

ISSN 0044-4502

Том 78, Номер 2

Февраль 2023



ЖУРНАЛ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ



www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 78, номер 2, 2023

ОБЗОРЫ

Автоматизация пробоподготовки на принципах хроматомембранных методов разделения при анализе водных и воздушных сред

Л. Н. Москвин, А. Л. Москвин, О. В. Родинков, Н. М. Якимова

99

Аналитические возможности определения углеводов хроматографическими и электрофоретическими методами

Л. А. Карцова, А. В. Малюшевская, Е. А. Колобова

108

СТАТЬИ ОБЩЕГО ХАРАКТЕРА

Методологические аспекты группового анализа органических веществ

В. И. Вершинин

129

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Поведение и фракционирование труднолетучих примесей в дуге постоянного тока при анализе циркония атомно-эмиссионным методом

Н. И. Золотарева, С. С. Гражулене

144

Спиропираны на основе бензофуранового фрагмента как аналитические реагенты на низкомолекулярные аминотиолы

А. А. Щербатых, О. И. Аскалелова, А. О. Буланов, И. Н. Щербаков, С. Т. Нгуен

151

Автоматизированная жидкостная микроэкстракция фторхинолонов для их последующего хроматографического определения

И. И. Тимофеева, К. А. Барбаянов, А. В. Булатов

159

Об устойчивости незамещенных гидразонов ароматических карбонильных соединений к гидролизу в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ

А. Деруиш, Г. В. Каракашев, А. И. Уколов, И. Г. Зенкевич

166

Извлечение и концентрирование высоколипофильного антиоксиданта 2,6-диизоборнил-4-метилфенола и его метаболита из образцов плазмы крови для определения методом ВЭЖХ-МС/МС

А. П. Лакеев, Е. А. Яновская, В. А. Яновский, М. О. Андропов

176

Хроматографическое определение ибупрофена в культуральных средах родококков и кинетическое моделирование процесса его биодеструкции

Е. В. Вихарева, А. А. Селянинов, Г. А. Бажутин, Е. А. Тюмина

187

УДК 543.05:542

АВТОМАТИЗАЦИЯ ПРОБОПОДГОТОВКИ НА ПРИНЦИПАХ ХРОМАТОМЕМБРАННЫХ МЕТОДОВ РАЗДЕЛЕНИЯ ПРИ АНАЛИЗЕ ВОДНЫХ И ВОЗДУШНЫХ СРЕД

© 2023 г. Л. Н. Москвин^{а, *}, А. Л. Москвин^б, О. В. Родинков^а, Н. М. Якимова^а

^аСанкт-Петербургский государственный университет, Институт химии
Университетская наб., 7/9, Санкт-Петербург, 199034 Россия

^бСанкт-Петербургский национальный исследовательский
университет информационных технологий, механики и оптики
Кронверкский просп., 49, Санкт-Петербург, 197101 Россия

*e-mail: moskvln@yandex.ru

Поступила в редакцию 05.07.2022 г.

После доработки 18.07.2022 г.

Принята к публикации 18.07.2022 г.

В статье обобщен накопленный опыт применения хроматомембранных методов (ХММ) для автоматизации химического анализа водных и воздушных сред. Особый акцент сделан на проточных методах непрерывного анализа, где ХММ часто не имеют альтернативы.

Ключевые слова: автоматизация, пробоподготовка, хроматомембранные методы.

DOI: 10.31857/S004445022302007X, **EDN:** CDLRBW

Пробоподготовка до сих пор остается наиболее сложной для автоматизации стадией химического анализа, особенно в тех случаях, когда она включает концентрирование аналитов, а анализ выполняется в непрерывном режиме. Пробоподготовка в анализе жидких и газовых сред, как правило, решает две задачи. Во-первых, концентрирования аналитов, а во-вторых, их перевод в другое фазовое состояние для их определения наиболее простыми и доступными методами. Например, для одновременного определения “кислых” газов (HCl, HF, SO₂, NO₂ и т.д.) в воздухе возможно использование ионного хроматографа после их предварительного выделения из газовой фазы в водный раствор. Или, наоборот, для определения летучих органических веществ (ЛОВ) в воде обычно прибегают к газовой экстракции, чтобы перенести ЛОВ в газовую фазу для их последующего определения методом газовой хроматографии. Для решения тех и других задач пробоподготовки чаще всего находят применение методы жидкостно-жидкостной экстракции, жидкостной абсорбции из газовой фазы в водные растворы и газовой экстракции. Общий принцип разделения веществ, лежащий в основе этих методов, — различия в их межфазном распределении. В течение длительного времени оставались неизменными принципиальные схемы реализации процессов межфазного распределения: смешение и расслаивание фаз в статических условиях или создание

потока одной фазы относительно другой, находящейся в стационарном состоянии. За редкими исключениями любая из этих схем, независимо от используемой системы фаз, позволяет осуществить разделение при периодическом вводе пробы исходной смеси веществ в зону ее контакта с фазой, извлекающей аналиты, и при периодическом выводе аналитов из извлекающей фазы или при использовании в качестве пробы самой извлекающей фазы с выделенными в нее аналитами. А в тех случаях, когда существует возможность непрерывного разделения, например, в противоточной жидкостно-жидкостной экстракции, как правило, возникают серьезные проблемы с расслаиванием фаз в потоке. Отсюда — объемные трудности, с которыми приходится сталкиваться при автоматизации стадии пробоподготовки с использованием любого из упомянутых выше методов.

Хроматомембранные процессы и основанные на их принципе методы разделения. Новые возможности для решения задач пробоподготовки открыли хроматомембранные методы (ХММ) — новые методы разделения [1], основанные на проявлении капиллярных эффектов в гидрофобных пористых средах [2, 3]. Хроматомембранные массообменные процессы (ХММП), лежащие в основе ХММ, принципиально осуществимы в системах жидкость—газ или жидкость—жидкость. Для осуществления ХММП необходимы бипористые

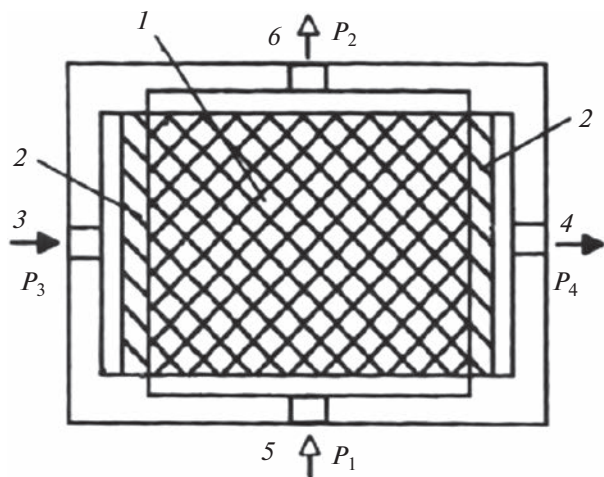


Рис. 1. Схема осуществления хроматомембранных массообменных процессов в случае потоков фаз, пересекающихся под прямым углом. 1 — бипористая гидрофобная матрица; 2 — однородномикропористые гидрофобные мембраны; 3 — вход неполярной жидкой или газовой фазы; 4 — выход неполярной жидкой или газовой фазы; 5 — вход полярной жидкой фазы; 6 — выход полярной жидкой фазы. P_1, P_2, P_3, P_4 — давления обеих фаз соответственно на входе в матрицу и на выходе из нее.

матрицы — пористые структуры с двумя типами однородных по размерам пор, различающихся размерами, изготовленные из гидрофобного материала. При этом единственная жидкая фаза или одна из двух жидких фаз должна быть настолько полярной, чтобы исключалась смачиваемость ею материала, из которого изготовлены гидрофобные пористые матрицы. Дополнительным обязательным требованием является определенный размер открытых пор в этих пористых матрицах. Одни из них относятся к категории микро- или мезопор (в дальнейшем по отношению к ним используется одна обобщающая характеристика — микропоры). Вторые относятся к категории макропор, существенно превосходя первые по размерам. Критерием выбора размеров пор каждого типа является возникающее в них капиллярное давление P_k по отношению к полярной жидкой фазе (ПЖФ).

В применяемых для осуществления ХММП бипористых матрицах размер микропор должен быть таким, чтобы в условиях проведения эксперимента давление ПЖФ во всем объеме бипористой матрицы ($P_{ПЖФ}$) не превышало величину P_k , возникающего в микропорах:

$$P_{ПЖФ} < P_k.$$

В этом случае последние оказываются недоступными для нее. В то же время микропоры в матрице могут служить каналами для прохождения второй фазы, участвующей в массообменном

процессе: неполярной жидкости или газа. В свою очередь, размеры макропор не должны быть меньше некоторой пороговой величины, при которой возникающее в них капиллярное давление делает их непроницаемыми для ПЖФ. В этом случае они образуют каналы для создания потока этой фазы. В результате в бипористых гидрофобных матрицах можно создать независимые, пересекающиеся под произвольными углами потоки двух фаз, массообмен между которыми будет осуществляться в местах пересечения каналов, образованных порами каждого типа, т.е. процесс массообмена будет аналогичен осуществляемому в хроматографической колонке, функционирующей в режимах обращенно-фазовой жидкостно-жидкостной хроматографии (случай двух жидких фаз) или в режиме жидкостно-газовой хроматографии (система жидкость—газ). Последнее гарантирует высокую эффективность массообмена, достигаемую в хроматографических методах.

Для того чтобы обеспечить ввод в бипористую матрицу и вывод из нее неполярной жидкой и (или) газовой фазы с соответствующих сторон массообменных матриц устанавливают плотно прижатые к ней однородно микропористые гидрофобные мембраны, требования к размерам пор в которых аналогичны требованиям к размерам микропор в бипористых матрицах.

Схема осуществления ХММП (рис. 1) соответствует прохождению потоков двух фаз, пересекающихся под прямым углом: полярная жидкость протекает через бипористую матрицу, образующую массообменное пространство от входа в массообменную камеру 5 до выхода из нее 6 (P_1 и P_2 — давления ПЖФ на входе в массообменную камеру и на выходе из нее соответственно), а в перпендикулярном направлении создается поток неполярной жидкости или газа от входа 3 к выходу 4 (P_3 и P_4 — давление на входе и выходе соответственно). Смешение потоков двух фаз в массообменной камере исключается за счет поддержания определенных соотношений давлений полярной и неполярной жидкой или газовой фаз на входе и на выходе из матрицы, в результате чего давление в пределах всего объема, занимаемого в массообменной камере неполярной фазой, поддерживается на более низком уровне, чем давление полярной фазы, т.е. минимальное давление P_2 полярной фазы, создаваемое на ее выходе из массообменной камеры, должно превышать максимальное давление P_3 неполярной жидкой фазы или газа на входе в нее:

$$P_2 > P_3. \quad (1)$$

В результате газ или неполярная жидкая фаза не могут перейти из “микропор” в макропоры. В свою очередь, их вытеснение из “микропор” полярной фазой исключается благодаря тому, что

максимальная величина давления ПЖФ P_1 , которое реализуется на ее входе в матрицу, поддерживается меньшей совокупной величины давления P_4 и P_k , возникающего в микропорах:

$$P_1 < P_4 + |P_k|, \quad (2)$$

где $|P_k|$ — абсолютная величина капиллярного давления, имеющего в данном случае отрицательное значение.

Поток неполярной жидкой или газовой фазы вводится в массообменное пространство и выходит из него через гидрофобные пористые мембраны, размеры пор в которых в случае идентичных материалов совпадают с размерами микропор в бипористой матрице, образующей массообменное пространство. Граничным условием выбора материала мембран и размера пор в них является соотношение:

$$|P_k| < P_1. \quad (3)$$

В рамках приведенной физико-химической модели ХММП достаточно очевидны подходы к выбору материала пористой матрицы. По своим физико-химическим свойствам материал матрицы должен быть, во-первых, химически инертным по отношению к обеим фазам, во-вторых, должен обеспечивать максимальный краевой угол смачивания полярной фазой. Подход к выбору пористой структуры материала бипористой матрицы с точки зрения эффективности процесса межфазного обмена аналогичен применяемому в хроматографических методах подходу к выбору размеров частиц носителей неподвижной фазы. В обоих случаях приходится искать компромисс между улучшением проницаемости бипористой матрицы или хроматографической колонки соответственно и ухудшением разрешения зон разделяемых веществ при увеличении размеров частиц сорбентов или носителей, а в случае ХММП — радиусов макропор.

Не столь однозначны критерии выбора радиусов “микропор”. При уменьшении их радиуса увеличивается величина возникающего в них капиллярного давления, что оправдано с точки зрения предотвращения проникновения в них полярной жидкой фазы. Но при этом снижается проницаемость матрицы для потока газа или жидкости, смачивающей поверхность пор, пропорционально квадрату их радиуса. Таким образом, возникает проблема подбора интервала радиусов “микропор”, при котором ХММП может быть осуществлен наиболее эффективно. Теоретически и экспериментально доказано [4, 5], что в идеальном случае при использовании в качестве материала матриц из политетрафторэтилена радиус микропор должен находиться в интервале от 1 до 10 мкм. При этом, как уже отмечалось выше,

микропоры, также как и макропоры должны быть максимально близки друг к другу по размерам.

Пробоподготовка на принципах хроматомембранных методов при выполнении анализов офлайн и онлайн. Еще одно достоинство хроматомембранных методов для использования их в пробоподготовке проявляется в открываемой ими возможности разделения веществ как по традиционной дискретной схеме, так и в непрерывном режиме соответственно при выполнении анализов офлайн и онлайн. Если в последнем случае для исключения смешения фаз требуется строгое выполнение условия (2), то при дискретном разделении смешение фаз исключается схемой подачи обеих фаз в хроматомембранную ячейку (ХМЯ) с перекрытием на входе и выходе из нее каналов подачи и сбора той фазы, которая в условиях эксперимента является неподвижной. Соответственно условие осуществления ХММП упрощается до

$$\Delta P < P_k, \quad (3)$$

где ΔP — градиент давления, при котором в ХМЯ подается та фаза, которая выступает в роли подвижной.

Принципиальные схемы осуществления ХММП в дискретном режиме приведены на рис. 2.

Другими важными параметрами оптимизации условий хроматомембранного разделения веществ являются направления относительного перемещения фаз в ХМЯ. В зависимости от направлений относительного перемещения фаз возможны три варианта ХММ (рис. 3). В случае параллельных потоков двух фаз, движущихся в одном направлении, реализуется прямоточный вариант метода. При встречном движении потоков — противоточный. Наконец, если потоки пересекаются под прямым углом, то осуществляется двухмерная схема ХМ-разделения. Относительные достоинства этих схем подробно обсуждаются в работах [6, 7], где рассмотрены закономерности движения зон разделяемых веществ в ХМЯ. Указанные закономерности описываются теми же уравнениями, что и в соответствующих вариантах хроматографических методов. Там же можно найти подтверждение применимости тарелочной теории хроматографии для оценки эффективности ХМ-методов и описание примеров их применения в вариантах хроматомембранной жидкостной экстракции (ХМЖЭ), хроматомембранной газовой экстракции (ХМГЭ) и хроматомембранной жидкостной абсорбции (ХМЖА).

Первыми иллюстрациями возможностей применения ХМЖЭ в проточных методах анализа явились проточно-инжекционное экстракционно-фотометрическое определение меди [6] и анионных поверхностно-активных веществ [8]. В обоих случаях при минимальных временных за-

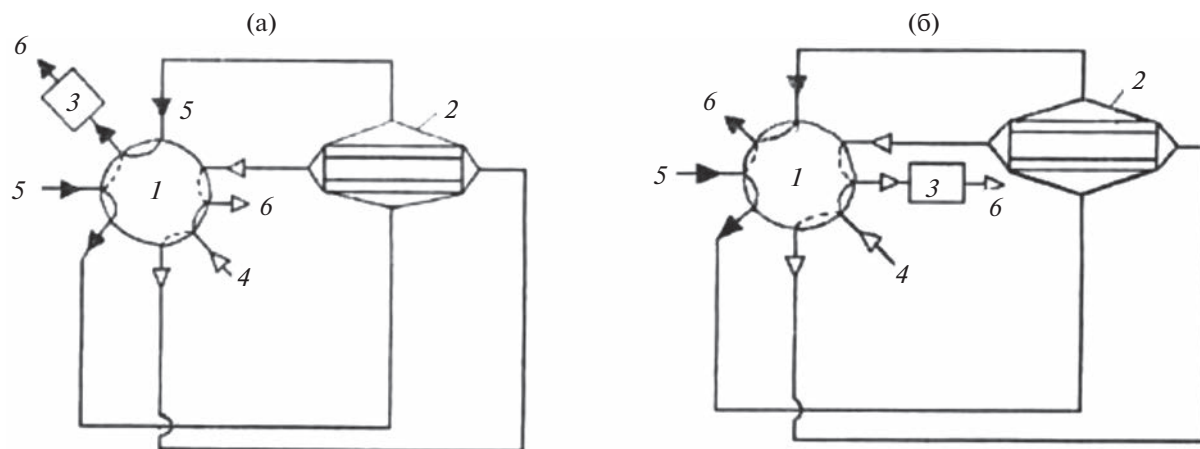


Рис. 2. Принципиальные схемы проведения хроматомембранного предварительного концентрирования в дискретном режиме из водной (а) и газовой (б) фазы: 1 – кран-переключатель потоков, 2 – хроматомембранная ячейка, 3 – детектор, 4 – анализируемый (а) или абсорбирующий (б) водный раствор, 5 – органический экстрагент (а) или анализируемая газовая смесь (б), 6 – сброс.

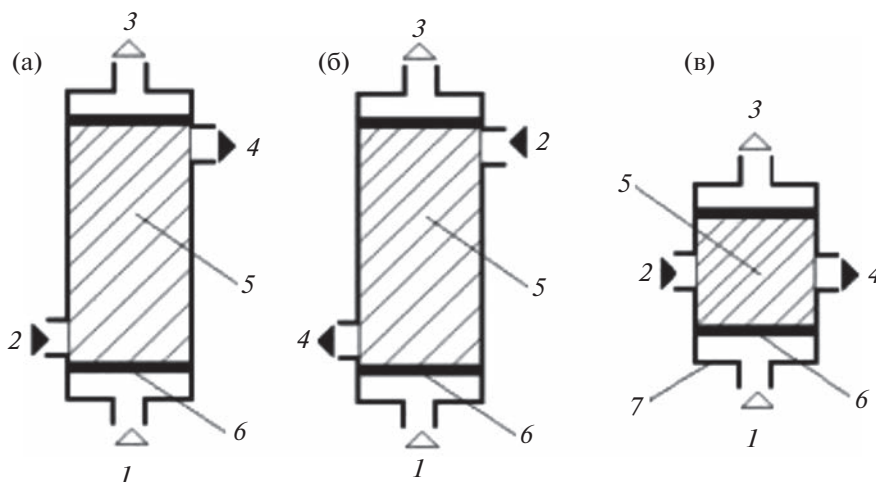


Рис. 3. Прямоточная (а), противоточная (б) и двухмерная (в) схемы осуществления хроматомембранных процессов. 1 и 3 – вход и выход потока неполярной жидкой или газовой фазы газа; 2 и 4 – вход и выход потока полярной жидкой фазы; 5 – массообменный слой; 6 – мембраны.

тратах и полной автоматизации процесса предварительного концентрирования удалось достичь резкого снижения пределов обнаружения аналитов. При использовании в качестве экстрагента хлороформного раствора диэтилдитиокарбамата свинца нижняя граница диапазона определяемых концентраций Cu(II) составила 0.1 мкг/л. При хроматомембранном экстракционном предварительном концентрировании анионных поверхностно-активных веществ в форме ионных ассоциатов с метиленовым голубым при продолжительности концентрирования 5 мин нижняя граница диапазона определяемых концентраций составила 8 мкг/л.

С увеличением продолжительности цикла предварительного концентрирования нижняя граница диапазона определяемых концентраций может быть пропорционально снижена. В этом проявляются принципиальные преимущества хроматомембранного экстракционного предварительного концентрирования по сравнению с принятыми в настоящее время сегментными схемами экстракции в проточно-инжекционном анализе (ПИА) [9], которые не позволяют достичь существенного концентрирования аналитов из-за ограничений возможности варьирования соотношения объемов пробы и экстрагента.

Гибридная схема экстракционно-хроматографической и хроматомембранной пробоподготовки.

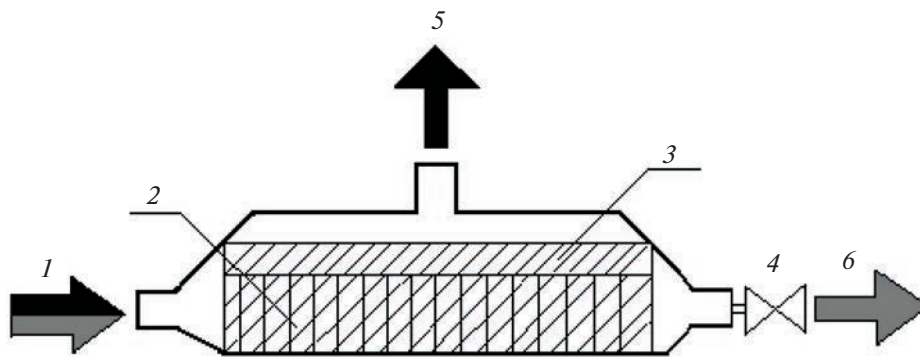


Рис. 4. Схема ячейки для хроматомембранного разделения двухфазных водно-органических потоков: 1 — вход смешанного потока водной и органической фаз; 2 — массообменная бипористая матрица; 3 — мембрана; 4 — дроссель; 5 — выход органической фазы; 6 — выход водной фазы.

Еще одной нетрадиционной возможностью ХМ-методов является разделение двухфазных смесей водных сред и органических растворителей в виде эмульсий, что позволило осуществить гибридные схемы разделения, включающие на первом этапе экстракционно-хроматографическое концентрирование аналитов с элюированием концентрата органической фазой, удерживаемой в хроматографической колонке в качестве неподвижной. На заключительном этапе проводится разделение в ХМЯ двухфазного потока, выходящего из экстракционно-хроматографической колонки, на индивидуальные компоненты с детектированием аналитов в фазе экстрагента, выходящего из ХМЯ. Подобная схема анализа позволила преодолеть основные ограничения возможностей использования ХМ-методов в схемах пробоподготовки при анализе природных и сбросных вод, существенно загрязненных взвесями неорганической и органической природы.

Присутствие взвесей приводит к засорению ими бипористых гидрофобных матриц, что требует их частой замены в ХМЯ. В этих случаях из-за возможных потерь определяемых примесей недопустима предварительная фильтрация пробы. Типичный пример — определение в воде примесей нефтепродуктов и фенолов [10].

Конструкция ХМЯ для разделения двухфазных потоков приведена на рис. 4.

В предлагаемой схеме пробоподготовки элюирование из концентрирующей колонки может осуществляться как при остановке потока водной фазы, так и при непрерывном пропускании через ХМЯ потоков водной и органической фаз. Первый вариант соответствует схеме ПИА с инъекцией пробы в аналитическую систему, второй — схеме непрерывного проточного анализа (НПА).

Независимо от используемого варианта схемы взвеси, содержащиеся в пробе воды, будут засорять экстракционно-хроматографическую колонку, периодическая замена которой, учитывая

простоту ее конструкции, более оправдана, чем замена ХМЯ. Важное преимущество предложенной схемы гибридной подготовки в ПИА, кроме уже отмеченного, проявляется в устранении ограничений по величине давления, под которым проба воды может подаваться в предконцентратор. Это давление в случае выделения аналитов непосредственно в ХМЯ ограничено величиной капиллярного давления, возникающего в микропорах бипористой матрицы и гидрофобных мембран, обеспечивающих выведение потока органической фазы из ячейки. В случае выделения аналитов в экстракционно-хроматографической колонке подобных ограничений нет. Соответственно, появляется возможность предварительного концентрирования при больших скоростях потока пробы с соответствующим сокращением продолжительности анализа. Результаты экспериментальной проверки предложенной схемы экстракционного предварительного концентрирования в непрерывном режиме представлены на примере определения в воде нефтепродуктов флуориметрическим методом (рис. 5).

При люминесцентном детектировании в случае НПА для определения нефтепродуктов на уровне 1 мкг/л достаточен объем пробы 20 мл. Суммарная продолжительность анализа — 5 мин. Предел обнаружения дополнительно может быть снижен пропорциональным увеличением объема пробы. Возможности варьирования коэффициента концентрирования в режиме НПА определяются соотношением скоростей потоков водной и органической фаз. При соотношении скоростей потоков водной и органической фаз, равном 9, диапазон определяемых концентраций нефтепродуктов в воде составил 5—250 мкг/л. При контроле онлайн схема НПА, в отличие от ПИА, исключает потерю информации о концентрации нефтепродуктов в анализируемой воде в период времени, соответствующий стадии элюирования

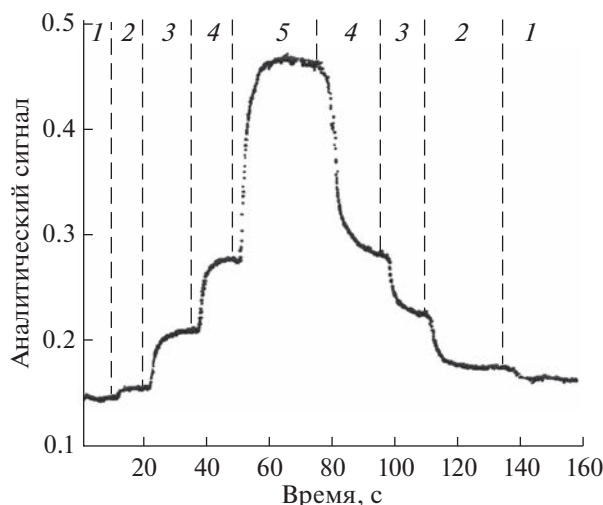


Рис. 5. Динамика изменения аналитического сигнала при осуществлении непрерывного проточного анализа после изменения содержания нефтепродуктов в потоке водной пробы. Концентрации нефтепродуктов в порядке их изменения в пробах, подаваемых в анализатор, приведены в форме их номеров по порядку последовательной подачи в анализатор: 1 — 0.1 мкг/л; 2 — 5 мкг/л; 3 — 50 мкг/л; 4 — 100 мкг/л; 5 — 250 мкг/л. Объемная скорость водной пробы — 7 мл/мин; органического экстрагента — 0.7 мл/мин.

концентрата из экстракционно-хроматографической колонки.

Хроматомембранная жидкостная абсорбция.

С учетом значительно меньшей вязкости газообразных сред по сравнению с жидкими ХММП более эффективен для разделения веществ в системе жидкость—газ. Принципиальные схемы проточного анализа газообразных сред с хроматомембранным жидкостно-абсорбционным выделением определяемых веществ в водные растворы аналогичны применяемым для жидкостно-экстракционного выделения [11]. Иллюстрацией аналитических возможностей хроматомембранного предварительного концентрирования из газовой фазы может служить определение наиболее типичных загрязнителей воздуха: диоксидов азота [12–15], серы [16, 17], аммиака [18–20], формальдегида [21], гидразина [22], паров ацетона [23] и одновременное ионохроматографическое определение неорганических соединений, образующих в поглощающих водных растворах ионные формы [24–26].

В проточных методах анализа, когда они используются для контроля онлайн, целесообразно включение ХМЯ в качестве постоянного элемента аналитических приборов [24]. В случае ПИА периодически отбираемых проб в различных точках пробоотбора ХМЯ могут включаться в выносимые блоки для автономного пробоотбора [25]. Причем число ячеек должно соответствовать числу отбираемых проб. Выносной блок подключа-

ется к анализатору в лаборатории таким образом, чтобы обеспечить последовательное элюирование концентратов из всех ячеек. При этом одновременно регенерируется ХМЯ.

Последняя схема автономного пробоотбора в ХМЯ наиболее адекватна хроматомембранной подготовке в дискретных методах химического анализа. В частности, она использована для ионохроматографического определения в воздухе микропримесей, образующих в водных растворах диссоциирующие соединения: HF, HCl и NO₂ [26].

Хроматомембранная газовая экстракция. Отдельным направлением аналитического применения хроматомембранных методов является парофазный анализ (ПФА), основанный на газо-экстракционном выделении аналитов [27]. Непрерывное ХМГЭ-выделение аналитов открыло, в частности, возможность непрерывной пробоподготовки при определении летучих органических веществ в водных средах [28–30].

ХМГЭ легко сочетается с газоадсорбционным концентрированием аналитов из потока газа-экстрагента с их последующей термодесорбцией. В англоязычной литературе подобная гибридная схема анализа называется *purge and trap* [31, 32]. Помимо подходов к выбору адсорбентов, рекомендуемых в работе [31], найдено оригинальное решение — композиционные поверхностно-слойные сорбенты [33], обеспечившие большую эффективность сорбции, благодаря чему описанная в работе [34] хроматомембранная версия этой схемы, помимо универсальности в плане применения в вариантах онлайн и офлайн анализа при решении задач пробоподготовки для определения летучих органических веществ, по своим возможностям превосходит все известные аналоги. В частности, она позволяет проводить отбор проб на месте, используя установки без насоса и источника питания к нему. Взаимное перемещение фаз обеспечивается установкой сосуда с пробой и ХМЯ на различной высоте, обеспечивающей протекание пробы через ячейку и всасывание в нее атмосферного воздуха в качестве газа-экстрагента.

Независимо от реализуемого варианта ПФА — дискретного или непрерывного — в обоих случаях достигается высокая воспроизводимость результатов. Относительное стандартное отклонение не превышает 0.02–0.03. Выбор оптимальных скоростей потоков фаз зависит от режима хроматомембранного процесса и осуществляется, исходя из компромисса между требованиями к пределу обнаружения и к инерционности системы контроля. Время, необходимое для достижения стационарного состояния хроматомембранного процесса, составляет от нескольких секунд до нескольких минут в зависимости от величин коэффициентов распределения, соотношений скоро-

стей потоков фаз, выбранного режима и параметров массообменного слоя [1].

Дополнительные преимущества проявляются при определении микропримесей. Осуществление хроматомембранного процесса в непрерывном режиме позволяет проводить продувку соединительных коммуникаций и дозирующей петли газового хроматографа газом-экстрагентом, содержащим выделяемые вещества, что минимизирует адсорбцию определяемых веществ на поверхности коммуникаций и так называемый “эффект памяти” [34–36].

* * *

Расширение арсенала методов разделения за счет появления группы хроматомембранных методов позволило найти целый ряд новых методических решений в пробоподготовке, расширяющих ее возможности в трех аспектах:

- повышение коэффициентов концентрирования аналитов;
- перевод аналитов в другое агрегатное состояние, более адекватное возможностям методов их определения;
- автоматизация стадии пробоподготовки при выполнении анализов как по традиционной схеме офлайн, так и в варианте систем непрерывного аналитического контроля онлайн.

В плане уже доказанных и потенциально возможных областей применения ХММП основные на его принципах методы разделения являются универсальными. Основными объектами, при анализе которых они уже подтвердили свою эффективность, являются объекты окружающей среды и биологические среды. Хроматомембранные методы пробоподготовки достаточно универсальны и с точки зрения аналитических методов, к которым они могут быть адаптированы. Это, в первую очередь, проточные и хроматографические методы: газовая и ионная хроматография.

Статья посвящена 300-летию Санкт-Петербургского государственного университета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Москвин Л.Н., Родинков О.В. Хроматомембранные методы разделения веществ. СПб: Изд-во С.-Петербургского университета, 2014. 216 с.
2. Москвин Л.Н. Хроматомембранный метод разделения веществ // Доклады РАН. 1994. Т. 334. № 5. С. 599.
3. Moskvina L.N. Chromatomembrane method for the continuous separation of substances // J. Chromatogr. A. 1994. V. 669. P. 81.
4. Москвин Л.Н., Родинков О.В. Хроматомембранные методы: физико-химические принципы, аналитические и технологические возможности // Изв. Акад. Наук. Сер. хим. 2012. Т. 61. № 4. С. 719. (Moskvina L.N., Rodinkov O.V. Chromatomembrane methods: Physicochemical principles, analytical and technological possibilities // Russ. Chem. Bull. 2012. V. 61. № 4. P. 723).
5. Родинков О.В., Москвин Л.Н., Васькова Е.А. Оптимизация пористой структуры гидрофобной матрицы для осуществления хроматомембранных массообменных процессов // Журн. физ. химии. 2005. Т. 79. № 3. С. 539. (Rodinkov O.V., Moskvina L.N., Vaskova E.A. Optimization of the porous structure of a hydrophobic matrix for chromatomembrane mass-exchange processes // Russ. J. Phys. Chem. 2005. V. 79. № 3. P. 453.)
6. Moskvina L.N., Simon U., Rodinkov O.V., Grigoriev G.L. Flow-injection analysis and chromatography – A new device for extraction in gas-liquid and liquid-liquid systems // Talanta. 1994. V. 41 (10). P. 1765.
7. Родинков О.В., Бугайченко А.С., Москвин Л.Н. Сравнение аналитических возможностей различных схем хроматомембранной газовой экстракции // Журн. аналит. химии. 2021. Т. 76. № 9. С. 797. (Rodinkov O.V., Bugaichenko A.S., Moskvina L.N. Comparison of the analytical capabilities of different chromatomembrane gas extraction techniques // J. Anal. Chem. 2021. V. 76. № 9. P. 1051.) <https://doi.org/10.31857/S0044450221090097>
8. Москвин Л.Н., Михайлова Н.В., Николаева Д.Н. Экстракционно-фотометрическое определение анионных поверхностно-активных веществ с хроматомембранным концентрированием // Журн. аналит. химии. 1996. Т. 51. № 8. С. 845. (Moskvina L.N., Nikolaeva D.N., Mikhailova N.V. Determination of anionic surfactants in water with adsorption preconcentration // J. Anal. Chem. 1996. V. 51. № 3. P. 282.)
9. Ganeto F., Rios Q., Luque de Castro. Liquid-liquid extraction in continuous flow systems without phase separation // Anal. Chem. 1988. V. 60. P. 2354.
10. Moskvina A.L., Moskvina L.N., Moszhuchin A.V., Fomin V.V. Traction-cromatographic preconcentration with chromatomembrane separation of extract from aqueous phase for luminexence determination of oil and phenols in natural water by flow analysis // Talanta. 1999. V. 50. P. 113.
11. Родинков О.В., Москвин Л.Н., Синицына Т.В., Григорьев Г.Л. Хроматомембранная абсорбция микропримесей полярных органических веществ из воздуха водными растворами // Журн. аналит. химии. 1998. Т. 53. № 4. С. 373. (Rodinkov O.V., Moskvina L.N., Sinitsina T.V., Grigor'ev G.L. Chromatomembrane absorption of trace impurities of polar organic substances from water to aqueous // J. Anal. Chem. 1998. V. 53. № 4. P. 326.)
12. Никоноров В.В., Москвин Л.Н. Новый реагент для определения нитрит-ионов // Журн. аналит. химии. 1996. Т. 51. № 8. С. 737. (Nikonorov V.V., Moskvina L.N. New reagent for determining nitrites // J. Anal. Chem. 1996. V. 51. № 7. P. 679.)
13. Wei Y., Oshima M., Simon J., Motomizu S. Absorption, concentration and determination of trace amounts of air pollutants by flow injection method coupled with a chromatomembrane cell system: Application to nitro-

- gen dioxide determination // *Talanta*. 2002. V. 58. № 6. P. 1343.
14. *Erxleben H., Moskvina L., Nikitina T.G., Simon J.* Determination of small quantities of nitrogen oxides in air by ion chromatography using a chromatomembrane cell for preconcentration // *Fresenius J. Anal. Chem.* 1998. V. 361. № 2. P. 325.
 15. *Wei Y., Oshima M., Simon J., Motomizu S.* The application of the chromatomembrane cell for the absorptive sampling of nitrogen dioxide followed by continuous determination of nitrite using a micro-flow injection system // *Talanta*. 2002. V. 57. № 2. P. 355.
 16. *Москвин Л.Н., Никонов В.В.* Проточно-инжекционное определение диоксида серы в воздухе с предварительным хроматомембранным концентрированием // *Журн. аналит. химии*. 1996. Т. 51. № 8. С. 891. (*Moskvina L.N., Nikonov V.V.* Flow-injection determination of sulfur dioxide in air with preliminary chromatomembrane concentration // *J. Anal. Chem.* 1996. V. 51. № 8. P. 891.)
 17. *Sriharathikhun P., Oshima M., Wei Y., Simon J., Motomizu S.* On-line collection/concentration and detection of sulfur dioxide in air by flow-injection spectrophotometry coupled with a chromatomembrane cell // *Anal. Sci.* 2004. V. 20. № 1. P. 113.
 18. *Erxleben H., Simon J., Moskvina L.N., Vladimirova L.O., Nikitina T.G.* Automated procedures for the determination of ozone and ammonia contents in air by using the chromatomembrane method for gas-liquid extraction // *Fresenius J. Anal. Chem.* 2000. V. 366. № 4. P. 332.
 19. *Москвин А.Л., Мельниченко А.Н., Диченко О.Ю.* Фотометрическое определение аммиака в воздухе рабочей зоны с хроматомембранным концентрированием // *Вестн. С.-Петерб. ун-та. Сер. 4: Физика. Химия*. 2011. Вып. 4. С. 55.
 20. *Москвин А.Л., Мельниченко А.Н., Диченко О.Ю.* Фотометрическое определение аммиака в воздухе рабочей зоны с хроматомембранной жидкостной абсорбцией // *Аналитика и контроль*. 2013. Т. 17. № 4. С. 485.
 21. *Sriharathikhun P., Oshima M., Wei Y., Simon J., Motomizu S.* On-line collection/concentration of trace amounts of formaldehyde in air with chromatomembrane cell and its sensitive determination by flow injection technique coupled with spectrophotometric and fluorometric // *Talanta*. 2005. V. 67. № 5. P. 1014.
 22. *Москвин Л.Н., Родников О.В., Синицына Т.В.* Фотометрическое определение гидразина в воздухе с хроматомембранным концентрированием // *Журн. аналит. химии*. 1999. Т. 54. № 1. С. 61. (*Moskvina L.N., Rodnikov O.V., Sinitsyna T.V.* Determination of hydrazine in air by photometry with chromatomembrane preconcentration // *J. Anal. Chem.* 1999. V. 54. № 1. P. 53.)
 23. *Родников О.В., Бугайченко А.С., Москвин Л.Н.* Динамическая хроматомембранная жидкостная хемосорбция микропримесей из газовой фазы в политетрафторэтиленовых матрицах, модифицированных сорбционно-активным материалом // *Журн. физ. химии*. 2010. Т. 84. № 8. С. 1568. (*Rodnikov O.V., Bugaichenko A.S., Moskvina L.N.* Dynamic chromatomembrane liquid chemisorption of trace impurities from a gas phase in polytetrafluoroethylene matrices modified with sorptionactive material // *Russ. J. Phys. Chem. A*. 2010. V. 84. № 8. P. 1428.) <https://doi.org/10.1134/S0036024410080261>
 24. *Moskvina L.N., Moskvina A.L.* Chromatomembrane methods – Novel automatization possibilities of substances separation processes // *Laboratory Robotics and Automatization*. 1998. V. 10. P. 3.
 25. *Москвин А.Л., Москвин Л.Н., Родников О.В.* Хроматомембранный метод – новый принцип функционирования устройств для пробоподготовки в аналитических приборах // *Научное приборостроение*. 1999. Т. 9. № 4. С. 62.
 26. *Москвин Л.Н., Родников О.В., Катрузов А.Н., Томилова Е.С.* Ионохроматографическое определение полярных неорганических примесей в воздухе с хроматомембранным предконцентрированием // *Журн. аналит. химии*. 1996. Т. 51. № 11. С. 1214. (*Moskvina L.N., Rodnikov O.V., Katruzov A.N., Tomilova E.S.* Ion-chromatographic determination of polar inorganic impurities in air with chromatomembrane preconcentration // *J. Anal. Chem.* 1996. V. 51. № 11. P. 1109.)
 27. *Moskvina L.N., Rodnikov O.V.* Continuous chromatomembrane headspace analysis // *J. Chromatogr. A*. 1996. V. 725. P. 351.
 28. *Родников О.В., Москвин Л.Н., Зыкин И.А.* Газохроматографическое определение газообразных углеводородов в водных растворах с хроматомембранной газовой экстракцией // *Журн. аналит. химии*. 2003. Т. 58. № 1. С. 82. (*Rodnikov O.V., Moskvina L.N., Zykin I.A.* Gas-chromatographic determination of gaseous hydrocarbons in aqueous solutions using chromatomembrane gas extraction // *J. Anal. Chem.* 2003. V. 58. № 1. P. 71.)
 29. *Майорова Н.А., Родников О.В., Москвин Л.Н.* Газохроматографическое определение метилакрилата и метилметакрилата в водных растворах с хроматомембранной газовой экстракцией и газодсорбционным концентрированием // *Вестн. С.-Петерб. ун-та. Сер. 4: Физика. Химия*. 2005. Вып. 4. С. 84.
 30. *Родников О.В., Москвин Л.Н.* Хроматомембранное концентрирование микропримесей органических загрязнителей природных вод и атмосферного воздуха // *Журн. аналит. химии*. 2002. Т. 57. № 10. С. 1057. (*Moskvina L.N., Rodnikov O.V.* Chromatomembrane preconcentration of trace impurities of organic pollutants from natural waters and atmospheric air // *J. Anal. Chem.* 2002. V. 57. № 10. P. 894.)
 31. *Dettmer K., Engewald W.* Adsorbent materials commonly used in air analysis for adsorptive enrichment and thermal desorption of volatile organic compounds // *Anal. Bioanal. Chem.* 2002. V. 373. P. 490.
 32. *Mayer H., Spiekermann M., Bergmann M.* Determination of volatile organic compounds in water by purge&trap – Gas chromatography – Mass spectrometry // *J. Mol. Struct.* 1995. V. 348. P. 389.
 33. *Родников О.В., Москвин Л.Н.* Поверхностно-слойные композиционные сорбенты для экспрессного концентрирования летучих органических веществ из водных и газовых сред // *Журн. аналит. химии*. 2012. Т. 67. № 10. С. 908. (*Rodnikov O.V., Moskvina L.N.* Surface layer composite sorbents for the rapid preconcentration of volatile organic substances from aqueous

- solutions and gas atmospheres // J. Anal. Chem. 2012. V. 67. № 10. P. 814.)
<https://doi.org/10.1134/S1061934812100073>
34. Москвин Л.Н., Родинков О.В. От жидкостно-газовой хроматографии к хроматомембранному массообменному процессу // Журн. аналит. химии. 2019. Т. 74. № 10. С. 729. (Moskvin L.N., Rodinkov O.V. From liquid–gas chromatography to a chromatomembrane mass-exchange process // J. Anal. Chem. 2019. V. 74. № 10. P. 955.)
<https://doi.org/10.1134/S0044450219100098>
35. Родинков О.В., Москвин Л.Н., Майорова Н.А. Быстродействие различных схем непрерывной хроматомембранной газовой экстракции // Журн. аналит. химии. 2005. Т. 60. № 8. С. 727. (Rodinkov O.V., Moskvin L.N., Maiorova N.A. Operation rates of different schemes of continuous chromatomembrane gas extraction // J. Anal. Chem. 2005. V. 60. № 8. P. 820.)
<https://doi.org/10.1134/S1061934819100083>
36. Rodinkov O.V., Moskvin L.N., Viktorova M.I., Dyakin A.A., Yakimova N.M. Chromatomembrane headspace analysis of aqueous solutions at elevated temperatures // Chromatographia. 2015. V. 78. P. 1211.

УДК 543.545

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УГЛЕВОДОВ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМИ И ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

© 2023 г. Л. А. Карцова^a, А. В. Малюшевская^{a, *}, Е. А. Колобова^{a, b}

^aСанкт-Петербургский государственный университет

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

^bВсероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова МЧС России
ул. Академика Лебедева, 4/2, Санкт-Петербург, 194044 Россия

*e-mail: malushevskaa@gmail.com

Поступила в редакцию 18.07.2022 г.

После доработки 28.07.2022 г.

Принята к публикации 28.07.2022 г.

В обзоре обсуждаются достоинства и ограничения хроматографических и электрофоретических подходов при определении нейтральных углеводов в различных объектах со сложной матрицей, возможность реализации многообразия режимов жидкостной хроматографии и капиллярного электрофореза (в зонном и мицеллярном вариантах), особенности их сочетания с различными вариантами дериватизации, детектирования и пробоподготовки. Обсуждаются условия косвенного детектирования сахаров при введении в подвижную фазу или фоновый электролит различных поглощающих добавок, лигандообменного капиллярного электрофореза и внутрикапиллярного комплексобразования, определение углеводов методами анионообменной и гидрофильной хроматографии.

Ключевые слова: капиллярный электрофорез, высокoeffективная жидкостная хроматография, нейтральные углеводы, дериватизация, косвенное детектирование, лигандообменный капиллярный электрофорез.

DOI: 10.31857/S0044450223020044, EDN: CDPKAN

Углеводы — обширный класс органических веществ, в молекулах которых содержатся гидроксильные и карбонильные группы. Название этого класса соединений происходит от слов “гидраты углерода” (К. Шмидт, 1844 г.): первые из известных науке углеводов описывались брутто-формулой $C_n(H_2O)_m$. Углеводы подразделяют на свободные и связанные, т.е. конъюгаты, соединенные с молекулами других классов соединений. Свободные углеводы, в свою очередь, включают моносахариды (альдозы и кетозы), дисахариды, олигосахариды (восстанавливающие и невосстанавливающие) и полисахариды (гомо- и гетеро-) (рис. 1).

Выделяют и функциональные производные углеводов, выполняющие различные функции в живом организме: дезокси-, amino- и сульфосахара, фосфорные эфиры моносахаридов, глюконовые кислоты, полиолы и иминосахара и т.д., основой которых служат нейтральные природные моносахариды. Из моносахаридов наиболее распространены пентозы и гексозы. В метаболизме живых существ важнейшую роль в развитии, роста, функционирования или выживания организма играют олигосахариды. Они могут быть мише-

лями для распознавания патогенными токсинами и микроорганизмами, подвержены большей внутри- и межвидовой изменчивости из-за взаимодействий хозяина и патогена в ходе эволюции [2, 3]. Неотъемлемыми компонентами многих биологических объектов являются и полисахариды (крахмал, целлюлоза, хитин, инулин и др.).

К связанным углеводам традиционно относят гликопротеины и гликолипиды [2]. Гликопротеины — углеводы, ковалентно связанные с белком в результате реакции гликозилирования, одной из наиболее частых посттрансляционных модификаций в эукариотических клетках [4]. Отдельную группу гликопротеинов представляют протеогликанов. Белковая часть этих молекул гликозилирована. Помимо протеогликанов также выделяют гликозаминогликаны, состоящие из неразветвленной гетерополисахаридной основы, O-гликозилированной серином или триптофаном [5]. К этому классу углеводов относят, например, хондроитин, гепарин и дерматан.

Гликолипиды имеют в структуре как гидрофильные, так и гидрофобные группы, составляют основу клеточных мембран, проявляя поверх-

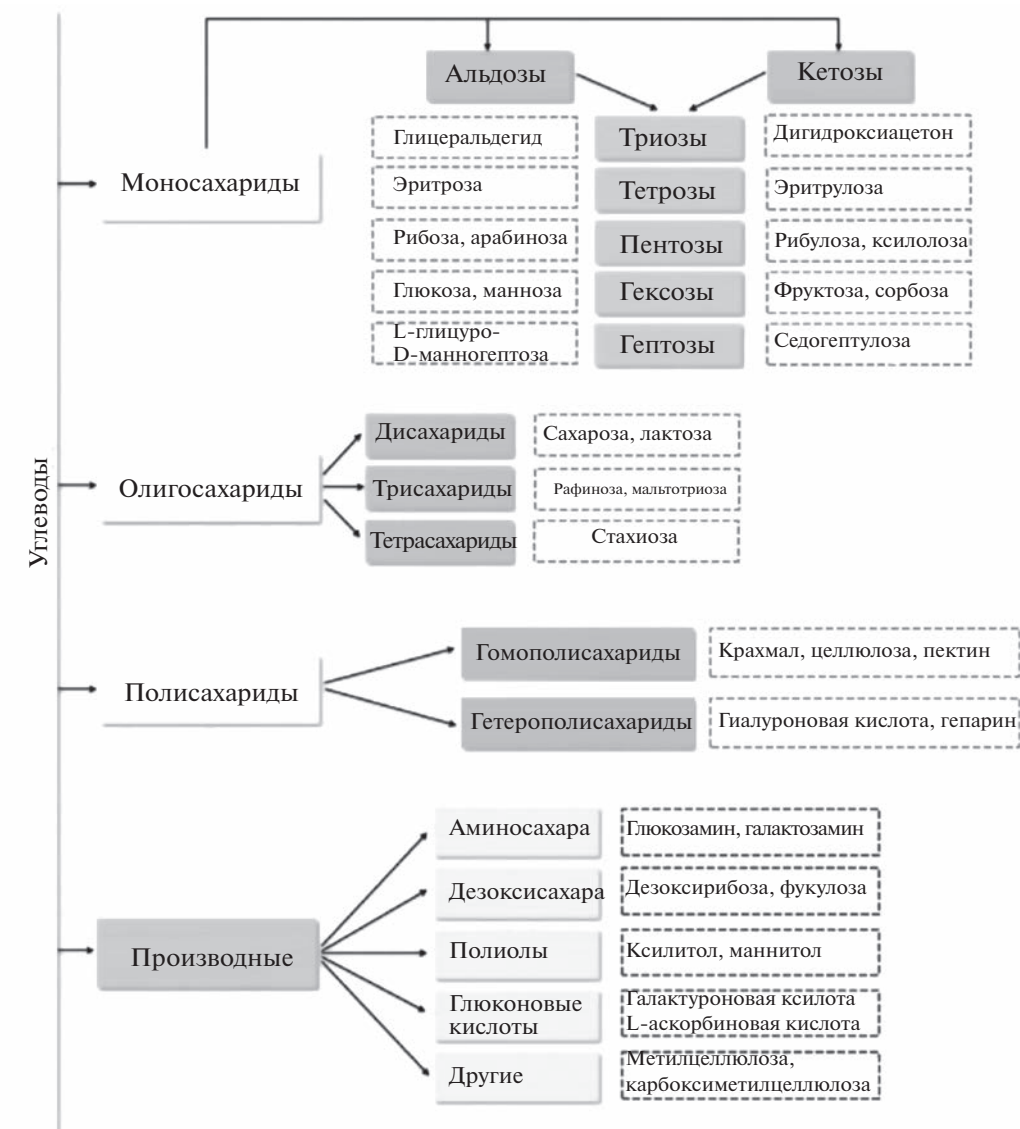


Рис. 1. Общая схема классификации углеводов [1].

ностную активность на границах раздела, обладают такими уникальными свойствами, как низкая токсичность, высокая способность к биологическому разложению, пенообразующая способность и т.д. Выявлен их большой потенциал в медико-биологической области [6].

Особенности структур углеводов приходится учитывать при выборе аналитического метода их определения. Они могут существовать в растворах в виде нескольких равновесных изомерных структур, имеют хиральные центры; в составе их молекул отсутствуют хромофорные группы. Ввиду разнообразия углеводов в живых организмах используют различные методы их определения: химические (титриметрия, гравиметрия, коло-

метрия), физические (поляриметрия, рефрактометрия, денситометрия, ЯМР- и масс-спектрометрия), ферментативные, методы иммуноанализа [7–10]. Несмотря на множество подходов, предложенных для определения сахаров, наиболее востребованы хроматографические и электрофоретические методы, позволяющие разделять сложную многокомпонентную смесь на отдельные аналиты.

Данный обзор посвящен обсуждению возможностей и ограничений различных вариантов жидкостной и газовой хроматографии, а также режимов капиллярного электрофореза при определении нейтральных углеводов.

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УГЛЕВОДОВ

Жидкостная хроматография. Поскольку нейтральные углеводы являются гидрофильными соединениями, прямое разделение высокополярных моно- и олигосахаридов предпочтительнее проводить в режиме гидрофильной хроматографии (HILIC – hydrophilic interaction chromatography) [11–14] с применением следующих детектирующих систем: рефрактометрический [15], испарительный светорассеивающий [16, 17] или масс-спектрометрический (МС) [18]. Для этой цели используют полярные колонки с амино-, циано- и диольными группами. Так, при определении олигосахаридов на основе ксилозы, хитозана и альгиновой кислоты на различных типах колонок (Silica, Diol, TSK Amide80, XAmide, Click Maltose, Click β -CD и Click TE-Cys) применяли испарительный светорассеивающий детектор [17]. В работе [19] определяли нейтральные углеводы – полиолы и фосфаты сахаров – в экстракте листьев *Arabidopsis thaliana* с использованием масс-селективного детектора на основе ионной ловушки с электроспрей-ионизацией, а методом HILIC в сочетании с tandemной масс-спектрометрией проводили определение углеводов в экстрактах семян *Moringa oleifera* [18], а также в образцах *Streptococcus thermophilus* после их ферментации [20]. Авторами работы [21] предложена и валидирована HILIC-МС/МС-методика определения лактулозы и маннитола в моче. Соотношение концентраций этих аналитов использовано в качестве независимого диагностического показателя (*двойной сахарный тест*) проницаемости кишечника [22].

Вариант HILIC с МС-детектированием применяется и при исследовании профилирования углеводов. Так, в работе [23] на полимерной колонке Aminex HPX-87H, модифицированной аминогруппами, в сочетании с времяпролетной масс-спектрометрией с электроспрей-ионизацией (ESI-TOF) проведено профилирование целлюлозной биомассы после предварительной термохимической обработки для выбора гликозилгидролазы с целью превращения в биотопливо или биохимические продукты.

Проблему размывания хроматографических пиков сахаров на классических полярных неподвижных фазах в условиях HILIC можно преодолеть применением монолитных колонок, обладающих большей удельной поверхностью. Так, авторам работы [24] удалось достичь высокой эффективности при разделении моно- и дисахаридов (рибозы, седогептулозы, глюкозы, сахарозы, мальтозы, трегалозы и раффинозы) в экстрактах растений с использованием силикагелевой монолитной колонки. Пределы обнаружения (ПО) составили 470 аттомоль для сахарозы, трегалозы и

невосстанавливающих дисахаридов. Мальтоза не определялась при концентрации ниже 16 нг/л.

