): *1* – золотого тонкопленочного электрода, *2* – золотого тонкопленочного электрода, модифицированного наноструктурами in situ, без обработки поверхности, *3* – электрода *2* с последующей обработкой поверхности этанолом и ацетоном, *4* – электрода *2* с последующей обработкой поверхности от Аи-ультрамикроэлектрода. 0.1 М H₂SO₄, 0.05 B/c.

воспроизводимость модифицированных электродов по сравнению с адсорбцией. В связи с этим в данной работе пероксидазу иммобилизовали на электродах, как описано в "Экспериментальной части" в разделе "Иммобилизация пероксидазы на поверхности электрода" и показано на рис. 1.

Исследовали отклики сенсора на основе прямого электронного переноса и с участием медиатора. Однако стабильного и воспроизводимого прямого электронного переноса между каталитическим центром фермента и электродами не происходит, поэтому электрокаталитические свойства сенсора для определения пероксида водорода оценивали путем определения пероксида водорода в присутствии редокс-медиатора [7, 13]. Для электродов, модифицированных пероксидазой, зависимость тока восстановления медиатора от концентрации пероксида водорода иллюстрирует рис. 1, при этом зависимость линейна в условиях лимитирующей стадии массопереноса.

Для сравнения аналитических характеристик сенсоров использовали следующие параметры: предел обнаружения, коэффициент чувствительности, линейный диапазон определяемых концентраций, воспроизводимость и стабильность отклика сенсоров [22, 23]. Предел обнаружения находили в соответствии с рекомендациями ICH [22] как 3.3s/b, где s – стандартное отклонение измерений в фоновом растворе без пероксида водорода, b – наклон градуировочной зависимости в диапазоне низких концентраций.

На рис. 4 приведены примеры отклика сенсоров на изменение концентрации пероксида водорода (градуировочные кривые). Можно заметить, что для электродов с наноструктурированной поверхностью токи восстановления окисленного медиатора значительно выше по сравнению с модифицированным пероксидазой ТПЭ. Это можно объяснить большим количеством электроактивного фермента, иммобилизованного на наноструктурированных электродах по сравнению с ТПЭ. Соответственно коэффициенты чувствительности, найденные по наклону градуировочного графика в диапазоне линейной зависимости отклика сенсора от концентрации пероксида водорода, имеют более высокие значения от 0.22 до $0.84 \text{ A M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ для электродов с наноструктурированными поверхностями по сравнению с $0.06 \text{ A M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ для ТПЭ, модифицированного пероксидазой (табл. 1). Как видно из рис. 4 и табл. 1, сенсоры на основе пероксидазы, иммобилизованной на наноструктурированных электродах, демонстрируют гораздо лучшие характеристики чувствительности, более широкие диапазоны рабочих концентраций и более низкие пределы обнаружения. Наилучшие характеристики, наиболее низкие пределы обнаружения 0.2 и 0.08 мкМ, а также высокие коэффициенты чувствительности получены для модифицированных электродов с наноструктурами, синтезированными в настоящей работе непосредственно на поверхности электрода in situ с последующей обработкой реагентом Меервейна, и для УМЭ, приготовленных методом направленного электрохимического синтеза наноструктур, соответственно. Такие результаты можно объяснить большей стабильностью и более высокой плотностью наноструктур при их синтезе методом in situ, а также более эффективным удалением изолирующей оболочки стабилизатора, что

позволило иммобилизовать большее количество электроактивного фермента на единицу площади. Теоретическая оценка максимальной чувствительности электорода составила 1 А M^{-1} сm⁻² для диффузионного режима, когда ток лимитируется массопереносом H_2O_2 [7, 30]. Из табл. 1 видно, что полученные сенсоры на основе наноструктурированных поверхностей электродов обладают высокими коэффициентами чувствительности, сравнимыми с указанной теоретической оценкой.

Влияние рН на отклик сенсора иллюстрирует рис. 5. Диапазон рН отражает оптимальные условия как для ферментативных, так и для электрохимических реакций на электродах с ковалентно иммобилизованными ферментами и может отклоняться от диапазона pH ферментативных реакций в растворах, найденных другими методами. Абсолютное значение тока восстановления возрастает с увеличением рН от 4.0 до ~7.0. Чуть более широкий интервал рН наблюдается для электродов на основе нанопроволок (рис. 5, кривые 4 и 5). Это может быть связано с тонкой многослойной структурой поверхности нанопроволочных электродов и эффектом зарядов и электрического поля двойного слоя на поверхностях нанопроволок, влияющих на протонирование функциональных групп молекул. При низких значениях рН отклик сенсора ухудшается, что может быть связано с денатурацией фермента. Поскольку максимальные абсолютные значения токов восстановления достигаются между рН 6.0 и 7.0, далее работали в этом интервале рН.

Воспроизводимость сенсоров оценивали с помощью измерений их отклика в 100 мкМ H_2O_2 и 2 мкМ H_2O_2 для Au-УМЕ/ПХ. Относительное стандартное отклонение пяти последовательных измерений для одного сенсора составило 3–6%. Результаты изучения долгосрочной стабильности сенсоров при хранении в ФБ при рН 6.5 и 4°С приведены на рис. 6 и в табл. 1.

Селективность биосенсоров изучали по отношению к ряду веществ с целью оценки их влияния на аналитический сигнал. Найдено, что определению 50 мкМ H_2O_2 не мешают равные концентрации допамина, мочевой кислоты, γ -аминомасляной кислоты, 2.5 мМ растворов глюкозы и фруктозы. Равные концентрации аскорбиновой кислоты вызывают уменьшение сигнала сенсоров до 6%, что можно объяснить реакцией аскорбиновой кислоты с пероксидом водорода и возможным восстановлением окисленной формы медиатора, QH[•] или Q, аскорбиновой кислотой.

Таким образом, биосенсоры на основе наноструктурированных электродов, модифицированных пероксидазой, демонстрируют более низкие пределы обнаружения, высокую чувствительность (табл. 1), а также более высокую долговременную стабильность по сравнению с модифицированным ТПЭ. Показано, что обработка поверхности на-

3

0.0015

2



Рис. 4. (а) Примеры отклика сенсоров. $c(H_2O_2)$, мМ: 1, 2-0; 3, 4-0.5. 1, 3 – Au TП \ni /ПX; 2, 4 – Au TП \ni /in situ OA-Au НС с обработкой реагентом Меервейна/ПХ. 0.1 М фосфатный буферный раствор, pH 6.8, 0.05 В/с. (б) Градуировочные зависимости биосенсоров на основе ковалентно иммобилизованного фермента пероксидазы хрена: $1 - Au T\Pi \Im / \Pi X$, 2 – Аи ТПЭ/Ц-НЧ (наночастицы, стабилизированные цитратом)/ПХ, 3 – Аи ТПЭ/ОА-НЧ/ПХ, 4 – Аи ТПЭ/ОА-НП/ПХ, 5 – Au ТПЭ/in situ Au OA-HC/ПХ с обработкой реагентом Меервейна. 0.1 М фосфатный буферный раствор, pH 6.8, 0.05 B/c. (в) Au-УМЕ/ПХ, на вставке изображена амперометрическаяю кривая. На кривых отмечены доверительные интервалы для P = 0.95, n = 5.

ночастиц и ультратонких нанопроволок окислителем – реагентом Меервейна с последующей иммобилизацией фермента дополнительно улучшает свойства биосенсоров на основе пероксидазы. Лучшие характеристики биосенсоров на основе наноструктур можно объяснить, во-первых, увеличением эффективной площади поверхности и, как следствие, большим количеством иммобилизованного активного фермента на единицу геометрической поверхности. Во-вторых, наноструктуры обеспечивают благоприятную поверхность для сохранения биокаталитической активности ферментов. Сенсоры на основе пероксидазы, иммобилизованной на нанодендритных Аи-УМЕ, позволяют достичь наиболее низких пределов обнаружения и высокой чувствительности при проведении измерений в амперометрическом режиме, демонстрируя при этом незначительно меньшую стабильность на протяжении 30 дней. Последнее, вероятно, связано с большей нестабильностью наноструктурных дендритов в структуре УМЕ.

Отметим, что значения пределов обнаружения около 10 нМ встречаются в нескольких работах, посвященных как биосенсорам на основе пероксидазы, так и нанозимам Fe₃O₄ и берлинской лазури [31-33]. Однако следует подчеркнуть, что приготовление растворов данных концентраций даже методом добавок более концентрированных растворов непосредственно в измерямый раствор может сопровождаться достаточно большой погрешностью, так как скорость реакции диспропорционирования пероксида водорода с образованием кислорода может увеличиться на несколько порядков в зависимости от присутствия малейших примесей, в том числе металлов из стенок стеклянной посуды. Более того, в ряде случаев может образовываться озон. Изменения концетраций кислорода или озона в таких случаях

НИКОЛАЕВ и др.

	1				
Трансдъюсер/сенсорный элемент	Коэффициент чувствительности, А М ⁻¹ см ⁻²	Предел обнаружения, мкМ	Линейный диапазон, мкМ	Стабильность, %/метод детектирования	Литература
Тонкая пленка Au (400 нм)/перокси- даза	$0.13 \ (R^2 = 0.9421)^1$	16 ^{2, 3}	18-210	82 ⁴ /ЦВ, -0.07 В	[13]
Наночастицы Au (стабилизирующий агент — олеиламин, 10—14 нм)/перок- сидаза	$0.53 \ (R^2 = 0.9595)^1$	8 ^{2, 3}	10-240	91 ⁴ /ЦВ, -0.07 В	[13]
Наночастицы Au (стабилизирующий агент – цитрат, 15–19 нм)/пероксидаза	$0.34 \ (R^2 = 0.9224)^1$	10 ^{2, 3}	16-200	90 ⁴ /ЦВ, -0.07 В	[14]
Нанопроволоки Au (стабилизирующий агент — олеиламин, диаметр 2—5 нм, длина 1—5 мкм)/пероксидаза	$0.60 \ (R^2 = 0.9632)^1$	5 ^{2, 3}	10-250	91 ⁴ /ЦВ, -0.07 В	[13]
Смешанные наноструктуры Au (синтез in situ, нанопроволоки диаметр 2– 15 нм, длина 0.5–2 мкм; наночастицы 10–14 нм), активация реагентом Меер- вейна/пероксидаза	$0.71 \ (R^2 = 0.9822)$	0.2 ^{2, 3}	0.14-200	92 ⁴ / ЦВ, -0.07 В	Данная работа
Нанодендриты (100-1000 нм)/перок- сидаза	$0.84 (R^2 = 0.9758) 0.35 (R^2 = 0.9753)$	0.08 ^{2, 3}	0.1-2 2-10	89 ⁵ / A, -0.07 B	Данная работа
Углеродное волокно/графен /гемогло- бин	1.4	2	8-214	>1 мес/А, -0.5 В	[24]
Стеклоуглеродный электрод/ZnO, наночастицы Au, пероксидаза, нафион	-	9	15-1100	−/A, −0.3 B	[25]
Электрод Au/рекомбинантные формы пероксидазы	1.5	0.01	_	$t_{1/2} = 72 - 96 \text{ y/A},$ -0.05 B	[5, 26]
Стеклоуглеродный электрод/перокси-	_	-	0.005-0.05	-/A, 0 B	[27]
даза в электронопроводящем редокс- полимере с включением комплексов осмия(III/II) в качестве медиатора	1		0.1–100	 –/вращающийся дисковый электрод, 0 В 	[28]
Смешанный оксид индия—олова/ Ag—С нанокомпозитный материал типа ядро—оболочка, пероксидаза	_	0.2	0.5–140	92 (1 мес)/А, -0.3 В	[29]

Таблица 1. Характеристики электрохимических биосенсоров на основе пероксидазы с различными типами нанотрансдъюсеров для определения пероксида водорода

Обозначения: "—" — информация отсутствует, ЦВ — циклическая вольтамперометрия, А — амперометрия. ¹В предыдущей работе была допущена расчетная ошибка, которая исправлена в данной работе. Для этих сенсоров приведены значения коэффициента чувствительности и диапазон концентраций, который может быть описан линейной зависимостью со значением коэффициента детерминации R^2 , близким к единице; ²3.3*s*/*b*; ³относительное стандартное отклонение вблизи предела обнаружения составляет 9–12%; ⁴в % от отклика сенсора в 50 мкМ H₂O₂ через 1 мес после изготовления по сравнению с новым сенсором; ⁵в % от отклика сенсора в 1 мкМ H₂O₂ через 1 мес после изготовления.

могут вносить вклад в отклик сенсора, приводя к понижению кажущегося предела обнаружения пероксида водорода.

* * *

Таким образом, предложены методы in situ синтеза наноструктур золота на поверхности

электродов и направленного электрохимического синтеза нанодендритов в качестве ультрамикроэлектродов для создания биосенсоров на основе пероксидазы. Показано, что активации поверхности наноструктур золота с помощью реагента Меервейна позволяет увеличить эффективную площадь поверхности электродов для последующей иммобилизации пероксидазы. Разработаны

356

ЖУРНАЛ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ том 76 № 4 2021



Рис. 5. Зависимость отклика сенсоров от pH раствора: *1* – Au TПЭ/ПХ, *2* – Au TПЭ/Ц-Au HЧ/ПХ, *3* – Au TПЭ/OA-Au HЧ/ПХ, *4* – Au TПЭ/OA-Au HЧ/ПХ, *5* – Au TПЭ/in situ OA-Au HC/ПХ с обработкой реагентом Меервейна в присутствии медиатора и 200 мкМ H₂O₂, *6* – Au-УМЕ/ПХ, в присутствии медиатора и 80 мкМ H₂O₂.

электрохимические биосенсоры для определения пероксида водорода с пределами обнаружения 0.2и 0.08 мкМ и коэффициентами чувствительности 0.71 и 0.84 А M^{-1} см⁻² для электродов, модифицированных методом in situ синтеза наноструктур в сочетании с активацией их поверхности реагентом Меервейна, и для УМЭ, приготовленных методом направленного электрохимического синтеза, соответственно. Результаты изучения влияния на электроаналитические характеристики пероксидазных биосенсоров наноструктурирования поверхности трансдьюсера и его последую-



Рис. 6. Стабильность сенсоров (% от отклика сенсоров в 50 мкМ растворе H_2O_2 по сравнению с первоначальным откликом): $1 - Au T\Pi \Im/\Pi X$, $2 - Au T\Pi \Im/\Pi Au HY/\Pi X$, $3 - Au T\Pi \Im/OA-Au HY/\Pi X$, $4 - Au T\Pi \Im/OA-Au H\Pi/\Pi X$, $5 - Au T\Pi \Im/in situ OA-Au HC/\Pi X$ с обработкой реагентом Меервейна, $6 - Au YME/\Pi X$. рH 6.8.

