

ISSN 0044-4502

Том 78, Номер 4

Апрель 2023



ЖУРНАЛ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ



www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 78, номер 4, 2023

ОБЗОРЫ

Современные методы и направления развития аналитической химии флаванонов

Э. Н. Якупова, Г. К. Зиятдинова 291

Использование смартфона в химическом анализе

З. А. Ч. Шаока, Д. С. Большаков, В. Г. Амелин 317

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Применение магнитных углеродных нанокомпозитов при формировании распознающего слоя пьезоэлектрического иммуносенсора для определения пенициллина G

*Е. В. Бизина, О. В. Фарафонова, Н. И. Золотарева,
С. С. Гражулене, Т. Н. Ермолаева* 354

Хроматографическая оценка содержания фенольных соединений в экстрактах ромашки аптечной (*Matricaria chamomilla* L.) в различных условиях извлечения

З. А. Темердашев, Т. К. Чубукина, Е. А. Виноцкая, Н. В. Киселева 365

Хроматографическое определение остаточных количеств дифлубензурана в сельскохозяйственных растительных матрицах

Е. Ю. Алексеев, Т. Д. Черменская 376

КРИТИКА И БИБЛИОГРАФИЯ

Новые книги издательства Royal Society of Chemistry 384

УДК 543.8

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ И НАПРАВЛЕНИЯ РАЗВИТИЯ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ ФЛАВАНОНОВ

© 2023 г. Э. Н. Якупова^а, Г. К. Зиятдинова^{а, *}

^а Химический институт им. А.М. Бутлерова, Казанский федеральный университет
ул. Кремлевская, 18, Казань, 420008 Россия

*e-mail: Ziyatdinovag@mail.ru

Поступила в редакцию 24.10.2022 г.

После доработки 24.11.2022 г.

Принята к публикации 25.11.2022 г.

Рассмотрены особенности строения флаванонов, сделан критический обзор и обобщены способы их определения в различных объектах. Данные систематизированы по методам анализа — хроматографическим, электрофоретическим, спектральным и электрохимическим. Обсуждены аналитические возможности, преимущества и недостатки каждой группы методов. Уделено внимание применению химически модифицированных электродов на основе углеродных наноматериалов, трехмерных нанопористых металлических структур, композитов наночастиц оксидов и сульфидов металлов или красителей с углеродными наноматериалами, а также комбинации модификаторов различных типов в вольтамперометрии флаванонов.

Ключевые слова: фенольные антиоксиданты, флаваноны, хроматография, спектрофотометрия, электрохимические методы, химически модифицированные электроды.

DOI: 10.31857/S0044450223040163, EDN: KZZMSL

Природные фенольные антиоксиданты являются одной из активно исследуемых групп биологически активных соединений в современной химии, что обусловлено как многообразием этих соединений, так и широким спектром проявляемой биологической активности [1]. Среди этих соединений следует выделить флаваноны — основные флавоноиды растений рода цитрусовых семейства рутовые (*Rutaceae*). Отдельные представители флаванонов идентифицированы в экстрактах растений семейства *Lamiaceae*, *Amaranthaceae* и др., однако их содержание крайне мало [2]. Флаваноны ингибируют пролиферацию клеток и ангиогенез, снижают уровень холестерина и триглицеридов, выступают в качестве ловушек свободных радикалов, проявляют эстрогенную активность, модулируют уровень оксида азота и уменьшают агрегацию тромбоцитов и иммобилизацию лимфоцитов [3]. Это обуславливает их применение в медицине в составе различных лекарственных средств. С другой стороны, цитрусовые фрукты и продукты на их основе являются частью пищевого рациона человека, что также обеспечивает положительное воздействие на здоровье. Флаваноны, в частности нарингин, оказывают влияние на фармакокинетику ряда лекарственных средств, поскольку ингибируют некоторые ферменты группы цитохрома P450 [4]. Кроме того, флаваноны при высоких концентрациях способны проявлять прооксидантные свой-

ства [1, 5]. Очевидно, что необходим контроль содержания соединений этой группы в реальных объектах. Тем не менее определение флаванонов не привлекало до недавнего времени достаточного внимания аналитиков по сравнению с другими классами природных фенольных соединений. Частично это связано с тем, что идентификация отдельных флаванонов стала возможной лишь с развитием хромато-масс-спектрометрии.

В настоящем обзоре рассмотрены особенности строения флаванонов и их основные представители, обобщены и критически проанализированы данные по способам их определения. В рамках каждой группы методов обсуждены подходы, обеспечивающие наилучшие аналитические характеристики определения флаванонов, а также достоинства и недостатки. Особое внимание уделено аналитическим возможностям химически модифицированных электродов при определении флаванонов в качестве эффективной альтернативы хроматографическим методам.

СТРУКТУРА ФЛАВАНОНОВ, ИХ ОСНОВНЫЕ ПРЕДСТАВИТЕЛИ И ИСТОЧНИКИ

Флаваноны или дигидрофлавоны состоят из двух ароматических колец А и В, соединенных друг с другом трехуглеродной цепью, которая

формирует закрытый пирановый цикл (кольцо С) с одним из ароматических колец (схема 1).

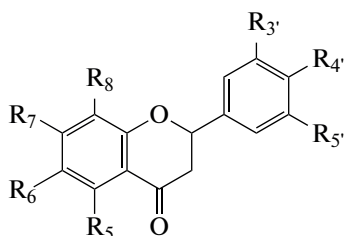


Схема 1. Общая структура флаванонов.

Отсутствие двойной связи C_2-C_3 , присутствие хирального атома углерода в положении C_2 и отсутствие заместителя в положении C_3 кольца С являются основными структурными особенностями, позволяющими рассматривать флаваноны как отдельный класс флавоноидов [6]. Флаваноны представлены широким спектром соединений с О- (гидрокси-, метокси-, метилendioкси-) и/или С-заместителями (метил-, бензил-, гидроксиметил-, формил-) в кольцах А и/или В [7] (схема 2).

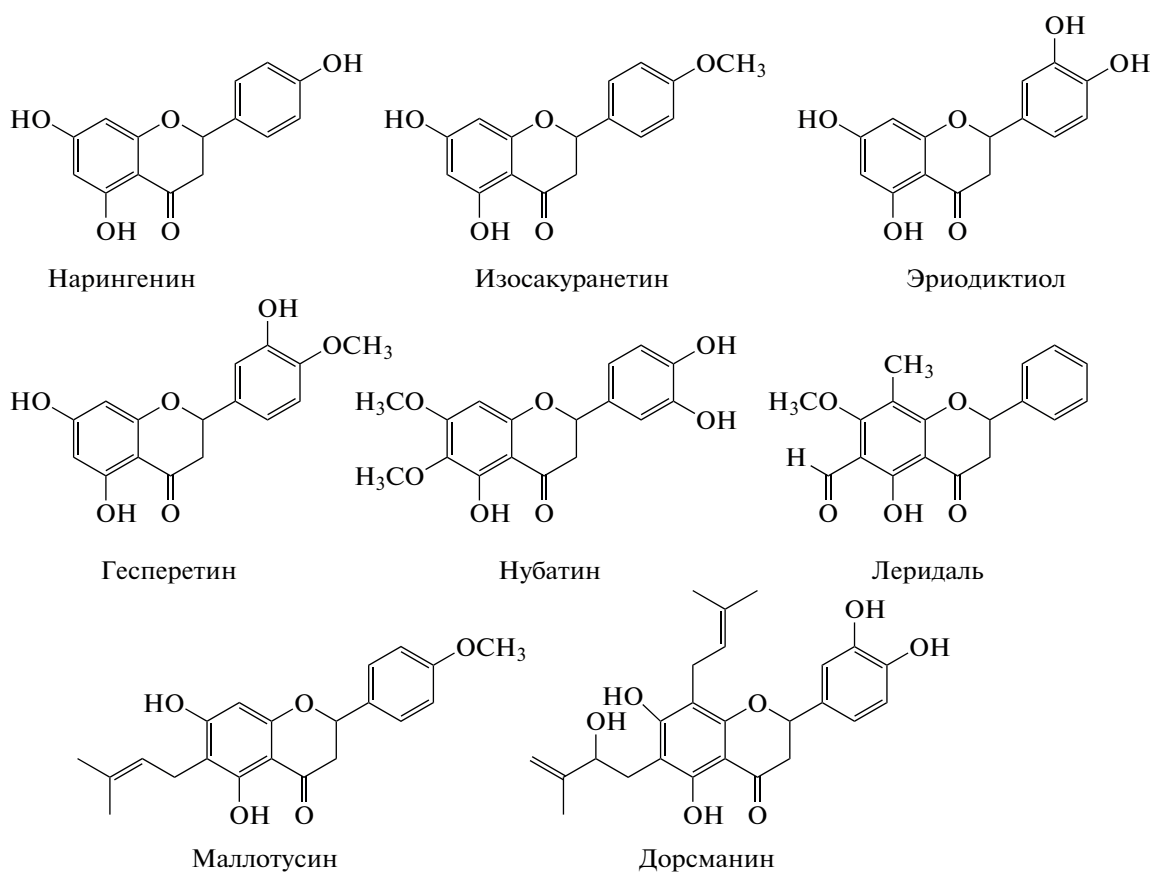


Схема 2. Агликоны флаванонов.

Как и другие флавоноиды, в природе флаваноны существуют в виде агликонов и гликозидов [1, 6, 8]. Гликозилирование агликонов протекает последовательно под действием флаванон-7-О-бета-глюкозилтрансферазы и флаванон-7-О-глюкозид-2''-О-рамнозилтрансферазы с образованием 7-О- β -D-глюкозидов и рамноглюкозидов [8] (табл. 1). При этом содержание агликонов в растительных объектах незначительно по сравнению с гликозидами.

Как отмечалось выше, основными источниками флаванонов для человека являются продукты питания (овощи (томаты и картофель), специи (розмарин и мята), фрукты (широкий круг цитру-

совых, слива, малина и виктория)) [9]. Максимальное содержание флаванонов характерно для цитрусовых фруктов (апельсин, померанец, грейпфрут, лайм, мандарин, бергамот, кумкват, лимон, чинотто и танжерин) [3]. При этом основными флаванонами апельсинов, мандаринов, лайма и лимонов является гесперидин, а померанца, бергамота и чинотто — неогесперидин, неоэриоцитрин и нарингин. Для грейпфрута характерно высокое содержание нарингина и минорные количества понцирина, неогесперидина и дидимина. Танжело содержит главным образом неогесперидин, а также меньшие количества нарингина, гесперидина и нарирутина, а кумкват —

Таблица 1. Гликозидные формы флаванонов

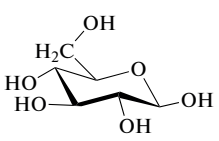
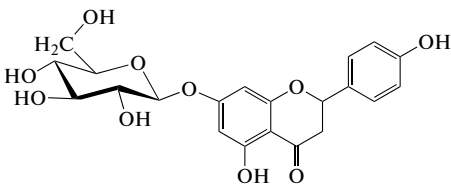
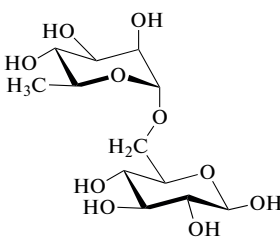
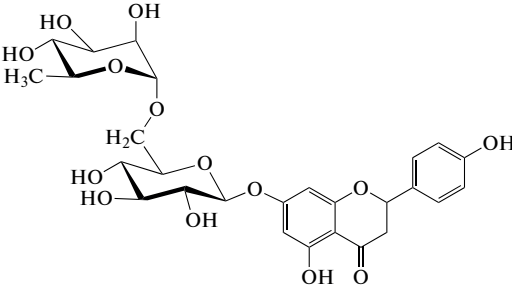
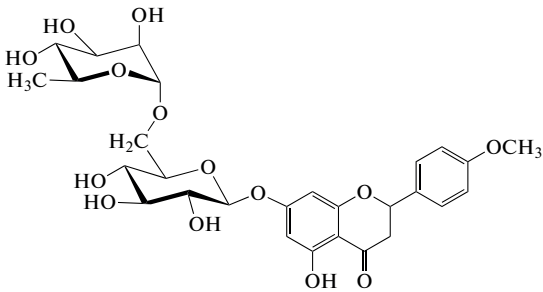
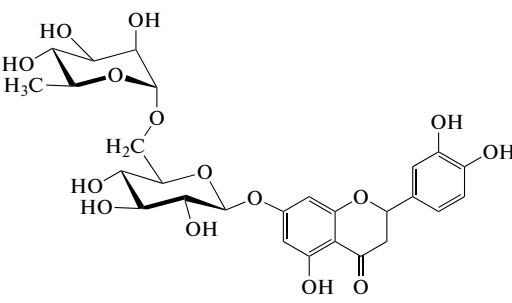
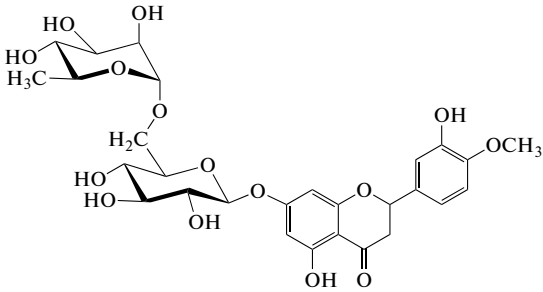
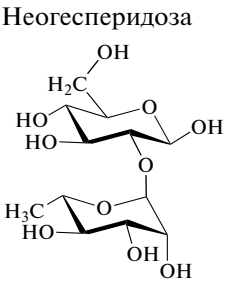
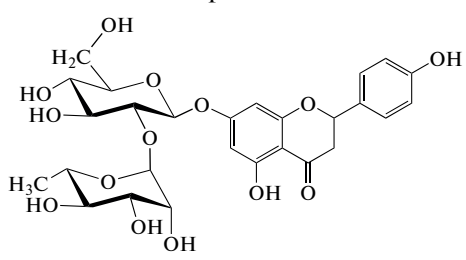
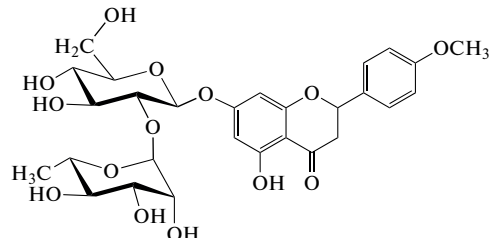
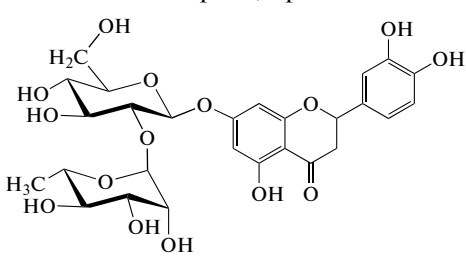
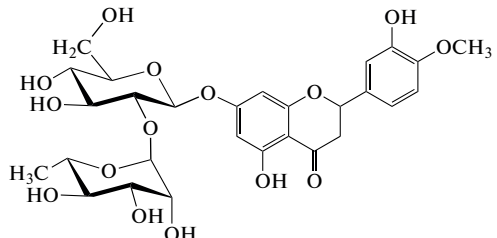
Сахарид	Агликон	Гликозид
Глюкоза 	Нарингенин	Прунин 
Рутиноза 	Нарингенин	Нарirutин 
	Изосакуранетин	Дидимин (неопонцирин) 
	Эриодиктиол	Эриодитрин 
	Гесперетин	Гесперидин 

Таблица 1. Окончание

Сахарид	Агликон	Гликозид
	Нарингенин	Нарингин 
	Изосакурнетин	Понцирин 
	Эриодиктиол	Неоэриоцитрин 
	Гесперетин	Неогесперидин 

гесперидин и нарингин [3]. Кроме того, флаваноны, в частности гесперидин, входят в состав лекарственных средств и биологически активных добавок [10], а также средств традиционной китайской медицины [11]. В связи с этим основными объектами анализа являются citrusовые фрукты и продукты питания на их основе, лекарственные средства, биологически активные добавки и лекарственное растительное сырье, а также биологические жидкости.

СПОСОБЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЛАВАНОНОВ

В настоящее время для определения флаванонов в различных объектах применяют инструментальные методы анализа, в частности хроматогра-

фию, капиллярный электрофорез, спектральные и электрохимические методы, отличающиеся по чувствительности, селективности, экспрессности и экономичности. Немаловажным фактором при разработке способов определения флаванонов является также возможность проведения прямого анализа образцов с минимальной пробоподготовкой или вовсе без нее.

Хроматография. Растительные материалы, которые являются источниками флаванонов и объектами анализа, характеризуются сложным химическим составом, причем эти компоненты относятся к различным классам органических соединений, в том числе и структурно родственными. Для идентификации флаванонов и их опре-

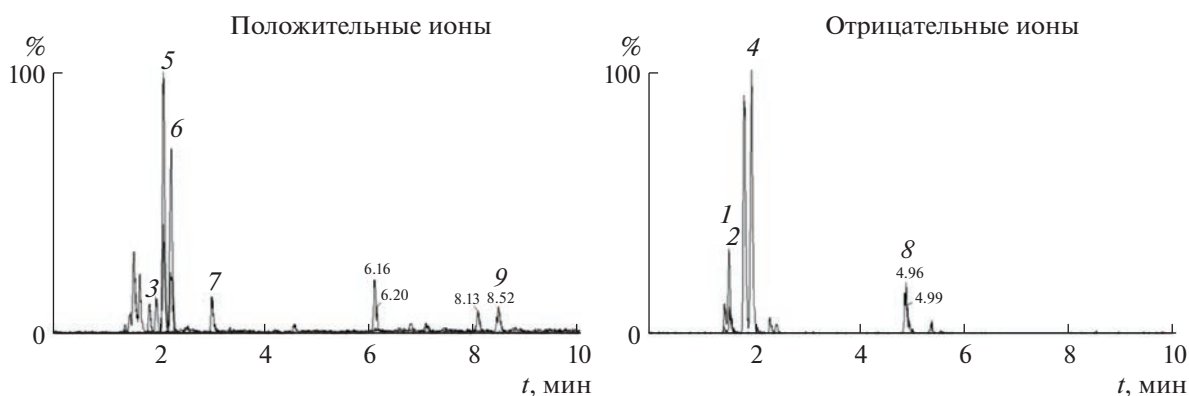


Рис. 1. Хроматограммы по полному ионному току 70%-ного метанольного раствора лиофилизированного образца водного отвара Gungha-tang, полученные методом ЖХ-МС/МС с мониторингом множественных реакций в режимах детектирования положительных и отрицательных ионов. Ликвиритина апиозид (1), неозерицитрин (2), нарирутин (3), нарингин (4), гесперидин (5), неогесперидин (6), ликвиритигенин (7), глицирризин (8) и 6-шогаол (9). Адаптировано из [17].

деления традиционно используют хроматографические методы. При этом зачастую необходимо предварительное извлечение аналитов и их концентрирование. Для этих целей применяют различные варианты жидкостной [12] и твердофазной экстракции [13–15] или их сочетание [16], что значительно увеличивает трудоемкость анализа и его стоимость.

Для идентификации флаванонов чаще всего используют жидкостную хроматографию с масс-спектрометрическим детектированием, причем в tandemном варианте [15–20]. Ионизацию молекул флаванонов проводят с помощью электрораспыления [15–20], а детектирование — в режиме как положительно [15, 17–19], так и отрицательно заряженных ионов [14, 16–18, 20] (рис. 1).

Флаваноны количественно определяют обычно в условиях обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с УФ- и диодно-матричным детектированием при 280 или 282 нм [12, 21–24], а также с электрохимическими детекторами (кулонометрическим [25] и амперометрическим [26]). В последнее время уделяют внимание масс-спектрометрическому детектированию, в том числе tandemному и высокого разрешения, что обеспечивает повышение селективности и чувствительности определения [14–17, 20, 27, 28]. Аналитические возможности ВЭЖХ-определения флаванонов в различных объектах охарактеризованы в табл. 2. Разделение достигается на колонках C18 (стандартных $3.0\text{--}4.6 \times 250$ мм, 5 мкм [21–24] или коротких 4×55 мм, 3 мкм [12] и 2.1×50 мм, 2.6 мкм [27]) с использованием в качестве подвижной фазы смесей ацетонитрила или метанола с водой или водными растворами уксусной, трифторуксусной, муравьиной кислот, фосфатным или ацетатным буферными растворами с pH

2.4–6.2 в режиме изократического или градиентного элюирования.

Представляет практический интерес определение оптических изомеров флаванонов. Так, достигнуто хиральное разделение шести пар изомеров (флаванона, нарингенина, гесперетина, эриодиктиола, ликвиритигенина и пиностромбина) на колонке Chiralpak AD-3R (2.1×150 мм, 3 мкм) с тройным квадрупольным tandemным масс-спектрометрическим детектированием в режиме мониторинга множественных реакций [15].

Развитие и внедрение ультра-ВЭЖХ в аналитическую практику нашло отражение и в хроматографии флаванонов [29]. Так, показана возможность одновременного определения нарирутина, нарингина, гесперидина, неогесперидина, и их агликонов нарингенина и гесперетина в растительном сырье в условиях ультра-ВЭЖХ с УФ-детектированием при 280 нм [13]. Диапазоны определяемых содержаний составляют 2.50–20.0 мкг/мл для нарирутина, нарингина, гесперидина, неогесперидина, 1.25–10.0 мкг/мл для нарингенина и 5.00–40.0 мкг/мл для гесперетина.

Для определения флаванонов в цитрусовых фруктах успешно использовано матричное твердофазное диспергирование образца с последующим ультра-ВЭЖХ-определением. Детектирование осуществляют на квадруполь-времетра-ном масс-спектрометре высокого разрешения с технологией разделения по ионной подвижности, что обеспечивает упрощение масс-спектров за счет лучшего разрешения пиков и нивелирования влияния фона. Метод позволяет определять нарирутин, нарингин, гесперидин и неогесперидин в диапазоне 0.01–5 мкг/мл с пределами обнаружения 3.70, 5.36, 6.52 и 5.77 нг/мл соответственно [14].