Перспективным направлением при разделении углеводов является использование ионных жидкостей (ИЖ), которые могут быть иммобилизованы на поверхности неподвижной фазы и обеспечить определение моно- и олигосахаридов с высокой эффективностью. Так, достигнуто разделение глюкозы и ксилозы [25] с использованием различных неподвижных фаз на основе имидазолиевых ИЖ и диоксида кремния. Ионные жидкости применяются и для модификации сорбента при твердофазной экстракции углеводов [26] с последующим их определением методом HILIC с рефрактометрическим детектированием. Пределы обнаружения глюкозы, ксилозы, фруктозы и рибозы лежат в диапазоне 0.45–3 мкг/мл. В работе [27] предложена модификация поверхности аминированной полимерной колонки с использованием диглицидилового эфира 1,4-бутандиола, что обеспечило селективное разделение 9 сахаров в течение 12 мин.

Другим режимом жидкостной хроматографии, успешно зарекомендовавшим себя при разделении заряженных аналитов, является высокоэффективная анионообменная хроматография (HPLC – high-performance anion-exchange chromatography), позволяющая определять углеводы без предварительной дериватизации, например моносахариды или N-гликаны, при высоких значениях pH ($\text{pH} > 11$) элюента [28]. Обычно HPLC комбинируют с амперометрическим [29, 30] или рефрактометрическим детектированием [31]. Амперометрическое детектирование широко применяется для обнаружения N-гликопротеинов и реализовано, например, при определении нейтральных углеводов (арабинозы, рамнозы, галактозы, глюкозы, ксилозы и маннозы) в образцах водоросли *Chlorella sorokiniana*; ПО аналитов составили 0.07–0.12 ppm [32]. Рефрактометрическое детектирование применяли при обнаружении лактулозы и маннитола в образцах мочи [33].

Вариант HPLC мало совместим с масс-спектрометрией с электроспрей ионизацией (ESI-MS). Основной проблемой является сильнощелочная среда элюента. Применение обессоливающих мембран позволяет предварительно удалить из пробы мешающие компоненты [32]. Определение глюкозы, фруктозы и сахарозы в образцах меда проводили с использованием HPLC-МС с обессоливающей мембраной, достигнутые значения ПО составили 1.49, 1.19 и 0.46 пмоль соответственно [33].

Несмотря на отсутствие хромофорных групп в молекулах углеводов, их определение возможно и с использованием спектрофотометрического детектирования. В сильнощелочной среде определяемые нейтральные сахара (глюкоза, сахароза и фруктоза) в результате фотоокисления образуют

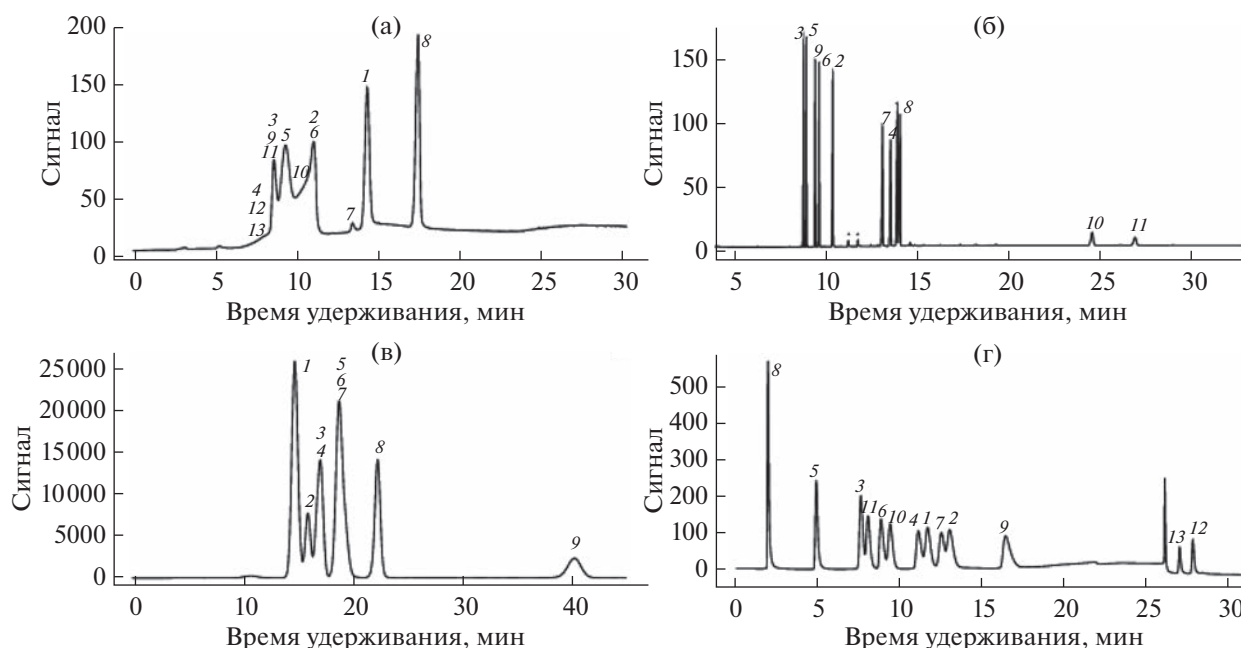


Рис. 2. Хроматограммы модельной смеси моносахаридов, полученные различными методами: А – ВЭЖХ с использованием PrevailTM Carbohydrate колонки; В – ВЭЖХ с использованием Shodex Pb²⁺ колонки; С – ГХ алдитолацетат-derivатов; D – НРАЕС-PAD. Аналиты: 1 – глюкоза, 2 – ксилоза, 3 – рамноза, 4 – галактоза, 5 – фукоза, 6 – арабиноза, 7 – манноза, 8 – мио-инозитол, 9 – рибоза, 10 – глюкозамин, 11 – галактозамин, 12 – глюкуроновая кислота, 13 – галактуроновая кислота [41].

производные малонового альдегида, поглощающие свет в УФ-области спектра ($\lambda_{\text{max}} = 266 \text{ nm}$), что использовано при определении сахаров в составе фруктовых соков [34].

Наиболее распространенный обращенно-фазовый режим высокоэффективной жидкостной хроматографии (**ОФ ВЭЖХ**) мало приемлем для разделения высокополярных нейтральных углеводов без предварительной их дериватизации с получением более гидрофобных производных [35–39]. Удерживание углеводов на таких колонках можно увеличить за счет образования ионных пар между молекулами сахаров и добавками аминов, например диэтаноламином, введенными в состав подвижной фазы. Показано, что при анализе смесей гликанов эффективность оказалась сопоставимой со значениями, достигнутыми в условиях гидрофильной хроматографии [40]. В работе [41] сопоставлены результаты разделения углеводов на различных колонках в режиме **ОФ ВЭЖХ** с рефрактометрическим детектированием или детектором заряженных аэрозолей, методами **НРАЕС** с амперометрическим детектированием и газовой хроматографии (**ГХ**) с пламенно-ионизационным детектированием после дериватизации алдитолацетатом (рис. 2).

Показано, что полное разделение модельной смеси достигается в условиях **НРАЕС** или после дериватизации методом **ГХ**, что успешно реализовано при определении углеводов в экстрактах

водорослей [41]. Для совместного определения аналитов различной природы и полярности в биологических объектах успешно зарекомендовала себя двумерная жидкостная хроматография, основанная на последовательном разделении сложных смесей с использованием двух хроматографических колонок [42]. Применение различных стационарных фаз для каждой колонки позволяет разделять и идентифицировать большее количество аналитов. Проблемой является поиск условий кондиционирования каждой из колонок, выбор подходящей подвижной фазы, разбавление образцов при последовательном прохождении через колонки. Так, двумерную ВЭЖХ применяли при определении низкомолекулярных гепаринов [43, 44]. Исходный анализируемый образец после обработки ферментом гепариназой был разделен на отдельные фракции. Анализ проводили методом **УВЭЖХ-МС** с использованием двух колонок: анионообменной (Ultisil XB-SAX) и эксклюзионной (Waters SEC BEH).

Газовая хроматография. Газовая хроматография является еще одним широко востребованным методом определения углеводов в биологических образцах в силу ее высокой эффективности, экспрессности и возможности совмещения с различными типами детекторов. В подавляющем большинстве случаев необходимо предварительное получение производных углеводов, что обусловлено их низкой летучестью и высокой поляр-

ностью [45]. Наиболее распространенными дериватами углеводов, определяемых методом ГХ, являются ацетаты, триметилсилиловые эфиры и триметилсилилоксимы [46]. Так, разработан [47] способ определения сахарозы в меде, включающий дериватизацию образца уксусным ангидридом с использованием N-метилимидазола в качестве катализатора, концентрирование аналита методом твердофазной микроэкстракции с использованием полиакрилатного волокна с последующим ГХ-МС-анализом. Пределы обнаружения составили 0.3 мас. %. Силилирование позволяет увеличить летучесть исследуемых соединений с использованием одностадийной процедуры дериватизации и провести их определение в биологическом образце (схема 1) [48].

Авторам работы [49] удалось успешно разделить фруктозу, ксилозу, арабинозу, фукозу, маннозу и галактозу, извлеченных из экстрактов *A. asphodeloides* и *G. ganoderma*. Помимо триметилсилильных производных для дериватизации при ГХ-анализе применяют производные пентаацетата альдонитрила, например, при определении глюкозы и галактозы в плазме крови человека (схема 2) [50]. Микроволновая обработка на этапе дериватизации позволила сократить ее продолжительность с 60 до 3–5 мин.

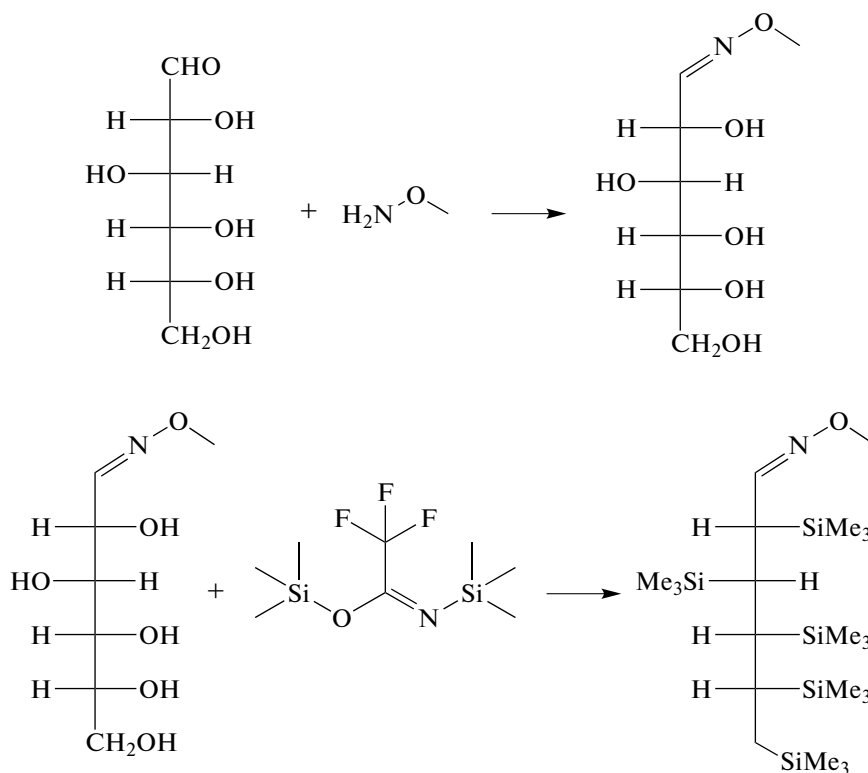


Схема 1. Схема дериватизации углевода с использованием метоксимиана и N,O-бис(триметил)силiltrифторацетамида [48].

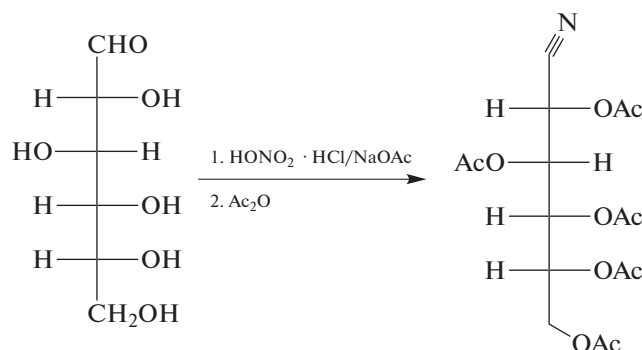


Схема 2. Схема дериватизации углевода с получением пентаацетата альдонитрила [50].

Триметилсилилирование остается наиболее распространенным вариантом получения произ-

водных для ГХ-анализа смесей углеводов, обеспечивая определение как нейтральных углеводов,

так и других классов органических соединений. Это, в свою очередь, позволяет в условиях газохроматографического анализа осуществлять метаболическое профилирование, например, при поиске возможных маркеров рака легких у мышей [51]. Выявлены [51, 52] возможности различных силилирующих агентов при определении моно- и дисахаридов в пищевых продуктах. Отмечено, что наиболее предпочтителен N,O-бис(триметил)силилтрифторацетамид за счет сокращения времени анализа и снижения количества возможных побочных продуктов. Разработаны также автоматизированные системы получения триметилсилильных производных, которые применялись при определении нейтральных сахаров (арабинозы и фруктозы) наряду с органическими кислотами и аминокислотами в образцах вина [53].

Газовая хроматография, несмотря на необходимость предварительного получения соответствующих производных, является одним из наиболее эффективных методов определения нейтральных углеводов благодаря высокой чувствительности и эффективности. Однако способы дериватизации не являются селективными по отношению к углеводам, поэтому в многокомпонентной смеси нельзя исключить наложения нескольких сигналов. Применение масс-спектрометрического детектирования позволяют существенно улучшить идентификацию [54, 55].

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УГЛЕВОДОВ МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА

Капиллярный электрофорез (КЭ) хорошо зарекомендовал себя как эффективный метод разделения, в первую очередь, заряженных частиц. Поскольку pK_a нейтральных углеводов в общем случае выше 12, их электрофоретическое разделение возможно лишь при высоких значениях pH фонового электролита (ФЭ) для перевода данных аналитов в анионную форму.

Так, моно- и дисахариды разделены с использованием в качестве ФЭ раствора гидроксида натрия с амперометрическим [56] и кондуктометрическим [57] детектированием. Сообщается [58] о селективном электрофоретическом определении углеводов в образцах красного и белого вина с масс-спектрометрическим детектированием. Применение спектрофотометрических детекторов для прямого обнаружения сахаров ограничено, поскольку в составе молекул этих аналитов отсутствуют хромофорные группы. Однако установлено, что при высоких значениях pH в ячейке детектирования происходит их фотоокисление с образованием малонового альдегида и других низкомолекулярных соединений, поглощающих свет при 268 нм [59–62], что обеспечивает возможность определения сахаров в соках и винах с пределами

обнаружения 0.02–0.05 мМ, а также в растительных волокнах [63] и олигомерах целлодекстринов [64].

Сообщается [65] о целевом электрофоретическом профилировании углеводов в водных экстрактах сосны и ели в зависимости от времени экстракции с прямым УФ-детектированием. Основываясь на миграции модельных соединений (фурфурол, инозитол, сахароза, глюкоза, полидактин и глюкуроновая кислота), на электрофореграммах выделили три группы аналитов: производные фурана и сахароспирты, моно- и дисахариды и уроновые кислоты. Определению сахаров в виноградных листьях и почках методом капиллярного зонного электрофореза с использованием 130 мМ раствора NaOH (pH 13.0) в качестве фонового электролита посвящена публикация [66].

Другой подход к определению углеводов методом КЭ – косвенное детектирование [67] с введением в ФЭ поглощающих в УФ-области спектра добавок: сорбиновой [68–70], 1-нафтилуксусной [71, 72], бензойной [73], 3,5-динитробензойной [74], 2,6-пиридиндикарбоновой кислот (ПДКК) [75–77], триптофана [77, 78], глицилглицина [79]. При таком подходе возможно также детектирование неорганических анионов, карбоновых и аминокислот, что может оказаться как достоинством предлагаемого варианта анализа, так и ограничением, затрудняя определение минорных концентраций углеводов [76] (рис. 3). Для сахаров пределы определения составили десятки мкг/мл.

Предложен [77] экспрессный электрофоретический вариант анализа смеси сахаров, содержащей девять моно- и олигосахаридов, в сильнощелочном (pH > 12) растворе с косвенным УФ-детектированием (280 нм). Пределы обнаружения составили несколько фемтомолей. Для сокращения времени анализа и увеличения селективности разделения нейтральных углеводов применяют различные катионные детергенты: цетилтриметиламмония бромид [75] или гидроксид [76, 77], миристилтриметиламмония бромид [72], гексаметрина бромид [69, 70]. Модифицируя стенки капилляра, они ослабляют и обращают электроосмотический поток (ЭОП). Интересный вариант с использованием имидазолиевых ионных жидкостей предложен для определения моно- и дисахаридов (глюкозы, фруктозы и сахарозы) в овощных соках [81]. Так, 1-додецил-3-этил-имидазолия хлорид использовали не только для обращения ЭОПа, но и в качестве поглощающей добавки ($\lambda_{det} = 207$ нм) для обеспечения режима косвенного детектирования.

Поиск новых хромофорных добавок в фоновый электролит весьма актуален при решении задач обнаружения и определения нейтральных углеводов косвенным детектированием. Идеальный хромофорный агент должен характеризоваться высо-

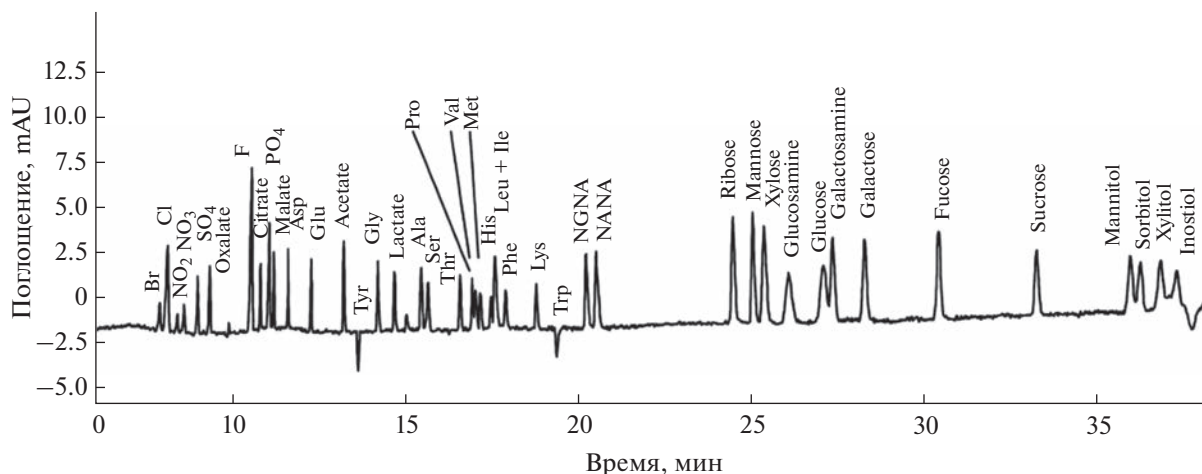


Рис. 3. Разделение неорганических и органических анионов, аминокислот и углеводов. Условия: кварцевый капилляр $L_{\text{tot}} = 112.5$ см ($L_{\text{eff}} = 104$ см), внутренний диаметр 50 мкм; фоновый электролит: 20 mM 2,6-пиридинкарбоновая кислота, 0.5 mM ЦТАБ (цетилтриметиламмоний бромид), pH 12.1; 15°C; напряжение –30 кВ; гидродинамический ввод пробы в течение 6 с, давление – 50 мбар; детектирование: 350 нм; 230 нм. Концентрации: Cl^- – 110 мг/л, углеводы – 200 мг/л, остальные – 50 мг/л [75].

ким коэффициентом поглощения и обладать электрофоретической подвижностью, близкой к подвижности определяемых аналитов.

Весьма успешными при определении сахаров в различных объектах являются подходы, основанные на процессах комплексообразования с компонентами фонового электролита, например боратами, что обеспечивает перевод углеводов в анионную форму и расширяет аналитические возможности метода КЭ. При использовании таких фоновых электролитов сахара могут быть превращены *in situ* в анионные боратные комплексы. Их стабильность обусловлена положением гидроксильных групп, участвующих в комплексообразовании: для циклических аналитов только вицинальные группы с *цис*-конфигурацией могут формировать стабильные комплексы; для полиолов предпочтительнее *цис*-1,2-диола [82, 83]. Устойчивость подобных комплексов возрастает при увеличении числа гидроксильных групп и зависит от pH ФЭ. Существенно, что УФ-поглощение таких комплексов заметно увеличивается при 195 нм, что обеспечивает их обнаружение [74].

Хорошо известно, что полиолы образуют хелатные комплексы и с ионами металлов [84]. Лигандообменный КЭ с участием ионов меди(II) реализован при анализе красного вина, цветочного меда и грейпфрутового сока [79, 85]. Предложены варианты разделения и обнаружения нейтральных углеводов за счет комплексообразования с солями меди(II) в режиме лигандообменного капиллярного электрофореза (ЛОКЭ) [72, 86]. В аммиачных растворах ион Cu^{2+} координирует четыре молекулы аммиака и две молекулы воды

($[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$). Хелатирование с углеводами возможно только при высоких значениях pH фонового электролита. Формирующиеся связи металл–лиганд обладают повышенным поглощением в УФ-диапазоне, которое bathochromно смещено по сравнению с первоначальным комплексом. Таким образом достигнуто разделение трех сахаров (сахарозы, рибозы и глюкозы) с высокой эффективностью (200 тыс. т.т./м) при прямом детектировании при длине волны 245 нм [86, 87]. Установлено, что чувствительность в режиме ЛОКЭ ограничена разницей в поглощении между хелатным комплексом углеводов– $\text{Cu}(\text{II})$ и $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4(\text{OH}_2)_2]^{2+}$, а пределы обнаружения оказались в три раза выше по сравнению с косвенным детектированием [72].

В условиях ЛОКЭ возможно совместное с углеводами обнаружение и определение неорганических катионов и аминокислот (рис. 4) [86]. Более подробно особенности метода ЛОКЭ и его аналитические возможности обсуждаются в обзоре [87].

Перспективными способами электрофоретического определения углеводов являются варианты с применением внутрикапиллярной дериватизации [88–93]. Так, предложен [88] подобный подход, основанный на взаимодействии аналитов с флуоресцентным агентом 7-амино-1,3-нафталиндисульфоновой кислотой. В качестве модельных аналитов выбраны ксилоза, фуккоза, глюкоза, N-ацетилглюкозамин и лактоза. В качестве внутрикапиллярного дериватизирующего реагента для определения глюкозы в плазме крови применяли *n*-гидразинбензолсульфоновую кислоту [89]. Предел обнару-

жения составил 31.2 мкМ. В работе [90] внутри-капиллярная дериватизация олигосахаридов

проведена с использованием 1-фенил-3-метил-пиразолона (схема 3).

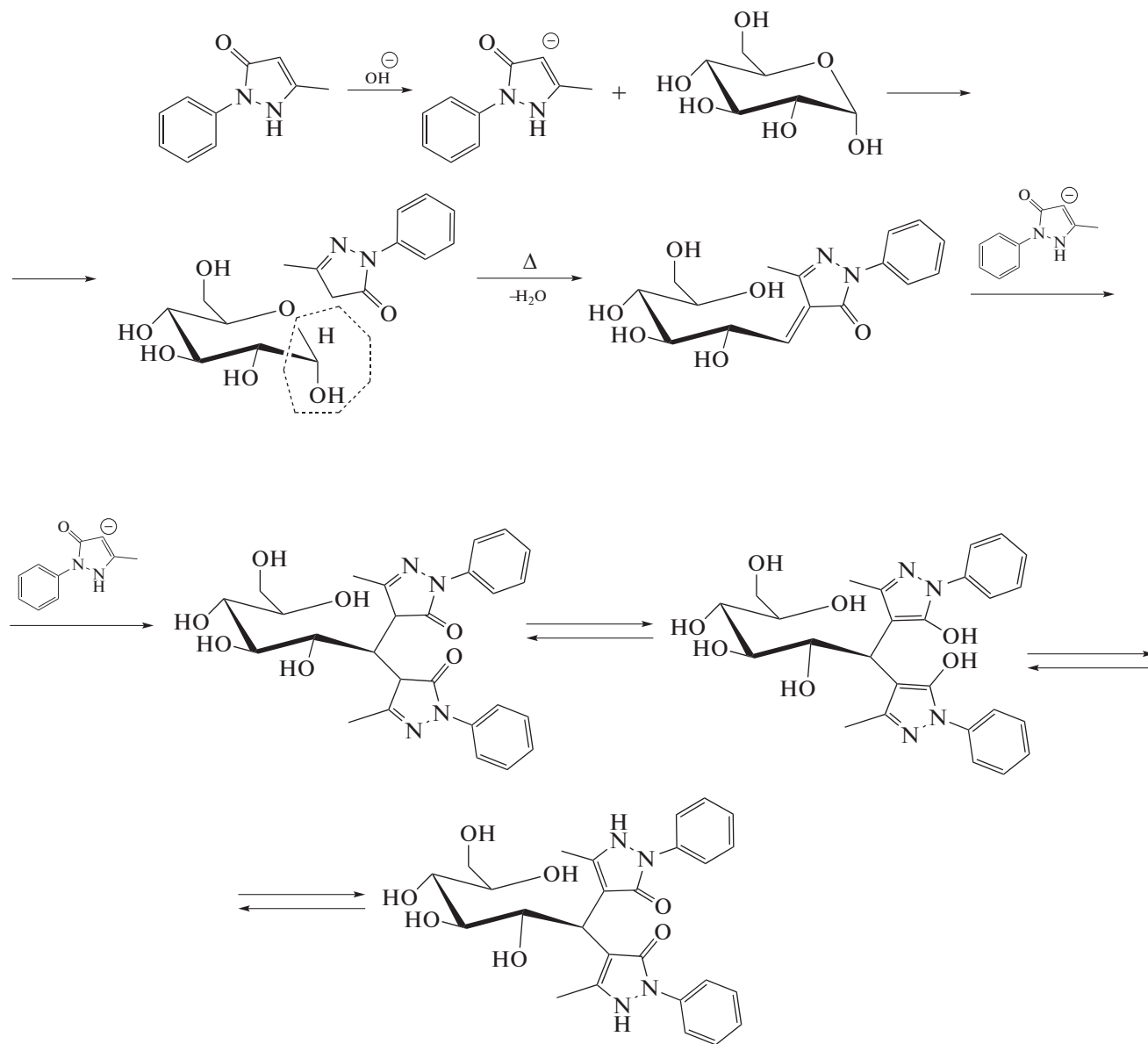


Схема 3. Схема дериватизации углеводов с использованием 1-фенил-3-метил-5-пиразолона [90].

Предложена система мониторинга уровня глюкозы в крови человека с использованием микроципового электрофореза. Сочетание восстановительного аминирования глюкозы флуоресцентным 2-аминоакридоном и образования комплекса глюкоза–борат обеспечило высокоселективное обнаружение глюкозы в такой сложной матрице, как образцы крови [92]. Обсуждаются [93] условия внутрикапиллярной дериватизации и последующего прямого УФ-детектирования (270 нм) в соках лимона, ананаса, апельсина и пробе коньяка нейтральных углеводов: ксилита, D-(–)-маннита, са-

харозы, D-(+)-фукозы, D-(+)-целлобиозы, D-(+)-галактозы, D-(+)-глюкозы, L-рамнозы, D-(+)-маннозы, D-(–)-арабинозы, D-(+)-ксилозы и D-(–)-рибозы. Воспроизводимость времен миграции составила от 0.3 до 1.1%. При этом не требовалось другой пробоподготовки, кроме разбавления анализируемой пробы.

Метод капиллярного электрофореза применяется и при разделении производных углеводов после дериватизации на стадии пробоподготовки. В качестве фонового электролита преимущественно применяют боратные буферные раство-

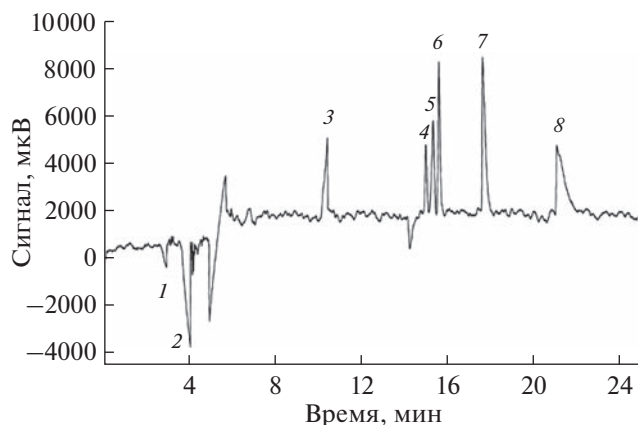


Рис. 4. Совместное определение сахаров, неорганических катионов и аминокислот в условиях ЛОКЭ. Условия: кварцевый капилляр $L_{\text{tot}} = 73$ см ($L_{\text{eff}} = 50$ см), внутренний диаметр 50 мкм; фоновый электролит: 7.5 mM CuSO_4 , 500 mM NH_3 , pH 11.6; 25 кВ; 245 нм. Аналиты: 1 — K^+ , 2 — Na^+ , 3 — глютамин, 4 — сахароза, 5 — рибоза, 6 — глюкоза, 7 — аспартат, 8 — глутамат [86].

ры, обеспечивая дополнительное комплексообразование с аналитами, что, в свою очередь, приводит к увеличению селективности разделения [94]. В ряде исследований разделение дериватов проводили в режиме мицелярной электрокинетической хроматографии (МЭКХ) с использованием в качестве псевдостационарной фазы додецилсульфата натрия [94], холевой кислоты [95], цетилтриметиламмония бромида при определении фруктозы, глюкозы, мальтозы, мальтотриозы, лактозы и сахарозы в злаках и молочных продуктах [96]. В работе [94] удалось достичь разделения глюкозы и фруктозы в форме 4-аминобензонитрильных производных методом МЭКХ, что в условиях зонного варианта КЭ оказалось невозможным.

Основные реагенты дериватизации и условия разделения производных рассмотрены в следующем разделе.

ПРОБОПОДГОТОВКА

При выполнении пробоподготовки природного объекта к хроматографическому или электрофоретическому определению углеводов требуется учитывать природу и концентрацию соответствующих моносахаридов, наличие различных изомерных структурных форм и конъюгатов и др. [97–99]. Основные этапы включают извлечение из матрицы растворимых полисахаридов, их гидролиз, дериватизацию с последующим хроматографическим или электрофоретическим анализом. Гидролиз полисахаридов проводят обычно с использованием серной или трифторуксусной

кислот. Ускорению гидролиза способствует микроволновая обработка.

Наиболее распространенными приемами пробоподготовки для очистки образца со сложной матрицей являются фильтрация, экстракция, хроматографическое разделение и химическая либо биологическая обработка пробы. В подавляющем большинстве случаев для извлечения и очистки нейтральных углеводов применяют различные варианты экстракции: жидкостная, твердофазная, сверхкритическая флюидная или жидкостная экстракция под давлением. В случае жидкостной экстракции наиболее часто в качестве экстрагентов используют воду и низкомолекулярные спирты [100] либо такие органические растворители, как диметилсульфоксид [101]. Имеются публикации, где роль экстрагента выполняют ионные жидкости [102]. Эффективность экстракции возрастает с применением микроволнового излучения [103]. Применение сверхкритической жидкостной экстракции для выделения углеводов пока остается ограниченным, поскольку их растворимость в наиболее распространенном в этом методе пробоподготовки сверхкритическом CO_2 оказывается достаточно низкой. Предприняты попытки увеличить их растворимость добавлением смеси этанол–вода для выделения из образца углеводов, синтезированных бактериями-пробиотиками [104, 105]. Для жидкостной экстракции под давлением чаще всего в качестве экстрагента используют воду, обеспечивая разделение углеводов на фракции в зависимости от их молекулярной массы [106–109]. Так, с помощью жидкостной экстракции под давлением получены фракции образцов меда, содержащих ди- и трисахариды [108]. Твердофазная экстракция по-прежнему остается наиболее востребованным вариантом пробоподготовки. Для этой цели используют обращенно-фазовые (C8 и C18) картриджи, ионообменные сорбенты либо графитированный углерод [110–112].

В работе [113] предложено частично заполнять кварцевый капилляр карбоксилированными одностенными углеродными нанотрубками при электрофоретическом определении глюкозы, мальтозы и фруктозы. Наночастицы удерживают примесные компоненты матрицы. Электрофоретическое разделение углеводов осуществляли с использованием 200 mM боратного буферного раствора (pH 9.5; 15 кВ). Перед вводом анализируемого образца в капилляр в течение 60 с вводили суспензию углеродных нанотрубок (50 мг/л в 300 mM боратном буферном растворе).

Среди хроматографических методов для пробоподготовки образцов, содержащих углеводы, наибольшее распространение получила эксклюзионная хроматография. Время элюирования различных компонентов зависит от соотношения

Таблица 1. Определение нейтральных углеводов с применением различных вариантов гидролиза

Вариант гидролиза	Аналиты	Литература
Гидролиз трехфторуксусной кислотой	Нейтральные и кислые углеводы	[116], [117]
Метанолиз	Гетерополисахариды	[118]
Гидролиз неорганическими кислотами (H ₂ SO ₄ или HCl)	Нейтральные углеводы	[119]
Формолиз	Нерастворимые в воде полисахариды	[120]

между размером их молекул и размером пор выбранной стационарной фазы. Это может быть полезно в случае необходимости выделять моно- или олигосахариды из образца, содержащего углеводы с различной степенью поликонденсации [114]. Биологическая обработка образцов для анализа смесей углеводов применяется реже, однако описано использование дрожжей для удаления моносахаридов из образцов меда, в которых требовалось установить содержание олигосахаридов [115].

В качестве методов пробоподготовки с применением химических реагентов обычно рассматриваются варианты разложения проб под действием кислот и органических растворителей (табл. 1). Кислотный гидролиз применяется для разрушения полисахаридов и их определения в образцах почвы [116, 117]. Для определения содержания ксилозы, рамнозы, маннозы, фукозы и галактозы полисахариды, присутствующие в образцах почвы, гидролизовали при 100°C в течение 4 ч до моносахаридов путем добавления трифторуксусной кислоты непосредственно в почву. Полученные моносахариды количественно дериватизировали этиловым эфиром 4-аминобензойной кислоты с восстановительным аминированием цианоборгидридом натрия и разделяли методом мицеллярной электрокинетической хроматографии с УФ-детектированием при 300 нм [117].

Метанолиз является более мягким способом расщепления полисахаридов и предложен, например, для определения компонентов лигноцеллюлоз в различных растительных объектах [118].

Формолиз обычно используется при определении сложных углеводов, нерастворимых в горячей воде [120].

Необходимым этапом пробоподготовки является дериватизация, позволяющая изменить свойства углеводов и обеспечить их обнаружение выбранным методом. Предложено немало дериватизирующих агентов [121, 122] с введением в состав молекул углеводов хромофорных или флуорофорных групп. При этом желательно, чтобы реакция протекала с участием одной функциональной группы аналита, исключая тем самым образование нескольких продуктов. Более того, выбранный вариант получения производных должен быть воспроизводимым и характеризоваться высокой конверсией. Весьма распространена дериватизация путем восстановительного аминирования. В таких реакциях подходящие хромофоры или флуорофоры, несущие первичную аминогруппу, взаимодействуют с карбонильной группой восстанавливающих сахаров в присутствии цианоборогидрида натрия (схема 4) [123].

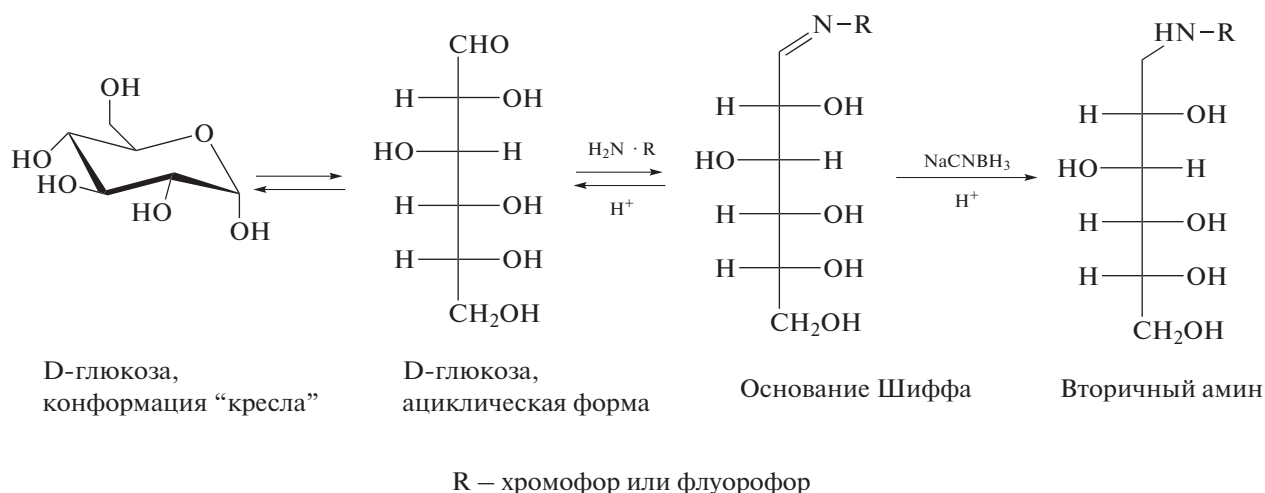


Схема 4. Схема восстановительного аминирования сахаров на примере глюкозы [123].

Таблица 2. Реагенты дериватизации и условия хроматографического и электрофоретического определения нейтральных углеводов

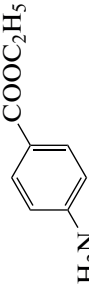
Реагент дериватизации	Метод	Аналиты	Образец	ПО	Литература
 Этил- <i>p</i> -аминобензоат	КЗЭ-УФ (305 нм); ФЭ: 450 мМ боратный буферный р-р, рН 9.94	Целлобиоза, ксилоза, глюкоза, манноза, арабиноза и галактоза	Бумага	35–72 мг/л	[124]
	КЗЭ-УФ 305 нм; ФЭ: 450 мМ боратный буферный р-р, рН 9.7	Ликсо́за, ксило́за, рибо́за, арабино́за, гуло́за, тало́за, глюко́за, манно́за, идо́за, алло́за, альтро́за, галакто́за	Смесь стандартов	–	[125]
	КЗЭ-УФ 280 нм; ФЭ: 500 мМ боратного буферного р-ра, 20% MeOH, 0.001% гексадиметринбромид; рН 10.0	Галакто́за, фуко́за, арабино́за, манно́за, фрукто́за, глюко́за, лакто́за, рибо́за, сорбо́за, ксило́за, мелиби́оза, целлоби́оза, ликсо́за, мальто́за, рамно́за, мальтотетро́за, генциоби́оза	Гидролизат листьев плюща	1 ppm	[131]
	ОФ ВЭЖХ-УФ (254 нм)	Мелиби́оза, лакто́за, изомальто́за, генциоби́оза целлоби́оза, мальто́за, галакто́за, глюко́за, манно́за, арабино́за, рибо́за, ксило́за, фуко́за, рамно́за	Смесь стандартов	–	[132]
	НРАЕС амперометрич. детектирование ОФ ВЭЖХ с диодно-матричным детектированием (250–350 нм)	Фуко́за, рамно́за, арабино́за, галакто́за, глюко́за, ксило́за, фрукто́за, рибо́за	Смесь стандартов	0.1–0.2 мкг/мл 0.3–1.0 мкг/мл	[133]

Таблица 2. Продолжение

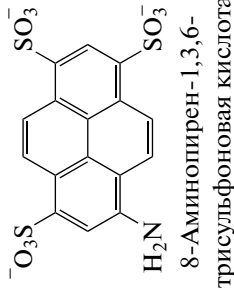
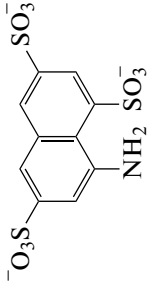
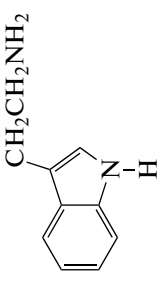
Реагент дериватизации	Метод	Аналиты	Образец	ПО	Литература
 8-Аминопирен-1,3,6-трисульфоновая кислота	КЗЭ флуориметрическое детектирование (экс: 488 нм; эм: 520 нм); ФЭ: 100 мМ боратный буферный р-р; рН 10.2	Рамноза, манноза, глюкоза, фруктоза, ксилоза, фукоза, галактоза	Смесь стандартов	–	[134]
	КЗЭ, флуориметрическое детектирование (экс: 488 нм; эм: 520 нм); ФЭ: 25 мМ ацетатный буферный р-р (рН 2.4) + 0.4% полиэтиленоксида; МС-детектирование; ФЭ: 0.3 об. % муравьиной кислоты, рН 2.4	Профилирование олигосахаридов	Грудное молоко	–	[135]
 8-Аминафталин-1,3,6-трисульфоновая кислота	КЗЭ, флуориметрическое детектирование (экс: 488 нм; эм: 520 нм); ФЭ: 240 мМ боратный буферный р-р, рН 9.0	Манноза, глюкоза, фукоза галактоза, ксилоза	Гидрализаты 6'-сиалил-N-ацетилгалактозамина и гликаны бычьего фетуина	50 пМ	[136]
	КЗЭ, флуориметрическое детектирование (экс: 370 нм; эм: 520 нм) и УФ-детектирование (214 нм); ФЭ: 200 мМ фосфатный буферный р-р, рН 2.0	Глюкоза, мальтоза, олигосахариды	Смесь стандартов	–	[137]
 Триптамин	КЗЭ-УФ, КЗЭ-МС полиакриламидное покрытие; ФЭ: уксусная кислота (0.15 мМ) – муравьиная кислота (0.06 мМ)	Глюкоза, мальтоза и неразветвленные мальтоолигосахариды	Декстрин-15	–	[138]
	МЭКХ-УФ (220 нм); ФЭ: 25 мМ холевая кислота, 100 мМ борат, 2% 1-пропанола, рН 9.7	Рамноза, целлюлоза, ксилоза, арабиноза, глюкоза, манноза, фукоза, галактоза, целлобиоза, мелибиоза	Экстракты растений	50 пМ	[195]

Таблица 2. Продолжение

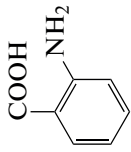
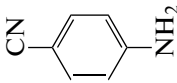
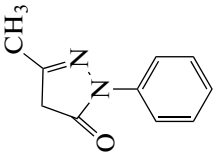
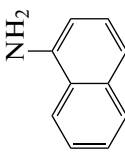
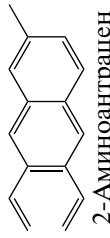
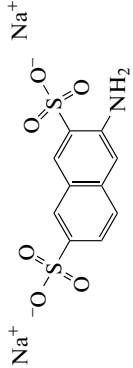
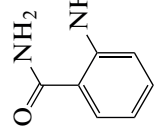
Реагент дериватизации	Метод	Аналиты	Образец	ПО	Литература
 2-Аминобензойная кислота	КЗЭ-УФ (214 нм); ФЭ: 150 мМ борат натрия, 50 мМ фосфат натрия, рН 7	Рибоза, фукоза, глюкоза, манноза, галактоза	Смесь стандартов	–	[126]
	ОФ ВЭЖХ флуориметрическое детектирование (экс: 360 нм; эм: 425); МС-детектирование	Глюкоза, галактоза, манноза, ксилоза, рибоза, фукоза, рамноза	Гликаны улитки	–	[127]
	НРАЕС-УФ (328 нм)	Ксилоза, галактоза, глюкоза, арабиноза	Растения	–	[128]
	ОФ ВЭЖХ флуориметрическое детектирование (экс: 360 нм; эм: 425)	Галактоза, глюкоза, манноза, фукоза	Клетки яичника китайского хомячка	–	[140]
	ОФ ВЭЖХ флуориметрическое детектирование (экс: 360 нм; эм: 425)	26 моноолигосахаридов	Гликаны улитки	65 фМ	[141]
 2-Аминобензонитрил	КЗЭ-УФ (280 нм); ФЭ: 500 мМ борат, 5% <i>n</i> -пропанола, 5% метанола, 0.001% гексаметилтринбромамида, рН 10.5	Галактоза, фукоза, арабиноза, манноза, фруктоза, глюкоза, лактоза, рибоза, сорбоза, ксилоза, мелибиоза, целлобиоза, ликсоза, мальтоза, рамноза, мальтотетроза, генциобиоза	Гидролизат листьев плюща	0.6 ppm	[131]

Таблица 2. Окончание

Реагент дериватизации	Метод	Аналиты	Образец	ПО	Литература
 1-Фенил-3-метил-5-пиразолон	ОФ ВЭЖХ; HPLC-УФ (248 нм); светорассеивающий детектор	Манноза, рибоза, мальтоза, лактоза, глюкоза, галактоза, ксилоза	Смесь стандартов	2.01–3.89 мкг/мл 38.32–43.26 мкг/мл	[142]
	ОФ ВЭЖХ-УФ (245 нм)	Манноза, рибоза, рамноза, глюкоза, ксилоза, галактоза, арабиноза, фукоза	Профилирование агроиндустриальных выбросов	1.17–4.83 мкг/мл	[129]
	ОФ ВЭЖХ-УФ (245 нм)	26 моно- и олигосахаридов	Гликаны улитки	65 фМ	[142]
	HPLC-МС	Манноза, рибоза, рамноза, глюкоза, ксилоза, галактоза, фукоза	Экстракты растений	0.06–0.20 нг/мл	[143]
 1-Аминонафталин	ОФ КЭХ с УФ-детектированием 214 нм; ФЭ: 17.5 мМ борная кислота, рН 10, 65% ацетонитрила	Профилирование олигосахаридов	Пиво	–	[144]
 2-Аминоантрацен					
 3-Амино-2,7-нафталиндисульфоновая кислота	ОФ КЭХ-УФ (214 нм); ФЭ: 10 мМ дигидрофосфат натрия, рН 6.0, 80% ацетонитрила				
 2-Аминобензамид	ОФ ВЭЖХ флуориметрическое детектирование (экс: 260 нм, эм: 440 нм)	Глюкоза, галактоза, манноза, ксилоза, арабиноза	Морская вода	1.2–10.8 нМ	[145]

В качестве дериватирующих реагентов, участвующих в восстановительном аминировании, применяют аминокислоты и их эфиры [124–128]. Для электрофоретического разделения необходимо получать дериваты, имеющие ионогенную аналитическую форму. Так, в работе [128] в качестве реагента для дериватизации используют сульфатированные ароматические амины. В ряде публикаций для получения производных используют конденсацию между карбонильной группой восстанавливающих углеводов и активными атомами водорода 1-фенил-3-метил-5-пиразолона, что успешно применяется как в хроматографическом [129], так и в электрофоретическом анализе [90]. Фенилгидразины применяют в качестве агентов для дериватизации восстанавливающих сахаров с образованием производных, обеспечивающих высокую чувствительность и при МС- и УФ-детектировании [130].

Некоторые примеры агентов дериватизации и условия их использования представлены в табл. 2.