щей модификации показали, что предложенные методы позволяют их улучшить.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 20-13-00143.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Clark L.C., Jr., Lyons C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1962. V. 102. P. 29.
- Ruzgas T., Lindgren A., Gorto L., Hecht H.-J., Reichelt J., Bilitewski U. Electrochemistry of peroxidases / Electroanalytical Methods for Biological Materials / Eds. Brajter-Toth A., Chambers J.Q. USA: Marcel Dekker, Inc., 2002. P. 233.
- 3. Будников Г.К., Евтюгин Г.А., Майстренко В.Н. Амперометрические биосенсоры / Модифицированные электроды для вольтамперометрии в химии, биологии и медицине. М.: Бином, 2012. 226 с.
- 4. Оленин А.Ю. Методы неферментативного определения пероксида водорода и связанных с ним активных форм кислорода // Журн. аналит. химии. 2017. V. 72. № 3. Р. 195. (Olenin A. Yu. Methods of nonenzymatic determination of hydrogen peroxide and related reactive oxygen species // J. Anal. Chem. 2017. V. 72. № 3. Р. 243.)
- 5. Преснова Г.В., Рубцова М.Ю., Егоров А.М. Электрохимические биосенсоры на основе пероксидазы хрена // Журн. Рос. хим. об-ва им Д.И. Менделеева. 2008. V. 52. № 2. Р. 60.
- 6. Вохмянина Д.В., Карякина Е.Е., Андреев Е.А., Карякин А.А. Мультибиосенсор на основе берлинской лазури для одновременного определения глюкозы и лактата в тонкослойной проточно-инжекционной системе // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Химия. 2018. V. 59. № 5. С. 337. (Vokhmyanina D.V., Karyakina E.E., Andreev E.A., Karyakin A.A. Prussian blue-based thinlayer flow-injection multibiosensor for simultaneous

determination of glucose and lactate // Mosc. Univ. Chem. Bull. 2018. V. 73. № 5. P. 216.)

- Ruzgas T., Csöregi E., Emnéus J., Gorton L., Marko-Varga G. Peroxidase-modified electrodes: Fundamentals and application // Anal. Chim. Acta. 1996. V. 330. № 2. P. 123.
- Giorgio M., Trinei M., Migliaccio E., Pelicci P.G. Hydrogen peroxide: A metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2007. V. 8. № 9. P. 722.
- 9. Brainina K., Stozhko N., Bukharinova M., Vikulova E. Nanomaterials: Electrochemical properties and application in sensors // Phys. Sci. Rev. 2018. V. 3. № 9. P. 20188050.
- Bartlett P.N., Al-Lolage F.A. There is no evidence to support literature claims of direct electron transfer (DET) for native glucose oxidase (GOx) at carbon nanotubes or graphene // J. Electroanal. Chem. 2018. V. 819. P. 26.
- Wilson G.S. Native glucose oxidase does not undergo direct electron transfer // Biosens. Bioelectron. 2016. V. 82. P. vii.
- Koposova E., Kisner A., Shumilova G., Ermolenko Y., Offenhäusser A., Mourzina Y. Oleylamine-stabilized gold nanostructures for bioelectronic assembly. Direct electrochemistry of cytochrome C // J. Phys. Chem. C. 2013. V. 117. № 27. P. 13944.
- Koposova E., Liu X., Kisner A., Ermolenko Y., Shumilova G., Offenhaeusser A., Mourzina Y. Bioelectrochemical systems with oleylamine-stabilized gold nanostructures and horseradish peroxidase for hydrogen peroxide sensor // Biosens. Bioelectron. 2014. V. 57. P. 54.
- Koposova E., Shumilova G., Ermolenko Y., Kisner A., Offenhaeusser A., Mourzina Y. Direct electrochemistry of cyt c and hydrogen peroxide biosensing on oleylamineand citrate-stabilized gold nanostructures // Sens. Actuators B. 2015. V. 207. P. 1045.
- Nikolaev K., Ermakov S., Ermolenko Y., Averyaskina E., Offenhausser A., Mourzina Y. A novel bioelectrochemical interface based on in situ synthesis of gold nanostructures on electrode surfaces and surface activation by Meerwein's salt. A bioelectrochemical sensor for glucose determination // Bioelectrochemistry. 2015. V. 105. P. 34.
- Muratova I.S., Mikhelson K.N., Ermolenko Y., Offenhausser A., Mourzina Y. On "resistance overpotential" caused by a potential drop along the ultrathin high aspect ratio gold nanowire electrodes in cyclic voltammetry // J. Solid State Electrochem. 2016. V. 20. № 12. P. 3359.
- 17. Muratova I.S., Mikhelson K.N., Ermolenko Y.E., Offenhausser A., Mourzina Y. Chemiresistors based on ultrathin gold nanowires for sensing halides, pyridine and dopamine // Sens. Actuators B. 2016. V. 232. № P. 420.
- 18. Kisner A., Heggen M., Mayer D., Simon U., Offenhaeusser A., Mourzina Y. Probing the effect of surface chemistry on the electrical properties of ultrathin gold nanowire sensors // Nanoscale. 2014. V. 6. № 10. P. 5146.
- Rosen E.L., Buonsanti R., Llordes A., Sawvel A.M., Milliron D.J., Helms B.A. Exceptionally mild reactive stripping of native ligands from nanocrystal surfaces by using Meerwein's salt // Angew. Chem. Int. Ed. 2012. V. 51. № 3. P. 684.
- 20. Nikolaev K.G., Maybeck V., Neumann E., Ermakov S.S., Ermolenko Y.E., Offenhausser A., Mourzina Y.G. Bime-

tallic nanowire sensors for extracellular electrochemical hydrogen peroxide detection in HL-1 cell culture // J. Solid State Electrochem. 2018. V. 22. № 4. P. 1023.

- 21. Nikolaev K.G., Ermolenko Y.E., Offenhausser A., Ermakov S.S., Mourzina Y.G. Multisensor systems by electrochemical nanowire assembly for the analysis of aqueous solutions // Front. Chem. 2018. V. 6. № 256.
- 22. ICH Harmonized tripartite guideline. Validation of analytical procedures: Text and methodology. Q2(R1).
- Currie L.A., Svehla G. Nomenclature for the presentation of results of chemical analysis (IUPAC Recommendations 1994) // Pure Appl. Chem. 1994. V. 66. № 3. P. 595.
- Bai J., Wu L., Wang X., Zhang H.-M. Hemoglobingraphene modified carbon fiber microelectrode for direct electrochemistry and electrochemical H₂O₂ sensing // Electrochim. Acta. 2015. V. 185. P. 142.
- 25. Xiang C., Zou Y., Sun L.-X., Xu F. Direct electrochemistry and enhanced electrocatalysis of horseradish peroxidase based on flowerlike ZnO–gold nanoparticle– Nafion nanocomposite // Sens. Actuators B. 2009. V. 136. № 1. P. 158.
- Ferapontova E.E., Grigorenko V.G., Egorov A.M., Börchers T., Ruzgas T., Gorton L. Mediatorless biosensor for H₂O₂ based on recombinant forms of horseradish peroxidase directly adsorbed on polycrystalline gold // Biosens. Bioelectron. 2001. V. 16. № 3. P. 147.
- Prasad A., Kumar A., Suzuki M., Kikuchi H., Sugai T., Kobayashi M., Pospíšil P., Tada M., Kasai S. Detection of hydrogen peroxide in Photosystem II (PSII) using catalytic amperometric biosensor // Front. Plant Science. 2015. V. 6. № 862.
- 28. Vreeke M., Maidan R., Heller A. Hydrogen peroxide and beta-nicotinamide adenine dinucleotide sensing amperometric electrodes based on electrical connection of horseradish peroxidase redox centers to electrodes through a three-dimensional electron relaying polymer network // Anal. Chem. 1992. V. 64. № 24. P. 3084.
- Mao S., Long Y., Li W., Tu Y., Deng A. Core-shell structured Ag@C for direct electrochemistry and hydrogen peroxide biosensor applications // Biosens. Bioelectron. 2013. V. 48. P. 258.
- Heller A. Electrical connection of enzyme redox centers to electrodes // J. Phys. Chem. 1992. V. 96. № 96. P. 3579.
- Wie. H, Wang E. Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): next-generation artificial enzymes // Chem. Soc. Rev. 2013. V. 42. P. 6060.
- Karyakin A.A., Puganova E.A., Bolshakov I.A., Karyakina E.E. Electrochemical Sensor with Record Performance Characteristics // Angew. Chem. Int. Ed. 2007. V. 46. P. 7678.
- 33. Tolstoy V.P., Gulina L.B., Golubeva A.A., Ermakov S.S., Gurenko V.E., Navolotskaya, D.V., Vladimirova N.I., Koroleva A.V. Thin layers formed by the oriented 2D nanocrystals of birnessite-type manganese oxide as a new electrochemical platform for ultrasensitive nonenzymatic hydrogen peroxide detection // J. Solid State Electrochem. 2019. V. 23. P. 573.

УДК 543.51/54.027/638.166

ОТНОШЕНИЯ СТАБИЛЬНЫХ ИЗОТОПОВ ¹³С/¹²С И ¹⁵N/¹⁴N В ОБРАЗЦАХ ПОДМОРА МЕДОНОСНЫХ ПЧЕЛ И В ПРОДУКТАХ ИХ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ

© 2021 г. Д. А. Калашникова^{а, *}, Г. В. Симонова^а

^аИнститут мониторинга климатических и экологических систем Сибирского отделения Российской академии наук просп. Академический, 10/3, Томск, 634055 Россия

> **e-mail: terrezaprk@mail.ru* Поступила в редакцию 27.08.2020 г. После доработки 23.10.2020 г. Принята к публикации 27.10.2020 г.

Проведен анализ изотопного состава углерода (δ^{13} С) и азота (δ^{15} N) в образцах подмора медоносных пчел и в продуктах пчеловодства (мед, пыльцевая обножка, воск, прополис), приобретенных как на медовых ярмарках, так и непосредственно на пасеках в Томской области, а также для сравнения в Алтайском и Краснодарском краях, Калужской и Кемеровской областях. Цель исследования — вы-явление индикаторной способности соотношений стабильных изотопов углерода 13 C/ 12 C и азота 15 N/ 14 N при контроле экологического состояния территорий, охватывающих ареал обитания медоносных пчел, а также при контроле пищевых продуктов (мед, пыльцевая обножка). Изотопный анализ выполняли методом изотопной масс-спектрометрии с использованием изотопного масс-спектрометра DELTA V Advantage (Thermo Fisher Scientific, Германия).

Ключевые слова: медоносные пчелы, продукты пчеловодства, изотопная масс-спектрометрия, стабильные изотопы, $\delta^{13}C$, $\delta^{15}N$.

DOI: 10.31857/S004445022104006X

В настоящее время стабильные изотопы находят широкое применение в исследовательских работах в большинстве областей науки [1]. Естественные вариации содержания стабильных изотопов очень информативны, они могут служить ценными нерадиоактивными источниками информации о том, как сегодня и в прошлом взаимодействовали объекты окружающей среды при климатических и экологических изменениях в экосистемах. Развитие методов мониторинга окружающей среды с использованием высокочувствительных биоиндикаторов в сочетании с изотопной масс-спектрометрией является актуальным направлением исследований.

Использование пчел и продуктов пчеловодства в качестве биоиндикаторов загрязнения окружающей среды при решении экологических проблем стало возможным после установления способности пчелосемей аккумулировать поллютанты в организме пчел-сборщиц [2]. Качество продукции жизнедеятельности пчел зависит от места расположения пасеки. Апимониторинг (оценка состояния окружающей среды с использованием медоносных пчел и продуктов пчеловодства) в нашей стране в последние два десятилетия осуществлялся в основном на загрязненность тяжелыми металлами в Московской, Рязанской, Новосибирской, Ростовской, Смоленской и Пермской областях, в Республике Башкортостан [3, 4]. В Томской области такие исследования не проводились.

В качестве индикаторов состояния экосистемы можно использовать изотопный состав азота ($\delta^{15}N$) и углерода ($\delta^{13}C$). Если величины $\delta^{15}N$ и $\delta^{13}C$ для растений-медоносов зависят от среды обитания, то и для пчел в разных местах обитания, и для продуктов их жизнедеятельности изотопные отношения должны различаться [5].

Основная цель настоящего исследования заключалась в анализе величин δ^{15} N и δ^{13} C в образцах подмора медоносных пчел и продуктах их жизнедеятельности (мед, пыльцевая обножка, воск, прополис) с целью выявления их индикаторной способности при мониторинге экологического состояния территорий, охватывающих ареал обитания медоносных пчел, а также при контроле пищевых продуктов (мед, пыльцевая обножка).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объекты исследования. В 2019 г. были отобраны образцы пыльцевой обножки, подмора пчел, воска, прополиса и меда как на медовых ярмарках, так и непосредственно на пасеках, располагающихся на территории Томской области. Для сравнения были приобретены образцы продуктов жизнедеятельности пчел из Алтайского и Краснодарского краев, Кемеровской и Калужской областей. Всего было собрано 26 образцов меда (14 чистых медов и 12 образцов меда в сотах), 16 образцов воска, 14 образцов пыльцевой обножки, 15 образцов прополиса и 16 образцов подмора пчел.

Методы исследования. Изотопный состав углерода и азота определяли методом изотопной масс-спектрометрии легких элементов [1] с использованием изотопного масс-спектрометра DELTA V Advantage, совмещенного с элементным анализатором Flash 2000 (Thermo Fisher Scientific, Германия), оснащенным окислительно-восстановительным реактором (приборы предоставлены центром коллективного пользования ТомЦКП СО РАН). Образцы подмора пчел очищали от пыльцы и высушивали при 70°С в течение 48 ч, а пробы воска, прополиса, меда и пыльцевой обножки выдерживали в эксикаторе 48 ч (осушитель пентаоксид фосфора). Экспериментально установили, что влажность меда не влияет на фракционирование изотопов углерода в меде. Образцы майского (раннего, весеннего с влажностью 21%) и июльского (летнего с влажностью 19%) медов выдерживали в эксикаторе в течение 6 дней. Изменение массы образцов составило менее 1%. Изотопный анализ углерода определяли на третьи и шестые сутки. Вариация величины δ^{13} С на третьи и шестые сутки составила $\pm 0.1\%$, что находится в пределах погрешности измерений.