Таблица 2. Аналитические характеристики обращенно-фазового ВЭЖХ-определения флаванонов

Параметры детектора	Подвижная фаза, режим элюирования	Аналит	Диапазон определяемых концентраций	Предел обнаружения	Объект анализа	Литература
Диодно-матричное детектирование						
$\lambda = 280$ нм	$\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$ (1% CH_3COOH), градиентный	Гесперидин Нарингин Нарингенин Понцирин Нарингин Нарингенин	60–300 мг/100 г 0.01–0.09 мг/100 г 0.05–0.25 мг/100 г 0.05–0.30 мг/100 г 55–95 мкг/мл 10–60 мкг/мл	1.87 мг/100 г 0.0037 мг/100 г 0.0066 мг/100 г 0.0147 мг/100 г 8.57 мкг/мл 3.37 мкг/мл	Апельсиновые соки Цитрусовые соки	[12] [21]
УФ-детектирование						
$\lambda = 280$ нм	$\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$, градиентный	Нарингин Прунин Нарингенин Нарингин	6.25–250 мкг/мл 6.25–250 мкг/мл 2.50–100 мкг/мл 0.1–20.0 мкг/мл	22.5 нг/мл 11.7 нг/мл 11.7 нг/мл 17.0 нг/мл	Цитрусовые соки Лекарственные средства	[22] [23]
$\lambda = 280$ нм	CH_3CN –фосфатный буферный раствор с рН 3.5 (25 : 75), изократический $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}-\text{HCOOH}$ (21 : 78.8 : 0.2), изократический	Нарингин Гесперидин	5–200 мг/л 5–200 мг/л	2.5 мг/л 2.5 мг/л	Цитрусовые соки	[24]
Электрохимическое детектирование						
Кулонометрия $E = 0.5$ и 0.7 В	40% CH_3CN в 70 мМ фосфатном буферном растворе с рН 2.4, изократический	Нарингенин	0.11–3.67 мкМ (плазма) 0.27–276 мкМ (моча)	74 нМ (плазма)	Плазма крови и моча	[25]
$E = 0.35$ и 0.55 В	58% CH_3OH в 70 мМ фосфатном буферном растворе с рН 2.4, изократический	Гесперетин	0.03–4.97 мкМ (плазма) 0.06–248 мкМ (моча)	33 нМ (плазма)		
Амперометрия $E = 0.9$ В	20 мМ ацетатный буферный раствор с рН 6.2–30% CH_3CN –5% CH_3OH , изократический	Нарингенин	0–200 нг/мл	1 нг/мл	Плазма крови крыс	[26]

Таблица 2. Окончание

Параметры детектора	Подвижная фаза, режим элюирования	Аналит	Диапазон определяемых концентраций	Предел обнаружения	Объект анализа	Литература
Масс-спектрометрическое детектирование						
m/z 579.1	$\text{CH}_3\text{CN}-2 \text{ мМ } \text{CH}_3\text{COONH}_4$ (75 : 25), изократический	Нарингин	63—6300 нг/мл	—	Цитрусовые соки	[27]
Тандемная масс-спектрометрия						
m/z 121.3, 65.1	$\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{OH}$, градиентный	Флаванон	15—5000 нг/мл	—	Растительное сырье	[15]
m/z 153.0, 147.0		Нарингенин	5.0—5000 нг/мл	—		
m/z 177.0, 153.0		Гесперетин	5.0—5000 нг/мл	—		
m/z 153.0, 162.9		Эриодиктиол	5.0—5000 нг/мл	—		
m/z 137.0, 147.0		Ликвиритигенин	5.0—5000 нг/мл	—		
m/z 167.0, 130.9		Пиностробин	5.0—5000 нг/мл	—		
m/z 255.0	H_2O (5 мМ HCOONH_4 и 1% (по объему) HCOOH)— CH_3CN , градиентный	Ликвиритина апиозид	25.00—400.00 нг/мл	8.33 нг/мл	Китайский растительный препарат Gunggha-tang	[17]
m/z 151.0		Неоэриоцитрин	50.00—800.00 нг/мл	0.83 нг/мл		
m/z 273.0		Нарирутин	50.00—800.00 нг/мл	3.33 нг/мл		
m/z 271.0		Нарингин	50.00—800.00 нг/мл	8.33 нг/мл		
m/z 303.2	0.1% $\text{HCOOH}-\text{CH}_3\text{CN}$, градиентный	Гесперидин	50.00—800.00 нг/мл	1.67 нг/мл	Экстракты морфогрупп <i>Zanthoxylum zanthoxyloides</i>	[20]
m/z 303.0		Неогесперидин	100.00—1600.00 нг/мл	0.33 нг/мл		
m/z 137.0		Ликвиритигенин	0.10—1.60 нг/мл	0.02 нг/мл		
m/z 286.8		Эриоцитрин	0.01—2.5 мг/л	0.003 мг/л		
m/z 301.0		Неогесперидин	0.10—1.0 мг/л	0.03 мг/л		
m/z 301.0		Гесперидин	0.25—2.5 мг/л	0.075 мг/л		
m/z 151.0	0.5% $\text{CH}_3\text{COOH}-0.5\% \text{CH}_3\text{COOH}$ в CH_3CN , градиентный	Нарингин	0.500—50 мкг/мл	0.059 нг/мл	Листья сои, апельсины и лайм	[28]
m/z 151.0		Нарингенин	0.500—50 мкг/мл	0.045 нг/мл		
m/z 301.0		Гесперидин	0.500—50 мкг/мл	0.070 нг/мл		

Ультра-ВЭЖХс tandemным масс-спектрометрическим детектированием в режиме выбранных реакций обеспечивает одновременное определение 11 флаванонов. Диапазоны определяемых содержаний равны 0.4–1000 нг/мл для эриодитрина, гесперицина, неогесперицина и эриодиктиола, 0.4–300 нг/мл для ликвиритина, 0.8–1000 нг/мл для нарирутина и нарингина, 0.4–100 нг/мл для ликвиритигенина, 0.4–700 нг/мл для нарингенина и пиноцембрина, 0.8–700 нг/мл для гесперетина. Метод успешно апробирован на образцах растительного сырья (люцерне, золотарнике, фацелии, гречихе, лакрице, лаванде) [16].

Ряд работ [30–34] посвящен определению флаванонов (главным образом нарингина, гесперицина и их агликонов) в плазме крови человека и животных в рамках фармакокинетических исследований с помощью ультра-ВЭЖХ с tandemным масс-спектрометрическим детектированием.

Во всех рассмотренных примерах ультра-ВЭЖХ-определения в качестве подвижной фазы используют те же элюенты, что и в случае ВЭЖХ, а для детектирования чаще всего выбирают tandemную масс-спектрометрию [14, 16, 30–34], в том числе высокого разрешения [14, 30]. Метод обеспечивает лучшее разрешение хроматографических пиков флаванонов за счет уменьшения длины колонки и размера частиц сорбента (≤ 2 мкм). Ультра-ВЭЖХ характеризуется более высокой чувствительностью по сравнению с ВЭЖХ, позволяет снизить расход элюента и сократить продолжительность разделения, а следовательно, и анализа в целом.

Другое направление в хроматографии флаванонов — использование высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ), считающейся универсальным методом исследования растительного сырья [35, 36]. ВЭТСХ позволяет проводить селективное определение отдельных флаванонов. Например, предложен нормально-фазовый ВЭТСХ-способ определения гесперицина в метанольных экстрактах кожуры цитрусовых фруктов на силикагеле 60 F254 с УФ-детектированием при 286 нм. В качестве подвижной фазы использовали смесь этилацетата, метанола и воды (15 : 3 : 2, по объему). Диапазон определяемых содержаний гесперицина составляет 100–800 нг/пятно с пределом обнаружения 8.87 нг/пятно [37]. Сходный подход позволяет определять нарингин в экстрактах щавеля пузырчатого с применением смеси этилацетата, ледяной уксусной кислоты, метанола и воды (30 : 10 : 5 : 1, по объему) в качестве элюента и денситометрического детектирования при 275 нм в режиме отражения [38]. Интервал определяемых содержаний нарингина составляет 100–1000 нг/полосу, а предел обнаружения — 36.9 нг/полосу.

Двумерная ВЭТСХ в сочетании с поверхностно-усиленной рамановской спектроскопией

обеспечивает успешное разделение и определение 14 флаваноидов, характерных для цитрусовых, в том числе флаванонов (нарингина, гесперицина, нарингенина и гесперетина) [39]. Разделение компонентов достигается в течение 5 мин элюированием последовательно смесью дихлорметана с метанолом (20 : 1), содержащей 1% уксусной кислоты, а затем смесью петролейного эфира с ацетоном (6 : 4) (рис. 2). Градуировочные зависимости линейны в диапазонах 30–300 мкМ для нарингенина, нарингина и гесперицина и 30–250 мкМ для гесперетина, а пределы обнаружения составляют 10 мкМ для всех флаванонов. Практическая применимость метода продемонстрирована на образцах апельсинового сока и цедре свежего апельсина. ВЭТСХ-способ характеризуется в 4.5 раза меньшей продолжительностью анализа по сравнению с ВЭЖХ (10 и 45 мин соответственно) и сопоставимой точностью, что делает его привлекательным для рутинного лабораторного анализа.

Одним из недостатков вышеупомянутых ВЭТСХ-подходов является использование в составе элюентов токсичных органических растворителей. Эта проблема успешно решена в условиях обращенно-фазовой ВЭТСХ на пластинах с C18 модифицированным силикагелем 60 F254S с подвижной фазой этанол–вода (50 : 50, по объему) [40]. Линейность денситометрического отклика гесперицина при 287 нм наблюдается в интервале 20–2000 нг/полосу с пределом обнаружения 7.02 ± 0.28 нг/полосу. Способ применен для определения гесперицина в различных экстрактах кожуры цитрусовых фруктов и лекарственных средствах.

Капиллярный электрофорез. Метод капиллярного электрофореза активно развивается и успешно применяется в анализе растительного сырья [41]. Способность флаванонов к ионизации успешно используется для их электрофоретического определения. Зонный капиллярный электрофорез с различными типами детектирования позволяет проводить одновременное определение флаванонов в объектах растительного происхождения, в том числе в присутствии фенольных соединений других классов [42–48]. Достижения в этом направлении обобщены в табл. 3. Для разделения аналитов чаще всего используют капилляры из плавленого кварца и боратный буферный раствор с pH 8.45–9.5 в качестве фонового электролита. Время разделения составляет от 8 до 25 мин в зависимости от накладываемого напряжения, параметров капилляра и природы аналитов. Электрохимическое детектирование [46–49] обеспечивает более широкие диапазоны определяемых содержаний и низкие пределы обнаружения флаванонов по сравнению с диодно-матричным и масс-спектрометрическим, что подтверждает высокую чувствительность электрохимического отклика де-

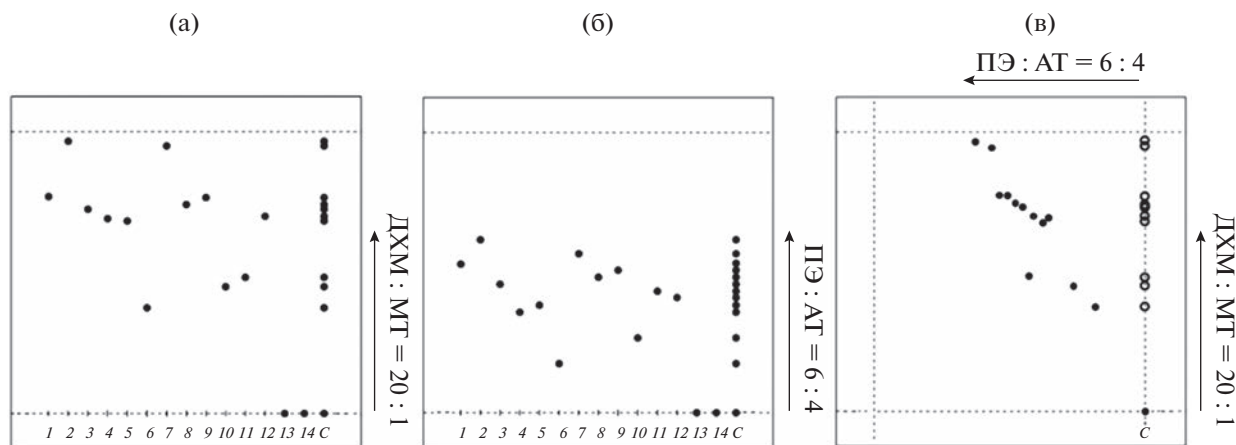


Рис. 2. ТСХ-разделение 14 флавоноидов при (а) элюировании смесью дихлорметана (ДХМ) с метанолом (МТ) (20 : 1), содержащей 1% уксусной кислоты; (б) элюировании смесью петролейного эфира (ПЭ) с ацетоном (АТ) (6 : 4); (в) двумерное разделение при последовательном элюировании смесями ДХМ–МТ (20 : 1) и ПЭ–АТ (6 : 4). Флавоноиды: 1–10 – полиметоксифлавоны, 11 – нарингенин, 12 – гесперетин, 13 – нарингин, 14 – гесперидин. Цитировано по [39] с разрешения Elsevier.

текторов на аналиты. Кроме того, использование электрохимического детектирования дает возможность миниатюризации системы, а также снижения объемов вводимой пробы и электролита.

Оригинальный подход к электрофоретическому определению гесперетина и нарингенина в присутствии 6-гидроксифлавона и биоханина А основан на использовании бесконтактного детектора проводимости [50]. Разделение аналитов достигается в течение 6 мин на модифицированном полиимидом капилляре с эффективной длиной 58 см при напряжении 30 кВ в среде 1.0 мМ хромата натрия с рН 9.5. Диапазон определяемых содержаний гесперетина и нарингенина составляет 1–10 мкг/мл в пределах обнаружения 0.15 и 0.17 мкг/мл соответственно. К преимуществам бесконтактного детектора проводимости следует отнести высокую чувствительность (пределы обнаружения в 8 и 6 раз ниже, чем для УФ-детектора в аналогичных условиях разделения), а также низкий уровень шумов. Подход использован для определения нарингина в лекарственном средстве Синупрет®.

Дальнейшее развитие в области электрофоретического определения флаванонов может быть направлено на миниатюризацию с помощью микрофлюидных электрофоретических устройств, а также расширение числа одновременно детектируемых аналитов.

Спектральные методы характеризуются простотой и доступностью, достаточной экспрессностью и поэтому привлекательны для рутинного использования. Флаваноны характеризуются достаточно интенсивным поглощением в областях 300–330 нм и 277–295 нм, связанным с присутствием колец В и А в структуре флаванонов соот-

ветственно. Такие полосы поглощения характерны для различных классов природных фенольных соединений. Появление заместителей в кольцах А и/или В, как правило, приводит к гипсо- или bathochromным сдвигам полос [51].

Возможно определение флаванонов с помощью УФ-спектроскопии и флуориметрии. В качестве аналита выступает обычно гесперидин [52–55], реже нарингенин [56, 57]. Аналитические возможности УФ-спектроскопического определения флаванонов иллюстрирует табл. 4. Представляет интерес подход к определению гесперицина в апельсиновых соках, основанный на обработке образца специфичным ферментом гесперицин 6-О- α -L-рамнозил- β -D-глюкозидазой из грибов *Acremonium* sp. DSM 24697 и последующем УФ-детектировании образующегося гесперетина при 323 нм [52]. Ферментативная реакция проводится непосредственно в кювете в течение 10 мин при 60°C при перемешивании. Подход исключает необходимость предварительной пробоподготовки образца, что является преимуществом по сравнению с хроматографическими способами.

Как видно из табл. 4, основными объектами анализа являются лекарственные средства на основе гесперицина. При этом особое внимание уделяется возможности одновременного определения гесперицина и диосмина [54, 55], что обусловлено составом лекарственных средств. Одним из подходов к решению этой задачи является использование производной спектрофотометрии при пересечении нулевой линии [54]. Определение нарингенина проводится для оценки его высвобождения из твердых дисперсий [56] и липидных наночастиц [57] в рамках исследований по поиску новых лекарственных форм на его основе.

Таблица 3. Электрофоретические способы определения флаванонов и их аналитические возможности

U , кВ	$I_{\text{кат}}$, см	Электролит	t , мин	Детектор	Флаванон	Диапазон определяемых концентраций	Предел обнаружения	Объект анализа	Литература
Диодно-матричное детектирование									
25	50	10 мМ боратный буферный раствор с рН 8.5	10	$\lambda = 214$ нм	Нарингин Нарингенин	3.12–200 мкг/мл 3.12–200 мкг/мл	0.406 мкг/мл 0.313 мкг/мл	Цитрусовые соки, слива	[42]
24	45	40 мМ боратный буферный раствор с рН 8.9	11	$\lambda = 210$ нм	Нарингин Нарингенин	2.5–100 мкМ 2.5–100 мкМ	0.143 мкМ 0.098 мкМ	Растительное сырье	[43]
17	50	25 мМ боратный буферный раствор с рН 9.0 + 17.5 мМ ВММ-РФ ₆	8	$\lambda = 214$ нм	Гесперидин	1–200 мкг/мл	0.444 мкг/мл	Апельсиновый и лимонный соки	[44]
Тандемная масс-спектрометрия									
25	100	Боратный буферный раствор с рН 9.5	—	m/z 459.1 m/z 301.0 и 489.1 m/z 271.0 m/z 301.0	Нарингин Неогесперидин Нарирутин Гесперидин	5–50 мг/л 5–50 мг/л 25–80 мг/л 25–80 мг/л	0.99 мг/л 0.23 мг/л 0.38 мг/л 1.15 мг/л	Цедра апельсина и помеланца	[45]
Электрохимическое детектирование									
12	75	60 мМ боратный буферный раствор с рН 9.0	25	Угольный дисковый электрод $E=0.95$ В	Гесперидин Нарингин Гесперетин Нарингенин	1–100 мкг/мл 1–100 мкг/мл 1–100 мкг/мл 1–100 мкг/мл	0.5 мкг/мл 0.35 мкг/мл 0.14 мкг/мл 0.16 мкг/мл	Кожура и сок грейпфрута	[46]
12	75	80 мМ боратный буферный раствор с рН 8.45	20	Угольный дисковый электрод $E = 0.85$ В	Нарингин Гесперидин Нарингенин	1–1000 мкг/мл 0.05–100 мкг/мл 0.5–500 мкг/мл	0.05 мкг/мл 0.01 мкг/мл 0.1 мкг/мл	Сушеные плоды померанца	[47]
12	40	50 мМ боратный буферный раствор с рН 9.2	12	МУНТ–полиуретан композитный электрод $E = 0.8$ В	Гесперидин Нарингин Гесперетин Нарингенин	1–1000 мкМ 1–1000 мкМ 1–1000 мкМ 1–1000 мкМ	0.22 мкМ 0.28 мкМ 0.24 мкМ 0.31 мкМ	Цедра помело	[48]
9	40	50 мМ боратный буферный раствор с рН 9.2	8	МУНТ–фенол-формальдегидная смола композитный электрод $E = 0.8$ В	Нарингин Гесперидин	1–1000 мкМ 1–1000 мкМ	0.78 мкМ	<i>Citrus reticulata</i> Blanco	[49]

Обозначения: ВММ-РФ₆ – 1-бутил-3-метилилимазолий гексафторфосфат, МУНТ – многостенные углеродные нанотрубки.

Таблица 4. УФ-спектроскопические способы определения флаванонов и их аналитические возможности

Аналит	λ , нм	Растворитель	Диапазон определяемых концентраций	Предел обнаружения	Объект анализа	Литература
Гесперидин	323	50 мМ фосфатный буферный раствор с рН 8.0	0–9 мкМ	1.8 мкМ	Апельсиновые соки	[52]
	283	60% метанол (рН 6.4)	1.83–24.5 мкг/мл	0.9 мкг/мл	Лекарственные средства	[53]
	269	0.2 М NaOH	3–25 мкг/мл	—		[54]
	285	0.2 М NaOH	5–50 мкг/мл	0.139 мкг/мл		[55]
Нарингенин	288	Метанол	2–12 мкг/мл	0.52 мкг/мл	Твердые дисперсии нарингенина	[56]
	283.49	Метанол	0–25 мкг/мл	0.1137 мкг/мл	Твердые липидные наночастицы с инкапсулированным нарингенином	[57]

Разработан простой и чувствительный флуориметрический способ определения гесперидина в лекарственных формах и плазме крови с внесленным гесперидином [58], основанный на тушении флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}} = 248$ нм, $\lambda_{\text{эмиссии}} = 494$ нм) Tb^{3+} в среде Трис-НСI буферного раствора с рН 8.5 за счет образования комплекса Tb^{3+} с гесперидином состава 1 : 3. Диапазон определяемых содержаний составляет 3.28–16.4 мкмоль, а предел обнаружения – 0.14 мкмоль. По аналогичному принципу можно определять диосмин, для которого длина волны возбуждения и эмиссии флуоресценции составляют 275 и 549 нм соответственно.

Основным недостатком спектроскопических способов является низкая селективность определения флаванонов, что ограничивает их практическую применимость для анализа объектов растительного происхождения (лекарственного растительного сырья, фруктов и продукции на их основе), содержащих широкий круг фенольных соединений различных классов и являющихся основным источником флаванонов. С другой стороны, в этом случае флаваноны могут использоваться в качестве стандарта при определении общего содержания фенольных соединений. Например, в работе [53] при анализе лекарственного средства “Витамин С с цитрусовыми биофлавоноидами и шиповником” для этих целей использован гесперидин. В настоящее время спектроскопические методы практически не применяются для определения индивидуальных флаванонов.

Электрохимические методы. Присутствие фенольных фрагментов в структуре флаванонов обуславливает их электрохимическую активность и возможность использования методов электроанализа для их определения. Однако до недавнего времени число работ в этой области было невелико. Рост внимания исследователей к флаванонам

как объектам электроанализа возрос в последнее пятилетие, однако этот класс флавоноидов является наименее изученным по сравнению с остальными. В качестве аналитов рассматривали лишь гесперидин, нарингин, эриодиктиол и их агликаны. Для их определения предложены различные типы электродов (рис. 3).

Полярография. Первые работы по электрохимическому определению флаванонов основаны на использовании ртутного электрода типа “висящая капля” в условиях инверсионной полярографии [59–61]. Гесперидин и нарингин образуют комплексы со ртутью, которые восстанавливаются при -0.2 и -0.4 В [59] и -0.25 и -0.42 В [60] соответственно в среде фосфатный буферный раствор (рН 11)–ацетонитрил (1 : 1). Для определения использовали оба пика восстановления после предварительного накопления, условия которого варьируются для каждого аналита в зависимости от потенциала пика восстановления. Для гесперидина диапазоны определяемых содержаний составляют 0.164–3.28 мкМ с пределом обнаружения 0.137 мкМ для пика при -0.2 В и 8.19–41 мкМ с пределом обнаружения 0.101 мкМ для пика при -0.4 В после накопления при -0.15 В в течение 60 с [59]. Для нарингина линейные зависимости токов восстановления наблюдаются в диапазонах 0.172–3.44 мкМ с пределом обнаружения 0.055 мкМ после накопления при -0.05 В в течение 10 с для пика при -0.25 В и 17.2–69 мкМ с пределом обнаружения 10 мкМ после накопления при -0.2 В в течение 30 с для пика при -0.42 В [60]. Аналогичный подход основан на адсорбционном концентрировании гесперидина или его комплекса с медью(II) на ртутном электроде типа “висящая капля” [61]. В последнем случае в режиме квадратно-волновой инверсионной полярографии удается определять следовые количества гесперидина в диапазоне 9.0–184 нМ с пределом обнаружения 4.89 нМ. Тем не менее

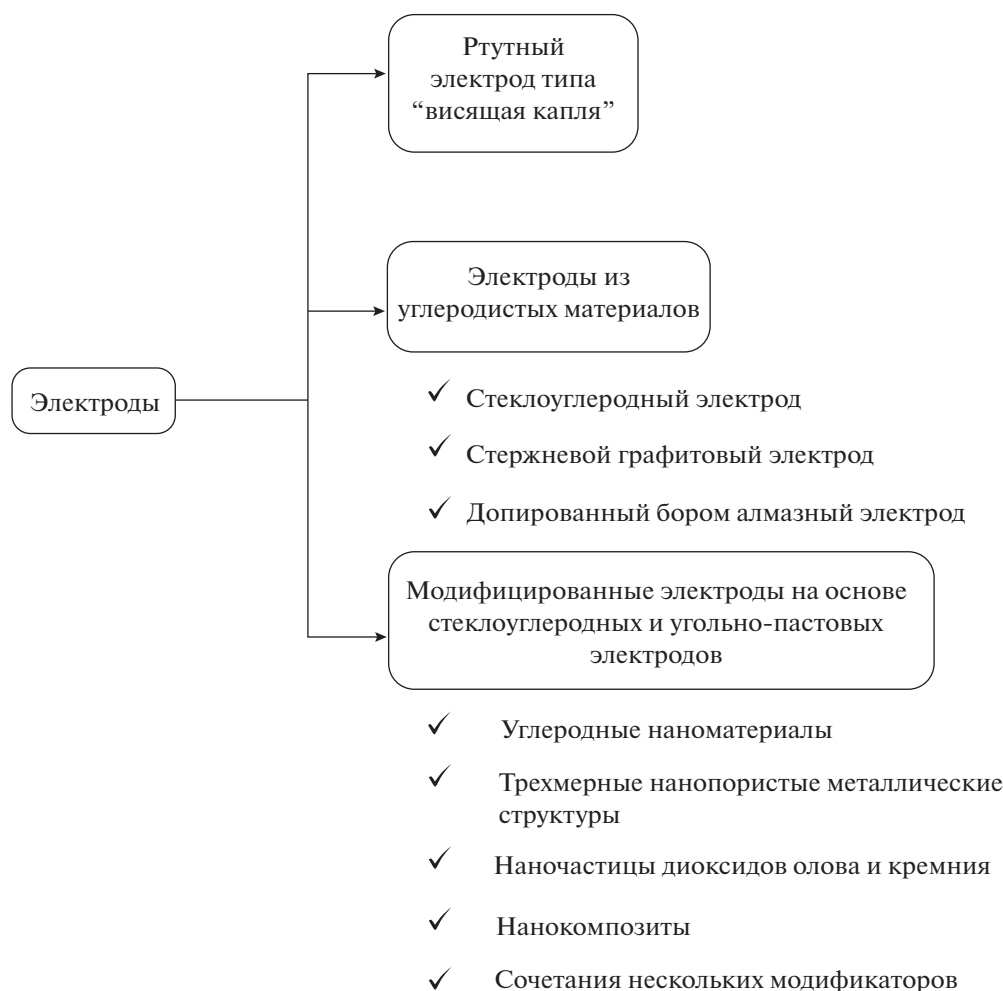


Рис. 3. Классификация электродов, применяемых для определения флаванонов.