* * *

Рассмотрены возможности и ограничения определения нейтральных углеводов в объектах природного происхождения методами хроматографии и электрофореза. Низкие константы ионизации, отсутствие хромофорных групп в составе молекул сахаров, наличие в водных растворах нескольких равновесных изомерных структур — главные проблемы при определении этих аналитов. Один из важнейших этапов пробоподготовки углеводов к анализу различными физико-химическими методами — получение соответствующих производных. Доминирующими тенденциями в выборе стратегии при определении сахаров в объектах со сложной матрицей является применение различных методов ГХ и ВЭ-ЖХ с масс-спектрометрическим детектированием и с получением производных. Значительная роль при решении этих задач отводится методам анионообменной и гидрофильной хроматографии. Электрофоретические методы имеют свою нишу за счет их высокой эффективности, возможности онлайн концентрирования и внутрикапиллярной дериватизации. При этом методы капиллярного электрофореза (зонный и мицеллярный варианты) могут выступать и в качестве референтных по отношению к хроматографическим. Поиск новейших и высокоселективных дериватирующих агентов — одна из приоритетных задач при разработке как электрофоретических, так и хроматографических способов определения нейтральных углеводов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wicinska P., Zurawska A., Falkowski P., Jeong D.Y., Szafran M. Sweet ceramics: How saccharide-based compounds have changed colloidal processing of ceramic materials // *J. Korean Ceram. Soc.* 2020. V. 57. № 3. P. 231.
<https://doi.org/10.1007/S43207-020-00036-X>
2. Gerwig G.J. *The Art of Carbohydrate Analysis*. Groningen: Springer, 2021.
<https://doi.org/10.1007/978-3-030-77791-3>
3. Varki A. Biological roles of oligosaccharides: All of the theories are correct // *Glycobiology*. 1993. V. 3. № 2. P. 97.
<https://doi.org/10.1093/GLYCOB/3.2.97>
4. Varki A. Biological roles of glycans // *Glycobiology*. 2017. V. 27. № 1. P. 3.
<https://doi.org/10.1093/GLYCOB/CWW086>
5. Gandhi N.S., Mancera R.L. The Structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins // *Chem. Biol. Drug Des.* 2008. V. 72. № 6. P. 455.
<https://doi.org/10.1111/J.1747-0285.2008.00741.X>
6. Cortés-Sánchez A., Hernández-Sánchez H., Jaramillo-Flores M.E. Biological activity of glycolipids produced by microorganisms: New trends and possible therapeutic alternatives // *Microbiol. Res.* 2013. V. 168. № 1. P. 22.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.07.002>
7. Niaz K., Khan F., Shah M.A. Analysis of carbohydrates (monosaccharides, polysaccharides) / *Recent Advances in Natural Products Analysis* / Eds. Nabavi S.M., Saeedi M., Nabavi S.F., Silva A.S. Amsterdam: Elsevier, 2020. P. 621.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816455-6.00018-4>
8. Geijtenbeek T., Torensma R., van Vliet S., van Duinhoven G., Adema G., Kooyk Y., Figdor C. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses // *Cell*. 2000. V. 100. P. 575.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80693-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80693-5)
9. Kapaev R., Egorova K., Toukach P. Carbohydrate structure generalization scheme for database-driven simulation of experimental observables, such as NMR chemical shifts // *J. Chem. Inf. Model.* 2014. V. 54. № 9. P. 2594.
<https://doi.org/10.1021/ci500267u>
10. Varki A., Freeze H.H., Manzi A.E. Preparation and analysis of glycoconjugates / *Current Protocols in Molecular Biology*. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc, 2009. P. 1.
<https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1700s88>
11. Карцова Л.А., Бессонова Е.А., Сомова В.Д. Гидрофильная хроматография // *Журн. аналит. химии*. 2019. Т. 74. № 5. P. 323. (Kartsova L.A., Bessonova E.A., and Somova V. D. Hydrophilic interaction chromatography // *J. Anal. Chem.* 2019. V. 74. № 5. P. 415.
<https://doi.org/10.1134/S1061934819050058>
<https://doi.org/10.1134/S0044450219050050>
12. Nagy G., Peng T., Pohl N.L.B. Recent liquid chromatographic approaches and developments for the separation and purification of carbohydrates // *Anal. Methods UK*. 2017. V. 9. № 24. P. 3579.
<https://doi.org/10.1039/c7ay01094j>

13. Ikegami T., Horie K., Saad N., Hosoya K., Fiehn O., Tanaka N. Highly efficient analysis of underivatized carbohydrates using monolithic-silica-based capillary hydrophilic interaction (HILIC) HPLC // *Anal. Bioanal. Chem.* 2008. V. 391. № 7. P. 2533.
<https://doi.org/10.1007/s00216-008-2060-6>
14. Tang K., Liang L., Cai Y., Mou S. Determination of sugars and alditols in tobacco with high-performance anion-exchange chromatography // *J. Sep. Sci.* 2007. V. 30. P. 2160.
<https://doi.org/10.1002/jssc.200700044>
15. Захарова А.М., Гринштейн И.Л., Карцова Л.А. Определение углеводов и подсластителей в пищевых продуктах и биологически активных добавках методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // *Журн. аналит. химии.* 2013. V. 68. № 12. P. 1208. (Zakharova A.M., Grinshtein I.L., and Kartsova L.A. Determination of sugars using ligand-exchange capillary electrophoresis // *J. Anal. Chem.* 2010. V. 68. № 12. P. 1081.
<https://doi.org/10.1134/S1061934813100122>
<https://doi.org/10.7868/s0044450213100149>
16. Fu Q., Liang T., Zhang X., Du Y., Guo Z., Liang X. Carbohydrate separation by hydrophilic interaction liquid chromatography on a “click” maltose column // *Carbohydr. Res.* 2010. V. 345. № 18. P. 2690.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2010.09.033>
17. Fu Q., Liang T., Li Z., Xu X., Ke Y., Jin Y., Liang X. Separation of carbohydrates using hydrophilic interaction liquid chromatography // *Carbohydr. Res.* 2013. V. 379. P. 13.
<https://doi.org/10.1016/J.CARRES.2013.06.006>
18. Liu J., Li J., Yi D., Liu Y., Liu R., Xue Y., Huang Q., Liu S., Jiang Y. Non-derivatization strategy for the comprehensive characterization of neutral monosaccharide isomers and neutral disaccharide isomers using hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to quadrupole/time-of-flight mass spectrometry // *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2021. V. 1185.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122972>
19. Antonio C., Larson T., Gilday A., Graham I., Bergström E., Thomas-Oates J. Hydrophilic interaction chromatography/electrospray mass spectrometry analysis of carbohydrate-related metabolites from *Arabidopsis thaliana* leaf tissue // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2008. V. 22. № 9. P. 1399.
<https://doi.org/10.1002/rcm.3519>
20. Pismennõi D., Kiritsenko V., Marhivka J., Küt M.L., Vilu R. Development and optimisation of HILIC-LC-MS method for determination of carbohydrates in fermentation samples // *Molecules.* 2021. V. 26. № 12. P. 3669.
<https://doi.org/10.3390/molecules26123669>
21. Gervasoni J., Primiano A., Graziani C., Scaldasferri F., Gasbarrini A., Urbani A., Persichilli S. Validation of UPLC-MS/MS Method for determination of urinary lactulose/mannitol // *Molecules.* 2018. V. 23. № 10. P. 2705.
<https://doi.org/10.3390/molecules23102705>
22. Grootjans J. Non-invasive assessment of barrier integrity and function of the human gut // *World J. Gastrointest. Surg.* 2010. V. 2. № 3. P. 61.
<https://doi.org/10.4240/wjgs.v2.i3.61>
23. Vismeh R., Humpala J.F., Chundawat S.P.S., Balan V., Dale B.E., Jones A.D. Profiling of soluble neutral oligosaccharides from treated biomass using solid phase extraction and LC-TOF MS // *Carbohydr. Polym.* 2013. V. 94. № 2. P. 791.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.02.005>
24. Ikegami T., Horie K., Saad N., Hosoya K., Fiehn O., Tanaka N. Highly efficient analysis of underivatized carbohydrates using monolithic-silica-based capillary hydrophilic interaction (HILIC) HPLC // *Anal. Bioanal. Chem.* 2008. V. 391. № 7. P. 2533.
<https://doi.org/10.1007/s00216-008-2060-6>
25. Bi W., Zhou J., Row K.H. Separation of xylose and glucose on different silica-confined ionic liquid stationary phases // *Anal. Chim. Acta.* 2010. V. 677. № 2. P. 162.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.08.004>
26. Tian M., Bi W., Row K.H. Separation of monosaccharides by solid-phase extraction with ionic liquid-modified microporous polymers // *J. Sep. Sci.* 2011. V. 34. № 22. P. 3151.
<https://doi.org/10.1002/jssc.201100546>
27. Chikurova N.Yu., Shemiakina O., Shpigun O.A., Chernobrovkina A.V. Multicomponent Ugi reaction as a tool for fast and easy preparation of stationary phases for hydrophilic interaction liquid chromatography. Part I: The influence of attachment and spacing of the functional ligand obtained via the Ugi reaction // *J. Chromatogr. A.* 2022. V. 1666. Article 462804.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.462804>
28. Maier M., Reusch D., Bruggink C., Bulau P., Wührer M., Molhøj M. Applying mini-bore HPAEC-MS/MS for the characterization and quantification of Fc N-glycans from heterogeneously glycosylated IgGs // *J. Chromatogr. B.* 2016. V. 1033–1034. P. 342.
<https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2016.08.001>
29. Corradini C., Cavazza A., Bignardi C. High-performance anion-exchange chromatography coupled with pulsed electrochemical detection as a powerful tool to evaluate carbohydrates of food interest: Principles and applications // *Int. J. Carbohydr. Chem.* 2012. V. 2012. P. 1.
<https://doi.org/10.1155/2012/487564>
30. Tommaso R., Cataldi I., Margiotta G., Iasi L., di Chio B. Determination of sugar compounds in olive plant extracts by anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection // *Anal. Chem.* 2000. V. 72. P. 3902.
<https://doi.org/10.1021/ac000266o>
31. Sequeira I.R., Kruger M.C., Hurst R.D., Lentle R.G. A simple, robust, and convenient HPLC assay for urinary lactulose and mannitol in the dual sugar absorption test // *Molecules.* 2022. V. 27. № 9. P. 2677.
<https://doi.org/10.3390/molecules27092677>
32. de Souza M.F., Pereira D.S., Freitas S.P., Bon E., Rodrigues M.A. Neutral sugars determination in *Chlorella*: Use of a one-step dilute sulfuric acid hydrolysis with reduced sample size followed by HPAEC analysis // *Algal Res.* 2017. V. 24. P. 130.
<https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2017.03.019>

33. *Bruggink C., Maurer R., Herrmann H., Cavalli S., Hoefler F.* Analysis of carbohydrates by anion exchange chromatography and mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* 2005. V. 1085. № 1. P. 104.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.03.108>
34. *Schmid T., Baumann B., Himmelsbach M., Klampfl C.W., Buchberger W.* Analysis of saccharides in beverages by HPLC with direct UV detection // *Anal. Bioanal. Chem.* 2016. V. 408. № 7. P. 1871.
<https://doi.org/10.1007/s00216-015-9290-1>
35. *Gonzalez N.M., Fitch A., Al-Bazi J.* Development of a RP-HPLC method for determination of glucose in *Shewanella oneidensis* cultures utilizing 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatization // *PLoS ONE.* 2020. V. 15. № 3. Article e0229990.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229990>
36. *Bai W., Fang X., Zhao W., Huang S., Zhang H., Qian M.* Determination of oligosaccharides and monosaccharides in Hakka rice wine by precolumn derivation high-performance liquid chromatography // *J. Food Drug Anal.* 2015. V. 23. № 4. P. 645.
<https://doi.org/10.1016/J.JFDA.2015.04.011>
37. *Rakete S., Glomb M.A.* A novel approach for the quantitation of carbohydrates in mash, wort, and beer with RP-HPLC using 1-naphthylamine for precolumn derivatization // *J. Agric. Food Chem.* 2013. V. 61. № 16. P. 3828.
<https://doi.org/10.1021/JF400463R>
38. *Wu W., Hamase K., Kiguchi M., Yamamoto K., Zaitzu K.* Reversed-phase HPLC of monosaccharides in glycoproteins derivatized with aminopyrazine with fluorescence detection // *Anal. Sci.* 2000. V. 16. № 9. P. 919.
<https://doi.org/10.2116/analsci.16.919>
39. *Nakamura A., Hatanaka C., Nagamatsu Y.* Ultraviolet spectrometric determination of neutral monosaccharides by HPLC with ethanolamine // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2000. V. 64. № 1. P. 178.
<https://doi.org/10.1271/bbb.64.178>
40. *Melmer M., Stangler T., Premstaller A., Lindner W.* Comparison of hydrophilic-interaction, reversed-phase and porous graphitic carbon chromatography for glycan analysis // *J. Chromatogr. A.* 2011. V. 1218. № 1. P. 118.
<https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2010.10.122>
41. *Templeton D.W., Quinn M., van Wychen S., Hyman D., Laurens L.M.L.* Separation and quantification of microalgal carbohydrates // *J. Chromatogr. A.* 2012. V. 1270. P. 225.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.10.034>
42. *Stoll D.R., Carr P.W.* Two-dimensional liquid chromatography: A state of the art tutorial // *Anal. Chem.* 2017. V. 89. № 1. P. 519.
<https://doi.org/10.1021/ACS.ANALCHEM.6B03506>
43. *Chen L., Zhu W., Yan N., Guo Y., Yi L., Ouyang Y., Zhang Z.* Analysis of heparinase derived LMWH products using a MHC 2D LC system linked to Q-TOF MS // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2022. V. 212. Article 114616.
<https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2022.114616>
44. *Chen L., Ouyang Y., Yan N., Guo Y., Yi L., Sun Y., Liu D., Zhang Z.* Comprehensive analysis of heparinase derived heparin-products using two-dimensional liquid chromatography coupled with mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* 2021. V. 1643. Article 462049.
<https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2021.462049>
45. *Ruiz-Matute A.I., Brokl M., Soria A.C., Sanz M.L., Martínez-Castro I.* Gas chromatographic–mass spectrometric characterisation of tri- and tetrasaccharides in honey // *Food Chem.* 2010. V. 120. № 2. P. 637.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2009.10.050>
46. *Ruiz-Matute A.I., Hernández-Hernández O., Rodríguez-Sánchez S., Sanz M.L., Martínez-Castro I.* Derivatization of carbohydrates for GC and GC-MS analyses // *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2011. V. 879. № 17–18. P. 1226.
<https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2010.11.013>
47. *Wang H., Geppert H., Fischer T., Wieprecht W., Möller D.* Determination of sucrose in honey with derivatization/solid-phase microextraction and gas-chromatography/mass spectrometry // *J. Chromatogr. Sci.* 2015. V. 53. № 9. P. 1427.
<https://doi.org/10.1093/chromsci/bmv044>
48. *Morvai-Vitányi M., Molnár-Perl I., Knausz D., Sass P.* Simultaneous GC derivatization and quantification of acids and sugars // *Chromatographia.* 1993. V. 36. № 1. P. 204.
<https://doi.org/10.1007/BF02263864>
49. *Xia Y.G., Sun H.M., Wang T.L., Liang J., Yang B.Y., Kuang H.X.* A modified GC-MS analytical procedure for separation and detection of multiple classes of carbohydrates // *Molecules.* 2018. V. 23. № 6. P. 1284.
<https://doi.org/10.3390/MOLECULES23061284>
50. *Silva F.O.* Microwave-assisted derivatization of glucose and galactose for gas chromatographic determination in human plasma // *Clin. Chem.* 2006. V. 52. № 2. P. 334.
<https://doi.org/10.1373/CLINCHEM.2005.062109>
51. *Li Z., Wang J., Huang C., Zhang S., Yang J., Jiang A., Zhou R., Pan D.* Gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry-based metabonomics of hepatocarcinoma in rats with lung metastasis: Elucidation of the metabolic characteristics of hepatocarcinoma at formation and metastasis // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2010. V. 24. № 18. P. 2765.
<https://doi.org/10.1002/RCM.4703>
52. *Rojas-Escudero E., Alarcón-Jiménez A.L., Elizalde-Galván P., Rojo-Callejas F.* Optimization of carbohydrate silylation for gas chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2004. V. 1027. P. 117.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.10.131>
53. *Zarate E., Boyle V., Rupprecht U., Green S., Villas-Boas S.G., Baker P., Pinu F.R.* Fully automated trimethylsilyl (TMS) derivatisation protocol for metabolite profiling by GC-MS // *Metabolites.* 2017. V. 7. № 1. P. 1.
<https://doi.org/10.3390/METABO7010001>
54. *Becker M., Liebner F., Rosenau T., Potthast A.* Ethoximation-silylation approach for mono- and disaccharide analysis and characterization of their identification parameters by GC/MS // *Talanta.* 2013. V. 115. P. 642.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.05.052>
55. *Xia Y.G., Sun H.M., Wang T.L., Liang J., Yang B.Y., Kuang H.X.* A modified GC-MS analytical procedure for separation and detection of multiple classes of carbohydrates // *Mol. A J. Synth. Chem. Nat. Prod.*

- Chem. 2018. V. 23. № 6. P. 1284.
<https://doi.org/10.3390/MOLECULES23061284>
56. Weber P.L., Lunte S.M. Capillary electrophoresis with pulsed amperometric detection of carbohydrates and glycopeptides // *Electrophoresis*. 1996. V. 17. № 2. P. 302.
<https://doi.org/10.1002/elps.1150170204>
57. Carvalho A., da Silva F.J.A., do Lago C.L. Determination of mono- and disaccharides by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection // *Electrophoresis*. 2003. V. 24. № 12–13. P. 2138.
<https://doi.org/10.1002/elps.200305408>
58. Klampfl C.W., Buchberger W. Determination of carbohydrates by capillary electrophoresis with electrospray-mass spectrometric detection // *Electrophoresis*. 2001. V. 22. № 13. P. 2737.
[https://doi.org/10.1002/15222683\(200108\)22:13<2737::AID-ELPS2737>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/15222683(200108)22:13<2737::AID-ELPS2737>3.0.CO;2-Z)
59. Schmid T., Himmelsbach M., Oliver J.D., Gaborieau M., Castignolles P., Buchberger W. Investigation of photochemical reactions of saccharides during direct ultraviolet absorbance detection in capillary electrophoresis // *J. Chromatogr. A*. 2015. V. 1388. P. 259.
<https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2015.02.030>
60. Schmid T., Himmelsbach M., Buchberger W. Investigation of photochemical reaction products of glucose formed during direct UV detection in CE // *Electrophoresis*. 2016. V. 37. № 7–8. P. 947.
<https://doi.org/10.1002/elps.201500283>
61. Sarazin C., Delaunay N., Costanza C.V., Eudes, Mallet J.M., Gareil P. New avenue for mid-UV-range detection of underivatized carbohydrates and amino acids in capillary electrophoresis // *Anal. Chem.* 2011. V. 83. № 19. P. 7381.
<https://doi.org/10.1021/ac2012834>
62. Rovio S., Yli-Kauhialuoma J., Sirén H. Determination of neutral carbohydrates by CZE with direct UV detection // *Electrophoresis*. 2007. V. 28. № 17. P. 3129.
<https://doi.org/10.1002/elps.200600783>
63. Rovio S., Simolin H., Koljonen K., Sirén H. Determination of monosaccharide composition in plant fiber materials by capillary zone electrophoresis // *J. Chromatogr. A*. 2008. V. 1185. № 1. P. 139.
<https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2008.01.031>
64. Alinat E., Jemmali S., Delaunay N., Archer X., Gareil P. Analysis of underivatized celloextrin oligosaccharides by capillary electrophoresis with direct photochemically induced UV-detection // *Electrophoresis*. 2015. V. 36. № 14. P. 1555.
<https://doi.org/10.1002/elps.201400605>
65. Kaijanen L., Metsämuuronen S., Reinikainen S.P., Pieterinen S., Jernström E. Profiling of water-soluble carbohydrates in pine and spruce extracts by capillary zone electrophoresis with direct UV detection // *Wood Sci. Technol.* 2015. V. 49. № 4. P. 795.
<https://doi.org/10.1007/s00226-015-0729-5>
66. Zhao L., Chanon A.M., Chattopadhyay N., Dami I.E., Blakeslee J.J. Quantification of carbohydrates in grape tissues using capillary zone electrophoresis // *Front. Plant. Sci.* 2016. V. 7. P. 818.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00818>
67. Lagane B., Treilhou M., Couderc F. Capillary electrophoresis: Theory, teaching approach and separation of oligosaccharides using indirect UV detection // *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 2000. V. 28. № 5. P. 251.
[https://doi.org/10.1016/S1470-8175\(00\)00031-X](https://doi.org/10.1016/S1470-8175(00)00031-X)
68. Xu X., Kok W.T., Poppe H. Sensitive determination of sugars by capillary zone electrophoresis with indirect UV detection under highly alkaline conditions // *J. Chromatogr. A*. 1995. V. 716. № 1–2. P. 231.
[https://doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)00552-X](https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)00552-X)
69. Zemmann A., Nguyen D.T., Bonn G. Fast separation of underivatized carbohydrates by coelectroosmotic capillary electrophoresis // *Electrophoresis*. 1997. V. 18. № 7. P. 1142.
<https://doi.org/10.1002/ELPS.1150180720>
70. Zemmann A.J. Sub-minute separations of organic and inorganic anions with co-electroosmotic capillary electrophoresis // *J. Chromatogr. A*. 1997. V. 787. № 1–2. P. 243.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00645-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00645-6)
71. Lee Y.H., Lin T.I., Luh T.Y. Determination of carbohydrates by high-performance capillary electrophoresis with indirect absorbance detection // *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* 1996. V. 681. № 1. P. 87.
[https://doi.org/10.1016/0378-4347\(95\)00503-X](https://doi.org/10.1016/0378-4347(95)00503-X)
72. Ramírez S.C., Carretero A.S., Blanco C.C., de Castro M.H.B., Gutiérrez A.F. Indirect determination of carbohydrates in wort samples and dietetic products by capillary electrophoresis // *J. Sci. Food Agric.* 2005. V. 85. № 3. P. 517.
<https://doi.org/10.1002/JSFA.2010>
73. Warren C.R., Adams M.A. Capillary electrophoresis for the determination of major amino acids and sugars in foliage: Application to the nitrogen nutrition of sclerophyllous species // *J. Exp. Bot.* 2000. V. 51. № 347. P. 1147.
<https://doi.org/10.1093/JEXBOT/51.347.1147>
74. Stroka J., Dossi N., Anklam E. Determination of the artificial sweetener Sucralose® by capillary electrophoresis // *Food Addit. Contam.* 2003. V. 20. № 6. P. 524.
<https://doi.org/10.1080/0265203031000070803>
75. Soga T., Heiger D.N. Simultaneous determination of monosaccharides in glycoproteins by capillary electrophoresis // *Anal. Biochem.* 1998. V. 261. № 1. P. 73.
<https://doi.org/10.1006/abio.1998.2727>
76. Soga T., Serwe M. Determination of carbohydrates in food samples by capillary electrophoresis with indirect UV detection // *Food Chem.* 2000. V. 69. № 3. P. 339.
[https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00044-3](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00044-3)
77. Soga T., Ross G.A. Simultaneous determination of inorganic anions, organic acids, amino acids and carbohydrates by capillary electrophoresis // *J. Chromatogr. A*. 1999. V. 837. № 1–2. P. 231.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00092-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00092-8)
78. Lu B., Westerlund D. Indirect UV detection of carbohydrates in capillary zone electrophoresis by using tryptophan as a marker // *Electrophoresis*. 1996. V. 17. № 2. P. 325.
<https://doi.org/10.1002/ELPS.1150170207>
79. Алексеева А.В., Карцова Л.А., Казачищева Н.В. Определение сахаров методом лигандообменного

- капиллярного электрофореза // Журн. аналит. химии. 2010. Т. 65. № 2. Р. 205. (*Alekseeva A.V., Kartsova L.A., Kazachishcheva N.V.* Determination of sugars using ligand-exchange capillary electrophoresis // *J. Anal. Chem.* 2010. V. 65. № 2. P. 202.) <https://doi.org/10.1134/S1061934810020176>
80. Gürel A., Hızal J., Öztekin N., Erim F.B. CE determination of carbohydrates using a dipeptide as separation electrolyte // *Chromatographia*. 2006. V. 64. № 5–6. P. 321. <https://doi.org/10.1365/s10337-006-0032-6>
 81. Vaher M., Koel M., Kazarjan J., Kaljurand M. Capillary electrophoretic analysis of neutral carbohydrates using ionic liquids as background electrolytes // *Electrophoresis*. 2011. V. 32. № 9. P. 1068. <https://doi.org/10.1002/elps.201000575>
 82. Hoffstetter-Kuhn S., Paulus A., Gassmann E., Widmer M.H. Influence of borate complexation on the electrophoretic behavior of carbohydrates in capillary electrophoresis // *Anal. Chem.* 1991. V. 63. № 15. P. 1541. https://doi.org/10.1021/AC00015A009/ASSET/AC00015A009.FP.PNG_V03
 83. Schmitt-Kopplin P., Fischer K., Freitag D., Kettrup G. Capillary electrophoresis for the simultaneous separation of selected carboxylated carbohydrates and their related 1,4-lactones // *J. Chromatogr. A*. 1998. V. 807. № 1. P. 89. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00056-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00056-9)
 84. Angyal S.J. Complexing of carbohydrates with copper ions: A reappraisal // *Carbohydr. Res.* 1990. V. 200. P. 181. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(90\)84189-2](https://doi.org/10.1016/0008-6215(90)84189-2)
 85. Алексеева А.В., Карцова Л.А. Возможности лигандообменного капиллярного электрофореза при определении биологически активных веществ // Журн. аналит. химии. 2011. Т. 66. № 7. Р. 764. (*Alekseeva A.V., Kartsova L.A.* Potencies of ligand-exchange capillary electrophoresis in the determination of biologically active compounds // *J. Anal. Chem.* 2011. V. 66. № 7. P. 651.) <https://doi.org/10.1134/S1061934811070021>
 86. Bazzanella A., Bachmann K. Separation and direct UV detection of sugars by capillary electrophoresis using chelation of copper(II) // *J. Chromatogr. A*. 1998. V. 799. № 1–2. P. 283. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)01039-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)01039-X)
 87. Алексеева А.В., Карцова Л.А. Лигандообменный капиллярный электрофорез // Журн. аналит. химии. 2011. Т. 66. № 7. Р. 677. (*Kartsova L.A., Alekseeva A.V.* Ligand-exchange capillary electrophoresis // *J. Anal. Chem.* 2011. V. 66. № 7. P. 563.) <https://doi.org/10.1134/S1061934811050066>
 88. Čokrtová K., Mareš V., Křížek T. On-capillary fluorescent labeling of saccharides for capillary electrophoresis // *Electrophoresis*. 2022. <https://doi.org/10.1002/elps.202200136>
 89. Wang X.Y., Chen Y., Li Z., Wang Z. Analysis of carbohydrates by capillary zone electrophoresis with on-capillary derivatization // *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2002. V. 25. № 4. P. 589. <https://doi.org/10.1081/JLC-120008813>
 90. Taga A., Suzuki S., Honda S. Capillary electrophoretic analysis of carbohydrates derivatized by in-capillary condensation with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone // *J. Chromatogr. A*. 2001. V. 911. № 2. P. 259. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00516-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00516-7)
 91. Wang X.Y., Chen Y., Li Z., Wang Z. Analysis of carbohydrates by capillary zone electrophoresis with on-capillary derivatization // *J. Liquid Chromatogr. Relat. Technol.* 2002. V. 25. I. 4. P. 589. <https://doi.org/10.1081/JLC-120008813>
 92. Maeda E., Kataoka M., Hino M., Kajimoto K., Kaji N., Tokeshi M., Kido J., Shinohara Y., Baba Y. Determination of human blood glucose levels using microchip electrophoresis // *Electrophoresis*. 2007. V. 28. P. 2927. <https://doi.org/10.1002/elps.200600795>
 93. Rovio S., Yli-Kauhaluoma J., Sirén H. Determination of neutral carbohydrates by CZE with direct UV detection // *Electrophoresis*. 2007. V. 28. № 17. P. 3129. <https://doi.org/10.1002/elps.200600783>
 94. Schwaiger H., Oefner P.J., Huber C., Grill E., Bonn G.K. Capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic chromatography of 4-aminobenzonitrile carbohydrate derivatives // *Electrophoresis*. 1994. V. 15. № 7. P. 941. <https://doi.org/10.1002/ELPS.11501501138>
 95. Andersen K.E., Bjerregaard C., Sørensen H. Analysis of reducing carbohydrates by reductive tryptamine derivatization prior to micellar electrokinetic capillary chromatography // *J. Agric. Food Chem.* 2003. V. 51. № 25. P. 7234. <https://doi.org/10.1021/jf030329e>
 96. Jager A.V., Tonin F.G., Tavares M.F.M. Comparative evaluation of extraction procedures and method validation for determination of carbohydrates in cereals and dairy products by capillary electrophoresis // *J. Sep. Sci.* 2007. V. 30. P. 586. <https://doi.org/10.1002/jssc.200600370>
 97. Soria A.C., Brokl M., Sanz M.L., Martínez-Castro I. Sample preparation for the determination of carbohydrates in food and beverages / *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*. V. 4 / Ed. Pawliszyn J. Amsterdam: Elsevier, 2012. P. 213. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381373-2.10135-8>
 98. Sanz M.L., Martínez-Castro I. Recent developments in sample preparation for chromatographic analysis of carbohydrates // *J. Chromatogr. A*. 2007. V. 1153. № 1–2. P. 74. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2007.01.028>
 99. Бирюлин С.И., Посокина Н.Е., Тришканева М.В. Выделение углеводов из растительного сырья и их идентификация с применением капиллярного электрофореза // Овощи России. 2019. Т. 5. С. 84. <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2019-5-84-87>
 100. Norikoshi R., Imanishi H., Ichimura K. A simple and rapid extraction method of carbohydrates from petals or sepals of four floricultural plants for determination of their content // *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 2008. V. 77. № 3. P. 289.
 101. Wanek W., Heintel S., Richter A. Preparation of starch and other carbon fractions from higher plant leaves for stable carbon isotope analysis // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2001. V. 15. № 14. P. 1136. <https://doi.org/10.1002/RCM.353>

102. *Hassan E.S.R.E., Mutelet F., Moïse J.C.* From the dissolution to the extraction of carbohydrates using ionic liquids // *RSC Adv.* 2013. V. 3. № 43. P. 20219. <https://doi.org/10.1039/C3RA42640H>
103. *Fishman M.L., Chau H.K., Cooke P.H., Yadav M.P., Hotchkiss A.T.* Physico-chemical characterization of alkaline soluble polysaccharides from sugar beet pulp // *Food Hydrocoll.* 2009. V. 23. № 6. P. 1554. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2008.10.015>
104. *Montañés F., Fornari T., Stateva R.P., Olano A., Ibáñez E.* Solubility of carbohydrates in supercritical carbon dioxide with (ethanol + water) cosolvent // *J. Supercrit. Fluids.* 2009. V. 49. № 1. P. 16. <https://doi.org/10.1016/J.SUPFLU.2008.11.014>
105. *Montañés F., Olano A., Reglero G., Ibáñez E., Fornari T.* Supercritical technology as an alternative to fractionate prebiotic galactooligosaccharides // *Sep. Purif. Technol.* 2009. V. 66. № 2. P. 383. <https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2008.12.006>
106. *Guan J., Yang F.Q., Li S.P.* Evaluation of carbohydrates in natural and cultured *Cordyceps* by pressurized liquid extraction and gas chromatography coupled with mass spectrometry // *Molecules.* 2010. V. 15. № 6. P. 4227. <https://doi.org/10.3390/molecules15064227>
107. *Cai K., Hu D., Lei B., Zhao H., Pan W., Song B.* Determination of carbohydrates in tobacco by pressurized liquid extraction combined with a novel ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction method // *Anal. Chim. Acta.* 2015. V. 882. P. 90. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2015.03.013>
108. *Ruiz-Matute A.I., Ramos L., Martínez-Castro I., Sanz M.L.* Fractionation of honey carbohydrates using pressurized liquid extraction with activated charcoal // *J. Agric. Food Chem.* 2008. V. 56. № 18. P. 8309. <https://doi.org/10.1021/JF8014552>
109. *Al-Suod H., Ratiu I.A., Görecki R., Buszewski B.* Pressurized liquid extraction of cyclitols and sugars: Optimization of extraction parameters and selective separation // *J. Sep. Sci.* 2019. V. 42. № 6. P. 1265. <https://doi.org/10.1002/JSSC.201801269>
110. *de Villiers A., Lynen F., Crouch A., Sandra P.* Development of a solid-phase extraction procedure for the simultaneous determination of polyphenols, organic acids and sugars in wine // *Chromatographia.* 2004. V. 59. № 7–8. P. 403. <https://doi.org/10.1365/S10337-004-0204-1>
111. *Megherbi M., Herbreteau B., Faure R., Dessalces G., Grenier-Loustalot M.F.* Solid phase extraction of oligo- and polysaccharides; Application to maltodextrins and honey qualitative analysis // *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2008. V. 31. № 7. P. 1033. <https://doi.org/10.1080/10826070801924915>
112. *Barnes J., Tian L., Loftis J., Hiznay J., Comhair S., Lauer M., Dweik R.* Isolation and analysis of sugar nucleotides using solid phase extraction and fluorophore assisted carbohydrate electrophoresis // *MethodsX.* 2016. V. 3. P. 251. <https://doi.org/10.1016/J.MEX.2016.03.010>
113. *Morales-Cid G., Simonet B.M., Cárdenas S., Valcárcel M.* On-capillary sample clean up method for the electrophoretic determination of carbohydrates in juice samples // *Electrophoresis.* 2007. V. 28. P. 1557. <https://doi.org/10.1002/elps.200600518>
114. *Hernández O., Ruiz-Matute A.I., Olano A., Moreno F.J., Sanz M.L.* Comparison of fractionation techniques to obtain prebiotic galactooligosaccharides // *Int. Dairy J.* 2009. V. 19. № 9. P. 531. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2009.03.002>
115. *Ruiz-Matute A.I., Soria A.C., Martínez-Castro I., Sanz M.L.* A new methodology based on GC-MS to detect honey adulteration with commercial syrups // *J. Agric. Food Chem.* 2007. V. 55. № 18. P. 7264. <https://doi.org/10.1021/JF070559J>
116. *Amelung W., Cheshire M.V., Guggenberger G.* Determination of neutral and acidic sugars in soil by capillary gas-liquid chromatography after trifluoroacetic acid hydrolysis // *Soil Biol. Biochem.* 1996. V. 28. № 12. P. 1631. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(96\)00248-9](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(96)00248-9)
117. *Santos S.M., Duarte A.C., Esteves V.I.* Development and application of capillary electrophoresis based method for the assessment of monosaccharide in soil using acid hydrolysis // *Talanta.* 2007. V. 72. P. 165. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.10.009>
118. *Xiao W., Chen X., Zhang Y., Qu T., Han L.* Product analysis for microwave-assisted methanolysis of lignocellulose // *Energy and Fuels.* 2016. V. 30. № 10. P. 8246. <https://doi.org/10.1021/ACS.ENERGYFUELS.6B01186>
119. *Arnous A., Meyer A.S.* Quantitative prediction of cell wall polysaccharide composition in grape (*Vitis vinifera* L.) and apple (*Malus domestica*) skins from acid hydrolysis monosaccharide profiles // *J. Agric. Food Chem.* 2009. V. 57. № 9. P. 3611. <https://doi.org/10.1021/JF900780R>
120. *Olennikov D.N., Rokhin A.V., Tankhaeva L.M.* Lamiaceae carbohydrates. V. Structure of glucoarabinogalactan from *Scutellaria baicalensis* // *Chem. Nat. Compd.* 2008. V. 44. № 5. P. 560. <https://doi.org/10.1007/S10600-008-9148-2>
121. *Harvey D.J.* Derivatization of carbohydrates for analysis by chromatography; electrophoresis and mass spectrometry // *J. Chromatogr. B.* 2011. V. 879. P. 1196. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.11.010>
122. *Yu R.B., Dalman N.A.V., Wuethrich A., Quirino J.P.* Derivatization of carbohydrates for analysis by liquid chromatography and capillary electrophoresis / *Carbohydrate Analysis by Modern Liquid Phase Separation Techniques* / Ed. El Rassi Z. Amsterdam: Elsevier, 2021. P. 1. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821447-3.00019-6>
123. *Campa C., Rossi M.* Capillary electrophoresis of neutral carbohydrates mono-, oligosaccharides, and glycosides / *Capillary Electrophoresis* / Ed. Schmitt-Kopplin P. Groningen: Springer, 2008. P. 247. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-376-9_11
124. *Dupont A.L., Egasse C., Morin A., Vasseur F.* Comprehensive characterisation of cellulose- and lignocellulose-degradation products in aged papers: Capillary zone electrophoresis of low-molar mass organic acids, carbohydrates, and aromatic lignin derivatives // *Carbohydr. Polym.* 2007. V. 68. № 1. P. 1. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.07.005>

125. *Sjöberg J., Adorjan I., Rosenau T., Kosma P.* An optimized CZE method for analysis of mono- and oligomeric aldose mixtures // *Carbohydr. Res.* 2004. V. 339. № 11. P. 2037.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2004.06.003>
126. *Sato K., Sato K., Okubo A., Yamazaki S.* Optimization of derivatization with 2-aminobenzoic acid for determination of monosaccharide composition by capillary electrophoresis // *Anal. Biochem.* 1998. V. 262. № 2. P. 195.
<https://doi.org/10.1006/abio.1998.2798>
127. *Windwarder M., Figl R., Svehla E., Moscai R., Farcet J.-B., Staudacher E., Kosma P., Altmann F.* 'Hypermethylation' of anthranilic acid-labeled sugars confers the selectivity required for liquid chromatography-mass spectrometry // *Anal. Biochem.* 2016. V. 514. P. 24.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.09.008>
128. *Lorenz D., Janzon R., Saake B.* Determination of uronic acids and neutral carbohydrates in pulp and biomass by hydrolysis, reductive amination and HPAEC-UV // *Holzforschung.* 2017. V. 71. № 10. P. 767.
<https://doi.org/10.1515/hf-2017-0020>
129. *Vojvodić-Cebin A., Komes D., Ralet M.C.* Development and validation of HPLC-DAD method with pre-column PMP derivatization for monomeric profile analysis of polysaccharides from agro-industrial wastes // *Polymers.* 2022. V. 14. № 3. P. 544.
<https://doi.org/10.3390/polym14030544>
130. *Lattová E., Perreault H.* Method for investigation of oligosaccharides using phenylhydrazine derivatization / *Glycomics* / Eds. Packer N.H., Karlsson N.G. Groningen: Springer, 2009. P. 65.
https://doi.org/10.1007/978-1-59745-022-5_5
131. *Nguyen D.T., Lerch H., Zemann A., Bonn G.* Separation of derivatized carbohydrates by co-electroosmotic capillary electrophoresis // *Chromatographia.* 1997. V. 46. № 3. P. 113.
<https://doi.org/10.1007/BF02495320>
132. *Kwon H., Kim J.* High performance liquid chromatography of mono- and oligosaccharides derivatized with p-aminobenzoic ethyl ester on a c18-bonded silica column // *J. Liq. Chromatogr.* 1995. V. 18. № 7. P. 1437.
<https://doi.org/10.1080/10826079508010422>
133. *Blanco D., Muro D., Gutiérrez M.D.* A comparison of pulsed amperometric detection and spectrophotometric detection of carbohydrates in cider brandy by liquid chromatography // *Anal. Chim. Acta.* 2004. V. 517. № 1–2. P. 65.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.04.056>
134. *Evangelista R.A., Liu M.S., Chen F.T.A.* Characterization of 9-aminopyrene-1,4,6-trisulfonate derivatized sugars by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection // *Anal. Chem.* 1995. V. 67. № 13. P. 2239.
<https://doi.org/10.1021/ac00109a051>
135. *Albrecht S., Schols H.A., van den Heuvel E.G.H.M., Voragen A.G.J., Gruppen H.* CE-LIF-MSn profiling of oligosaccharides in human milk and feces of breast-fed babies // *Electrophoresis.* 2010. V. 31. № 7. P. 1264.
<https://doi.org/10.1002/elps.200900646>
136. *Chen F.T.A., Dobashi T.S., Evangelista R.A.* Quantitative analysis of sugar constituents of glycoproteins by capillary electrophoresis // *Glycobiology.* 1998. V. 8. № 11. P. 1045.
<https://doi.org/10.1093/GLYCOB/8.11.1045>
137. *Chiesa C., Horváth C.* Capillary zone electrophoresis of malto-oligosaccharides derivatized with 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acid // *J. Chromatogr. A.* 1993. V. 645. № 2. P. 337.
[https://doi.org/10.1016/0021-9673\(93\)83394-8](https://doi.org/10.1016/0021-9673(93)83394-8)
138. *Larsson M., Sundberg R., Folestad S.* On-line capillary electrophoresis with mass spectrometry detection for the analysis of carbohydrates after derivatization with 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acid // *J. Chromatogr. A.* 2001. V. 934. № 1–2. P. 75.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01274-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01274-2)
139. *Sato K., Sato K., Okubo A., Yamazaki S.* Determination of monosaccharides derivatized with 2-aminobenzoic acid by capillary electrophoresis // *Anal. Biochem.* 1997. V. 251. № 1. P. 119.
<https://doi.org/10.1006/ABIO.1997.2266>
140. *Saddic G.N., Dhume S.T., Anumula K.R.* Carbohydrate composition analysis of glycoproteins by HPLC using highly fluorescent anthranilic acid (AA) tag / *Post-translational Modifications of Proteins* / Ed. Kannicht C. Groningen: Springer, 2008. P. 215.
https://doi.org/10.1007/978-1-60327-084-7_15
141. *Stepan H., Staudacher E.* Optimization of monosaccharide determination using anthranilic acid and 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone for gastropod analysis // *Anal. Biochem.* 2011. V. 418. № 1. P. 24.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.07.005>
142. *Wang W., Wang Y., Chen F., Zheng F.* Comparison of determination of sugar-PMP derivatives by two different stationary phases and two HPLC detectors: C18 vs. amide columns and DAD vs. ELSD // *J. Food Compos. Anal.* 2021. V. 96. Article 103715.
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103715>
143. *Fan B., Li T., Song X., Wu C., Qian C.* A rapid, accurate and sensitive method for determination of monosaccharides in different varieties of *Osmanthus fragrans* Lour by pre-column derivatization with HPLC-MS/MS // *Int. J. Biol. Macromol.* 2019. V. 125. P. 221.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.033>
144. *Rajendiran V., El Rassi Z.* Reversed-phase capillary electrochromatography of pre-column derivatized mono- and oligosaccharides with three different ultraviolet absorbing tags // *J. Chromatogr. A.* 2022. V. 1671. Article 463025.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463025>
145. *Alyuruk H., Kontas A., Altay O.* A comparative study of two HPLC methods for dissolved monosaccharide analysis in seawater using 2-amino benzamide and 2-amino pyrazine as pre-column derivatization reagents // *Talanta.* 2021. V. 234. Article 122629.
<https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2021.122629>

УДК 543.635

МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ГРУППОВОГО АНАЛИЗА ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

© 2023 г. В. И. Вершинин*

Омский государственный университет им. Ф.М. Достоевского
просп. Мира, 55а, Омск, 644077 Россия

*e-mail: vyvershinin@yandex.ru

Поступила в редакцию 14.07.2022 г.

После доработки 19.08.2022 г.

Принята к публикации 22.08.2022 г.

В объектах сложного состава обычно присутствуют однотипные органические соединения, молекулы которых различаются по составу и строению, но обладают общими признаками (структурными, функциональными, химико-аналитическими и др.), которые не характерны для других соединений. Суммарные содержания однотипных соединений являются показателями группового состава исследуемого объекта. Методики их определения широко применяются в контрольно-аналитических и исследовательских лабораториях. К концу XX века сложился особый вид химического анализа — *групповой анализ* (ГА). Важным частным случаем ГА предлагается считать *структурно-групповой анализ* (СГА). К сожалению, методологические и метрологические аспекты ГА и СГА недостаточно изучены. Не сложилась в этой области и общепризнанная система терминов. В статье рассмотрены терминология и история ГА, принципы формирования групп и способы оценки суммарных содержаний. Выделены нерешенные проблемы ГА. Это — неопределенность качественного состава групп, затрудняющая интерпретацию результатов группового анализа, а также внутригрупповая селективность и неаддитивность аналитических сигналов. Рассмотрены возможные пути решения этих проблем.

Ключевые слова: групповой анализ, структурно-групповой анализ, принципы формирования групп, расчеты суммарных содержаний, интегральные показатели, многомерные градуировки, неопределенность результатов анализа.

DOI: 10.31857/S0044450223020147, EDN: CDSVHS

Групповой анализ (ГА) — один из видов химического анализа. Он применяется в аналитическом контроле объектов окружающей среды, биообъектов, нефтепродуктов и пищевых продуктов, а также при исследовании состава других объектов. В ходе ГА измеряют обобщенные сигналы однотипных органических соединений, присутствующих в пробе, и рассчитывают суммарное содержание этих соединений (показатель группового состава). Интерес к ГА в последние годы возрос. Тем не менее методологические и метрологические аспекты ГА слабо изучены. Этот вид анализа не рассматривается в учебной литературе (кроме учебника [1]) и недостаточно известен многим аналитикам. В этой области не выработана даже единая терминология.

Цели настоящей статьи — предложения по терминологии ГА, обзор истории и основных вариантов ГА, выявление проблем, возникающих при разработке методик ГА, и обсуждение возможных путей их решения.

ПРЕДЛОЖЕНИЯ ПО ТЕРМИНОЛОГИИ

В общей методологии науки групповым анализом называют способ исследования сложных систем, включающий их мысленное расчленение на широкие группы компонентов [2]. Компоненты единичной группы должны иметь тождественные или близкие значения некоторых признаков (дескрипторов), отличаясь по ним от компонентов других групп. Представители частных наук (математики, психологи, социологи и др.) по-разному конкретизируют понятие “групповой анализ”. В рамках аналитической химии предлагается считать групповым анализом (*group analysis*) *совокупность методик обнаружения и/или суммарного количественного определения органических соединений, имеющих некоторые общие признаки*. Эти соединения следует считать компонентами искомой группы. Единичный объект анализа обычно содержит не все компоненты искомой группы, а наборы компонентов, присутствующих в разных объектах (пробах), могут сильно различаться.

Качественный групповой анализ — это проверка присутствия каких-либо компонентов группы без их опознания. Методики обнаружения некоторых групп органических соединений были созданы еще в XIX веке (проба Бейльштейна, реакция серебряного зеркала и др.). Теперь качественный ГА применяют редко, далее он рассматриваться не будет.

Количественный групповой анализ — это определение суммарных содержаний одной или нескольких групп однотипных соединений, входящих в состав исследуемого объекта [3]. Так, в сыворотке крови определяют суммарное содержание белков; в пищевых продуктах — суммарные содержания белков, жиров и углеводов, а в нефтепродуктах — суммарные содержания алканов, аренов, наftenов и олефинов [4]. Внутри этих широких групп выделяют более узкие совокупности однотипных соединений. Так, кроме суммарного содержания всех белков, в биообъектах дополнительно определяют суммарные содержания альбуминов и глобулинов. Внутри группы глобулиновых белков выделяют подгруппу гамма-глобулинов и т.п. Таким образом, показатели группового состава исследуемых объектов можно определять, нормировать и контролировать на разных иерархических уровнях.

В качестве показателей группового состава часто используют не суммарные содержания однотипных соединений, а их приблизительные оценки — интегральные показатели (ИП). Термин *интегральный показатель (total index)* означает приблизительную оценку суммарного содержания однотипных соединений, найденную путем пересчета их обобщенного аналитического сигнала на некоторое стандартное вещество. Примеры ИП: фенольный и углеводородный индексы, показатели ХПК и БПК, кислотное и бромное число, “общий белок” и др. [1, 5]. Как будет показано далее, измерение интегральных показателей — наиболее распространенный, но далеко не единственный способ проведения ГА.

Следует оговориться, что интегральными показателями часто называют и величины, не связанные с групповым химическим анализом. Примером могут быть интегральные показатели экологической эффективности [6].

Термин *групповой анализ* не ограничен ни природой объектов анализа, ни природой аналитов, ни природой дескрипторов. Однотипные соединения можно объединять в группы и отличать от компонентов других групп как по структурным, так и по функциональным, химико-аналитическим и другим признакам. Следует признать, что термин *групповой анализ* аналитики используют довольно редко. Более популярен термин “*структурно-групповой анализ*” (СГА, *structural group analysis*), хотя по определению он ограничен при-

родой дескрипторов (компоненты группы должны иметь близкую структуру молекул [7]). Термин СГА преимущественно используют в публикациях и нормативных документах, относящихся к изучению состава нефти и нефтепродуктов. Однако определение фракционного состава нефтепродуктов к СГА не относят [8], поскольку любая фракция содержит соединения с близкими температурами кипения, но несходной структурой молекул. В ходе группового анализа белков или гуминовых веществ группы однотипных соединений также выделяют не по структуре соответствующих молекул, а по свойствам аналитов (растворимости и/или электрофоретической подвижности) [9].

Понятия ГА и СГА многие специалисты различают [8], а другие считают синонимами [7]. Вероятно, *структурно-групповой анализ следует считать одним из видов группового анализа, его частным случаем*. Предлагается следующая дефиниция: СГА — это *определение суммарных содержаний одной или нескольких групп соединений, имеющих общие структурные признаки, входящих в состав исследуемого объекта и совместно формирующих аналитические сигналы*.

Надо отметить, что иногда термин СГА используют в более широком и даже в совершенно ином смысле, не связывая его с определением показателей группового состава. Примером могут быть исследования структуры и свойств функциональных групп ионообменников [10]. Иногда же термин СГА неоправданно сужают, сводя его к одному из способов расчета показателей группового состава, а именно к расчету доли атомов углерода, входящих во фрагменты заданного типа [2, 8].

К групповому анализу близок еще один вид анализа органических веществ, а именно *функциональный анализ (ФА, functional group analysis)*. Как указывал Ю.А. Клячко [11], в рамках ФА решают две основные задачи: 1) подтверждение предполагаемого строения некоторого соединения; 2) определение соединений известного строения в смеси продуктов органического синтеза. Основное внимание всегда уделялось первой задаче [12, 13]. Для этого опознавали функциональные группы, входящие в состав молекул синтезированного соединения, и количественно определяли их. К ГА эта задача не имеет отношения, так как объектами ГА являются не индивидуальные соединения, а их многокомпонентные смеси. Решая же вторую задачу, специалисты в области ФА разрабатывали методики определения *единичных* соединений, содержащих некоторую функциональную группу. Как правило, суммарное содержание этих соединений не определяли. Поэтому трудно согласиться с авторами, считающими ФА частью СГА [7] или отождествляющими эти виды анали-

Таблица 1. Классификация видов химического анализа по природе объектов определения [15]

Вид анализа	Объекты определения (аналиты)	Примеры	Области преимущественного применения
Изотопный	Атомы с заданными значениями заряда ядра и массового числа (изотопы)	^{137}Cs , ^{235}U	Атомная энергетика, контроль загрязнения окружающей среды, медицина, археология
Элементный	Атомы с заданными значениями заряда ядра (элементы)	Cs, Sr, U, Cr, Fe, Hg	Повсеместно
Вещественный	Атомы (ионы) элемента в заданной форме (степени окисления)	Cr(III), Fe^{2+} , сера сульфатная	Химическая технология, экомониторинг, металлургия, геология и др.
Молекулярный	Молекулы с заданной структурой	Бензол, глюкоза, этанол	Химическая технология, медицина, фармакология, экомониторинг и др.
Групповой (включая СГА)	Совокупности разных молекул с заданным набором признаков	Арены, смолы, углеводы, ПАВ, фенольные антиоксиданты	Нефтепереработка, пищевая промышленность, медицина, экологический мониторинг
Фазовый	Отдельная фаза в составе твердого вещества	Графит, кварц	Металлургия, геология, технология строительных материалов

за [14]. Вероятно, следует считать ФА особым видом молекулярного анализа, принципиально отличающимся от любых вариантов ГА.

Все изложенное выше указывает на необходимость обсуждения русскоязычной терминологии ГА и выработки рекомендаций Научного совета РАН по аналитической химии.

Не менее важно понять место ГА в общей структуре видов и методов анализа. В конце XX века сформировалась классификация видов анализа, учитывающая природу аналитов (см. учебники [14, 15]). В рамках этой классификации основные виды анализа отвечают разным уровням структурирования материи (табл. 1). Если в ходе молекулярного анализа определяют одинаковые молекулы, то в групповом – совокупности *разных* молекул, имеющих некоторые общие признаки. Таким образом, ГА принципиально отличен от молекулярного анализа. Как отдельный вид анализа, ГА имеет свой набор *методов*, оптимальных или хотя бы пригодных для измерения обобщенных сигналов неидентичных молекул. Здесь не нужны высокоселективные методы (масс-спектрометрические, ферментативные и т. п.). Подходят малоселективные методы, особенно спектрометрия в ИК-, УФ- или видимой области. Пригодны также гравиметрия, титриметрия, кондуктометрия, рефрактометрия и некоторые другие методы.

Как отдельный вид анализа, групповой анализ должен иметь собственные теоретические осно-

вы. Теория ГА только создается, но уже ясно, что ее предметами должны быть: формирование групп однотипных соединений, измерение обобщенных сигналов, расчеты суммарных содержаний, источники неопределенности результатов и способы ее снижения [5]. В рамках молекулярного анализа эти вопросы не рассматривались, так как для раздельного определения индивидуальных органических соединений они неактуальны.

ИСТОРИЯ ГРУППОВОГО АНАЛИЗА

История ГА началась с попыток изучения состава минералов и природных вод методом фракционной кристаллизации (Р. Бойль, Т. Бергман). Раствор пробы поочередно обрабатывали реагентами-осадителями, в осадок переходили смеси однотипных соединений [16]. Взвешивание этих осадков позволило бы установить групповой состав исследуемых объектов. Однако Г. Розе, К.Р. Фрезениус и другие аналитики XIX века рассматривали совместное выделение однотипных веществ (в частности, сульфидов) лишь как одну из стадий качественного элементного анализа. Суммарные содержания разных неорганических веществ или разных элементов количественно определяли очень редко. Групповой анализ изначально развивался как инструмент исследования состава многокомпонентных органических веществ. Необходимость ГА была осознана во второй половине XIX века в связи с началом

промышленной переработки нефти. Работы К. Шорлеммера, К. Энглера, Д.И. Менделеева, В.В. Марковникова, С.С. Наметкина и других химиков того времени позволили выделить и изучить множество индивидуальных углеводородов (УВ). Так, только из бензиновой фракции пенсильванской нефти были выделены десятки индивидуальных УВ, отнесенных к трем структурным группам (алканы, циклоалканы, арены). Стало понятно, что индивидуальный состав нефтепродуктов слишком сложен, а свойства индивидуальных УВ слишком близки, чтобы при переработке нефти руководствоваться данными о природе и содержании отдельных УВ. Нужно было развивать структурно-групповой анализ!

Первые методики СГА нефти и нефтепродуктов появились в начале XX века. Группы однотипных компонентов выделяли из узких фракций (дистиллятов), полученных при перегонке нефти. Одним из вариантов СГА стал так называемый SARA-анализ (Saturates, Aromatics, Resins, Asphaltenes), разработанный У. Ричардсоном в 1908 г. Для разделения указанных групп использовали различия в полярности и растворимости их компонентов [17]. Несколько ранее (1900) Д.Т. Дей предложил разделять группы УВ, учитывая различия в адсорбционных свойствах. Он пропускал дистилляты через колонки, заполненные фуллеровой землей, выделяя группы структурно-однотипных соединений, в частности ароматические УВ [16]. Со временем колоночную хроматографию стали применять не только для изучения группового состава нефтей, но и для контроля технологических процессов, связанных с получением и переработкой легких нефтепродуктов. Примером может быть стандартная методика определения группового состава бензинов методом ГЖХ [18]. Эту задачу решают и без разделения УВ, применяя экспрессные методики, основанные на регистрации и математической обработке спектра поглощения исследуемого бензина в ближней ИК-области [19].

Групповой анализ тяжелых нефтепродуктов представляет собой намного более трудную задачу. Дело в том, что тяжелые нефтепродукты содержат множество гибридных структур, одновременно включающих и бензольные кольца, и длинные цепочки метиленовых звеньев, и характерные для нафтенных пяти- или шестичленные циклы из тех же звеньев. Наличие гибридных структур мешает четкому разделению традиционных структурных групп. Поэтому еще в 1940-х годах были разработаны расчетные варианты СГА, не требующие разделения анализируемой фракции. Как правило, они были экспрессными, но не очень точными. Измеряя показатель преломления (n), плотность (d) и среднюю молекулярную массу (M), а затем подставляя результаты в заранее выведенные формулы, нефтяники вычисляли

показатели группового состава [20]. Теперь n - d - M анализ применяют редко, а для того чтобы охарактеризовать групповой состав тяжелых нефтепродуктов, вместо массовой доли тех или иных молекул рассчитывают массовые доли атомов углерода, входящих в те или иные структурные фрагменты молекул. Фрагментами могут быть бензольное кольцо, метильная или метиленовая группа и т.п. Определять содержания фрагментов можно методами ИК- или ЯМР-спектроскопии [21]. При этом не важно, в какие молекулы (обычные или гибридные) входит этот фрагмент. Найденные содержания фрагментов с близкой структурой суммируют и вычисляют доли атомов углерода, входящих в алифатические, алициклические и ароматические структуры [22]; они являются показателями структурно-группового состава тяжелых нефтепродуктов.

Групповой анализ других объектов развивался медленнее, чем анализ нефтепродуктов. Однотипные соединения в водах стали суммарно определять в 1940-х годах, а система аналитического контроля природных и сточных вод, включающая определение показателей группового состава, была сформирована лишь в 1960-х годах. Важную роль при этом сыграла деятельность Ю.Ю. Лурье [23]. Суммарные содержания кислот находили титриметрическим методом, выражая результат в моль-экв/л. Суммарные содержания легкоокисляемых органических соединений выражали в виде интегральных показателей ХПК или БПК. Разные группы токсикантов в водах определяли спектрометрическими методами [24]. Так, однотипные фенолы переводили в окрашенные соединения, применяя групповые фотометрические реагенты (обычно 4-аминоантипирин), а затем измеряли оптическую плотность раствора в видимой области. Суммарное содержание УВ находили преимущественно методом ИК-спектроскопии. Лишь в США сумму УВ в водах обычно определяли хроматографическими методами [25].

Большая группа исследователей разрабатывала методики ГА биообъектов. Еще в 1926 г. был разработан турбидиметрический метод определения суммарного содержания белков в биологических жидкостях [26], основанный на взаимодействии белков с сульфосалициловой кислотой (ССК). Простой и высокочувствительный метод ССК до сих пор применяют в практике, хотя он имеет важный недостаток: разные белки (альбумины, глобулины, липопротеины и т.п.) определяются с различной чувствительностью. В частности, чувствительность определения альбуминов вчетверо выше, чем глобулинов. Из-за внутригрупповой селективности сигналов результат ГА (показатель "общий белок") зависит от соотношения альбуминов и глобулинов, а оно непредсказуемо меняется от пробы к пробе. Со временем общий белок стали определять, ис-

пользуя менее селективные реагенты, например пирогалловый красный [27]. Внутригрупповая селективность сигналов, с которой аналитики впервые столкнулись при определении показателя “общий белок”, позднее была выявлена и в других вариантах ГА [28].

В конце XX века аналитики стали уделять большое внимание оценке суммарного содержания антиоксидантов (АО) в пищевых продуктах [29, 30]. Вместо суммарного содержания АО обычно определяют разные ИП, называя их показателями обобщенной антиоксидантной активности (или емкости). Исследования в этой области многочисленны и охватывают множество объектов. Так, только одна группа авторов измерила показатели антиоксидантной активности более трех тысяч пищевых продуктов [31]. Антиоксиданты в целом или отдельные группы АО (например, тиолы или флавоноиды) определяют, используя различные групповые реагенты. Особое внимание уделяется определению суммарного содержания фенольных АО в винах, чае и фруктовых соках. Разработаны стандартные методики определения отдельных групп АО, например полифенолов в чае [32]. Однако нормативные значения ИП для большинства продуктов не установлены, и в пищевых лабораториях суммарные содержания АО определяют лишь эпизодически.