Все образцы измельчали, после чего навеску образца помешали в оловянные капсулы (олово высокой степени чистоты). Оптимальная масса навески образца для изотопного анализа углерода составляет 500-600 мкг, для изотопного анализа азота белковой фракции меда и пыльцевой обножки — 1000 мкг, для изотопного анализа азота подмора пчел – 200 мкг, прополиса – 5 мг. Запакованные в капсулы образцы загружали в автосамплер элементного анализатора Flash 2000. Капсула попадала в окислительный реактор, нагретый до 1020°С и заполненный Сг₂О₃ и гранулами Со₃О₄, сжигалась в потоке газа-носителя (гелий, 250 мл/мин) с одновременно поданным чистым кислородом (180 мл/мин). Полученные продукты окисления (CO₂, N_xO_y) поступали в восстановительный реактор, где оксиды азота восстанавливались до N₂. Для удаления воды использовали ловушку с перхлоратом магния. N₂ и СО₂ по капилляру попадали в масс-спектрометр DELTA V Advantage через систему газораспределния Conflo II. Изотопный состав δ измеряют в промилле (‰) и определяют по формуле:

$$\delta^{n} \mathbf{X} = \left[\frac{R_{\text{sample}} - R_{\text{standard}}}{R_{\text{standard}}}\right] \times 1000,$$

где ${}^{n}X$ — это изотопы ${}^{13}C$ или ${}^{15}N$, R_{sample} и $R_{standard}$ — отношение тяжелого изотопа к легкому в исследуемом образце и стандарте соответственно.

Лабораторные рабочие газы сравнения CO₂ и N₂ калибровали по международному стандартному образцу МАГАТЭ IAEA-600 Caffeine с известной величиной отношения стабильных изотопов: $\delta^{13}C_{VPDB} = -27.771 \pm 0.043\%$ и $\delta^{15}N_{airN_2} = 1.0 \pm 0.2\%$. Воспроизводимость результатов изотопного анализа газов сравнения составляла $\pm 0.02\%$ для CO₂ и $\pm 0.05\%$ для N₂. Погрешность трех последовательных измерений анализируемых образцов не превышала для углерода $\pm 0.2\%$, а для азота $\pm 0.6\%$.

Для обнаружения подделки меда с помощью растительных сахаров, получаемых из растений типа C4, например путем добавления сиропа с высоким содержанием фруктозы, полученного в основном из кукурузы или сахарного тростника, можно использовать величину δ^{13} C, так как диапазоны вариаций величины изотопного состава растений типов C3 и C4 существенно различаются (рис. 1). Ассоциация аналитической химии для обнаружения фальсификация меда сахарными сиропами в качестве официального приняла метод обнаружения с применением изотопной массспектрометрии [6]. Суть метода заключается в сравнении величин δ^{13} C в меде и экстрагированной из него белковой фракции.

Так как пчелы собирают нектар обычно с С3растений, натуральный мед имеет значение изотопного состава углерода примерно от -28 до -23%[7]. При разбавлении меда сиропом из сахарного тростника или кукурузы мед обогащается тяжелым изотопом углерода ¹³С (δ^{13} С > -23%), поэтому подлинность образцов меда с величиной δ^{13} С выше -23% вызывает сомнения [8].

Изотопный состав белковой фракции меда не меняется при добавлении сахарного сиропа в мед, поэтому изотопный состав белковой фракции меда является "внутренним стандартом". Отличие величины δ^{13} С между медом и экстрагированной из него белковой фракцией более чем на 1‰ свидетельствует о фальсификации меда [9]. Белковую фракцию меда экстрагировали по методике, описанной в работе [10].

Для статистических расчетов использовали пакет "Анализ данных" для Microsoft Excel. Базовая статистика включала среднее значение (среднее арифметическое), стандартное отклонение (σ), минимум, максимум и размах выборки.


Рис. 1. Гистограмма значений δ^{13} С для растений типов С3 и С4 на основе более 1000 изотопных анализов. Светлая область показывает распределение δ^{13} С образцов натурального меда из США [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изотопный состав углерода в образцах подмора медоносных пчел и в продуктах их жизнедеятельности. Первоначально проводили сравнительный анализ изотопного состава углерода в образцах меда и выделенной из него белковой фракции (протеине) с целью выявления поддельного меда, фальсифицируемого растительными сахарами. Величина δ^{13} С образцов меда изменялась в диапазоне от -29.0 до -24.4%, а величина δ^{13} С протеина – от –28.9 до –24.3‰ (рис. 2). Получили линейную зависимость для образцов меда и выделенной из него белковой фракции: $\delta^{13}C_{протеин} = 0.96\delta^{13}C_{мед} - 0.93$, $R^2 = 0.82$ (рис. 2). Все образцы меда оказались подлинными, величины δ¹³С всех образцов меда ниже -23%; разница величин δ^{13} С для меда и экстрагированной из него белковой фракции менее чем 1‰.

В табл. 1 и 2 представлены результаты анализа изотопного состава углерода в образцах подмора медоносных пчел и в продуктах их жизнедеятельности.

Подмор ичел — это мертвые тела насекомых, которые умерли естественным путем. В теле погибшего насекомого остаются все продукты его жизнедеятельности (белки, хитин и некоторые липиды).

Величина δ^{13} С подмора пчел варьируется от −26.7 до −25.1‰. Среднее значение величины δ^{13} С равно −26.2‰. Величина δ^{13} С подмора пчел выше величины δ^{13} С меда. Исключения составили образцы № 4 (с. Краснощеково Алтайского края), № 10 (д. Романовка Томской области) (табл. 2).

Диапазон вариации величины δ^{13} С подмора пчел согласно опубликованным данным лежит в диапазоне от -27.2 до -21.7% во Франции [11], а в Японии – от -27.4 до -23.9% [5].

Med — продукт, производимый медоносными пчелами из нектара растений. Изотопное отношение углерода в растениях определяется про-



Рис. 2. Изотопный состав углерода в образцах меда и экстрагированного из него протеина: (●) – Алтайский край, (●) – Томская область, (■) – Кемеровская область, (▲) – Калужская область, (Ҳ) – Краснодарский край.

КАЛАШНИКОВА, СИМОНОВА

Объект исследования	Томская область				Все регионы					
	средн.	σ	мин.	макс.	диапазон	средн.	σ	мин.	макс.	диапазон
Мёд	-26.5	0.3	-26.8	-26.1	0.7	-26.6	1.0	-29.0	-24.9	4.1
Мёд в сотах	-26.7	0.6	-27.3	-25.9	1.4	-26.6	0.9	-27.8	-24.4	3.4
Воск	-28.4	0.4	-28.9	-27.8	1.1	-28.6	0.7	-30.3	-27.4	2.9
Пыльцевая обножка	-27.4	1.2	-28.8	-25.1	3.7	-27.5	1.6	-31.2	-25.1	6.1
Прополис	-27.4	0.4	-27.8	-26.8	1.0	-27.4	0.5	-28.3	-26.5	1.8
Подмор пчел	-26.1	0.5	-26.7	-25.1	1.6	-26.2	0.4	-26.7	-25.1	1.6

Таблица 1. Основная статистика величины $\delta^{13}C(\%)$ в собранных образцах

Таблица 2. Величина δ¹³С (‰) в образцах подмора медоносных пчел и в продуктах их жизнедеятельности

№ п/п	Место отбора	Мёд	Мёд в сотах	Воск	Пыльцевая обножка	Прополис	Подмор пчел		
	Алтайский край								
1	Красногорский район	-29.0		-28.6	-28.1	-28.3	-26.2		
2	Красногорский район			-30.3			-26.0		
3	д. Захарово, Рубцовский район	-27.0					-25.7		
4	с. Краснощеково, Краснощековский район	-26.5		-28.4	-25.5	-26.5	-26.6		
	Том	ская об	бласть		I				
5	с. Баткат, Шегарский район		-27.3	-28.9	-26.5	-27.5	-26.6		
6	д. Тихомировка, Асиновский район		-26.7	-28.2					
7	д. Терсалгай, Кожевниковский район		-27.0	-28.6		-26.8			
8	г. Асино, Асиновский район		-27.3	-28.8	-25.1		-26.4		
9	д. Романовка, Томский район	-26.8	-26.9	-27.9	-27.2	-27.2	-25.9		
10	д. Романовка, Томский район		-26.0	-28.4	-28.4	-27.8	-26.1		
11	с. Зырянское, Зырянский район	-26.8			-27.7	-27.1			
12	с. Новоархангельское, Томский район		-25.9	-28.5	-28.8	-27.2			
13	п. Кандинка, Томский район				-28.2		-26.7		
14	д. Озёрное, Колпашевский район	-26.1				-27.8	-25.1		
15	д. Новониколаевка, Шегарский район		-26.3	-27.8	-27.3	-27.5	-26.0		
16	п. Зырянка, Зырянский район	-26.3							
	Кемер	овская	область		I				
17	п. Заозёрный, Юргинский район		-27.7	-29.2		-26.6	-26.6		
18	п. Большой Керлегеш, Прокопьевский район	-26.7		-28.2	-25.7	-28.1	-26.2		
	Калу	жская о	область		<u>1</u>				
19	Малоярославецкий район,	-27.8	-27.8	-29.8	-27.9	-26.8	-26.4		
20	Цимлянский заповедник	-24.9							
21		-25.6							
	Красн	одарск	сий край		I				
22	Туапсе		-24.4	-27.4	-27.1	-27.2			
23		-26.1			-31.2	-27.8			
24			-26.2	-28.0		-27.7	-26.0		

ЖУРНАЛ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ том 76 № 4 2021

цессом фотосинтеза с обогащением растения легким изотопом углерода ¹²С [12]. Степень обогащения зависит от пути ассимиляции углерода. В зависимости от пути фотосинтеза растения делятся на три основные группы: С3, С4 и САМ. Значение величины δ^{13} С для растений в зависимости от их типа варьируется в разных диапазонах: для растений типа С3 между –22 и –33‰, для растений типа С4 между –10 и –20‰ (рис. 2), для САМ-растений между –11 и –13.5‰ [13].

Значения величины δ^{13} С меда имеют тенденцию к увеличению с ростом количества солнечных дней и, следовательно, с увеличением средней температуры и уменьшением средней влажности [14].

Величина δ^{13} С образцов меда Томской области варьируется в диапазоне от -27.3 до -25.9%. Примерно в таком же диапазоне (от -27.7 до -26.7%) изменяется величина δ^{13} С образцов меда Кемеровской области. Средние значения величины δ^{13} С образцов из районов с умеренно континентальным и средиземноморским климатом, таких как Калужская область (-26.5 или -25.3%) и Краснодарский край (-25.6%), выше, чем средние значения величины δ^{13} С образцов меда из районов с континентальным климатом – Алтайский край (-27.5%), Кемеровская область (-27.2%) и Томская область (-26.6%).

Диапазон вариации величины δ^{13} С всех проанализированных образцов меда — от —29 до —24.4‰. Изотопный анализ бразильского меда показал вариации величины δ^{13} С (от —28.5 до —25.1‰) [15], итальянского (от —25.8 до —23.4‰) [16], словенского (от —27.4 до —23.4‰) [17], новозеландского меда (от —25.4 до —24.0‰) [18].

Пыльцевая обножка образуется при соединении цветочной пыльцы с нектаром и слюнными веществами пчел. Основными компонентами пыльцевой обножки являются углеводы (от 13 до 55%), сырые волокна (от 0.3 до 20%), белки (от 10 до 40%) и липиды (от 1 до 10%) [19]. Величина δ^{13} С пыльцевой обножки варьируется от -31.2 до -25.1%. Среднее значение величины δ^{13} С равно -27.5%. Максимальный разброс значения величины δ^{13} С зафиксирован именно в пыльцевой обножке: $\Delta\delta^{13}$ С = 6.1% для всех регионов, $\Delta\delta^{13}$ С = 3.7% для Томской области.

Пчелы собирают пыльцу с растений, а соотношения ¹³C/¹²C растений различаются для разных сред обитания из-за фракционирования изотопов углерода, что обусловлено географическим положением, климатом, а также антропогенным воздействием. Максимальное значение величины δ¹³C (-25.1‰) обнаружено для пыльцевой обножки образца № 8 (г. Асино Томской области). Предположительно, высокое значение величины δ¹³C можно объяснить тем, что растения в данной области находятся в угнетенных условиях (близость города, воздействие автотранспорта, использование синтетических удобрений на полях), т.е. при неблагоприятных условиях произрастания изотопный состав углерода растений обогащается тяжелым изотопом ¹³С. Минимальное значение величины δ^{13} С (-31.2%) зафиксировано для пыльцевой обножки, собранной пчелами во время цветения плюща (№ 23, табл. 2). Плющ – превосходный медонос, в Туапсинском районе цветет в сентябре—октябре. Наше значение величины δ^{13} С для плюща согласуется с данными (от -31.3 до -28.1%), представленными в работе [20].

Величина δ^{13} С пыльцевой обножки выше величины δ^{13} С образцов лугового цветочного меда ($\mathbb{N} \mathbb{N} \mathbb{N}$ 1, 4, 5, 18, табл. 2) и ниже величины δ^{13} С образцов лесного меда ($\mathbb{N} \mathbb{N} \mathbb{N} 9-12$, 15, 22; табл. 2). Такое различие объясняется так называемым "эффектом лесного полога". Концентрация ¹³С минимальна в приземном слое. Это связано с особенностями фотосинтеза растений в условиях затенения (лесной полог) и с фиксацией выделяемого почвой и лесной подстилкой CO₂, обедненного изотопом ¹³С [21].

Воск производится пчелами для сооружения сот, в которых они проживают, хранят запасы меда, выращивают потомство. На сегодняшний день известно более трехсот веществ, которые содержатся в воске. Величина δ^{13} С всех образцов воска варьируется в пределах от −30.3 до −27.4‰. Среднее значение величины δ^{13} С равно −28.6‰. Величина δ^{13} С образцов воска ниже величины δ^{13} С образцов меда и подмора пчел, за исключение образца № 1 (Красногорский район Алтайского края). Исследования новозеландских и немецких ученых показали, что диапазон значений величины δ^{13} С новозеландских образцов воска изменяется в пределах от −23.2 до −26.8‰ [18], а немецких образцов – от −29.9 до −27.9‰ [22].

Прополис – вещество смолистого типа, производимое в процессе деятельности пчел, изготавливается пчелами на основе растительных элементов. Прополис не имеет единого состава. В процентном соотношении прополис включает: смолы и пыльцевой бальзам (50-60%); воск, добавляемый пчелами (30%); различные сочетания растительных вешеств. обладающих индивидуальными свойствами (10%) [23]. Все это делает интерпретацию данных по прополису очень сложной. Величина δ^{13} С всех исследуемых образцов прополиса варьируется от -28.3 до -26.5%. Среднее значение величины δ^{13} С равно -27.4%, что более чем на 1‰ выше по сравнению с аналогичным значением для воска и ниже величин δ¹³С образцов меда. Исключения составили образцы № 1 (Алтайский край), № 7 (Томская область) и № 19 (Калужская область).