рассмотренные полярографические способы характеризуются значимыми недостатками, которые ограничивают их практическую применимость. Во-первых, это низкая селективность отклика флаванонов в присутствии ионов металлов, других флавоноидов, органических соединений (щавелевой, глутаровой и аскорбиновой кислот, аланина) и поверхностно-активных веществ, которые существенно влияют на пики восстановления вплоть до их полного исчезновения [59–61]. Во-вторых, это необходимость использования двух пиков восстановления при различных потенциалах, отличающихся условиями проведения измерений, в зависимости от концентрации флаванона. Это осложняет анализ реальных объектов, содержание аналитов в которых неизвестно. В-третьих, использование ртутных электродов в настоящее время запрещено в большинстве стран мира вследствие токсичности паров ртути.

Электроды из углеродистых материалов. Упомянутые выше ограничения частично снимаются

при использовании стеклоуглеродного электрода (СУЭ) [62], одноразового стержневого графитового электрода [63], в том числе электрохимически активированного [64–66], и допированного бором алмазного электрода [67]. Рассмотрено электроокисление эриодиктиола на СУЭ в водной среде и показано, что пик окисления по первой ступени связан с обратимым окислением пирокатехинового фрагмента [62].

Представляет интерес одноразовый стержневой графитовый электрод — относительно новый тип электродов в электроанализе, одним из преимуществ которого является отсутствие стадии очистки электродной поверхности перед каждым измерением и высокая воспроизводимость электродной поверхности. Такие электроды ранее не применялись для определения флаванонов. Показана возможность определения гесперидина на одноразовом стержневом графитовом электроде в среде буферного раствора Бриттона–Робинсона с рН 1.81 в условиях дифференциально-импульсной вольтамперометрии (ДИВ) [63]. Градуиро-

вочная зависимость линейна в диапазоне 0.10–12 мкМ, а предел обнаружения составляет 0.0858 мкМ. Для улучшения этих параметров предложен инверсионный вариант с предварительным накоплением продукта окисления гесперидина при потенциале 1.000 В в течение 60 с, что обеспечивает линейный диапазон 0.050–1.00 мкМ с пределом обнаружения 0.019 мкМ гесперидина. Установлено, что в режиме ДИВ нарингин и галловая кислота не мешают определению гесперидина, тогда как пик окисления диосмина полностью перекрывается с пиком гесперидина. Подход апробирован при анализе пищевых добавок [63].

Разработаны способы вольтамперометрического определения гесперидина [64], нарингенина [65] и нарингина [66] на электрохимически активированных одноразовых стержневых графитовых электродах. Для электроактивации поверхности можно использовать потенциодинамический [64] и потенциостатический режимы [65, 66]. Показано, что активация пятикратным сканированием потенциала от –0.6 до 2.0 В со скоростью 50 мВ/с в среде фосфатного буферного раствора с рН 7.0 обеспечивает восьмикратное увеличение токов окисления гесперидина [64]. Потенциостатическая активация при 2.000 В в течение 60 с в той же среде приводит к 5- и 1.3-кратному увеличению токов окисления нарингенина [65] и нарингина [66] соответственно. Эти эффекты обусловлены увеличением площади поверхности электрода, что подтверждено экспериментально, а также образованием кислородсодержащих функциональных групп. В условиях ДИВ в среде ацетатного буферного раствора с рН 5.0 отклик гесперидина линейен в диапазоне 0.5–10 мкМ, а предел обнаружения составляет 0.2 мкМ [64]. Подход использован в анализе монокомпонентного лекарственного средства на основе гесперидина, содержащего в качестве вспомогательных компонентов диоксид кремния и крахмал. Мешающее влияние других типов соединений не рассматривается. Для определения нарингенина рассмотрены ДИВ и квадратно-волновая вольтамперометрия (КВВ) на фоне 0.05 М гидрофталата натрия при рН 4.0 [65]. Оба метода характеризуются близкими аналитическими характеристиками и позволяют определять нарингенин в диапазонах 0.0786–0.762 и 0.762–95.4 мкМ с пределом обнаружения 0.0306 мкМ для ДИВ и 0.0750–7.50 и 7.50–100 мкМ с пределом обнаружения 0.0440 мкМ для КВВ. Определение нарингина в режиме адсорбционной ДИВ возможно в диапазоне концентраций 0.6–8.0 мкМ с пределом обнаружения 0.135 мкМ после предварительного накопления в течение 240 с при потенциале 0.0 В [66]. Определение нарингенина и нарингина неселективно, поэтому подходы [65, 66] использованы для определения антиоксидантной емкости соков и кожуры грейпфрутов,

обусловленной присутствием фенольных антиоксидантов.

Адсорбционная инверсионная КВВ на допированном бором алмазном электроде в среде 0.1 М хлорной кислоты предложена для определения гесперидина в пищевых добавках [67]. Электрохимическое концентрирование при 0.4 В в течение 30 с обеспечивает диапазон определяемых концентраций 4.09–115 мкМ, а предел обнаружения 1.2 мкМ. Эти характеристики существенно уступают полученным на упомянутых выше электродах. Однако допированный бором алмазный электрод менее подвержен загрязнению поверхности продуктами реакции, удобен в эксплуатации и применим для решения задач фармацевтического анализа. Мешающее влияние аскорбиновой кислоты не позволяет проводить прямое определение гесперидина в некоторых лекарственных формах, апельсинах и продуктах на их основе, являющихся основными источниками гесперидина. В этом случае требуется предварительная обработка образца аскорбатоксидазой, что повышает трудоемкость и снижает экономичность анализа.

Главный недостаток всех упомянутых выше подходов к определению флаванонов — исключение в ряде случаев из рассмотрения мешающего влияния неорганических и органических соединений различных классов либо низкая селективность отклика флаванонов в присутствии структурно родственных соединений. Кроме того, имеются резервы для улучшения аналитических и операционных характеристик. Перечисленные проблемы удается преодолеть в той или иной степени с помощью химически модифицированных электродов.

Модифицированные электроды. К различным типам модификаторов можно отнести углеродные наноматериалы [68–73], трехмерные нанопористые металлические структуры [74, 75], наночастицы диоксидов олова [76] и кремния [77], а также различные нанокompозиты [78–82] и сочетания нескольких модификаторов с послойным нанесением [83–90]. Аналитические возможности модификаторов обобщены в табл. 5. Следует отметить, что практически все модифицированные электроды характеризуются селективным откликом на флаваноны в присутствии типичных мешающих компонентов, таких как неорганические ионы (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Al^{3+} , Zn^{2+} , Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} и т.д.), аскорбиновая кислота, сахараиды (глюкоза, фруктоза, сахароза, рамноза). Представляет интерес оценка мешающего влияния других фенольных соединений, в первую очередь, структурно родственных.

Электроды, модифицированные углеродными наноматериалами. Одним из наиболее широко применяемых типов модификаторов электродной поверхности являются углеродные нано-

материалы. Много- (МУНТ) [68–70] и одностенные [71] углеродные нанотрубки, электровосстановленный оксид графена [72, 73] показали электрокаталитические свойства по отношению к окислению гесперидина, нарингина, эриоцитрина и их агликонов. Варьирование типов углеродных наноматериалов и условий получения их суспензий позволяет управлять откликом флаванонов. Так, сопоставление вольт-амперных характеристик гесперидина и нарингина на СУЭ, модифицированных 1D (МУНТ), 2D (оксидом графена) и 3D (углеродной сажей Ketjen black EC300J) структурированными материалами, диспергированными в нафине показало, что наилучший отклик наблюдается для электрода на основе многостенных углеродных нанотрубок [69]. Это обусловлено большим числом структурных дефектов, sp^2 -гибридизованных атомов углерода и меньшим количеством кислородсодержащих функциональных групп, чем у оксида графена. Углеродная чернь Ketjen black EC300J обладает высокой электропроводимостью и дает высокие фоновые токи, что приводит к менее выраженным откликам флаванонов.

Оксид графена характеризуется низкой проводимостью; для ее повышения проводят его электровосстановление [72, 73]. Этот способ характеризуется экспрессностью по сравнению с химическими методами, не требует использования восстановителей, многие из которых токсичны, а также легко контролируется и позволяет получать воспроизводимые покрытия. Сочетание электровосстановленного оксида графена с одностенными углеродными нанотрубками обеспечивает синергетический эффект двух модификаторов [73].

Аналитические характеристики определения флаванонов на электродах, модифицированных углеродными наноматериалами, значительно улучшаются по сравнению с таковыми на электродах из традиционных углеродных материалов [68–73]. Кроме того, преимуществом модифицированных углеродными наноматериалами электродов является селективность отклика флаванонов в присутствии широкого круга неорганических ионов и органических соединений, в том числе аскорбиновой кислоты, глюкозы, рибофлавина, витамина B_1 , а также структурно близких соединений. Например, определению эриоцитрина не мешают 100-кратные избытки гесперидина, нарингина, нарирутина и дидимина [72]. С другой стороны, ионы меди(II) при низких концентрациях оказывают мешающее влияние при определении нарингина на электроде, модифицированном одностенными углеродными нанотрубками [71], что хорошо согласуется с данными [61]. В работе [70] селективность оклика гесперидина не рассматривается.

Электроды на основе трехмерных нанопористых металлических структур стали активно ис-

пользоваться в органическом электроанализе. Для определения флаванонов предложены печатные углеродные электроды, модифицированные трехмерными пористыми наноструктурами никеля [74] и платины [75]. Такие структуры имеют губчатоподобную морфологию (рис. 4), что обеспечивает большую площадь поверхности, меньшую плотность и большее число активных центров не только на поверхности модификатора, но и в порах. Кроме того, создание трехмерной нанопористой структуры может улучшить электрохимические характеристики электрода, облегчая процесс диффузии целевого аналита, уменьшая забивание пор и повышая чувствительность отклика электрода [91]. Покрытие на основе пористого никеля (рис. 4а) получали путем электроосаждения при плотности тока -0.6 А/см^2 в течение 40 с в присутствии пузырьков водорода как динамического темплата [74]. В случае трехмерных наноструктур пористой платины использовали 15-кратное циклирование потенциала от 1.2 до -0.6 В со скоростью 100 мВ/с в растворе, содержащем $1.0 \text{ мМ H}_2\text{PtCl}_6$ и 1.0 мМ CuSO_4 в $0.5 \text{ М H}_2\text{SO}_4$. На каждом катодном скане происходит электроосаждение сплава Pt–Cu, а на анодном – растворение меди, что приводит к формированию трехмерной пористой структуры платины (рис. 4б) [75].

Оба электрода обеспечивают статистически достоверное увеличение токов окисления флаванонов по сравнению с немодифицированным электродом и характеризуются селективностью отклика в присутствии других флаванонов, что позволяет использовать их в анализе “yellow water” (жидких остатков, образующихся после мытья апельсиновых плодов, дистилляции и производства эфирного масла) [74, 75]. Для проведения измерения достаточно 50 мкл разбавленного в 20 [74] или 2.5 раза [75] образца. Электрод на основе трехмерных наноструктур пористой платины позволяет одновременно определять нарирутин и гесперидин.

Электроды, модифицированные наночастицами оксидов металлов и неметаллов, не получили широкого применения в качестве модификаторов электродной поверхности для определения флаванонов. Так, разработан СУЭ, модифицированный наночастицами диоксида олова(IV), диспергированными в 0.50 мМ катионном поверхностно-активном веществе (ПАВ) цетилпиридиний бромиде, для определения гесперидина в апельсиновых соках [76]. При этом ПАВ выполняет двойную роль: выступает в качестве стабилизатора дисперсии наночастиц диоксида олова(IV) вследствие электростатического взаимодействия (наночастицы несут поверхностный отрицательный заряд) и обеспечивает концентрирование гесперидина на электродной поверхности за счет гидрофобных взаимодействий, в

Таблица 5. Аналитические характеристики определения флаванонов на химически модифицированных электродах

Электрод	Режим	Аналит	Фоновый электролит	ПрО, мкМ	Диапазон определяемых содержаний, мкМ	Объект анализа	Литература
Углеродные наноматериалы							
МУНТ/СУЭ	АдДИВ	Эриодиктиол	0.1 М ацетатный буферный раствор с рН 4.7	0.0011	0.0035–3.5	Скорлупа арахиса	[68]
МУНТ/СУЭ	ВА	Нарингин Гесперидин	0.2 М фосфатный буферный раствор с рН 7.0	— —	0–30 0–20	Экстракт сока грейпфрута	[69]
МУНТ/УПЭ печатный	АДИКВВ	Гесперидин	Буферный раствор Бриттона–Робинсона с рН 1.0	0.0073	0–30	Апельсиновый сок	[70]
ОУНТ/СУЭ	ВА	Нарингенин	0.1 М фосфатный буферный раствор с рН 2.0	0.020	0.080–5.0 и 5.0–12	<i>Fructus Aurantii</i> Immaturus	[71]
Электровосстановленный ОГ/СУЭ	АдДИВ	Эриоцитрин	0.1 М ацетатный буферный раствор с рН 4.8	0.00084	0.017–0.59	Лимоны	[72]
Электровосстановленный ОГ/ОУНТ-СООН/СУЭ	АдВА	Гесперетин	0.1 М фосфатный буферный раствор с рН 2.0	0.020	0.050–3.0	Моча и китайское лекарственное средство Flos buddlejae	[73]
Пористые трехмерные наноструктуры металлов							
3D нанопористый Ni/УПЭ печатный	ДИВ	Нарирутин	Этанол + 0.1 М цитратный буферный раствор рН 4.0 (40:60)	0.039	0.10–10	Yellow water	[74]
3D нанопористая Pt/УПЭ печатный	ВА	Гесперидин Нарирутин	0.1 М H ₂ SO ₄	6.61 0.21	10–400 10–500		[75]
Наночастицы оксидов металлов и неметаллов							
SnO ₂ –ЦПБ/СУЭ	АдДИВ	Гесперидин	0.1 М фосфатный буферный раствор с рН 7.0	0.077	0.10–10 и 10–75	Апельсиновые соки	[76]

Таблица 5. Продолжение

Электрод	Режим	Аналит	Фоновый электролит	ПрО, мкМ	Диапазон определяемых содержаний, мкМ	Объект анализа	Литера- тура
Мезопористый SiO ₂ -УПЭ	АлДИВ	Гесперидин	0.1 М фосфатный буферный раствор с рН 8.0	0.25	0.5–25	Традиционные препараты китайской медицины	[77]
Композитные наноматериалы							
Наночастицы CeO ₂ - ПДДА-функ- ционализирован- ный графен/СУЭ	АлДИВ	Эриоцитрин	0.1 М фосфатный буферный раствор с рН 2.0	0.0007	0.010–1.0	Лимон	[78]
Наночастицы CoS ₂ -нанолисты MoS ₂ -ПДДА-функ- ционализирован- ный графен/СУЭ	ДИВ	Эриоцитрин	0.1 М фосфатный буферный раствор с рН 2.0	0.00067	0.002–1.0	Лимон	[79]
Нанотерострукту- ры SnS ₂ -нанолисты восстановленного ОГ/СУЭ	АлДИВ	Нарингенин	0.1 М фосфатный буферный раствор с рН 3.0	0.313	0.49–56.6	Плазма крови и моча с внесенным аналитом	[80]
Нильский синий – МУНТ-СООН/УПЭ	ДИВ	Нарингенин	0.1 М фосфатный буферный раствор с рН 7.0	0.30	0.9–10 и 10–50	Виноградный, томат- ный и апельсиновый соки с внесенным ана- литом	[81]
Бриллиантовый зеленый–нанопла- стины графена/УПЭ	ДИВ	Гесперидин	0.1 М фосфатный буферный раствор рН 7.5	0.050	0.10–7.0 и 7.0–100	Лимонный сок, экс- тракты цедры апель- сина и листьев мяты	[82]
Послойная комбинация модификаторов различных типов							
In situ ДДС/МУНТ- СООН/СУЭ	ДВА	Нарингенин	Буферный раствор Бриттона – Робинсона с рН 8.0	0.14	0.75–25 и 25–100	Грейпфрутовые соки	[83]

Таблица 5. Окончание

Электрод	Режим	Аналит	Фоновый электролит	ПрО, мкМ	Диапазон определяемых содержаний, мкМ	Объект анализа	Литература
Наночастицы Au/Электровосстановленный ОГ/СУЭ	А	Гесперидин	0.1 М ацетатный буферный раствор с рН 3.6	0.0082	0.050–8.0	Pericarpium Citri Reticulatae	[84]
Поли(эллаговая кислота)/МУНТ/СУЭ	ДИВ	Нарингин	0.1 М фосфатный буферный раствор с рН 6.5	0.014	0.050–1.0 и 1.0–100	Грейпфрутовые соки	[85]
Полиалюминон/ОУНТф/СУЭ	ДИВ	Гесперидин Нарингин	0.1 М фосфатный буферный раствор с рН 5.0	0.029 0.020	0.10–2.5 и 2.5–25 0.10–2.5 и 2.5–25	Апельсиновые и грейпфрутовые соки	[86]
Полимеры с молекулярными отпечатками							
Поли(о-амино-фенол)/ГЭ	А	Нарингин	0.1 М ацетатный буферный раствор с рН 3.3	16	60–140	Апельсиновые соки	[87]
Поли (о-аминогидрокси)-Наночастицы Au/Ультразвуковой активированный уголь/СУЭ	ДИВ	Гесперидин	0.1 М фосфатный буферный раствор с рН 2.0	0.045	0.085–30	Препарат китайской медицины chenpi	[88]
ДНК-сенсоры							
Двунигетовая ДНК/ПДДА–МУНТ-СООН/ГЭ _с	ДИВ	Нарингин	0.50 М ацетатный буферный раствор рН 4.8 + 20 мМ NaCl	0.017	0.10–1000	Грейпфрутовый, апельсиновый и лимонный соки	[89]
Двунигетовая ДНК/Поли(2,6-пиридин-дикарбоновая кислота)/восстановленный ОГ/СУЭ	ДИВ	Гесперидин	0.50 М ацетатный буферный раствор рН 4.8 + 20 мМ NaCl	0.24	0.82–82	Плазма крови	[90]
Обозначения: ПрО – предел обнаружения, МУНТ – многостепенные углеродные нанотрубки, АдДИВ – адсорбционная дифференциально-импульсная вольтамперометрия, ВА – вольтамперометрия с линейной разверткой потенциала, УПЭ – угольно-пастовый электрод, АдИКВВ – адсорбционная инверсионная квадратно-волновая вольтамперометрия, ОУНТ – одностепенные углеродные нанотрубки, ОГ – оксид графена, ОУНТ-СООН – карбоксилированные одностепенные углеродные нанотрубки, АдВА – адсорбционная вольтамперометрия с линейной разверткой потенциала, ДИВ – дифференциально-импульсная вольтамперометрия, ЦПБ – цетилипидиний бромид, ПДДА – поли(диаллилдиметиламмоний хлорид), МУНТ-СООН – карбоксилированные многостепенные углеродные нанотрубки, ДДС – додецилсульфат натрия, ДВА – дифференциальная вольтамперометрия, А – амперометрия, ОУНТф – функционализированные полиаминобензолсульфоновой кислотой одностепенные углеродные нанотрубки, ГЭ – графитовый электрод, ГЭС – стержневой графитовый электрод.							

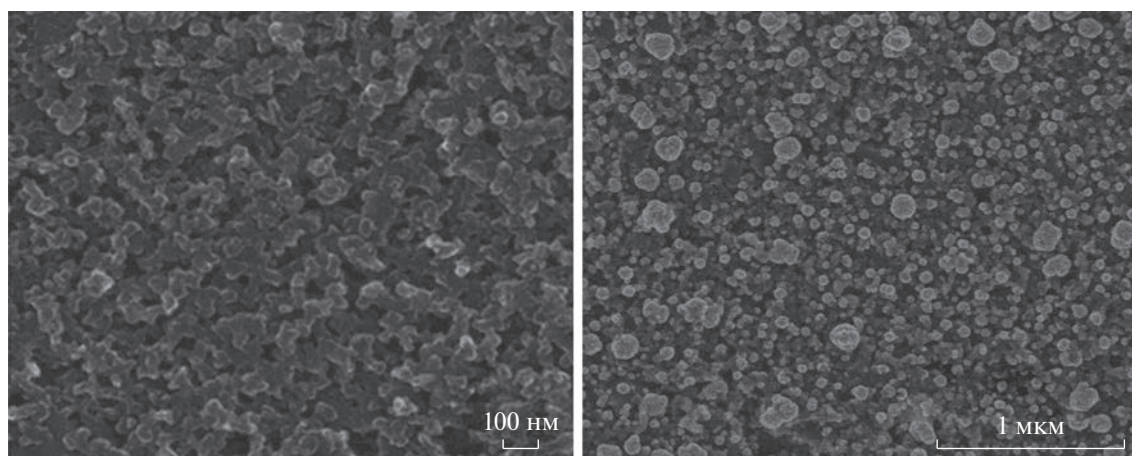


Рис. 4. (а) СЭМ-изображение 3D наноструктурированного пористого Ni/УПЭ, полученного при плотности тока -0.6 A/cm^2 . Цитировано по [74] с разрешения Elsevier. (б) СЭМ-изображение 3D наноструктурированного пористого Pt/УПЭ. Цитировано по [75] с разрешения Elsevier. 50 000х увеличение. УПЭ — печатный угольно-пастовый электрод.

частности π – π стэкинга, что подтверждается данными для катионных ПАВ, не содержащих в структуре ароматические фрагменты. Поверхностная концентрация гесперидина составляет $69 \pm 1 \text{ пмоль/см}^2$ [76]. Предложенный модификатор обеспечивает 7.4-кратный рост токов окисления по сравнению с СУЭ без использования предварительного адсорбционного накопления.

Электрод на основе мезопористого диоксида кремния также обеспечивает значимый рост токов окисления гесперидина, обусловленный увеличением эффективной площади поверхности электрода вследствие присутствия пор и каналов в структуре модификатора, а также адсорбцией аналита [77].

Аналитические характеристики методик определения гесперидина на этих электродах сопоставимы с таковыми для других модифицированных электродов и позволяют определять его в реальных объектах. Достоинством электродов на основе наночастиц диоксидов олова и кремния является селективность их отклика в присутствии других природных фенольных соединений (нарингина, кверцетина, рутина, морина, кофейной и хлорогеновой кислот [76], танжеретина, цитромитина и нобилетина [77]).

Электроды, модифицированные композитными наноматериалами. В настоящее время нанокompозиты активно используют в качестве модифицирующих покрытий электродов. Применительно к определению флаванонов описаны композиты наночастиц оксидов [78] и сульфидов [79, 80] металлов, а также красителей [81, 82] с углеродными наноматериалами. Композиты на основе наночастиц [78–80] получают химическим путем в несколько стадий с использованием большого числа вспомогательных реагентов (рис. 5). Конечный композит получают в автоклавах при $120\text{--}200^\circ\text{C}$ в течение 8–12 ч, а затем центрифуги-

руют, тщательно отмывают этанолом и водой и высушивают под вакуумом в течение 8–10 ч. Затем ультразвуковым диспергированием в течение 1–3 ч получают суспензии наноматериала в воде [78, 79] или водно-этанольной смеси [80]. Таким образом, процедура является трудоемкой и требует контроля структуры получающихся нанокompозитов. Способы получения композитов на основе красителей проще в исполнении. В суспензию соответствующего наноматериала в подходящем растворителе (этаноле [81] или диметилформамиде [82]), полученную ультразвуковым диспергированием, добавляют необходимое количество красителя и снова подвергают ультразвуковой обработке в течение 30 [81] или 15 мин [82]. Электродную поверхность модифицируют рассматриваемыми нанокompозитами методом капельного испарения.

Электроды на основе композитов наночастиц оксидов и сульфидов металлов дают чувствительный отклик на эриоцитрин [78, 79] и нарингенин [80]. Аналитические характеристики, достигнутые при определении эриоцитрина, существенно превосходят таковые для СУЭ, модифицированного электровосстановленным оксидом графена [81]. Кроме того, показана селективность отклика эриоцитрина в присутствии 10-кратных избытков других флаванонов (гесперетина, нарингенина, нарирутина), а также флавоноидов (10-кратного избытка диосмина и 3-кратного избытка рутина). Для нарингенина мешающее влияние структурно родственных соединений не рассматривали, поскольку в качестве объектов анализа выбрали биологические жидкости. Показано, что компоненты нарингинсодержащих лекарственных средств и биологических жидкостей (аскорбиновая и мочевая кислоты, глюкоза, лактоза, сахароза, крахмал и целлюлоза) не мешают его определению [80].