Отметим, что методики ГА в XX веке разрабатывали не столько профессиональные аналитики, сколько инженеры-нефтяники, гидрохимики, биохимики, медики и специалисты по пищевой химии; каждый из них занимался лишь “своими” объектами, не выявляя общие закономерности ГА. Многие аналитики считали, что методами ГЖХ и ВЭЖХ в будущем можно будет быстро и легко определять индивидуальный состав любых сложных объектов, а потому групповой анализ развивать незачем. Однако к концу XX века число известных органических соединений настолько выросло, а свойства многих из них оказались настолько близкими, что их раздельное определение стало нецелесообразным, а иногда и невозможным (например, из-за таутомерии). Выходом стал групповой анализ. По оценкам специалистов, методики ГА составляют около 20% от общего числа методик анализа [33]. Чаще всего ГА проводят в природоохранных и клинико-диагностических лабораториях. Значимость ГА постепенно возрастает [34]. Однако замена покомпонентного анализа групповым никогда не станет полной: уникальные по свойствам вещества (суперэкоотоксиканты, ферменты и др.) всегда надо будет определять отдельно от их аналогов.

ПРИНЦИПЫ ФОРМИРОВАНИЯ ГРУПП

Историческое развитие ГА привело к формированию множества групп совместно определяемых соединений (табл. 2) и еще большего количества показателей группового состава. Однако индивидуальный состав большинства таких групп не регламентирован, а иногда и вовсе неизвестен (в частности, при определении АО). *Неопределенность индивидуального состава групп* является серьезной методологической проблемой. Аналитик должен знать, какие именно соединения он может, а какие — не может суммарно определять по данной методике! Судить об этом по названию группы нельзя, нередко оно носит условный характер (например, “антиоксиданты”) или не отвечает фактическому составу группы. Так, при спектрофотометрическом определении суммы фенолов в водах с применением 4-аминоантипирина обобщенный сигнал формируют далеко не все индивидуальные фенолы, зато вместе с фенолами определяются некоторые амины [35, 36]. Как правило, в нормативных документах (ГОСТы, ПДК и т.п.) подобная информация не приводится. Для выполнения анализа по готовой методике она очень нужна, но совершенно необходима для правильной интерпретации результатов ГА. Естественно, перечень компонентов группы либо четкие правила ее формирования должны быть установлены до разработки соответствующей методики ГА.

Возможны три разных подхода к формированию групп, различающиеся по природе учитываемых дескрипторов (табл. 3).

Первый подход (учет структурных признаков) позволяет легко сформировать перечень компонентов группы. Надо только заранее установить правила отнесения компонента к той или иной группе при наличии в молекуле нескольких разных заместителей. Если один аналитик будет относить хлорфенолы к группе фенолов, другой — к группе хлорпроизводных, а третий — выделять хлорфенолы в отдельную группу, то результаты ГА окажутся несопоставимыми.

Второй подход предполагает учет потребительских свойств компонентов группы. Речь идет о признаках, связанных с применением, реакционной способностью или биологической активностью веществ. Так, для медиков важно выявить и определить сумму однотипных токсикантов или лекарственных веществ, а для технологов — вещества с близкими температурами кипения или близкими значениями растворимости.

Третий подход — это объединение компонентов в группы по их химико-аналитическим свойствам. Этот подход применяют весьма часто, поскольку соответствующую методику ГА легко разработать. В одну группу можно включить все вещества, осаждаемые некоторым реагентом при некотором значении pH (этот подход применял

Таблица 2. Традиционные группы совместно определяемых органических веществ [1]

Объекты анализа	Основные группы объектов определения
Нефть и нефтепродукты	Алканы (парафины), циклоалканы (нафтены), арены, полиарены, олефины, смолы, асфальтены, серосодержащие соединения, кислоты, фракции по температурам кипения (бензин, керосин) и др.
Природные и сточные воды	Органические вещества, нефтепродукты (углеводороды), фенолы, ПАВ, гуминовые кислоты, взвешенные вещества и др.
Пищевые продукты	Белки, жиры, углеводы, кислоты, антиоксиданты, отдельные группы антиоксидантов (флавоноиды, тиолы и др.), экстрактивные вещества
Биообъекты	Белки, отдельные группы белков (альбумины, глобулины и т.п.), редуцирующие сахара, липиды, триглицериды, холестерин (суммарно), билирубин (суммарно), антиоксиданты и др.

Таблица 3. Основные подходы к формированию групп органических веществ

Учитываемые признаки компонентов	Примеры признаков	Примеры групп	Область преимущественного применения
Структурные	Наличие и число двойных связей, циклов и функциональных групп, разветвленность или линейность цепей	Олефины, <i>n</i> -алканы, полиарены, моносахариды, триглицериды	Систематизация веществ в науке и в образовании, СГА нефтепродуктов, геология, химическая технология, клинический анализ
Потребительские (функциональные)	Растворимость, токсичность (ПДК), температура кипения, каталитическая или лекарственная активность, теплотворная способность	Антиоксиданты, токсиканты, анальгетики, редуцирующие сахара, бензин и другие фракции нефти, ПАВ, пестициды	Аналитический контроль в промышленности, клинический анализ, безопасность жизнедеятельности, экомониторинг и др.
Химико-аналитические	Спектральные характеристики, редокс-потенциалы, характеристики удерживания, летучесть, экстрагируемость, сорбируемость и др.	Нефтепродукты, гуминовые вещества, липиды, летучие органические соединения (ЛОС)	Аналитический контроль, экомониторинг

еще Фрезениус). Можно объединить в одну группу все вещества, поглощающие свет при некоторой длине волны, независимо от строения их молекул, а затем рассчитать их суммарное содержание.

Абсолютизация какого-либо одного подхода нежелательна. Каждый из них имеет свои ограничения и недостатки. Так, вещества, однотипные в структурном отношении, нередко сильно различаются по потребительским свойствам, и данные о суммарном содержании структурно однотипных соединений оказываются невостребованными. Примером может быть группа полиаренов. Биологическая активность разных полиаренов столь различна, что в работах по канцерогенезу и экомониторингу определяют лишь некоторые (“приоритетные”) полиарены, но не сумму всех полиаренов [37]. Напротив, вещества, родствен-

ные по канцерогенной активности или токсичности, могут сильно различаться по строению и химико-аналитическим свойствам. Это ведет к систематическим погрешностям при определении суммарного содержания компонентов такой группы. Примером может быть сформированная в рамках второго подхода широкая группа антиоксидантов. Ни один из групповых реагентов не реагирует со *всеми* АО, так как строение молекул и химико-аналитические свойства разных АО сильно различаются [29, 30]. По методу ORAC в основном определяются АО, реагирующие с пероксидными радикалами (так называемые НАТ-антиоксиданты), а методы DPPH и CUPRAC чувствительны к ЕТ-антиоксидантам (сильным восстановителям) [38].

Объединение в одну группу веществ с одинаковыми химико-аналитическими свойствами без

учета строения их молекул и потребительских свойств также нежелательно. Это затрудняет интерпретацию результатов ГА. Ярким примером является определение суммарного содержания нефтепродуктов в природных водах. Группа “нефтепродукты” была сформирована именно в рамках третьего подхода. Еще в 1968 г. было принято решение считать “нефтепродуктами” сумму неполярных и малополярных УВ, растворимых в гексане и не сорбирующихся на оксиде алюминия [39, 40]. В такую группу входят и сильные токсиканты (бензол), и малотоксичные УВ (алканы). Следовательно, по величине ИП “нефтепродукты” (*hydrocarbon index*) нельзя судить о загрязнении водоема токсичными УВ, а это очень важно. Неслучайно во многих странах в последние годы отказались от определения этого ИП, заменив его определением отдельных групп УВ [41]. В частности, нужна информация о содержании наиболее опасных УВ (моноциклических аренов C_6 – C_9). Их определяют как по отдельности [42], так и суммарно [43]. Компоненты этой узкой группы имеют и сходную структуру, и близкие значения ПДК, и сходные спектры поглощения. При формировании подобных групп следует учитывать все признаки предполагаемых компонентов – и структурные, и потребительские, и химико-аналитические. Кроме того, обязательно следует учитывать ожидаемый состав исследуемых объектов.

В регламентации индивидуального состава новой группы однотипных веществ должны принимать участие не только аналитики, но и представители организаций, заинтересованных в получении результатов ГА (например, экологи или технологи). Должны участвовать и те, кто устанавливает нормативы группового состава (например, значения ПДК) или выпускает стандартные образцы. Согласованный перечень компонентов группы или правила их отбора должны быть включены в нормативные документы (ГОСТы, МВИ, ПДК) и согласованы с международными организациями (ISO, СИТАС). Примером регламентации индивидуального состава групп могут быть официальные перечни наркотиков или лекарственных средств, хотя компоненты этих групп определяют порознь. К сожалению, разобщенность специалистов в области группового анализа, а также экономические и политические факторы в настоящее время препятствуют реализации изложенной выше идеальной схемы.

Набор совместно определяемых соединений не должен зависеть от того, каким методом будет определяться их суммарное содержание (при одинаковых пределах обнаружения). Это требование отвечает общеметрولوجическому принципу единства измерений. К сожалению, определение одного и того же показателя группового состава разными методами нередко ведет к достоверно раз-

личающимся результатам, иногда в 10–20 раз [44]. Основная причина в том, что обобщенные сигналы формируют не все, а лишь некоторые компоненты искомой группы, причем сигналы разного типа создаются разными компонентами. Так, при определении нефтепродуктов ИК-спектрометрическим методом обобщенный сигнал создается в основном алканами и циклоалканами; в рамках УФ-спектрометрии такой сигнал формируют арены, а в рамках флуориметрического метода – полиарены, которых в исследуемом объекте очень мало. Чтобы исключить возможность таких расхождений, надо не только заранее определить индивидуальный состав искомой группы, используя выбранные признаки, но и проверить, все ли компоненты искомой группы будут участвовать в формировании обобщенного сигнала. Если метод, обеспечивающий такое участие, найти не удастся, придется определять компоненты этой группы порознь, как определяют ферменты, витамины и многие другие вещества. Если же подходящий метод будет найден, надо проверить, насколько различна чувствительность определения отдельных компонентов группы; аддитивны ли сигналы этих компонентов; влияют ли на обобщенный сигнал посторонние вещества и т.п. Алгоритм проверки изложен в статье [35].

СПОСОБЫ ГРУППОВОГО АНАЛИЗА. ИНТЕГРАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ

Как уже отмечалось, исторически первым способом ГА было препаративное выделение и взвешивание искомой группы соединений. Этот способ широко применяют и сегодня. Так, чтобы определить нефтепродукты в сточных водах, их экстрагируют *n*-гексаном, а после осторожного удаления экстрагента смесь оставшихся УВ взвешивают [45]. К сожалению, подобные методики обычно являются длительными и трудоемкими.

Второй способ ГА предполагает разделение пробы вплоть до индивидуальных соединений (обычно методом ГЖХ). Затем пики всех компонентов пробы опознают, выбирают соединения искомой группы, измеряют их сигналы (площади пиков), рассчитывают содержания каждого из отобранных соединений и суммируют их. Примером являются методики экстракционно-хроматографического определения всех УВ [25] или моноциклических ароматических УВ [46] в водах. Однако такие методики длительны, трудоемки и дают избыточную информацию об индивидуальном составе пробы. Вероятно, методики этого типа лучше применять в качестве референтных – для проверки экспрессных методик ГА, не требующих разделения и опознавания компонентов группы.

Таблица 4. Некоторые интегральные показатели состава природных и сточных вод [5]

Показатель	Определяемые соединения	Способ измерения	Стандартное вещество
Фенольный индекс (<i>phenol index</i>)	Фенолы, реагирующие с 4-аминоантипирином	Вид	Простейший фенол (C_6H_5OH)
Нефтепродукты (<i>hydrocarbon index</i>)	Углеводороды (алканы, арены, нафтенy, олефины и др.)	ИК, УФ, ФЛ	Смесь Симарда, <i>n</i> -гептан и др.
АПАВ (<i>MBAS, anionic detergents</i>)	Алкилбензосульфаты и сульфозфиры, дающие экстрагируемые ассоциаты	Вид, ФЛ	Додецилсульфат натрия
КПАВ (<i>cationic detergents</i>)	Четвертичные аммониевые соединения, имидазолины и алкиламины	Вид, ФЛ	Цетилпиридиний хлорид
ХПК _{Cr} (<i>chemical oxygen demand</i>)	Соединения, реагирующие с $K_2Cr_2O_7$ в сильноокислой среде	Хроматометрия	Кислород, бифталат калия
Общая жесткость (<i>total hardness</i>)	Соли кальция, магния и других металлов, реагирующих с ЭДТА	Комплексонометрия	Ca^{2+} , CaO, $CaCO_3$
Соленость (<i>salinity</i>)	Сильные электролиты (соли)	Кондуктометрия	Стандартная смесь солей

Примечание: ФЛ – флуориметрия; УФ, ИК, ВИД – спектрометрия в УФ-, ИК- и видимой областях спектра.

Третьим способом ГА является измерение обобщенного аналитического сигнала с последующим прямым расчетом суммарного содержания компонентов группы. Таких методик немного, так как они должны соответствовать трем жестким условиям. А именно:

- обобщенный сигнал (A_{Σ}) аддитивно формируют все компоненты искомой группы;
- чувствительность определения всех компонентов искомой группы одинакова;
- величина A_{Σ} не зависит от природы и содержания посторонних веществ.

Пример методики, удовлетворяющей этим требованиям, – титриметрическое определение суммарной концентрации сильных кислот (в моль-экв/л). Другой пример: определение суммарного содержания УВ с помощью хроматографа, в колонке которого смесь разных УВ не разделяется [47]. После ввода пробы, ее испарения и отделения неуглеводородных компонентов единый пик всех УВ регистрируется пламенно-ионизационным детектором, одинаково чувствительным к любым УВ. Одномерную градуировку можно построить по любому УВ или по смеси разных УВ, это не повлияет на результат анализа.

Как уже отмечалось в начале статьи, наиболее распространенный способ ГА – это измерение интегральных показателей. Примером могут быть показатели состава природных и сточных вод, показанные в табл. 4. Более полный перечень ИП приведен в статье [33]. Для определения ИП чаще всего применяют разные варианты спектрометрии. Используют и другие инструментальные ме-

тоды, вплоть до ЯМР-спектрометрии [48]. В любом случае вначале измеряют обобщенный сигнал компонентов искомой группы (A_{Σ}) и, пользуясь заранее построенной одномерной градуировкой, рассчитывают суммарное содержание компонентов искомой группы (c^*), выраженное в пересчете на стандартное вещество ($X_{ст}$). Анализ объектов сложного состава с помощью ИП позволяет оценить суммарное содержание (c_{Σ}) компонентов группы и в тех случаях, когда их сигналы измеряются с существенно разной чувствительностью [28]. Надо лишь правильно подобрать $X_{ст}$. В качестве стандарта обычно используют один из компонентов искомой группы или смесь таких компонентов [35, 40, 49]. Если стандартное вещество $X_{ст}$ выбрано правильно, то результат анализа (c^*) окажется приблизительно равным действительной величине c_{Σ} . Так, ИП “фенольный индекс” должен быть приблизительно равен суммарному содержанию фенолов в данной пробе. На практике стандартные методики определения фенолов обычно приводят к сильно заниженным оценкам c_{Σ} [36, 50].

Следует обратить внимание на принципиальное различие между определением индивидуальных соединений и оценкой их суммарного содержания в виде ИП. В обоих случаях аналитик может измерять одни и те же сигналы (например, оптические плотности растворов), пользоваться теми же реагентами и приборами, строить такие же градуировки. Однако в метрологическом отношении результаты будут сильно различаться. Утверждение “фенольный индекс некоторой пробы равен 3 мг/л” вовсе не означает, что суммарное со-

Таблица 5. Способы нивелирования коэффициентов чувствительности при оценке суммарного содержания од- нотипных аналитов с помощью интегральных показателей [5]

Способ нивелирования	Метод анализа	Группа аналитов	Литература
Подбор группового реагента	Спектрофотометрия	Белки	[27, 52]
	Спектрофотометрия	Фенолы	[50]
Замена вспомогательного реагента	Спектрофотометрия	Антиоксиданты (полифенолы)	[53]
Введение дополнительного реагента	Спектрофотометрия	Белки	[52, 54]
	Вольтамперометрия	Тиолы	[55]
Изменение концентрационных условий	Спектротометрия в видимой области	Антиоксиданты (полифенолы)	[56]
Изменение времени экспозиции	Спектротометрия в видимой области	Белки, полифенолы	[56, 57]
Подбор длины волны	Спектрофотометрия	Фенолы	[58]
Измерение сигнала на нескольких длинах волн	ИК-спектротометрия	Углеводороды	[28, 59]
Измерение поглощения полихроматического излучения	ИК-фотометрия	Углеводороды	[60]
Измерение интегральной интенсивности сигнала	ИК-спектротометрия	Углеводороды	[61]
Переход к другому способу выражения концентраций	Рефрактометрия	Углеводы	[62]
	Спектротометрия в видимой области (FRAP)	Антиоксиданты (полифенолы)	[56]

держание фенолов в пробе составляет 3 мг/л или хотя бы приблизительно равно этой концентрации. Оно означает только то, что после обработки 4-аминоантипирином проба с неизвестным суммарным содержанием фенолов имеет такую же оптическую плотность, как раствор, содержащий 3 мг C_6H_5OH в 1 л. Таким образом, для определения одной физической величины (суммарного содержания разных фенолов) аналитик использует градуировку, построенную для определения другой величины (содержания стандартного вещества). Выражение одной физической величины в пересчете на другую метрологически некорректно, так же как оценка расстояний в часах полета или литрах затраченного бензина.

Чтобы построить “правильную” градуировку, нужны эталоны с известным суммарным содержанием именно тех компонентов искомой группы, которые есть в пробах, причем с таким же соотношением этих компонентов. Можно применять в качестве стандартного вещества смеси компонентов группы, заранее выделенные из таких же объектов, как исследуемые [51]. Этот прием снижает систематические погрешности, но не устраняет их.

Относительная погрешность группового анализа (δ_c) зависит от ряда факторов. Главный из них — *внутригрупповая селективность сигналов*; чем она сильнее выражена, тем больше предель-

ная погрешность. Чтобы получить приблизительно правильные результаты группового анализа, надо не только правильно выбрать стандартное вещество, но и нивелировать чувствительность определения разных компонентов группы; для этого аналитики разработали и проверили на практике целый ряд способов (табл. 5). Разные способы нивелирования сигналов обоснованы и сопоставлены в монографии [5].

Если качественный состав группы и коэффициенты чувствительности компонентов известны, то величину δ_c можно успешно прогнозировать. Более того, по величине ИП можно рассчитать искомое значение c_x (в интервальной форме) [63]. Однако интервальные оценки суммарных содержаний учитывают лишь внутригрупповую селективность сигналов и выбор стандартного вещества. Другими источниками погрешностей могут быть ошибки при формировании группы, неправильный выбор способа измерений, неаддитивность сигналов, потери аналитов в ходе пробоподготовки, влияние посторонних веществ и т.д. Как правило, для методик, основанных на измерении ИП, единичные погрешности ГА не превышают 50 отн. %. При неудачном выборе способа измерений и использовании неподходящих стандартных веществ эти погрешности могут достигать до 500% [40], особенно при сильно выраженной внутригрупповой селективности сиг-

налов. Возникает вопрос, можно ли вообще применять столь неточные показатели состава, как ИП. Ответ зависит от цели применения. Для мониторинга или оценки степени очистки сточных вод можно использовать любые ИП, так как значения c^* в пробах, отобранных в разное время из одного и того же водоема и проанализированных по одной и той же методике, приблизительно пропорциональны действительным значениям c_Σ . По меняющимся значениям ИП можно судить о динамике изменений группового состава объекта. Можно использовать неточные ИП и для скрининга. Но такие ИП нельзя сопоставлять с нормативами группового состава! Предложенные гигиенистами предельно допустимые значения показателей группового состава вызывают резкую критику специалистов [64–66]. Применение ИП в аналитическом контроле качества продукции промышленных предприятий также нежелательно.

Несмотря на метрологическую некорректность и невысокую точность результатов, получаемых с помощью ИП, этот способ группового анализа имеет свои достоинства: экспрессность, простота и прецизионность методик, возможность оценки c_Σ без разделения и опознания компонентов пробы. Имеет значение и то, что с помощью ИП уже собран большой объем данных по групповому составу разных объектов. Система интегральных показателей должна быть существенно улучшена, но отказываться от нее не следует.

ПРИМЕНЕНИЕ МНОГОМЕРНЫХ ГРАДУИРОВОК

Недостатки ИП как инструмента группового анализа привлекли внимание аналитиков к альтернативным способам оценки суммарных содержаний. Новые методики ГА не должны уступать известным по прецизионности, чувствительности и экспрессности, но они должны быть гораздо более правильными. Должны быть устранены субъективность и метрологическая некорректность, характерные для применения интегральных показателей. Этим требованиям соответствует сравнительно новый способ оценки суммарных содержаний, а именно *применение многомерных градуировок*. Аналитические возможности многомерных градуировок как инструмента ГА еще недостаточно изучены.

Исходными данными обычно являются оптические плотности раствора пробы, одновременно измеренные при разных аналитических длинах волн (АДВ) в УФ- или ближней ИК-области [67]. По этим данным рассчитывают математические модели (регрессии), связывающие концентрации аналитов (c_i или c_Σ) и результаты исходных изме-

рений [68]. Начиная с 1980-х годов, эти модели рассчитывают, применяя хеометрические алгоритмы и компьютерные программы [69, 70]. Чаше всего с помощью многомерных градуировок компоненты исследуемого объекта определяют раздельно, однако на рубеже XX и XXI веков многомерные градуировки стали применять и для определения суммарного содержания однотипных органических соединений. Для этого пригодны многомерные линейные градуировки двух типов, прямые и обращенные.

Прямые (“традиционные”) градуировки соответствуют общей формуле

$$(A_\Sigma)_j = \sum k_{ij}c_i, \quad (1)$$

где $(A_\Sigma)_j$ — обобщенный сигнал присутствующих в пробе аналитов искомой группы при j -ой АДВ, k_{ij} — коэффициент поглощения i -го аналита при j -ой длине волны, c_i — концентрация i -го аналита. Коэффициенты поглощения аналитов при всех АДВ заранее определяют по однокомпонентным модельным растворам или по стандартным смесям известного состава. Значения c_i для очередной пробы находят, решая переопределенную систему линейных уравнений типа (1) с помощью подходящих хеометрических алгоритмов, а затем суммируют найденные значения c_i . Примером может быть УФ-спектрометрическое определение суммарного содержания аренов в интервале значений c_Σ от 0.1 до 0.5 мг/л [71]. Суммирование найденных c_i привело к довольно точным оценкам c_Σ ; относительная погрешность не превышала 5 отн. %. Данный вариант ГА является простым и метрологически корректным, но он применим лишь к сравнительно простым смесям с известным качественным составом. Число АДВ должно превышать число аналитов в пробе, а сигналы компонентов должны быть аддитивны.

В более сложных случаях рекомендуется использовать *обращенные многомерные градуировки*. Они отвечают общей формуле

$$c_\Sigma = \sum b_j(A_\Sigma)_j. \quad (2)$$

Здесь b_j — регрессионный коэффициент для j -ой АДВ. Значения b_j заранее находят по спектрам модельных смесей известного состава, образующих обучающую выборку. Для расчета c_Σ часто используют хеометрический алгоритм PLS, реализуемый с помощью программы “Unscrambler” [70]. Можно применять и другие алгоритмы, реализуемые с помощью более простых и доступных программ. Примеры методик ГА, основанных на применении обращенных градуировок, представлены в табл. 6. При построении обращенных градуировок число АДВ может быть меньше числа однотипных аналитов, имеющих в пробе. При аддитивном светопоглощении компонентов искомой группы и достаточно большом объеме обу-

Таблица 6. Примеры определения суммарных содержаний (c_{Σ}) однотипных аналитов с помощью обращенных многомерных градуировок

Группа аналитов	Диапазоны значений c_{Σ}	Объект анализа	Область спектра	Алгоритм	δc , отн. %	Литература
Углеводы	10–200 мг/мл	Фруктовые соки	БИК	PLS	<3	[72]
Таннины	До 1 мг/мл	Красные вина	БИК	PLS	?	[73]
Парафины, нафтенy, арены	40–50% 40–65% 1.5–11%	Бензиновые фракции нефти	БИК	PLS	<2 <3 <5	[74]
Полифенолы	15–25 мг/л	Чай	БИК	PLS	?	[75]
Углеводороды	10–100 мг/л	Сточные воды	ИК	МЛР PLS	<8 <6	[76]
Арены	До 50 мг/л	Сточные воды	УФ	OLS	<20	[43]
Тяжелые металлы	10–20 мкмоль/л	Модельные растворы	ВИД	OLS	<6	[77]
Антоцианины	<1%	Красные вина	БИК	PLS, нейронные сети	?	[78]

чающей выборки применение обращенных градуировок дает весьма точные результаты ГА. При неаддитивном светопоглощении точность результатов ниже, тем не менее анализ возможен и в этом случае [77].

Несомненно, вариант группового анализа, основанный на применении обращенных многомерных градуировок, является очень перспективным. Он имеет два важных преимущества по сравнению с использованием ИП. Во-первых, результат ГА выражают в метрологически корректной форме, без пересчета на содержание произвольно выбранного стандартного вещества. Во-вторых, использование множества стандартных смесей и проведение измерений при многих длинах волн способствуют повышению прецизионности и правильности группового анализа. Если в обучающую выборку включили достаточное число градуировочных смесей, а их состав близок к составу исследуемого объекта, то погрешности группового анализа окажутся намного ниже (при прочих равных условиях), чем при использовании ИП. Систематические погрешности ГА с применением обращенных градуировок обычно не превышают 10%. Формировать обращенные многомерные градуировки можно так, чтобы учесть влияние потерь при экстракции и влияние посторонних веществ [76].

НЕРЕШЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ГРУППОВОГО АНАЛИЗА

Обзор литературы показывает, что групповой анализ объектов сложного состава является самостоятельным видом химического анализа, имеет собственные теоретические основы, свой набор применяемых методов анализа и целый ряд нерешенных проблем.

Рассмотрение методологических и метрологических аспектов группового анализа позволяет выделить три основные проблемы. А именно:

1. Неопределенность индивидуального состава групп однотипных (совместно определяемых) органических соединений

Такая неопределенность затрудняет разработку методик ГА и интерпретацию результатов анализа. Способом решения проблемы может стать *официальная регламентация состава групп*. А именно: должны быть проведены специальные исследования, и по их результатам установлены перечни наиболее распространенных однотипных соединений, входящих в ту или иную группу. Вместо перечней могут быть указаны четкие критерии отнесения индивидуальных соединений к той или иной группе. Информация об индивидуальном составе групп должна не только учитываться при разработке методик группового анализа, но и указываться в нормативных документах (ГОСТы, МВИ, ПДК и т.п.). Методики ГА должны быть составлены так, чтобы все компоненты искомой группы, присутствующие в единичной пробе, участвовали в формировании обобщенного аналитического сигнала. В этом случае и при исключении других источников неопределенности (влияние посторонних веществ и т.п.) результаты ГА одних и тех же объектов не должны зависеть от выбора методики, что важно для сопоставления результатов анализа и достижения единства измерений.

2. Внутригрупповая селективность сигналов

В отличие от неопределенности индивидуального состава групп, внутригрупповая селективность сигналов искажает результаты анализа не во всех вариантах ГА, а только при определении интегральных показателей состава. В настоящее время такие показатели являются основным инструментом ГА, и проблема внутригрупповой селективности сигналов весьма актуальна. Способом ее решения является нивелирование чувствительности определения компонентов группы. Нивелирование обычно достигается путем выбора оптимального способа или оптимальных условий измерения обобщенных сигналов. При невозможности нивелирования сигналов выходом может быть переход к применению обращенных многомерных градуировок. Другой выход — суммирование концентраций компонентов группы после их хроматографического разделения и опознания.

3. Неаддитивность сигналов

Этот фактор также приводит к систематическим погрешностям ГА. Проблема неаддитивности сигналов актуальна при любом способе проведения ГА. К сожалению, источники неаддитивности сигналов недостаточно изучены. Обычно считают, что источником является химическое взаимодействие аналитов, однако значимые отклонения от аддитивности иногда наблюдаются и в тех случаях, когда компоненты искомой группы друг с другом не реагируют. Снизить отклонения от аддитивности можно путем перехода к другим условиям измерения сигналов или изменения концентрационных условий. При невозможности устранения отклонений от аддитивности следует применять обращенные многомерные градуировки или суммировать концентрации компонентов после их разделения.

Для успешного решения этих и ряда других проблем группового анализа необходимо расширение исследований в этой области аналитической химии. Следует увеличить выпуск и расширить ассортимент стандартных образцов группового состава. Принципы, возможности и способы группового анализа должны войти в программу профессиональной подготовки аналитиков. Знакомить студентов с этим видом химического анализа следует и в рамках базового курса “Аналитическая химия”.

Автор благодарит акад. Ю.А. Золотова за ценные советы при обсуждении плана данной статьи и д.х.н. И.В. Власову за полезные замечания при обсуждении текста.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Будников Г.К., Вершинин В.И., Евтюгин Г.А., Карцова Л.А., Лебедев А.Т., Мазур Д.М., Майстренко В.Н., Проскурнин М.А., Пупышев А.А., Шеховцова Т.Н., Шпигун О.А., Яшкин С.Н. Методы и достижения современной аналитической химии / Под ред. Вершинина В.И. Санкт-Петербург: Лань, 2020. 588 с.
2. Геологический словарь. В 2-х тт. / Под ред. Паффенгольца Л.Н. М.: Недра, 1973. Т. 1. 487 с.
3. Вершинин В.И. Органических веществ анализ / Большая российская энциклопедия. Т. 24. М.: БРЭ, 2014. С. 351.
4. Новиков А.А., Кухмазова А.Р. Групповой состав нефтей Западной Сибири // Инновации и инвестиции. 2018. № 11. С. 277.
5. Вершинин В.И. Определение суммарного содержания однотипных веществ (теория интегральных показателей). Омск: Изд-во ОмГУ, 2016. 288 с.
6. Анашкин О.С., Рохлин Н.М. Интегральные показатели экономической эффективности при формировании сырьевой базы углеводородов России // Недропользование XXI век. 2015. № 7. С. 130.
7. Колоколов Б.Н. Органических веществ анализ / Химическая энциклопедия / Под ред. Кнунянца И.Л. Т. 3. М.: Изд-во “Советская энциклопедия”, 1990. С. 401.
8. Спейт Дж. Анализ нефти. Справочник. СПб.: ЦОП “Профессия”, 2012. С. 290.
9. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). М.: Наука, 1981. 288 с.
10. Нечаева Л.С., Бутырская Е.В., Шапошник В.А., Семенов В.Ф. Структурно-групповой анализ карбоксильного катионообменника // Сорбционные и хроматографические процессы. 2009. Т. 9. № 2. С. 208.
11. Клячко Ю.А. Функциональный анализ (химический) / Большая советская энциклопедия. В 30-ти тт. Т. 28. М.: Изд-во “Советская энциклопедия”, 1978. 682 с.
12. Сиггиа С., Ханна Дж.Г. Количественный анализ по функциональным группам. М.: Химия, 1983. 672 с.
13. Мазор Л. Методы органического анализа. М.: Мир, 1986. 584 с.
14. Основы аналитической химии. Учебник для вузов. В 2-х кн. / Под редакцией Золотова Ю.А. 3-е издание. Кн. 1. Общие вопросы и методы разделения. М.: Высшая школа, 2004. С. 10.
15. Вершинин В.И., Власова И.В., Никифорова И.А. Аналитическая химия. Учебник. 3-е издание. М.: Лань, 2019. С. 16.
16. Сабадвари Ф., Робинсон А. История аналитической химии. М.: Мир, 1984. 303 с.
17. Чемоданов А.Е., Вахин А.В., Ситнов С.А., Феоктистов Д.А. Групповой состав нефти и методы его изучения. Казань: Казанский федеральный университет, 2018. 21 с.
18. ASTM D.5134-98. Standard test method for detailed analysis of petroleum naphthas through *n*-Nonane by

- capillary gas chromatography. Annual book of ASTM Standards. USA. 1998.
19. *Вершинин В.И., Контева Е.В., Троицкий В.В.* Определение суммарных содержаний парафинов, нафтенных и аренов по светопоглощению бензинов в ближней ИК-области // Заводск. лаборатория. Диагностика материалов. 2005. Т. 71. № 11. С. 10.
 20. *Ван-Несс К., Ван-Вестен Х.* Состав масляных фракций нефти и их анализ Пер. с англ. М.: Изд-во ИЛ, 1954. 466 с.
 21. *Speight J.G.* Handbook of Petroleum Product Analysis. 2nd Ed. Hoboken: John Wiley & Sons Inc., 2015. 345 p.
 22. *Солиенко О.В., Полещук О.Х., Огородников В.Д., Резвухин А.И.* Применение ИК-спектроскопии для определения доли "ароматических" атомов углерода в тяжелых нефтяных фракциях // Нефтехимия. 1984. Т. 24. № 1. С. 137.
 23. Унифицированные методы анализа вод / Под ред. Лурье Ю.Ю. М.: Химия, 1973. 376 с.
 24. *Лейте В.* Определение органических загрязнений питьевых, природных и сточных вод. Пер. с нем. М.: Химия, 1975. 200 с.
 25. Analysis of petroleum hydrocarbons in environmental media. Total petroleum hydrocarbon criteria working group series. V. 1 / Ed. Weisman W. Amherst Sci. Publ., 1998. 98 p.
 26. *Kingsbury F.B., Clark C.P., Williams G., Post A.L.* The rapid determination of albumin in urine // J. Lab. Clin. Med. 1926. № 11. P. 981.
 27. *Zaia D.A.M., Marques F.R., Zaia C.T.* Spectrophotometric determination of total proteins in blood plasma: A comparative study among dye-binding methods // Braz. Arch. Biol. Technol. 2005. V. 48. № 3. P. 385.
 28. *Vershinin V.I.* Total indices as a tool to estimate sum content of similar analytes. Review // Talanta. 2015. V. 131. № 1. P. 293. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.07.102>
 29. *Будников Г.К., Зиятдинова Г.К.* Антиоксиданты как объекты биоаналитической химии // Журн. аналит. химии. 2005. Т. 60. № 7. С. 678. (*Budnikov G.K., Ziyadinova G.K.* Antioxidants as analytes in analytical chemistry // J. Anal. Chem. 2005. V. 60. № 7. P. 600.) <https://doi.org/10.1007/s10809-005-0146-2>
 30. *Apak R., Güçlü K., Demirata B., Özyürek M., Çelik S.E., Bektaşoğlu B., Berker K., Özyurt D.* Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to compounds // Molecules. 2007. № 12. P. 1496.
 31. *Carlsen M.H., Halvorsen B.L., Holte K., Behn S.K., Dragland S., Sampson L.* The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide // Nutr. J. Online. 2010. V. 9. № 3. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-9-3>
 32. ISO 14502-1:2005. Determination of substances characteristic of green and black tea. Part 1: Content of total polyphenols in tea. Colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent. 2005. 10 p.
 33. *Baena J.R., Valcarcel M.* Total indices in analytical sciences // Trends Anal. Chem. 2003. V. 22. № 9. P. 641. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)01101-4](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)01101-4)
 34. *Золотов Ю.А.* Определение интегральных показателей как задача аналитической химии // Журн. аналит. химии. 2004. Т. 59. № 7. С. 677.
 35. *Вершинин В.И.* Формирование групп и выбор стандартных веществ при определении суммарных содержаний однотипных соединений в виде интегральных показателей // Журн. аналит. химии. 2017. Т. 72. № 9. С. 816. (*Vershinin V.I.* Group formation and choice of standard substances in the determination of total concentrations of similar compounds as total indices // J. Anal. Chem. 2017. V. 72. № 9. P. 947.) <https://doi.org/10.1134/S1061934817090131>
 36. *Хатмуллина Р.М., Сафарова В.И., Латыпова В.З.* Достоверность оценки загрязненности вод нефтяными углеводородами и фенолами с помощью интегральных показателей // Журн. аналит. химии. 2018. Т. 73. № 7. С. 545. (*Khatmullina R.M., Safarova V.I., Latypova V.Z.* Reliability of the assessment of water pollution by petroleum hydrocarbons and phenols using some of total indices // J. Anal. Chem. 2018. V. 73. 2018. № 7. P. 728.) <https://doi.org/10.1134/S1061934818070080>
 37. *Ровинский Ф.Я., Теплицкая Т.А., Алексеева Т.А.* Фоновый мониторинг полициклических ароматических углеводородов. Л.: Гидрометеиздат, 1988. 288 с.
 38. *Apak R., Güçlü K., Özyurek M., Karademir S.E.* Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method // J. Agric. Food Chem. 2004. V. 52. № 26. P. 7970. <https://doi.org/10.1021/jf048741x>
 39. *Лурье Ю.Ю.* О методах определения нефтепродуктов в сточных и природных водах. Памятная записка о симпозиуме стран — членов СЭВ "Методы определения нефти и нефтепродуктов" / Применение сорбции и ионного обмена при анализе вод. М., 1974. 40 с.
 40. *Кленкин А.А., Павленко Л.Ф., Темердашев З.А.* Некоторые методические особенности определения уровня нефтяного загрязнения водных экосистем // Заводск. лаборатория. Диагностика материалов. 2007. Т. 73. № 2. С. 31–35.
 41. *Леоненко И.И., Антонович В.П., Андрианов А.М., Безлуцкая И.В., Цымбалюк К.К.* Методы определения нефтепродуктов в водах и других объектах окружающей среды (обзор) // Методы и объекты хим. анализа. 2010. Т. 5. № 2. С. 58.
 42. *Другов Ю.С., Родин А.А.* Экологические анализы при разливах нефти и нефтепродуктов. СПб: Анатолия, 2000. 250 с.
 43. *Антонова Т.В., Вершинин В.И., Власова И.В.* УФ-спектрометрическое определение суммарного содержания аренов в сточных водах // Журн. аналит. химии. 2021. Т. 76. С. 603. (*Antonova T.V., Vershinin V.I., Vlasova I.V.* UV-spectrometric determination of total concentration of arenes in wastewaters // J. Anal. Chem. 2021. V.76. № 7. P. 728.) <https://doi.org/10.1134/S1061934821070042>
 44. *Немировская И.А., Аникиев В.В., Теобальд Н., Раве А.* Идентификация нефтяных углеводородов в морской среде при использовании различных методов

- анализа // Журн. аналит. химии. 1997. Т. 52. № 4. С. 392.
45. EPA method 1664. Revision A. *n*-Hexane extractable material and silica gel treated *n*-hexane extractable material by extraction and gravimetry. EPA-821-R-98-002, 1999. 28 p.
46. Вершинин В.И., Усова С.В. Экстракционно-хроматографическое определение суммарного содержания моноциклических аренов C_6-C_9 в сточных водах // Журн. аналит. химии. 2021. Т. 76. № 3. С. 244. (Vershinin V.I., Usova S.V. Extraction–chromatographic determination of the total concentration of monocyclic arenes C_6-C_9 in wastewater // J. Anal. Chem. 2021. V. 76. № 3. P. 337. <https://doi.org/10.1134/S1061934821010159> <https://doi.org/10.31857/S0044450221010151>)
47. Чуйкин А.Ф. Способ определения суммарного содержания нефтепродуктов в воде. Патент РФ № 2354965. Опубликовано 10.05.2009.
48. Monakhova Y.B., Kuballa T., Lachenmeier D.W. Rapid determination of total thujone in absinthe using 1H NMR spectroscopy // Int. J. Spectrosc. 2011. Article 171684. <https://doi.org/10.1155/2011/171684>
49. Nenadis N., Lazaridou O., Tsimidou M.Z. Use of reference compounds in antioxidant activity assessment // J. Agric. Food Chem. 2007. V. 55. № 14. P. 5452.
50. Антонова Т.В., Вершинин В.И., Иванова В.А., Шилигин П.В. К вопросу о точности спектрофотометрических оценок суммарного содержания фенолов // Аналитика и контроль. 2012. Т. 16. № 4. С. 343.
51. Методика выполнения измерений массовой концентрации нефтепродуктов в природных и очищенных сточных водах методом колоночной хроматографии. ПНД Ф 14.1:2.62-96. М.: Изд-во стандартов, 2004. 13 с.
52. Пупкова В.И., Прасолова Л.М. Определение белка в моче и спинномозговой жидкости. Кольцово: Вектор Бест, 2007. 43 с. <http://www.zavlab.ru/files/pdf/belok.pdf> (28.08.2022).
53. Berker K.I., Guçlu K., Tor I., Apak R. Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, bathophenanthroline, tripyridyltriazine, and ferricyanide reagents // Talanta. 2007. V. 72. № 3. P. 1157.
54. Orsonneau J.L., Douet P., Massoubre C., Lustenberger P., Bernard S. An improved pyrogallol red-molybdate method for determining total urinary protein // Clin. Chem. 1989. V. 35. № 11. P. 2233.
55. Стась И.Е., Лейтес Е.А., Шипунов Б.П., Лыкова М.И. Определение суммарного содержания тиолов методом инверсионной вольтамперометрии // Химия растительного сырья. 1997. Т. 1. № 3. С. 35.
56. Цюпко Т.Г., Петракова И.В., Бриленок Н.В., Николаева Н.А., Чупрынина Д.А., Темердашев З.А., Вершинин В.И. Определение суммарного содержания антиоксидантов методом FRAP // Аналитика и контроль. 2011. Т. 15. № 3. С. 287.
57. Шетникович К.А., Ованесов Е.Н., Овчинников И.М. Определение общего белка в моче — возможности, особенности и приборная часть // Лаборатория. 2007. № 4. С. 1.
58. Антонова Т.В., Вершинин В.И., Видимкина Ю.В. Патент РФ № 255 33322. Способ определения суммарного содержания фенолов в природных и сточных водах. Опубликовано 20.11.2014 // Б. и. 2014. № 24.
59. Усова С.В., Федорова М.А., Петров С.В., Вершинин В.И. Многоволновая ИК-спектметрия как способ оценки суммарного содержания углеводов // Аналитика и контроль. 2015. Т. 19. № 1. С. 69.
60. Федорова М.А., Усова С.В., Вершинин В.И. Точность ИК-спектметрического определения суммарного содержания углеводов при разных способах измерения аналитического сигнала // Аналитика и контроль. 2014. Т. 18. № 1. С. 91.
61. Шагидуллин Р.Р., Аввакумова Л.В., Дорошкина Г.М., Селянина С.Г. / Определение нефтепродуктов в водах на основе ИК-Фурье спектрального комплекса и измерения интегральных интенсивностей полос поглощения // Журн. аналит. химии. 2002. Т. 57. № 3. С. 250.
62. Видимкина Ю.И., Казакова О.А., Вершинин В.И. Рефрактометрическое определение суммарного содержания углеводов в пересчете на сахарозу // Вестник Омского госуниверситета. 2013. № 2. С. 108.
63. Вершинин В.И., Исаченко Н.А., Бриленок Н.С. Методология анализа неразделенных смесей. Интервальные оценки суммарного содержания однотипных аналитов // Журн. аналит. химии. 2016. Т. 71. № 4. С. 369. (Vershinin V.I., Isachenko N.A., Brilenok N.S. Methodology of analysis of unseparated mixtures: Interval estimates of the total concentrations of similar analytes // J. Anal. Chem. 2016. V. 71. № 4. P. 351.) <https://doi.org/10/1134/S1061934816040080>
64. Дедков Ю.М. Современные проблемы аналитической химии сточных вод // Рос. хим. журн. 2002. Т. XLVI. № 4. С. 11.
65. Тропынина Л.В., Карташова А.В., Жилина И.В., Романов П.В. Достоверность и информативность показателя “фенольный индекс” // Методы оценки соответствия. 2012. № 12. С. 20.
66. Гагарина О.В. Оценка и нормирование качества природных вод: критерии, методы, существующие проблемы. Ижевск: Изд-во “Удмуртский университет”, 2012. 199 с.
67. Берштейн И.Я., Каминский Ю.А. Спектрофотометрический анализ в органической химии. Л.: Химия, 1986. 200 с.
68. Родионова О.Е., Померанцев А.Л. Хемометрика: достижения и перспективы // Успехи химии. 2006. Т. 75. № 4. С. 302. <https://doi.org/10.1070/RC2006v075n04ABEH003599>
69. Brereton R.G. Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry // Analyst. 2000. V. 125. № 11. P. 2125.
70. Esbensen K.H. Multivariate Data Analysis — In Practice. An Introduction to Multivariate Data Analysis and Experimental Design. 5th Ed. Woodbridge: Camo Process AS, 2004. 588 p.
71. Власова И.В., Вершинин В.И. Спектрометрическое определение суммарного содержания однотипных аналитов с помощью традиционных многомерных

- градуировок // Журн. аналит. химии. 2022. Т. 77. № 1. С. 20. (Vlasova I.V., Vershinin V.I. Spectrometric determination of the total concentration of similar analytes using conventional multidimensional calibrations / J. Anal. Chem. 2022. V. 77. № 1. P. 35.) <https://doi.org/10.1134/S1061934822010142>
72. Rambla F.J., Garrigues S., de la Guardia M. PLS-NIR determination of total sugar, glucose, fructose and sucrose in aqueous solutions of fruit juices // Anal. Chim. Acta. 1997. V. 344. P. 41.
73. Cozzolino D., Kwiatkowski M.J., Parker M., Cynkar W.U., Damberg R.G., Gishen M., Herderich M.J. Prediction of phenolic compounds in red wine fermentations by visible and near infrared spectroscopy // Anal. Chim. Acta. 2004. V. 513. № 1. P. 73.
74. Вершинин В.И., Контева Е.В., Троцкий В.В. Определение суммарных содержаний парафинов, нафтен и аренов по светопоглощению бензинов в ближней ИК-области // Заводск. лаборатория. 2005. Т. 71. № 11. С. 10.
75. Quansheng C., Jiewen Z., Muhua L. Determination of total polyphenols content in green tea using FT-NIR spectroscopy and different PLS algorithms // Pharm. Biomed. Anal. 2008. V. 46. № 3. P. 568.
76. Vershinin V.I., Petrov S.V. The estimation of total petroleum hydrocarbons in waste waters by multiwave IR spectrometry with multivariate calibrations // Talanta. 2016. V. 148. P. 163.
77. Власова И.В., Вершинин В.И. Спектрометрическое определение суммарного содержания одностипных аналитов с помощью обращенных многомерных градуировок // Журн. аналит. химии. 2022. Т. 77. № 11. С. 1032.
78. Janik L.J., Cozzolino D., Damberg R., Cynkar W., Gishen M. The prediction of total anthocyanin concentration in red-grape homogenates using visible-near-infrared spectroscopy and artificial neural networks // Anal. Chim. Acta. 2007. V. 594. № 1. P. 107. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.05.019>

УДК 543.423

ПОВЕДЕНИЕ И ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ТРУДНОЛЕТУЧИХ ПРИМЕСЕЙ В ДУГЕ ПОСТОЯННОГО ТОКА ПРИ АНАЛИЗЕ ЦИРКОНИЯ АТОМНО-ЭМИССИОННЫМ МЕТОДОМ

© 2023 г. Н. И. Золотарева^а, *, С. С. Гражулене^а

^аИнститут проблем технологии микроэлектроники и особочистых материалов Российской академии наук
ул. Академика Осипяна, 6, Черноголовка, Московская обл., 142432 Россия

*e-mail: zol@iptm.ru

Поступила в редакцию 20.04.2022 г.

После доработки 14.06.2022 г.

Принята к публикации 14.06.2022 г.

Изучено влияние химически активных фторсодержащих добавок AlF_3 , BaF_2 и ZnF_2 на характер испарения ряда труднолетучих элементов из тугоплавкой матрицы в кратере электрода дуги постоянного тока при атомно-эмиссионном анализе циркония. Найдено, что в присутствии добавок происходит образование легколетучих фторидов труднолетучих элементов-примесей и их фракционное испарение по отношению к испарению элемента-основы. Быстрое и полное испарение фторидов примесей происходит в течение первых 30 с горения дуги, и лишь после этого начинается интенсивное испарение основы. Такое фракционирование приводит к значительному росту интенсивности спектральных линий примесей и уменьшению интенсивности фона и, следовательно, снижению пределов определения труднолетучих элементов в оксиде циркония. Установлено, что наиболее эффективной из исследуемых фторирующих добавок является фторид цинка. Его использование позволило снизить пределы определения труднолетучих элементов на два порядка по сравнению с пределами определения в оксиде циркония без добавок, а также улучшить воспроизводимость результатов определений.

Ключевые слова: дуговой атомно-эмиссионный анализ, труднолетучие элементы, оксид циркония, химически активные добавки, пределы определения, фракционное испарение.

DOI: 10.31857/S0044450223020160, EDN: SEBETE

Благодаря своим уникальным свойствам: прочности, термостойкости и высокой коррозионной стойкости цирконий находит широкое применение в электротехнике, металлургической промышленности и машиностроении. Кроме того, цирконий, обладая нейтронной прозрачностью, является незаменимым конструкционным материалом для оболочек тепловыделяющих элементов (ТВЭЛов) для атомных реакторов электростанций и ядерных установок морского флота. Немаловажными являются и перспективы его применения в медицине. При лечении переломов и в челюстно-лицевой хирургии успешно используют импланты на основе циркониевых сплавов, обладающих преимуществами перед другими материалами-аналогами по биологической совместимости, прочности, устойчивости к коррозии и пластичности. Известно, что содержание примесей даже в следовых концентрациях ухудшает полезные свойства металла. Например, В и Нf имеют большое сечение поглощения нейтронов, причем у бора оно на порядок выше, чем у гафния, поэтому их допустимое содержание в цирко-

нии для атомной промышленности составляет 0.01–0.05 мас. % для гафния и на порядок меньше для бора [1]. Бериллий является высокотоксичным элементом, поэтому возможность его определения в цирконии с достаточно низкими пределами определения (c_{lim}) важна для медицины. Таким образом, разработка высокочувствительных методов определения примесных элементов в цирконии остается весьма актуальной задачей.

Анализ тугоплавких металлов, к числу которых принадлежит и цирконий, представляет собой непростую аналитическую задачу ввиду ряда причин, в частности, трудностей в пробоподготовке из-за плохой растворимости в случаях, требующих переведения проб в раствор, и высокой температуры кипения в дуговых спектральных методах. Кроме того, богатые эмиссионные спектры циркония обуславливают высокую интенсивность фона в спектре, а также риск перекрытия его спектральных линий с линиями примесей. В результате предложенные методы анализа циркониевых материалов, например атомно-

эмиссионная спектрометрия (АЭС) с индуктивно связанной плазмой, демонстрируют достаточно высокие c_{lim} , например, для труднолетучих элементов они находятся на уровне 0.1 мас. %, [2], что не удовлетворяет требованиям атомной промышленности и медицины. Кроме того, способы, связанные с растворением матрицы, являются трудоемкими, требуют сильного разбавления пробы или отделения матрицы, что связано с риском дополнительных загрязнений, т.е. увеличением значений холостого опыта и ухудшением тем самым метрологических характеристик. Другие, более чувствительные методы, например масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой, помимо указанных выше недостатков, связанных с растворением пробы, являются дорогостоящими и не всегда доступными.

Наиболее подходящим, не требующим растворения образцов методом анализа циркониевых соединений представляется АЭС в дуге постоянного тока. Метод характеризуется достаточно высокой чувствительностью и простой пробоподготовкой, широкой доступностью и экономичностью. Однако задача усложняется при необходимости определения примесных элементов, обладающих аналогичной с цирконием низкой летучестью ($T_{кип}$ выше 4000°C), а также богатыми эмиссионными спектрами, перекрывающимися с линиями основы. Эти причины препятствуют достижению необходимых c_{lim} и требуемой надежности определений и мотивируют поиск путей их преодоления. Так, например, для снижения c_{lim} гафния до 0.01 мас. % предложено использование тонкостенного электрода формы "узкий кратер" [3], который обеспечивает быстрый и равномерный нагрев пробы до высоких температур, при которых она достаточно быстро поступает в плазму дуги. Однако в этом случае испарение основы и примесных элементов происходит одновременно, что не позволяет снизить ни уровень фона, ни возможное перекрывание аналитических линий в спектре. С нашей точки зрения, для снижения c_{lim} более эффективен метод фракционного (селективного) испарения определяемых элементов-примесей из матрицы, которое можно осуществить введением соответствующей химически активной добавки, приводящей к образованию в кратере электрода дуги легколетучих соединений определяемых элементов. В результате можно ожидать значительного снижения c_{lim} примесных элементов. Однако описанные в литературе способы использования химических добавок BiF_3 и BaF_2 в анализе оксида циркония в дуге постоянного или переменного тока [3, 4] не дали желаемых результатов. Возможно, это объясняется тем, что из-за низкой температуры кипения фторид висмута испаряется из электрода прежде, чем происходит фторирование и образование легколетучих фторидов

труднолетучих элементов [3]. Добавку BaF_2 использовали в сочетании с графитовым порошком, что приводило к образованию труднолетучих карбидов не только матричного, но и примесных элементов [4] и делало способ неэффективным. Таким образом, поиск оптимальных химических добавок для селективного испарения и, следовательно, улучшения метрологических характеристик определения тугоплавких примесей в соединениях циркония не теряет своей актуальности.

Цель настоящей работы — исследование поведения и возможности фракционного испарения труднолетучих элементов-примесей и основы из кратера электрода дуги постоянного тока в присутствии фторсодержащих химических добавок AlF_3 , BaF_2 и ZnF_2 для улучшения метрологических характеристик анализа оксида циркония.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использовали спектрограф PGS-2 с плоской дифракционной решеткой 651 штр/мм, обеспечивающий обратную линейную дисперсию 0.74 нм/мм. В качестве источника возбуждения спектров применяли дугу постоянного тока 13 А. Эмиссионные спектры регистрировали с помощью разработанной в нашей лаборатории фотоэлектрической системы регистрации с использованием линеек приборов с зарядовой связью [5].

В качестве добавок исследовали AlF_3 , BaF_2 , ZnF_2 , и $NaCl$ марки ос. ч. Кривые испарения элементов строили по результатам регистрации спектров с экспозициями по 10 с до полного испарения пробы из кратера электрода. Пробу набивали в кратер нижнего электрода (анода) типа "рюмка". Кратер "рюмки" имел глубину и диаметр 4 мм, толщину стенок 1 мм, шейку диаметром 1.5 и высоту 4 мм. Конец верхнего электрода был заточен на конус. Расстояние между электродами составляло 4 мм. Использовали трехлинзовую систему освещения щели.