Сложный состав воска (из более чем трехсот веществ, содержащихся в воске, 75% составляют

Объект	Томская область					Все регионы				
исследования	средн.	σ	МИН.	макс.	диапазон	средн.	σ	мин.	макс.	диапазон
Протеин	4.2	0.8	2.8	5.1	2.3	4.2	1.8	-0.7	8.3	9.0
Прополис	3.0	2.5	0.4	8.5	8.1	4.7	2.9	0.4	11.2	10.8
Пыльцевая обножка	5.2	1.9	2.3	7.2	4.9	3.8	2.6	-2.8	7.2	10.0
Подмор пчел	6.5	1.9	4.7	9.8	5.1	6.2	1.7	4.1	9.8	5.7

Таблица 3. Основная статистика величины $\delta^{15}N$ (‰) в собранных образцах

сложные жиры, велико также содержание свободных жирных кислот) и прополиса также является причиной различий в значениях δ¹³С и вызывает сложности при интерпретации данных изотопного состава. В биологических объектах фракционирование изотопов происходит не только за счет кинетического и магнитного изотопных эффектов, но и при других биохимических процессах (например, при дыхании, биосинтезе липидов). Как результат, одно и то же органическое вещество может иметь разное распределение изотопов внутри молекулы в зависимости от путей биосинтеза и условий среды [24, 25]. В работе [26] изучено распределение изотопов углерода между основными полимерами биомассы высших растений на примере структурных полимеров пшеницы (лигнин, гемицеллюлоза, целлюлоза, крахмал, белки, липиды). Крахмал и гемицеллюлоза оказались наиболее изотопно тяжелыми (-25.9 и -26.2‰ соответственно). Белки менее обогащены ¹³С (до -27.3‰), липиды и лигнин (-33.3 и -32.6‰) относятся к изотопно легким компонен-



Рис. 3. Блочная диаграмма изотопного состава азота образов пыльцевой обножки и подмора пчел.

там биомассы. Гетерогенность изотопного состава (от -33.3 до -25.9%) биополимеров определяет изотопную неоднородность органов и частей растения. Таким образом, изотопная неоднородность может встречаться не только на уровне отдельных молекул, но и на уровне целых классов органических соединений.

Изотопный состав азота в образцах подмора медоносных пчел и в продуктах их жизнедеятельности. В табл. 3 и 4 представлены результаты определения изотопного состава азота в образцах подмора пчел и в продуктах их жизнедеятельности. Содержание азота в меде и воске очень мало, поэтому значения величины δ^{15} N для воска не представлены, но о величине δ^{15} N для меда можно судить по величине δ^{15} N протеина.

Среднее значение величины δ^{15} N для пыльцевой обножки медоносных пчел составляет +3.8‰. Величина δ^{15} N в образцах подмора пчел варьируется от +4.1 до +9.8‰. Диапазон вариации величины δ^{15} N подмора пчел в целом сходен с опубликованными данными: величина δ^{15} N пчел во Франции лежит в диапазоне от -4 до +10‰ [11], а в Японии – от -3.0 до+7.1‰ [5].

Средняя величина $\delta^{15}N$ в образцах подмора пчел равна +6.2‰, что на 2.4‰ выше, чем в образцах пыльцевой обножки (рис. 3). Данная разница соответствует наибольшему трофическому уровню в цепочке "растение — пчела", так как на каждом уровне метаболизма происходит увеличение концентрации ¹⁵N [27].

Азот — важный элемент питания растений. Они получают азот в виде аминокислот и белков из растворимых веществ верхнего слоя почвы, на котором произрастают. В связи с этим изотопный состав азота белковой фракции меда отражает почвенные условия района, где пчелы собирали мед (например, суглинистая почва лучше удерживает растворимые соединения азота, чем песчаная почва). Некоторые растения, например клевер и эспарцет, которые являются важными источниками монофлерных медов, симбиотически выделяют азот из воздуха. Следовательно, значения величины δ^{15} N таких растений может быть около 0‰ [28].

№ п/п	Место отбора	Протеин	Прополис	Пыльцевая обножка	Подмор пчел				
	Алтайский край								
1	Красногорский район	8.3	8.0	2.7	7.9				
2	Красногорский район								
3	д. Захарово, Рубцовский район	4.8							
4	с. Краснощеково, Краснощековский район	4.8	7.0	3.2	6.7				
I	Томская	я область							
5	с. Баткат, Шегарский район	4.6	2.8	4.1	6.1				
6	д. Тихомировка, Асиновский район	3.8							
7	д. Терсалгай, Кожевниковский район	5.1	1.4						
8	г. Асино, Асиновский район	4.9		2.3	6.6				
9	д. Романовка, Томский район	5.0	1.9	6.9	5.5				
10	д. Романовка, Томский район	3.2	3.0	6.2	8.1				
11	с. Зырянское, Зырянский район	4.1	8.5	5.7					
12	с. Новоархангельское, Томский район	3.6	2.2	3.0					
13	п. Кандинка, Томский район			7.2	4.7				
14	д. Озёрное, Колпашевский район	5.0	4.1		9.8				
15	д. Новониколаевка, Шегарский район	2.8	0.4	6.5	4.8				
16	п. Зырянка, Зырянский район	4.6							
	Кемеровс	кая области	5		•				
17	п. Заозёрный, Юргинский район	7.3	4.3		6.6				
18	п. Большой Керлегеш, Прокопьевский район	4.0	5.9	2.6	4.1				
	Калужска	ая область							
19	Малоярославецкий район, Цимлянский запо-	3.9	11.2	2.1	5.2				
20	ведник	5.0							
21		2.9							
	Краснодај	рский край	ľ						
22	Туапсе	4.1	4.1	4.1					
23		-0.7	4.6	-2.8					
24		1.3	6.9		4.5				

Таблица 4. Величина δ^{15} N (‰) в образцах подмора пчел и в продуктах их жизнедеятельности

Величина δ^{15} N всех образцов протеина варыруется от -0.7 до + 8.3%. Среднее значение величины δ^{15} N равно +4.2%. Самый легкий изотопный состав азота (δ^{15} N = -0.7%) определен для образца меда из плюща ($\mathbb{N} 23$, табл. 4). Наибольшее значение величины δ^{15} N определено для образца из Алтайского края (δ^{15} N = +8.3%), возможно, из-за обработки лугов удобрениями животного происхождения (навоз), в которых содержание ¹⁵N высокое [29]. Диапазон вариации значений величины δ^{15} N протеина образцов бразильского меда составляет от +1 до +8% [15], итальянского – от -1 до +5.2% [16] и словенского – от -3.6 до +6.4% [17].

Величина $\delta^{15}N$ всех образцов прополиса варьируется в достаточно широком диапазоне от

ЖУРНАЛ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ том 76 № 4 2021

+0.4 до +11.2‰. Среднее значение величины δ^{15} N равно +4.7‰; это значение выше значения изотопного состава азота пыльцевой обножки и ниже величин δ^{15} N образцов подмора пчел.

Наибольшие вариации изотопного состава азота характерны для пыльцевой обножки (табл. 3). Факторы, влияющие на изотопный состав азота в растении и пыльце, — это различный изотопный состав поглощаемых азотсодержащих соединений, который зависит как от типа соединения (нитраты, аммоний, органические компоненты), так и от локализации в почве; фракционирование изотопов в процессе поглощения и ассимиляции; микоризный статус растения [30]; климатические особенности [31]. Изотопный состав азота пыльцевой обножки медоносных пчел отражает наличие азотсодержащих веществ и почвенные условия



Рис. 4. Изотопный состав азота и углерода образцов пыльцевой обножки: (■) – Алтайский край, (●) – Томская область, (◆) – Кемеровская область, (+) – Калужская область, (○) – Краснодарский край. Стрелка указывает на величину δ¹⁵N плюща.

в районе, где пчелы обитали. Например, в областях, подверженных высыханию, усиливается улетучивание аммиака (NH₃) из почвы, что увеличивает концентрацию ¹⁵N, включенного в растительную ткань [32]. Значения величины δ^{15} N значительно различаются в зависимости от вида растения. Примерами являются красный клевер — величина δ^{15} N — 0.27% (*Trifolium pratense*), бобы — +0.31% (*Vicia faba*), трава — +3.21% (смесь), кукурузный силос — +4.24% и рапс — +8.73% (*Brassica napus*) [33]. В нашем исследовании примером является пыльца плюща, собранная пчелами в Туапсинском районе в сентябре (№ 23, табл. 4), с величиной δ^{15} N = = -2.75%.

Из рис. 4 видно, что географическое положение не влияет на значения изотопного состава азота в пыльцевой обножке исследуемых образцов. Вариации значений $\delta^{15}N$ в диапазоне от +2% до +4% характерны для всех исследуемых регионов, и они согласуются со значениями $\delta^{15}N$ для травянистых растений Канады [34]. Для пяти образцов, отобранных в Томской области, зафиксировано более высокое содержание ¹⁵N, значения $\delta^{15}N$ изменяются в пределах от +5.5 до +7.7%. Однако величина δ^{13} С для этих образцов имеет достаточно низкие значения от -28.6 до -27‰. На основании этого факта мы исключили предположение о влиянии локальных климатических факторов. В условиях высоких температур и нехватки воды усиливается выделение аммиака из почвы и увеличивается концентрация ¹⁵N, включенного в растительную ткань, а фракционирование изотопов углерода угнетается, что

приводит к более высокому содержанию 13 С в растительных продуктах. По-видимому, более высокое содержание 15 N может быть связано либо с почвенными условиями и наличием азотсодержащих соединений в почве, либо с содержанием в кормовой базе пчел в основном растений-медоносов с высоким содержанием 15 N (например, рапса).

* * *

Таким образом, изотопный состав углерода меда является географическим маркером происхождения меда. Высокие значения δ^{13} С характерны для образцов меда европейской части России и черноморского региона. Значения величины δ^{13} С меда из регионов Сибири более низкие. Аналогичная характеристика значений δ^{13} С прослеживается и для воска. Сравнительный анализ изотопного состава углерода меда и выделенного из него протеина показал, что все образцы проанализированного меда являются подлинными. Установлено, что изотопные составы углерода пчел и продуктов их жизнедеятельности могут иметь значительные отличия. Это связано с тем, что отдельные биохимические фракции, индивидуальные соединения и даже фрагменты одного соединения имеют разный изотопный состав. Например, липиды показывают систематическую обогащенность изотопом ¹²С. Углеводы и белки обычно обеднены легким изотопом. Наши результаты еще раз подтвердили вывод о возможности существования изотопных эффектов не

только на стадии фотосинтеза, но и при других биохимических процессах (дыхание, биосинтез липилов, углеводов, аминокислот). Анализ изотопного состава азота показал, что в тканях пчел среднее значение величины $\delta^{15}N$ равно +6.2‰, что приблизительно на 1.7% выше, чем в образцах протеина и прополиса и на 2.4‰ выше, чем в образцах пыльцевой обножки, что соответствует наибольшему трофическому уровню в цепочке "растение \rightarrow пчела". Вариации значений $\delta^{15}N$ пыльцевой обножки в диапазоне от +2 до+4‰ характерны для всех исследуемых регионов, они согласуются со значениями $\delta^{15}N$ для травянистых растений. Однако для пяти образцов пыльцевой обножки, отобранных в Томской области, зафиксировано более высокое содержание ¹⁵N. Этот вопрос требует дополнительного исследования: для выявления ботанического происхождения и идентификации пыльцы основных таксонов необходимо провести мелиссопалинологический анализ. а для выявления азотсодержащих соединений в почвах — изотопный анализ азота почвенных образцов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-90016.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Лебедев А.Т. Масс-спектрометрия для анализа объектов окружающей среды. М.: Техносфера, 2013. С. 632.
- Кадиров Р.А. Пчелы как индикаторы загрязнения окружающей среды некоторыми поллютантами. Дис. ... канд. биол. наук. М., 1999. 113 с.
- 3. Коркина В.И. Загрязнение тяжелыми металлами пыльцевой обножки, собранной медоносными пчелами на юге Западной Сибири // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. 2008. № 5. С. 154.
- Петухов А.В., Уланова Т.С., Завгородняя И.С. Оценка экологической обстановки отдельных территорий Пермской области с помощью медоносных пчел / Вопросы апидологии: Сборник статей. Удмуртский государственный научно-исследовательский институт сельского хозяйства РАСХН. Ижевск, 2000. С. 76.
- Taki H., Ikeda H., Nagamitsu T., Yasuda M., Sugiura S., Maeto K., Okabe K. Stable nitrogen and carbon isotope ratios in wild native honeybees: The influence of land use and climate // Biodivers. Conserv. 2017. V. 26. P. 3157.
- AOAC. Official methods of analysis method 998.12: C-4 plant sugars in honey. Internal standard stable carbon isotope ratio method. AOAC International, 1998.
- Cerling T.E., Barnette J.E., Bowen G.J., Chesson L.A., Ehleringer J.R., Remien C.H., Shea P., Tipple B.J., West J.B. Forensic stable isotope biogeochemistry // Annu. Rev. Earth Planet. Sci. 2016. V. 44. P. 175.
- 8. Xiaoteng Z., Taylor M.P., Salouros H., Prasad S. Authenticity and geographic origin of global honeys deter-

mined using carbon isotope ratios and trace elements // Sci. Reports. 2018. V. 8. Article 14639.