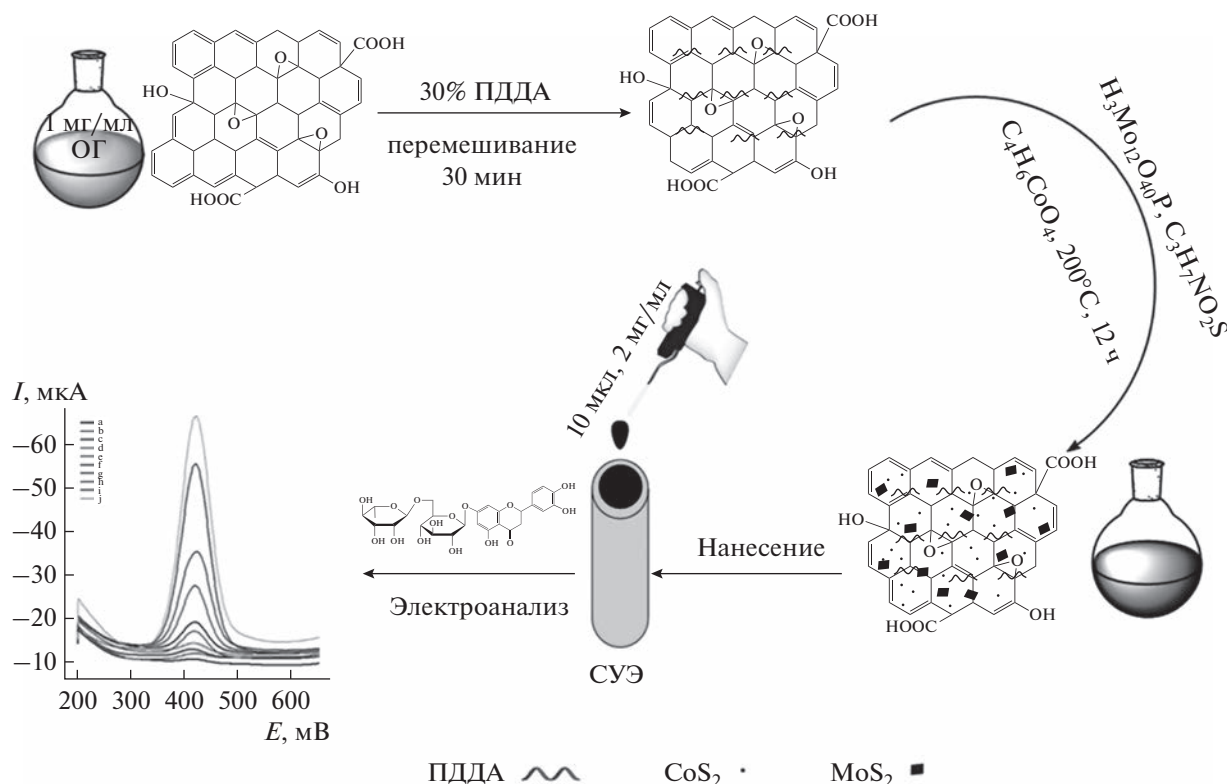


Рис. 5. Схематическое представление нанокompозита из восстановленного оксида графена (ОГ), функционализированного ПДДА, наночастиц CoS_2 и нанолистов MoS_2 как модификатора электродной поверхности для вольтамперометрического определения эриоцитрина. Цитировано по [79] с разрешения Elsevier. ПДДА — поли(диаллилдиметиламмоний хлорид).

Композиты на основе красителей [81, 82] дают менее чувствительный отклик на флаваноны, но достигнутые аналитические характеристики позволяют успешно их использовать для анализа реальных объектов. Кроме того, электроды просты в изготовлении, определение проводится при физиологических значениях pH и не требуется предварительное накопление аналитов, что значительно уменьшает продолжительность измерения, а также исключает возможность адсорбции других электроактивных компонентов из анализируемого объекта.

Комбинации модификаторов различных типов. Другой подход к модификации электродной поверхности заключается в послойном нанесении нескольких типов модификаторов. Так, электроды, модифицированные углеродными наноматериалами [83–86], применяют в качестве платформы для последующего нанесения модификаторов различного типа. Для этого можно использовать подход *in situ* (рис. 6а), который реализован, например, для нанесения додецилсульфата натрия на электрод, модифицированный карбоксилированными многостенными углеродными нанотрубками методом капельного испарения [83]. Такой подход к модификации обеспечивает чувствительный отклик нарингина за счет

гидрофобных взаимодействий с молекулами ПАВ, адсорбированными на электродной поверхности. Однако при получении покрытия *in situ* необходимо строго соблюдать время контакта электрода со средой, чтобы обеспечить воспроизводимость электродной поверхности. Преимуществами описанного подхода являются простота изготовления электрода, экспрессность, достаточная чувствительность и высокая селективность определения нарингина в присутствии фенольных кислот (галловой, кофейной и *n*-кумаровой) и флавоноидов (катехина, кверцетина и рутина).

Применение электрохимической модификации позволяет получать покрытия различных типов. Так, электроосаждение наночастиц золота на поверхности модифицированного электровосстановленным оксидом графена СУЭ [84] обеспечивает узкое и равномерное распределение наночастиц по размеру (30–40 нм) с формированием трехмерного покрытия, что приводит к росту площади поверхности электрода и обеспечивает эффективную адсорбцию гесперидина и высокую чувствительность его определения.

Представляет интерес формирование полимерных покрытий на поверхности модифицированных углеродными нанотрубками СУЭ в

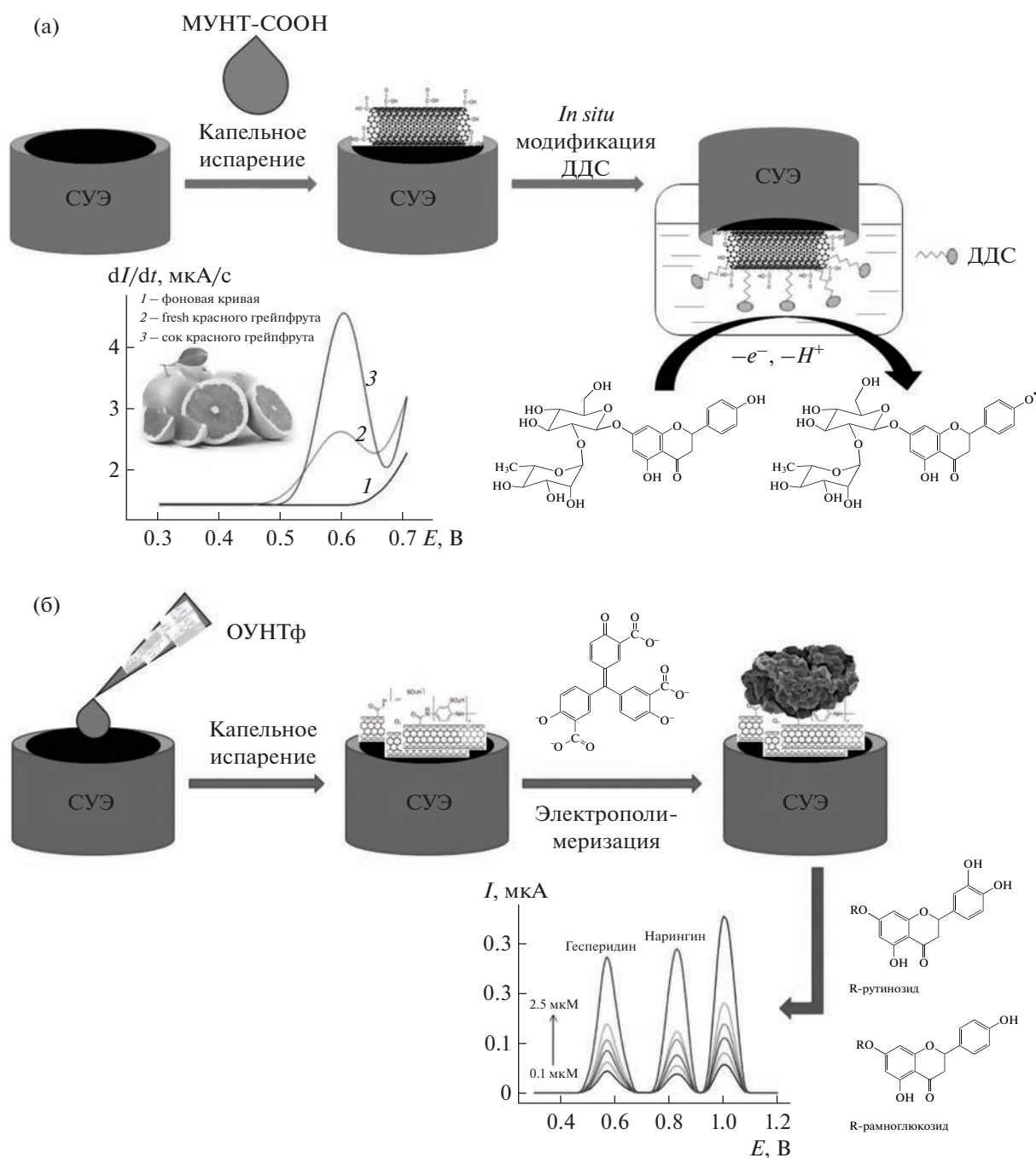


Рис. 6. Схематическое изображение (а) СУЭ, модифицированного карбоксилированными многостенными углеродными нанотрубками (МУНТ-СООН) и *in situ* додецилсульфатом натрия (ДДС) для вольтамперометрического определения нарингина; (б) СУЭ, послойно модифицированного функционализированными полиаминобензолсульфоновой кислотой одностенными углеродными нанотрубками (ОУНТф) и электрополимеризованным алюминоном для одновременного вольтамперометрического определения гесперидина и нарингина.

условиях потенциодинамического электролиза [85, 86]. В качестве мономеров использовали эллаговую кислоту (димер галловой кислоты лактонового типа) [85] и алюминон [86]. Присутствие фенольных фрагментов в их структуре приводит к формированию непроводящих полимерных покрытий, что характерно для электро-

полимеризации фенольных соединений [92]. Использование углеродных нанотрубок в качестве подложки обеспечивает достаточную проводимость электрода, а также большую площадь поверхности и, следовательно, более равномерное распределение полимерного покрытия, увеличение его количества на электроде и стабилизацию

[92]. Поскольку свойства получаемого полимерного покрытия зависят от концентрации мономера, фонового электролита и условий электрополимеризации, необходима оптимизация этих параметров. Как показано на природных фенольных антиоксидантах [93–95], параметры электрополимеризации следует оптимизировать по отклику целевых аналитов. Применительно к флаванонам установлено, что электрополимеризацию эллаговой кислоты следует проводить из 10 мкМ раствора мономера семикратным циклированием потенциала от 0.0 до 1.0 В со скоростью 100 мВ/с в фосфатном буферном растворе с pH 7.0 [85], а для получения полиалюминона необходимо использовать 100 мкМ раствор мономера и десятикратное сканирование потенциала от 0.1 до 0.8 В со скоростью 100 мВ/с в 0.1 М растворе NaOH [86]. Оба электрода демонстрируют чувствительный и селективный отклик на флаваноны в присутствии структурно подобных соединений. Модифицированный полиалюминоном электрод впервые предложен для одновременного определения нарингина и гесперидина [86] (рис. 66). Позже для решения этой задачи разработан электрод на основе многостенных углеродных нанотрубок, диспергированных в нафине [69], однако отсутствуют данные по пределам обнаружения флаванонов и селективности определения.

Полимеры с молекулярными отпечатками как модификаторы электродной поверхности. Одним из современных подходов к повышению селективности определения аналитов является создание полимеров с молекулярными отпечатками. Этот подход успешно реализован при определении нарингина и гесперидина, для которых созданы электроды, модифицированные электрохимически полученными полимерами с молекулярными отпечатками. Поли(*o*-аминофенол) с молекулярными отпечатками нарингина получен в условиях циклической вольтамперометрии на графитовом электроде [87]. Оригинальный электрод на основе полимера с молекулярными отпечатками предложен для определения гесперидина в препаратах традиционной китайской медицины [88]. Для этого использована послойная модификация СУЭ ультрадисперсным активированным углем с высокой проводимостью с последующим электроосаждением наночастиц золота. Затем электрод помещали на 12 ч в раствор, содержащий *o*-аминотиофенол и гесперидин, при этом происходила самоорганизация мономера на электродной поверхности за счет взаимодействия тиольных групп с наночастицами золота. Электрополимеризацию проводили методом циклической вольтамперометрии (13 циклов от –1.0 до 1.0 В со скоростью 50 мВ/с). Температуру удаляли выдерживанием электрода при перемешивании в 0.1 М растворе Na_2HPO_4 в течение 40 мин. Электрод характеризуется высокой селективностью отклика на гесперидин в присутствии гесперети-

на, рутина, кверцетина, пуэрарина, нарингенина, что позволяет использовать его в анализе растительных объектов со сложным фенольным составом. На одном электроде можно выполнить три измерения, после которых необходимо заново получать модифицирующее покрытие.

ДНК-сенсоры. При определении природных фенольных соединений чаще всего используют ферментные биосенсоры, позволяющие находить их суммарное содержание в образце [96]. В биосенсорах другого типа в качестве чувствительного слоя используют ДНК. Показана возможность определения нарингина и гесперидина с помощью электрохимических ДНК-сенсоров по уменьшению токов окисления гуанина и/или аденина [89, 90]. Для иммобилизации двунитевой ДНК из молок сельди использовали стержневой графитовый электрод, модифицированный карбоксилированными многостенными углеродными нанотрубками, диспергированными в поли(диаллилдиметиламмоний хлориде) [89], или СУЭ, модифицированный послойно электровосстановленным оксидом графена и электрополимеризованной 2,6-пиридиндикарбоновой кислотой [90]. Применение таких подложек обеспечивает закрепление большого количества ДНК на электродной поверхности за счет увеличения площади электрода. Кроме того, присутствие катионного поли(диаллилдиметиламмоний хлорида) обеспечивает электростатическое взаимодействие с отрицательно заряженными молекулами ДНК [89]. В случае полимерного покрытия происходит сорбция ДНК, зависящая от времени, которое составило 20 мин [90]. Оба сенсора показали не лучшие аналитические характеристики. Более того, для ДНК-сенсора на гесперидин отсутствуют данные по селективности отклика [90], хотя приведены результаты анализа плазмы крови с внесенным гесперидином. ДНК-сенсор на нарингин селективен в присутствии 200-кратных избытков рутина, икариина, нарингенина и гесперидина, 100-кратных избытков неорганических ионов, никотинамида, аскорбиновой и лимонной кислот, фруктозы и глюкозы, что позволило использовать его в анализе свежесжатых и коммерческих грейпфрутовых, апельсиновых и лимонных соков [89].

Фотоэлектрохимический сенсор для определения нарингина основан на использовании допированного фтором SnO_2 -электрода, модифицированного электроосажденным CdS и композитом на основе TiO_2 и комплекса хлоропротопорфирина IX с железом(III) [97]. В среде фосфатного буферного раствора с pH 7.0 фототок регистрируется в условиях амперометрии при потенциале 0.0 В. Диапазон определяемых содержаний нарингина составил 1–332 мкМ, а предел обнаружения – 0.03 мкМ. Аналитический сигнал характеризуется высокой воспроизводимостью и стабильностью. Определению на-

рингина не мешают аскорбиновая, галловая и лимонная кислоты, гесперидин, нарингенин, флаван и кверцетин, что позволяет использовать такой подход в анализе цитрусовых соков.

* * *

Анализ литературы показал, что флаваноны представляют интерес как объекты анализа, для идентификации и определения которых обычно используют хроматографические и электрофоретические методы с различными типами детектирования, среди которых все больше внимания уделяют ультра-ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием, в том числе в tandemном варианте, а также зонному капиллярному электрофорезу с электрохимическим детектированием. Дальнейшее развитие хроматографических подходов связано с идентификацией новых флаванонов, извлекаемых из растительного сырья, с применением масс-спектрометрии высокого разрешения и разработкой способов их определения. При этом представляет практический интерес использование “зеленых растворителей” в качестве подвижных фаз, особенно в ВЭТСХ. Для зонного капиллярного электрофореза актуально увеличение числа одновременно детектируемых флаванонов и миниатюризация систем, что может быть достигнуто за счет применения модифицированных капилляров и электрохимического детектирования соответственно.

Аналитические возможности спектральных методов при определении флаванонов крайне ограничены вследствие недостаточной селективности УФ-спектроскопии и флуориметрии. Объектами анализа могут быть лишь однокомпонентные лекарственные средства, число которых невелико. Для объектов сложного состава (лекарственного растительного сырья, фруктов, продуктов питания) возможно определение суммарного содержания флаванонов. Для повышения селективности определения индивидуальных флаванонов необходимо разрабатывать способы селективной экстракции целевого аналита либо синтезировать специфические фотометрические или флуоресцентные реагенты.

Проблема селективности отклика флаванонов является актуальной и для электрохимических методов анализа. Для решения этой задачи используют химически модифицированные электроды, обеспечивающие в ряде случаев высокую селективность отклика флаванонов в присутствии структурно родственных соединений, в том числе того же класса. В качестве модификаторов электродной поверхности чаще всего используют углеродные наноматериалы, их композиты с оксидами и сульфидами металлов, красителями, а также комбинации с послойно нанесенными полимерными покрытиями, наночастицами золота, ПАВ, ДНК. Композитные материалы характеризуются многоступенчатой и длительной процеду-

рой синтеза и очистки, но аналитические характеристики определения флаванонов сопоставимы с таковыми для других модификаторов. Модификаторы, получаемые электрохимически, обеспечивают более широкие диапазоны определяемых содержаний флаванонов, низкие пределы обнаружения и селективность отклика, высокую воспроизводимость электродной поверхности и при этом характеризуются простотой синтеза. Высокая селективность отклика характерна для электродов, модифицированных полимерами с молекулярными отпечатками флаванонов, однако исследования в этом направлении практически не ведутся.

В целом флаваноны как объекты электроанализа — один из наименее изученных классов флавоноидов. В качестве объектов анализа рассмотрены лишь гесперидин, нарингин, эриодиктиол и их агликоны. Представляет интерес расширение круга аналитов, тем более что они специфичны для отдельных видов растительного сырья. Другое перспективное направление исследований связано с разработкой способов одновременного определения нескольких флаванонов. Для решения этой проблемы необходимы новые модификаторы электродной поверхности, сочетающие высокую чувствительность и селективность отклика на целевые флаваноны. Структура поверхности модификатора, в частности присутствие пор определенного размера, может обеспечить эффективное разделение агликонов и гликозидов флаванонов. Актуальное направление исследований флаванонов — миниатюризация электрохимических систем, в том числе уже существующих, представляет практический интерес, но пока остается не реализованной. Таким образом, разработка простых и экспрессных способов определения флаванонов, характеризующихся надежностью получаемых результатов и применимых в рутинной практике, остается востребованной.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зиятдинова Г.К., Будников Г.К. Природные фенольные антиоксиданты в биоаналитической химии: состояние проблемы и перспективы развития // Успехи химии. 2015. Т. 84. № 2. С. 194. (Ziyatdinova G.K., Budnikov H.C. Natural phenolic antioxidants in bioanalytical chemistry: State of the art and prospects of development // Russ. Chem. Rev. 2015. V. 84. № 2. P. 194.) <https://doi.org/10.1070/RCR4436>
2. Veitch N.C., Grayer R.J. Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins // Nat. Prod. Rep. 2008. V. 25. № 3. P. 555. <https://doi.org/10.1039/B718040N>
3. Barreca D., Gattuso G., Bellocchio E., Calderaro A., Trombetta D., Smeriglio A., Lagan G., Daglia M., Meneghini S., Nabavi S.M. Flavanones: Citrus phytochemical with health-promoting properties // Biofactors. 2017. V. 43. № 4. P. 495. <https://doi.org/10.1002/biof.1363>

4. Ghosal A., Satoh H., Thomas P.E., Bush F., Moore D. Inhibition and kinetics of cytochrome P4503A activity in microsomes from rat, human, and cDNA-expressed human cytochrome P450 // *Drug. Metab. Dispos.* 1996. V. 24. № 9. P. 940.
5. Constantin R.P., do Nascimento G.S., Constantin R.P., Salgueiro C.L., Bracht A., Ishii-Iwamoto E.L., Yamamoto N.S., Constantin J. Citrus flavanones affect hepatic fatty acid oxidation in rats by acting as prooxidant agents // *BioMed Res. Int.* 2013. V. 2013. Article 342973. <https://doi.org/10.1155/2013/342973>
6. Shen N., Wang T., Gan Q., Liu S., Wang L., Lin B. Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity // *Food Chem.* 2022. V. 383. Article 132531. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132531>
7. Veitch N.C., Grayer R.J. Chalcones, dihydrochalcones, and aurones / *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications* / Eds. Andersen O.M., Markham K.R. Boca Raton: CRC Press LLC, 2006. P. 1003.
8. Khan M.K., Zill-E-Huma, Dangles O. A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols // *J. Food Compos. Anal.* 2014. V. 33. № 1. P. 85. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.11.004>
9. Durazzo A., Lucarini M., Souto E.B., Cicala C., Caiazzo E., Izzo A.A., Novellino E., Santini A. Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health // *Phytother. Res.* 2019. V. 33. № 9. P. 2221. <https://doi.org/10.1002/ptr.6419>
10. Регистр лекарственных средств России: Энциклопедия лекарств. Вып. 30 / Под ред. Вышковского Г.Л. М.: ВЕДАНТА, 2021. 1536 с.
11. Zhang C., Bucheli P., Liang X., Lu Y. Citrus flavonoids as functional ingredients and their role in traditional Chinese medicine // *Food.* 2007. V. 1. № 2. P. 287.
12. e Silva L.C.R.C., David J.M., Borges R. dos S.Q., Ferreira S.L.C., David J.P., dos Reis P.S., Bruns R.E. Determination of flavanones in orange juices obtained from different sources by HPLC/DAD // *J. Anal. Methods Chem.* 2014. V. 2014. Article 296838. <https://doi.org/10.1155/2014/296838>
13. Hejniak J., Baranowska I., Stencel S., Bajkacz S. Separation and determination of selected polyphenols from medicinal plants // *J. Chromatogr. Sci.* 2019. V. 57. № 1. P. 17. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmy075>
14. Zheng H., Zhen X.-T., Chena Y., Zhua S.-C., Ye L.-H., Yang S.-W., Wang Q.-Y., Cao J. In situ antioxidation-assisted matrix solid-phase dispersion microextraction and discrimination of chiral flavonoids from citrus fruit via ion mobility quadrupole time-of-flight high-resolution mass spectrometry // *Food Chem.* 2021. V. 343. Article 128422. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128422>
15. Baranowska I., Hejniak J., Magiera S. LC-ESI-MS/MS method for the enantioseparation of six flavanones // *Anal. Methods.* 2017. V. 9. № 6. P. 1018. <https://doi.org/10.1039/C6AY02952C>
16. Bajkacz S., Baranowska I., Buszewski B., Kowalski B., Ligor M. Determination of flavonoids and phenolic acids in plant materials using SLE-SPE-UHPLC-MS/MS method // *Food Anal. Methods.* 2018. V. 11. № 12. P. 35. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1332-9>
17. Seo C.-S., Shin H.-K. Simultaneous analysis for quality control of traditional herbal medicine, gungha-tang, using liquid chromatography–tandem mass spectrometry // *Molecules.* 2022. V. 27. № 4. Article 1223. <https://doi.org/10.3390/molecules27041223>
18. Zeng X., Su W., Zheng Y., Liu H., Li P., Zhang W., Liang Y., Bai Y., Peng W., Yao H. UFLC-Q-TOF-MS/MS-based screening and identification of flavonoids and derived metabolites in human urine after oral administration of *Exocarpium Citri Grandis* extract // *Molecules.* 2018. V. 23. № 4. Article 895. <https://doi.org/10.3390/molecules23040895>
19. Aziz N., Khan M.N., Ali A., Khadim A., Muhsinah A.B., Uddin J., Musharraf S.G. Rapid analysis of flavonoids based on spectral library development in positive ionization mode using LC-HR-ESI-MS/MS // *Arab. J. Chem.* 2022. V. 15. № 4. Article 103734. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.103734>
20. Tine Y., Yang Y., Renucci F., Costa J., Wélé A., Paolini J. LC-MS/MS analysis of flavonoid compounds from *Zanthoxylum zanthoxyloides* extracts and their antioxidant activities // *Nat. Prod. Commun.* 2017. V. 12. № 12. P. 1865. <https://doi.org/10.1177/1934578X1701201213>
21. Ribeiro I.A., Ribeiro M.H.L. Naringin and naringenin determination and control in grapefruit juice by a validated HPLC method // *Food Control.* 2008. V. 19. № 4. P. 432. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.05.007>
22. Ni H., Zhang S.F., Gao Q.F., Hu Y., Jiang Z.D., Chen F. Development and evaluation of simultaneous quantification of naringin, prunin, naringenin, and limonin in citrus juice // *Food Sci. Biotechnol.* 2015. V. 24. № 4. P. 1234. <https://doi.org/10.1007/s10068-015-0159-z>
23. Musmade K.P., Trilok M., Dengale S.J., Bhat K., Reddy M.S., Musmade P.B., Udupa N. Development and validation of liquid chromatographic method for estimation of naringin in nanoformulation // *J. Pharm.* 2014. V. 2014. Article 864901. <https://doi.org/10.1155/2014/864901>
24. Büyüktuncel E. Fast determination of naringin and hesperidin in natural and commercial citrus juices by HPLC method // *Asian J. Chem.* 2017. V. 29. № 11. P. 2384. <https://doi.org/10.14233/ajchem.2017.20675>
25. Erlund I., Meririnne E., Alfthan G., Aro A. Plasma kinetics and urinary excretion of the flavanones naringenin and hesperetin in humans after ingestion of orange juice and grapefruit juice // *J. Nutr.* 2001. V. 131. № 2. P. 235. <https://doi.org/10.1093/jn/131.2.235>
26. Xie F., Wulster-Radcliffe M., Hilt R., Kissinger C.B., Kissinger P.T. Determination of naringenin in rat plasma with the Culex® automated blood sampler coupled with liquid chromatography/electrochemistry // *Asian J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 2004. V. 4. № 1. P. 29.
27. Diaconu C., Vlase L., Cuciureanu M., Filip L. Assessment of flavonoids content in citrus juices using a LC/MS method // *Farmacia.* 2017. V. 65. № 1. P. 92.
28. Perlatti B., Fernandes J.B., Silva M.F.G.F., Ardila J.A., Carneiro R.L., Souza B.H.S., Costa E.N., Eduardo W.I., Boça Junior A.L., Forim M.R. Application of a quantitative HPLC-ESI-MS/MS method for flavonoids in different vegetables matrices // *J. Braz. Chem. Soc.*