Образцы сравнения готовили на основе оксида циркония ос. ч. Примесные элементы вводили также в виде их оксидов ос. ч. Концентрация примесных элементов в головном образце составляла 1 мас. %. Образцы сравнения готовили методом последовательного разбавления головного эталона оксидом циркония ос. ч. Готовили две серии образцов сравнения. О правильности приготовленных образцов свидетельствовало совпадение градуировочных графиков определяемых элементов в этих сериях.

Металлический цирконий перед анализом переводили в оксид путем прокаливании на воздухе при 900°C. В полученный оксид вводили добавку, тщательно перемешивали в ступке из оргстекла и анализировали.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изученные элементы перечислены в табл. 1. Их выбор определялся аномально высокими (4000–5000°C) температурами кипения соединений, в виде которых они могут находиться в анализируемой основе, имеющей также высокую температуру кипения. Кроме того, высокочувствительное определение примесей Be, V и Hf имеет практическое значение для различных областей применения. В качестве химических добавок выбрали фторсодержащие соединения AlF_3 , BaF_2 и ZnF_2 , так как фториды труднолетучих элементов, которые могут образоваться в кратере электрода дуги в их присутствии, имеют низкие температуры кипения и достаточно устойчивы [6]. Эти добавки обладают достаточно высокими температурами кипения, что предотвращает их преждевременное испарение из кратера электрода до окончания процесса фторирования труднолетучих элементов, имеют довольно простой эмиссионный спектр, поэтому их присутствие в анализируемом образце дополнительно не усложняет проведение анализа. Для сравнения с фторидами изучили влияние на характер испарения труднолетучих элементов добавки NaCl , широко используемой для снижения пределов обнаружения ряда элементов в различных объектах [7].

На рис. 1а, б приведены кривые испарения бериллия и гафния из кратера дуги постоянного тока в присутствии и в отсутствие добавок. Оптимальное количество добавки, найденное из зависимости интенсивности спектральных линий определяемых элементов от ее содержания, составило 15 мас. % для всех изучаемых фторидов. Из рис. 1а, б видно, что влияние всех изученных фторсодержащих соединений одинаково по отношению к Be и Hf. Наблюдается как значительный рост интенсивности спектральных линий, так и уменьшение времени их полного испарения из кратера электрода дуги, что свидетельствует об образовании легколетучих фторидов. Тем не менее максимальный эффект наблюдается для фторида цинка. Объяснить это явление, по-видимому, можно разницей в потенциалах ионизации элементов (V_i), образующих фториды. Как видно из табл. 1, V_i определяемых элементов находятся на уровне 7–9 эВ. Оптимальная температура плазмы ($T_{\text{опт}}$) для возбуждения выбранных атомных спектральных линий для этих элементов, рассчитанная по предложенной в работе [8] формуле, составляет 5600–5800°C. Значения $T_{\text{опт}}$ для ионных линий элементов составляют около 7000°C. Эффективная температура плазмы циркониевой дуги в атмосфере воздуха (V_i циркония равен 6.95 эВ) составляет 5900°C [9]. Известно [10], что введение в плазму дуги, горящую в атмосфере воздуха, элементов с невысоким V_i способствует снижению эффективной температуры

Таблица 1. Потенциалы ионизации (V_i), температуры кипения труднолетучих металлов и их оксидов, а также длины волн спектральных линий, используемые для их определения

Элемент	λ , нм	$T_{\text{кип}}$ Me, °C	$T_{\text{кип}}$ Me _x O _y , °C	V_i , эВ
B	249.772	3865	1860	8.29
Be	313.042	2970	4120	9.32
Hf	277.335	4600	5400	6.82
Nb	309.417	3700	4744	6.77
Ta	293.355	5458	>5000	7.89
V	310.229	3400	2030	6.74
Zr	268.945	4409	4300	6.95

плазмы. При этом снижение температуры плазмы тем больше, чем ниже V_i вводимого элемента и больше его концентрация в столбе дуги. Введение в дугу элементов с высокими V_i (>10 эВ) практически не влияет на эффективную температуру столба дуги. В связи с этим можно предположить, что введение фторида цинка (V_i цинка 9.393 эВ) практически не приводит к снижению эффективной температуры плазмы дуги, и она остается близкой к оптимальной для возбуждения спектральных линий труднолетучих элементов. В то же время использование легкоионизируемых фторидов алюминия и бария (V_i алюминия и бария равны 5.985 и 5.21 эВ соответственно) способствует значительному снижению температуры плазмы дуги до $5300 \pm 5400^\circ\text{C}$ [9], что и объясняет менее значительный рост интенсивности атомных линий гафния и бериллия в присутствии этих добавок по сравнению с фторидом цинка. Таким образом, при выборе химически активной добавки важно учитывать не только температуру кипения добавки, но и потенциал ионизации элемента, входящего в ее состав.

Использование добавки 4 мас. % хлорида натрия (рис. 1) способствует лишь незначительному росту интенсивности спектральных линий труднолетучих элементов, а время их полного испарения остается практически тем же, что и без добавки. Это еще раз подтверждает [11], что добавка NaCl действует скорее как спектроскопический буфер, а не химически активная добавка, поэтому ее использование для определения труднолетучих элементов нецелесообразно.

Поведение остальных примесных элементов, перечисленных в табл. 1, при введении добавок имеет аналогичный характер.

На рис. 2 представлены кривые испарения элемента-основы циркония из электрода дуги при наличии и в отсутствие добавок. Видно, что без добавок (кривая 4) температура плазмы и,

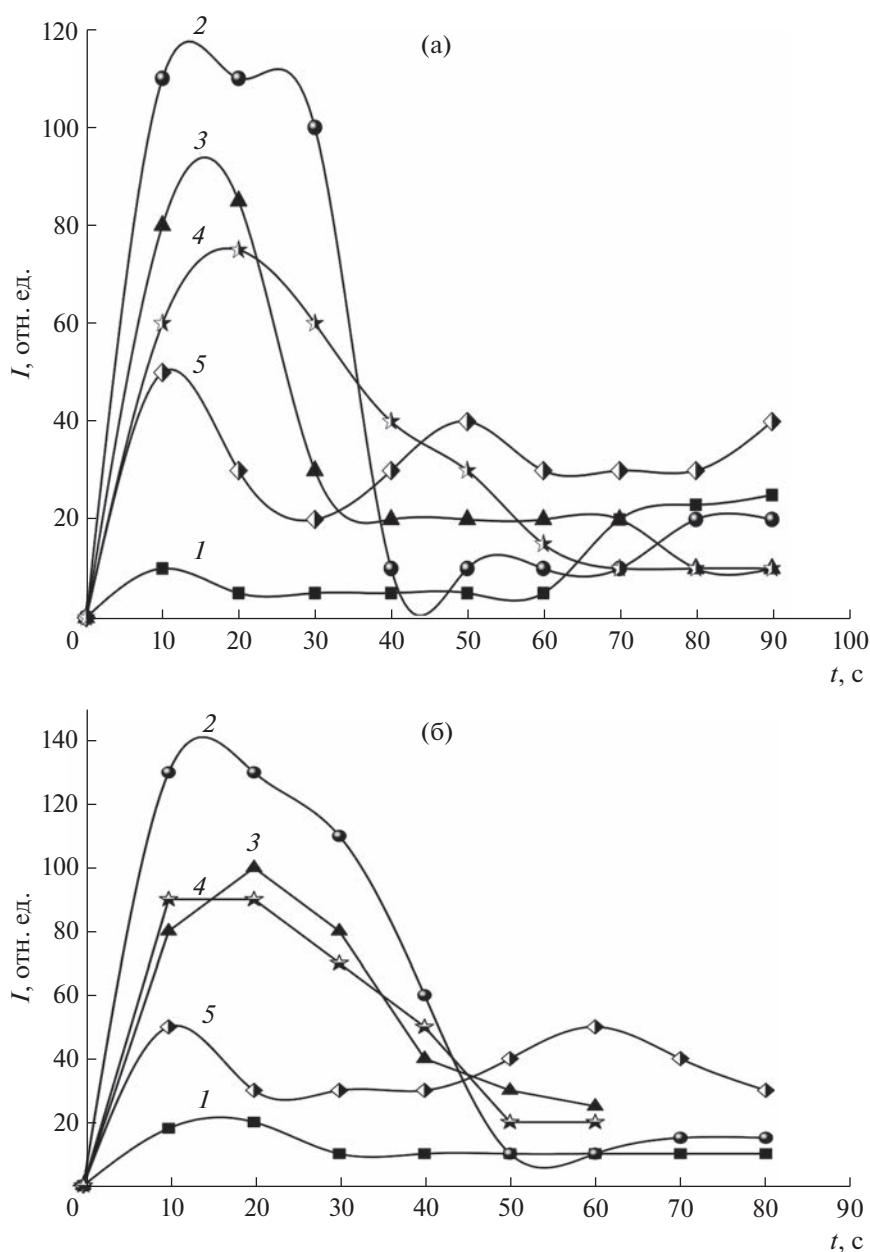


Рис. 1. Кривые испарения Hf (а) и Be (б) из оксида циркония без добавок (1) и в присутствии добавок: 2 – 15 мас. % ZnF_2 , 3 – 15 мас. % AlF_3 , 4 – 15 мас. % BaF_2 , 5 – 4 мас. % NaCl .

следовательно, электрода выше, поэтому интенсивное испарение основы – циркония из электрода начинается с момента зажигания дуги. В присутствии всех добавок интенсивное поступление циркония в плазму дуги начинается после 30-й секунды с момента зажигания дуги. При этом интенсивность его спектральных линий в присутствии ZnF_2 выше, чем в присутствии других добавок. Это наглядно подтверждает тот факт, что в присутствии легкоионизируемых добавок температура плазмы и, соответственно, электрода ниже, чем в присутствии фторида цинка.

Из рис. 3 на примере поведения примеси тантала видно, что его испарение и испарение элемента-основы циркония из кратера электрода в присутствии добавки ZnF_2 разделено во времени. Испарение тантала происходит в первые 30 с горения дуги, а интенсивное испарение циркония начинается после 30-й секунды. Известно, что чувствительность метода определяется соотношением $I_{\text{л}}/I_{\text{ф}}$, где $I_{\text{л}}$ – интенсивность аналитической линии определяемого элемента, а $I_{\text{ф}}$ – интенсивность фона рядом с ней. Фракционное испарение элемента-примеси по отношению к

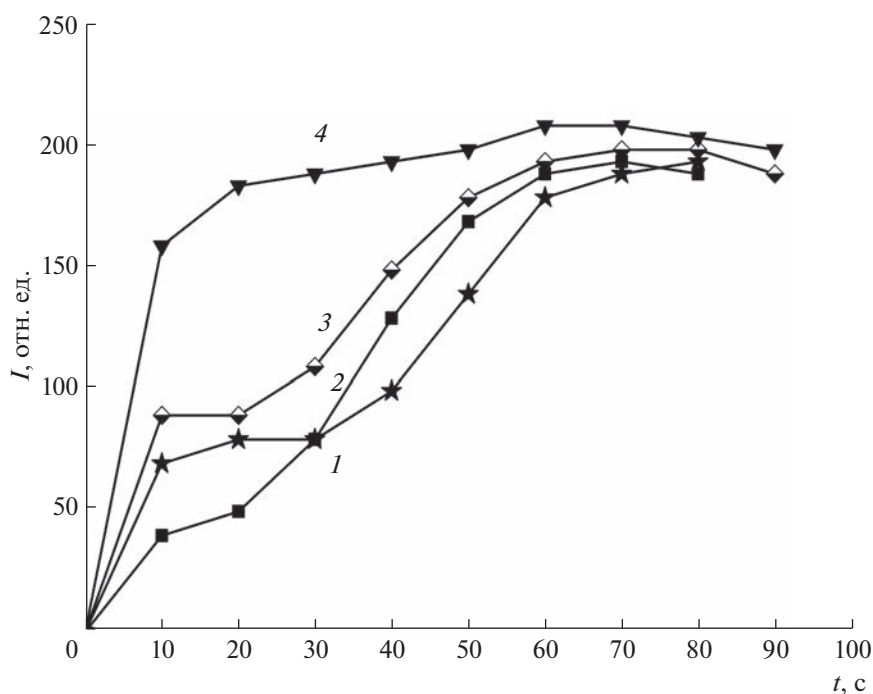


Рис. 2. Сравнительные кривые испарения элемента-основы циркония из кратера электрода в присутствии добавок: 1 – NaCl, 2 – AlF₃, 3 – ZnF₂, 4 – без добавки.

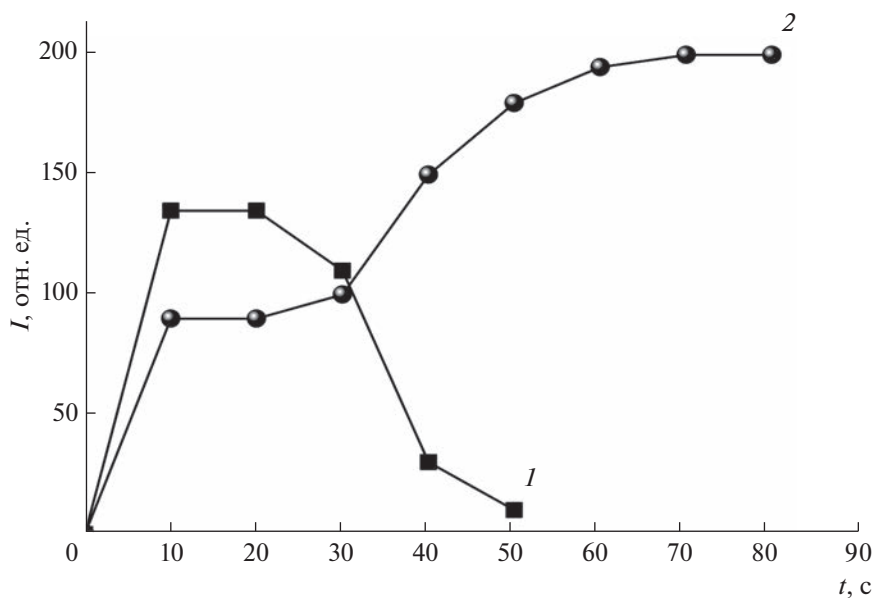


Рис. 3. Фракционный характер испарения элемента-примеси тантала (1) по отношению к испарению элемента-основы циркония (2) из кратера электрода дуги в присутствии добавки ZnF₂.

элементу-основы приводит к уменьшению величины I_{ϕ} вблизи аналитической линии тантала. Таким образом, использование добавки фторида цинка способствует одновременно и росту интенсивности спектральных линий труднолетучих элементов-примесей за счет образования в крате-

ре электрода их летучих фторидов, и уменьшению интенсивности фона в спектре, что приводит к значительному снижению c_{lim} тантала в оксиде циркония.

Такое поведение характерно для всех изученных примесей в цирконии, что отражено в табл. 2,

Таблица 2. Пределы определения (c_{lim}) и сходимость результатов определения (s_r) труднолетучих элементов в оксиде циркония в присутствии добавки 15 мас. % ZnF_2 и без добавки ($n = 15$, $P = 0.95$)

Элемент	c_{lim} , мас. %		s_r	
	без добавки	с ZnF_2	без добавки	с ZnF_2
B	5×10^{-2}	3×10^{-4}	0.18	0.12
Be	7×10^{-3}	7×10^{-5}	0.16	0.09
Hf	8×10^{-2}	2×10^{-3}	0.20	0.12
Nb	5×10^{-2}	8×10^{-4}	0.18	0.09
Ta	8×10^{-2}	5×10^{-3}	0.20	0.12
V	1×10^{-2}	2×10^{-4}	0.15	0.08

где приведены значения c_{lim} , а также сходимость результатов их определения в оксиде циркония в присутствии и в отсутствие добавки ZnF_2 . c_{lim} оценивали по содержанию, соответствующему нижней точке градуировочного графика, найденному с приемлемой точностью [12]. Из табл. 2 видно, что использование фторида цинка приводит не только к снижению c_{lim} на два порядка, но и к улучшению сходимости результатов определения. Правильность результатов определения труднолетучих элементов-примесей в присутствии ZnF_2 проверяли методом введено–найденно (табл. 3). Для Hf, Nb и Ta, пределы определения которых составляют $(2-5) \times 10^{-3}$ мас. %, проверку правильности проводили при концентрации 5.0×10^{-2} мас. %. Для B, Be и V, пределы определения которых на порядок ниже, правильность определения контролировали при более низкой концентрации – 5.0×10^{-4} мас. %. Полученные результаты (табл. 3) свидетельствуют об отсутствии значимых различий между введенным и найденным содержаниями для всех определяемых элементов.

Таблица 3. Проверка правильности определения труднолетучих элементов в оксиде циркония в присутствии добавки ZnF_2 дуговым атомно-эмиссионным методом ($n = 4$, $P = 0.95$)

Элемент	Введено, мас. %	Найдено, мас. %	s_r
B	5.0×10^{-4}	$(4.6 \pm 0.9) \times 10^{-4}$	0.13
Be	5.0×10^{-4}	$(4.8 \pm 0.8) \times 10^{-4}$	0.11
Hf	5.0×10^{-2}	$(4.6 \pm 0.9) \times 10^{-2}$	0.12
Nb	5.0×10^{-2}	$(4.9 \pm 0.7) \times 10^{-2}$	0.09
Ta	5.0×10^{-2}	$(4.4 \pm 0.9) \times 10^{-2}$	0.13
V	5.0×10^{-4}	$(5.0 \pm 0.8) \times 10^{-4}$	0.10

Таким образом, изучено поведение труднолетучих элементов в присутствии фторсодержащих добавок AlF_3 , BaF_2 и ZnF_2 в дуге постоянного тока при анализе циркония методом атомно-эмиссионной спектроскопии. Показано, что происходит фракционное испарение труднолетучих элементов-примесей по отношению к матричному элементу в плазму дуги благодаря образованию в кратере электрода их легколетучих фторидов. Это приводит к существенному росту интенсивности спектральных линий элементов-примесей и снижению фона вблизи аналитических линий. Найдено, что из изученных добавок наиболее эффективен ZnF_2 . Использование ZnF_2 позволило снизить пределы определения труднолетучих элементов в оксиде циркония на полтора-два порядка и значительно улучшить сходимость результатов их определений.

Работа выполнена в рамках Госзадания № 075-00706-22-00.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Решетников Ф.Г. Разработка, производство и эксплуатация тепловыделяющих элементов энергетических реакторов. М.: Энергоиздат, 1995. Кн. 1. С. 126.
2. Глинская И.В., Теселкина А.Э., Алексеева Т.Ю., Куфтырев Р.Ю. Анализ диоксида циркония, стабилизированного оксидом иттрия, методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой // Заводск. лаборатория. Диагностика материалов. 2018. Т. 84. № 4. С. 16.
3. Домбровская М.А., Лисиенко Д.Г., Шафар О.Ю. Определение гафния в циркониевых материалах // Заводск. лаборатория. Диагностика материалов. 2019. Т. 85. № 1. Ч. II. С. 56.
4. Елинсон С.В., Петров К.И. Аналитическая химия циркония и гафния. М.: Наука, 1965. 240 с.
5. Бурмий Ж.П., Золотарева Н.И., Хвостиков В.А., Гражулене С.С. Фотоэлектрическая регистрация эмиссионных спектров на основе приборов с заря-

- довой связью // Заводск. лаборатория. Диагностика материалов. 2008. Т. 74. № 6. С. 26.
6. *Верятин У.Д., Маширев В.П.* Термодинамические свойства индивидуальных веществ. М.: Атомиздат, 1965. С. 154.
 7. *Чанышева Т.А., Шелпакова И.Р.* Унифицированный метод атомно-эмиссионного спектрального анализа объектов разной природы // Аналитика и контроль. 2002. Т. 6. № 3. С. 298.
 8. *Гольдфарб В.М., Ильина Е.В.* О зависимости интенсивности спектральных линий от состава плазмы дуги постоянного тока / Прикладная спектроскопия. М.: Наука, 1969. Т. 1. С. 172.
 9. *Зильберштейн Х.И.* Спектральный анализ чистых веществ. Л.: Химия, 1971. С. 105.
 10. *Зайдель А.Н., Калитеевский Н.И., Липис Л.В., Чайка М.П.* Эмиссионный спектральный анализ атомных материалов. М.: Физматгиз, 1960. 686 с.
 11. *Домбровская М.А., Лисиенко Д.Г., Гильмуллина Ч.Г., Кубрина Е.Д.* Совершенствование атомно-эмиссионной методики анализа графитового коллектора // Заводск. лаборатория. Диагностика материалов. 2017. Т. 83. № 1. Ч. II. С. 51.
 12. *Экспериандова Л.П., Беликов К.Н., Химченко С.В., Бланк Т.А.* Еще раз о пределах обнаружения и определения // Журн. аналит. химии. 2010. Т. 65. № 3. С. 229. (*Eksperiandova L.P., Belikov K.N., Khimchenko S.V., Blank T.A.* Once again about determination and detection limits // J. Anal. Chem. 2010. V. 65. № 3. P. 223.)

УДК 543.062;543.422.3;543.64

СПИРОПИРАНЫ НА ОСНОВЕ БЕНЗОФУРАНОВОГО ФРАГМЕНТА КАК АНАЛИТИЧЕСКИЕ РЕАГЕНТЫ НА НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ АМИНОТИОЛЫ

© 2023 г. А. А. Щербатых^{а, *}, О. И. Аскалепова^а, А. О. Буланов^а, И. Н. Щербаков^а, С. Т. Нгуен^а

^аЮжный федеральный университет, химический факультет
ул. Р. Зорге, 7, Ростов-на-Дону, 344090 Россия

*e-mail: sherbatyh@sfedu.ru, asherbatyh@inbox.ru

Поступила в редакцию 12.04.2022 г.

После доработки 21.06.2022 г.

Принята к публикации 06.07.2022 г.

Задача определения биологически активных низкомолекулярных аминотиолов, таких как цистеин и глутатион, требует разработки новых методов и аналитических реагентов. Среди последних в отдельную группу можно выделить спиропираны — фотохромные органические вещества, в растворах которых существует равновесие между циклической и открытой формами. В настоящей работе рассмотрена возможность применения бензофурановых спиропиранов в качестве аналитических реагентов на аминотиолы. Изучено влияние различных заместителей в структуре спиропиранов на изменение их оптических свойств в присутствии цистеина и глутатиона. Установлено, что равновесие в растворах бензофурановых спиропиранов, содержащих в положении 7 гидроксигруппу, в присутствии аналитов смещается в сторону образования окрашенной раскрытой формы. Рассмотренные спиропираны использованы для создания простой, селективной и чувствительной методики спектрофотометрического и кинетического определения цистеина и глутатиона *in vitro*.

Ключевые слова: цистеин, глутатион, аминотиолы, спиропираны.

DOI: 10.31857/S0044450223010127, **EDN:** CEFYIX

Низкомолекулярные аминотиолы, такие как цистеин, гомоцистеин и глутатион, играют важную роль в биохимических процессах. Благодаря сильным восстановительным свойствам они являются незаменимыми компонентами защитной системы организма: нейтрализуют действие окислителей (таких как свободные радикалы [1, 2]) в условиях оксидативного стресса, поддерживают постоянство окислительно-восстановительного статуса клетки [3], участвуют в биосинтезе других антиоксидантов и клеточных метаболитов [4]. Концентрация их в клетке достаточно высока (30–200 μM для цистеина, 5–15 μM для гомоцистеина, 10 мМ для глутатиона [5–7]), а в условиях нарушения клеточного гомеостаза (оксидативный стресс, заболевания иммунной системы) может изменяться, что делает их индикаторами для отслеживания нежелательных физиологических процессов [8–10]. Важная роль аминотиолов обуславливает необходимость их точного количественного определения, для чего постоянно разрабатываются новые эффективные методы и синтезируются селективные сенсоры.

Перечень методов определения цистеина, гомоцистеина и глутатиона достаточно широк — к

ним относятся спектрофотометрия [11], флуориметрия [12, 13], высокоэффективная жидкостная хроматография [14], капиллярный зонный электрофорез [15], масс-спектрометрия [16]. Если рассматривать методы, основанные на спектрофотометрическом детектировании, то, поскольку аналиты характеризуются слабым поглощением в диапазоне 200–800 нм, часто в анализе применяются дериватизирующие агенты [17, 18] или селективные химические сенсоры [7, 19]. Среди последних в отдельную группу можно выделить спиропираны.

Спиропираны — фотохромные органические вещества, в растворах которых существует равновесие между двумя формами: спиро-формой (циклической формой, ее раствор бесцветен) и мероцианиновой формой (открытой меро-формой, ее раствор окрашен) [20–22]. На равновесие могут влиять различные факторы: температура, давление, облучение, pH среды, природа растворителя, присутствие субстрата. В аналитических целях особенно интересен последний фактор: субстратами, которые способствуют раскрытию циклической формы и образуют комплекс с мероцианиновой формой, часто служат ионы металлов

[23] и аминокислоты [24] (в частности, содержащие тиольные группы [25, 26]). На изменении спектров поглощения спиропиранов, вызванном стабилизацией мероцианиновой формы под действием аналита, и основаны соответствующие методы анализа.

В работах [19, 25, 26], посвященных определению аминотиолов, отмечается, что тиольная группировка аналитов участвует в дополнительном связывании со спиропираном, чем объясняется селективность определения цистеина и глутатиона на фоне остальных аминокислот. Более того, авторами работы [19] подчеркивается важность учета стерического фактора при подборе структуры спиропирана. Так, наличие заместителей большого размера и протяженной формы, содержащих гетероатомы (например, азот), позволяет добиться селективности действия по отношению к олигопептиду глутатиону на фоне небольших по размеру аминокислот цистеина и гомоцистеина. Кроме этого, все рассмотренные спиропираны содержат индолиновый фрагмент, благодаря которому образующаяся мероцианиновая форма является цвиттер-ионом. С одной стороны, за счет взаимодействия между цвиттер-ионами мероцианина и аминокислоты образуется прочный комплекс, что позволяет разработать чувствительную методику. С другой стороны, поскольку цвиттер-ион мероцианина аналогичным образом связывается и с другими цвиттер-ионами, присутствующими в растворе (например, с другими аминокислотами), а также с протонами и ионами металлов, селективность разработанных методов в ряде случаев [24–26] не всегда удовлетворительна.

В данной работе рассмотрены бензофурановые спиропираны как аналитические реагенты на аминотиолы. Мероцианиновая форма спиропиранов, содержащих бензофурановый фрагмент, представляет собой нейтральную молекулу [27–31]. Изучено влияние структуры предложенных спиропиранов на устойчивость мероцианиновой формы и на чувствительность определения цистеина, гомоцистеина и глутатиона. Показано, что аналиты могут смещать равновесие в сторону образования окрашенной формы, что позволило разработать чувствительные и селективные методики их определения *in vitro*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

L-цистеин (98%, Sigma-Aldrich, США; **Cys**), L-гомоцистеин (98%, Sigma-Aldrich, США; **Hcy**), L-глутатион (97%, Alfa-Aesar, США; **GSH**), L-метионин (98%, Sigma-Aldrich, США; **Met**), L-глицин (97%, Sigma-Aldrich, США; **Gly**) использовали без дополнительной очистки. Спиропираны SP1–7 синтезировали, как описано ранее [27–31]. Ацетонитрил для ВЭЖХ производства “Криохром” (Россия) применяли без дополнительной

очистки. Использовали реактивы и растворители квалификации не ниже х. ч., если не указано иное.

Точные навески препаратов взвешивали на весах специального класса точности МВ 210-А (“Сартогосм”, Россия) с погрешностью измерения 0.0001 г. Электронные спектры поглощения соединений и значения оптической плотности регистрировали на спектрофотометре Cary 50, снабженном Пельтье-термостатом (Varian, США), в кварцевых кюветах с толщиной поглощающего слоя 1.0 см. Значения pH растворов измеряли иономером pH-150М (Теплоприбор, Россия) с индикаторным стеклянным электродом и хлоридсеребряным электродом сравнения.

Исходные растворы аминокислот (5.0×10^{-3} М) готовили растворением точной навески в бидистиллированной воде. Рабочие растворы необходимой концентрации готовили последовательным разбавлением исходного раствора бидистиллированной водой. Исходные растворы спиропиранов (5.0×10^{-4} М) готовили растворением точной навески в ацетонитриле. Рабочие растворы необходимой концентрации готовили последовательным разбавлением исходного раствора ацетонитрилом.

Трис-HCl буферный раствор с pH 7.4 готовили, разбавляя 25 мл 0.2 М раствора трис(гидроксиметил)аминометана до 100 мл 0.1 М HCl, контролируя значение pH с помощью pH-метра.

Для изучения взаимодействия между спиропираном и субстратом раствор субстрата (Cys, Hcy, GSH, Met или Gly, диапазон концентраций $0–1.0 \times 10^{-3}$ М) добавляли к раствору спиропирана (конечная концентрация 5.0×10^{-5} М; растворитель — смесь ацетонитрил–трис-HCl буферный раствор с pH 7.4 (50 : 50, по объему) [25]). Смесь инкубировали в темноте в течение 25 мин, затем регистрировали электронный спектр поглощения.

Константу связывания для комплекса аминотиола со спиропираном рассчитывали по формуле (1):

$$\frac{1}{A_i} = \frac{1}{\varepsilon[\text{SP}]} + \frac{1}{\beta\varepsilon[\text{SP}][\text{RSH}]_i}, \quad (1)$$

где A_i — оптическая плотность при 460 нм (SP3) и при 450 нм (SP7) в присутствии i -той концентрации аналита [RSH] (GSH в случае SP7 и Cys в случае SP3), М; ε — молярный коэффициент светопоглощения спиропирана, $\text{М}^{-1} \text{см}^{-1}$; [SP] — концентрация спиропирана, М; β — константа связывания между спиропираном и аналитом, М^{-1} .

Для получения градуировочных зависимостей для спектрофотометрического определения Cys (SP3) и GSH (SP7) смешивали растворы спиропирана (конечные концентрации 2.0×10^{-5} М для SP3 и 1.0×10^{-4} М для SP7) и аминотиола (диапазон концентраций $1.7 \times 10^{-6}–2.0 \times 10^{-5}$ М для Cys

и 5.0×10^{-7} – 1.0×10^{-4} М для GSH), в смеси ацетонитрил–трис-НCl буферный раствор с pH 7.4 (50 : 50, по объему) и после выдерживания в темноте в течение 25 мин регистрировали спектр поглощения.

Для определения Cys (SP3) и GSH (SP7) кинетическим методом смешивали растворы спиропирана (конечные концентрации 2.0×10^{-5} М для SP3 и 1.0×10^{-4} М для SP7) и аминотиола (диапазон концентраций 1.7×10^{-6} – 1.0×10^{-5} М для Cys и 5.0×10^{-7} – 5.0×10^{-5} М для GSH), в смеси ацетонитрил–трис-НCl буферный раствор с pH 7.4 (50 : 50, по объему) и в течение 25 мин регистрировали спектры поглощения с интервалом 2 мин. Кинетика взаимодействия спиропирана с аминотиолом при избыточной концентрации спиропирана описывается уравнением реакции псевдопервого порядка по реагирующим компонентам:

$$\ln \frac{c^0}{c^0 - X} = kt, \quad (2)$$

где c^0 – исходная концентрация спиропирана, М; X – координата реакции, t – время, мин; k – константа скорости, мин^{-1} .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Концепция выбора структуры спиропиранов. Определение аминокислот при помощи спиропиранов основано на образовании комплекса между мероцианиновой формой спиропирана и аминокислотой. Это взаимодействие смещает равновесие между спироциклической (раствор бесцветен) и мероцианиновой (раствор окрашен и поглощает свет в длинноволновой области) формами в сторону последней.

В работах [19, 24–26], посвященных определению аминокислот, в основном рассмотрены спиропираны, содержащие индолиновый фрагмент. При раскрытии спиро-формы таких спиропиранов образуется полярная цвиттер-ионная меро-

цианиновая форма (схема 1а). Она образует комплекс с цвиттер-ионной формой серосодержащей аминокислоты главным образом за счет сил электростатического притяжения, хотя возможно образование дополнительных координационных связей с атомом серы тиольной группы определяемой аминокислоты. При этом молекулы аналита также могут активно участвовать в процессе раскрытия циклической формы за счет нуклеофильной атаки тиолат-аниона серосодержащей аминокислоты [25]. Очевидно, что в случае спиропиранов на основе индолинового фрагмента при выборе структуры и природы заместителей следует руководствоваться следующими принципами: заместители должны стабилизировать циклическую форму, что повышает контрастность аналитической реакции; должен быть учтен стерический фактор – размер и положение заместителей спиропирана влияет на селективность по отношению к аминотиолам, отличающимся по размеру, например глутатиону и цистеину.

В случае спиропиранов на основе бензофуранового фрагмента при раскрытии спиро-формы не образуется цвиттер-иона [27–31] (схема 1б), они более устойчивы к влиянию растворителя и внешнего облучения, т.е. процесс раскрытия циклической формы затруднен. Поскольку мероцианиновая форма бензофуранового спиропирана не является биполярным ионом, связывание с аминокислотой происходит за счет координационных связей. Нами изучена целесообразность аналитического применения ряда бензофурановых спиропиранов, имеющих различные заместители, которые могут стабилизировать как циклическую, так и раскрытую форму. Кроме того, заместители, отличающиеся размерами и наличием гетероатомов, как и в случае индолиновых спиропиранов могут влиять на эффективность анализа, поскольку их структура может определять селективность по отношению к различным анализам.

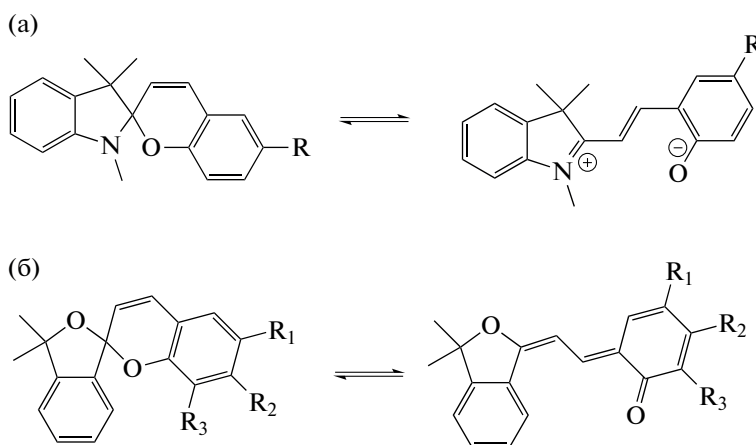


Схема 1. Равновесие между циклической и открытой формами спиропирана на основе индолинового (а) и бензофуранового (б) фрагмента.

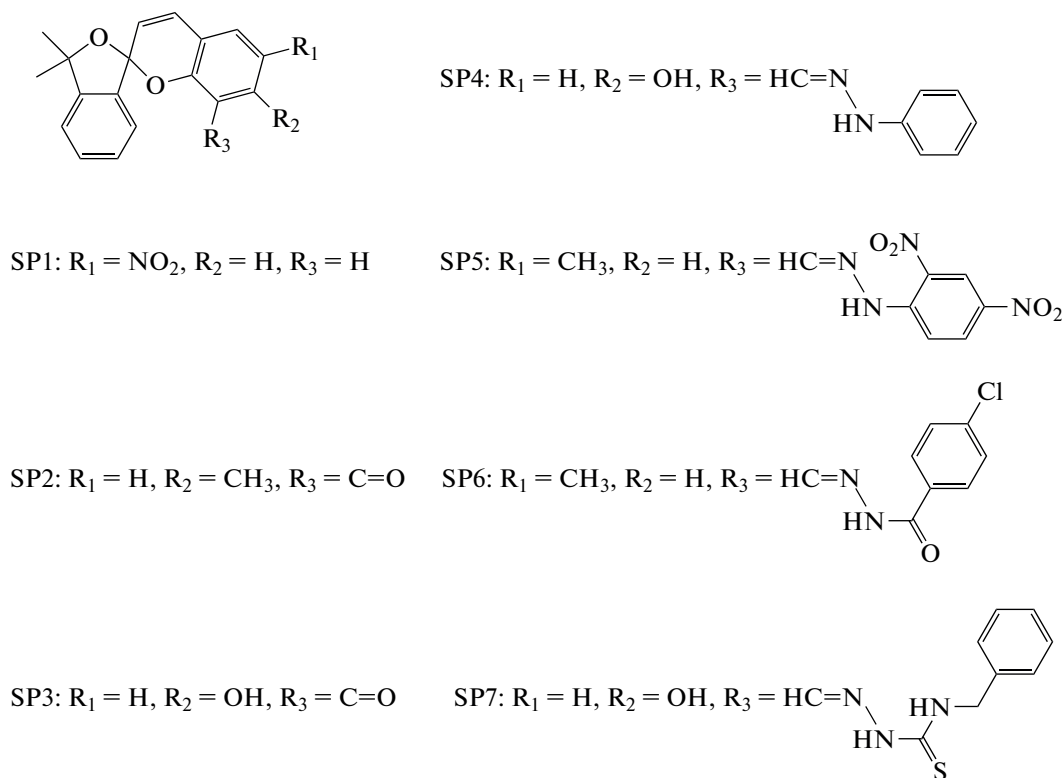


Рис. 1. Бензофурановые спиропираны SP1-7, рассмотренные в настоящей работе.

Предложенные спиропираны имеют различные заместители в положениях 6, 7 или 8 (рис. 1). Например, показано [25], что нитрогруппа в положении 6 у индолинового спиропирана приводит к стабилизации мероцианиновой формы и падению чувствительности по отношению к глутатиону и цистеину. Мы, в свою очередь, исследовали свойства бензофуранового спиропирана с аналогичным заместителем в положении 6 (SP1). Ранее показано [27], что присутствие в положении 7 гидроксигруппы с подвижным атомом водорода стабилизирует открытую форму. В связи с этим мы проанализировали соединения SP3, SP4, и SP7, содержащие OH-заместители в положении 7, а также заместители различного размера в положении 8. Кроме того, рассмотрены спиропираны с различными заместителями в положении 8, но не содержащие гидроксигруппы в положении 7 (SP2, SP5, SP6).

Фотохимические свойства соединений SP1-7 в присутствии различных субстратов. Спиропираны SP1-7 хорошо растворимы в метаноле, ацетонитриле, диметилсульфоксиде, но нерастворимы в воде. При этом цистеин, гомоцистеин и глутатион являются водорастворимыми аминотиолами и практически не растворяются в органических растворителях. Для дальнейшего анализа мы использовали в качестве растворителя смесь ацетонитрил–трис-НCl буферный раствор с pH 7.4

(50 : 50, по объему), в которой одинаково хорошо растворимы и аналиты, и спиропираны. Чтобы исключить влияние компонентов буферного раствора на равновесие между изомерными формами спиропиранов (например, за счет возможного комплексообразования мероцианиновой формы с ионами калия) при исследовании их фотохимических свойств использовали трис-НCl буферный раствор. Поскольку в диапазоне pH 7.2–9.0 значительных различий в оптических свойствах для каждого спиропирана не наблюдали, для дальнейших исследований выбрали значение pH 7.4 как близкое к физиологическому.

Изучили электронные спектры поглощения спиропиранов в присутствии различных субстратов: GSH, Cys, Hcy, Gly и Met (рис. 2). Для SP1, SP2, SP5, SP6 не наблюдали изменения оптических свойств как в присутствии аминотиолов, так и в присутствии аминокислот, не содержащих тиольной группы. Оптическая плотность в длинноволновой области спектра увеличивается в присутствии субстратов в случае спиропиранов, содержащих гидроксигруппу в положении 7 (SP3, SP4, SP7). При этом соединения SP3, SP4, SP7 характеризуются стабильностью мероцианиновой формы. Во-первых, открытую форму стабилизирует переход протона с гидроксигруппы на атом азота [27]. Во-вторых, у этих спиропиранов относительно велика длина связи $\text{C}_{\text{спиро}}-\text{O}$, которая

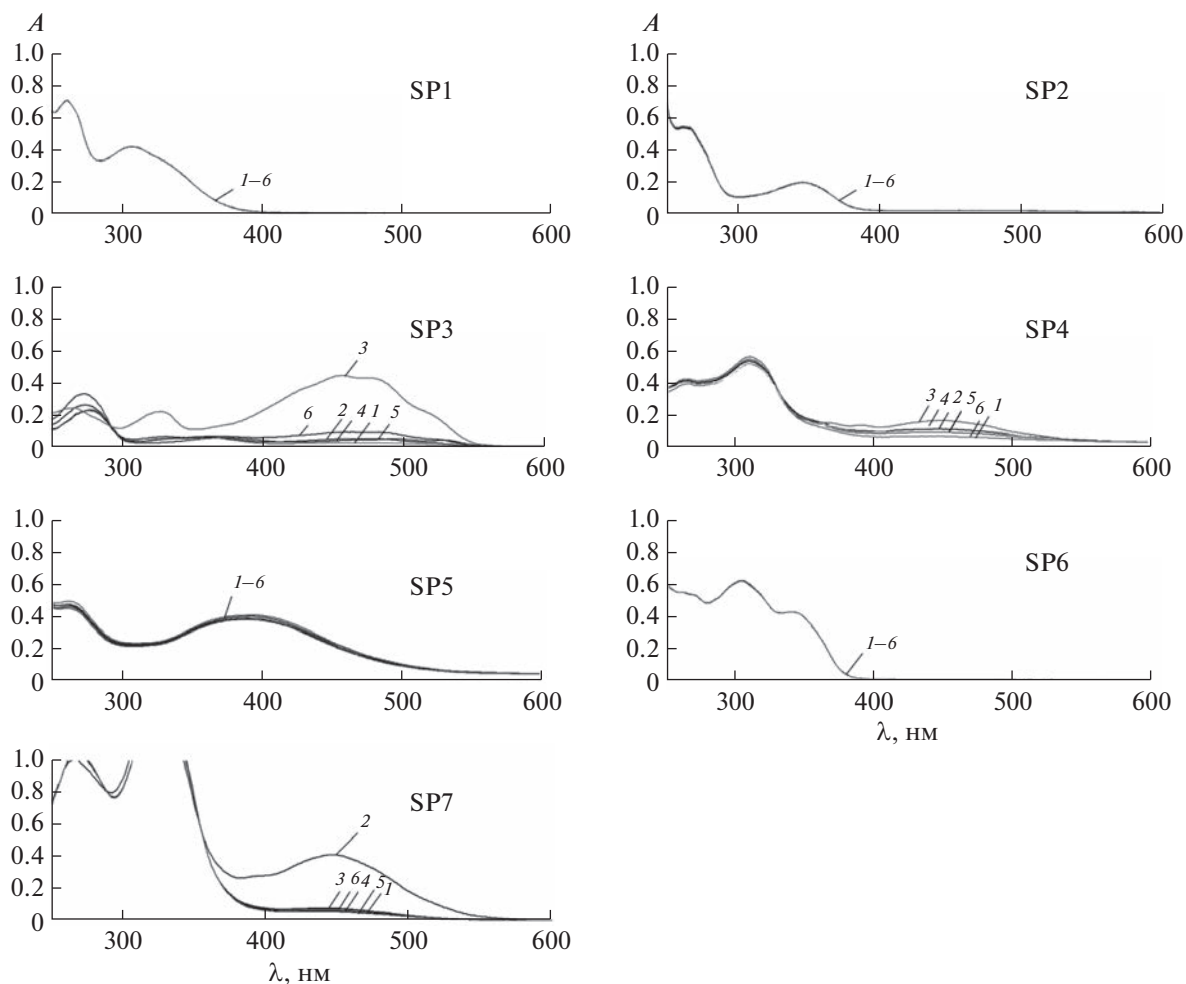


Рис. 2. Электронные спектры поглощения спиропиранов SP1-7 (5.0×10^{-5} M) в отсутствие субстратов (1) и в присутствии 1.0×10^{-3} M GSH (2), Cys (3), Hcy (4), Gly (5) и Met (6).

разрывается при раскрытии циклической формы [30, 31]. К примеру, у SP7 и SP4 она значительно длиннее, чем у SP1 [31].

Показано [25], что нитрогруппа в положении 6 стабилизирует мероцианиновую форму спиропирана на основе индолинового фрагмента. Тем не менее в спектре аналогичного бензофуранового спиропирана SP1 аналитический сигнал в присутствии аминокислот не наблюдается. Вероятно, в сравнении со спиропираном индолинового типа именно бензофурановый фрагмент оказывает решающее влияние на стабильность циклической формы.

В случаях SP7 и SP3 изменения спектра в присутствии метионина и глицина незначительны. Наоборот, отклик на присутствие аминокислот цистеина и глутатиона явно выражен. При этом соединения SP7, SP4, SP3 демонстрируют различную селективность по отношению к анализам (рис. 2, 3).

Во всех случаях, где наблюдается аналитический сигнал, увеличение оптической плотности при длине волны 450 нм для SP7, SP4 и при 460 нм для SP3 происходит пропорционально увеличению концентрации субстрата. Это позволяет оценить константу связывания и возможность количественного анализа. Для расчета константы связывания использовали уравнение (1). Для комплекса SP3 с цистеином константа составила $4.46 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, для SP7 с глутатионом — $1.05 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. Значения констант превосходят аналогичные данные для некоторых индолиновых спиропиранов [25] и позволяют использовать спектрофотометрический метод для количественного определения цистеина и глутатиона.

Получены градуировочные зависимости вида $(A - A_0)/A_0 = c(\text{RSH})K + b$, где A_0 и A — значения оптической плотности при 460 нм (SP3) или 450 нм (SP7) в отсутствие и в присутствии Cys или GSH соответственно. Параметры градуировочных функций представлены в табл. 1.

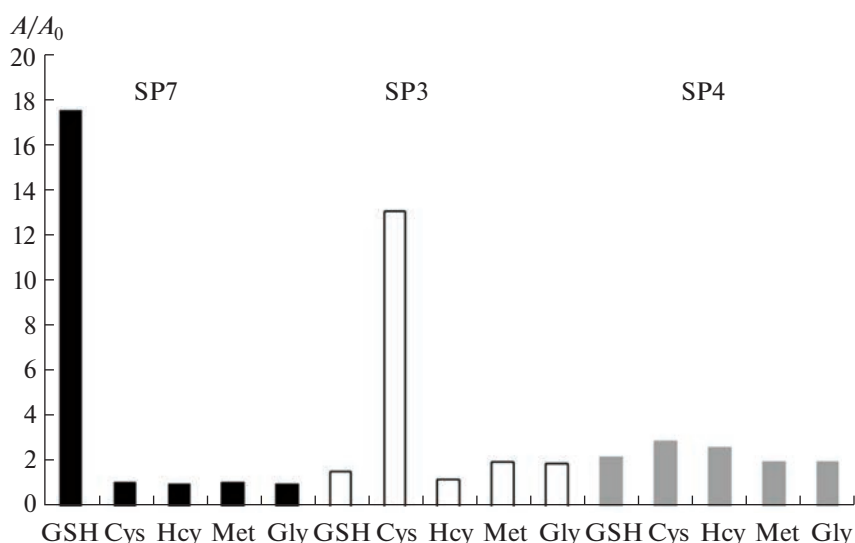


Рис. 3. Селективность спиропиранов SP7 (черный), SP3 (белый) и SP4 (серый) по отношению к аминокислотам, где A_0 и A — поглощение спиропирана при 450 нм для SP7, SP4 и при 460 нм для SP3 в отсутствие и присутствии изомольного количества аминокислоты соответственно.

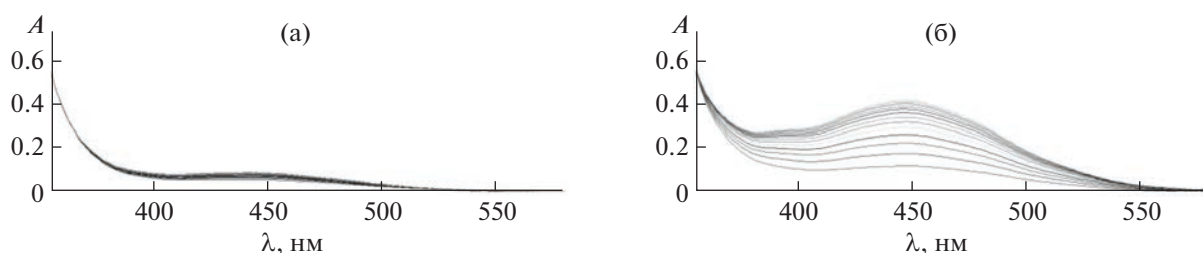


Рис. 4. Увеличение оптической плотности при 450 нм в спектре SP7 (1.0×10^{-4} М) в отсутствие (а) и в присутствии 4.0×10^{-5} М GSH (б) в смеси ацетонитрил–трис-НСl буферный раствор с рН 7.4 (50 : 50, по объему); спектры регистрировали с интервалом 2 мин.

Кинетический анализ. Увеличение оптической плотности в растворе спиропирана в длинноволновой области свидетельствует о переходе соединения в мероцианиновую форму. При этом изомеризация спиропирана в присутствии аминокислоты происходит быстрее, чем в его отсутствие (рис. 4).

Анализ кинетики перехода соединений SP7 и SP3 из циклической формы в открытую показал, что скорость процесса изомеризации напрямую

зависит от концентрации присутствующего аминокислоты. Кинетика процесса позволяет использовать константы псевдопервого порядка для разработки методики количественного определения [26] цистеина и глутатиона.

Рассчитаны константы псевдопервого порядка при взаимодействии избытка спиропирана с аминокислотой. Коэффициенты градуировочных зависимостей вида $k = c(RSH)K + b$ (где k — константа псевдопервого порядка, рассчитанная по

Таблица 1. Параметры градуировочных функций для спектрофотометрического определения цистеина и глутатиона

Аналит	Спиропиран	Коэффициенты градуировочных зависимостей			$c_{\min}$, М
		K	b	R	
Cys	SP3	2.7×10^4	0.7	0.964	8.8×10^{-7}
GSH	SP7	3.9×10^4	1.2	0.956	1.2×10^{-7}

Примечание: R — коэффициент корреляции, $c_{\min}$ — предел обнаружения.

Таблица 2. Параметры градуировочных функций для определения цистеина и глутатиона кинетическим методом

Аналит	Спиропиран	Коэффициенты градуировочных зависимостей			$c_{\text{мин}}, \text{M}$
		K	b	R	
Cys	SP3	7.5×10^5	17.6	0.962	9.5×10^{-7}
GSH	SP7	1.0×10^5	5.7	0.959	2.9×10^{-7}

Примечание: R — коэффициент корреляции, $c_{\text{мин}}$ — предел обнаружения.

формуле (2), для реакции аминотиола RSH (Cys или GSH) с избытком SP3 или SP7 соответственно) представлены в табл. 2.

Таким образом, каталитические свойства цистеина и глутатиона могут быть использованы для разработки методики их чувствительного кинетического определения.

Разработанные методики спектрофотометрического (табл. 1) и кинетического (табл. 2) определения цистеина и глутатиона являются простыми, чувствительными и селективными.

Спиропираны бензофуранового ряда SP1, SP2, SP5, SP6, стабильные в циклической форме, не продемонстрировали аналитического сигнала по отношению к определяемым веществам. Соединения, имеющие в положении 7 гидроксогруппу, стабилизирующую мероцианиновую форму, можно использовать при спектрофотометрическом и кинетическом определении цистеина и глутатиона. Рассмотренные методики характеризуются высокой чувствительностью и селективностью. При этом спектрофотометрическое определение менее трудоемко, поскольку не требует получения серии значений оптической плотности в фиксированные моменты времени и расчета констант скорости. Спектрофотометрическая методика в целом является более перспективной для дальнейшего применения для определения аминотиолов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №21-53-54007 Вьет_а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yin F., Sancheti H., Cadenas E. Mitochondrial thiols in the regulation of cell death pathways // *Antioxid. Redox Signaling*. 2012. V. 17. № 12. P. 1714.
2. Щербатых А.А., Черновьянц М.С. Исследование антигипероксидных и антиоксидантных свойств цистеина, глутатиона и метионина методами спектрофотометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии // *Журн. аналит. химии*. 2021. Т. 76. № 4. С. 313. (Shcherbatykh A.A., Chernov'yants M.S. Study of antithyroid and antioxidant properties of cysteine, glutathione, and methionine by spectrophotometry and high performance liquid chromatography // *J. Anal. Chem.* 2021. V. 76. № 4. P. 476.)
3. Jones D.P., Liang Y. Measuring the poise of thiol/disulfide couples in vivo // *Free Radical Biol. Med.* 2009. V. 47. № 10. P. 1329.
4. Dröge W., Hack V., Breitkreutz R., Holm E., Shubinsky G., Schmid E., Galter D. Role of cysteine and glutathione in signal transduction, immunopathology and cachexia // *BioFactors* (Oxford, England). 1998. V. 8. № 1–2. P. 97.
5. Yang Y., Feng Y., Qiu F., Iqbal K., Wang Y., Song X., Wang Y., Zhang G., Liu W. Dual-site and dual-excitation fluorescent probe that can be tuned for discriminative detection of cysteine, homocystein, and thiophenols // *Anal. Chem.* 2018. V. 90. № 23. P. 14048.
6. Głowacki R., Borowczyk K., Bald E. Fast analysis of wine for total homocysteine content by high-performance liquid chromatography // *Amino Acids*. 2012. V. 42. № 1. P. 247.
7. Yue Y., Huo F., Ning P., Zhang Y., Chao J., Meng X., Yin C. Dual-site fluorescent probe for visualizing the metabolism of CYS in living cells // *J. Am. Chem. Soc.* 2017. V. 139. № 8. P. 3181.
8. 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. № 2. P. 143.
9. Seshadri S., Beiser A., Selhub J., Jacques P.F., Rosenberg I.H., D'Agostino R.B., Wilson P.W.F., Wolf P.A. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease // *The New England J. Med.* 2002. V. 346. № 7. P. 476.
10. Gao Q., Zhang W., Song B., Zhang R., Guo W., Yuan J. Development of a novel lysosome-targeted ruthenium(II) complex for phosphorescence/time-gated luminescence assay of biothiols // *Anal. Chem.* 2017. V. 89. № 8. P. 4517.
11. Zhang Q., Ding S., Zhai Q., Feng G. Highly sensitive and selective detection of biothiols by a new low dose colorimetric and fluorescent probe // *RSC Adv.* 2015. V. 5. № 77. P. 62325.
12. Jia L., Niu L.-Y., Yang Q.-Z. Fluorescent probe for simultaneous discrimination of GSH, Cys, and SO₂ derivatives // *Anal. Chem.* 2020. V. 92. № 15. P. 10800.
13. Zhang M., Wang L., Zhao Y., Wang F., Wu J., Liang G. Using bioluminescence turn-on to detect cysteine in vitro and in vivo // *Anal. Chem.* 2018. V. 90. № 8. P. 4951.
14. Liang S.-C., Wang H., Zhang Z.-M., Zhang H.-S. Determination of thiol by high-performance liquid chromatography and fluorescence detection with 5-methyl-(2-(m-iodoacetylaminophenyl)benzoxazole // *Anal. Bioanal. Chem.* 2005. V. 381. № 5. P. 1095.