- White J.W., Winters K. Honey protein as internal standard for stable carbon isotope ratio detection of adulteration of honey // J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1989. V. 72. P. 907.
- Ветрова О.В., Калашникова Д.А., Мелков В.Н., Симонова Г.В. Выявление фальсификации меда сахарными сиропами методом масс-спектрометрии стабильных изотопов // Журн. аналит. химии. 2017. Т. 72. № 7. С. 645. (Vetrova O.V., Kalashnikova D. A., Melkov V. N., Simonova G. V. Detection of honey adulterations with sugar syrups by stable isotope mass spectrometry // J. Anal. Chem. 2017. V. 72. № 7. Р. 756.)
- Rankovic A., Geslinc B., Perrard A., Barbillon A., Vaury V., Abbadie L., Dajoz I. Urbanization effects on wild bee carbon and nitrogen stable isotope ratios in the Paris region // Acta Oecol. 2020. V. 105. Article 103545.
- 12. Галимов Э.М. Природа биологического фракционирования изотопов. М.: Наука, 1981. С. 246.
- 13. Padovan G.J., Rodriques L.P., Leme I.A., Jong D.D., Marchini J.S. Presence of C4 sugars in honey samples detected by the carbon isotope ratio measured by IRMS // Eurasian J. Anal. Chem. 2007. V. 2. № 3. P. 134.
- Jonasson S., Medrano H., Flexas J. Variation in leaf longevity of Pistacia lentiscus and its relationship to sex and drought stress inferred from leaf delta δ¹³C // Funct. Ecol. 1997. V. 11. № 3. P. 282.
- Veiga S.J. Detecção de adulteração e determinação da origem geográfica de méis de abelhas sem ferrão do Brasil utilizando a razão isotópica do C, H, O e N. Thesis, 2017. 67 p.
- Bontempo L., Camin F., Ziller L., Perini M., Nicolini G., Larcher R. Isotopic and elemental composition of selected types of Italian honey // Measurement. 2017. V. 98. P. 283.
- Kropf U., Golob T., Nečemer M., Kump P., Korošec M., Bertoncelj J., Ogrinc N. Carbon and nitrogen natural stable isotopes in Slovene honey: Adulteration and botanical and geographical aspects // J. Agric. Food Chem. 2010. V. 58. P. 12794.
- Rogers K.M. Eliminating false positive C4 sugar tests on New Zealand Manuka honey // Rapid Commun. Mass Spectrom. 2010. V. 24: P. 2370.
- Pascoal A., Rodrigues S., Teixeira A., Feás X., Estevinho L.M. Biological activities of commercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory // Food Chem. Toxicol. 2014. V. 63. P. 233.
- Raschi A., Miglietta F., Tognetti R., Gardingen P.V. Plant Responses to Elevated CO₂: Evidence from Natural Springs. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1997. P. 286.
- Merwe N.V.D., Medina E.T.G. The canopy effect, carbon isotope ratios and food webs in Amazonia // J. Archeol. Sci. 1991. V. 18. P. 249.
- 22. Bengsch E., Kettrup A., Stocker A., Rossmann A. Authentizitätsbestimmung von Gelee Royale und/oder seiner Komponenten durch (Multi) Isotopenanalyse. DE10344606A1. 2003. Date of publication 16.06.2011.
- https://ferma.expert/pchely/pcheloprodukciya/pchelinye-soty/ (25.08.2020).

ЖУРНАЛ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ том 76 № 4 2021

- Abelson P.H., Hoering T.C. Carbon isotope fractionation in formation of amino acids by photosynthetic organisms // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1961. V. 47. № 5. P. 623.
- 25. Кодина Л.А., Генералова В.Н. Внутримолекулярные и межмолекулярные изотопные эффекты на примере фенольных соединений и аминокислот природного происхождения / Рефераты докладов и сообщений IX Менделеевского съезда по общей и прикладной химии. Алма-Ата. 1975. М.: Наука, 1975. Т. 1. С. 308.
- 26. Кодина Л.А. Распределение изотопов углерода в разных формах биогенного органического вещества І. Распределение изотопов углерода между основными полимерами биомассы высших растений // Геохимия. 2010. № 12. С. 1235.
- Hyodo F. Use of stable carbon and nitrogen isotopes in insect trophic ecology // Entomol. Sci. 2015. V. 18. P. 295.
- Schellenberg A., Chmielus S., Schlicht C., Camin F., Perini M., Bontempo L., Heinrich K., Kelly S. D., Rossmann A., Thomas F., Jamin E., Horacek M. Multielement stable isotope ratios (H, C, N, S) of honey from different European regions // Food Chem. 2010. V. 121. P. 770.

- Bateman A.S., Kelly S.D. Fertilizer nitrogen isotope signatures // Isotopes Environ. Health Stud. 2007. V. 43. № 3. P. 237.
- Макаров М.И. Изотопный состав азота в почвах и растениях: использование в экологических исследованиях (обзор) // Почвоведение. 2009. Т. 12. С. 1432.
- Szpak P. Complexities of nitrogen isotope biogeochemistry in plant-soil systems: Implications for the study of ancient agricultural and animal management practices // Front. Plant Sci. 2014. V. 5. P. 288.
- Nommik H., Pluth D.J., Larsson K., Mahendrappa M.K. Isotopic fractionation accompanying fertilizer nitrogen transformations in soil and trees of a Scots Pine ecosystem // Plant Soil. 1994. V. 158. P. 169.
- 33. Stocker A., Rossmann A., Kettrup A., Bengsch E. Detection of royal jelly adulteration using carbon and nitrogen stable isotope ratio analysis // Rapid Commun. Mass Spectrom. 2006. V. 20. № 2. P. 181.
- Schwarz D.M. A stable isotope investigation of pollen from Pinery Provincial Park, Southwestern Ontario, Canada. Electronic Thesis and Dissertation Repository, 2016. No. 4254.

— АНАЛИТИЧЕСКИЕ ПРИБОРЫ —

УДК 543

КАКИЕ АНАЛИТИЧЕСКИЕ ПРИБОРЫ ПРОИЗВОДЯТ В РОССИИ?

© 2021 г. Г. И. Цизин^{*a*}, Ю. А. Золотов^{*a*, *b*, *}

^а Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет Ленинские горы, 1, стр. 3, Москва, 119991 Россия ^bИнститут общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова Российской академии наук Ленинский просп., 31, Москва, 119991 Россия

**e-mail: zolotov.32@mail.ru* Поступила в редакцию 23.09.2020 г. После доработки 19.10.2020 г. Принята к публикации 29.10.2020 г.

Сделана попытка собрать и систематизировать информацию об измерительных аналитических приборах, производимых в России на рубеже второго и третьего десятилетия XXI в. Большая часть приборов выпускается крупными и среднего размера компаниями, возникшими в 1990-е годы. Рассмотрены приборы для разных областей спектрального анализа, масс-спектрометры, хроматографы, электрохимические приборы, аналитические весы и др.

Ключевые слова: производство аналитических приборов, анализаторы, спектрометры, рентгеновские аналитические приборы, масс-спектрометры, приборы ионной подвижности, электроаналитические приборы, аналитические весы.

DOI: 10.31857/S0044450221040137

Исчерпывающий ответ на поставленный в заголовке вопрос дать трудно, однако и паллиативная, фрагментарная информация будет, вероятно, полезна.

Российское аналитическое приборостроение в целом не занимает лидирующих позиций в отношении номенклатуры выпускаемых приборов, масштабов их производства и нередко технического уровня, однако состояние дел сильно отличается для приборов разных групп. Существовавшие в Советском Союзе крупные государственные приборостроительные организации и предприятия (Ленинградское оптико-механическое объединение, Государственный оптический институт, "Буревестник", "Госметр", "Химавтоматика" и многие другие) понесли в 1990-е годы большие потери. На их базе силами, как правило, их же сотрудников во многих случаях были созданы малые предприятия, некоторые из которых не только удержались на ногах, но и стали внушительными компаниями. Надо также вспомнить, что часть существовавших в СССР организаций и производственных предприятий, выпускавших аналитическую технику, оказались за пределами России – в Украине (Сумский завод электронных микроскопов, Северодонецкий филиал "Химавтоматики" и др.), в Белоруссии (Гомельский завод, специализировавшийся на электрохимическом оборудовании) и других сопредельных государствах. Косвенно развитие отечественного аналитического приборостроения тормозилось и возросшими у ряда потребителей возможностями приобретать технику зарубежного производства.

В настоящее время само понятие "российские приборы" нельзя считать однозначным. Возможна ситуация, когда прибор сконструирован в России и целиком изготовлен из отечественных материалов и комплектующих. На другом полюсе — "отверточное" производство, если изделие собирают из импортных составляющих. Во многих случаях, если не в большинстве, мы имеем промежуточный вариант: что-то российское, что-то покупается за границей (так работают и многие зарубежные производители). В этой статье мы не проводим указанного деления, за исключением немногочисленных очевидных случаев.

Рассмотрим теперь нынешнюю ситуацию с производством конкретных приборов.

Атомно-эмиссионные спектрометры. В современных атомно-эмиссионных спектрометрах используют различные способы атомизации пробы дугу постоянного и переменного тока, искру, пламена, лазерное возбуждение, индуктивно связанную плазму (ИСП). В большинстве приборов для атомно-эмиссионной спектрометрии (АЭС) атомизацию в настоящее время осуществляют с помощью ИСП; достоинства этого метода — широкий диапазон определяемых содержаний, линейность градуировочных графиков, большое число определяемых элементов. Ограничение метода – необходимость растворения пробы; есть приставки для искрового пробоотбора, лазерной абляции, позволяющие анализировать твердые объекты, но они не всегда решают задачи. Между тем анализ металлов, сплавов, геологических объектов подчас удобнее проводить без растворения. Этой цели хорошо служат спектрометры с традиционными способами атомизации.

В России выпускается довольно много приборов с дугой постоянного и переменного тока, с искровым разрядом, в том числе в инертном газе. Еще со времен СССР накоплен опыт создания и использования искровых и дуговых генераторов для атомно-эмиссионных спектрометров, создан и внушительный банк методик под такие приборы, есть приборы хорошего качества (табл. 1).

Концепции большинства приборов достаточно традиционны. Это спектрометры по схеме Пашена-Рунге, иногда одинарные, иногда сдвоенные. Во всех случаях используются диспергирующие элементы (вогнутые обычные и голографические дифракционные решетки) высокого класса. В качестве детектора почти везде (за исключением отдельных приборов) применяют ПЗС-линейки; с точки зрения оптической схемы для многоэлементного спектрального анализа они, вероятно, оптимальны. Уровень оптической части спектрометров соответствует мировому.

Наибольшее число моделей спектрометров для АЭС производит ЗАО "Спектральная лаборатория". Компания осуществляет сопровождение и модернизацию приборов, в том числе приборов производства прошлых лет. Неплохо отработан прибор "Папуас-4", выпускаемый в семи модификациях ООО "Спектроприбор-2". Подавляющее большинство спектрометров, указанных в табл. 1, сертифицированы – внесены в Федеральный информационный фонд по обеспечению единства измерений. Единственная модель спектрометра с ИСП – прибор "Эридан-500", выпускаемый в четырех модификациях ООО "Мониторинг". Характеристики этого прибора соответствуют среднему прибору зарубежного производства, однако мы не располагаем сведениями о его использовании в промышленности и науке.

Надежные и современные спектрометры разрабатывает и выпускает ООО "ВМК Оптоэлектроника". Возникнув как малое предприятие на базе Сибирского отделения Академии наук, эта компания стала мощным и авторитетным производителем аналитической техники, с широким кругом заинтересованных потребителей (которых, кстати, компания ежегодно собирает на большой семинар). Используются оригинальные многоканальные анализаторы эмиссионных спектров МАЭС. Компания выпускает ряд приборов и комплексов серии "Грант", например "ГрандПоток" для анализа порошковых проб методом просыпки—вдувания. Приборы этого производителя широко применяются в промышленности, особенно для анализа металлов и сплавов.

Атомно-абсорбционные спектрометры. Атомноабсорбционная спектроскопия (ААС) была на пике внимания аналитиков в 1960—1980 гг., однако метод используется и в настоящее время. Компании производят соответствующие приборы и с пламенной, и особенно с электротермической атомизацией, появился отечественный спектрометр для многоэлементного анализа с источником непрерывного спектра (Гранд-ААС, разработан "ВМК Оптоэлектроника"). Приборы для ААС выпускают "Кортэк" (Москва), "Люмэкс" (С.-Петербург) и некоторые другие производители. В табл. 2 перечислены основные производимые в России спектрометры.

Приборы для рентгеноспектрального анализа. Приборостроение для рентгеноспектрального анализа имеет в нашей стране давнюю историю. Ленинградское НПО "Буревестник" в течение длительного времени частично обеспечивало внутренние потребности страны в рентгенофлуоресцентных спектрометрах. Недостатками были медленное внедрение в серию новых разработок, частое применение устаревших зарубежных подходов (при наличии вполне оригинальных перспективных отечественных разработок). отставание в области использования вычислительной техники. Это привело со временем к тому, что не только научные учреждения, но и промышленные предприятия стали переходить на импортное оборудование (прежде всего производства Philips, ARL и др.). Относительно медленно развивался рентгеноспектральный микроанализ, несмотря на то, что метод был создан параллельно во Франции и СССР (Ильин, Боровский, 1951), а первый промышленный прибор появился в конце 1950-х годов (МАР-1, Красногорский механический завод). Усилия НПО "Орион" (Москва) и Завода электронных микроскопов (Сумы) не смогли обеспечить развитие этого направления в соответствии с мировыми тенденциям, большинство научных учреждений и промышленных предприятий использовали импортное оборудование. Сохранялось серийное производство достаточно старых по конструкции приборов в НПО "Буревестник" и на предприятии "Научприбор" (Орел). В плане перспективных разработок также наблюдалось существенное отставание.

Развитие новых направлений в рентгеновском приборостроении началось с распадом СССР и появлением (прежде всего в Петербурге) ряда небольших предприятий, ориентированных на производство рентгеноспектральной аппаратуры. Основные модели производимого ныне рентге-

Производитель, город	Наименование (марка) эмиссионного спектрометра	Способ возбуждения спектра	Назначение, метрологические характеристики
ООО "ВМК Оптоэлектро- ника" (Новосибирск)	Гранд-Поток	Дуга переменного и постоян- ного тока	Анализ порошковых проб методом просыпки—вдувания (геологич. образцы, порошковая металлургия). Пределы обнаружения благородных металлов: <0.001 г/т для Au и Pd, <0.1 г/т для Ag
	Гранд-Глобула (ком- плекс)	Дуга и искра	Анализ порошковых проб, метал- лов и сплавов
	Гранд-Эксперт (комплекс)	Два спектрометра – вакуум- ный и воздушный. Возбужде- ние искровое в аргоне	Анализ металлов и сплавов. Диа- пазоны определяемых содержа- ний, %: С 0.002–3.0; S 0.001–0.2; P 0.001–0.2; Si 0.002–5.0
ЗАО "Спектраль- ная лаборатория" (СПетербург)	Титан СЛ (для определе- ния водорода в титане, алюминии и их сплавах)	Искра 8—50 Дж	Предел обнаружения по водороду 0.001%
	МСА (8 модификаций)	Низковольтная искра в аргоне, дуга переменного тока, пульсирующая дуга постоянного тока	Пределы обнаружения по С 0.004%, по Cr и Mg – 0.0005%
	ДФС-51 СЛ		Определяемые элементы: С, Р, S, Si, Mn, Cr, Ni, Cu, Al, Ti, Mo, V, W, Nb, B, Co, Zr, Pb, Zn, As. Диапазон определяемых содержаний от 0.0001 до десятков процентов
	Минилаб СЛ (перенос- ной)	Низковольтная искра	Определяемые содержания от 0.0004% (Ве)
	МФС 8 (3 модификации)	Низковольтная искра, дуга переменного и постоянного тока	Пределы обнаружения по Fe 0.008%, по Cr и Ni 0.005%
ООО "Монито- ринг" (СПетербург)	Эридан-500 (4 модификации)	Индуктивно связанная плазма, частота 27.12 МГц (опция 40.68 МГц), 0.2–2.0 кВт	Пределы обнаружения (в сталях) Mn 1, Fe 4, Zn 4 мкг/дм ³
ООО "Спектро- прибор-2" (Подольск)	Папуас-4 (7 модификаций)	Искра, дуга	Пределы обнаружения 0.1–0.05%
000 "Актив"	Спас-0,2 (вакуумная и	Низковольтная униполярная	Предел обнаружения (при анализе
	воздушная модификации)	искра в аргоне	сталеи) 0–0.01%
электроника" (СПетербург)	лайн-300, Искролайн-500	искра	сталей) 0.0001%

Таблица 1. Атомно-эмиссионные спектрометры российского производства

носпектрального оборудования представлены в табл. 3.