2016. V. 27. № 3. P. 475.
<https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150273>
29. Csuti A., Sik B., Ajtony Z. Measurement of naringin from citrus fruits by high-performance liquid chromatography – A review // *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2022. <https://doi.org/10.1080/10408347.2022.2082241>
30. Baira E., Dagla I., Siapi E., Zoumpoulakis P., Tsarbopoulos A., Simitzis P., Goliomytis M., Deligeorgis S.G., Skaltsounis A.-L., Gikas E. Development of a validated UHPLC-ESI (-)-HRMS methodology for the simultaneous quantitative determination of hesperidin, hesperetin, naringin, and naringenin in chicken plasma // *Food Anal. Methods.* 2019. V. 12. № 5. P. 1187. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-01420-4>
31. Ma Y., Zhang Y., Zhai Y., Zhu Z., Pan Y., Qian D., Su S., Fan X., Duan J. Development of a UPLC-TQ/MS approach for the determination of eleven bioactive components in Haizao Yuhu decoction plus-minus Haizao and Gancan drug combination after oral administration in a rat model of hypothyroidism // *Molecules.* 2017. V. 22. № 1. Article 7. <https://doi.org/10.3390/molecules22010007>
32. Yuan J., Wei F., Luo X., Zhang M., Qiao R., Zhong M., Chen H., Yang W. Multi-component comparative pharmacokinetics in rats after oral administration of *Fructus aurantia* Extract, naringin, neohesperidin, and naringin-neohesperidin // *Front. Pharmacol.* 2020. V. 11. Article 933. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2020.00933>
33. Chen T., Wu H., He Y., Pan W., Yan Z., Liao Y., Peng W., Gan L., Zhang Y., Su W., Yao H. Simultaneously quantitative analysis of naringin and its major human gut microbial metabolites naringenin and 3-(4'-hydroxyphenyl) propanoic acid via stable isotope deuterium-labeling coupled with RRLC-MS/MS Method // *Molecules.* 2019. V. 24. № 23. Article 4287. <https://doi.org/10.3390/molecules24234287>
34. Zeng X., Su W., Liu H., Zheng Y., Chen T., Zhang W., Yan Z., Bai Y., Yao H. Simultaneous determination of rosuvastatin, naringin and naringenin in rat plasma by RRLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic drug interaction study // *J. Chromatogr. Sci.* 2018. V. 56. № 7. P. 611. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmy034>
35. Meier B., Sprian D. Modern HPTLC – A perfect tool for quality control of herbals and their preparations // *J. AOAC Int.* 2010. V. 93. № 5. P. 1399. <https://doi.org/10.1093/jaoac/93.5.1399>
36. Mikropoulou E.V., Petrakis E.A., Argyropoulou A., Mitakou S., Halabalaki M., Skaltsounis L.A. Quantification of bioactive lignans in sesame seeds using HPTLC densitometry: Comparative evaluation by HPLC-PDA // *Food Chem.* 2019. V. 288. P. 1. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.109>
37. Alam P., Alam A., Anwer Md.K., Alqasoumi S.I. Quantitative estimation of hesperidin by HPTLC in different varieties of citrus peels // *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2014. V. 4. № 4. P. 262. <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C1007>
38. Alam P., Siddiqui N.A., Al-Rehaily A.J., Alajmi M.F., Basudan O.A., Khan T.H. Stability-indicating densitometric high-performance thin-layer chromatographic method for the quantitative analysis of biomarker naringin in the leaves and stems of *Rumex vesicarius* L. // *JPC – J. Planar Chromatogr.* 2014. V. 27. № 3. P. 204. <https://doi.org/10.1556/JPC.27.2014.3.10>
39. Li Y., Zhao C., Lu C., Zhou S., Tian G., He L., Bao Y., Fauconnier M.-L., Xiao H., Zheng J. Simultaneous determination of 14 bioactive citrus flavonoids using thin-layer chromatography combined with surface enhanced Raman spectroscopy // *Food Chem.* 2021. V. 338. Article 128115. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128115>
40. Foudah A.I., Shakeel F., Alam P., Alqarni M.H., Abdel-Kader M.S., Alshehri S. A sustainable reversed-phase HPTLC method for the quantitative estimation of hesperidin in traditional and ultrasound-assisted extracts of different varieties of citrus fruit peels and commercial tablets // *Agronomy.* 2021. V. 11. № 9. Article 1744. <https://doi.org/10.3390/agronomy11091744>
41. Przybylska A., Gackowski M., Koba M. Application of capillary electrophoresis to the analysis of bioactive compounds in herbal raw materials // *Molecules.* 2021. V. 26. № 8. Article 2135. <https://doi.org/10.3390/molecules26082135>
42. Memon A.F., Solangi A.R., Memon S.Q., Mallah A., Memon N., Memon A.A. Simultaneous determination of quercetin, rutin, naringin, and naringenin in different fruits by capillary zone electrophoresis // *Food. Anal. Methods.* 2017. V. 10. № 1. P. 83. <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0552-0>
43. Şanlı S., Lunte C. Determination of eleven flavonoids in chamomile and linden extracts by capillary electrophoresis // *Anal. Methods.* 2014. V. 6. № 11. P. 3858. <https://doi.org/10.1039/C3AY41878B>
44. Memon A.F., Solangi A.R., Memon S.Q., Mallah A., Memon N. Quantitative separation of hesperidin, chrysin, epicatechin, epigallocatechin gallate, and morin using ionic liquid as a buffer additive in capillary electrophoresis // *Electrophoresis.* 2018. V. 39. № 13. P. 1606. <https://doi.org/10.1002/elps.201700421>
45. Sawalha S.M.S., Arráez-Román D., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A. Quantification of main phenolic compounds in sweet and bitter orange peel using CE-MS/MS // *Food Chem.* 2009. V. 116. № 2. P. 567. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.003>
46. Wu T., Guan Y., Ye J. Determination of flavonoids and ascorbic acid in grapefruit peel and juice by capillary electrophoresis with electrochemical detection // *Food Chem.* 2007. V. 100. № 4. P. 1573. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.12.042>
47. Peng Y., Liu F., Ye J. Quantitative and qualitative analysis of flavonoid markers in *Frucus aurantii* of different geographical origin by capillary electrophoresis with electrochemical detection // *J. Chromatogr. B.* 2006. V. 830. № 2. P. 224. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.10.043>
48. Ma F., Zhang W., Wang J., Zhang L., Chen G. Fabrication of a carbon nanotube-polyurethane composite electrode by in situ polyaddition for use in amperometric detection in capillary electrophoresis // *Microchim. Acta.* 2016. V. 183. № 9. P. 2579. <https://doi.org/10.1007/s00604-016-1900-x>
49. Wang X., Wang J., Zhang L., Chen G. Carbon nanotube-phenolic resin composite electrode fabricated by far infrared-assisted crosslinking for enhanced amperometric detection // *Electroanalysis.* 2019. V. 31. № 4. P. 756. <https://doi.org/10.1002/elan.201800604>
50. Bachmann S., Huck C.W., Bakry R., Bonn G.K. Analysis of flavonoids by CE using capacitively coupled contact-

- less conductivity detection // *Electrophoresis*. 2007. V. 28. № 13. P. 799.
<https://doi.org/10.1002/elps.200600228>
51. *Tsimogiannis D., Samiotaki M., Panayotou G., Oreopoulou V.* Characterization of flavonoid subgroups and hydroxy substitution by HPLC-MS/MS // *Molecules*. 2007. V. 12. № 3. P. 593.
<https://doi.org/10.3390/12030593>
52. *Mazzafarro L.S., Breccia J.D.* Quantification of hesperidin in citrus-based foods using a fungal diglycosidase // *Food Chem.* 2012. V. 134. № 4. P. 2338.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.107>
53. *Kuntić V., Pejić N., Mičić S.* Direct spectrophotometric determination of hesperidin in pharmaceutical preparations // *Acta Chim. Slov.* 2012. V. 59. № 2. P. 436.
54. *Bennani I., Chentoufi M.A., El Otmani I.S., Cheikh A., Bamou N., El Karbane M., Bouatia M.* Development and validation of two spectrophotometric methods for simultaneous determination of diosmine and hesperidin in mixture and their applications // *J. App. Pharm. Sci.* 2020. V. 10. № 7. P. 100.
55. *Srilatha D., Nasare M., Nagasandhya B., Prasad V., Diwan P.* Development and validation of UV spectrophotometric method for simultaneous estimation of hesperidin and diosmin in the pharmaceutical dosage form // *ISRN Spectroscopy*. 2013. V. 2013. Article 534830.
<https://doi.org/10.1155/2013/534830>
56. *Jha D.K., Shah D.S., Talele S.R., Amin P.D.* Correlation of two validated methods for the quantification of naringenin in its solid dispersion: HPLC and UV spectrophotometric methods // *SN Appl. Sci.* 2020. V. 2. № 4. Article 698.
<https://doi.org/10.1007/s42452-020-2536-3>
57. *Sahu A.K., Jain V.* Quantification of naringenin encapsulated in solid lipid nanoparticles by validated UV-spectroscopy method // *Planta Med.* 2015. V. 81. № 5. P. 13.
<https://doi.org/10.1055/s-0035-1545230>
58. *Mohamed D., Tawakkol S.M.* Fluorimetric determination of diosmin and hesperidin in combined dosage forms and in plasma through complex formation with terbium // *Bull. Fac. Pharm. Cairo Univ.* 2013. V. 51. № 1. P. 81.
<https://doi.org/10.1016/j.bfopcu.2012.12.001>
59. *Obendorf D., Reichart E.* Determination of hesperidin by cathodic stripping voltammetry in orange juice and helopyrin, a phytopharmaceutical preparation // *Electroanalysis*. 1995. V. 7. № 11. P. 1075.
<https://doi.org/10.1002/elan.1140071115>
60. *Reichart E., Obendorf D.* Determination of naringin in grapefruit juice by cathodic stripping differential pulse voltammetry at the hanging mercury drop electrode // *Anal. Chim. Acta*. 1998. V. 360. № 1–3. P. 179.
[https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(97\)00704-6](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(97)00704-6)
61. *Temerk Y.M., Ibrahim M.S., Kotb M.* Square-wave cathodic adsorptive stripping voltammetric determination of 3-hydroxyflavone, morin and hesperidin in bulk form and biological fluids in absence and presence of Cu(II) // *J. Braz. Chem. Soc.* 2011. V. 22. № 11. P. 2056.
<https://doi.org/10.1590/S0103-50532011001100006>
62. *de Souza Gil E., Enache A.T., Oliveira-Brett A.M.* Anodic behaviour of flavonoids orientin, eriodictyol and robinin at a glassy carbon electrode // *Electroanalysis*. 2012. V. 24. № 7. P. 1576.
<https://doi.org/10.1002/elan.201200211>
63. *David I.G., Numan N., Buleandră M., Popa D.-E., Lițescu S.C., Riga S., Ciobanu A.M.* Rapid voltammetric screening method for the assessment of bioflavonoid content using the disposable bare pencil graphite electrode // *Chemosensors*. 2021. V. 9. № 11. Article 323.
<https://doi.org/10.3390/chemosensors9110323>
64. *Šafranko S., Stanković A., Asserghine A., Jakovljević M., Hajra S., Nundy S., Medvidović-Kosanović M., Jokić S.* Electroactivated disposable pencil graphite electrode – new, cost-effective, and sensitive electrochemical detection of bioflavonoid hesperidin // *Electroanalysis*. 2021. V. 33. № 4. P. 1063.
<https://doi.org/10.1002/elan.202060511>
65. *David I.G., Lițescu S.C., Popa D.E., Buleandra M., Iordache L., Albu C., Alecu A., Penu R.L.* Voltammetric analysis of naringenin at a disposable pencil graphite electrode – Application to polyphenol content determination in citrus juice // *Anal. Methods*. 2018. V. 10. № 48. P. 5763.
<https://doi.org/10.1039/C8AY02281J>
66. *David I.G., Lițescu S.C., Moraru R., Albu C., Buleandra M., Popa D.E., Riga S., Ciobanu A.M., Noor H.* Electroanalysis of naringin at electroactivated pencil graphite electrode for the assessment of polyphenolics with intermediate antioxidant power // *Antioxidants*. 2022. V. 11. № 12. Article 2306.
<https://doi.org/10.3390/antiox11122306>
67. *Yiğit A., Yardım Y., Şentürk Z.* Square-wave adsorptive stripping voltammetric determination of hesperidin using a boron-doped diamond electrode // *J. Anal. Chem.* 2020. V. 75. № 5. P. 653.
<https://doi.org/10.1134/S1061934820050184>
68. *Cai W.-L., Liu L., Liao X.-Q., Tao K.-L., Feng F., Yang G.-J.* Determination of eriodictyol by a modified multiwalled carbon nanotube glassy carbon electrode // *Anal. Lett.* 2016. V. 49. № 10. P. 1502.
<https://doi.org/10.1080/00032719.2015.1113423>
69. *Xia H.-Q., Gu T., Fan R., Zeng J.* Comparative investigation of bioflavonoid electrocatalysis in 1D, 2D, and 3D carbon nanomaterials for simultaneous detection of naringin and hesperidin in fruits // *RSC Adv.* 2022. V. 12. № 11. P. 6409.
<https://doi.org/10.1039/D1RA07217J>
70. *Sims M.J., Li Q., Kachosangi R.T., Wildgoose G.G., Compton R.G.* Using multiwalled carbon nanotube modified electrodes for the adsorptive stripping voltammetric determination of hesperidin // *Electrochim. Acta*. 2009. V. 54. № 22. P. 5030.
<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2008.10.056>
71. *Wang W., Gao J., Wang L., Ye B.* Electrochemical behavior of naringenin and its sensitive determination based on a single-walled carbon nanotube modified electrode // *Anal. Methods*. 2015. V. 7. № 20. P. 8847.
<https://doi.org/10.1039/C5AY01782C>
72. *Yao S., Cai W., Liu L., Liao X., Tao K., Feng F., Yang G.* Electrochemical behavior of eriodictin and highly sensitive determination based on an electrochemically reduced graphene oxide modified glassy carbon electrode // *Anal. Methods*. 2016. V. 8. № 18. P. 3722.
<https://doi.org/10.1039/C6AY00064A>
73. *Wu J., Wang L., Wang Q., Zou L., Ye B.* The novel voltammetric method for determination of hesperetin based on a sensitive electrochemical sensor // *Talanta*. 2016. V. 150. P. 61.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.12.026>

74. *Beluomini M.A., Stradiotto N.R., Boldrin M.V.* Electrosynthesis of three-dimensional nanoporous nickel on screen-printed electrode used for the determination of naringin in citrus wastewater // *Food Chem.* 2021. V. 353. Article 129427. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129427>
75. *Beluomini M.A., Stradiotto N.R., Zanoni M.V.B.* Simultaneous detection of hesperidin and naringin in residual water using nanoporous platinum electrosynthesized by alloying-dealloying mechanism // *J. Electroanal. Chem.* 2022. V. 904. Article 115866. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2021.115866>
76. *Ziyatdinova G., Yakupova E., Davletshin R.* Voltammetric determination of hesperidin on the electrode modified with SnO₂ nanoparticles and surfactants // *Electroanalysis.* 2021. V. 33. № 12. P. 2417. <https://doi.org/10.1002/elan.202100405>
77. *Sun D., Wang F., Wu K., Chen J., Zhou Y.* Electrochemical determination of hesperidin using mesoporous SiO₂ modified electrode // *Microchim. Acta.* 2009. V. 167. № 1. P. 35. <https://doi.org/10.1007/s00604-009-0200-0>
78. *Wang L., Wang Q., Sheng K., Li G., Ye B.* A new graphene nanocomposite modified electrode as efficient voltammetric sensor for determination of eriocitrin // *J. Electroanal. Chem.* 2017. V. 785. P. 96. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2016.11.061>
79. *Zhang Y., Liu Z., Zou L., Ye B.* A new voltammetry sensor platform for eriocitrin based on CoS₂-MoS₂-PDDA-GR nanocomposite // *Talanta.* 2018. V. 189. P. 345. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.07.004>
80. *Teradal N.L., Satpati A.K., Seetharamappa J.* A facile one-pot hydrothermal synthesis of tin sulfide-decorated reduced graphene oxide nanoribbons and its sensing application for a flavanone naringenin // *J. Electroanal. Chem.* 2017. V. 797. P. 89. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2017.05.022>
81. *Manasa G., Mascarenhas R.J., Bhakta A.K., Mekhalif Z.* MWCNT/Nileblue heterostructured composite electrode for flavanone naringenin quantification in fruit juices // *Electroanalysis.* 2020. V. 32. № 5. P. 939. <https://doi.org/10.1002/elan.201900573>
82. *Manasa G., Mascarenhas R.J., Bhakta A.K., Mekhalif Z.* Nano-graphene-platelet/Brilliant-green composite coated carbon paste electrode interface for electrocatalytic oxidation of flavanone hesperidin // *Microchem. J.* 2021. V. 160. Article 105768. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105768>
83. *Ziyatdinova G., Yakupova E., Ziganshina E., Budnikov H.* First order derivative voltammetry on the *in situ* surfactant modified electrode for naringin quantification // *Electroanalysis.* 2019. V. 31. № 11. P. 2130. <https://doi.org/10.1002/elan.201900257>
84. *Gao Y., Wu X., Wang H., Lu W., Guo M.* Highly sensitive detection of hesperidin using AuNPs/rGO modified glassy carbon electrode // *Analyst.* 2018. V. 143. № 1. P. 297. <https://doi.org/10.1039/C7AN01706E>
85. *Ziyatdinova G., Yakupova E., Guss E., Budnikov H.* The selective electrochemical sensing of naringin using electropolymerized ellagic acid film // *J. Electrochem. Soc.* 2020. V. 167. № 10. Article 107502. <https://doi.org/10.1149/1945-7111/ab9280>
86. *Zhupanova A., Guss E., Ziyatdinova G., Budnikov H.* Simultaneous voltammetric determination of flavanones using an electrode based on functionalized single-walled carbon nanotubes and polyaluminumon // *Anal. Lett.* 2020. V. 53. № 13. P. 2170. <https://doi.org/10.1080/00032719.2020.1732402>
87. *Ma X.-L., Chen R.-Y., Zheng X., Chen X., Chen Z.* Preparation and application of naringin sensor based on molecularly imprinting technique // *Chinese J. Anal. Chem.* 2010. V. 38. № 1. P. 100. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1096.2010.00100>
88. *Sun B., Hou X., Li D., Gou Y., Hu F., Li W., Shi X.* Electrochemical sensing and high selective detection of hesperidin with molecularly imprinted polymer based on ultrafine activated carbon // *J. Electrochem. Soc.* 2019. V. 166. № 15. P. B1644. <https://doi.org/10.1149/2.1141915jes>
89. *Ensafi A.A., Karbalaee S., Heydari-Bafrooei E., Rezaei B.* Biosensing of naringin in marketed fruits and juices based on its interaction with DNA // *J. Iran. Chem. Soc.* 2016. V. 13. № 1. P. 19. <https://doi.org/10.1007/s13738-015-0707-8>
90. *Tiğ G.A., Bolat E.Ö., Zeybek B., Pekyardımcı Ş.* Hesperidin-dsDNA interaction based on electrochemically reduced graphene oxide and poly-(2,6-pyridinedicarboxylic acid) modified glassy carbon electrode // *Hacettepe J. Biol. Chem.* 2016. V. 44. № 4. P. 487. <https://doi.org/10.15671/HJBC.2016.129>
91. *Park S., Song Y.J., Han J.-H., Boo H., Chung T.D.* Structural and electrochemical features of 3D nanoporous platinum electrodes // *Electrochim. Acta.* 2010. V. 55. № 6. P. 2029. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2009.11.026>
92. *Ziyatdinova G., Guss E., Yakupova E.* Electrochemical sensors based on the electropolymerized natural phenolic antioxidants and their analytical application // *Sensors.* 2021. V. 21. № 24. Article 8385. <https://doi.org/10.3390/s21248385>
93. *Ziyatdinova G., Kozlova E., Budnikov H.* Polyquercetin/MWNT-modified electrode for the determination of natural phenolic antioxidants // *Electroanalysis.* 2017. V. 29. № 11. P. 2610. <https://doi.org/10.1002/elan.201700440>
94. *Ziyatdinova G., Kozlova E., Budnikov H.* Poly(gallic acid)/MWNT-modified electrode for the selective and sensitive voltammetric determination of quercetin in medicinal herbs // *J. Electroanal. Chem.* 2018. V. 821. P. 73. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2017.12.071>
95. *Ziyatdinova G., Zhupanova A., Davletshin R.* Simultaneous determination of ferulic acid and vanillin in vanilla extracts using voltammetric sensor based on electropolymerized bromocresol purple // *Sensors.* 2022. V. 22. № 1. Article 288. <https://doi.org/10.3390/s22010288>
96. *Forzato C., Vida V., Berti F.* Biosensors and sensing systems for rapid analysis of phenolic compounds from plants: a comprehensive review // *Biosensors.* 2020. V. 10. № 9. Article 105. <https://doi.org/10.3390/bios10090105>
97. *Sousa C.S., Lima K.C.M.S., Botelho C.N., Pereira N.M., Fernandes R.N., Silva G.G., Damos F.S., Luz R.C.S.* Photoelectrochemical sensor for determination of naringin at low oxidation potential using a modified FTO electrode with cadmium sulfide and titanium dioxide sensitized with chloroporphyrin IX iron(III) // *J. Solid State Electrochem.* 2020. V. 24. № 8. P. 1715. <https://doi.org/10.1007/s10008-020-04568-4>

УДК 543.068.8:543.422:543.426:543.062:677.016.41

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СМАРТФОНА В ХИМИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ

© 2023 г. З. А. Ч. Шаока^а, Д. С. Большаков^б, В. Г. Амелин^{а, *}

^аВладимирский государственный университет
имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых
ул. Горького, 87, Владимир, 600000 Россия

^бЦентр гигиены и эпидемиологии во Владимирской области
ул. Токарева, 5, Владимир, 600005 Россия

*E-mail: amelinvg@mail.ru

Поступила в редакцию 03.09.2022 г.

После доработки 23.09.2022 г.

Принята к публикации 26.09.2022 г.