15. Ševčíková P., Glatz Z., Tomandl J. Determination of homocysteine in human plasma by micellar electrokinetic chromatography and in-capillary detection reaction with 2,2'-dipyridyl disulfide // *J. Chromatogr. A*. 2003. V. 990. № 1–2. P. 197.
16. Yuan W., Edwards J.L. Thiol metabolomics of endothelial cells using capillary liquid chromatography mass spectrometry with isotope coded affinity tags // *J. Chromatogr. A*. 2011. V. 1218. № 18. P. 2561.
17. Głowacki R., Stachniuk J., Borowczyk K., Jakubowski H. Quantification of homocysteine and cysteine by derivatization with pyridoxal 5'-phosphate and hydrophilic interaction liquid chromatography // *Anal. Bioanal. Chem.* 2016. V. 408. № 7. P. 1935.
18. Shcherbatykh A.A., Chernov'yants M.S., Popov L.D. Determination of low molecular thiols and protein sulfhydryl groups using heterocyclic disulfides // *Amino Acids*. 2022. V. 54. P. 469.
19. Shao N., Jin J., Wang H., Zheng J., Yang R., Chan W., Abliz Z. Design of bis-spiropyran ligands as dipolar molecule receptors and application to in vivo glutathione fluorescent probes // *J. Am. Chem. Soc.* 2010. V. 132. № 2. P. 725.
20. Волошин Н.А., Чернышев А.В., Безуглый С.О., Метелица А.В., Волошина Е.Н., Минкин В.И. Spiropyrans and spirooxazines // *Russ. Chem. Bull.* 2008. V. 57. № 1. P. 151.)
21. Распопова Е.А., Морозов А.Н., Буланов А.О., Попов Л.Д., Щербаков И.Н., Левченков С.И., Коган В.А. Новая лигандная система на основе ферроценоил-гидразона 7'-гидрокси-3-метил-8'-формил-3,4-дигидро-2Н-1,3-бензоксазин-2-спиро-2(Н)-хромена // *Журн. общ. химии*. 2012. Т. 82. № 8. С. 1396. (Raspopova E.A., Morozov A.N., Bulanov A.O., Popov L.D., Shcherbakov I.N., Levchenkov S.I., Kogan V.A. A new ligand system based on 7'-hydroxy-3-methyl-8'-formyl-3,4-dihydro-2H-1,3-benzoxazine-2-spiro-2(H)-chromene Ferrocenoylhydrazone // *Russ. J. Gen. Chem.* 2012. V. 82. № 8. P. 1457.)
22. Chernyshev A.V., Rostovtseva I.A., Burov O.N., Popov L.D., Morozov A.N., Kletskii M.E., Bulanov A.O., Gaeva E.B., Metelitsa A.V. Hydrogen bond effect of the photoswitching of a spiropyran dyad // *J. Photochem. Photobiol. A*. 2020. V. 398. Article 112611.
23. Feuerstein T.J., Müller R., Barner-Kowollik C., Roesky P.W. Investigating the photochemistry of spiropyran metal complexes with online LED-NMR // *Inorg. Chem.* 2019. V. 58. № 22. P. 15479.
24. Liu Y., Fan M., Zhang S., Sheng X., Yao J. Basic amino acid induced isomerization of a spiropyran: Towards visual recognition of basic amino acids in water // *New J. Chem.* 2007. V. 31. № 11. P. 1878.
25. Garcia J., Addison J.B., Liu S.Z., Lu S., Faulkner A.L., Hodur B.M., Balmond E.I., Or V.W., Yun J.H., Trevino K., Shen B., Shaw J.T., Frank N.L., Louie A.Y. Antioxidant sensing by spiropyrans: Substituent effects and NMR spectroscopic studies // *J. Phys. Chem. B*. 2019. V. 123. № 31. P. 6799.
26. Li Y., Duan Y., Li J., Zheng J., Yu H., Yang R. Simultaneous nucleophilic-substituted and electrostatic interactions for thermal switching of spiropyran: A new approach for rapid and selective colorimetric detection of thiol-containing amino acids // *Anal. Chem.* 2012. V. 84. № 11. P. 4732.
27. Shcherbakov I.N., Bulanov A.O., Revinskii Y.V., Popov L.D. Conjugated prototropic and ring opening rearrangements in Schiff base derivatives of formyl functionalized 2-oxaindane series spiropyran: Synthesis, NMR, IR, UV/Vis, and DFT study // *Struct. Chem.* 2019. V. 30. № 4. P. 1381.
28. Попов Л.Д., Буланов А.О., Распопова Е.А., Морозов А.Н., Щербаков И.Н., Кобелева О.И., Валова Т.М., Барачевский В.А. Синтез новых спиропиранов и исследование влияния природы заместителей на их фотохромизм и комплексообразование // *Журн. общ. химии*. 2013. Т. 83. № 6. С. 980. (Popov L.D., Bulanov A.O., Raspopova E.A., Morozov A.N., Shcherbakov I.N., Kobeleva O.I., Valova T.M., Barachevskii V.A. Synthesis of new spiropyrans and study of the effect of the nature of substituents on their photochromism and complexation // *Russ. J. Gen. Chem.* 2013. V. 83. № 6. P. 1111.)
29. Попов Л.Д., Щербаков И.Н., Буланов А.О., Шашева Е.Ю., Ткаченко Ю.Н., Кобелева О.И., Валова Т.М., Барачевский В.А. Синтез, фотохромные свойства и комплексообразование с ионами металлов гидразонов на основе спиропирана оксаинданового ряда // *Журн. общ. химии*. 2012. Т. 82. № 8. С. 1362. (Popov L.D., Shcherbakov I.A., Bulanov A.O., Shasheva E.Y., Tkachenko Y.N., Kobeleva O.I., Vyalova T.M., Barachevskii V.A. Synthesis, photochromic properties, and complex formation with metal ions of hydrazones based on a spiropyran of oxaindane series // *Russ. J. Gen. Chem.* 2012. V. 82. № 8. P. 1432.)
30. Bulanov A.O., Shcherbakov I.N., Popov L.D., Shasheva E.Y., Belikov P.A., Starikova Z.A. Novel hydrazone derivatives of 7-hydroxy-3',3'-dimethyl-3'H-spirochromene-2,1'-isobenzofuran-8-carbaldehyde // *Acta Crystallogr. C: Struct. Chem.* 2011. V. C67. Pt 3. P. o85.
31. Bulanov A.O., Shcherbakov I.N., Tupolova Y.P., Popov L.D., Lukov V.V., Kogan V.A., Belikov P.A. A novel chelatoform functionalized spiropyran of the 2-oxaindane series // *Acta Crystallogr. C: Struct. Chem.* 2009. V. C65. Pt 12. P. o618.

УДК 543.4

Посвящается 300-летию Санкт-Петербургского государственного университета

АВТОМАТИЗИРОВАННАЯ ЖИДКОСТНАЯ МИКРОЭКСТРАКЦИЯ ФТОРХИНОЛОНОВ ДЛЯ ИХ ПОСЛЕДУЮЩЕГО ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ

© 2023 г. И. И. Тимофеева^а, К. А. Барбаянов^а, А. В. Булатов^а

^аСанкт-Петербургский государственный университет, Институт химии
Университетский просп., 26, Санкт-Петербург, 198504 Россия

*e-mail: i.i.timofeeva@spbu.ru, timofeeva.irina.7@gmail.com

Поступила в редакцию 30.04.2022 г.

После доработки 11.07.2022 г.

Принята к публикации 19.07.2022 г.

Разработан автоматизированный способ дисперсионной жидкостной микроэкстракции антибиотиков фторхинолонового ряда на принципах циклического инъекционного анализа. Способ предполагает диспергирование экстрагента газовой фазой, которая образуется *in situ* в экстракционной камере проточного анализатора. В качестве экстрагента для выделения и концентрирования фторхинолонов изучен глубокий эвтектический растворитель на основе терпеноида и смеси гидрофильной и гидрофобной карбоновых кислот, и обоснована возможность его применения. Гидрофильная карбоновая кислота в составе экстрагента выступает донором протонов для образования углекислого газа-диспергатора в присутствии растворенного в водной фазе карбоната натрия. На примере определения фторхинолонов в сточных водах показана возможность сочетания разработанного способа с методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуориметрическим детектированием. Пределы обнаружения (3σ) для офлоксацина, флероксацина и норфлоксацина составили 0.3 мкг/л.

Ключевые слова: дисперсионная жидкостная микроэкстракция, автоматизация, фторхинолоны, глубокий эвтектический растворитель, сточные воды, жидкостная хроматография.

DOI: 10.31857/S0044450223020135, **EDN:** AUSOSY

Как правило, инструментальный химический анализ проб сложного состава включает процедуры разделения и концентрирования с целью устранения мешающего влияния матричных компонентов проб и снижения пределов обнаружения целевых аналитов. Однако такая пробоподготовка остается наиболее длительной и трудоемкой в общей схеме химического анализа и предполагает большой расход реагентов и проб на ее выполнение.

Новые возможности для инструментального химического анализа открыли методы жидкостной микроэкстракции, обеспечивающие возможность эффективного предконцентрирования целевых аналитов, миниатюризацию и экологическую безопасность пробоподготовки [1–3]. Миниатюризация состоит в уменьшении масштабов процедур на всех стадиях выполнения анализа с целью снижения расходов проб, реагентов и образующихся отходов и, как следствие, повышения его экологической безопасности. По-

высить экспрессность жидкостной микроэкстракции возможно путем ее автоматизации на принципах проточных методов, в которых основной акцент сделан на замену ручных рутинных процедур, составляющих основу стадии пробоподготовки, простыми легко автоматизируемыми операциями объединения и смешения потоков пробы, растворов реагентов и экстрагентов [4–6].

В последнее время особое внимание уделяют поиску и разработке новых эффективных экстракционных систем для выделения различных классов аналитов, в том числе в условиях проточного анализа [7]. К “зеленым” экстрагентам последнего поколения относят глубокие эвтектические растворители (ГЭР) [8, 9]. Такие экстрагенты состоят из двух или более прекурсоров, которые способны образовывать между собой водородные связи, что приводит к существенному снижению температуры плавления ГЭР по сравнению с температурами плавления исходных компонентов. Как правило, ГЭР находятся в

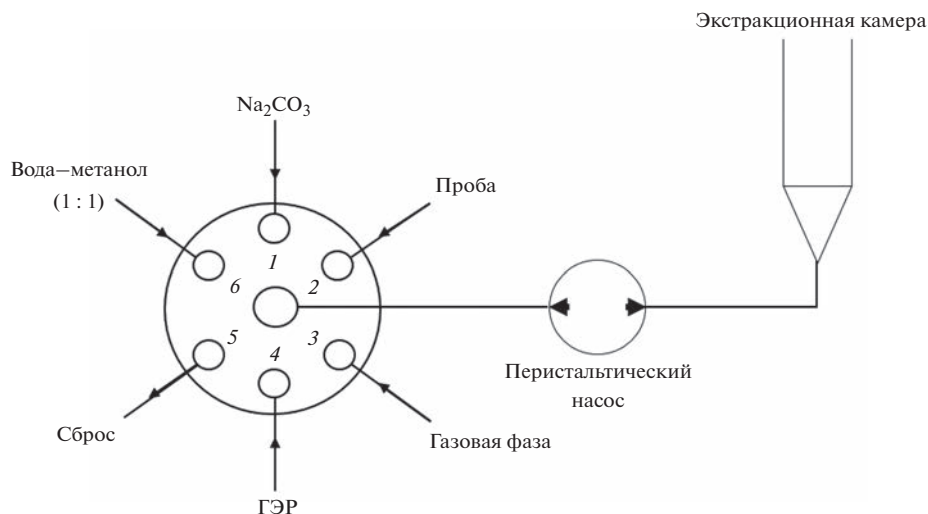


Рис. 1. Гидравлическая схема для автоматизации дисперсионной жидкостной микроэкстракции.

жидком состоянии при нормальных условиях. Комбинируя прекурсоры ГЭР можно получать “дизайнерские” гидрофобные [10] и гидрофильные [11] растворители с требуемыми экстракционными свойствами.

Фторхинолоны находят обширное применение при фармакотерапии широкого круга заболеваний человека и животных. Выведение фторхинолонов и их метаболитов из организма осуществляется почками, главным образом в неизменном виде [12], поэтому фторхинолоны попадают в сточные воды и загрязняют объекты окружающей среды. Важной задачей является разработка экспрессных и чувствительных способов определения антибиотиков в сточных водах.

Цель данной работы – разработка автоматизированного способа дисперсионной жидкостной микроэкстракции в ГЭР, реализуемого на принципах циклического инъекционного анализа (ЦИА). Способ предполагает диспергирование экстрагента газовой фазой (углекислым газом), которая образуется *in situ* в экстракционной камере проточного анализатора. С целью подтверждения эффективности предложенного способа дисперсионной жидкостной микроэкстракции изучали возможность выделения антибиотиков фторхинолонового ряда (офлоксацина, флероксацина и норфлоксацина) из проб сточных вод для последующего их определения методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуориметрическим детектированием (ВЭЖХ-ФД).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Рабочие растворы фторхинолонов (офлоксацина, флероксацина и норфлоксацина) готовили непосредственно перед работой последователь-

ным разбавлением деионизованной водой стандартного раствора (1.0 мг/л), полученного растворением соответствующих навесок аналитов в 0.01 М растворе NaOH. Стандартный раствор фторхинолонов устойчив при хранении в закрытом сосуде в холодильнике при 5°C в течение одного месяца.

Глубокие эвтектические растворители готовили в стеклянном стакане путем смешивания 1 мл гептановой кислоты, 22.4 г расплавленного ментола и 13 мл муравьиной кислоты. Смесь хранили в закрытом сосуде в холодильнике при 5°C.

Фосфатный буферный раствор (pH 6.4) готовили перед анализом путем смешивания 0.05 М раствора Na_2HPO_4 и 0.05 М раствора NaH_2PO_4 в соотношении 1 : 3.

Все реактивы имели квалификацию не ниже ч. д. а.

Пробы сточных вод получали из ГУП “Водоканал Санкт-Петербурга”. Перед анализом все пробы предварительно фильтровали через фильтр “синяя лента”.

Гидравлическая схема ЦИА (рис. 1) включала: соленоидный кран-переключатель (Cole-Parmer, США); перистальтический насос (MasterFlex L/S, Cole-Parmer, США), обеспечивающий реверс направления потока (скорость потока – от 0.5 до 6.0 мл/мин); экстракционную камеру – полипропиленовую трубку конусообразной формы объемом 5 мл; трубки для коммуникаций из политетрафторэтилена (внутренний диаметр 0.5 мм). Система управлялась с помощью компьютера.

Хроматографический анализ выполняли с помощью жидкостного хроматографа с флуориметрическим детектором LC-20 (Shimadzu, Япония). Для определения фторхинолонов устанавливали длины волн возбуждения и флуоресценции 278 и

466 нм соответственно. Хроматографическое разделение осуществляли на колонке Luna C18 (250 × 4.6 мм, размер частиц 5 мкм, Phenomenex, США) в изократическом режиме при 40°C. Подвижная фаза представляла собой смесь метанола и фосфатного буферного раствора (рН 6.4) в соотношении 45 : 55. Скорость потока подвижной фазы составляла 0.7 мл/мин. Времена удерживания норфлоксацина, флероксацина и офлоксацина составляли 6.3, 9.7 и 11.3 мин соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На предварительном этапе для микроэкстракционного выделения фторхинолонов в статических условиях изучали возможность применения гидрофобных ГЭР на основе тимола и гептановой кислоты с различным соотношением прекурсоров. Тимол широко применяется в качестве акцептора водородной связи для приготвления устойчивых в водной фазе ГЭР [13]. Гептановую кислоту выбрали в качестве донора водородной связи, поскольку она обеспечивает возможность получения менее вязких ГЭР по сравнению с более длинноцепочечными карбоновыми кислотами. Высокая вязкость растворителей ограничивает их применение в проточном анализе. ГЭР и водный раствор анализов (200 мкг/л) встряхивали при соотношении фаз 1 : 30 в течение 5 мин, после чего выполняли хроматографический анализ полученных фаз. Установили, что максимальные степени извлечения наблюдаются при мольном соотношении гептановой кислоты и тимола 1 : 2 соответственно (рис. 2).

Для автоматизации дисперсионной жидкостной микроэкстракции фторхинолонов в ГЭР разработали гидравлическую схему (рис. 1), которая предполагает коммутацию крана-переключателя, перистальтического насоса и сообщающейся с атмосферой экстракционной камеры. Схема обеспечивает возможность диспергирования фазы ГЭР потоком углекислого газа, который образуется в результате химической реакции гидрокарбонат-ионов с прекурсором ГЭР непосредственно в экстракционной камере.

Учитывая необходимость в доноре протонов для реакции образования углекислого газа в присутствии гидрокарбонат-ионов, в состав ГЭР на основе гептановой кислоты и тимола (1 : 2) вводили муравьиную/уксусную кислоту, которая растворяется и в водной фазе, и в фазе ГЭР. Муравьиную/уксусную кислоту вводили в ГЭР в количествах, необходимых для полной нейтрализации водной фазы, чтобы обеспечить условия для извлечения молекулярных форм анализов. Установили, что в присутствии муравьиной кислоты наблюдается более интенсивное выделение углекислого газа и перемешивание фаз (диспергирование) в экстракционной камере, так как этот прекурсор ГЭР явля-

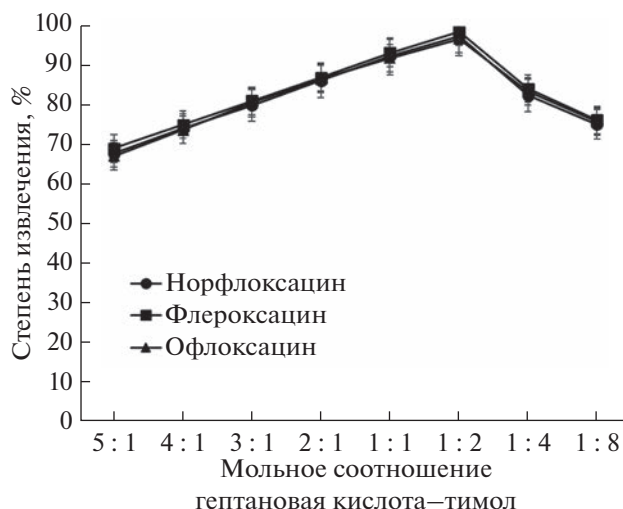


Рис. 2. Влияние состава глубокого эвтектического растворителя на эффективность экстракции фторхинолонов (концентрация анализов 200 мкг/л).

ется более сильной кислотой, чем уксусная (pK_a 3.75 и 4.76 соответственно).

Карбонат натрия использовали как источник гидрокарбонат-ионов в растворе пробы. Для оптимизации концентрации карбоната натрия в водной фазе проводили серию экспериментов в условиях ЦИА. В экстракционной камере последовательно смешивали 2 М раствор Na_2CO_3 (0.6, 1.3, 1.9, 2.5, 3.1 мл) с водным раствором антибиотиков (4.4, 3.7, 3.1, 2.5, 1.9 мл). Далее в экстракционную камеру подавали ГЭР на основе тимола и гептановой кислоты (100 мкл; мольное соотношение 1 : 2) и муравьиной кислоты (от 100 до 490 мкл). Результаты, представленные на рис. 3, показывают, что оптимальная концентрация Na_2CO_3 составляет 0.75 М, так как, начиная с этой концентрации, степени извлечения анализов достигают максимального значения, и дальнейшее увеличение концентрации реагента не влияет на эффективность массопереноса.

Объем пробы влияет на соотношение фаз и достигаемые коэффициенты концентрирования. С целью снижения пределов обнаружения изучили возможность увеличения соотношения объемов фаз. Для этого в экстракционную камеру последовательно подавали порции 2 М раствора Na_2CO_3 и водного раствора анализов в различных соотношениях, получая в результате от 1 до 5 мл водной фазы с постоянными концентрациями Na_2CO_3 (0.75 М) и анализов (200 мкг/л). Далее к полученному раствору добавляли трехкомпонентный ГЭР, состоящий из тимола и гептановой кислоты (мольное соотношение 1 : 2) и муравьиной кислоты (от 60 до 295 мкл). Как видно из рис. 4, объем водной фазы 5 мл обеспечивает мак-

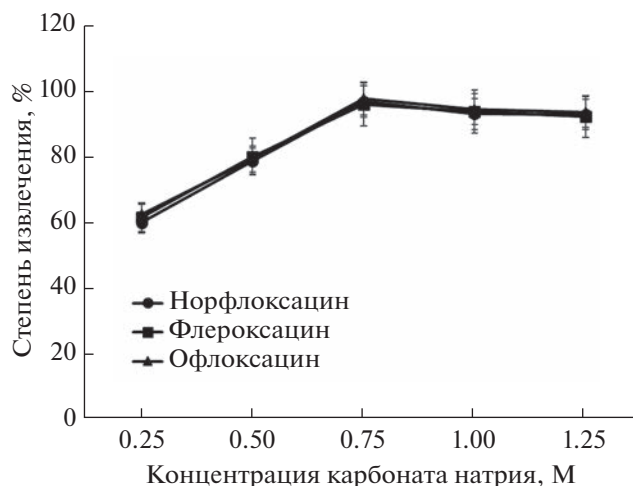


Рис. 3. Влияние концентрации карбоната натрия на эффективность экстракции фторхинолонов (концентрация аналитов 200 мкг/л).

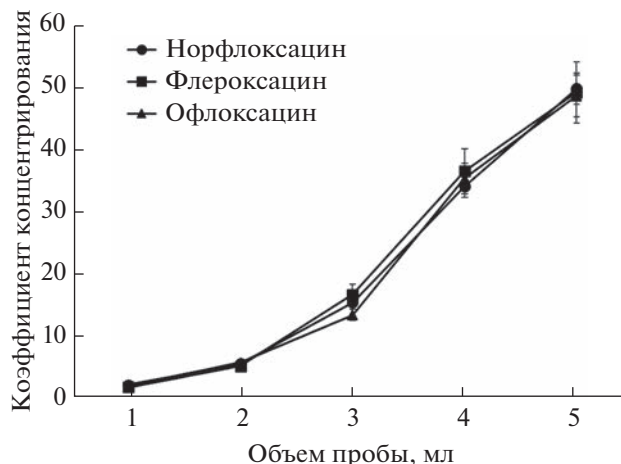


Рис. 4. Влияние объема пробы на эффективность экстракции фторхинолонов (концентрация аналитов 200 мкг/л).

симальные коэффициенты концентрирования. Дальнейшее увеличение объема пробы невозможно, так как при этом происходит частичное растворение фазы экстрагента в пробе, что затрудняет отбор органической фазы и приводит к невоспроизводимым результатам.

Изучали влияние времени разделения фаз в экстракционной камере на прецизионность в интервале от 30 с до 10 мин. При этом дополнительно в экстракционную камеру подавали поток атмосферного воздуха (скорость потока 3.0 мл/мин), который инициировал разрушение эмульсии. При перемешивании фаз в течение менее 5 мин значения s_r составляли от 20 до 45%. Для воспроизводимого

разделения фаз требовался барботаж в течение 5 мин, при этом $s_r \leq 10\%$.

На основании полученных результатов разработали способ определения фторхинолонов в водных средах. На первом этапе с помощью перистальтического насоса через кран-переключатель в экстракционную камеру подавали 1.9 мл 2 М раствора Na_2CO_3 (канал 1) и 3.1 мл пробы (канал 2). Для перемешивания двух растворов в камеру в течение 20 с подавали атмосферный воздух (канал 3). Далее вводили 390 мкл ГЭР (гептановая кислота, ментол и муравьиная кислота, 1 : 2 : 48) (канал 4), после чего подавали атмосферный воздух в течение 5 мин. Скорость потоков составляла 3.0 мл/мин. На втором этапе (после разделения фаз) с помощью перистальтического насоса выполняли слив нижней (водной) фазы из камеры, а фазу экстракта перекачивали в вialу для последующего ВЭЖХ-ФД-анализа. На заключительном этапе проводили промывку всех коммуникаций системы смесью метанола и дистиллированной воды (1 : 1) (канал 6).

Для построения градуировочных зависимостей (рис. 5) использовали стандартные растворы аналитов, которые проводили через все стадии микроэкстракции. Способ обеспечил диапазоны определяемых концентраций офлоксацина, флероксацина и норфлоксацина от 1 до 200 мкг/л при объеме пробы 5 мл. Пределы обнаружения (3σ) для всех аналитов составили 0.3 мкг/л, пределы определения (10σ) для всех аналитов — 1 мкг/л. Для этого уровня концентраций соотношение сигнал/шум составило 8, 11 и 16 для норфлоксацина, флероксацина и офлоксацина соответственно. Относительная неисключенная систематическая погрешность для уровня концентраций аналитов 1 мкг/л не превышала $\pm 20\%$ ($P =$

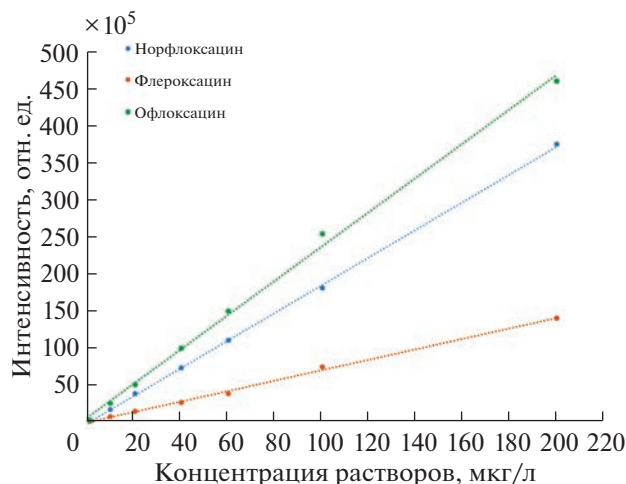


Рис. 5. Градуировочные графики для хроматографического определения фторхинолонов.

Таблица 1. Результаты анализа сточных вод ($n = 3$, $P = 0.95$)

Образец сточной воды	Аналит	Введено, мкг/л	Найдено, мкг/л	Относительная степень извлечения, %
№ 1	Норфлоксацин	0	<ПО*	
		15	12.1 ± 1.2	81
		30	25.0 ± 1.5	83
		45	38.6 ± 1.9	86
	Флероксацин	0	<ПО	
		15	13.5 ± 1.4	90
		30	24.4 ± 0.8	81
		45	38.7 ± 2.1	86
	Офлоксацин	0	<ПО	
		15	13.2 ± 0.9	88
		30	25.6 ± 1.2	85
		45	37.4 ± 0.9	83
№ 2	Норфлоксацин	0	<ПО	
		15	14.7 ± 0.8	98
		30	27.1 ± 1.0	90
		45	41.7 ± 1.5	93
	Флероксацин	0	<ПО	
		15	13.7 ± 0.7	91
		30	28.6 ± 1.3	95
		45	40.5 ± 1.0	90
	Офлоксацин	0	<ПО	
		15	14.8 ± 0.9	99
		30	27.7 ± 0.6	92
		45	41.2 ± 1.4	92
№ 3	Норфлоксацин	0	<ПО	
		15	12.6 ± 0.7	84
		30	24.7 ± 1.2	82
		45	40.0 ± 1.4	89
	Флероксацин	0	<ПО	
		15	13.4 ± 1.1	89
		30	26.0 ± 0.9	87
		45	39.7 ± 1.3	88
	Офлоксацин	0	<ПО	
		15	13.9 ± 0.6	93
		30	26.7 ± 1.0	89
		45	37.3 ± 0.6	83

* Предел обнаружения.

= 0.95). При этом значения s_r внутрилабораторной прецизионности не превышали 9% ($n = 6$). Производительность пробоподготовки — 10 проб в час. Время хроматографического анализа — 20 мин. Способ позволил исключить ручные манипуляции и стадию центрифугирования.

Аналитические возможности способа подтверждены при анализе сточных вод. В пробах антибиотиков не были обнаружены (табл. 1). Правильность полученных результатов проверяли методом введено—найденно. Хроматограммы, полученные при анализе сточной воды с различными

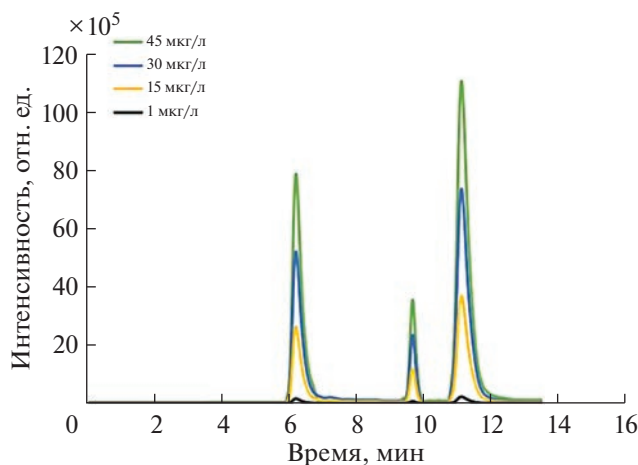


Рис. 6. Хроматограммы, полученные при анализе сточной воды с добавками фторхинолонов (времена удерживания норфлоксацина, флероксацина и офлоксацина: 6.3, 9.7 и 11.3 мин соответственно).

ми добавками офлоксацина, флероксацина и норфлоксацина, представлены на рис. 6. Относительную степень извлечения фторхинолонов рассчитывали по формуле:

$$R = \frac{c_{\text{с добавкой}} - c_{\text{добавки}}}{c_{\text{без добавки}}} \times 100\%,$$

где $c_{\text{с добавкой}}$ — концентрация аналита в пробе с введенной в нее добавкой, $c_{\text{добавки}}$ — концентрация введенной в пробу добавки, $c_{\text{без добавки}}$ — концентрация аналита в пробе.

Относительная степень извлечения превышала 81%, что подтверждает отсутствие существенного мешающего влияния компонентов матрицы на извлечение и определение аналитов. В соответствии с данными [14] для уровня концентраций аналита 10 мкг/л значение относительной степени извлечения в диапазоне от 60 до 115% является допустимым.

Разработан автоматизированный способ дисперсионной жидкостной микроэкстракции, основанный на диспергировании глубокого эвтектического растворителя потоком углекислого газа, который образуется в результате химической реакции. Представлена гидравлическая схема для реализации дисперсионной жидкостной микроэкстракции на принципах циклического инъекционного анализа. Для микроэкстракционного выделения офлоксацина, флероксацина и норфлоксацина изучена возможность применения глубокого эвтектического растворителя на основе ментола, гептановой и муравьиной кислот. Предложенный способ определения фторхинолонов в

сточных водах обеспечивает пределы обнаружения (0.3 мкг/л), сопоставимые с приведенными в работах [15–17]. В отличие от описанных ранее способов дисперсионной микроэкстракции, разработанный способ исключает необходимость применения токсичных экстрагентов, полярных растворителей для диспергирования экстрагентов и центрифугирования для разделения фаз.

Авторы выражают благодарность РНФ (№ 21-13-00020, <https://rscf.ru/project/21-13-00020/>) за финансовую поддержку в проводимых исследованиях, а также ГУП «Водоканал Санкт-Петербурга» за предоставленные пробы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Крылов В.А., Крылов А.В., Мосягин П.В., Маткивская Ю.О. Жидкофазное микроэкстракционное концентрирование примесей // Журн. аналит. химии. 2011. Т. 66. С. 341.
2. Дмитриенко С.Г., Аняри В.В., Толмачева В.В., Горбунова М.В. Жидкостная экстракция органических соединений в каплю экстрагента. Обзор обзоров // Журн. аналит. химии. 2021. Т. 76. № 8. С. 675. <https://doi.org/10.31857/S0044450221080041>
3. Дмитриенко С.Г., Аняри В.В., Толмачева В.В., Горбунова М.В. Дисперсионная жидкостно-жидкостная микроэкстракция органических соединений. Обзор обзоров // Журн. аналит. химии. 2020. Т. 75. № 10. С. 867. <https://doi.org/10.31857/S0044450220100059>
4. Золотов Ю.А. Проточный химический анализ: монография. М.: Наука, 2014. 428 с.
5. Цизин Г.И., Статкус М.А., Золотов Ю.А. Сорбционное и экстракционное концентрирование микрокомпонентов в проточных системах анализа // Журн. аналит. химии. 2015. Т. 70. № 11. С. 1123.
6. Vakh C., Falkova M., Timofeeva I., Moskvina A., Moskvina L., Bulatov A. Flow analysis: A novel approach for classification // Crit. Rev. Anal. Chem. 2016. V. 46 P. 374. <https://doi.org/10.1080/10408347.2015.1087301>
7. Вах К.С., Тимофеева И.И., Булатов А.В. Автоматизация микроэкстракционного концентрирования на принципах циклического инъекционного анализа // Журн. аналит. химии. 2019. Т. 74. № 11. С. 846. <https://doi.org/10.1134/S106193481911011X>
8. Smith E.L., Abbott A.P., Ryder K.S. Deep eutectic solvents (DESs) and their applications // Chem. Rev. 2014. V. 114. № 21. P. 11060. <https://doi.org/10.1021/cr300162p>
9. Shishov A., Bulatov A., Locatelli M., Carradori S., Andrich V. Application of deep eutectic solvents in analytical chemistry. A review // Microchem. J. 2017. V. 135. P. 33. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.07.015>
10. Cao J., Su E. Hydrophobic deep eutectic solvents: The new generation of green solvents for diversified and colorful applications in green chemistry // J. Clean. Prod. 2021. V. 314. Article 127965. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.127965>

11. *Ma Y., Wang Q., Zhu T.* Comparison of hydrophilic and hydrophobic deep eutectic solvents for pretreatment determination of sulfonamides from aqueous environments // *Anal. Methods*. 2019. V. 11. P. 5901. <https://doi.org/10.1039/C9AY02244A>
12. *Turnidge J.* Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fluoroquinolones // *Drugs*. 1999. V. 58. P. 29. <https://doi.org/10.2165/00003495-199958002-00006>
13. *Martins M.A.R., Crespo E.A., Pontes P.V.A., Silva L.P., Bülow M., Maximo G.J., Batista E.A.C., Held C., Pinho S.P., Coutinho J.A.P.* Tunable hydrophobic eutectic solvents based on terpenes and monocarboxylic acid // *ACS Sustain. Chem. Eng.* 2018. V. 6. P. 8836. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b01203>
14. *Taverniers I., De Loose M., Van Bockstaele E.* Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance // *Trends Anal. Chem.* 2004. V. 23. P. 535. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.04.001>
15. *Herrera-Herrera A.V., Hernández-Borges J., Borges-Miquel T.M., Rodríguez-Delgado M.Á.* Dispersive liquid-liquid microextraction combined with ultra-high performance liquid chromatography for the simultaneous determination of 25 sulfonamide and quinolone antibiotics in water samples // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2013. V. 75. P. 130. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.11.026>
16. *Selahle S.K., Nomngongo P.N.* Determination of fluoroquinolones in the environmental samples using vortex assisted dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography // *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 2020. V. 100. P. 282. <https://doi.org/10.1080/03067319.2019.1636042>
17. *Herrera-Herrera A.V., Hernández-Borges J., Borges-Miquel T.M., Rodríguez-Delgado M.Á.* Dispersive liquid-liquid microextraction combined with nonaqueous capillary electrophoresis for the determination of fluoroquinolone antibiotics in waters // *Electrophoresis*. 2010. V. 31. P. 3457. <https://doi.org/10.1002/elps.201000285>

УДК 543.544.3:547.574.3

ОБ УСТОЙЧИВОСТИ НЕЗАМЕЩЕННЫХ ГИДРАЗОНОВ АРОМАТИЧЕСКИХ КАРБОНИЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ К ГИДРОЛИЗУ В УСЛОВИЯХ ОБРАЩЕННО-ФАЗОВОЙ ВЭЖХ

© 2023 г. А. Деруиш^а, Г. В. Каракашев^б, А. И. Уколов^б, И. Г. Зенкевич^{а, *}

^аСанкт-Петербургский государственный университет, Институт химии
Университетский просп., 26, Санкт-Петербург, 198504 Россия

^бНаучно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека
Федерального медико-биологического агентства России
г.п. Кузьмолковский, ст. Капитолово 93, Ленинградская обл., 188663 Россия

*e-mail: izenkevich@yandex.ru

Поступила в редакцию 30.06.2022 г.

После доработки 14.07.2022 г.

Принята к публикации 14.07.2022 г.

Соединения ряда незамещенных гидразонов $RR'C=NNH_2$ отличаются нестабильностью в ходе газохроматографического разделения. Проверка их устойчивости к гидролизу в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ показала, что гидразоны ароматических кетонов стабильны. В отличие от них, гидразоны альдегидов оказались стабильными в системах метанол–вода при их нейтральной реакции (при отсутствии кислых модификаторов). В системах же ацетонитрил–вода, содержащих 0.1% муравьиной кислоты, стабильны только гидразоны ароматических кетонов, тогда как производные альдегидов полностью гидролизуются. Эту особенность необходимо принимать во внимание при определении других соединений этого класса. Для выявления гидролиза аналитов сопоставлены индексы удерживания исходных карбонильных соединений и гидразонов при разных соотношениях объемов органических модификаторов и водных фаз и различных значениях pH элюента, относительные оптические плотности характеризуемых компонентов $A(254/220) = A(254)/A(220)$, а также данные хромато–масс–спектрометрического анализа.

Ключевые слова: незамещенные гидразоны ароматических карбонильных соединений, обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография, нестабильность аналитов в процессе разделения.

DOI: 10.31857/S0044450223020032, EDN: CEGSOJ

Нестабильность химических соединений осложняет многие экспериментальные операции с ними. Для подобных объектов надежные значения аналитических параметров часто отсутствуют, что затрудняет их идентификацию. С другой стороны, именно отсутствие справочной информации является одним из признаков нестабильности аналитов. Помимо нестабильности исходных образцов (взаимодействие компонентов анализируемых проб между собой), возможности хроматографического анализа дополнительно ограничены нестабильностью аналитов в процессе их хроматографического разделения [1]. В газовой хроматографии основной причиной является термическое разложение аналитов, а в высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) — их

гидролиз. Поскольку этими факторами обусловлена значительная часть ошибок и парадоксов интерпретации результатов [2], подобные примеры, несомненно, заслуживают специального рассмотрения.

Нестабильность присуща даже относительно несложным соединениям, например незамещенным гидразонам алифатических и ароматических альдегидов и кетонов ($RR'C=N-NH_2$). Такие гидразоны синтетически легко доступны и образуются при взаимодействии карбонильных соединений с гидразином (или гидразин-гидратом). При избытке карбонильных соединений становится значимым параллельное образование азидов (схема 1):

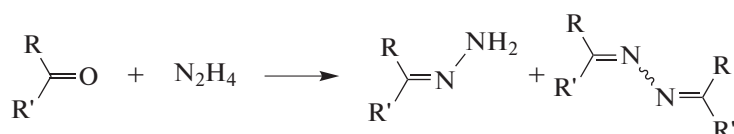


Схема 1. Взаимодействие карбонильных соединений с гидразином.

Соединения этого класса хорошо известны и являются, например, промежуточными продуктами при восстановлении карбонильных соединений гидразин-гидратом до изоструктурных углеводородов (реакция Кижнера–Вольфа) [3–5]. Однако в базе NIST [6], как ни удивительно, содержатся сведения лишь об одном из простейших представителей этого класса – гидразоне ацетона. Известно всего одно значение его газохроматографического индекса удерживания на стандартных неполярных полидиметилсилоксановых неподвижных фазах, определенное с большой погрешностью (700 ± 24). Если же обратить внимание на доступные справочные значения нормальной температуры кипения этого гидразона (по разным данным они составляют 124–125, 114–116, 122–126, 128–131, 110.5°C и т.п.), то их

значительный разброс свидетельствует о термической нестабильности этого соединения. Даже в процессе хранения при комнатной температуре незамещенные гидразоны постепенно превращаются в более стабильные азины. Поэтому неудивительно, что проверка возможностей газохроматографического разделения как алифатических, так и ароматических соединений этого класса подтвердила их разложение в хроматографической колонке [7]. Примечательно, что этот процесс, в отличие от большинства других примеров термической деструкции аналитов, представляет собой бимолекулярную реакцию второго порядка, а образующийся при этом гидразин способен вступать во вторичные взаимодействия с другими компонентами анализируемых образцов (схема 2):

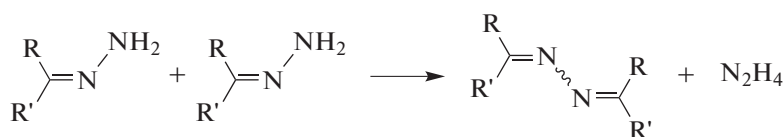


Схема 2. Схема разложения незамещенных гидразонов с образованием азинов.

Результатом протекания подобных процессов оказывается искажение формы хроматографических пиков и аномальные контуры хроматограмм. Если компонент А превращается в компонент Б (или наоборот), то между их пиками может регистрироваться размытая зона Z (“шлейф”, “плато” и т.п.), как это условно изображено на рис. 1. Аналогичный вид имеют хроматограммы соединений, способных к таутомерным превращениям в ходе хроматографического разделения [8].

Подобные профили хроматограмм нестабильных в условиях разделения аналитов сходны как в газовой хроматографии, так и в обращенно-фазовой ВЭЖХ. Как правило, продукты разложения $A \rightarrow B$ имеют меньшие параметры удерживания, $t_R(B) < t_R(A)$. Однако для бимолекулярной реакции $B \rightarrow A$ (схема 2) более сложные продукты бимолекулярных реакций могут иметь большие параметры удерживания. Регистрация масс-спектров в различных точках диффузных зон Z (рис. 1) [1] показывает, что они могут быть образованы либо только продуктами разложения Б, либо обоими компонентами А и Б в переменных соотношениях. Оценка температурных диапазонов термической стабильности аналитов в

ходе хроматографического разделения на основании их температур кипения при атмосферном давлении без разложения [9] показывает, что даже для простейших незамещенных гидразонов это условие не выполняется.

Таким образом, принципиальная невозможность газохроматографического разделения незамещенных гидразонов (I) заставляет проверить применимость для этих целей обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ), что и является задачей настоящей работы. Необходимым условием УФ-детектирования аналитов в этом варианте разделения является наличие хромофора в молекуле, поэтому рассмотрение ограничено только гидразонами ароматических карбонильных соединений.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты, растворители. В работе использовали гидразин-гидрат (99%, Ленреактив) и следующие карбонильные соединения: *n*-метилбензальдегид х. ч. (Реахим, Москва), ацетофенон, пропиофенон, бутирофенон (Sigma-Aldrich Rus LLC, Россия), *n*-метилацетофенон х. ч. (Реахим,

Москва). Реакцию карбонильных соединений (100 мкл или ~100 мг) с гидразин-гидратом (1 мл) для гомогенизации реакционных смесей проводили в смеси с 1 мл изопропилового спирта х. ч. (Криохром, Санкт-Петербург). Для предотвращения образования азинов (схема 1) мольный избыток гидразин-гидрата составлял приблизительно 25–30. Далее анализировали реакционные смеси, которые предварительно смешивали с элюентом в соотношении 1 : 100. В случае альдегидов, легко окисляющихся в присутствии кислорода атмосферного воздуха, реакционные смеси обычно содержали некоторые количества соответствующих карбоновых кислот, имеющих меньшие параметры удерживания. Для приготовления элюентов для ВЭЖХ использовали метанол х. ч. (Криохром, Санкт-Петербург) и деионизованную воду (удельное сопротивление 18.2 МОм · см) с добавкой 0.1% муравьиной кислоты (98% “для анализа”, PanReac, Испания).

Условия хроматографического анализа. Время на удерживания выбранных соединений в различных изократических режимах определяли на жидкостном хроматографе Shimadzu LC-20 Prominence с диодно-матричным детектором и колонкой Phenomenex C18 длиной 250 мм, внутренним диаметром 4.6 мм и размером частиц сорбента 5 мкм. Образцы анализировали в нескольких режимах изократического элюирования. Расход элюента 1.0 мл/мин, температура колонки 30°C. Пробы дозировали с использованием автосамплера SIL-20A/AC, объем проб 20 мкл, число параллельных дозирования каждой из них — два. Для определения индексов удерживания во все образцы добавляли смесь трех реперных *n*-алкилфенилкетонов $C_6H_5COC_nH_{2n+1}$ с $n = 1-3$. Для всех аналитов вычисляли относительные оптические плотности при 254 и 220 нм, $A(254/220) = A(254)/A(220)$.

Условия хромато-масс-спектрометрического анализа. Анализ проводили на жидкостном хроматографе UltiMate 3000 (Thermo, США) с масс-спектрометрическим детектором QExactive (Thermo, США) с орбитальной ловушкой и колонкой ZorbaxSB-C18 длиной 50 мм, внутренним диаметром 4.6 мм и размером частиц сорбента 1.8 мкм. Использовали градиентное элюирование смесью 0.1%-ного водного раствора муравьиной кислоты (фаза А) и ацетонитрила (фаза Б): 20% Б (0–0.5 мин), 15–90% Б (0.5–8 мин) 90% Б (8–10 мин) и 20% Б (10.1–14 мин); для элюента такого состава pH ≈ 2.7. Расход элюента 0.4 мкл/мин, объем проб 1 мкл. Условия электрораспылительной ионизации с регистрацией положительно заряженных ионов: температура проводящего капилляра 380°C, температура распыляющего капилляра 300°C, расход газа-осушителя 45 усл. ед., расход вспомогательного газа 20 усл. ед., напряжение на капилляре 3.5 кВ.

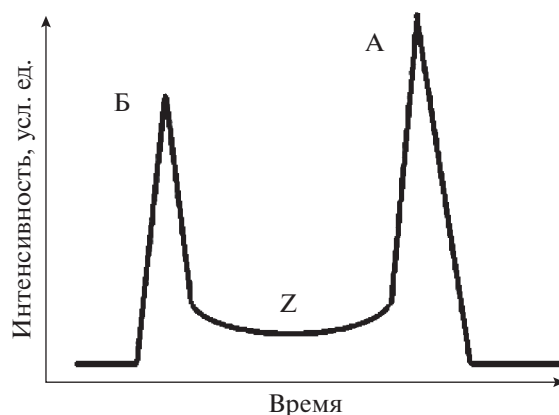


Рис. 1. Схематическое изображение хроматограммы аналитов, нестабильных в условиях хроматографического разделения. Регистрация размытой зоны Z (“шлейф”, “плато” и т.п.) между пиками свидетельствует о том, что компонент А превращается в компонент Б (или наоборот) в хроматографической колонке.

Обработка результатов. В условиях изократического элюирования гидразоны характеризовали логарифмическими индексами удерживания [10]:

$$RI_x = RI_n + (RI_{n+k} - RI_n) \times [\lg(t_{R,x}) - \lg(t_{R,n})] / [\lg(t_{R,n+k}) - \lg(t_{R,n})], \quad (1)$$

где $t_{R,x}$, $t_{R,n}$ и $t_{R,n+k}$ — времена удерживания целевого аналита (*x*) и ближайших к нему по параметрам удерживания реперных компонентов с присвоенными им значениями индексов удерживания RI_n и RI_{n+k} . В качестве реперных компонентов в ОФ ВЭЖХ используют *n*-алкилфенилкетоны $C_6H_5COC_nH_{2n+1}$, $RI_n = 100n_C$, где n_C — суммарное число атомов углерода в молекуле.

Необходимые для вычисления логарифмических индексов удерживания времена удерживания несорбируемых компонентов (t_0) оценивали по временам удерживания трех реперных *n*-алкилфенилкетонов по формуле Петерсона и Хирша [11]:

$$t_0 \approx (t_{R,1}t_{R,3} - t_{R,2}^2) / (t_{R,1} + t_{R,3} - 2t_{R,2}). \quad (2)$$

Для статистической обработки параметров удерживания использовали ПО Excel (Microsoft Office, 2010), а для построения графиков — ПО Origin (версия 4.1).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Различные полифункциональные соединения, относящиеся к классу гидразонов, находят широкое применение, например, как лекарственные препараты [12–17]. Некоторые из замещенных гидразонов, значительно более устойчивых к

гидролизу, чем незамещенные, рекомендованы как производные карбонильных соединений для их разделения и определения в ОФ ВЭЖХ [18, 19]. Чаще всего для этого используют 2,4-динитрофенилгидразоны [18–24]. Что же касается незамещенных гидразонов, то их характерным свойством является легкость гидролиза; по имеющимся оценкам [25] она в 10^2 – 10^3 раз выше, чем изоструктурных оксимов $RR'C=NOH$. Именно нестабильность незамещенных гидразонов при хранении в нашем случае определила природу анализируемых образцов: это непосредственно реакционные смеси соответствующих карбонильных соединений, содержащие большой избыток гидразин-гидрата.

Задача настоящей работы не предполагала характеристику большого количества анализов, а заключалась, прежде всего, в выяснении стабильности простейших незамещенных гидразонов ароматических карбонильных соединений в условиях ОФ ВЭЖХ. Это позволило ограничить рассмотрение их сравнительно небольшим числом.

Гидразоны ароматических кетонов. В табл. 1 приведены аналитические данные для продуктов взаимодействия четырех ароматических кетонов с гидразин-гидратом I–IV, прежде всего, индексы удерживания продуктов, определенные в изократических режимах при содержании метанола в элюенте от 50 до 85 об. %. Кроме этого указаны диапазоны значений m/z , соответствующие молекулярным массам исходных соединений и ожидаемых гидразонов, что необходимо для их селективного масс-спектрометрического детектирования, а также отношения оптических плотностей $A(254/220) = A(254)/A(220)$. Для сравнения приведены соответствующие относительные оптические плотности исходных карбонильных соединений и их индексы удерживания. Использование таких спектральных параметров повышает надежность и однозначность идентификации анализов в ОФ ВЭЖХ. В ряде случаев становится возможным их отнесение к соответствующим гомологическим рядам [26, 27].

Представленная в табл. 1 информация позволила установить следующее:

- Массовые числа ионов $[M + H]^+$ главных компонентов реакционных смесей во всех случаях соответствуют массовым числам таких ионов для ожидаемых гидразонов ароматических кетонов I–IV;

- Регистрация масс-хроматограмм реакционных смесей по массовым числам ионов $[M + H]^+$ исходных карбонильных соединений показала их отсутствие. Кроме того, хроматограммы по полному ионному току в диапазоне m/z 50–750 и результаты ВЭЖХ-анализа демонстрируют отсутствие в таких реакционных смесях детектируемых количеств азинов;

- Индексы удерживания регистрируемых компонентов всегда меньше индексов удерживания исходных кетонов и зависят от концентрации метанола в составе элюента. Среднее значение разности индексов удерживания гидразонов и исходных кетонов составляет -81 ± 21 . Поскольку индексы удерживания в ОФ ВЭЖХ зависят от концентрации органического компонента элюента [28], дополнительно оценили коэффициенты dRI/dc , равные -0.11 ± 0.05 (I), 1.9 ± 0.6 (II), 1.6 ± 0.3 (III) и 1.6 ± 0.4 (IV);

- Относительные оптические плотности $A(254/220)$ главных компонентов реакционных смесей составляют 1.15 ± 0.03 и статистически значимо отличаются от значений $A(254/220)$ исходных алкиларилкетонов (2.6 ± 0.2).

- Различия в индексах удерживания и относительных оптических плотностях исходных кетонов и ожидаемых гидразонов подтверждают полноту взаимодействия кетонов с гидразин-гидратом. Кроме того, отсутствие хроматографических аномалий продуктов взаимодействия показывает, что такие гидразоны стабильны к гидролизу в условиях их разделения методом ОФ ВЭЖХ даже при слабокислой реакции водно-ацетонитрильного элюента (0.1% муравьиной кислоты).

Еще одним доводом в пользу образования гидразонов алкиларилкетонов является наличие на масс-хроматограммах реакционных смесей по массам ионов $[M + H]^+$ гидразонов несимметричных карбонильных соединений (всех алкиларилкетонов) двух пиков с одинаковыми молекулярными массами, соответствующими *син*- (минорный компонент с меньшим временем удерживания) и *анти*-изомерам гидразонов. Подобное разделение *син*- и *анти*-изомеров ранее отмечено для 2,4-динитрофенилгидразонов несимметричных карбонильных соединений [29].

Поведение гидразонов замещенных бензальдегидов в условиях ВЭЖХ. Аналитические данные для продуктов взаимодействия трех ароматических альдегидов V–VII приведены в табл. 2. Интерпретировать хроматограммы таких реакционных смесей в условиях ОФ ВЭЖХ сложнее. Прежде всего, необходимо отметить известный факт [30], что альдегиды в реакциях с гидразинами более реакционноспособны по сравнению с кетонами, что означает возможность образования не только незамещенных гидразонов, но и соответствующих азинов (схема 1). Для более детальной характеристики общих особенностей поведения гидразонов альдегидов в условиях ОФ ВЭЖХ один пример целесообразно рассмотреть подробнее, а именно: результаты анализа реакционной смеси *n*-метилбензальдегида (V) с гидразин-гидратом, фрагмент хроматограммы которой по суммарному ионному току в диапазоне m/z 50–300 приведен на рис. 3а.