Долгое время НПП "Буревестник" было ведущим предприятием как по разработке новой рентгеноспектральной аппаратуры, так и по ее производству. По кристалл-дифракционной схеме были созданы различные приборы, в частности квантометры для промышленных лабораторий с предустановленными каналами на определенные элементы. Примерами таких приборов являются спектрометр рентгеновский многоканальный СРМ-35, разработанный специалистами НПП и производимый ЗАО "Научприбор" в Орле. Этот прибор может быть настроен на

Таблица 2.	Атомно-абсор	рбционные	спектрометры
------------	--------------	-----------	--------------

Производитель (город)	Наименование (марка) прибора	Способ атомизации	Характеристики прибора
"Кортэк" (Москва)	Квант-2А	Пламя	_
	Квант-2М	Пламя	_
	Квант Z	Электротермическая	_
	Квант Z1	Электротермическая	_
"Люмэкс" (СПетербург)	ΜΓΑ-1000	Электротермическая	Зеемановская коррекция несе- лективного поглощения
ООО "ВМК Оптоэлектро- ника" (Новосибирск)	Гранд-ААС	Электротермическая	Прибор позволяет одновременно определять 30—40 элементов

16 элементов в диапазоне от В до U, реализован диапазон определяемых содержаний от 1 ррт до 100%. По этим характеристикам аппарат вполне соответствует мировому уровню, но его недостатки (низкая надежность узлов, несколько устаревшая схема обработки данных) приводят к тому, что предприятия предпочитают импортные аналоги. Среди других разработок НПП "Буревестник" следует выделить прибор BPA-135F - универсальный рентгенофлуоресцентный энергодисперсионный спектрометр. В каталоге предприятия сохраняется потоковый анализатор пульп АР-35, предназначенный для горно-обогатительных комбинатов. Среди производимых НПП "Буревестник" приборов необходимо также отметить приборы, ориентированные на определение серы в нефтепродуктах (энергодисперсионный и волнодисперсионный анализаторы серы в нефтепродуктах). В этих приборах реализован ряд оригинальных технических решений, они в полной мере соответствуют требованиям определения серы в нефтепродуктах по существующим стандартам. Большинство приборов НПП "Буревестник" сертифицированы и внесены в Госреестр средств измерений. Выпуск приборов указанного профиля в НПП "Буревестник" невелик.

Наиболее успешной компанией такого профиля является ООО "НПО "Спектрон", работающее с 1989 г. В его разработках был успешно использован опыт отечественного приборостроения в области рентгеновских кристалл-дифракционных спектрометров. Оригинальная схема Анисовича-Литинского позволила создать компактные настольные приборы, составившие впоследствии семейство "Спектроскан" (табл. 3). Данные приборы, объединив высокое разрешение кристаллдифракционной схемы и большую светосилу, оказались конкурентоспособными по отношению к энергодисперсионным приборам зарубежного производства по своим техническим характеристикам, при этом они существенно дешевле импортных. На предприятии осуществляется серийный выпуск данных аппаратов. Приборы поставлены в Казахстан, Армению, Белоруссию, Алжир, Съерра-Леоне, Иран, ОАЭ, Чехию и другие страны.

Отдельного внимания заслуживают приборы НПО "Спектрон" для анализа нефти и автомобильного топлива: анализатор серы в нефти и нефтепродуктах "Спектроскан SUL", анализатор серы в автомобильных топливах "Спектроскан SWD3", анализатор хлора и серы в нефти и нефтепродуктах "Спектроскан CLSW". Приборы этой группы не уступают зарубежным аналогам и удовлетворяют требованиям нормативных документов по контролю качества нефти и топлива. Все производимые приборы этого предприятия внесены в Реестр средств измерений РФ.

Выпускается также ручной переносной рентгенофлуоресцентный энергодисперсионный спектрометр для анализа горных пород. Существенно, что "Спектрон" не только производит приборы, но и обеспечивает потребителя методиками. Доля отечественных комплектующих в приборах предприятия не менее 80%. В настоящее время НПО "Спектрон" — несомненный лидер в области производства оборудования для рентгеноспектрального анализа.

Такое оборудование производят также АО "Научные приборы" (Петербург), ЗАО "Южполиметаллхолдинг" (Москва), ЗАО "Элеран" (Москва), ООО "Предприятие Толоконников" (Москва). Число выпускаемых этими производителями приборов ограничено (от десятков до единиц в год). Во многих случаях производство сводится к сборке из импортных комплектующих, что позволяет понизить общую цену, но не имеет перспектив с точки зрения создания новых приборов. Оценивая качество приборов этой группы, можно констатировать, что они, как правило, находятся на уровне средних аппаратов зарубежного производства; данных об их длительной эксплуатации у нас нет.

Спектрофотометры, фотометры для видимой и УФ-областей спектра. Приборы этой группы очень широко используются в России, поэтому

Производитель	Наименование (марка) прибора	Способ возбуждения спектра	Способ разложения в спектр	Определяемые элементы	Диапазон определяемых содержаний (предел обнаружения)
НПП "Буре- вестник" (СПетербург)	Универсальный рентгенофлуорес- центный энерго- дисперсионный спектрометр ВРА- 135 F	Рентгеновская трубка 10 Вт, 50 кВ	Энергодисперси- онный полупро- водниковый детектор	F–U	OT 10^{-2} (Na, Mg); 2 × 10^{-3} (Al–Cl); 5 × 10^{-4} (K–U) %
	Энергодисперси- онный анализатор серы в нефтепро- дуктах АСЭ-2	Рентгеновская трубка малой мощности	Энергодисперси- онный газовый пропорциональ- ный счетчик	S	5 ppm—5%
	Волнодисперсион- ный потоковый анализатор пульп AP-35	Рентгеновская трубка	Кристалл- дифракционный с фиксированной настройкой кана- лов (до 8 каналов)	Ca-U	5 × 10 ⁻² —1 × 10 ⁻³ % (в пульпах)
	Специализирован- ный волнодиспер- сионный анализатор АРФ-7	Рентгеновская трубка БХВ-6, 3–5 кВт, 50 кВ	Кристалл- дифракционный высокого разре- шения (схема Кошуа)	Co–U (исключает наложения Rb, Sr, Th)	10 ⁻⁴ -100%
	Волнодисперсион- ный анализатор серы в нефтепро- дуктах ACB-2	Рентгеновская трубка	Кристалл- дифракционный	S	3 ppm-5%
ЗАО "Научпри- бор" (Орел)	Спектрометр рент- геновский многока- нальный СРМ-35	Рентгеновская трубка 4 кВт	Кристалл- дифракционный с фиксирован- ными каналами (16 каналов)	B-U	10 ⁻⁴ -100%
АО "Элеран" (Электросталь)	Спектрометры рентгенофлуорес- центные универ- сальные Clever A-17, Clever B-23, Clever C-31	Рентгеновская трубка 50 Вт, 50 кВ (программа управляемая), Rh	Энергодисперси- онный, SDD детектор	Na-U	10 ⁻⁴ -100%
ЗАО "Южполи- металлхол- динг" (Москва)	Анализатор рентге- нофлуоресцентный энергодисперсион- ный "Призма— M(Au)"	Рентгеновская трубка	Энергодисперси- онный	Au, Ag, Pt, Pd, Rh, In, Ir, Fe, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb, Sn	0.1-100%
	Автоматизирован- ный диагностиче- ский комплекс "АДК-призма"	Рентгеновская трубка	Энергодисперси- онный	Ca, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ag, Sn, W, Pb	0.2—500 г/т

Таблица 3. Рентгенофлуоресцентные спектрометры и квантометры

Таблица 3. Продолжение

Производитель	Наименование (марка) прибора	Способ возбуждения спектра	Способ разложения в спектр	Определяемые элементы	Диапазон определяемых содержаний (предел обнаружения)
	Рентгенофлуорес- центный комплекс экологического контроля "Призма-Эко"	Рентгеновская трубка	Энергодисперси- онный	P, Ca, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Zn, W, Hg	(На фильтрах) 2—5000 мкг
	Портативный рентгенофлуорес- центный анализатор "МетЭксперт"	Рентгеновская трубка	Энергодисперси- онный	Na–Am	0.05-100%
ООО "НПО "Спектрон" (СПетербург)	Электродисперси- онный рентгено- флуоресцентный анализатор для определения серы в автомобильных топливах, нефти, нефтепродуктах "Спектроскан SL"	Рентгеновская трубка	Энергодисперси- онный	S	0.0007-5%
	Анализатор хлора и серы в нефти и нефтепродуктах "Спектроскан CLSW"	Рентгеновская трубка Cr, Pd	Кристалл- дифракционный	Cl, S	Cl от 1.5 мг/кг, S от 0.9 мг/кг
	Анализатор серы в нефти и нефтепро- дуктах "Спектро- скан SUL"	Рентгеновская трубка	Энергодисперси- онный	S	0.0003-5%
	Анализатор серы в автомобильных топливах "Спек- троскан SWD3"	Рентгеновская трубка Cr, Pd	Кристалл- дифракционный	S	1.5—500 мг/кг
	Спектроскан Макс-GVM	Рентгеновская трубка, Pd, 160 Вт, 40 кВ	Кристалл- дифракционный	Na-U	Na ot 0.5%, Mg ot 0.02%, Al-P ot 0.005%, S-U ot 2 × 10 ⁴ %
	Спектроскан Макс-G	Рентгеновская трубка, 4 Вт, 40 кВ, Аg (Mo, Cu)	Кристалл- дифракционный	Ca–U	Ca, Mo-Sb 0.15-100%, осталь- ные 0.06-100%

Таблица 3. Окончание

Производитель	Наименование (марка) прибора	Способ возбуждения спектра	Способ разложения в спектр	Определяемые элементы	Диапазон определяемых содержаний (предел обнаружения)
ООО "Пред- приятие Толо- конников" (Москва)	Анализатор состава вещества "Респект"	Рентгеновская трубка 120 Вт, 50 кВ, 2.4 мА, Аg, Ni, Cu, Mo, Re	Энергодисперси- онный	Na-U	Предел обнаруже- ния Na–S 1–10 ⁻² %, Cl–U 10 ⁻² –3 × 10 ⁻⁴ %
АО "Научные приборы" (СПетербург)	Анализатор рентге- нофлуоресцентный энергодисперсион- ный "Реан" (модели 0.1K – 0.3 K, 0.1H – 0.3H)	Рентгеновская трубка 4 Вт, Аg, Ta, Mo, W, Rh, 10–40 кВ	Энергодисперси- онный	Al–U	От 10 ррт
	Спектрометр рент- генофлуоресцен- тый портативный X-SPEC (модели 40 L, 50 L, 40H, 50H, M)	Рентгеновская трубка 10 Вт, 50 кВ, Ag, Ta, W, Rh	Энергодисперси- онный	(Na)—U	Пределы обнаруже- ния, ppm: Cr – 20, Mn – 16, Fe – 14, Cu – 11, Pb – 14, Zn – 11
	Микрозонд-мик- роскоп рентгенов- ский аналитический РАМ-30 µ	Рентгеновская трубка 500 Вт, 50 кВ, диаметр рентгеновского зонда 30— 1000 мкм	Энергодисперси- онный	(Na)-U	Не заявлены

наличие их отечественного производства весьма важно. К счастью, в данной области были неплохие заделы, некоторые российские спектрофотометры применяются в огромном числе лабораторий – производственных, учебных, научных. В табл. 4 указаны основные приборы.

Таблица 4. Спектрофотометры и спектроэлектроколориметры

Производитель (город)	Наименование (марка) прибора	Некоторые сведения о спектрофотометрах
ОКБ "Спектр" (СПетербург)	СФ-56	Однократное и многократное измерение на заданных длинах волн, сканирование задан- ных участков спектра, кинетические измере- ния, математическая обработка результатов
	СФ-2000	Высокое разрешение, высокая скорость сканирования спектра
"Экросхим" (СПетербург)	ПЭ-5400 УФ, ПЭ-5300 ВИ, ПЭ-5400 ВИ	Сертифицированы для использования мед- учреждениями
Загорский оптико-механический завод (ЗОМЗ) (Сергиев Посад)	КФК-3-01 и модификации	Новая версия КФК-3
ООО "ЮНИКО-СИС" (СПетербург)	КФК-3КМ	Однолучевой
"Аквилон" (Москва)	СФ-104	Однолучевой сканирующий, автосамплер на 8 кювет, самотестирование
	СФ-102	Однолучевой сканирующий, автосамплер на 8 кювет, самотестирование

Производитель (город)	Наименование (марка) прибора	Некоторые сведения о приборах
"Люмэкс" (СПетер- бург)	Люмас-30	Элементный анализатор с импульсным тлеющим разрядом для монолит- ных тонкослойных и порошковых проб металлов, полупроводников, диэлектриков. Времяпролетный анализатор. Высокая чувствительность
	Люмас-50	Времяпролетный прибор для анализа многокомпонентных газовых пото- ков в режиме реального времени. Ионизация электронная. Быстродей- ствующий прибор
Институт аналитиче- ского приборострое-	MX5310	Настольный времяпролетный масс-спектрометр. Ионизация электро- распылением, разрешающая способность не менее 7000
ния РАН (СПетербург). Экспериментальный завод научного приборостро- ения (Черноголовка)	MC7-100	Квадрупольный прибор для анализа газовых смесей. Разрешающая спо- собность 1 а. е. м., предел обнаружения 1—5 ppm, можно определять одновременно до 10 примесей
НПО "Спектромасс" (СПетербург)	MC-800	Настольный квадрупольный масс-спектрометр. Ионизация электрон- ная. Для анализа газов, предел обнаружения 1 ppm. Диапазон массовых чисел 2—800 а. е. м.
Новоуральский при- борный завод (Ново- уральск)	МТИ-350 Г, МТИ-350 Т, МТИ-350 ГП	Приборы преимущественно для изотопного анализа урана, особенно его гексафторида. Для определения гексафторида урана в газовой фазе (МТИ-350 Г), анализа солей урана и трансурановых элементов (МТИ-350 Т), определения примесей в гексафториде (МТИ-350 ГП)

Таблица 5. Масс-спектрометры

Прежние производители (ЛОМО, Загорский оптико-механический и другие заводы) претерпели значительные изменения, но появились компании, в том числе и на базе названных предприятий, которые либо совершенствуют испытанные модели (КФК-3 и др.), либо разрабатывают новые, более современные.