Представлен обзор современного состояния и перспектив развития метода цифровой цветометрии при использовании смартфона в качестве цветорегистрирующего устройства. Систематизированы практические приложения методологии экспресс-анализа в рамках контроля объектов окружающей среды, биологических жидкостей, пищевых продуктов, лекарственных препаратов и некоторых специфических объектов. Рассмотрено многообразие подходов, которые являются основой для формирования аналитического сигнала в цифровой цветометрии. Отмечены возможности (достоинства и недостатки) смартфона, оснащенного различными программными продуктами, как универсального, мобильного, экспрессного и чувствительного инструмента в анализе объектов различного происхождения.

Ключевые слова: смартфон, химический анализ, цифровая цветометрия, методология экспресс-анализа, тест-устройство.

DOI: 10.31857/S0044450223030131, **EDN:** PUGVQM

На протяжении нескольких десятилетий переломные инструментальные методы, такие как газовая и жидкостная хроматография, капиллярный электрофорез и масс-спектрометрия, были основными инструментами для обнаружения и оценки содержания веществ в образцах биологического происхождения, объектах окружающей среды, продуктах питания и напитках. Основные преимущества этих методов можно свести к высокой специфичности и низким пределам обнаружения. Однако соответствующие инструменты очень дороги, измерения требуют значительных затрат времени, узкоспециализированного лабораторного оборудования и обученного высококвалифицированного персонала. Внедрение в практику рутинного анализа (в том числе внелабораторного, полевого) гораздо более простых устройств и подходов обнаружения и определения представляет большой научный интерес [1].

Распространение цифровой цветометрии в многочисленных научных работах последних лет является следствием объективных достоинств данного метода [2–4]. В отличие от классических методологий колориметрического, фотометрического и люминесцентного анализа, цветометрический подход обеспечивает возможность исследова-

ния окрашенных и флуоресцирующих растворов, сорбентов, осадков и индикаторных бумаг в рамках одного аппаратного решения. Для увеличения чувствительности и достоверности проводимых измерений в распоряжении химиков-исследователей имеются разного рода возможности: вариативность цветометрических систем, различные методы математической и статистической обработки массива данных, многообразие приемов формирования аналитического сигнала.

Популяризации метода способствует создание портативных и переносных цифровых устройств, среди которых главным образом следует выделить смартфон [1, 5]. Их немаловажным достоинством является высокая скорость передачи полученной информации практически в любую точку планеты. Увеличение разрешающей способности цифровых камер повышает локальность цветометрического анализа, открывая перспективы исследования малых образцов и включений (например, осадков малого объема) [2].

Смартфон — это явление современной жизни, использование которого становится все более распространенным. Его возможности с каждым днем быстро развиваются. Следует выделить не-

сколько особенностей, вследствие которых смартфон стремительно завоевывает статус аналитического инструмента для решения задач идентификации и оценки содержания соединений различной природы. Помимо доступности, мобильности, простоты в применении, данное средство легко укомплектовать интуитивно понятными приложениями, способными проводить регистрацию оптического сигнала (колориметрия, флуоресценция, хемилюминесценция, биолюминесценция, фотолюминесценция, пикселизация), электрохимического сигнала, считывание штрих-кодов, хеометрические расчеты и визуализацию с помощью флуоресцентной микроскопии [1].

Камера является основным аналитическим инструментом смартфона. Она способна снимать цифровое изображение и выполнять дальнейшую обработку с помощью различных приложений для смартфонов. Обнаружение и количественная оценка возможны за счет измерения характеристик цифрового изображения, зависящих от концентрации, таких как цвет, люминесценция, количество пикселей, отраженный или рассеянный свет, показатель преломления.

В данной работе проведен обзор научных работ, в основе которых лежит использование смартфона в качестве аналитического инструмента для контроля объектов различного происхождения цветометрическим методом.

ЦВЕТОМЕТРИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ, УСТРОЙСТВА И ПРИСПОСОБЛЕНИЯ ДЛЯ ХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СМАРТФОНА

Расширение возможностей и перспективы развития цветометрического метода при использовании смартфона как современного и портативного инструмента для мониторинговых исследований в различных областях производственного комплекса обусловлены не только многообразием цветометрических систем и доступных программных продуктов, но и значительным спектром устройств и приспособлений, которые в настоящее время разработаны для решения конкретных нетривиальных задач.

В ряде научных обзоров [2–4] подробно рассмотрены основные цветометрические системы, применяемые в химической цветометрии на основе бытовых, офисных и персональных цветорегистрирующих устройств. Наибольшей популярностью в химическом анализе с использованием смартфона для фиксации цветометрических характеристик получили такие системы, как RGB, CIE (1976) L^*a^*b , HSL, CMYK, YCbCr, CIE 1931 (XYZ), HSV (HSB), которым можно дать следующую общую характеристику:

– **RGB** (от англ. *red, green, blue*) – аддитивная цветовая модель, описывающая способ кодирования цвета для цветовоспроизведения с помощью трех цветов, которые принято называть основными. Выбор основных цветов обусловлен особенностями физиологии восприятия цвета сетчаткой человеческого глаза. Система RGB на практике является наиболее распространенной цветовой моделью для компьютерных изображений и смартфона. В 24-битной версии этой модели возможны 256 значений для каждого из трех основных цветов, что дает производные комбинации в диапазоне 16777216 цветовых решений.

– **HSL, HLS или HSI** (от англ. *hue, saturation, lightness (intensity)*) – цветовая модель, в которой цветовыми координатами являются тон, насыщенность и светлота.

– **CIE 1931 (XYZ)** – эталонная цветовая модель, заданная в строгом математическом смысле Международной комиссией по освещению в 1931 г. Модель CIE (1931) XYZ является мастер-моделью практически всех остальных цветовых моделей, используемых в технических областях.

– **CIE 1976 $L^*a^*b^*$ (CIELAB)** представляет собой цветовое пространство, особенно используемое для характеристики цветов поверхности. Цвета характеризуют три размера: яркость L^* определяется яркостью поверхности; два параметра a^* и b^* выражают отклонение цвета от цвета серой поверхности той же яркости. Наличие серой неокрашенной ахроматической поверхности подразумевает явное указание состава света, который освещает окрашенную поверхность. Цветовое пространство CIELAB определяется из пространства CIE XYZ. По сравнению с последним оно имеет то преимущество, что распределение цветов больше соответствует восприятию цветовых различий зрительной системой человека.

– **HSV** (от англ. *hue, saturation, value*) или **HSB** (от англ. *hue, saturation, brightness*) – цветовая модель, в которой координатами цвета являются: *Hue* – цветовой тон, (например, красный, зеленый или сине-голубой). Варьируется в пределах 0–360°, однако иногда приводится к диапазону 0–100 или 0–1. *Saturation* – насыщенность; варьируется в пределах 0–100 или 0–1. Чем больше этот параметр, тем “чище” цвет, поэтому этот параметр иногда называют чистотой цвета. А чем ближе этот параметр к нулю, тем ближе цвет к нейтральному серому. *Value* (значение цвета) или *Brightness* – яркость; также задается в пределах 0–100 или 0–1. Модель была создана Элви Рэем Смитом в середине 1970-х. Она является нелинейным преобразованием модели RGB.

– **CMYK** (от англ. *cyan, magenta, yellow, key* или *black*), четырехцветная автотипия – субтрактивная схема формирования цвета, используемая,

прежде всего, в полиграфии для стандартной триадной печати. Она использует голубой, пурпурный и желтый цвета в роли основных, а также черный цвет.

– **YCbCr (Y'CbCr)** – семейство цветовых пространств, которые используются для передачи цветных изображений в компонентном видео и цифровой фотографии. Y' – компонента яркости, Cb и Cr являются синей и красной цветоразностными компонентами. Y' отличается от Y, которой обозначают яркость без предсказания. Это означает, что для Y' интенсивность света кодируется нелинейно с помощью гамма-коррекции.

Устройства и приспособления для химического анализа с использованием смартфона. Эволюция данного направления как неотъемлемой составляющей цифровой цветометрии направлена на решение ряда задач: уменьшение пределов обнаружения и определение разрабатываемых приемов; повышение достоверности идентификации химического соединения или группы веществ; реализация многокомпонентного анализа в рамках единичного исследования (в полевых условиях или в условиях ограниченного объема пробы); внедрение чувствительных способов формирования аналитического сигнала (флуоресценция, хемилюминесценция); стандартизация (обеспечение воспроизводимости) условий проведения исследований; миниатюризация; увеличение мобильности и экологичности.

Значительный прорыв в области совершенствования микроустройств и приспособлений для смартфона в рамках методологии экспресс-анализа достигнут за счет активного внедрения 3D-принтеров. Применение современных технологий 3D печати позволяет изготавливать устройства практически любой конфигурации, обусловленной конкретными целями и задачами исследователя. Примечательна возможность создания платформ как обязательной и неотъемлемой части единой колориметрической системы, непосредственно соединенной со смартфоном. Для стандартизации расстояния между объективом камеры и кюветой, используемой для регистрации аналитического сигнала, при цветометрическом определении сульфат-ионов и хинина представлена принципиальная схема впервые разработанного устройства [6]. Конструкция платформы полностью исключает влияние факторов внешней среды на результаты анализа природной воды и тонируемых напитков.

Помимо послойной печати узкоспециализированных микроустройств, требующих значительных манипуляций и технических решений для их должного функционирования, предложены варианты печати на подложке, чаще всего на бумаге (в том числе офисной), для производства готового продукта [7–9]. Методом восковой пе-

чати [7, 9] изготавливают микропланшеты для одновременного анализа значительного количества проб при регистрации цифрового изображения. В работе [8] используют одноразовые платформы из прозрачной пленки с нанесенными угольными электродами методом трафаретной печати для электрохимического непрямого обнаружения бактерий вида *Escherichia coli* и *Enterococcus*.

Особый интерес представляет внедрение в практику цветометрических исследований готовых приспособлений коммерческого производства. В данном случае это позволяет снизить себестоимость единичного анализа за счет уменьшения затрат на приобретение и изготовление комплектующих материалов. Среди приспособлений подобного рода следует выделить полистироловый микропланшет на 96 лунок [10, 11], стеклянные кюветы с длиной оптического пути 10 мм [12, 13], фарфоровый планшет на 6 [14], 9 [15] и 12 лунок [16], микропробирки типа “Эппендорф” [17, 18], пробирки типа “Фалькон” [19, 20].

Для стандартизации условий регистрации цветометрических характеристик посредством смартфона предложены камеры (боксы) изготовленные из различных материалов [21–41]. Приведены примеры использования (пено)полистирола [22, 30, 32, 36], плексигласа [26], древесноволокнистой плиты средней плотности (МДФ) [27, 28], фанеры [35], пластика [31, 34], пенопласта [33] и картона [40] при производстве подобных камер, зачастую обшитых с внутренней стороны черным или белым материалом. Для контроля освещенности боксы в ряде работ [31, 32, 34, 36–41] снабжены светодиодными лампами (лентами).

Рассматривая смартфон как цветорегистрирующее устройство, необходимо отметить, что его статус универсального и мобильного инструмента при решении задач в различных областях аналитической химии обусловлен разработкой доступных программных продуктов, среди которых можно выделить *RGBer*, *ColorGrab*, *ColorMeter*, *GIMP* и другие. Мобильные приложения, как узкоспециализированные, так и универсальные графические редакторы, являются неотъемлемой и обязательной составляющей единого цветометрического подхода. С целью удобства регистрации аналитического сигнала и последующей интерпретации полученных данных авторы исследований работ [22, 23, 26, 42–56] предлагают свои программные продукты, совместимые с операционной системой *Android*.

Развитие цифровой цветометрии на базе персональной техники послужило толчком для совершенствования программных средств. На примере приложения для смартфона *PhotoMetrix* [57] рассмотрены этапы разработки новых, более актуальных версий, возможности одномерного и многомерного анализа, включая хемометриче-

скую обработку данных *in situ*. Разработанное в 2015 г. приложение использовалось для обработки готовых цифровых изображений, полученных камерой смартфона. Первоначальная версия обеспечивала одномерный (калибровку системы) и многомерный анализ при реализации метода главных компонент. Вторая версия программы (*PhotoMetrix PRO*[®]) включала два инструмента в многомерном режиме: иерархический кластерный анализ и частичный метод наименьших квадратов. Третья версия (*PhotoMetrix UVC*[®]) адаптирована для использования с внешней камерой при получении изображений. Особенность программного продукта заключается в декомпозиции изображения средствами нескольких цветиметрических систем (RGB, HSV, HSL). Подобная мультифункциональность удобна с практической точки зрения при выборе оптимальных условий идентификации и определения конкретных химических соединений (или их групп) в анализируемом объекте. Обзор [57] в полной мере отражает общую тенденцию последних лет — модернизацию программных продуктов для мобильных устройств, обеспечение полной работоспособности цветиметрического подхода *in situ*, привлечение хеометрических приемов для повышения достоверности конечных результатов и выводов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРИЛОЖЕНИЯ МЕТОДА ЦИФРОВОЙ ЦВЕТОМЕТРИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СМАРТФОНА

Несмотря на простоту аппаратного оформления, применение доступных и популярных расходных материалов цифровая цветиметрия с использованием смартфона является конкурентоспособным инструментом для научных, рутинных, полевых, мониторинговых и клинических исследований. Специфичность и эффективность разработанных решений во многом обусловлена уникальной комбинацией механизма формирования аналитического сигнала, изготовленного датчика для смартфона, выбранной цветиметрической системы и программного продукта, способа обработки и оценки полученных первоначальных данных, включая статистические и хеометрические методы.

Анализ объектов окружающей среды. В период активного развития и функционирования промышленного комплекса антропогенное воздействие на конкретные объекты окружающей среды имеет значительные масштабы, поэтому априори актуальной является задача разработки простых, быстрых и экономически выгодных средств оценки данного воздействия.

Анализ данных табл. 1 позволяет сделать вывод о значительном многообразии принципов, лежащих в основе работы аналитических устройств, которые

предназначены для идентификации и оценки содержания контаминантов различной природы в объектах окружающей среды.

Среди широкого спектра аналитических задач, решаемых при помощи метода цветиметрии, традиционно наиболее распространенной является определение ионов металлов [4]. Высокая значимость этого направления сохраняется и в настоящее время, что нашло отражение в ряде научных публикаций [12, 28, 42, 43, 58, 59, 61–64]. В силу специфики определяемой группы соединений их переводят в окрашенную форму за счет проведения хромогенных реакций на бумажных носителях [42, 58, 59, 61], в растворе [12] или в органической фазе в присутствии ПАВ [28]. Совершенствование материально-технической базы и появление новых реагентов (или расширение области их применения) позволяет использовать для определения ионов металлов в сочетании с цифровыми цветоизмерительными технологиями такие аналитические эффекты, как эмиссию пламени [64], усиление флуоресценции комплексов с редкоземельными металлами [60], колориметрию при агрегации (плазмонный колориметрический анализ) или распаде наночастиц благородных металлов в присутствии аналита [43, 62, 63].

Предложена двухслойная бумажная микрофлюидная система (**БМФС**) в качестве колориметрического анализатора на основе смартфона совместно с программным продуктом *CAнал* для чувствительного и селективного определения ртути(II) в пробах воды [62]. Устройство специальной конструкции изготовлено методом струйной печати с использованием димера алкилкетона, легированного немодифицированными наночастицами серебра в зоне обнаружения аналита. Аналитическим сигналом является интенсивность серого в синем цветовом канале ($\lg(G_B - G_{B_0})$), обусловленная распадом наночастиц серебра при воздействии ртути(II) на БМФС. В оптимизированных условиях разработанный подход показал высокую чувствительность, низкий предел обнаружения (0.003 мг/л) при малом объеме пробы (дважды по 2 мкл) и коротком времени анализа. Диапазон линейности составил 0.01–10 мг/л. Кроме того, практическая реализация представленного подхода на различных пробах продемонстрировала приемлемые характеристики, которые согласуются с данными традиционного метода атомно-абсорбционной спектрометрии холодного пара. Данный способ позволяет проводить быстрое, простое, удобное (мгновенный отчет о концентрации ртути(II) на дисплее смартфона), чувствительное, селективное определение следовых количеств ртути(II) в пробах воды на месте отбора с высокой производительностью (48 проб/ч при $n = 3$).

Таблица 1. Использование смартфона в анализе объектов окружающей среды

Аналит	Цветометрическая система	Принцип анализа	Устройство/приспособление	Приложение (программное обеспечение)	Аналитический параметр	ДОС	$c_{\min}$	Объект анализа	Литература
Fe(II) Ni(II) Cr(VI) Cu(II) Al(III) Zn(II)	RGB	Колориметрия хромогенных реакций на бумажном носителе	Двухслойная трехмерная бумажная микрофлюидная система	—*	R + G + B	0.3–18 мг/л 0.4–23 мг/л 0.2–17 мг/л 0.05–24 мг/л 0.1–10 мг/л 0.05–24 мг/л	0.2 мг/л 0.3 мг/л 0.1 мг/л 0.03 мг/л 0.08 мг/л 0.04 мг/л	Природная вода	[58]
Zn(II) Cr(VI) Cu(II) Pb(II) Mn(II)	RGB	Колориметрия хромогенных реакций на бумажном носителе	Аналитическое устройство на бумажной основе	Color Picker	R + G + B	2–6 мг/л 0.1–0.5 мг/л 0.3–8 мг/л 0.08–0.6 мг/л 0.2–1 мг/л	0.63 мг/л 0.07 мг/л 0.17 мг/л 0.03 мг/л 0.11 мг/л	Сточная вода	[59]
Co(II) Cu(II) Fe(III) Mn(II) Cr(VI) Ni(II)	RGB	Колориметрия хромогенных реакций на бумажном носителе	Бумажная микрофлюидная система (чип), беспилотный летательный аппарат, пробоотборник	ПО для iOS, созданное на базе Xcode 8.0 и языка программирования Swift 3.0	R + G + B	8–81 нг 45–500 нг 200–2000 нг 10–100 нг 150–3000 нг 80–800 нг	8 нг 45 нг 190 нг 10.08 нг 150 нг 80 нг	Взвешенные твердые частицы в воздухе	[42]
Pb(II)	RGB	Усиление флуоресценции комплекса Ir(III) с одноцепочечной ДНК в конформации G-квадруплекса	Бумажная микрофлюидная система с режимом фиксации (приостановки) капель	—	R	10–100 нМ	—	Вода	[60]
Cs(I)	RGB	Колориметрия хромогенной реакции с хризоидином G на бумажном носителе	Аналитическое устройство на бумажной основе (многофункциональный датчик)	ImageJ	R + G + B	100–50000 мкг/л	100 мкг/л	Вода	[61]
Hg(II)	RGB	Плазмонный колориметрический анализ: колориметрия при агрегации наночастиц Au в присутствии ионов Hg(II)	Платформа на смартфон (оптико-механическое считывающее устройство)	ПО для Android	G/R	0–2000 мкг/л	3.5 мкг/л	Вода	[43]

Таблица 1. Продолжение

Аналит	Цветометрическая система	Принцип анализа	Устройство/приспособление	Приложение (программное обеспечение)	Аналитический параметр	ДОС	$c_{\min}$	Объект анализа	Литература
Hg(II)	RGB	Колориметрия при распаде наночастиц Ag в присутствии ионов Hg(II)	Двухслойная бумажная микрофлюидная система	CAAnal	$\lg(G_B - G_{Bo})$	0.01–10 мг/л	3 мкг/л	Вода	[62]
Hg(II)	RGB	Колориметрия при распаде комплекса наночастиц Au с молекулами ДНК	Одноэтапный конкурентный биосенсор бокового (латерального) потока	Color, Color Curous, Its Colors	R	4–2048 нМ	4 нМ	Водопроводная вода	[63]
K	HSV	Колориметрия мембраны из ПВХ с дибензо-18-краун-6-эфиром в качестве ионофора, тетрагидрофенилборатом калия и нильским синим в качестве хромоионофора	Колориметрический сенсор, световая палатка для фотостудии	ПО на базе платформ JavaME, Matlab	H	$3.1 \times 10^{-5} - 0.1$ М	3.1×10^{-5} М	Вода	[44]
Na	RGB	Колориметрия пламени (эмиссия)	—	—	V (векторная норма)	20–160 мг/л	6 мг/л	Кокосовая и морская воды	[64]
Cl ₂	RGB	Колориметрия реакции с реактивом KI—крахмал	Эталонная сцена (фон), микрофлакон (виала)	—	CR	0.3–1.0 мг/л	0.01 мг/л	Вода	[21]
PO ₄ ³⁻	RGB	Продукт восстановления фосфорномолибденовой кислоты	Бокс для колориметрического анализа из пенополистирола (8 × 10 × 18 см)	Phosphorus Analysis на языке программирования Java для платформы Android	R + G + B	0.0–1.0 мг/л	0.01 мг/л	Почва	[22]
F ⁻	RGB	Колориметрия обесцвечивания растворов комплекса циркония с ксиленоловым оранжевым	Тестовая камера (стандартный контейнер с фиксированной геометрией)	Akvo Caddisfly на языке программирования Java для платформы Android	G+B	0–2 мг/л	—	Вода	[23]

Таблица 1. Продолжение

Аналит	Цветометрическая система	Принцип анализа	Устройство/приспособление	Приложение (программное обеспечение)	Аналитический параметр	ДОС	$c_{\min}$	Объект анализа	Литература
NO_3^-	RGB	Колориметрия продукта реакции нитритов (после восстановления нитратов цинком) с реактивом Грисса	Микропланшет на 96 лунок	ImageJ	G	0,10–2,5 мг/л	0,04 мг/л	Поверхностные воды	[11]
NO_2^-	RGB, CIE 1976 $L^*a^*b^*$	Колориметрия окрашенных растворов аналитов	Платформа – портативная фотостудия ($40 \times 40 \times 25$ см)	ChemTrainerSIR	$R + G + B, \Delta E^*$	0–0,5 мг/л	–	Вода	[24]
PO_4^{3-}						0–0,3 мг/л			
Cr(VI)						0–1,0 мг/л			
Фенол						0–0,5 мг/л			
pH	RGB, CIE 1931	Колориметрия индикаторных бумаг	–	–	x, y	1–12	–	Вода	[65]
АПАВ	RGB	Колориметрия ионных ассоциатов аналитов с метиленовым синим после ДЖЖМЭ	Модуль для получения цифровых изображений в контролируемых условиях	Color Grab 3.3.3	A_T	10–70 мкг/л	2,6 мкг/л	Природная вода	[25]
Хлор активный		Колориметрия аналитов с <i>N,N</i> -диэтил- <i>n</i> -фенилендиаминном после экстракции “в точке помутнения”				0,1–2 мг/л	70 мкг/л		
Формальдегид	RGB	Колориметрия продукта реакции аналита с ацетилацетоном при жидкостной микроэкстракции в каплю	Бокс (коробка) для колориметрического анализа из планшета (12 × 8 × 9 см)	Локальное приложение для Android	1/B	0,3–10 мг/л	0,1 мг/л	Сточная вода, текстиль	[26]

Таблица 1. Продолжение

Аналит	Цветометрическая система	Принцип анализа	Устройство/приспособление	Приложение (программное обеспечение)	Аналитический параметр	ДОС	$c_{\min}$	Объект анализа	Литература
Взрывчатые вещества: трипероксид триацетона, гексаметилен трипероксид диамин, 4-амино-2-нитрофенол, нитробензол, пикриновая кислота	RGB	Колориметрия продуктов реакции аналитов с иодидом калия, креатинином и анилином	Колориметрический датчик (сенсор) на бумажной основе, закрытая камера (бокс)	Разработанное авторами ПО, Statistica 12.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA)	R + G + B	–	0.2 мкг 1.0 мкг 0.4 мкг 0.1 мг 2.3 мкг	Почва	[45]
Хлорпирифос	YCbCr	Колориметрия ингибирования аналитом гидролиза <i>n</i> -нитро-фенолпальмитата липазой до <i>n</i> -нитро-фенола	Устройство на бумажной основе	MATLAB	Cb	0.1–1.0 мг/л	0.065 мг/л	Вода	[66]
Малатион Параоксон	RGB	Колориметрия ингибирования аналитами гидролиза ацетилхолинэстеразой до индиго	Устройство на бумажной основе	Разработанное авторами ПО	R + G + B	10^{-8} – 10^{-6} М	–	Вода	[46]
Фенол	RGB	Колориметрия экстракта при ультразвуковой ДЖЖМЭ после дериватизации аналита с 4-аминоантипирином в присутствии окислителя	Лабораторный деревянный бокс (ящик) из МДФ (58 × 30 × 30 см)	Color Grab (version 3.6.1, Loomatix®)	A	5–300 мкг/л	1.7 мкг/л	Вода	[27]

Таблица 1. Окончание

Аналит	Цветометрическая система	Принцип анализа	Устройство/приспособление	Приложение (программное обеспечение)	Аналитический параметр	ДОС	$c_{\min}$	Объект анализа	Литература
Cr(III) Cr(VI)	RGB	Колориметрия экстракта при ЖЖМЭ с помощью воздуха (AALLME) после образования комплекса аналита с 1,5-дифенилкарбазидом	Бокс колориметрического анализатора из МДФ ($20 \times 20 \times 15$ см)	Color Grab (version 3.6.1 (с) 2017 LOOMATIX Ltd)	S_A (G)	3–350 мкг/л	0.9 мкг/л 3 мкг/л	Вода	[28]
Cr(VI)	CIE- $L^*a^*b^*$	Колориметрия комплекса аналита с 1,5-дифенилкарбазидом	Стеклокюветы с длиной оптического пути 10 мм, самодельная платформа для получения изображений	Photoshop CC 2017, ImageJ 1.80	$\Delta E_{L^*a^*b^*}$	0–0.8 мг/л	0.01 (0.06) мкг/мл	Природные и сточные воды	[12]
Тетрациклины (6 веществ)	RGB	Цветометрия сенсibilизированной аналитами флуоресценции Eu(III) на его гидроксиде	Цветометрия комплекса на осадке в пробирке типа “Эппендорф”	RGBer	A_T	(0.005–0.08)–(0.1–1) мкг/мл	0.001–0.004 мкг/мл	Сточные и природные воды	[17]
Хинолоны (17 веществ)	RGB	Цветометрия флуоресценции аналитов на силикагеле после статической сорбции	Цветометрия сорбата на силикагеле в центрифужной пробирке типа Фалькон	RGBer	A_T	(0.002–0.01)–0.2 мкг/мл	0.0007–0.004 мкг/мл	Природные воды	[19]
Фторхинолоны (13 веществ)	RGB	Цветометрия флуоресценции аналитов на силикагеле после статической сорбции	Цветометрия сорбата на силикагеле в центрифужной пробирке типа Фалькон	RGBer	A_T	0.002–0.2 мкг/мл	–	Природные воды	[20]
Тетрациклины (6 веществ)	RGB	Цветометрия сенсibilизированной аналитами флуоресценции Eu(III) на его гидроксиде	Цветометрия комплекса на осадке в пробирке типа “Эппендорф”	RGBer	A_T	0.005–0.1 мкг/мл	–	Природные воды	[18]

* Информация не указана.