Таблица 1. Аналитические данные (индексы удерживания, значения m/z и относительные оптические плотности $A(254/220)$) для гидразонов некоторых алкиларилкетонов

Характеристики аналита	$\epsilon(\text{CH}_3\text{OH})$, об. %					Диапазон (m/z) ионов [M + H] ⁺	Среднее значение $A(254/220)$	Значение $A(254/220)$ исходного кетона	Индекс удержи- вания исходного кетона	
	55	60	65	70	75					80
Гидразон ацетофенона (I)										
RI	738	737	738	734	737	736	734	135.0896– 135.0937	2.7	800
$A(254/220)$	1.23	1.23	1.22	1.20	1.13	1.12	1.04			
$\Delta\text{RI} = \text{RI}_{\text{гидразон}} - \text{RI}_{\text{кетон}}$	–62	–63	–62	–66	–63	–64	–66			
Гидразон <i>n</i> -метилацетофенона (II)										
RI	784	799	803	830	816	–	–	149.1051– 149.1096	–	884*
$A(254/220)$	1.18	1.22	1.18	1.16	1.21	1.19	1.12			
$\Delta\text{RI} = \text{RI}_{\text{гидразон}} - \text{RI}_{\text{кетон}}$	–100	–85	–81	–54	–68	–	–			
Гидразон пропиофенона (III)										
RI	795	808	819	830	820	840	–	149.1051– 149.1095	2.3	900
$A(254/220)$	1.33	1.16	1.13	1.03	1.10	1.07	1.09			
$\Delta\text{RI} = \text{RI}_{\text{гидразон}} - \text{RI}_{\text{кетон}}$	–105	–92	–81	–70	–80	–60	–			
Гидразон бутирофенона (IV)										
RI	875	885	894	901	890	905	939	163.1222– 163.1238	2.7	1000
$A(254/220)$	1.30	1.13	1.12	1.08	1.10	1.07	1.01			
$\Delta\text{RI} = \text{RI}_{\text{гидразон}} - \text{RI}_{\text{кетон}}$	–125	–115	–106	–99	–110	–95	–61			
Среднее значение $A(254/220)$:								1.15 ± 0.03	2.6 ± 0.2	
Среднее значение $\Delta\text{RI} = \text{RI}_{\text{гидразон}} - \text{RI}_{\text{кетон}}$						–81 ± 21				

* Оценка по усредненным литературным значениям RI толуола (1016 $\pm$ 19) и бензола (932 $\pm$ 17), $\Delta\text{RI} = 84$ в ОФ ВЭЖХ.

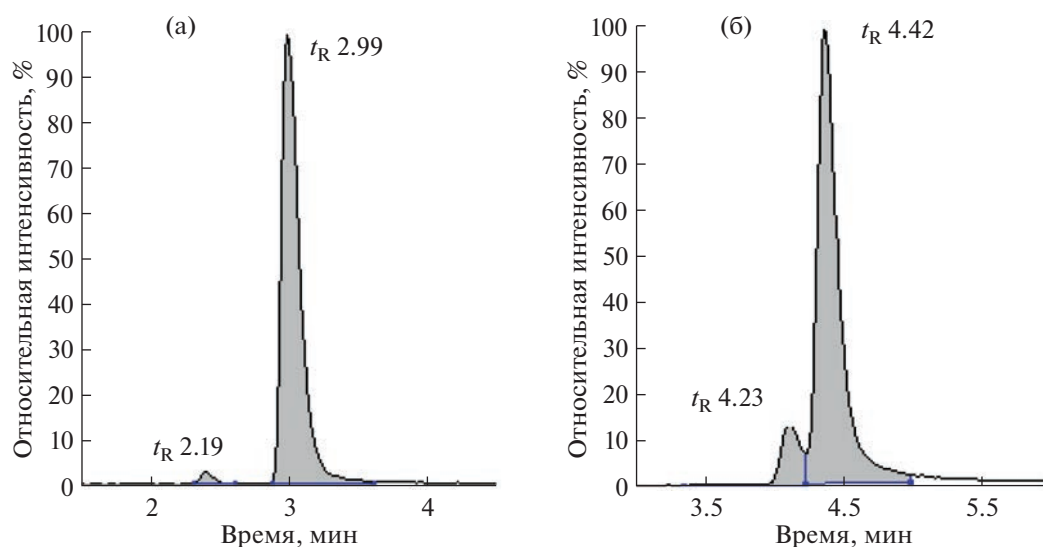


Рис. 2. Фрагменты масс-хроматограмм гидразонов ацетофенона (а) и пропиофенона (б) по массовым числам ионов $[M + H]^+$. Минорные пики с меньшими временами удерживания соответствуют *син*-изомерам, основные — *анти*-изомерам.

В области времени удерживания исходного карбонильного соединения нет заметных хроматографических пиков; единственным сигналом оказывается пик со временем удерживания 12.39 мин, соответствующий азину *n*-метилбензальдегида. С целью селективного выявления возможных следов исходного карбонильного соединения записали масс-хроматограмму по значению m/z в диапазоне 121.0630–121.0666 (рис. 3б). Регистрируемый на ней сигнал со временем удерживания 4.52 мин можно приписать *n*-метилбензальдегиду; тогда второй сигнал с t_R 1.95 мин закономерно принадлежит примеси продукта окисления такого альдегида кислородом воздуха — *n*-метилбензойной кислоте. С аналогичной целью, а именно для выявления возможных следов незамещенного гид-

разона, записали масс-хроматограмму по значению m/z в диапазоне 135.0896–135.0037 (рис. 3в). Однако вместо отчетливо детерминированных хроматографических пиков на ней проявляется широкий размытый сигнал. Правая граница такого “шлейфа” (приблизительно 12.4 мин) соответствует времени удерживания азина *n*-метилбензальдегида, тогда как левая (4.57 мин) практически совпадает со временем удерживания исходного альдегида. Форма такого сигнала аналогична специфическому хроматографическому профилю, изображенному на рис. 1, характеризующему нестабильность аналитов в хроматографической колонке в процессе разделения. В данном случае это указывает на гидролиз азина *n*-метилбензальдегида в процессе анализа (схема 3):

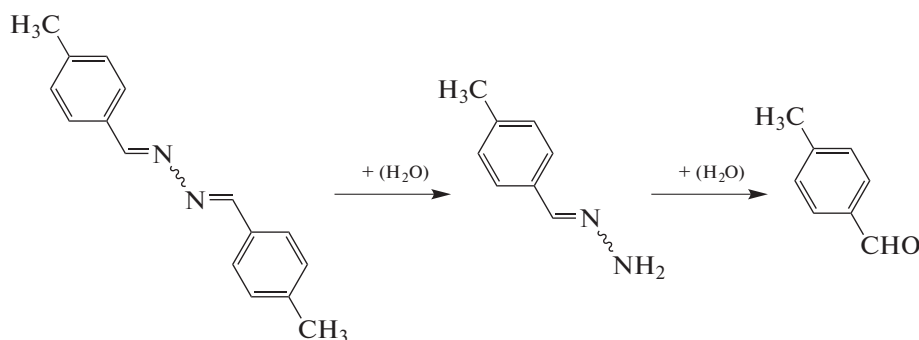


Схема 3. Гидролиз азина *n*-метилбензальдегида с образованием гидразона.

Размытый сигнал, иллюстрируемый рис. 3в, преимущественно принадлежит ионам $[\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_2 + \text{H}]^+$, соответствующим по составу незамещенному

гидразону *n*-метилбензальдегида. Однако этот компонент не присутствует в реакционной смеси, а образуется в результате гидролиза азина. В соот-

Таблица 2. Аналитические данные (индексы удерживания и относительные оптические плотности $A(254/220)$) компонентов реакционных смесей не-которых замещенных бензальдегидов с гидразин-гидратом в сравнении с данными для исходных альдегидов

Аналит и его характеристики		$c(\text{CH}_3\text{OH})$, об. %								Среднее значение $A(254/220)$
		50	55	60	65	70	75	80	85	
n -Метилбензальдегид* (A)**	RI	870	—	874	—	879	—	884	—	
	$A(254/220)$	2.36	—	2.01	—	2.02	—	1.97	—	2.09 ± 0.18
Гидразон n -метилбензальдегида (V) (Б)	RI	—	719	720	720	721	724	724	722	
	$A(254/220)$	—	1.22	1.17	1.16	1.21	1.19	1.32	—	1.21 ± 0.06
$\Delta\text{RI} = \text{RI}_{\text{гидразон}} - \text{RI}_{\text{альдегид}}$				—154		—158		—160		
o -Метилбензальдегид (A)	RI	860	—	860	—	860	—	861	—	
	$A(254/220)$	2.51	—	2.00	—	1.71	—	1.52	—	1.9 ± 0.4
Гидразон o -метилбензальдегида (VI) (Б)	RI	—	728	724	721	717	716	712	710	
	$A(254/220)$	—	0.63	0.63	0.59	0.62	0.60	0.53	0.63	0.63 ± 0.04
$\Delta\text{RI} = \text{RI}_{\text{гидразон}} - \text{RI}_{\text{альдегид}}$				—136		—143		—149		
Среднее значение $A(254/220)$ для альдегидов:										2.0 ± 0.1
Среднее значение $A(254/220)$ для гидразонов:										0.9 ± 0.4
o -Гидроксibenзальдегид (A)	RI	795	—	804	—	811	—	819	—	
	$A(254/220)$	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Гидразон o -гидроксibenзальдегида (VII) (Б)	RI	—	722	719	715	713	711	708	702	0.44 ± 0.03;
	$A(254/220)$	—	0.48	0.47	0.45	0.46	0.41	0.40	0.40	0.51***
Среднее значение $\Delta\text{RI} = \text{RI}_{\text{гидразон}} - \text{RI}_{\text{альдегид}}$										—150 ± 9

* Диапазон (m/z) для ионов $[\text{M} + \text{H}]^+$ — 121.0630–121.0666; ** (A) — хромато-масс-спектрометрический анализ (элюент — ацетонитрил—вода); (Б) — хроматографический анализ (элюенты — метанол—вода); *** литературное значение.

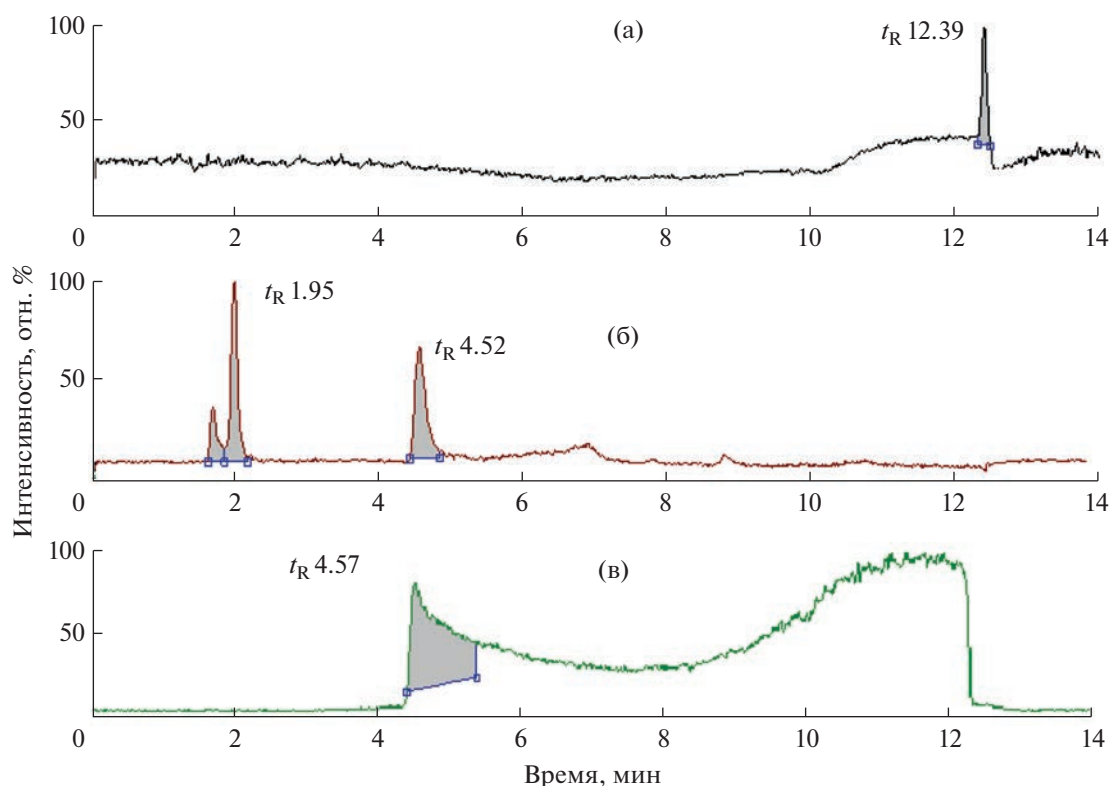


Рис. 3. Масс-хроматограммы реакционной смеси *n*-метилбензальдегида с избытком гидразин-гидрата (а) по суммарному ионному току в диапазоне m/z 50–300; (б) по массовому числу ионов $[M + H]^+$ исходного альдегида (в диапазоне m/z 121.0630–121.0666); (в) по массовому числу ионов $[M + H]^+$ незамещенного гидразона (m/z в диапазоне 135.0896–135.0037).

ветствии со схемой 3 этот процесс должен протекать в две стадии. Можно отметить, что на основании имеющейся у авторов настоящей работы информации это всего лишь второй известный пример протекания двухстадийных процессов в хроматографической колонке и первый пример двухстадийного гидролиза аналитов в условиях ОФ ВЭЖХ. Ранее к процессам такого типа было отнесено термическое разложение незамещенных гидразонов карбонильных соединений в ходе газохроматографического анализа [1, 7]

Если сравнить результаты хроматографического анализа одних и тех же смесей ароматических альдегидов с гидразин-гидратом на хроматографе Shimadzu LC-20 Prominence и их хромато-масс-спектрометрического анализа на хроматографе UltiMate 3000, то они оказываются существенно отличающимися. Во-первых, индексы удерживания регистрируемых компонентов не совпадают друг с другом; в первом случае они меньше на 150 ± 9 ед. индекса. Такие различия превышают возможные вариации индексов удерживания в результате замены в составе элюента метанола на ацетонитрил. Иными словами, прослеживается та же закономерность, что и в случае гидразонов ароматических кетонов и самих кар-

бонильных соединений, для которых такая разность равна -81 ± 21 (табл. 1). Незамещенные гидразоны, содержащие в молекуле два активных атома водорода, элюируются раньше, чем их прекурсоры. Во-вторых, не совпадают значения относительных оптических плотностей, $A(254/220)$, равные 0.9 ± 0.4 и 2.0 ± 0.1 . И здесь можно отметить аналогию с величинами $A(254/220)$ для гидразонов кетонов и самих кетонов (1.15 ± 0.03 и 2.6 ± 0.2 , табл. 1). Сочетание этих двух независимых аналитических параметров (индексы удерживания + спектральные отношения) позволяет однозначно утверждать, что в условиях хроматографического разделения мы обнаруживаем исключительно гидразоны, тогда как в условиях хромато-масс-спектрометрического анализа гидразоны альдегидов полностью гидролизуются. Причиной этого является слабокислая реакция элюента, содержащего 0.1% муравьиной кислоты, с $pH \approx 2.7$.

Таким образом, в отличие от незамещенных гидразонов кетонов, которые стабильны даже в элюентах с $pH < 7$, незамещенные гидразоны альдегидов полностью гидролизуются при слабокис-

лой реакции элюентов типа ацетонитрил–вода, обусловленной добавками в водную фазу 0.1% муравьиной кислоты. Эту их особенность необходимо принимать во внимание при определении других соединений этого класса. Для выявления гидролиза аналитов сопоставлены индексы удерживания исходных карбонильных соединений и гидразонов при разных соотношениях объемов органических модификаторов и водных фаз и различных значениях pH элюентов, относительные оптические плотности характеризуемых компонентов при длинах волн детектирования 254 и 220 нм, $A(254/220) = A(254)/A(220)$, а также данные хромато-масс-спектрометрического анализа.

Экспериментальные данные настоящей работы получены в Ресурсном центре “Методы анализа состава вещества” Научного парка Санкт-Петербургского государственного университета. Авторы благодарят сотрудников Центра за содействие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Zenkevich I.G.* Features and new examples of gas chromatographic separation of thermally unstable analytes. Ch. 3 / *Recent Advances in Gas Chromatography*. London: IntechOpen Ltd., 2020. P. 1. <https://doi.org/10.5772/intechopen.94229>
2. *Middleditch B.S.* Analytical Artifacts: GC, MS, HPLC, TLC, and PC. Amsterdam: J. Chromatogr. Library, 1989. V. 44. 1033 p.
3. *Herr C.H., Whitmore F.C., Schiessler R.W.* The Wolff–Kishner reaction at atmospheric pressure // *J. Am. Chem. Soc.* 1945. V. 67. № 12. P. 2061. <https://doi.org/10.1021/ja01228a002>
4. *Soffer M.D., Soffer M.B., Sherk K.W.* A low pressure method for Wolff–Kishner reduction // *J. Am. Chem. Soc.* 1945. V. 67. № 9. P. 1435. <https://doi.org/10.1021/ja1225a004>
5. *Kueth J.T., Childers K.G., Peng Z., Journet M., Humphrey G.R., Vickery T., Bachert D., Lam T.T.* A practical kilogram-scale implementation of the Wolff–Kishner reduction // *Org. Process Res. Development*. 2009. V. 13. № 3. P. 576. <https://doi.org/10.1021/op9000274>
6. The NIST Mass Spectral Library (NIST/EPA/NIH EI MS Library, 2017 Release). Software/Data Version; NIST Standard Reference Database, Number 69, August 2017. National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD 20899: <http://webbook.nist.gov> (дата обращения: апрель 2022 г.).
7. *Зенкевич И.Г., Подольский Н.Е.* Выявление соединений, нестабильных в условиях газохроматографического разделения. Незамещенные гидразоны карбонильных соединений // *Аналитика и контроль*. 2017. Т. 21. № 2. С. 125. <https://doi.org/10.15825/analitika.2017.21.2.002>
8. *Зенкевич И.Г., Лукина В.М.* Особенности газохроматографического разделения таутомеров этил-ацетоацетата // *Журн. физ. химии*. 2020. Т. 94. № 6. С. 910. <https://doi.org/10.1134/S0036024420060357>
9. *Kornilova T.A., Ukolov A.I., Kostikov R.R., Zenkevich I.G.* A simple criterion for gas chromatography/mass spectrometric analysis of thermally unstable compounds, and reassessment of the by-products of alkyl diazoacetate synthesis // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2013. V. 27. № 3. P. 461. <https://doi.org/10.1002/rcm.6457>
10. Kovats' retention index system / *Encyclopedia of Chromatography* / Ed. Cazes J. 3rd Ed. Boca Raton: CRC Press (Taylor & Francis Group), 2010. P. 1304.
11. *Peterson M.L., Hirsch J.* A calculation for locating the carrier gas front of a gas-liquid chromatogram // *J. Lipid Res.* 1959. V. 1. P. 132.
12. *Kovarikova P., Vavrova K., Tomalova K., Schongut M., Hruskova K., Haskova P., Klimes J.* HPLC-DAD and MS/MS analysis of novel drug candidates from the group of aromatic hydrazones revealing the presence of geometric isomers // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2008. V. 48. № 2. P. 295. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.12.017>
13. *Isenberg S.L., Carter M.D., Crow B.S., Graham L.A., Johnson D.J., Beninato N., Steele K., Thomas J.D., Johnson R.C.* Quantification of hydrazine in human urine by HPLC-MS-MS // *J. Anal. Toxicol.* 2016. V. 40. № 4. P. 248. <https://doi.org/10.1093/jat/bkw015>
14. *Song L., Gao D., Li S., Wang Y., Liu H., Jiang Y.* Simultaneous quantitation of hydrazine and acetylhydrazine in human plasma by high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry after derivatization with p-tolualdehyde // *J. Chromatogr. B*. 2017. V. 1063. P. 189. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.08.-36>
15. *Brewer C.T., Yang L., Edwards A., Lu Y., Low J., Wu J., Lee R.E., Chen T.* The isoniazid metabolites hydrazine and pyridoxal isonicotinoyl hydrazone modulate heme biosynthesis // *Toxicol. Sci.* 2019. V. 168. № 1. P. 209. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy294>
16. *Wahbeh J., Milkowski S.* The use of hydrazones for biomedical applications // *SLAS Technol.* 2019. V. 24. № 2. P. 161. <https://doi.org/10.1117/2472630318822713>
17. *Mateeva A., Peikova L., Kondeva-Burdina M., Georgieva M.* Development of new HPLC method for identification of metabolic degradation of N-pyrrolylhydrazide hydrazones with determined MAO-B activity in cellular cultures // *Pharmacia*. 2021. V. 69. № 1. P. 15. <https://doi.org/10.3897/pharmacia.69.e78417>
18. Derivatization of analytes in chromatography: General aspects / *Encyclopedia of Chromatography* / Ed. Cazes J. 3rd Ed. New York: Taylor & Francis, 2010. V. 1. P. 562.
19. Carbonyls: Derivatization for GC analysis / *Encyclopedia of Chromatography* / Ed. Cazes J. 3rd Ed. New York: Taylor & Francis, 2010. V. 1. P. 310.
20. *Grosjean E., Green P.G., Grosjean D.* Liquid chromatography analysis of carbonyl (2,4-dinitrophenyl)hydrazones with detection by diode array ultraviolet spectroscopy and by atmospheric pressure negative chemical ionization mass spectrometry // *Anal. Chem.* 1999. V. 71. № 9. P. 1851. <https://doi.org/10.1021/ac981022v>

21. Rapid separation and identification of carbonyl compounds by HPLC / Agilent Application Note / Wilmington: Agilent Technologies, Inc., 2008. 4 p.
22. Ochs S.M., Fasciotti M., Netto A.D.P. Analysis of 31 hydrazones of carbonyl compounds by RRLC-UV and RRLC-MS(/MS): A comparison of methods // J. Spectrosc. 2015. Article ID 890836. <https://doi.org/10.1155/2015/890836>
23. Damanik M., Murkovic M. Formation of potentially toxic carbonyl compounds during oxidation of triolein in the presence of alimentary antioxidants // Monatsh Chem. 2017. V. 148. № 12. P. 2031. <https://doi.org/10.1007/s00706-017-2036-3>
24. Frey J., Schneider F., Schink B., Hunn T. Synthesis of short-chain hydroxyaldehydes and their 2,4-dinitrophenylhydrazones derivatives, and separation of their isomers by high-performance liquid chromatography // J. Chromatogr. A. 2018. V. 1531. P. 143. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.11.046>
25. Kalia J., Reines R.T. Hydrolytic stability of hydrazones and oximes // Angew. Chem. Int. Ed. 2008. V. 47. № 39. P. 7523. <https://doi.org/10.002/anie.200802651>
26. Зенкевич И.Г., Косман В.М. Относительное поглощение при разных длинах волн - дополнительный УФ-спектральный параметр для идентификации органических соединений в обращенно-фазовой ВЭЖХ // Журн. аналит. химии. 1996. Т. 51. № 8. С. 870.
27. Зенкевич И.Г., Косман В.М. Новые возможности идентификации органических соединений по УФ-спектрам с использованием относительных оптических плотностей // Журн. прикл. химии. 1997. Т. 70. № 11. С. 1861
28. Зенкевич И.Г., Деруиш А. Аналитические аспекты зависимости индексов удерживания органических соединений в обращенно-фазовой ВЭЖХ от содержания метанола в составе элюента // Аналитика и контроль. 2022. Т. 26. № 1. С. 41. <https://doi.org/10.15826/analitika.2022.26.1.004>
29. Practical Gas Chromatography / Eds. Engewald W., Dettmer-Wilde K. Berlin: Springer-Verlag, 2014. 902 p.
30. Иоффе Б.В., Кузнецов М.А., Потехин А.А. Химия органических производных гидразина. Л.: Химия, 1979, 224 с.

УДК 543.054:543.51:543.544.5.068.7

ИЗВЛЕЧЕНИЕ И КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ ВЫСОКОЛИПОФИЛЬНОГО АНТИОКСИДАНТА 2,6-ДИИЗОБОРНИЛ-4-МЕТИЛФЕНОЛА И ЕГО МЕТАБОЛИТА ИЗ ОБРАЗЦОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС/МС

© 2023 г. А. П. Лакеев^{a, b, *}, Е. А. Яновская^{a, b, **}, В. А. Яновский^a, М. О. Андропов^a

^aНациональный исследовательский Томский государственный университет, химический факультет, научно-образовательный центр “Перспективные материалы и технологии в недропользовании” просп. Ленина, 36, Томск, 634050 Россия

^bНаучно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины им. Е. Д. Гольдберга Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук просп. Ленина, 3, Томск, 634028 Россия

*e-mail: lakeevs@mail.ru

**e-mail: elena.yanovskaya@pharmso.ru

Поступила в редакцию 23.06.2022 г.

После доработки 13.07.2022 г.

Принята к публикации 13.07.2022 г.

Предложена методика извлечения 2,6-дидиборнил-4-метилфенола (**ИБФ**), молекула которого обладает потенциальной мультитаргетной активностью, и его активного метаболита 2,6-дидиборнил-4-гидроксиметилфенола (**ИБФ–ОН**) из образцов плазмы человека и крысы для дальнейшего определения методом жидкостной тандемной хромато-масс-спектрометрии. Определена растворимость **ИБФ** (в мг/мл) в различных органических растворителях. В частности, соединение легко растворимо в хлороформе (346 ± 14), метил-*трет*-бутиловом эфире (98.6 ± 3.8) и этилацетате (96.8 ± 2.0). Показано, что использование в качестве экстракционной системы с одновременной денатурацией белка смеси хлороформа и изопропанола (5 : 1, по объему) позволяет извлекать лишь $66 \pm 10\%$ **ИБФ** от его общего количества, в то время как степень извлечения **ИБФ–ОН** составляет $96 \pm 7\%$. Предварительное разбавление 200 мкл плазмы 300 мкл физиологического раствора повышает извлечение **ИБФ** до $100 \pm 4\%$. Высушивание экстрактов в вакуумном концентраторе (воздух, 45°C) с дальнейшим растворением сухих остатков в 300 мкл ацетонитрила способствует очистке биообразцов и концентрированию аналитов. Общее время пробоподготовки не превышает 70 мин, а продолжительность анализа составляет 7 мин, объем вводимой аликвоты – 2 мкл. Методика успешно апробирована на реальных образцах плазмы крыс после однократного перорального введения масляной формы **ИБФ** (10 мг/кг) в рамках фармакокинетических исследований.

Ключевые слова: пробоподготовка образцов плазмы, ВЭЖХ-МС/МС, диборнол, простагенин, фенольные антиоксиданты.

DOI: 10.31857/S0044450223020068, **EDN:** CEKHAR

В настоящее время, несмотря на значительные успехи в разработке биофармацевтических препаратов, актуальной остается задача поиска и создания лекарственных средств на основе малых молекул. Значительный интерес представляют так называемые “мультитаргетные лекарственные средства” [1, 2], воздействующие одновременно на несколько биологических мишеней, что обусловлено современной точкой зрения на мультифакториальную, т.е. вызываемую сово-

купностью как наследственных, так и внешних факторов, этиологию заболеваний.

Одной из таких молекул является 2,6-дидиборнил-4-метилфенол (**ИБФ**, диборнол, медиборнол, схема 1a) – полусинтетическое соединение класса пространственно-затрудненных фенолов, полученное из продуктов лесопереработки в институте химии Коми научного центра Уральского отделения РАН (Сыктывкар) [3].

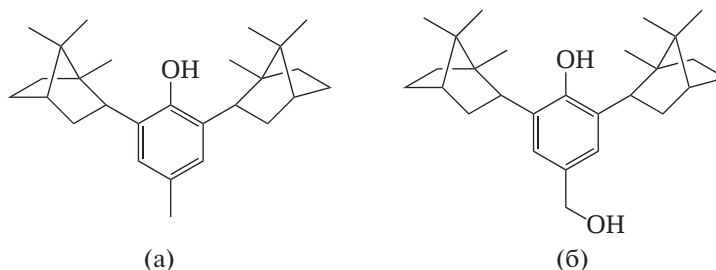


Схема 1. Структурные формулы 2,6-диизоборнил-4-метилфенола (а) и 2,6-диизоборнил-4-гидроксиметилфенола (б).

В рамках проведенных доклинических исследований, а также в ходе последующих научных изысканий установлено, что ИБФ обладает выраженной антиоксидантной активностью [4], вследствие чего демонстрирует нейро-, кардио- и ретинопротекторные свойства [5–8], улучшает реологические показатели крови при моделировании различных патологических состояний [9–11]. Кроме того, соединение оказывает мембранопротекторное действие на сперматозоиды и способствует нормализации их окислительно-восстановительного статуса [12], а также обладает терапевтическим потенциалом для лечения доброкачественной гиперплазии предстательной железы [13]. Тем не менее, как отмечают авторы работы [13], метаболит ИБФ – 2,6-диизоборнил-4-гидроксиметилфенол (ИБФ–ОН, простагенин, схема 1б) более перспективен для применения в лечении указанного заболевания.

Сотрудниками НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е. Д. Гольдберга (Томск) изучена фармакокинетика ИБФ, а также его биодоступность при различных способах введения [14–18]. Установлено, что масляная форма препарата является наиболее подходящей для дальнейшего перорального использования, поскольку ИБФ относится к числу высоколипофильных веществ ($\lg P = 8.14$) [17]. Для подобных соединений следует ожидать связывания с липидными компонентами биологических систем помимо уже известной способности лекарственных средств связываться с белками плазмы, в том числе с липопротеинами, а также клетками крови. Данные обстоятельства создают ряд сложностей для извлечения ИБФ из биологических жидкостей и тканей. Кроме того, высокое значение коэффициента липофильности определяет растворимость препарата в неполярных и малополярных растворителях. При использовании классического способа пробоподготовки методом жидкостно-жидкостной экстракции (ЖЖЭ) указанными выше типами растворителей в органическую фазу наряду с целевыми компонентами экстрагируются различные липофильные соединения биологической матрицы, обуславливающие матричный

эффект и загрязнение аналитического оборудования.

В литературе описан ряд традиционных методов пробоподготовки биологического материала для извлечения высоколипофильных соединений, за прототип которых выбран пробукол ($\lg P = 11.30$) [19–24]. В качестве экстрагентов авторы использовали следующие смеси (по объему): MeOH–(Me)₂CO (3 : 2) [19], (Et)₂O–CH₂Cl₂ (1 : 1) [20], EtOH [21], *n*-C₆H₁₄ с добавлением MeOH и EtOH [22], *n*-C₇H₁₆ с физиологическим раствором и EtOH [23], *изо*-C₈H₁₈ с дистиллированной водой и EtOH [24]. Для концентрирования и очистки проб экстракты высушивали в токе азота с последующим растворением сухих остатков в небольшом количестве органического растворителя. Авторы работы [21] высушивали экстракт в токе воздуха, остаток растворяли в (Et)₂O и NaOH, затем вновь отбирали полученную органическую фракцию и высушивали досуха с дальнейшим растворением в MeOH. Что касается ИБФ, описана следующая методика пробоподготовки образцов плазмы [15, 17]: 4 мл биоматериала подвергали термической денатурации (30 мин), разбавляли 2 мл физиологического раствора, центрифугировали (10 мин), добавляли смесь CHCl₃–*изо*-PrOH–H₃PO₄ (9 : 1 : 0.15, по объему), перемешивали (20 мин), центрифугировали (15 мин), отбирали органическую слой и высушивали в токе азота, сухой остаток растворяли в 100 мкл смеси *n*-C₆H₁₄–*изо*-PrOH–MeCN (3 : 5 : 2, по объему), фильтровали через пористый фильтр и 5 мкл использовали для хроматографического анализа с флуориметрическим детектированием (общее время анализа 16 мин). Количественная характеристика извлечения ИБФ не приведена.

Одно из требований при выборе подходящего экстрагента – его способность растворять максимальное количество аналита. В литературе приведены лишь качественные характеристики растворимости ИБФ в некоторых растворителях [25]: практически нерастворим в воде, очень плохо растворим в 95%-ном EtOH, умеренно растворим в (Et)₂O, *n*-C₆H₁₄ и (Me)₂CO, хорошо растворим в CHCl₃.

Цель настоящей работы – разработка методики пробоподготовки образцов плазмы для определения ИБФ и его метаболита ИБФ–ОН методом жидкостной tandemной хромато–масс–спектрометрии (ВЭЖХ–МС/МС). Особое внимание уделено минимизации количества биологического материала, а также продолжительности пробоподготовки, что, несомненно, важно для дальнейших клинических исследований. Интерес также представляло получение количественных данных о растворимости ИБФ в различных растворителях.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы. Использовали стандартные образцы (содержание основного вещества не менее 98%) 2,6-диизоборнил-4-метилфенола и 2,6-диизоборнил-4-гидроксиметилфенола (институт химии Коми научного центра Уральского отделения РАН, Россия), ацетонитрил сорт 0, о. ч. (Криохром, Россия), ацетон х. ч. (ЭКОС-1, Россия), гексан х. ч. (ЭКОС-1, Россия), гептан х. ч. (ЭКОС-1, Россия), диметилсульфоксид (99%, Иодные технологии и маркетинг, Россия), диэтиловый эфир х. ч. (Кузбассоргхим, Россия), изопропанол х. ч. (ЭКОС-1, Россия), метанол х. ч. (Вектон, Россия), метил-*трет*-бутиловый эфир х. ч. (ЭКОС-1, Россия), хлороформ х. ч. (ЭКОС-1, Россия), этанол (95%, Кемеровская фармацевтическая фабрика, Россия), этилацетат х. ч. (ЭКОС-1, Россия), концентрированную серную х. ч. (Сигма Тек, Россия) и ортофосфорную х. ч. (Химпром, Россия) кислоты, муравьиную кислоту (~98%, Sigma-Aldrich, США), аммиак х. ч. (Сигма Тек, Россия), сульфат аммония х. ч. (Химреактивнаб, Россия), физиологический раствор (Мосфарм, Россия). Сверхчистую воду (тип I) получали с применением специализированной системы очистки воды Millipore Direct-Q 5 UV (Merck, США).

Оборудование. Аналитическая ВЭЖХ–МС/МС–система включала дегазатор DGU-20A5R, насосы высокого давления LC-20ADXR, автоинжектор SIL-20ACXR, термостат СТО-20A (Shimadzu, Япония), tandemный масс–спектрометр Triple Quad 3500 с тройным квадруполем (AB Sciex, США), хроматографическую колонку EC Nucleodur C8ec (150 × 4.6 мм, 5 мкм, 100 Å) (Macherey-Nagel, Германия) с предколоночным картриджем, газогенератор азота Genius (Peak Scientific, Великобритания).

Для пробоподготовки образцов применяли универсальный пробирочный вортекс MSV-3500 (Biosan, Латвия), мультифункциональную центрифугу с охлаждением SL 16R (Thermo Scientific, США), вакуумный центробежный концентратор Concentrator plus (Eppendorf, Германия), термощейкер TS-100 (Biosan, Латвия).

Программное обеспечение Analyst 1.7.2 и MultiQuant 3.0.3 использовали для сбора и обработки хромато–масс–спектрометрических данных соответственно.

Биологические образцы. Образцы интактной плазмы здоровых добровольцев, содержащей калиевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты в качестве антикоагулянта, приобретали у частной организации и хранили при –32°C. Образцы интактной плазмы крыс линии Вистар с добавлением гепарината натрия в качестве антикоагулянта получали из сонной артерии, предварительно наркотизировав животных диэтиловым эфиром. Образцы крови центрифугировали (3000×g, 15 мин, 4°C), отбирали полученную плазму и хранили при –32°C.

Все процедуры с участием животных как объектов данного исследования выполнены в соответствии с международными и национальными руководящими принципами по уходу и использованию животных, а также одобрены локальным комитетом НИИФиРМ им. Е. Д. Гольдберга, где выполнено исследование.

Приготовление стандартных растворов. Исходные растворы ИБФ и ИБФ–ОН (1000 мкг/мл) готовили растворением их точных навесок в MeOH и в смеси MeCN–(Me)₂CO (8 : 2, по объему) соответственно. Затем из полученных растворов последовательным разбавлением MeCN получали рабочие растворы с концентрациями 400, 40, 0.8 мкг/мл (ИБФ) и 40, 0.8, 0.08 мкг/мл (ИБФ–ОН). Из них, в свою очередь, готовили градуировочные растворы ($n = 9$) в концентрационном диапазоне 0.2–100 мкг/мл (ИБФ) и (4–400) × 10^{–3} мкг/мл (ИБФ–ОН). Для оценки степени извлечения аналитов готовили растворы контроля качества с концентрациями 90 мкг/мл (ИБФ) и 0.36 мкг/мл (ИБФ–ОН). При приготовлении градуировочных растворов и растворов контроля качества использовали отдельные исходные и рабочие растворы.

Все исходные и рабочие растворы хранили в посуде из темного стекла в холодильных камерах при –32°C, а градуировочные растворы и растворы контроля качества – при 4°C в виалах из прозрачного стекла.

Определение растворимости 2,6-диизоборнил-4-метилфенола. В сверхчистую воду (500 мкл), (Me)₂SO, (Me)₂CO, MeOH, MeCN, MeOC(Me)₃, EtOH, (Et)₂O, EtOAc, *изо*-PrOH, *н*-C₆H₁₄, *н*-C₇H₁₆, CHCl₃ (300 мкл для каждого растворителя) вносили навески ИБФ до получения насыщенных растворов. Суспензии интенсивно встряхивали на термощейкере (500 об/мин, 25°C) в течение 6 ч для установления гетерогенного равновесия (при растворении вещества в раствор вносили его новую порцию). Эксперимент проводили в плотно закрытых пробирках типа Эппендорф во избежа-

ние улетучивания органических растворителей (количество контролировали по заранее установленным меткам). Далее полученные насыщенные растворы центрифугировали (12000 об/мин, 3 мин, 25°C) и 20 мкл надосадочной жидкости переносили в вials. После испарения растворителя остаток растворяли в MeCN, разбавляли и анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС. В случае таких растворителей, как вода, ROH, MeCN, (Me)₂SO надосадочные жидкости разбавляли без предварительного высушивания.

Для количественной оценки содержания ИБФ в полученных растворах использовали метод абсолютной градуировки, которую строили по градуировочным растворам в диапазоне 0.1–5 мкг/мл ($n = 7$; готовили отдельно из растворов, указанных в разделе “Приготовление стандартных растворов”). Уравнение градуировочной зависимости имело следующий вид: $y = 11.1595x - 472.2379$ (линейная функция с весовым фактором $1/x$; коэффициент детерминации $R^2 = 0.9932$).

Приготовление градуировочных, контрольных и холостых образцов. Образцы интактной плазмы человека или крысы перед анализом размораживали при комнатной температуре, 190 мкл плазмы затем помещали в пробирки типа Эппендорф и добавляли 10 мкл стандартного градуировочного или контрольного раствора (смесь ИБФ и ИБФ–ОН). Для приготовления холостых образцов к плазме добавляли 10 мкл MeCN. Диапазон концентраций аналитов в градуировочных образцах составил 0.01–5 мкг/мл (ИБФ) и $(0.2–20) \times 10^{-3}$ мкг/мл (ИБФ–ОН). Концентрации в образцах контроля качества – 4.5 мкг/мл (ИБФ) и 18×10^{-3} мкг/мл (ИБФ–ОН).

Пробоподготовка. Ниже описаны различные способы пробоподготовки исследуемых биологических образцов. В каждом случае общим этапом, если не указано иное, являлось перемешивание проб на вортексе (2100 об/мин, 5 мин), центрифугирование ($12000 \times g$, 8 мин, 4°C), отбор органической фракции и ее высушивание в концентраторе (1200 об/мин, 30–50 мин в зависимости от растворителя, 45°C), растворение остатков в 300 мкл MeCN с последующим перемешиванием при 1500 об/мин в течение 5 мин и переносом полученного экстракта в вial для дальнейшего анализа. Под образцом далее будем понимать смесь 190 мкл плазмы и 10 мкл контрольного раствора.

(1) Образец + 400 мкл охлажденного MeCN (или MeOH) (без высушивания);

(2) Образец + 1200 мкл n -C₆H₁₄;

(3) Образец + 1200 мкл n -C₇H₁₆;

(4) Образец + 600 мкл n -C₆H₁₄ + 600 мкл MeOC(Me)₃;

(5) Образец + 400 мкл n -C₆H₁₄ + 400 мкл MeOC(Me)₃ + 400 мкл (Et)₂O;

(6) Образец + 600 мкл n -C₆H₁₄ + 600 мкл EtOAc;

(7) Образец + 1200 мкл CHCl₃;

(8) Образец + 200 мкл *изо*-PrOH + 1000 мкл CHCl₃;

(9) Образец + 200 мкл MeOH + 1000 мкл CHCl₃.

В качестве наиболее подходящей экстракционной системы выбрали смесь (8) (см. ниже раздел “Результаты и их обсуждение”), поэтому тщательно проанализировали влияние соотношения растворителей CHCl₃–*изо*-PrOH (1 : 1; 2 : 1; 2.5 : 1; 3 : 1; 5 : 1, по объему) на степень извлечения ИБФ и ИБФ–ОН. Также изучили роль неорганических добавок 3 М (NH₄)₂SO₄, 0.6 М H₂SO₄ и 30%-ной (по массе) H₃PO₄ в процессе извлечения целевых компонентов. Более детально оценили влияние физиологического раствора. Так, физиологический раствор добавляли к 200 мкл плазмы, содержащей аналиты, в соотношениях 1 : 2; 1 : 1 и 1.5 : 1 (объем плазмы был постоянным).

Оценка степени извлечения. Извлечение оценивали на образцах контроля качества ($n = 3$). В качестве образцов сравнения использовали экстракты холостых образцов, к которым непосредственно перед анализом на этапе высушивания добавляли известное количество аналита (образцы, представляющие 100%-ную эффективность экстракции). Степень извлечения рассчитывали согласно формуле:

$$E = (S_{\text{реал}}/S_{100\%}) \times 100\%,$$

где $S_{\text{реал}}$ – площадь пика образца контроля качества, подвергнутого процедуре пробоподготовки, $S_{100\%}$ – площадь пика образца контроля качества, представляющего 100%-ную эффективность экстракции.

Условия хромато-масс-спектрометрического анализа. Хроматографирование осуществляли в изократическом режиме при использовании в качестве подвижной фазы MeCN (элюент Б) и 0.1%-ную HCOOH в воде (элюент А) при объемном соотношении 97 : 3 соответственно. Объем вводимой аликвоты 2 мкл, скорость потока элюента 0.55 мл/мин, температура автоинжектора и колонки 15 и 40°C соответственно, среднее время удерживания ИБФ 6.34 ± 0.02 мин (рис. 1а) и ИБФ–ОН 4.51 ± 0.02 мин (рис. 1б), общая продолжительность анализа 7.00 мин.

Для детектирования аналитов использовали метод tandemной масс-спектрометрии с электро-распылительной ионизацией в режиме мониторинга заданных реакций (регистрировали отрицательно заряженные ионы на основе переходов, m/z : 379.1 $\rightarrow$ 256.1 (ИБФ) и 395.1 $\rightarrow$ 377.1 (ИБФ–ОН). Время накопления сигнала 150 мс. В табл. 1 приведены условия МС/МС-детектирования, предварительно оптимизированные для обеспечения максимальной чувствительности

прибора путем прямого шприцевого ввода раствора анализата в камеру источника ($c = 1$ мкг/мл в соответствующей подвижной фазе при скорости потока 7 мкл/мин).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Растворимость 2,6-диизоборнил-4-метилфенола. Растворимость ИБФ изучали в 13 растворителях различной природы (табл. 2): полярные протонные (ROH , H_2O) и апротонные (EtOAc , $(\text{Me})_2\text{CO}$, MeCN , $(\text{Me})_2\text{SO}$), неполярные ($n\text{-C}_6\text{H}_{14}$, $n\text{-C}_7\text{H}_{16}$, $(\text{Et})_2\text{O}$, $\text{MeOC}(\text{Me})_3$, CHCl_3). Как и ожидалось, анализат оказался лучше всего растворим в неполярных растворителях (за исключением $(\text{Et})_2\text{O}$), а также в одном полярном апротонном (EtOAc). В связи с тем, что даже в таких неполярных растворителях, как $(\text{Et})_2\text{O}$, $\text{MeOC}(\text{Me})_3$, CHCl_3 , ориентационные и индукционные силы на фоне преобладания дисперсионных вносят определенный вклад в межмолекулярные взаимодействия, довольно сложно выявить характер зависимостей растворимости ИБФ от диэлектрической проницаемости конкретного растворителя, его поляризуемости или дипольного момента даже в пределах одной группы. Тем не менее можно выделить следующую корреляцию. В ряду полярных амфипротонных растворителей (в скобках приведены значения их полярности, рассчитанные относительно полярности воды [26]) H_2O (1.000), MeOH (0.762), EtOH (0.654), *изо*- PrOH (0.546) наблюдается возрастание растворимости ИБФ (табл. 2) наряду с закономерным уменьшением энергий водородных связей и диполь-дипольных взаимодействий между молекулами растворителя (параметры δ_{H} и δ_{D} по Хансену [27] соответственно). Зависимость значения растворимости ИБФ в рассматриваемых растворителях от их относительной полярности носит линейный характер (рис. 2; $y = -56.0537x + 56.5124$, $R^2 = 0.9998$). Полученный порядок указывает на то, что в общем случае растворимость соединения возрастает с увеличением размера молекул растворителя и уменьшением его полярности. В целом экспериментальные данные свидетельствуют о незначительном вкладе специфической сольватации в процесс растворения анализата, что, вероятно, обусловлено стерической заслоненностью гидроксильной группы объемными изоборнильными группировками. Так, по мере введения в молекулу фенола различных заместителей в ряду фенол (9.98 [28], 82.8 мг/мл [29]), *пара*-крезол (10.14 [28], 21.5 мг/мл [29]), 2,6-диизоборнил-4-метилфенол (11.20, 0.46 мг/мл), 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенол (12.20 [30], 0.6×10^{-3} мг/мл [29]) наблюдается снижение подвижности атома водорода гидроксила, что выражается в возрастании значений pK_{a} и уменьшении растворимости

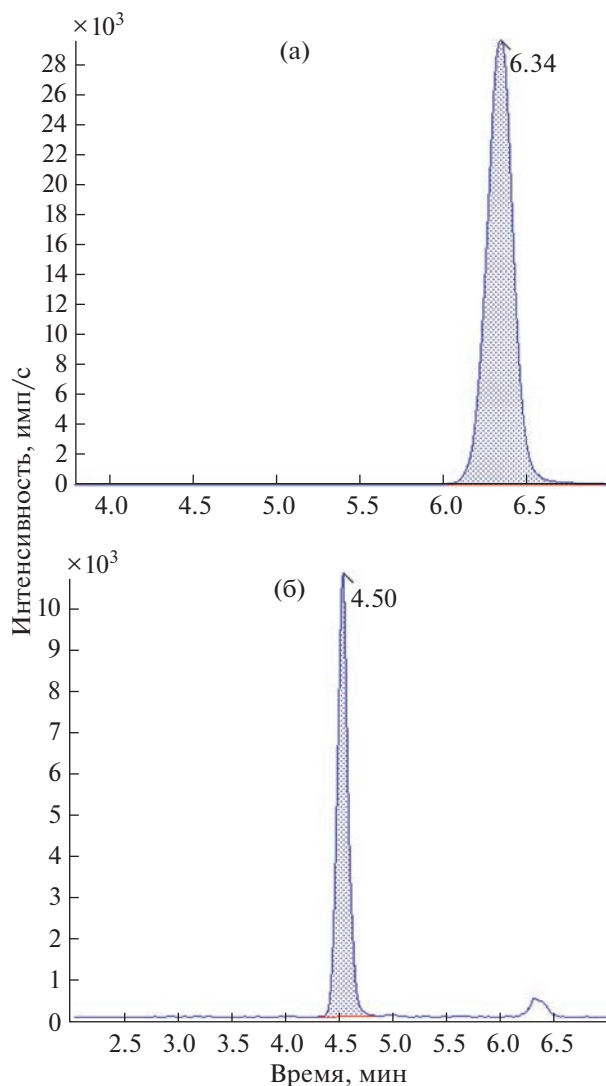


Рис. 1. Репрезентативные хроматограммы смеси стандартных образцов 2,6-диизоборнил-4-метилфенола ($c = 4.5$ мкг/мл) (а) и 2,6-диизоборнил-4-гидроксиметилфенола ($c = 18 \times 10^{-3}$ мкг/мл) (б), экстрагированных из плазмы.

соединений в воде (данные представлены для $I = 0$ и $t = 20$ или 25°C).

В фармакопейном анализе понятие растворимости используется в качестве характеристики приблизительной растворимости фармацевтической субстанции при постоянной температуре. Согласно общей фармакопейной статье (ОФС. 1.2.1.0005.15 Растворимость) [31], растворимость соединения в различных растворителях можно охарактеризовать терминами (в скобках приведено примерное количество растворителя в мл, необходимое для растворения 1 г вещества): практически нерастворим (более 10000), очень мало растворим (1000–10000), мало растворим (100–1000), умеренно растворим (30–100), растворим

Таблица 1. Условия МС/МС-детектирования

Параметр	Значение параметра	
	ИБФ	ИБФ–ОН
Потенциал входа, В	–3.4	
Потенциал декластеризации, В	–260	–200
Энергия столкновения, В	–60	–48
Потенциал столкновения на выходе из ячейки, В	–10	
Газовая завеса (N_2), psi	20	
Газ столкновения (N_2), psi	10	
Напряжение на капилляре, В	–4500	
Температура источника, °C	500	
Газ-распылитель (воздух), psi	40	
Газ-нагреватель (воздух), psi	35	

Таблица 2. Растворимость 2,6-диизоборнил-4-метилфенола в различных растворителях при 25°C

Растворитель	S , мг/мл	S , мл растворителя на 1 г вещества*
Гексан	53.6 ± 1.0	19
Гептан	50.3 ± 1.1	20
Диэтиловый эфир	22.7 ± 1.5	44
Метил-трет-бутиловый эфир	98.6 ± 3.8	10
Хлороформ	346 ± 14	3
Этилацетат	96.8 ± 2.0	10
Изопропанол	26.9 ± 0.5	37
Ацетон	12.57 ± 0.31	80
Этанол	19.0 ± 0.4	53
Метанол	13.80 ± 0.05	73
Ацетонитрил	25.50 ± 0.23	39
Диметилсульфоксид	0.40 ± 0.06	2500
Вода	0.460 ± 0.032	2174

* Характеристика растворимости вещества согласно Государственной Фармакопеи РФ XIV издания [31].

(10–30), легко растворим (1–10) и очень легко растворим (до 1). Из представленных значений (табл. 2) следует, что ИБФ легко растворим в $CHCl_3$, $MeOC(Me)_3$ и $EtOAc$, растворим в $n-C_6H_{14}$ и $n-C_7H_{16}$, умеренно растворим в $iso-PrOH$, $MeCN$, $(Et)_2O$, $EtOH$, $MeOH$ и $(Me)_2CO$, очень мало растворим в воде и $(Me)_2SO$.

Выбор экстракционной системы. На начальном этапе оценивали возможность извлечения ИБФ

из плазмы человека и крысы методом осаждения белка добавлением $MeCN$ или $MeOH$ (система 1), отличающимся высокой производительностью и экспрессностью. Тем не менее степень извлечения аналита варьировалась от 58 до 61%, что косвенно указывает на высокую степень связывания препарата с белками и/или липидами биологической матрицы. Вследствие этого данные варианты исключены нами из дальнейшего рассмотрения. По результатам определения растворимости ИБФ в различных растворителях (табл. 2) выбрали ряд наиболее подходящих экстрагентов, в том числе их смесей, для извлечения аналитов из биообразцов методом ЖЖЭ (системы 2–9). Несмотря на то, что ИБФ ($\lg P = 8.14$) и ИБФ–ОН ($\lg P = 6.20$) – высоколипофильные соединения, экстракция с применением неполярных растворителей, а также их смесей (системы 2–5 и 7) оказалась наименее эффективна с точки зрения извлечения ИБФ (рис. 3), которая не превышала 61% (здесь и далее приводим усредненные величины). Аналогичная ситуация наблюдалась и для смеси $n-C_6H_{14}$ с полярным апротонным растворителем $EtOAc$ (46%, система 6). Использование $CHCl_3$ с добавлением полярных протонных растворителей – спиртов $MeOH$ и $iso-PrOH$ (5 : 1, по объему), выступающих в роли депротенинизирующих агентов, позволило достичь степени извлечения ИБФ, равной 66% (рис. 3). $CHCl_3$ по сравнению с $n-C_6H_{14}$ характеризуется большей летучестью, что позволяет значительно сократить время высушивания экстрактов в ходе дальнейшей пробоподготовки. Именно это преимущество определило выбор данного растворителя в качестве основного компонента экстракционной системы, несмотря на близкие значения степени извлечения ИБФ $CHCl_3$ и $n-C_6H_{14}$ (~44%, рис. 3). Напротив, для ИБФ–ОН при использовании неполярных растворителей получили удовлетворительные результаты по его извлечению (75–83%). Тем не менее выбор системы $CHCl_3$ – $iso-PrOH$ позволил существенно повысить степень извлечения соединения (96%, рис. 3). Следует отметить, что при экстракции ИБФ из плазмы наблюдали большой разброс данных между тестируемыми системами (степень извлечения варьировалась от 37 до 66%, рис. 3). Полученные показатели были ниже и не коррелировали с результатами по извлечению ИБФ–ОН, что, вероятно, обусловлено большей липофильностью ИБФ. Таким образом, в качестве окончательного варианта экстракционной системы выбрали смесь $CHCl_3$ – $iso-PrOH$ (5 : 1, по объему).

Влияние соотношения компонентов экстракционной системы на извлечение аналитов. Для выбранной экстракционной системы $CHCl_3$ – $iso-PrOH$ оценили влияние соотношения компонентов (1 : 1, 2 : 1, 2.5 : 1, 3 : 1, 5 : 1 соответственно, по объему) на степень извлечения аналитов (изна-

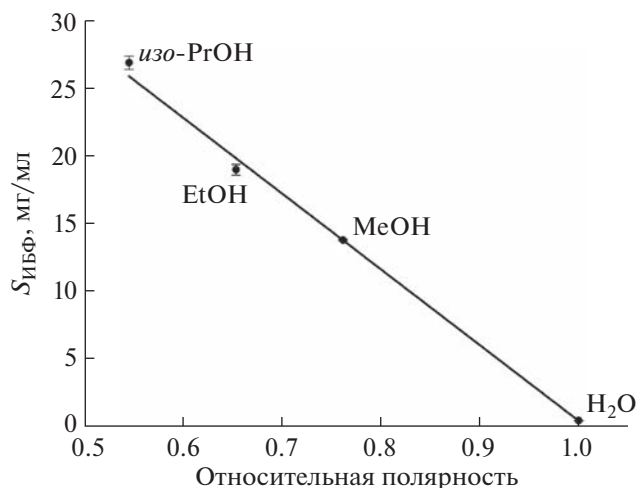


Рис. 2. Зависимость растворимости 2,6-диизоборнил-4-метилфенола (мг/мл) от относительной полярности растворителя ($R^2 = 0.9998$).