Флуориметры. Широко известны приборы "Флуорат" (Флуорат-02-2М, Флуорат 02-3М) компании "Люмэкс", они производятся уже много лет и с успехом распространяются во многих странах; на начало 2020 г. выпущено около 10 тысяч приборов. Прибор "Флуорат-02-Панорама" используют в исследовательской работе.

ООО "Европолитест" выпускает флуориметр УФМА; длины волн возбуждающего излучения 365 и 455 нм, спектральный диапазон флуоресценции 400-580 нм для модели В1 и 540-650 для модели В2.

На рынке есть также спектрофотометры Флуоран СФФ-2 (ФГУП "ВНИИОФИ").

ИК-Фурье спектрометры. Группа компаний "Люмэкс" выпускает ИК-Фурье спектрометры ИнфраЛЮМ-ФТ-12 (модификации), использующие ближнюю область. Приборы предназначены, например, для анализа сельхозпродукции, пищевых товаров. Петербургская компания АО ЛОИП ("Лабораторное оборудование и приборы") выпускает ИК-Фурье спектрометр ФСМ-1201; "Интерспектр", тоже Петербург, — приборы ФСМ-2211 (для ближней области спектра) и ФСМ-2203 (с высоким разрешением). Есть и другие, в том числе ИК-Фурье, спектрометры.

Масс-спектрометры. В России небольшими партиями выпускаются масс-спектрометры для изотопного и элементного анализа, а также для определения "малых" молекул в газовой фазе — кислорода, азота, оксидов углерода и серы (табл. 5).

Долгожданным стал начавшийся в России выпуск масс-спектрометрических приборов для анализа смесей органических веществ. ЗАО "СКБ "Хроматэк" (Йошкар-Ола) разработало и серийно выпускает масс-спектрометрический детектор для газовой хроматографии с масс-спектрметрическим детектированием. Заявленные производителем характеристики этого квадрупольного прибора не уступают характеристикам импортного оборудования того же класса (табл. 6), а его цена существенно ниже.

Масс-детекторы с похожими заявленными характеристиками и газовые хромато-масс-спектрометры производит также ООО "Интерлаб", однако доля импортных комплектующих в этом случае больше, чем в приборах компании "Хроматэк".

Спектрометры ионной подвижности. Метод существует в двух вариантах: обычная спектрометрия ионной подвижности (СИП; ion mobility spectrometry, IMS) и спектрометрия приращения ионной подвижности (СПИП; increment ion mo-

Источники ионов	ADVIS – с высокой чувствительностью, устойчивый к загрязнениям; STD – позволяет работать с устройством прямого ввода (опция)		
Катод	Два, с программным переключением		
Квадруполь	В настоящее время выпускается ЗАО СКБ "Хроматэк", до недавнего времени – импортный		
Диапазон масс	от 1 до 1200 а. е. м.		
Ионизация	Электронная		
	Химическая (опция)		
Температура источника	До 350°С		
ИОНОВ			
Температура переходной линии ГХ-МС	До 400°С		
Отношение сигнал/шум	Не менее 2500 : 1 по октафторнафталину		
Инструментальный предел обнаружения (IDL)	От 1.68 до 10 фг по октафторнафталину		
Форвакуумный насос	Двухступенчатый пластинчато-роторный (основное исполнение), по желанию заказчика возможна поставка безмасляного насоса		
Турбомолекулярный насос (импортный)	240 л/с (основное исполнение); 84 л/с (опция); 300 л/с (опция); диффузионный (опция)		
Устройство прямого ввода	Доступно по предварительному заказу		

Таблица 6. Характеристики масс-спектрометрического детектора СКБ "Хроматэк"

bility spectrometry, IMIS). Приборы обоих типов часто используют армии и специальные службы, в нашей стране – таможенная служба, МВД, МЧС, ФСБ и другие. Они применяются для обнаружения взрывчатых и отравляющих веществ, наркотиков, других опасных химических веществ. В США для вооруженных сил разработан и выпускается простой прибор массой 500 г. В России производство налажено в Новосибирске (прибор М-02 и другие). Детекторы "Кербер" выпускает "Южполиметаллхолдинг" в Москве: продолжительность анализа 1-5 с, масса прибора 3.7 кг, он может функционировать в полевых условиях; используется таможенной службой и другими ведомствами. Имеются также разработки Института аналитического приборостроения РАН, в том числе с концентрирующим устройством.

Жидкостные хроматографы. Высокоэффективная хроматография (ВЭЖХ) позволяет проводить разделение сложных смесей органических и неорганических (в первую очередь ионизованных) веществ на составляющие их компоненты и одновременное детектирование большинства компонентов с определением концентрации одного или нескольких соединений (в зависимости от конкретных аналитических задач и наличия стандартных образцов). ВЭЖХ широко применяется для целей качественного и количественного анализа сложных веществ: биологических объектов, наркотических, лекарственных, сильнодействующих препаратов, ядов, пищевых продуктов и напитков, взрывчатых веществ, красителей, почв и др. Используется в атомной энергетике, фармацевтической и пищевой промышленности, медицине и многих других областях. Объемы продаж на российском рынке составляют несколько тысяч штук приборов в год.

Жидкостные хроматографы выпускают "Аквилон', "Эко-Нова", "Люмэкс", "Интерлаб" и другие компании. Технические, аналитические и пользовательские характеристики жидкостных хроматографов серии "Стайер" ("Аквилон") не уступают характеристикам приборов ведущих иностранных производителей. При этом их стоимость в полтора, а иногда в два раза ниже стоимости зарубежных аналогов. Хроматограф "Маэстро", выпускаемый ООО "Интерлаб", по своим характеристикам также не уступает импортным аналогам, при этом он тоже в 1.5 раза дешевле. Еще одно предприятие, выпускающее конкурентоспособные жидкостные хроматографы, - ЗАО СКБ "Хроматэк". Название прибора – Кристалл ВЭЖХ.

Основные производимые в России жидкостные хроматографы представлены в табл. 7, которую составили Я.И. Яшин и А.Я. Яшин.

Газовые хроматографы. Газовая хроматография — универсальный метод разделения смесей разнообразных веществ, испаряющихся без разложения. Это один из самых современных методов многокомпонентного анализа, его отличительные черты — экспрессность, высокая точность, чувствительность, возможность автоматизации. Этот метод

Компания, город	Модель	Детекторы*
"Интерлаб" (Москва)	Маэстро ВЭЖХ	СПФ, ДМД, РФ, УФ, фотометрический и флуоримет- рический светодиодный
"Аквилон" (Москва)	Стайер-М	КД, УФ (190–400 нм), СПФ, ДМД, флуориметриче- ский
"Люмэкс" (СПетербург)	Люмахром	СПФ, УФ, флуориметрический
"Научприбор" (Орел)	Милихром-6	Уф (190–360 нм), СПФ, флуориметрический
"Медикант" (Орел)	Орлант, модели 121, 321, 122, 322	УФ (190-360 нм), СПФ (380-720 нм), флуориметри- ческий
"Хромос" (Дзержинск)	Хромос	УФ, ЭХД, КД
"Portlab" (Москва)	Джетхром	КД, СПФ, ЭХД, флуориметрический
"Эконова" (Новосибирск)	Альфахром	УФ (190-360 нм)
"Хроматэк" (Йошкар-Ола)	Кристалл ВЭЖХ	СПФ, ДМД, УФ, флуориметрический

Таблица 7. Жидкостные хроматографы

*СПФ – спектрофотометрический, ДМД – диодно-матричный; УФ – ультрафиолетовый, КД – кондуктометрический, ЭХД – электрохимический.

Таблица 8. Приборы для капиллярного электрофореза

Продукт	Капель 105 М/205		
Производитель	"Люмэкс" (СПетербург)		
Цена	\$ 15000-25000		
Ввод пробы	Гидродинамический или электрокинетический		
Детекторы	Спектрофотометрический 190-400 нм; время отклика 0.1 с		
Автосамплер	2 карусели по 10 позиций на входе и выходе капилляра или карусель на 59 позиций (в зависимости от модификации)		
Напряжение, кВ	от 0 до $\pm 25/30$ (в зависимости от модификации)		
Минимальная длина капилляра от инжектора до детектора	7 или 8.5 см (короткий конец); минимальная общая длина капилляра 33 см		

незаменим в нефтехимии (бензины содержат сотни соединений, а керосины и масла — тысячи), его используют при определении пестицидов, в анализе удобрений, лекарственных препаратов, витаминов, наркотиков и др.

Основные производители газовых анализаторов в России — ЗАО СКБ "Хроматэк" и ООО "НПФ "Мета-хром" (оба в Йошкар-Оле). Их продукция: хроматографы Кристалл 2000М и Кристалл 5000, Хромас-Кристалл 5000, Хроматэк-МСД, Кристалллюкс-4000М, промышленный потоковый газовый хроматограф Перохром-4000. По своим характеристикам перечисленные приборы успешно конкурируют с аналогичными приборами компаний "Шимадзу" и "Аджилент". Цена приборов в 1.5–2 раза ниже, чем аналогичных.

Газовые хроматографы специального назначения серии "Эхо" разработаны в Институте нефтегазовой геологии и геофизики им. А.А. Трофимука СО РАН (Новосибирск) и производятся совместно с ПО "Север". Это – поликапиллярные приборы ЭХО-Аспид, портативные, быстродействующие, очень чувствительные для обнаружения паров взрывчатых веществ; Эхо-Фид-ВВ для анализа выдыхаемого воздуха при диагностике диабета; ЭХО-ДТП, ЭХО-ДЭЗ для экологического контроля с детекторами фотоионизационным, пламенно-ионизационным, по теплопроводности соответственно.

Приборы для капиллярного электрофореза. Прибор "Капель 205" компании "Люмэкс" широко используется, выпущено (на начало 2020 г.) более 220 экземпляров. Ранее выпускалась модель "Капель 105". Некоторые сведения о приборах см. в табл. 8.

Электрохимические приборы. Приборы этой группы обычно не очень дорогие, некоторые довольно просты в изготовлении. Этот сегмент аналитической техники в России обеспечивается собственным производством лучше многих других. В этой области действует немалое число производителей — "Эконикс", "Эконикс-Эксперт", "Вольта", "Томьаналит', "НПЦ Техноаналит" и другие.

рН-метры, ионометры, ионоселективные электроды, кислородомеры. Приборы этой группы изготавливают компании "Эконикс-Эксперт" и НПП "Эконикс" (обе в Москве), "Аквилон", "Томьаналит" и другие.

Приборы для вольтамперометрического и близких к нему методов анализа. Ранее такие приборы выпускало НПП "Буревестник", но уже давно этого не делает. В числе компаний, выпускающих устройства для вольтамперометрического анализа, – "Томьаналит", "Вольта", "Эконикс-Эксперт", "НПЦ Техноаналит" и другие. Так, петербургская "Вольта" изготавливает и продает потенциостат-гальваностат ИПС, потенциостаты серии IPC, установку с вращащимся дисковым электродом ВЭД-06, анализатор тяжелых металлов ABC-06, анализатор тяжелых металлов ABC-1.1.

Кулонометры. Одно из предприятий Росатома производит прецизионные потенциостатические кулонометрические приборы для нужд ведомства по разработке Института геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского РАН. Есть и другие разработки. Кулонометрические титраторы выпускает "Эконикс-Эксперт" (Москва).

Титраторы. Некоторые массовые анализы успешно осуществляются методом титриметрии, и для решения таких задач серийно производят не очень дорогие приборы. К числу таких задач относится определение концентрации воды по методу Фишера или некоторые анализы молока. Производятся и более универсальные титраторы. Компания "Аквилон", например, выпускает автоматический титратор АТП-02. "Техноцентр" (Новосибирск) продает титратор "по Фишеру" АТЛ-11-01, "Партнер" (Ростов-на-Дону) – титратор "Фишера" и "Эксперт-007".

Аналитические весы. Разработка и производство аналитических весов сосредоточены в Петербурге. Научно-производственное предприятие "Госметр" выпускает несколько серий прецизионных весов – ВЛА (ВЛА-220 С, ВЛА-120 С, ВЛА-120 С и другие) и ВЛ (ВЛ-В, ВЛ-120 С, ВЛ-220 С, в последнее время Л-84 В). Другим производителем является ОКБ "Веста", выпускающее весы серий АВ и ВМ.

Анализаторы. Речь идет об относительно простых в использовании приборах, обычно предназначенных для определения одного вещества в определенной среде. Ограничение возможностей компенсируется компактностью, надежностью и уже отмеченной простотой эксплуатации. В многочисленных устройствах этого типа реализуются самые разнообразные методы анализа, приборы данной группы нацелены на определение большого числа важных аналитов. С точки зрения обеспечения массового анализа за такими приборами большое будущее. Это видно на примере широко применяемых анализаторов - кислородомеров, глюкометров, анализаторов серы в нефти, рН-метров, приборов для определения метана в угольных шахтах и других. Все названные приборы, кроме, кажется, глюкометров, и очень многие другие производятся в России.

Вспомогательное оборудование. В России выпускается много вспомогательного оборудования для химического анализа — микроволновые печи, аналитические автоклавы, устройства для концентрирования аналитов, ионселективные электроды и др., но это направление, возможно, заслуживает отдельной публикации.