Применение привычных колориметрических реакций с образованием окрашенных аналитических форм в рамках анализа объектов окружающей среды нашло отражение при определении неорганических анионов [11, 22–24], фенола [27], активного хлора [21, 25], формальдегида [26] и взрывчатых веществ [45].

В исследовании [26] представлено сочетание жидкостной микроэкстракции в каплю воды (раствора) в свободном пространстве и анализа окрашенной капли с помощью смартфона для определения формальдегида в качестве модельного токсиканта в образцах текстиля и сточных вод. Сконструировано простое устройство (бокс для колориметрического анализа из плексигласа) для обнаружения аналита. Методика основана на одновременной экстракции формальдегида в водную каплю и переводе его в окрашенное соединение реакцией с ацетилацетоном. Мобильный телефон использовали для обнаружения проявленного цвета и анализа изображения. В работе оптимизированы ключевые экспериментальные параметры, влияющие на чувствительность, включая конструкцию устройства, состав капель, ионную силу раствора, температуру и время экстракции. Диапазон определяемых содержаний (ДОС) составил 0.3–10 мг/л с пределом обнаружения 0.1 мг/л. Подход успешно применен для определения свободного формальдегида в образцах текстиля и сточных вод при степени извлечения 80–97% и 91–99% соответственно.

Предложен новый подход к фотометрическим измерениям в сочетании с процедурой жидкостной экстракции [25]. Подход позволяет избежать недостатков спектрофотометрических измерений в УФ- и видимой областях спектра, вызванных ограниченным объемом экстракта образца, таких как уменьшение оптического пути или необходимость разбавления. Кроме того, исключается необходимость разделения фаз и, следовательно, потеря экстракта перед измерениями. Возможность применения данного приема продемонстрирована с помощью дисперсионной жидкостной микроэкстракции (ДЖЖМЭ) для определения анионных поверхностно-активных веществ (АПАВ) в пресных водах с метиленовым синим и экстракции в точке помутнения для определения свободного хлора в водопроводной воде с *N,N*-диэтил-*n*-фенилендиамином. В качестве аналитического сигнала принимали значения каналов RGB. При определении АПАВ методом ДЖЖМЭ линейный отклик достигнут в диапазоне 10–70 мкг/л с пределом обнаружения 2.6 мкг/л. Наблюдали высокие значения степени извлечения (87.8–99.7%) и корреляцию результатов с эталонным методом. Определение свободного Cl_2 характеризовалось линейным откликом сигнала в диапазоне 0.1–2.0 мг/л с пределом обнаружения 70 мкг/л.

Колориметрию ингибирования аналитами гидролиза субстрата под действием фермента, сопровождающуюся образованием окрашенного продукта реакции, применяли для определения хлорпирифоса [66], малатиона и параоксона [46] в воде. Авторами подобных приемов разработано устройство на бумажной основе, предназначенное для использования в полевых условиях. При оценке содержания хлорпирифоса изучены различные модели цветового пространства (RGB, HSV и YCbCr), в результате чего для последующих расчетов выбрана координата S_b в силу более высокой линейности ($R^2 = 0.988$) по отношению к концентрации пестицида [66]. В работе [46] представлено приложение для обработки изображений на месте, которое использует новый алгоритм для количественной оценки интенсивности цвета и связывания его с концентрацией загрязняющих веществ. Данное приложение для мобильного телефона разработано на основе алгоритма подсчета пикселей, который работает с меньшей предвзятостью и субъективностью пользователя, чем обычно используемое лабораторное программное обеспечение *ImageJ*.

В рамках данного раздела обособленное место занимает цикл работ [17–20], посвященный расширению возможностей цветометрического подхода для определения антибактериальных препаратов различных классов в природных и сточных водах по собственной флуоресценции аналитов на силикагеле после статической сорбции [19, 20] и сенсibilизированной аналитами флуоресценции Eu(III) на его гидроксиде [17, 18]. Отличительной особенностью подобных методик является создание колориметрических датчиков на основе привычных лабораторных комплектующих материалов, отличающихся доступностью и простотой в обращении и не влияющих на мобильность системы. Использование чувствительных техник формирования аналитического сигнала в сочетании с высокой локальностью проводимых измерений (сорбенты и осадки малого объема) обеспечивает пределы обнаружения на уровне 0.002–0.08 мкг/мл.

Образцы биологического происхождения. Новой вехой в истории развития данного исследовательского направления является создание датчиков и устройств с цветовой фиксацией результата химической или ферментативной реакции. Регистрация и интерпретация полученной информации проводится при использовании персонального цветорегистрирующего устройства – смартфона (табл. 2).

Среди разработанных различными научными группами принципиальных схем для анализа образцов биологического происхождения (биологических жидкостей) можно выделить приемы, направленные на оценку функционального со-

Таблица 2. Использование смартфона в анализе образцов биологического происхождения

Аналит	Цветометрическая система	Принцип анализа	Устройство/приспособление	Приложение (программное обеспечение)	Аналитический параметр	ДОС	$c_{\min}$	Объект анализа	Литература
Алпразолам (бензодиазепины)	RGB	Колориметрия при агрегации наночастиц Ag стабилизированных цитрат-ионами в присутствии аналита	Бумажная микрофлюидная система	Color Helper	R	10–180 нг/мл	10 нг/мл	Кровь, стекловидное тело	[67]
Допамин (дофамин)	RGB	Колориметрия при восстановлении хлорида железа под действием аналита до Fe^{2+} с последующей реакцией с фенолтропином	Бумажная микрофлюидная система	Adobe Photoshop CS2	R + G + B	0.527–4.75 мкМ	0.37 мкМ	Сыворотка плазма крови	[68]
Каптоприл	RGB	Колориметрия комплекса аналита с хлоридом палладия(II)	Фарфоровый планшет на 9 лунок	ImageJ	B	3.12×10^{-5} – 1.21×10^{-3} М	8.06×10^{-6} М	Синтетическая моча	[15]
Витамин Д	HSB	Колориметрия при иммуноанализе с наночастицами золота	Поверхностная колориметрическая реакция (тест-полоска)	—*	$\Delta H = B_{\det} - B_{ref}$	15–110 нМ	15 нМ	Кровь	[69]
Холестерин	RGB, HSL	Колориметрия ферментативной реакции аналита (до образования хинониминового красителя)	Тест-полоска с сухим реагентом	ПО для платформы iPhone iOS	S (1/S)	120–400 мг/дл	—	Кровь	[47]
Малоновый диальдегид	RGB	Колориметрия агарозного геля после экстракции и дериватизации аналита 2-тиобарбитуровой кислотой	Сорбционная экстракция с вращающимся диском	Color Grab	G	5.5–1000 нг/мл 63–12500 нг/г	1.5 нг/мл 12.5 нг/г	Биологические жидкости, пищевые продукты (молоко, масло)	[70]

Таблица 2. Продолжение

Аналит	Цветометрическая система	Принцип анализа	Устройство/приспособление	Приложение (программное обеспечение)	Аналитический параметр	ДОС	$c_{\min}$	Объект анализа	Литература
Хлориды	—	Колориметрия тушения флуоресценции продукта взаимодействия и <i>L</i> -цистеина в присутствии аналита	Флуоресцентный сенсор с кюветой для раствора	—	I_0/I (тушение флуоресценции)	0.8–200 мМ	—	Пот	[71]
<i>L</i> -Лактат	RGB, HSV	Рефлектометрия ферментативной реакции аналита	Биосенсор на функционализированной бумажной подложке	ImageJ (v.1.46)	$H (1/H)$	0.6–10 мМ	0.1 мМ (0.9 мг/дл)	Ротовая жидкость	[72]
Глюкоза	RGB	Рефлектометрия (колориметрия) ферментативной реакции аналита на подложке с оксидом графена	Бумажная микрофлюидная система	ПО для iOS, созданное на базе Xcode 8.0 и языка программирования Swift 3.0; MATLAB	ΔP	0–1 мМ	0.02 мМ	Ротовая жидкость	[48]
Глюкоза, белок, рН, красные кровяные тельца (эритроциты)	RGB	Колориметрия реагентов полос на бумажной основе	Микрофлюидная система на основе бумаги и пластика	UrineAnalysis для Android	H	0–300 мг/дл 0–2000 мг/дл 5.25–7.5 0–250 клеток/л	—	Моча	[73]
Мочевая кислота, глюкоза	RGB	Колориметрия ферментативных хромогенных реакций на бумажном носителе	Аналитическое устройство на бумажной основе	ImageJ (1.48v)	ΔGray	0.01–1.0 мМ 0.02–4.0 мМ	0.003 мМ 0.014 мМ	Сыворотка крови	[74]

Таблица 2. Окончание

Аналит	Цветометрическая система	Принцип анализа	Устройство/приспособление	Приложение (программное обеспечение)	Аналитический параметр	ДОС	$C_{\min}$	Объект анализа	Литература
Fe^{+3}	—	Колориметрия обесцвечивания наночастиц Ag в присутствии ЦТАБ под действием аналита	Аналитическое устройство на бумажной основе	ImageJ	ΔS	50–900 мкг/л	20 мкг/л	Вода и плазма крови	[75]
Глюкоза	RGB	Колориметрия мультиферментных каскадных реакций	Микрофлюидная система на основе ткани и бумаги	Color Name	V_R	50–600 мкМ	13.49 мкМ	Пот	[76]
Сывороточный альбумин, трансферрин	—	Колориметрия реакции разрушения комплекса нанокуркумин- VO^{2+} при действии аналитов	Оптический нанозонд	MATLAB (version R2010a)	ΔA	50–200 нМ 20–140 нМ	11 нМ 8 нМ	Сыворотка и моча	[77]
Этанол	RGB	Колориметрия бумажной тест-полоски с иммобилизованным <i>p</i> -нитрофенолом	Датчик на бумажной основе	ImageJ	B	0.04–0.1 об. %	0.03 об. %	Слюна	[78]
Cl^- , глюкоза, молочная кислота (лактат-ион), pH	RGB	Колориметрия ферментативных и хромогенных реакций	Мягкое эпидермальное микрофлюидное устройство	—	%RGB	0–625 мМ 0–25.0 мМ 0–100 мМ 5.0–8.5 ед. pH	—	Пот	[79]
pH	RGB	Колориметрия индикаторной полоски	Тест-полоска, состоящая из индикаторной полоски, эталонной полоски и светорассеивателя	Разработанное авторами ПО	H (оттенки)	5.0–9.0 1.0–14.0	—	Пот, слюна	[49]

* Информация не указана.

стояния организма, внутренних органов, а также обмена веществ [47–49, 69–77, 79], и средства, позволяющие определить содержание лекарственных и наркотических веществ [15, 67, 68, 78].

Возможности мониторинга состояния здоровья, обеспечиваемые сбором и количественным химическим анализом пота, могут дополнить или потенциально устранить необходимость в подходах, основанных на спорадической оценке образцов крови. В работе [79] представлена мягкая, гибкая и растяжимая микрофлюидная система, которая может тесно и прочно прикрепляться к поверхности кожи без химического и механического раздражения. Система каналов (капилляров) обеспечивает поток пробы от потовых желез через микрофлюидную сеть и набор резервуаров. Встроенные химические анализаторы (индикаторные зоны) колориметрически реагируют на такие маркеры, как глюкоза, pH, хлорид- и лактат-ионы. Исследования на людях продемонстрировали функциональность этого устройства во время тренировок в контролируемой среде и во время велогонок на длинные дистанции в засушливых условиях на открытом воздухе. Помимо концентрации глюкозы, хлорид-, лактат-ионов и уровня pH, система позволяет рассчитать количественные значения скорости потоотделения и общей потери пота.

Специфика объектов исследования и определяемых компонентов объясняет преобладающее число научных публикаций с упором на хромогенные и ферментативные реакции. Однако их практическая реализация характеризуется внушительным спектром технических решений (табл. 2), направленных на проведение чувствительного определения аналитов в широком диапазоне определяемых содержаний, в том числе с использованием экстракции [70]. Кроме того, для детектирования органических биологически активных веществ (алпразолам, витамин Д) и ионов Fe^{3+} в качестве аналитического реагента предложено использовать наночастицы благородных металлов [67, 69, 75].

Содержание хлорид-ионов в поте является важным диагностическим маркером кистозного фиброза (муковисцидоза), но внедрение систем диагностики на месте затруднено в силу высокой стоимости существующих хлорид-селективных датчиков. Для обеспечения недорогих диагностических решений авторы работы [71] создали платформу, адаптированную под стандартную ювету, в качестве неотъемлемой части хлоридомера на базе смартфона. В качестве аналитического параметра в данной конструкции применяется тушение флуоресценции продукта взаимодействия цитрат-ионов с *L*-цистеином (*SA*-цистеина) в присутствии хлорид-ионов. Представленный сенсор продемонстрировал широкий линей-

ный диапазон определяемых концентраций хлорид-ионов 0.8–200 мМ и время отклика, ограниченное диффузией. Клиническая валидация проводилась с использованием биопроб пота людей с муковисцидозом и без него, что позволило получить необходимое количество статистических данных для надежной диагностики заболевания.

Разработана простая, точная и недорогая аналитическая процедура определения каптоприла с помощью цифрового изображения [15]. Данная стратегия основана на реакции между каптоприлом и хлоридом палладия(II), в результате которой образуется желтый водорастворимый комплекс с максимумом поглощения при длине волны 380 нм. Камера смартфона и предназначенное для управления внутренним освещением портативное устройство объединены при получении цифровых изображений реакционных смесей. Для установления количественной связи между интенсивностью цвета и концентрацией аналита применяли цифровую обработку изображений с применением RGB. При использовании в качестве аналитического параметра значения интенсивности синего канала *B* получена градуировочная зависимость в диапазоне концентраций от 3.12×10^{-5} до 1.21×10^{-3} моль/л. Пределы обнаружения и определения составили 8.06×10^{-6} и 2.69×10^{-5} моль/л соответственно. Степень извлечения в образцах синтетической мочи варьировалась от 97.1 до 102.9%. Результаты сравнивали с эталонным методом. При доверительной вероятности 95% существенных различий не обнаружено. Разработанный подход имеет бюджетные и экологические преимущества, связанные с использованием дешевых и простых в обращении устройств и потреблением очень малых объемов реагента (800 мкл на одно определение). Этот аналитический инструмент может быть полезен для лабораторий с ограниченными финансовыми ресурсами при соблюдении принципов “зеленой” химии.

Анализ пищевых продуктов. В эпоху бурного развития разнообразных способов фальсификации продуктов питания и распространения недоброкачественной продукции на рынке важность совершенствования методологии экспресс-анализа сложно переоценить. Кроме того, потенциальные пути контаминации сырья на различных этапах производства (от получения до хранения) могут оказывать существенное влияние на безопасность и качество готовой продукции [80].

Анализ литературных данных (табл. 3) показал, что цветометрический подход нашел применение для определения неорганических и органических веществ природного и синтетического происхождения в молочной [29, 30, 35–37, 84–87, 92, 96–98, 100], мукомольно-крупяной [95], муч-

ной [93], спиртосодержащей [14, 31–34, 99], соковой [53], мясной [92, 100], масложировой [82] продукции, в морепродуктах [91], овощах и фруктах [16, 81, 100], зерне [52, 54], питьевой воде [6, 8, 37, 51, 53, 87–89, 98, 100] и напитках [6, 83, 94, 99].

Универсальность подхода обусловлена возможностью сочетания привычных в использовании и доступных широкой аудитории смартфонов с простыми тест-устройствами для химического анализа. Спектр контролируемых показателей средствами цветометрии внушительен, что подтверждает его конкурентоспособность по отношению к прочим инструментальным методам. В работах [9, 81] представлена универсальная стратегия кислотно-основного титрования (определение титруемой кислотности) с использованием индикаторов природного происхождения (антоцианов и экстракта кожуры жаботикабы). Колориметрические реакции проводили с использованием полистирольного микропланшета [81] или массива из двенадцати микрозон диаметром 5 мм, напечатанного воском на фильтровальной бумаге [9]. Интенсивность цвета фиксировали с помощью смартфона в режиме реального времени [9] или после получения цифрового изображения [81] с последующим анализом посредством бесплатного приложения *Photometrix*[®] [9]. Кривые титрования соответствуют кривым, полученным с применением традиционного титриметрического метода.

Применение цветометрического метода на базе смартфона обеспечивает обнаружение бактерий вида *Escherichia coli* и *Enterococcus*, индикаторов фекального загрязнения воды и продуктов питания с использованием субстратов, специфичных для ферментов, продуцируемых каждым видом [8]. *E. coli* продуцируют β -галактозидазу и β -глюкозидазу, тогда как *Enterococcus* spp. продуцирует β -глюкозидазу. Наличие субстратов обеспечивает выделение *n*-нитрофенола, *o*-нитрофенола или *n*-аминофенола в качестве продуктов. Установлено, что электрохимическое обнаружение с использованием угольных электродов с графаретной печатью обеспечивает оптимальную производительность на недорогих и одноразовых платформах с прозрачной пленкой. Обнаружение электрохимически активных субстратов (*n*-нитрофенола, *o*-нитрофенола или *n*-аминофенола) осуществляли соответственно на уровне 1.1, 2.8 и 0.5 мкМ. Для обнаружения нитрофенолов разработана колориметрическая система луночных планшетов на бумажной основе из простой картонной коробки и смартфона. Пределы обнаружения *n*-нитрофенола и *o*-нитрофенола составили 81 и 119 мкМ соответственно. Хотя колориметрические принципы детектирования давали более высокие пределы обнаружения, чем электрохимические, оба метода обеспечивали одинаковое время обнаружения бактерий. Низкие кон-

центрации (10^1 КОЕ/мл) патогенных и непатогенных изолятов *E. coli* и (10^0 КОЕ/мл) штаммов *E. faecalis* и *E. faecium* обнаружены в течение 4 и 8 ч после предварительного обогащения. Образцы проростков люцерны и воды из лагуны служили модельными образцами пищевой продукции и воды в рамках апробации описанного подхода. Образцы воды не дали положительных результатов, в то время как образцы проростков дали положительный результат в течение 4 ч после предварительного обогащения. Положительное обнаружение заранее зараженных (2.3×10^2 и 3.1×10^1 КОЕ/мл(г) *E. coli* и *E. faecium* соответственно) образцов проростков и воды дало положительный результат в течение 4 и 12 ч после предварительного обогащения соответственно. Подобные разработки имеют большой научный и практический интерес, поскольку, с одной стороны, позволяют смартфону в сочетании с сопутствующими материалами (платформа, датчик) заменить значительный спектр оборудования с сохранением точности, с другой, — увеличить производительность стационарной или передвижной лаборатории.

Актуальной задачей, требующей инструментального решения, является оценка содержания сложных эфиров в алкогольном напитке из сахарного тростника Кашаса, вкус и аромат которого связаны с наличием данной группы аналитов, обычно выраженным в пересчете на этилацетат. Предложен точечный тест для определения общего количества сложных эфиров посредством анализа цифровых изображений [32]. Способ основан на реакции аналитов с гидроксиламином при образовании соответствующих ионов гидроксамата, дающих фиолетовый комплекс с Fe(III) в кислой среде. Цифровые изображения получены при контролируемом освещении и преобразованы в значения компонентов цвета RGB с помощью приложения *PhotoMetrix*[®] 1.8. Значения канала *B* приняты за аналитический отклик из-за комплементарности цвету продукта реакции. Диапазон линейности составил 100–500 мг/л при коэффициенте вариации ($n = 10$) и пределе обнаружения 1.1% и 30 мг/л (в пересчете на этилацетат) соответственно. Методика характеризуется экологичностью и малым расходом реактивов. Результаты предложенной схемы согласуются с данными, полученными титриметрическим методом при доверительной вероятности 95%.

Объекты различного происхождения. Возможность комплектации смартфона дополнительными универсальными средствами, позволяющими реализовывать специфические химические реакции, способствует применению цифровой цветометрии на базе смартфона в различных областях химического анализа (табл. 4).