чально выбрали соотношение 5 : 1). Статистических различий, рассчитанных попарно между двумя группами относительно системы CHCl_3 –*изо*-PrOH (5 : 1, по объему) с помощью *t*-критерия Стьюдента, выявлено не было ($p > 0.05$). Однако отмечены визуальные различия – при соотношении CHCl_3 –*изо*-PrOH, равном 5 : 1, белковый слой на границе фаз тоньше, что позволяет отбирать больший объем органической фазы (рис. 4). В связи с этим указанное соотношение компонентов используемой экстракционной системы выбрали как наиболее подходящее.

Влияние добавок неорганических соединений на извлечение аналитов. Одним из факторов, влияющих на полноту процесса экстракции, является величина pH водной фазы, так как только в нейтральной форме аналит в максимальном количестве переходит в органическую составляющую и в меньшей степени связывается с белками плазмы. Экстракция соединений, представляющих собой

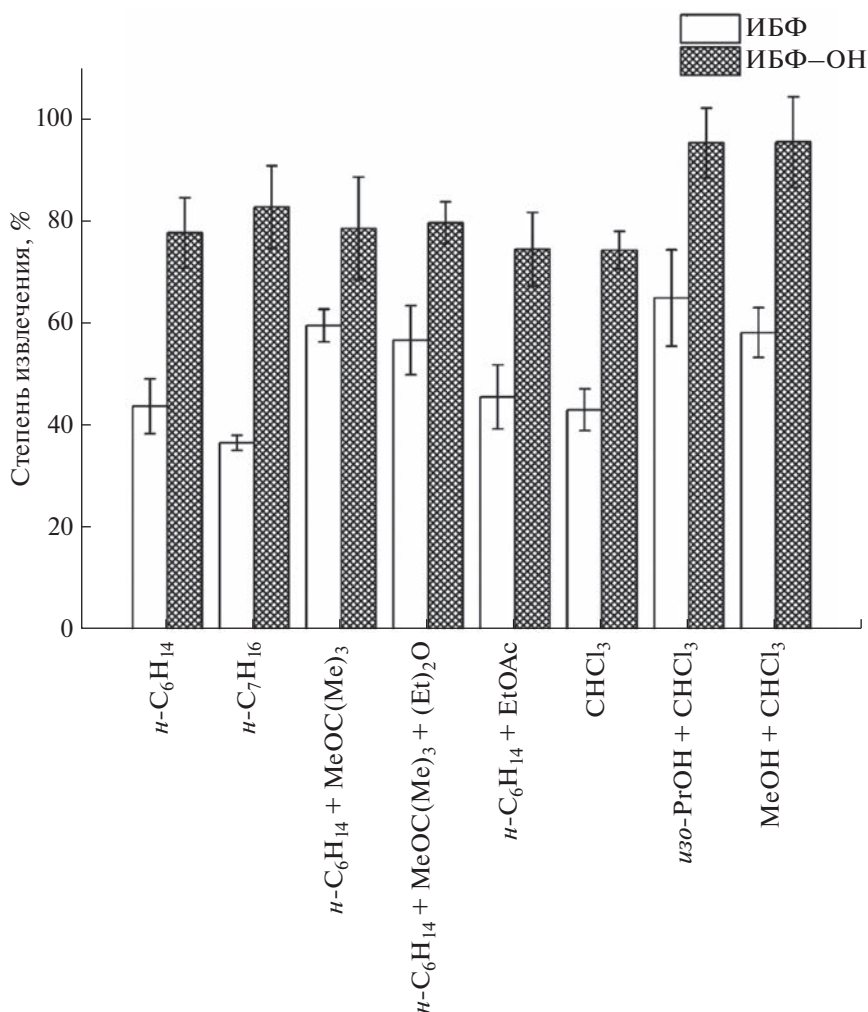


Рис. 3. Результаты оценки степени извлечения 2,6-диизоборнил-4-метилфенола и 2,6-диизоборнил-4-гидроксиметилфенола из образцов плазмы с использованием различных экстракционных систем.

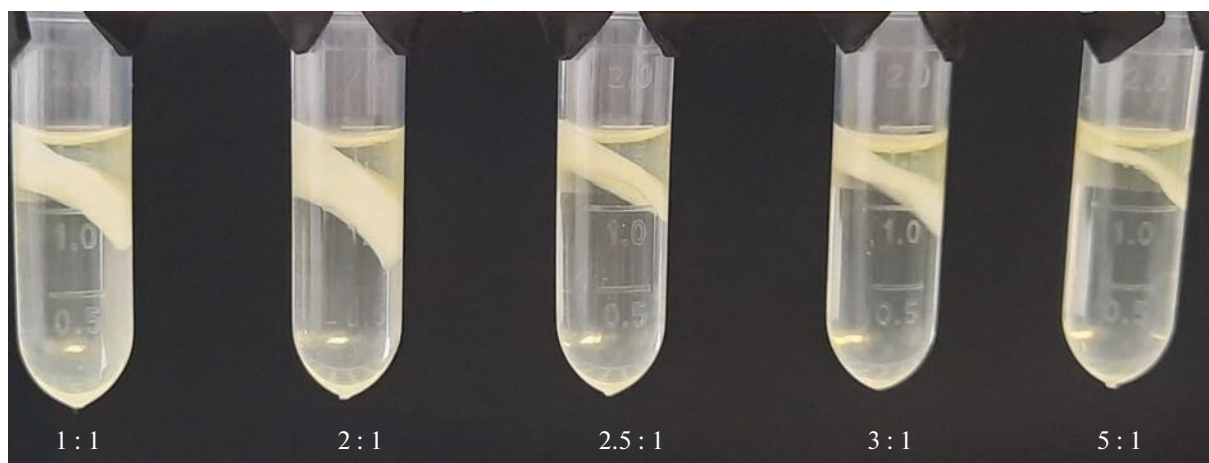


Рис. 4. Визуальное представление образцов после экстракции аналитов из плазмы смесью CHCl_3 –*изо*-PrOH при различных соотношениях компонентов (по объему).

слабые кислоты, максимальна только при значениях pH ниже pK_a аналита не менее чем на две единицы. ИБФ ($pK_{a1} = 11.20$) и ИБФ–ОН ($pK_{a1} = 10.33$, $pK_{a2} = 15.20$) обладают слабыми кислотными свойствами, поэтому их экстракция из плазмы крови, состоящей на 90–92% из воды, наиболее эффективна лишь в кислых, нейтральных и слабощелочных средах. В связи с этим мы наблюдали незначительное влияние pH водной фазы при добавлении H_2SO_4 и H_3PO_4 на извлечение аналитов, так как в интервале pH от 0 до 8 соединения находятся в молекулярной форме. Кроме того, добавление кислот способствовало частичному растворению белка, что приводило к загрязнению получаемых экстрактов.

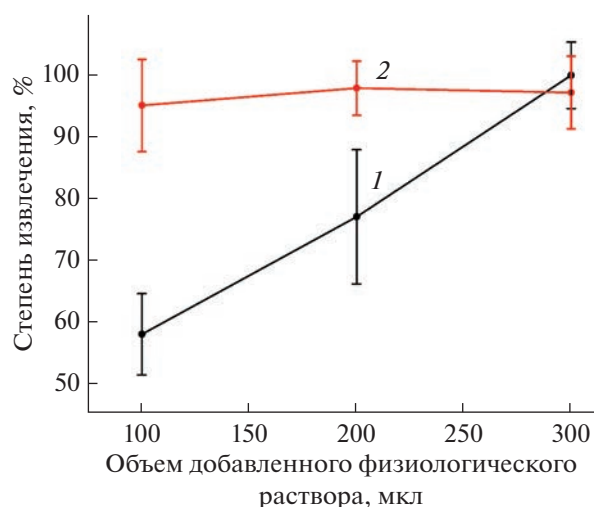


Рис. 5. Зависимость степени извлечения 2,6-диизоборнил-4-метилфенола (1) и 2,6-диизоборнил-4-гидроксиметилфенола (2) от объема добавленного физиологического раствора на этапе экстракции.

При внесении 3 М раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ между фазами формировался выраженный белковый слой, что затрудняло отбор нижней органической фракции и приводило, таким образом, к потере аналитов. Кроме того, введение в систему $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ значительно уменьшало извлечение ИБФ (по сравнению с системой, в которой $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ отсутствовал).

Принимая во внимание методики, описанные в работах [15, 17, 23], изучили также влияние добавки физиологического раствора на степень извлечения ИБФ и ИБФ–ОН. Для этого в 10 мкл стандартного раствора аналитов вносили 100–300 мкл физиологического раствора и 190 мкл плазмы, создавая, таким образом, соотношения раствор–плазма, равные 1 : 2, 1 : 1, 1.5 : 1 (по объему) соответственно. Далее проводили пробоподготовку образцов (см. выше раздел “Пробоподготовка”). Как видно из рис. 5, наблюдалось симбатное изменение степени извлечения ИБФ в зависимости от количества добавленного физиологического раствора. Так, разбавление плазмы 300 мкл физиологического раствора позволило достичь максимального извлечения ИБФ ($100 \pm 4\%$). В случае ИБФ–ОН добавление физиологического раствора не оказывало влияния на его извлечение (рис. 5, по сравнению с системой, не содержащей физиологический раствор).

Влияние времени перемешивания на извлечение аналитов. После окончательного выбора способа пробоподготовки образцов плазмы человека и крысы (10 мкл стандартного раствора аналитов + 190 мкл плазмы + 300 мкл физиологического раствора + 200 мкл *изо*-PrOH, перемешивание, + + 1000 мкл CHCl_3 , далее см. выше раздел “Пробоподготовка”) требовалось установить подходящее время перемешивания образцов, обеспечивающее наиболее полное извлечение аналитов

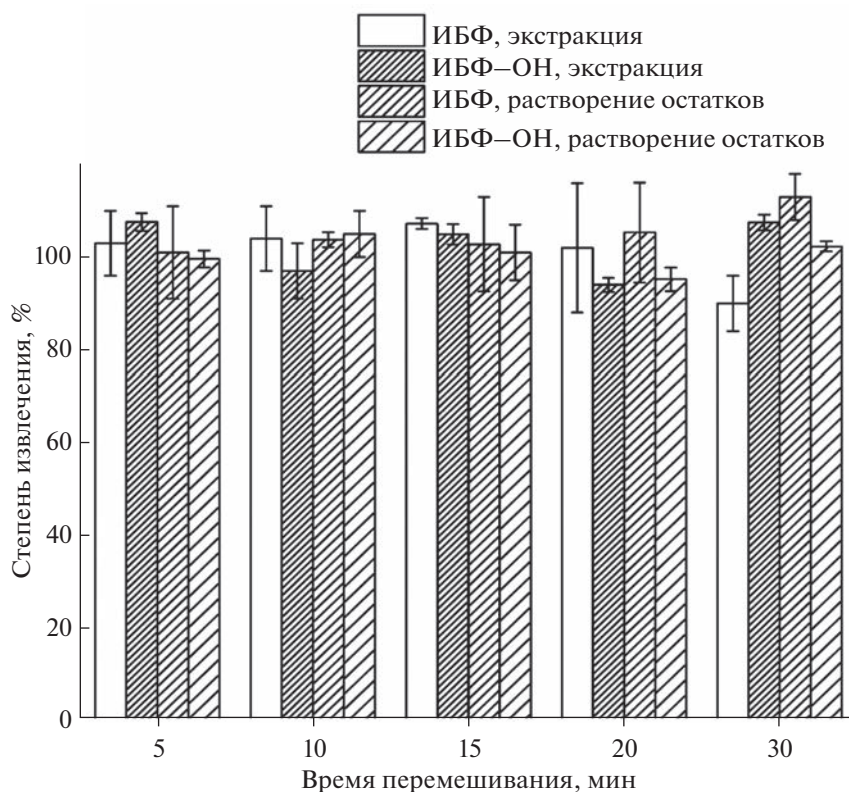


Рис. 6. Влияние времени перемешивания образцов на степень извлечения 2,6-диизоборнил-4-метилфенола и 2,6-диизоборнил-4-гидроксиметилфенола на этапах экстракции и растворения сухих остатков.

как на этапе их экстракции, так и при растворении остатков после высушивания. Как видно из рис. 6, практически полное извлечение целевых компонентов (с учетом погрешности) достигается уже после 5 мин интенсивного встряхивания экстрактов и сухих остатков на пробирочном вихре. Близкие результаты по извлечению аналитов как на этапе экстракции, так и растворения остатков указывают на отсутствие термической деградации соединений при их высушивании (~45 мин) в ходе очистки и концентрирования образцов.

* * *

Разработана методика пробоподготовки образцов плазмы крови человека и крысы, обеспечивающая практически 100%-ное извлечение как 2,6-диизоборнил-4-метилфенола, так и его активного метаболита 2,6-диизоборнил-4-гидроксиметилфенола. В качестве способа пробоподготовки выбран простой и доступный метод жидкостно-жидкостной экстракции с использованием смеси CHCl_3 –*изо*-PrOH (5 : 1, по объему) в качестве экстрагента, в одном из компонентов которого (CHCl_3) 2,6-диизоборнил-4-метилфенол демонстрирует наибольшую растворимость (346 мг/мл).

Показано, что добавление 300 мкл физиологического раствора препятствует связыванию соединения с белками и липидами плазмы, повышая тем самым его извлечение с 66 до 100%. Высушивание образцов в вакуумном концентраторе на воздухе при 45°C с дальнейшим растворением сухих остатков в MeCN способствует не только их очистке и снижению возможного мешающего влияния со стороны соэкстрагирующихся компонентов биологической матрицы, но и позволяет сконцентрировать аналиты почти в три раза. Предложенная методика по сравнению с описанной ранее позволяет сократить затраты времени на этапе пробоподготовки как минимум в два раза с объемом вводимой аликвоты 2 мкл. Указанные преимущества весьма существенны при работе с чувствительным и дорогостоящим аналитическим оборудованием, а также при анализе большого количества биообразцов методом ВЭЖХ-МС/МС. Для анализа достаточно 0.2 мл плазмы крови, тогда как по известной методике требовалось 4 мл биоматериала. Методика пробоподготовки и анализа успешно апробирована на реальных образцах плазмы крыс после однократного перорального введения им субстанции 2,6-диизоборнил-4-метилфенола в персиковом масле в дозе 10 мг/кг в рамках фармакокинетических исследований.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 22-25-00575; <https://rscf.ru/project/22-25-00575/>).

Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории органического синтеза и химии природных соединений института химии Коми научно-го центра Уральского отделения РАН (Сыктывкар, Россия) в лице А.В. Кучина и И.Ю. Чукичевой за предоставление субстанций 2,6-диизоборнил-4-метилфенола и 2,6-диизоборнил-4-гидроксиметилфенола.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Makhoba X.H., Jr C.V., Mosa R.A., Viegas F.P.D., Poole O.J. Potential impact of the multi-target drug approach in the treatment of some complex diseases // *Drug Des. Devel. Ther.* 2020. V. 14. P. 3235. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S257494>
2. Talevi A. Multi-target pharmacology: possibilities and limitations of the “skeleton key approach” from a medicinal chemist perspective // *Front. Pharmacol.* 2015. V. 6. Article 205. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00205>
3. Кучин А.В., Чукичева И.Ю., Федорова И.В. Способ получения 2,6-диизоборнил-4-метилфенола. Патент РФ № 2394807. Заявка 2008120876/04 от 28.05.2008, опубл. 20.07.2010.
4. Чукичева И.Ю., Буравлев Е.В., Федорова И.В., Борисенков М.Ф., Кучин А.В. Антиоксидантные свойства терпенофенолов // *Изв. АН. Сер. хим.* 2010. № 12. С. 2220. (Chukicheva I.Yu., Buravlev E.V., Fedorova I.V., Borisenkov M.F., Kutchin A.V. Antioxidant properties of terpene-substituted phenols // *Russ. Chem. Bull.* 2010. V. 59. № 12. P. 2276.) <https://doi.org/10.1007/s11172-010-0388-5>
5. Плотников М.Б., Краснов Е.А., Чернышева Г.А., Смольякова В.И., Иванов И.С., Кучин А.В., Чукичева И.Ю., Федорова И.В. Нейропротекторное средство. Патент РФ № 2406488. Заявка 2009115030/15 от 20.04.2009, опубл. 20.12.2010.
6. Чернышева Г.А., Смольякова В.И., Кучин А.В., Чукичева И.Ю., Плотников М.Б. Нейропротективный эффект диборнола на модели фокальной ишемии-реперфузии головного мозга у крыс // *Бюл. эксп. биол. и мед.* 2018. Т. 166. № 7. С. 18. (Chenysheva G.A., Smol'yakova V.A., Kutchin A.V., Chukicheva I.Yu., Plotnikov M.B. Neuroprotective effects of dibornol in focal cerebral ischemia/reperfusion in rats // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2018. V. 166. № 1. P. 15.) <https://doi.org/10.1007/s10517-018-4278-4>
7. Плотникова Т.М., Чернышева Г.А., Смольякова В.А., Щетинин П.П., Кучин А.В., Чукичева И.Ю., Плотников М.Б. Кардиопротективная активность 2,6-диизоборнил-4-метилфенола при острой ишемии-реперфузии миокарда у крыс // *Бюл. эксп. биол. и мед.* 2018. Т. 165. № 5. С. 601. (Plotnikova T.M., Chernysheva G.A., Smol'yakova V.A., Shchetinin P.P., Kutchin A.V., Chukicheva I.Yu., Plotnikov M.B. Cardioprotective activity of 2,6-diisobornyl-4-methylphenol in acute myocardial ischemia/reperfusion in rats // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2018. V. 165. № 5. P. 657.) <https://doi.org/10.1007/s10517-018-4235-2>
8. Жданкина А.А., Логвинов С.В., Плотников М.Б., Смольякова В.И., Иванов И.С., Кучин А.В., Чукичева И.Ю., Федорова И.В. Средство, обладающее ретинопротекторной активностью. Патент РФ № 2406487. Заявка 2009117355/15 от 06.05.2009, опубл. 20.12.2010.
9. Плотникова Т.М., Чернышева Г.А., Смольякова В.А., Щетинин П.П., Кучин А.В., Чукичева И.Ю., Плотников М.Б. Гемореологические эффекты диборнола в условиях модели ишемии/реперфузии миокарда // *Бюл. эксп. биол. и мед.* 2014. Т. 157. № 2. С. 173. (Plotnikova T.M., Chernysheva G.A., Smol'yakova V.I., Shchetinin P.P., Kutchin A.V., Chukicheva I.Yu., Plotnikov M.B. Hemorheologic effects of dibornol in a model of myocardial ischemia/reperfusion // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2014. V. 157. № 2. P. 211.) <https://doi.org/10.1007/s10517-014-2527-8>
10. Плотников М.Б., Краснов Е.А., Смольякова В.И., Иванов И.С., Кучин А.В., Чукичева И.Ю. Средство, увеличивающее мозговой кровоток. Патент РФ № 2351321. Заявка 2007126303/15 от 10.07.2007, опубл. 10.04.2009.
11. Плотников М.Б., Краснов Е.А., Смольякова В.И., Иванов И.С., Кучин А.В., Чукичева И.Ю., Буравлев Е.В. Средства, обладающие гемореологической, антиагрегантной и антитромбогенной активностью. Патент РФ № 2347561. Заявка 2007115301/15 от 23.04.2007, опубл. 27.02.2009.
12. Боровская Т.Г., Камалова С.И., Кривова Н.А., Заева О.Б., Полуэктова М.Е., Вычужанина А.В., Григорьева В.А., Плотников М.Б., Гольдберг В.Е. Экспериментальное изучение эффективности фенольных антиоксидантов при мужской инфертильности, обусловленной патоспермией // *Бюл. эксп. биол. и мед.* 2018. Т. 166. № 7. С. 10. (Borovskaya T.G., Kamalova S.I., Krivova N.A., Zaeva O.B., Poluektova M.E., Vychuzhanina A.V., Grigor'eva V.A., Plotnikov M.B., Goldberg V.E. Experimental study of the effectiveness of phenolic antioxidants in male infertility caused by pathospermia // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2018. V. 166. № 1. P. 7.) <https://doi.org/10.1007/s10517-018-4276-6>
13. Боровская Т.Г., Камалова С.И., Григорьева В.А., Полуэктова М.Е., Вычужанина А.В., Кучин А.В., Чукичева И.Ю., Буравлев Е.В., Фомина Т.И., Плотников М.Б., Гольдберг В.Е., Дыгай А.М. Эффективность антиоксидантов фенольной природы в экспериментальной модели доброкачественной гиперплазии предстательной железы // *Бюл. эксп. биол. и мед.* 2019. Т. 167. № 5. С. 541. (Borovskaya T.G., Kamalova S.I., Grigor'eva V.A., Poluektova M.E., Vychuzhanina A.V., Kutchin A.V., Chukicheva I.Yu., Buravlev E.V., Fomina T.I., Plotnikov M.B., Goldberg V.E., Dygai A.M. Effectiveness of phenolic antioxidants in experimental model of benign prostatic hyperplasia // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2019. V. 167. № 5. P. 606.) <https://doi.org/10.1007/s10517-019-04580-3>
14. Чернышева Г.А., Смольякова В.И., Плотников М.Б., Яновская Е.А., Гурто Р.В., Удот В.В., Кучин А.В., Чукичева И.Ю. Фармакокинетика фенольного антиоксиданта 4-метил-2,6-диизоборнилфенола при

- внутривенном введении // Эксп. клин. фармакол. 2011. Т. 74. № 9. С. 20.
15. Смольякова В.И., Чернышева Г.А., Яновская Е.А., Гурто Р.В., Кучин А.В., Чукичева И.Ю., Удут В.В., Плотников М.Б. Оценка линейности фармакокинетики фенольного антиоксиданта 4-метил-2,6-диизоборнилфенола при внутрижелудочном введении // Эксп. клин. фармакол. 2014. Т. 77. № 2. С. 31.
 16. Смольякова В.И., Чернышева Г.А., Яновская Е.А., Гурто Р.В., Кучин А.В., Чукичева И.Ю., Удут В.В., Плотников М.Б. Распределение 4-метил-2,6-диизоборнилфенола в тканях и органах крыс // Эксп. клин. фармакол. 2014. Т. 77. № 9. С. 28.
 17. Чернышева Г.А., Смольякова В.И., Яновская Е.А., Кучин А.В., Чукичева И.Ю., Удут В.В., Плотников М.Б. Биодоступность фенольного антиоксиданта 4-метил-2,6-диизоборнилфенола при пероральном введении // Бюл. эксп. биол. и мед. 2016. Т. 161. № 4. С. 494. (Chernysheva G.A., Smolyakova V.I., Yanovskaya E.A., Kutchin A.V., Chukicheva I.Yu., Udut V.V., Plotnikov M.B. Bioavailability of phenolic antioxidant 4-methyl-2,6-diisobornylphenol after oral administration // Bull. Exp. Biol. Med. 2016. V. 161. № 4. P. 505.)
<https://doi.org/10.1007/s10517-016-3448-5>
 18. Яновская Е.А., Смольякова В.И., Чернышева Г.А., Гурто Р.В., Кучин А.В., Чукичева И.Ю., Удут В.В., Плотников М.Б. Экскреция высоколипофильного фенольного антиоксиданта у крыс // Хим.-фарм. журн. 2017. Т. 51. № 5. С. 13. (Yanovskaya E.A., Smolyakova V.I., Chernysheva G.A., Gurto R.V., Kutchin A.V., Chukicheva I.Yu., Udut V.V., Plotnikov M.B. Excretion of a highly lipophilic phenolic antioxidant from rats // Pharm. Chem. J. 2017. V. 51. № 5. P. 340.)
<https://doi.org/10.1007/s11094-017-1610-7>
 19. Bird D.A., Tangirala R.K., Fruebis J., Steinberg D., Witztum J.L., Palinski W. Effect of probucol on LDL oxidation and atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice // J. Lipid Res. 1998. V. 39. № 5. P. 1079.
 20. Xie K., Xiang J., Yu Q., Liang M.-Z., Nan F., Qin Y.-P. Determination of probucol in human plasma by HPLC-MS/MS // J. Sichuan Univ. (Med. Sci. Ed.). 2012. V. 43. № 5. P. 775.
 21. Kudo S., Akiyama H., Odomi M., Miyamoto G. High-performance liquid chromatographic procedure for the determination of probucol in human plasma // J. Chromatogr. B: Biomed. Appl. 1983. V. 277. P. 419.
[https://doi.org/10.1016/s0378-4347\(00\)84869-0](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(00)84869-0)
 22. Ortega H., Coperias J.L., Castilla P., Gómez-Coronado D., Lasunción M.A. Liquid chromatographic method for the simultaneous determination of different lipid-soluble antioxidants in human plasma and low-density lipoproteins // J. Chromatogr. B: Biomed. Appl. 2004. V. 803. № 2. P. 249.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2003.12.025>
 23. Elinder L.S., Walldius G. Simultaneous measurement of serum probucol and lipid-soluble antioxidants // J. Lipid Res. 1992. V. 33. № 1. P. 131.
 24. Nourooz-Zadeh J., Gopaul N.K., Forster L.A., Ferns G.A., Ånggård E.E. Measurement of plasma probucol levels by high-performance liquid chromatography // J. Chromatogr. B: Biomed. Appl. 1994. V. 654. № 1. P. 55.
[https://doi.org/10.1016/0378-4347\(94\)00003-4](https://doi.org/10.1016/0378-4347(94)00003-4)
 25. Краснов Е.А., Назмутдинова Е.Е., Иванов И.С., Чукичева И.Ю., Кучин А.В., Плотников М.Б. Разработка методик анализа нового пространственно-затрудненного фенола диборнола в качестве фармацевтической субстанции // Хим.-фарм. журн. 2010. Т. 44. № 11. С. 53. (Krasnov E.A., Nazmutdinova E.E., Ivanov I.S., Chukicheva I. Yu., Kuchin A.V., Plotnikov M.B. Development of methods for the analysis of the new sterically hindered phenol dibornol as a pharmaceutical substance // Pharm. Chem. J. 2011. V. 44. № 11. P. 639.)
<https://doi.org/10.1007/s11094-011-0536-8>
 26. Reichardt C., Welton T. Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry. Weinheim: Wiley-VCH, 2011. 711 p.
 27. Hansen C.M. Hansen Solubility Parameters: A User's Handbook. N. W.: CRC Press, 2007. 520 p.
 28. Gross K.C., Seybold P.G. Substituent effects on the physical properties and pK_a of phenol // Int. J. Quantum Chem. 2001. V. 85. № 4–5. P. 569.
<https://doi.org/10.1002/qua.1525>
 29. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> (23.05.2022).
 30. Boulebd H. Radical scavenging behavior of butylated hydroxytoluene against oxygenated free radicals in physiological environments: Insights from DTF calculations // Int. J. Chem. Kinet. 2021. V. 54. P. 50.
<https://doi.org/10.1002/kin.21540>
 31. Государственная Фармакопея РФ XIV издания. М.: ФГБУ “Научный центр экспертизы средств медицинского применения” Минздрава России, 2018. Т. 1. С. 542 (ОФС. 1.2.1.0005.15 Растворимость). <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-1-0005-15-rastvorimost> (23.05.2022). <https://femb.ru/record/pharmacopeia14> (23.05.2022).

УДК 579.6:57.042:615.2

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИБУПРОФЕНА В КУЛЬТУРАЛЬНЫХ СРЕДАХ РОДОКОККОВ И КИНЕТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА ЕГО БИОДЕСТРУКЦИИ

© 2023 г. Е. В. Вихарева^{a, b, *}, А. А. Селянинов^c, Г. А. Бажутин^a, Е. А. Тюмина^a

^aПермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук
ул. Ленина, 13а, Пермь, 614990 Россия

^bПермская государственная фармацевтическая академия
ул. Полевая, 2, Пермь, 614900 Россия

^cПермский национальный исследовательский политехнический университет
Комсомольский просп., 29, Пермь, 614990 Россия

*e-mail: vihareva@pfa.ru

Поступила в редакцию 15.04.2022 г.

После доработки 12.05.2022 г.

Принята к публикации 12.05.2022 г.

Подобраны условия хроматографического определения ибупрофена в культуральных средах *Rhodococcus* spp. методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. Процедурой валидации подтверждены специфичность, линейность и точность предложенной методики, что позволяет использовать ее для достоверной оценки содержания ибупрофена в процессе бактериальной деструкции. С применением кинетического моделирования осуществлен прогноз изменения содержания ибупрофена, определены период полураспада, время окончания процесса биодеструкции и его воспроизводимость.

Ключевые слова: ибупрофен, ВЭЖХ, *Rhodococcus*, биодеструкция, кинетическое моделирование.

DOI: 10.31857/S0044450223010140, **EDN:** CELDRE

Развитие фармацевтической промышленности и рост объемов производства лекарственных препаратов поставили человечество перед новой экологической проблемой, связанной с попаданием лекарственных средств и их метаболитов (так называемых фармацевтических поллютантов) в окружающую среду. Применение высокоэффективной жидкостной и газовой хроматографии, часто в сочетании с масс-спектрометрией, позволяет обнаруживать фармполлютанты не только в сточных водах, но и в природных водоемах и даже в питьевой воде [1–6].

Одним из широко используемых в медицинской практике нестероидных противовоспалительных препаратов является ибупрофен ($C_{13}H_{18}O_2$; CAS: 15687-27-1; (2*RS*)-2-[4-(2-метилпропил)фенил]пропановая кислота [7]. Ибупрофен (ИБ, схема 1) и его метаболиты обнаружены в сточных водах очистных сооружений разных стран в концентрациях от нескольких нг/л до 6000 мкг/л [8–11].

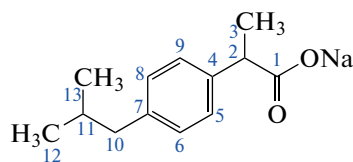


Схема 1. Структурная формула натриевой соли ибупрофена.

На настоящий момент накоплен значительный экспериментальный материал по биодеструкции ИБ различными микроорганизмами, в том числе почвенными и водными бактериями рода *Rhodococcus*, которые отличаются наибольшим разнообразием деградируемых фармполлютантов [12–14]. Исследования направлены в основном на изучение метаболических путей процесса биодеструкции ИБ. Однако информация о возможности определения ИБ в ходе данного процесса явно недостаточна. При этом особый интерес представляет кинетическое моделирование, которое дает возможность оценивать не только скорость, но и воспроизводимость процесса, время его окончания, а также осуществлять переход от лабораторных исследований к промышленным технологиям.

Цель настоящего исследования — подбор методики хроматографического анализа ибупрофена в среде культивирования актинобактерий рода *Rhodococcus* с использованием обращенно-фазовой ВЭЖХ и кинетическое моделирование процесса биодеструкции данного вещества.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты. Использовали натриевую соль ибупрофена ($C_{13}H_{17}NaO_2$, CAS 31121-93-4, соль α -метил-4-(изобутил)фенилуксусной кислоты; Sigma-Aldrich, США) — белый кристаллический порошок, хорошо растворимый в воде. Реагенты имели квалификацию х. ч., ч. д. а. или ос. ч. (База № 1 химреактивов, Россия; Кριοхром, Россия; Merck, Германия; Sigma-Aldrich, США).

Условия проведения процесса биодеструкции ибупрофена. В качестве деструктора ибупрофена использовали штамм *Rhodococcus cerastii* ИЭГМ 1243 из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, <http://www.iegmc.ru>, ЦКП 480868, УНУ 73559, WDCM 768) [15]. В колбу Эрленмейера емк. 250 мл вносили 0.01 г ибупрофена, 100 мл минерально-солевой среды “К” состава (г/л): K_2HPO_4 — 1.0; KH_2PO_4 — 1.0; NH_4NO_3 — 1.0; NaCl — 1.0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0.2; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ — 0.02; $FeCl_3 \cdot 7H_2O$ — 0.001; 0.5 г/л глюкозы, 0.1 мл/л *н*-гексадекана в качестве косубстратов (дополнительных источников углерода и энергии) и инокулят (взвесь клеток родококков) до соответствия стандарту мутности БАК5 (5 NTU). Клетки родококков предварительно выращивали в течение трех суток в мясопептонном бульоне и отмывали 10 mM фосфатным буферным раствором (pH 7.0). Биодеструкцию ибупрофена проводили в условиях периодического культивирования на орбитальном шейкере Certomat IS (Sartorius, Германия) при 160 об/мин и 28°C. Продолжительность экспериментов составляла 5 сут. Пробы объемом 2.0 мл отбирали с интервалом 1 сут.

Приборы и оборудование. Орбитальный шейкер Certomat IS (Sartorius, Германия); хроматограф LC Prominence 20A (Shimadzu, Япония), оснащенный хроматографической колонкой с сорбентом с обращенной фазой Luna 5uC18(2) 100A (4.6 мм × 250 мм) и диодно-матричным детектором (SPD-M20A); лабораторная центрифуга (12000 об/мин, Eppendorf, Германия).

Модельные смеси для построения градуировочной кривой для ВЭЖХ — растворы ибупрофена в среде “К” в диапазоне концентраций 1–100 мкг/мл в зависимости от валидируемого показателя.

Подготовка проб культуральной жидкости родококков для анализа методом ВЭЖХ. Аликвотную часть культуральной среды в количестве 1.0 мл,

содержащей ибупрофен, продукты его биодеструкции, бактериальные клетки и продукты их жизнедеятельности, помещали в пробирку Эппендорфа и центрифугировали при 10000 об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость, освобожденную от клеток, фильтровали через мембранный шприцевой нейлоновый фильтр с размером пор 0.45 мкм (Agilent Technologies, США). В качестве контрольных сред использовали стерильную минеральную среду “К” с ибупрофеном (0.01%) без внесения бактериальных клеток (абиотический контроль); стерильную среду “К” с клетками родококков без ибупрофена (биотический контроль или плацебо).

Учет результатов. Хроматографическую информацию записывали и обрабатывали с помощью программного обеспечения LCSolution (v/1.25 rus).

Валидация методики. Валидационную оценку проводили в 6-кратной повторности по показателям: селективность, линейность, прецизионность и правильность результатов анализа [16].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Экспериментально установили, что ИБ подвергается бактериальному разложению. Остаточная концентрация исследуемого соединения из среды культивирования *Rhodococcus cerastii* ИЭГМ 1243 на уровне 20% через 5 сут эксперимента.

Условия хроматографического определения ибупрофена. При выборе оптимальных условий определения ибупрофена в культуральной среде родококков в качестве неподвижной фазы использовали обращенно-фазовый сорбент из группы алкилсиликагелей. В качестве растворителей применяли смеси ацетонитрила и фосфатного буферного раствора (pH 3) в разных соотношениях, которые позволяли работать в широком УФ-диапазоне и использовать наиболее популярный при анализе лекарственных препаратов спектрофотометрический детектор. Длина волны детектирования ибупрофена составила 220 нм (рис. 1).

Поскольку в изократическом режиме элюирования удалось получить симметричные пики ибупрофена с приемлемыми временами удерживания, то исследования по возможности использования градиентного режима не проводились. В результате для разделения образующейся в процессе биодеструкции ибупрофена многокомпонентной системы предложены следующие условия хроматографического анализа: подвижная фаза ацетонитрил–фосфатный буферный раствор (pH 3) (60 : 40); скорость потока элюента — 1 мл/мин; температура колонки — 40°C; объем пробы — 10 мкл; длина волны детектирования — 220 нм. В описанных

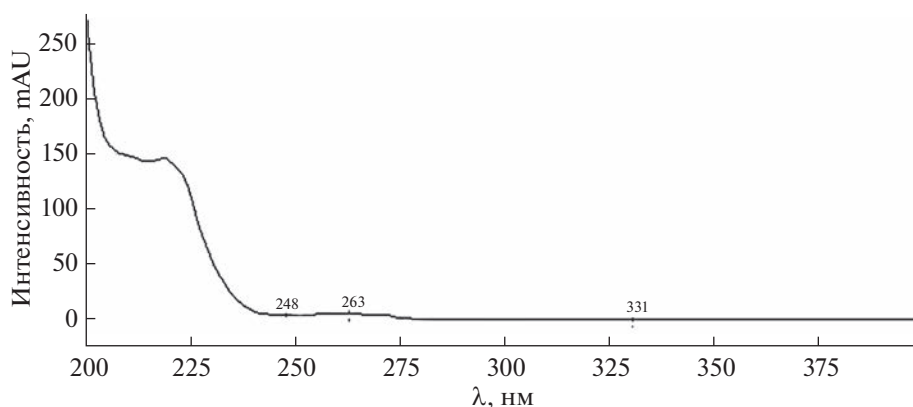


Рис. 1. УФ-спектр стандартного раствора ибупрофена (0.01%).

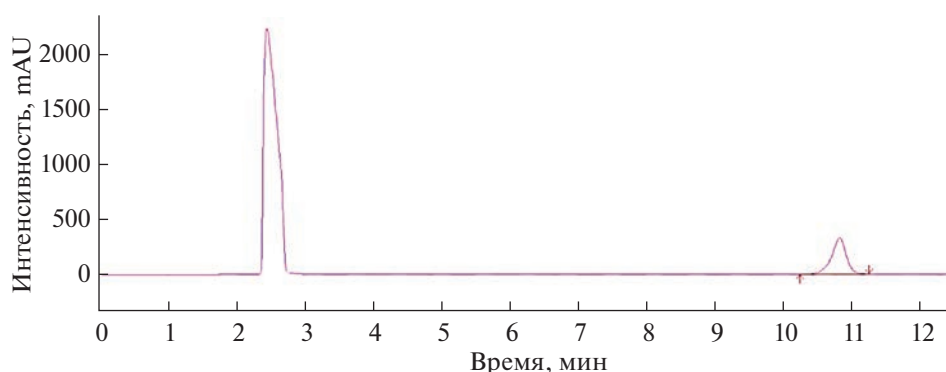


Рис. 2. Хроматограмма ибупрофена (0.01%) в среде "К" (абиотический контроль).

условиях время удерживания ибупрофена составило 10.80 ± 0.02 мин.

Валидационная оценка методики. Для оценки селективности хроматографического определения ибупрофена в предложенных условиях получили хроматограммы раствора стандартного образца ибупрофена (0.01%) в среде "К" (рис. 2), раствора плацебо (среды "К" с клетками родококков без ибупрофена) и раствора ибупрофена в культуральной среде родококков после биодеструкции в течение 5 сут (рис. 3). Установили, что

на хроматограмме раствора плацебо отсутствуют пики с временами удерживания, близкими к ибупрофену. Пики плацебо и культуральной жидкости хорошо разделяются с пиком ибупрофена, что свидетельствует о селективности методики.

При оценке *линейности* построили градуировочный график зависимости площади пика ибупрофена (S) от его концентрации (c) в модельных растворах в интервале от 1 до 100 мкг/мл. Градуировочная зависимость описывается уравнением $S = 13083c$; полученный коэффициент корреля-

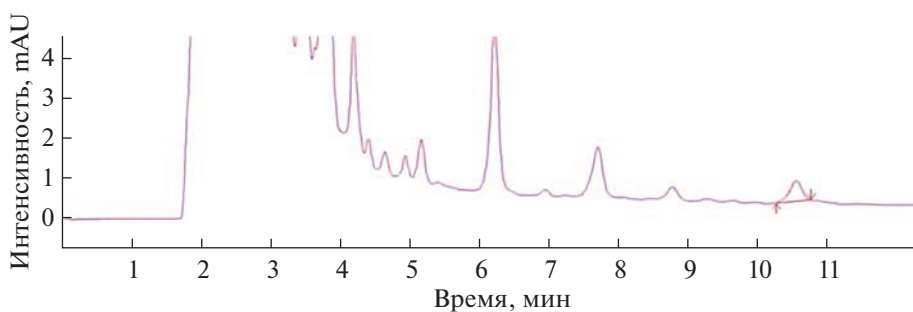


Рис. 3. Хроматограмма культуральной жидкости родококков после ферментации в течение пяти суток.

Таблица 1. Прецизионность и правильность методики хроматографического определения ибупрофена в культуральной среде родококков

Концентрация ибупрофена в модельном растворе	Найдено ибупрофена, мкг/мл	$\bar{x}$ ($n = 6$)	s , мкг/мл	s_r , %	ϵ , %
1.01 мкг/мл (0.0001%)	0.98	0.99	0.11	11.11	–1.00
	0.86				
	1.08				
	0.87				
	1.05				
	1.11				
20.03 мкг/мл (0.002%)	21.10	20.30	0.84	4.14	1.50
	19.62				
	19.31				
	20.84				
	21.19				
	19.73				
70.02 мкг/мл (0.007%)	68.42	69.02	1.25	1.81	–1.40
	69.18				
	69.20				
	71.18				
	67.39				
	68.77				

ции 0.999 указывает на линейность зависимости в данном диапазоне концентраций ибупрофена.

Прецизионность и правильность методики оценивали по величинам относительного стандартного отклонения (s_r , %) и относительной погрешности (ϵ , %), используя модельные смеси с тремя уровнями содержаний ибупрофена: 0.0001, 0.002 и 0.007% (табл. 1). Полученные данные удовлетворяют критериям приемлемости, предъявляемым к биоаналитическим методикам [16].

Предложенную методику хроматографического определения ибупрофена использовали для изучения динамики удаления данного вещества в процессе биодеструкции клетками *Rhodococcus cerastii* ИЭГМ 1243 (табл. 2). Эксперименты проводили в 10 повторностях (реализациях) в одинаковых условиях.

Абиотический контроль показал отсутствие изменений содержания ибупрофена за время отбора проб. Остаточное содержание ибупрофена в культуральной среде *Rhodococcus cerastii* ИЭГМ 1243 в 10 реализациях за первые сутки уменьшилось до 43–50% и после пяти суток до 17–26%, что свидетельствует об эффективности процесса биодеструкции ибупрофена в данных условиях. Разброс значений концентрации исследуемого вещества по реализациям в день отбора проб составил 7–9%, что при достаточной точности ме-

тодики хроматографического анализа подтверждает случайность процесса биодеструкции с позиций стохастического анализа [17, 18].

Кинетическое моделирование процесса биодеструкции ибупрофена. Для кинетического моделирования использовали уравнение первого порядка $dx/dt = -kx$ с начальным условием $x_0 = 100\%$ при $t = 0$. Данное уравнение адекватно описывает динамику изменения концентрации лекарственных средств (дротаверина гидрохлорида, кодеина фосфата, ацетилсалициловой кислоты и др.) в процессе бактериальной деструкции [19–21]. Значения параметра скорости биодеструкции k в реализациях определяли с применением метода наименьших квадратов по полученным экспериментальным данным (табл. 2). Помимо этого, согласно выражению $t_{1/2} = \ln(2)/k$ определяли период полураспада ибупрофена в процессе биодеструкции, а по выражению $t_1 = \ln(100)/k$ устанавливали время окончания процесса биодеструкции при 100-кратном уменьшении начальной концентрации исследуемого вещества (табл. 2).

Кинетические кривые, характеризующие изменение остаточной концентрации ибупрофена в культуральных средах родококков в процессе его биодеструкции (рис. 4), хорошо соответствуют полученным экспериментальным данным (табл. 2).

Таблица 2. Динамика процесса биодеструкции ибупрофена (0.01%) клетками *Rhodococcus cerastii* ИЭГМ 1243

№ опыта	Экспозиция					Кинетическое моделирование		
	1 сут	2 сут	3 сут	4 сут	5 сут	k , сут ⁻¹	$t_{1/2}$, сут	t_1 , сут
1	42.66*	33.99	25.97	22.16	19.67	0.5086	1.36	9.05
2	45.82	34.57	27.02	23.21	20.42	0.4861	1.43	9.47
3	44.19	31.70	23.67	19.82	17.37	0.5252	1.32	8.77
4	49.51	36.78	29.57	26.23	25.22	0.4439	1.56	10.38
5	50.30	38.30	29.22	26.69	24.52	0.4377	1.58	10.52
6	49.82	37.14	23.54	22.08	19.06	0.4767	1.45	9.66
7	50.47	36.16	26.85	25.24	22.11	0.4553	1.52	10.11
8	48.85	35.33	27.01	25.29	21.16	0.4655	1.49	9.89
9	49.91	36.84	31.14	26.96	25.56	0.4367	1.59	10.54
10	50.06	36.44	29.31	26.61	25.18	0.4425	1.57	10.41

* Приведена концентрация ибупрофена по отношению к исходной; начальная концентрация ибупрофена (0.01%) принята за 100%.

Значения параметра k скорости процесса биодеструкции ибупрофена с использованием клеток *Rhodococcus cerastii* ИЭГМ 1243 находятся в пределах 0.4367–0.5252 сут⁻¹, период полураспада $t_{1/2}$ – 1.32–1.59 сут, время окончания процесса t_1 – 8.77–10.54 сут. Доверительные интервалы для выборочных средних значений периода полураспада и времени окончания процесса биодеструкции ибупрофена, установленные с применением критического значения коэффициента Стьюдента для доверительной вероятности $P = 95\%$ и числа степеней свободы $(n - 1) = 9$, составляют $(1.49 \pm \pm 0.07)$ сут и $(9.88 \pm \pm 0.45)$ сут соответственно. Полученное значение относительного стандартного отклонения для данных интервалов (6.4%) свидетельствует о приемлемой воспроизводимости процесса биодеструкции ибупрофена [18].

Методом обращенно-фазовой ВЭЖХ подобраны условия хроматографического определения ибупрофена в культуральных средах родококков. Предложенная методика характеризуется достаточной точностью, линейной градуировочной зависимостью, что позволяет использовать ее для достоверной оценки содержания ибупрофена в процессе бактериальной деструкции. С применением кинетического моделирования осуществлен прогноз изменения содержания ибупрофена в процессе биодеструкции, определены период полураспада вещества, время окончания процесса и его воспроизводимость. Полученные данные могут быть использованы при разработке биотехнологических способов очистки сточных вод фармацевтических предприятий от опасных для окружающей природной среды фармацевтических отходов.

Исследования выполнены при поддержке Госзадания АААА-А19-119112290008-4 Минобрнауки РФ и РНФ (грант 21-14-00132).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nikolaou A. Pharmaceuticals and related compounds as emerging pollutants in water: Analytical aspects // Global NEST J. 2013. V. 15. № 1. P. 1. <https://doi.org/10.30955/gnj.000969>
2. aus der Beek T., Weber F.A., Bergmann A., Hickmann S., Ebert I., Küster A.H.A. Pharmaceuticals in the environment. Global occurrences and perspectives // Environ. Toxicol. Chem. 2016. V. 35. P. 823. <https://doi.org/10.1002/etc.3339>
3. Баренбойм Г.М., Чиганова М.А. Загрязнение поверхностных и сточных вод лекарственными препаратами // Вода: хим. экол. 2012. № 10. С. 40.

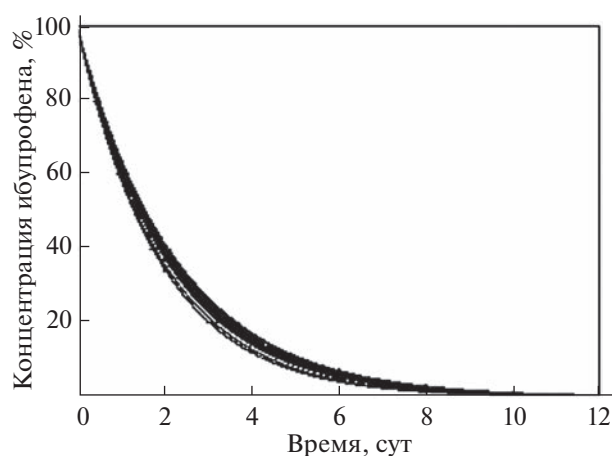


Рис. 4. Кинетические кривые изменения концентрации ибупрофена в процессе биодеструкции клетками *Rhodococcus cerastii* ИЭГМ 1243.

4. Lin A.Y., Tsai Y.T. Occurrence of pharmaceuticals in Taiwan's surface waters: Impact of waste streams from hospitals and pharmaceutical production facilities // *Sci. Total Environ.* 2009. V. 407. № 12. P. 793. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.03.009>
5. Ortiz de Garcia S.A., Pinto G.P., Garcia-Encina P.A., Irusta R. Ecotoxicity and environmental risk assessment of pharmaceuticals and personal care products in aquatic environments and wastewater treatment plants // *Ecotoxicology*. 2014. V. 23. P. 1517. <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1293-8>
6. Weigel S., Kallenborn R., Hühnerfuss H. Simultaneous solid-phase extraction of acidic, neutral and basic pharmaceuticals from aqueous samples at ambient (neutral) pH and their determination by gas chromatography-mass spectrometry // *J. Chromatog. A*. 2003. V. 1023. № 2. P. 183. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.10.036>
7. Регистр лекарственных средств России. URL: https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_1061.htm (дата обращения: 12.04.2022).
8. Chopra S., Kumar D. Ibuprofen as an emerging organic contaminant in environment, distribution and remediation // *Heliyon*. 2020. V. 6. № 6. P. e04087. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04087>
9. Singh V., Suthar S. Occurrence, seasonal variations, and ecological risk of pharmaceuticals and personal care products in River Ganges at two holy cities of India // *Chemosphere*. 2021. V. 268. P. 129331. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129331>
10. Moreau M., Hadfield J., Hughey J., Sanders F., Lapworth D.J., White D., Civil W. A baseline assessment of emerging organic contaminants in New Zealand groundwater // *Sci. Total Environ.* 2019. V. 686. P. 425. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.210>
11. Guruge K.S., Goswami P., Tanoue R., Nomiya K., Wijesekara R.G.S., Dharmaratne T.S. First nationwide investigation and environmental risk assessment of 72 pharmaceuticals and personal care products from Sri Lankan surface waterways // *Sci. Total Environ.* 2019. V. 690. P. 683. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.042>
12. Ivshina I.B., Mukhutdinova A.N., Tyumina H.A., Vikhareva H.V., Suzina N.E., El'-Registan G.I., Mulyukin A.L. Drotaverine hydrochloride degradation using cyst-like dormant cells of *Rhodococcus ruber* // *Curr. Microbiol.* 2015. V. 70. № 3. P. 307. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0718-1>
13. Ivshina I.B., Tyumina E.A., Kuzmina M.V., Vikhareva E.V. Features of diclofenac biodegradation by *Rhodococcus ruber* IEGM 346 // *Sci. Rep.* 2019. № 9. P. 9159. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45732-9>
14. Ivshina I.B., Tyumina E.A., Bazhutina G.A., Vikhareva E.V. Response of *Rhodococcus cerastii* IEGM 1278 to toxic effect of ibuprofen // *PLoS ONE*. 2021. V. 16. № 11. P. e0260032. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260032>
15. Catalogue of Strains of Regional Specialized Collection of Alkanotrophic Microorganisms. URL: <http://www.iegmc.ru/strains/index.html> (дата обращения 12.04.2022).
16. Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM), 2018.
17. Селянинов А.А., Вихарева Е.В., Ившина И.Б., Баранова А.А., Карпенко Ю.Н. Стохастический анализ повторяемости процесса биодеструкции дротаверина гидрохлорида // *Рос. журн. биомех.* 2013. Т. 17. № 1(59). С. 41. (Selyaninov A.A., Vikhareva E.V., Ivshina I.B., Baranova A.A., Karpenko Yu.N. The stochastic analysis of repeatability of the process of biological destruction of drotaverine hydrochloride // *Russ. J. Biomech.* 2013. V. 17. № 1(59). P. 35.)
18. Сергиенко В.И., Бондарева И.Б. Математическая статистика в клинических исследованиях. М.: ГЭОТАР МЕДИЦИНА, 2000. 256 с.
19. Карпенко Ю.Н., Селянинов А.А., Мухутдинова А.Н., Рычкова И.И., Баранова А.А., Вихарева Е.В., Ившина И.Б. Хроматографический анализ и кинетическое моделирование процесса биодеструкции дротаверина в культуральной жидкости *R. rhodochrous* // *Журн. аналит. химии*. 2014. Т. 69. № 7. С. 750. (Karpenko Yu.N., Selyaninov A.A., Mukhutdinova A.N., Rychkova M.I., Baranova A.A., Vikhareva E.V., Ivshina I.B. Chromatographic determination of drotaverine hydrochloride and kinetic modeling of the process of its biodestruction in a *R. rhodochrous* culture liquid // *J. Anal. Chem.* 2014. V. 69. № 7. P. 681.) <https://doi.org/10.1134/S1061934814070077>
20. Плотников А.Н., Карпенко Ю.Н., Вихарева Е.В., Тюмина Е.А., Рычкова М.И., Селянинов А.А. Определение кодеина фосфата в культуральной жидкости родококков методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // *Вестн. Моск. ун-та. Серия Химия*. 2018. Т. 59. № 1. С. 50. (Plotnikov A.N., Karpenko Y.N., Vikhareva E.V., Tyumina E.A., Rychkova M.I., Selyaninov A.A. Determination of codeine phosphate in the culture fluid of *Rhodococcus* by high-performance liquid chromatography // *Moscow Univ. Chem. Bull.* 2017. V. 72. № 6. P. 328.) <https://doi.org/10.3103/S0027131418010054>
21. Хренков А.Н., Вихарева Е.В., Тумилович Е.Ю., Карпенко Ю.Н., Селянинов А.А., Тюмина Е.А. Хроматографический анализ ацетилсалициловой кислоты в культуральных жидкостях родококков // *Вестн. Моск. ун-та. Серия Химия*. 2020. Т. 61. № 5. С. 388. (Khrenkov A.N., Vikhareva E.V., Tumilovich E.Yu., Karpenko Yu.N., Selyaninov A.A., Tyumina E.A. Chromatographic analysis of acetylsalicylic acid in *Rhodococcus* cultural fluids // *Moscow Univ. Chem. Bull.* 2020. V. 61. № 5. P. 309.) <https://doi.org/10.3103/S0027131420050053>