———— В НАУЧНОМ СОВЕТЕ РАН ПО АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ ————

44-Я ГОДИЧНАЯ СЕССИЯ СОВЕТА

DOI: 10.31857/S0044450221040071

29 сентября 2020 г. в оздоровительном комплексе "Орбита" (Краснодарский край, пос. Ольгинка) во время IV Всероссийской конференции "Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез" состоялась очередная 44-я Годичная сессия совета. После вступительного слова председателя совета академика Ю.А. Золотова¹ состоялось вручение молодежных премий совета. Премии вручены к. х. н. Ю.С. Петровой (Уральский федеральный университет им. первого президента России Б.Н. Ельцина), к. х. н. А.В. Маркину (Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского) и к. х. н. Д.М. Мазуру (МГУ им. М.В. Ломоносова)². Лауреаты премий кратко рассказали о своих работах.

Д. х. н. П.Н. Нестеренко (МГУ им. М.В. Ломоносова) сделал интересный доклад об основных достижениях и тенденциях развития аналитической химии в стране (на основе материалов отчета совета за 2019 г.). Начав с наукометрических аспектов развития аналитической химии в мире, докладчик остановился на основных отечественных достижениях в этой области. в том числе не отраженных в отчете. Он отметил, что опережающими темпами развиваются наноматериалы аналитического назначения, химические сенсоры, микрочипы; способы определения, подходы к ним (approaches) развиваются интенсивнее, чем методы определения (analytical techniques); заострил внимание на существующих, по его мнению, недостатках. Недостает информации о практических внедрениях аналитических разработок, мало работ по созданию приборов и установок, невелико число российских монографий в области аналитической химии. С презентацией доклада можно ознакомиться на сайте научного совета.

Научно-организационная деятельность совета в 2019 г. освещена в сообщении ученого секретаря совета к. х. н. И.Н. Киселевой. Деятельность эта была вполне успешной. Совет провел два семинара на 17-й Международной выставке лабораторного оборудования и химических реактивов "Аналитика Экспо 2019" (Москва, 23–26 апреля): "Неинвазивная лабораторная диагностика заболеваний" (председатель – д. х. н. А.И. Ревельский, МГУ им. М.В. Ломоносова) и "Анализ минерального сырья" (председатель – к. ф.-м. н. А.А. Рогожин, Всероссийский научно-исследовательский институт минерального сырья им. Н.М. Федоровского). Успешно прошли XI Всероссийская конференция по анализу объектов окружающей среды "Экоаналитика 2019" (Пермь, санаторий Усть-Качка, 27 мая-1 июня); 43-я Годичная сессия совета в рамках этой конференции; XXI Менделеевский съезд (Санкт-Петербург, 9–13 сентября), на котором работала секция "Аналитическая химия: новые методы и приборы для химических исследований и анализа"; 3-я Всероссийская конференция по аналитической спектроскопии (Краснодар-Туапсе, 29 сентября-5 октября); 8-я Всероссийская конференция с международным участием "Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы" (Москва, 14-18 октября); XXII Черняевская конференция по химии, аналитике и технологии платиновых металлов (Москва, 18-22 ноября) с секцией по аналитической химии.

Планы на следующие годы были скорректированы коронавирусной пандемией. В 2020 г. состоялись 12-й Международный симпозиум по хемометрике (Саратов, 24-28 февраля); 18-я Международная выставка лабораторного оборудования и химических реактивов "АналитикаЭкспо 2020" (Москва, КВЦ Крокус-Экспо, 23–26 сентября), на которой был организован семинар "Газовые химические сенсоры" (председатель д. т. н. Б.К. Зуев); IV Всероссийская конференция "Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез" и 44-я Годичная сессия совета в рамках этой конференции и Х Юбилейная Всероссийская конференция по электрохимическим методам анализа "ЭМА 2020") (Казань, 16-20 ноября). В 2021 г. планируется проведение VI Всероссийского симпозиума по разделению и концентрированию в аналитической химии и радиохимии (Краснодарский край, пос. Ольгинка, 26 сентября-2 октября). На 2021 г. перенесена XI Всероссийская научная конференция "Аналитика Сибири и Дальнего Востока", посвященная 100-летию со дня рождения И.Г. Юделевича (Новосибирск, даты не определены).

В 2022 г. состоится IV Съезд аналитиков России. На середину мая того же года намечено проведение V Всероссийской конференции "Анали-

¹ Публикуется отдельно.

² Информация о премиях совета за 2020 г. опубликована (Журн. аналит. химии. 2020. Т. 75. № 10. С. 955).

тическая хроматография и капиллярный электрофорез" (Самара), с 2021 на 2022 г. перенесена международная конференция "Eurosensor" (Санкт-Петербург).

Вторая часть сессии прошла под лозунгом "COVID-2019 и аналитическая химия". С докладами выступили д. х. н. Б.Б. Дзантиев (ФИЦ Биотехнологии РАН) и д. х. н. П.П. Гладышев (Университет "Дубна") в соавторстве с Ю.В Тумановым (ГНЦ "Вектор", Новосибирск).

Б.Б. Дзантиев рассказал о методах аналитической химии в лиагностике коронавирусной инфекции. Из 40 известных коронавирусов 7 вызывают простудные заболевания человека и 3 из них – SARS-CoV (2002 г.), MERS-CoV (2012 г.) и SARS-CoV-2 (2019–2020 гг.) – являются возбудителями тяжелых респираторных инфекций. Специалисты по аналитической химии в мире и в России оперативно отреагировали на вызовы, связанные с пандемией. Предложен ряд диагностических методов для обнаружения вирусов и антител к ним, позволяющих быстро выявлять и оперативно лечить инфицированных людей, а также контролировать эффективность разрабатываемых вакцин. Среди методов диагностики широкое распространение в настоящее время получили методы ПЦР (разработаны коммерческие приборы для быстрого осуществления анализа), иммуноферментный (ИФА), иммунохроматографический (ИХА) методы, создан ряд биосенсоров, разработана диагностика вируса по уровням биохимических маркеров, на основе анализа выдыхаемого воздуха. Создана медицинская маска с сенсорным покрытием, меняющая цвет в присутствии вируса. В России зарегистрировано 32 молекулярно-генетических теста на COVID-19, в том числе 28 – отечественных производителей; 49 наборов реагентов для определения антител (ИФА), в том числе 24 — отечественных; 50 экспресс-тестов для определения антител (ИХА), в том числе 5 отечественных; 4 экспресс-теста для определения антигена (ИХА). В перспективе — массовая диагностика с помощью роботов и смартфонов.

В докладе "Аналитика и протеомная диагностика коронавирусных заболеваний" П.П. Гладышев отметил, что современная медицинская диагностика базируется на определении набора биомаркеров заболеваний. У COVID-19 найдено 27 белковых биомаркеров, о 3D-структуре которых имеется практически полная информация. Залача заключается в создании биореагентов на эти биомаркеры. Перечислен ряд технологий получения биореагентов, в том числе аптамерные полипептидные, аптамерные ДНК/РНК технологии и другие, на базе которых созданы платформы для аналитической диагностики. Будущее за созданием систем молекулярной диагностики, которые основаны на компьютерном молекулярном дизайне биореагентов и молекулярном моделировании процессов их взаимолействия с биомаркерами. Одной из задач. стоящих перед аналитиками сегодня, является создание автоматизированных систем массовой лабораторной диагностики.

В дискуссии были высоко оценены и доклад о важнейших достижениях в области аналитической химии в 2019 г., и доклады по теме коронавируса. Доклад по отчету совета активно обсуждался, был высказан ряд замечаний и пожеланий. Отчет о работе совета в 2019 г. был признан удовлетворительным и утвержден.

И.Н. Киселева

——— В НАУЧНОМ СОВЕТЕ РАН ПО АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ ——

ВСТУПИТЕЛЬНОЕ СЛОВО ПРЕДСЕДАТЕЛЯ НАУЧНОГО СОВЕТА РАН ПО АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ АКАДЕМИКА Ю.А. ЗОЛОТОВА НА ГОДИЧНОЙ СЕССИИ 29 СЕНТЯБРЯ 2020 г.

DOI: 10.31857/S0044450221040186

Глубокоуважаемые коллеги! Карантинные меры 2020 года затруднили осуществление многих дел. Преподавание аналитической химии проводилось в непривычных условиях, с издержками, но тем не менее все старались довести учебный год до конца с основными полагающимися атрибутами. Экспериментальная научная работа в период изоляции во многих местах не проводилась вовсе, зато делались обобщения, писались статьи, отчеты, диссертации, учебные пособия и монографии. Крупные мероприятия, а именно некоторые конференции, выездные заседания бюро, были перенесены либо отменены. Проведена, правда, выставка "Аналитика Экспо" с хорошим семинаром по газовым сенсорам.

Однако на этой сессии научного совета подводятся итоги 2019 г., когда никакого карантина не было, поэтому мы вправе предъявить к ушедшему году обычные, без скидок, требования. Мы должны рассмотреть наши успехи и недостатки, соотнося их с тем, что происходит в мировой науке; а там много чего происходит. Например, интенсивно разрабатываются приемы и устройства для анализа биомедицинских объектов; победы здесь не перестают удивлять, причем многое относительно быстро входит в практику. Вспомним пульсоксиметры, которые надевают нам на пальцы в поликлиниках (это по сути оптический анализатор кислорода в крови); глюкометры; приборы для ПЦР; массовую ДНК-идентификацию. В этой сфере работает большое число людей самых разных специальностей. Некоторые журналы по аналитической химии состоят почти полностью из статей, нацеленных на анализ биообъектов в широком смысле слова – не только объектов медицины или молекулярной биологии, но также пищевых продуктов, растительного и животного сырья. Соответственно развиваются аналитические методы, широко используемые для анализа таких объектов, – разные виды хроматографии и электрофореза, масс-спектрометрия, биохимические методы; многие задачи решаются спектрометрическими и электрохимическими методами. В области анализа биомедицинских объектов многое делается и у нас, но хотелось бы больше крупных, оригинальных работ.

Значительные достижения аналитическая химия имеет в направлении обнаружения взрывчатых и отравляющих веществ, наркотиков, разного рода токсикантов; в надежных и часто портативных и простых в использовании устройствах для такого обнаружения нуждаются та же медицина, экологическая служба, вооруженные силы, службы безопасности, пожарная охрана. Впечатляет создание в США прибора для обнаружения отравляющих и взрывчатых веществ весом в 500 г на базе метода спектрометрии ионной подвижности; такой прибор может быть выдан каждому солдату.

Метолы анализа все в большей степени создаются, совершенствуются, рекомендуются практике не химиками-аналитиками и даже не теми, кто в той или иной степени считает себя аналитиком, а специалистами из самых разных областей знания, работающими в организациях или учреждениях физического, технического, биологического, геологического или иного профиля, а также на предприятиях. Это характерно для всего мира и для нашей страны тоже. Только один пример: спектрометрией ионной подвижности у нас занимаются в Московском инженерно-физическом институте, в Научно-исследовательском технологическом институте Росатома, в полузакрытых учреждениях Новосибирска; московская фирма Южполиметаллхолдинг производит приборы серии "Кербер". В этом списке, который можно продолжить, нет, кажется, академических институтов и вузов (или факультетов) химического профиля. Задача аналитиков-профессионалов, задача научного совета - объединить все исследования и разработки, целью которых является определение химического состава веществ и материалов, способствовать распространению аналитической методологии. Все должны знать о представительной пробе, градуировании, мешающих влияниях, ресурсе устройства, способах обработки и интерпретации данных. А то, что аналитические методы все больше создают коллеги из других областей знания, так это хорошо.

В 2019 г. и в первой половине 2020 г. очередными изданиями вышли учебники, подготовленные под редакцией Л.Н. Москвина, А.А. Ищенко, В.И. Вершинина, издано несколько монографий, вышли материалы, посвященные памяти известных аналитиков. Весьма заметен новый вклад в науку, например в части обнаружения взрывчатых и отравляющих веществ, развития биосенсоров, вклада в наноаналитику, в масс-спектрометрию. Растет число публикаций в хороших журналах, в редколлегиях и особенно редсоветах многих международных журналов увеличилось число российских аналитиков.

После предыдущей сессии научного совета, которая состоялась в Усть-Качке под Пермью в мае прошлого года, мы потеряли (в январе 2020 г.) кандидата химических наук Анатолия Ивановича Каменева, специалиста по электрохимическим методам анализа, долгое время работавшего на кафедре аналитической химии Московского университета им. М.В. Ломоносова и в течение многих лет члена нашего совета. 26 июля 2019 г. ушел из жизни Николай Петрович Ильин, кандидат технических наук, специалист по рентгеновским методам анализа, один из пионеров рентгеноспектрального микроанализа, работавший в НПО "Квант", член научного совета.

В 2019 г. сформирован новый состав научного совета и его подразделений, который получил полномочия на пять лет, до 2024 г. В этом году совету 80 лет; юбилей отмечен книгой о совете (Золотов Ю.А., Киселева И.Н. Аналитика и аналитики. Научный совет РАН по аналитической химии. М.: Спутник+, 2020. 252 с.).

В 2022 г. состоится Съезд аналитиков России; надеюсь, что это будет большое, полезное и интересное событие. Приветствуются предложения, идеи по его организации, особенно по программе.

— ХРОНИКА —



7 ноября 2020 г. ушла из жизни Валентина Павловна Фадеева, доктор химических наук, главный научный сотрудник лаборатории микроанализа Института органической химии Сибирского отделения РАН.

В.П. Фадеева родилась в 1935 г., окончила в 1958 г. химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова. Была аспирантом аналитической лабо-

ПАМЯТИ В. П. ФАДЕЕВОЙ

ратории Института химии природных соединений АН СССР, до 1965 г. работала во Всесоюзном институте лекарственных и ароматических растений (Москва). С 1965 г. – в Новосибирском институте органической химии СО АН СССР, в лаборатории микроанализа. В 1975–2012 гг. заведовала этой лабораторией, а с 2012 г. была главным научным сотрудником. Кандидатскую диссертацию защитила в 1963 г., докторскую – в 2004 г. ("Элементный и функциональный анализ ароматических, полициклических и азотистых гетероциклических органических соединений").

В.П. Фадеева была крупным специалистом по органическому анализу, автором более 150 публикаций. С 1976 г. входила в состав Научного совета АН СССР (РАН) по аналитической химии. В институте и Сибирском отделении РАН пользовалась большим авторитетом. Она активно участвовала в общественной жизни: трижды избиралась депутатом городского совета, была редактором институтской газеты. Ее знали и как чуткого наставника молодежи, под ее руководством защищены три кандидатских диссертации. Благодаря своим ярким личным качествам, таким как исключительная доброта, внимание к собеседнику, горячая любовь к людям, природе и своему делу, а также способность всегда сохранять оптимизм и присутствие духа, Валентина Павловна заслужила глубокое уважение коллег.