Предложены условия для оценки качества косметики и средств личной гигиены [38, 40],

Таблица 3. Использование смартфона в анализе пищевых продуктов

Аналит	Цветометрическая система	Принцип анализа	Устройство/приспособление	Приложение (программное обеспечение)	Аналитический параметр	ДОС	$c_{\min}$	Объект анализа	Литература
H_2O_2	RGB	Колориметрия хромогенного продукта реакции 3,3',5'-тетраметилбензидина с пероксидом водорода, катализированной легированными углеводными точками	Самодельный колориметрический бокс для смартфона	Color Grab для Android	$R (R - R_{\text{blank}})$	3–30 мкМ	0.8 мкМ	Молоко, жидкость для полоскания рта	[29]
Титруемая кислотность (лимонная кислота)	RGB	Колориметрия реакции при использовании антоцианов в качестве индикатора	Микротитрование в полистирольном планшете	ImageJ	V	—*	—	Апельсин, лимон и маракуйя	[81]
Аскорбиновая кислота	RGB	Колориметрия при восстановлении хлорида железа под действием аналита до Fe^{2+} с последующей реакцией с <i>o</i> -фенантролином	Фарфоровая планка с 12 лунками	ImageJ	B	0.59–5.9 мг/л (3.3×10^{-6} – 3.3×10^{-5} М)	0.15 мг/л (8.5×10^{-7} М)	Фрукты	[16]
Полифенолы	—	Колориметрия реакции взаимодействия аналитов с реактивом Фолина–Чокалеу (в пересчете на галловую кислоту)	Микрофлюидный хемосенсор на бумажной основе	ImageJ v.1.46	MGI (общая интенсивность серого)	30–750 мкг/г	30 мкг/г	Оливковое масло	[82]
АПАВ	RGB	Колориметрия ионной пары аналитов с метиленовым синим после осаждения белков и процедуры ДЖЖМЭ хлороформом	Коробка из полистирола ($14 \times 16 \times 10$ см) для вставки пробирок типа “Эппендорф”	Color Grab (Loomatix [®] , version 3.5.2)	R	10–50 мг/л	2.2 мг/л	Молоко	[30]

Таблица 3. Продолжение

Аналит	Цветометрическая система	Принцип анализа	Устройство/приспособление	Приложение (программное обеспечение)	Аналитический параметр	ДОС	$C_{\min}$	Объект анализа	Литература
Кофеин	RGB	Измерение флуоресценции (тушения флуоресценции) комплекса аналита с 8-гидроксипирен-1,3,6-присульфонатом	Миниатюрный флуоресцентный датчик	ImageJ	$R (-\lg(R/R_0))$	100–600 мг/л	30 мг/л	Энергетические напитки, лекарственные препараты	[83]
Триэтиламин, изобутиламин, изопентиламин	RGB	Колориметрия кислотно-основных индикаторов (ализарин, бромфеноловый синий, хлорофеноловый красный, метиловый красный, тимоловый синий) под действием аналитов	Колориметрический прибор на пластинчатой основе	Разработанное авторами ПО	Евклидово расстояние, ED	–	$1 \text{ млн}^{-1} \text{ (ppm)}$	Пищевые продукты	[50]
Щелочная фосфатаза	RGB	Колориметрия каталитической активности аналита по отношению к 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфату (сине-зеленый осадок)	Миниатюрный иммуносенсор на бумажной основе	–	$R (\lg (R_0/R))$	10–1000 U/мл (Ед/мл)	0,87 U/мл (Ед/мл)	Молоко	[84]
Медь	RGB	Колориметрия хелата аналита с купризеном в щелочной среде	Фарфоровый планшет на 6 лунок	ImageJ	B	0,75–5,00 мг/л	0,078 мг/л	Спирт из сахарного тростника	[14]
Тетрациклины, хинолоны	RGB	Колориметрия иммуноферментной реакции в присутствии наночастиц Ag	Иммунологический микрочип	GenePix Pro 3.0	B	0,2–3,2 нг/мл 0,15–3,6 нг/мл	1,51 нг/мл 1,74 нг/мл	Молоко	[85]

Таблица 3. Продолжение

Аналит	Цветометрическая система	Принцип анализа	Устройство/приспособление	Приложение (программное обеспечение)	Аналитический параметр	ДОС	$c_{\min}$	Объект анализа	Литература
Фурфурол	RGB	Колориметрия продукта реакции фурфурола санилином в кислой среде	Пластиковая камера ($20 \times 17.5 \times 12$ см), покрытая матовыми чернильными лентами. Фарфоровый планшет на 9 лунок	ImageJ	G	$1.67 - 10.0$ мг/100 мл	0.34 и 1.15 мг/100 мл	Спирт из сахарного тростника	[31]
Кислотно-основное титрование (на примере уксусной кислоты)	RGB (R, G, B, H, S, V, L, I)	Колориметрия реакции кислотно-основного титрования на бумаге в присутствии экстракта жаботикабы в качестве индикатора	Бумажный микропланшет (микроразоны) на фильтровальной бумаге, изготовленный методом восковой печати	Photometrix®	S	$1 - 12$ ед. pH	—	На примере столового уксуса	[9]
Белки (на примере казеина)	RGB	Колориметрия хромогенной реакции аналитов с микробной протеазой, иммобилизованной на магнитных частицах, с фенольным реактивом Фолина-Чокалтеу	Иммуноферментный анализ	GIMP 2.8.14 (ПО типа GNU), Origin 9.1 (OriginLab, USA)	R, G, B	$0 - 8$ мг/мл	242 мкг/мл	На примере коровьего молока	[86]
H_2O_2	RGB	Колориметрия сенсibilизированной флуоресценции комплексов европия с органическими веществами (металлоорганические карбоксаты) под действием гидроксидионов	Бумажный микрочип	World of Color	B/R	$0.001 - 1$ mM	0.14 мкM	Вода, молоко	[87]

Таблица 3. Продолжение

Аналит	Цветометрическая система	Принцип анализа	Устройство/приспособление	Приложение (программное обеспечение)	Аналитический параметр	ДОС	$c_{\min}$	Объект анализа	Литература
Сложные эфиры (в пересчете на этилацетат)	RGB	Колориметрия продуктов реакции аналитов и гидроксилamina, с образованием комплексов гидроксамат-ионов и Fe(III)	Камера (бокс) из пенополистирола ($190 \times 210 \times 125$ мм), покрытая белой бумагой со светодиодной лентой	PhotoMetrix® 1.8	B, G	100–500 мг/л	30 мг/л	Спирты из сахарного тростника (Кашаса)	[32]
Cu^{2+}	RGB	Колориметрия продукта реакции аналита с пигментом красной свеклы в щелочной среде	Реакция в растворе	Adobe Photoshop, ПО на языке программирования Java для платформы Android	B	4–20 μM	0.84 μM	Питьевая вода	[51]
F^-	RGB	Колориметрия сенсibilизированной флуоресценции комплексов европия и тербия с органическими веществами (металлоорганические карбоксаты) под действием аналитов	Реакция в растворе	–	R/B	0.05–50 мг/л; 0–9.5 ppm (мг/л)	–	Питьевая вода	[88]
Фентоат (пестицид)	RGB	Колориметрия взаимодействия аналита с наночастицами Cu-Ag в присутствии цитрат-ионов	Бумажный сенсор	ImageJ, Gaussian 16.0	R + G + B	50–15000 мкг/л	15 мкг/л	Вода, пищевые продукты	[89]
Краситель красный очаровательный (Allura red)	RGB	Колориметрия образцов продукции	Оптическое сенсорное устройство	MATLAB 7.13, PLS Toolbox 6.5, Image Processing Toolbox 8.0, The N-way Toolbox для Matlab 3.30	Математическая обработка данных через оттенки серого	22.9–78.8 мг/кг	4.2 мг/кг	Леденцы	[90]

Таблица 3. Продолжение

Аналит	Цветометрическая система	Принцип анализа	Устройство/приспособление	Приложение (программное обеспечение)	Аналитический параметр	ДОС	$c_{\min}$	Объект анализа	Литература
Качество игристых вин (Цвет вина)	RGB	Колориметрия вина	Закрытый черный бокс из черного пенопласта, изнутри покрытый черной бархатной бумагой	RGB-ColorMeter: White Märtten 2014, ColorMeter (Version 1.8)	B	–	–	Вино	[33]
Метанол	RGB	Колориметрия при окислении аналита до метанала с последующей реакцией образования фиолетового хромофора при взаимодействии с хромотроповой кислотой	Черная пластиковая камера (20 × 12 × 18 см) со светодиодными лентами. Фарфоровый планшет на 9 лунок	ImageJ	G	5–35 мг/100 мл	1.5 мг/100 мл	Спирт из сахарного тростника	[34]
Афлатоксин В1	–	Колориметрия конкурентной реакции связывания с антителами между аналитом и конъюгатом (коллоидное золото- AFB1 - BSA)	Латеральный иммуноанализ	ПО для Android	Оптическая плотность	5–1000 мкг/кг	5 мкг/кг	Зерно кукурузы и риса	[52]
Окадаевая (акадаиксовая) кислота, сакситоксин	RGB	Колориметрия конкурентной реакции связывания с антителами (при наличии коллоидного золота)	Тест-система для иммуноанализа	iSipr (разработанное авторами ПО)	G	3–20 нг/мл 10–100 нг/мл	2.8 нг/мл 9.8 нг/мл	Морепродукты	[91]
Стрептомицин	RGB	Колориметрия флуоресценции продукта последовательных иммуноферментных реакций аналита с красителем SYBR Green I	Иммуноферментный анализ	Touch Color	G	0.1–100 мкМ	94 нМ	Молоко, мясо курицы	[92]

Таблица 3. Продолжение

Аналит	Цветометрическая система	Принцип анализа	Устройство/приспособление	Приложение (программное обеспечение)	Аналитический параметр	ДОС	$c_{\min}$	Объект анализа	Литература
SO_3^{2-}	RGB	Колориметрия окрашенного комплекса SO_2 с Fe(II) и 1,10-фенантролином	Микроэкстракция в тонкую пленку SO_2 (продукта вращения аналита) из паровой фазы	ПО для Android	B	0.1–700 мкг/л	0.04 мкг/л	Сок, вода	[53]
Пищевые аллергены (на примере аллергенов арахиса)	—	Колориметрия продуктов иммунной ферментной реакции	Персонализированная платформа iTunes	—	Относительное поглощение	1–25 ppm (мг/кг)	1 ppm (мг/кг)	Печенье	[93]
Тетрациклин	RGB (R, G, B, H, S, V, Gr)	Колориметрия экстракта молока после осаждения белков и очистки методом ТФЭ	Бокс из фанеры, ($10 \times 16.5 \times 25$ см) внутри покрытый черной краской, приспособленный под стандартные кварцевые кюветы	ColorComp для устройств iPhone в операционной системе iOS	$d(I_x, I_y)$	0.5–10 мкг/мл	0.5 мкг/мл	Молоко	[35]
Бактерии (<i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus</i>)	RGB	Колориметрия продуктов иммунной электрохимической реакции	Луночный планшет на бумажной основе	—	R + G + B	0– 10^5 КОЕ/мл	1.4×10^{-8} , 3.1×10^{-8} М (для продуктов реакции)	Вода и пищевые продукты	[8]
Сульфат-ионы Хинин	RGB	Нефелометрия продукта реакции аналита с BaCl_2 (сульфат-ионы). Колориметрия флуоресценции аналита (хинин)	Кювета, помещенная в жесткое непрозрачное черное устройство, изготовленное на 3D-принтере	ImageJ	B, G	2.0–50.0 мг/л 0.42–3.10 мг/л	0.13 мг/л 0.43 мг/л	Природная вода, тонизирующие напитки	[6]

Таблица 3. Продолжение

Аналит	Цветометрическая система	Принцип анализа	Устройство/приспособление	Приложение (программное обеспечение)	Аналитический параметр	ДОС	$c_{\min}$	Объект анализа	Литература
Сульфаниламиды	RGB	ДЖЖМЭ в присутствии бутанола, ДДСН и 4-(диметиламино)-циннамальдегида. Колориметрия экстракта (продукта реакции аналита при ДЖЖМЭ (иминной соли))	Камера (бокс) из пенополистирола ($11 \times 8 \times 14$ см) со светодиодами световыми лентами, приспособленная под пробирки типа Фалькон объемом 15 мл	CollorGrab (Loo-matix [®] , version 3.6.1, 2017)	G	50–1000 мкг/л (общее содержание)	20 мкг/л	Молоко	[36]
Рибофлавин (витамин B ₂)	RGB	Колориметрия флуоресценции аналита	Самодельный флуориметр с держателем кювет для стандартной кварцевой кюветы	Color Grab	G	0.05–1.2 мкг/л	0.01 мкг/л	Энергетический напиток, поливитаминная добавка	[94]
Афлатоксин B ₁	–	Колориметрия флуоресценции аналита при взаимодействии с молекулярно импринтированной мембраной датчика	Биомиметический датчик	Spotxel [®] Reader (Sicasys Software GmbH, Germany)	Интенсивность окрашивания (усл. ед)	20–100 нг/мл	20 нг/мл	Кукурузная и пшеничная мука	[95]
Кальций	RGB	ДЖЖМЭ комплекса аналита с глюкозаль-бис(2-гидроксианилом) в присутствии хлороформа, 1,2-дихлорметана и эфироминна Колориметрия экстракта	Самодельный колориметрический бокс для смартфона ($7 \times 10 \times 5$ см) со светодиодным светом низкой мощности	Color Grab	G	0.06–1.5 мкг/мл	0.017 мкг/мл	Сухое молоко (пищевые продукты), вода	[37]
Зearаленон	RGB	Колориметрия результатов (продуктов) иммунохроматографического анализа	Твердотканная микро-латексная сферическая форма для иммунохроматографии	SIAP-App (на языке программирования Java для платформы Android)	Отношение интенсивности окраски зон T/C	0.5–3.5 мкг/кг	0.08 мкг/кг 0.18 мкг/кг	Зерно Корма	[54]

Таблица 3. Окончание

Аналит	Цветометрическая система	Принцип анализа	Устройство/пристособление	Приложение (программное обеспечение)	Аналитический параметр	ДОС	$C_{\min}$	Объект анализа	Литература
Меланин	—	Колориметрия флуоресценции аналита в присутствии квантовых точек из нанокмполитов Au@C	Устройство на базе смартфона, включающее ячейку для детектирования	—	Интенсивность флуоресценции	1–10 мкМ	3,6 нМ	Молоко	[96]
Меланин, хлорамфеникол	RGB	Колориметрия результатов (продуктов) иммунохроматографического анализа	Бумажный микрофлюидный чип	—	GRAY (R + G + B)	0–100 нг/мл 0–10 нг/мл	30 нг/мл 6 нг/мл	Молоко	[97]
Бензойная кислота	RGB	Колориметрия продукта реакции Яновского после превращения аналита в 3,5-динитробензойную кислоту	Бумажный микрофлюидный чип	Разработанное авторами ПО	R + B	500–4000 ppm (мг/кг)	500 ppm (мг/кг)	Пищевые продукты растительного происхождения	[55]
Гипохлориты, (куркумин)	RGB	Колориметрия тушения флуоресценции продукта окисления куркумина на наночастицах Cu	Реакция в растворе	—	R/B	0–412 мкМ	24 мкМ	Молоко, вода	[98]
Охратоксин А	—	Колориметрия конкурентной реакции связывания с антителами	Биосенсор на основе латерального иммуноанализа	ImageJ	Отношение интенсивности окраски зон T/C	0,1–25 мкг/л	0,3 и 0,1 мкг/л	Вино, кофе	[99]
КПАВ, АПАВ (7 веществ)	RGB	Цветометрия окраски экстрактов ионных пар аналитов с эозином или акридиновым желтым после ДЖЖМЭ	Устройство для измерения цветометрических характеристик ДЖЖМЭ-экстрактов	RGBer	A_T	0,01–1 мг/л	0,005–0,05 мг/л	Молоко, овощи и фрукты, мясо, питьевая вода	[100]

* Информация не указана.

Таблица 4. Использование смартфона в анализе объектов различного происхождения

Аналит	Цветометрическая система	Принцип анализа	Устройство/приспособ-ление	Приложение (программное обеспечение)	Аналитический параметр	ДОС	$c_{\min}$	Объект анализа	Литература
CH ₂ O	RGB	Колориметрия окраски продукта дериватизации аналита после извлечения газодиффузной микроэкстракцией с ацетилацетоном	Коробка цилиндрической формы со светодиодной лампой	Image J	B	0.5–10 мг/кг	0.2 мг/кг	Косметика и средства личной гигиены	[38]
Биодизель (метилловые эфиры жирных кислот)	RGB	Колориметрия окраски комплекса Fe(III) с гидроксамат-ионами, образованными реакцией алкиловых эфиров, характерных для биодизеля, с гидроксил-амином	Бокс (190 × 210 × 125 мм), покрытый белой бумагой со светодиодной лампой	PhotoMetrix [®] , 1.6	G	3–30%	1%	Дизельное топливо	[39]
Фенацетин	СМУК	Колориметрия окраски продукта реакции аналита с 1,2-нафтохинон-4-сульфонатом, после его гидролиза до <i>n</i> -аминофенола	Подставка из черного полиметилметакрилата	GIMP2	M (magenta)	0–64.52 мкг/мл	3.5 мкг/мл	Кокаин	[7]

Таблица 4. Продолжение

Аналит	Цветометрическая система	Принцип анализа	Устройство/пристосовление	Приложение (программное обеспечение)	Аналитический параметр	ДОС	$c_{\min}$	Объект анализа	Литература
β -D-галактозидаза	—	Колориметрия флуоресценции продукта иммунореакции, сопровождающаяся выделением флуоресцина	Бумажная микрофлюидная система	—*	G (green)	0.7–5 нМ	700 пМ	Модельные растворы	[101]
Hg(II)	RGB	Колориметрия окраски и флуоресценции продукта реакции аналита с роданидом В	Реакция на сенсорной полимерной мембране	GIMP (GNU Image Manipulation Program)	PC1 (R+G+B)	—	3.5×10^{-6} М	Водные среды	[102]
Fe(III)	RGB	Колориметрия окраски продукта реакции аналита с SCN^-	3D напечатанный колориметрический анализатор (камера) для смартфона и кюветы	Color Grab (version 3.6.1, Loomatix®)	I (оттенки серого)	0.5–10 мг/л	0.1 мг/л	Биоэтанол	[103]

Таблица 4. Продолжение

Аналит	Цветометрическая система	Принцип анализа	Устройство/пристособ-ление	Приложение (программное обеспечение)	Аналитический параметр	ДОС	$c_{\min}$	Объект анализа	Литература
Гипохлорит-ионы	RGB	Колориметрия окраски продукта реакции аналитов с антоцианами	Камера ($12 \times 31.5 \times 19.5$ см) из черного непрозрачного картона со светодиодами. Фарфоровый планшет на 12 лунок	Image J	G или V(G,B)	1.23×10^{-4} – 3.69×10^{-4} M	3.5×10^{-5} M	Отбеливающие жидкости	[40]
Cu^{2+} , Fe^{2+}	RGB	Колориметрия окраски продукта реакции аналитов с гексацианоферратом иодидом калия	Бумажная микрофлюидная система	ColorAssist	B, R	100– 400 мкг/мл	–	Растворы	[104]
Hg^{2+}	RGB	Колориметрия затухания флуоресценции при образовании комплекса аналита с замещенным бензотиазолиновым спиропираном	Реакция в растворе	ImageJ	Интенсивность цвета	0–8.61 мкМ	0.62 мкМ	Растворы	[105]

Таблица 4. Окончание

Аналит	Цветометрическая система	Принцип анализа	Устройство/приспособление	Приложение (программное обеспечение)	Аналитический параметр	ДОС	$c_{\min}$	Объект анализа	Литература
Каннабиноид АВ-001	RGB	Колориметрия продукта реакции аналита с модифицированным реактивом Эрлиха, адсорбированным на силикагеле	Планшет на 96 лунок	ColorMeter free	G	1–200 мкг	1 мкг	Образцы трав	[10]
Кислород	RGB	Колориметрия тушения люминесценции октаэтилпорфиринового комплекса платины на мембране	Сенсорный модуль. Кислородчувствительная мембрана	Разработанное авторами ПО для Android	R ($\lg(R_0/R-1)$)	1–100%	0.28%	Газы	[56]
Общее содержание фенолов (по галловой кислоте)	—	Колориметрия продуктов реакции экстракта с реактивом Фолина–Чокалтеу	Реакция на целлюлозной хроматографической бумаге	ImageJ, GraphPad Prism 5	Интенсивность цвета	0–1000 мкг/мл	—	Лекарственные растения	[106]
Кальций, Магний	RGB	Колориметрия обесцвечивания целочного раствора эриохромового черного Т при образовании комплексов с аналитами	Бокс (190 × 210 × 125 мм), покрытый белой бумагой со светодиодной лампой	PhotoMetriX [®] 1.8	R	10–75 мкМ	3 мкМ	Биодизель	[41]

* Информация не указана.

топлива [39, 41, 103], наркотических веществ [7], растительной продукции (лекарственных трав) [10, 106], газовых [56], водных и модельных сред [101, 102, 104, 105].

Разработан простой и чувствительный подход к оценке качества отбеливающих жидкостей, содержащих гипохлорит-ионы [40]. Прием экономичен и безопасен для окружающей среды, поскольку в нем используются недорогие материалы на основе натуральных компонентов. С использованием только одного цифрового изображения удается провести 12 анализов в течение 5 мин при образовании 600 мкл отработанного слива за один тест. Подход заключается в получении цифрового изображения колориметрической реакции гипохлорит-ионов с антоцианами при помощи смартфона и системы, построенной из недорогих материалов для оптимизации сбора данных. В оптимизированных условиях реакции аналитический сигнал линеен в диапазоне концентраций аналита от 1.23×10^{-4} до 3.69×10^{-4} моль/л с пределами обнаружения и определения 3.5×10^{-5} и 1.16×10^{-4} моль/л соответственно. Результаты анализа согласуются с данными, полученными с использованием титриметрического метода.

В работе [7] предлагается колориметрическое устройство на основе офисной бумаге в качестве портативного, быстрого и недорогого датчика для судебно-медицинских экспертиз, направленных на обнаружение фенаcetина, используемого в качестве примеси в незаконных изъятых материалах, таких как кокаин. Подход описывает использование белой офисной бумаги в качестве подложки и технологию восковой печати для изготовления зон детектирования. На основе проведенных исследований установлено, что аналитический сигнал линеен в диапазоне 0–64.52 мкг/мл фенаcetина. Предел обнаружения составил 3.5 мкг/мл. Точность колориметрического устройства на базе смартфона оценена с использованием изъятых образцов кокаина, в том числе с привлечением метода добавок.

Для определения газообразного кислорода в работе [56] представлен портативный прибор, принцип работы которого основан на тушении интенсивности люминесценции октаэтилпорфиринового комплекса платины при его возбуждении с помощью светоизлучающего диода с максимум излучения 380 нм. Измеренное значение R для мембраны напрямую связано с концентрацией окружающего кислорода. Разработано приложение для устройств на базе *Android* с камерами (таких как смартфоны), чтобы использовать их в качестве детекторов и процессоров изображений при прогнозировании концентрации газообразного кислорода.

Анализ лекарственных препаратов. Фармацевтическая отрасль предъявляет жесткие и регла-

ментированные требования к качеству готовых лекарственных препаратов (ГЛП) [107–109]. Однако значительные темпы разработки лекарственных средств и вывода на рынок новых ГЛП не могут обеспечить своевременную актуализацию и переиздание общих контрольных процедур [107–109]. Перспективным направлением, способным конкурировать по точности и экспрессности с традиционными титриметрическими и спектрометрическими методами, является внедрение в рутинную практику контрольных лабораторий цветометрических приемов на базе смартфона (табл. 5).

Представлен новый подход к определению аскорбиновой кислоты в растворе, основанный на анализе полученных с помощью смартфона цифровых изображений [13]. В основе методики лежит уменьшение количества хромофора хинонимина (при реализации ферментативного колориметрического метода определения глюкозы), образующегося по мере увеличения концентрации аскорбиновой кислоты в среде.

Для определения антибиотиков пенициллинового ряда в лекарственных средствах использовали ДЖЖМЭ ассоциатов пенициллинов с метиленовым синим [114]. Показана возможность использования хемометрического анализа, обработку массива данных проводили методами главных компонент, иерархического кластерного анализа и метода k-means с использованием программного обеспечения XLSTAT. Проведены идентификация и определение концентрации антибиотиков пенициллинового ряда в таблетированных формах с использованием хемометрического анализа. Градуировочные характеристики линейны с коэффициентами достоверности аппроксимации ≥ 0.99 . Относительное стандартное отклонение результатов анализа не превышает 0.05.

Предложен способ определения четвертичных аммониевых соединений (ЧАС) в лекарственных и дезинфицирующих средствах, основанный на ДЖЖМЭ ассоциатов с эозином и измерении цветометрических характеристик экстрактов с помощью смартфона и специализированного программного обеспечения [116]. В качестве аналитического сигнала (A_r) использовали значения цветометрических параметров в системе RGB. Разработаны варианты определения содержания хлоридов цетилпиридиния, миристалкония, бензалкония и бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]аммония в лекарственных препаратах *Терафлю*, *Септолете Тотал*, *Калгель*, *Мирамистин*, *Иноксин* и *Фарматекс*, а также хлоридов цетилпиридиния, бензалкония, алкилдиметил(этилбензил)аммония, цетилтриметиламмония, мирилтриметиламмония и дидецилдиметиламмония в антисептических препаратах *Секурол*, *Ахдез*, *Стеллариум* и мицеллярных водах. Преде-

Таблица 5. Использование смартфона в анализе лекарственных препаратов

Аналит	Цветометрическая система	Принцип анализа	Устройство/приспособление	Приложение (программное обеспечение)	Аналитический параметр	ДОС	$c_{\min}$	Объект анализа	Литература
Аскорбиновая кислота	RGB	Колориметрия (уменьшения) окраски хинина как продукта ферментативной реакции аналита с глюкозооксидазой	Реакция в растворе. Кюветы на белой поверхности с белым фоном	GIMP 2.0	G , B ($Abs(G)$), $Abs(B)$	6–10 мг/л	0.055 мг/л	ЛП (на примере таблеток)	[13]
Тетрациклины (6 веществ)	RGB	Цветометрия твердофазной собственной флуоресценции аналитов и сенсibilизированной аналитами флуоресценции $Eu(III)$ на целлюлозной бумаге и пластинках ТСХ	Реакция на целлюлозной бумаге для хроматографии и пластинках ВЭТСХ	RGBer	A_T	3–500 мкг/мл	1–5 мкг/мл	ЛП (на примере таблеток)	[110]
Хинолоны (17 веществ)	RGB	Цветометрия твердофазной собственной флуоресценции аналитов и сенсibilизированной аналитами флуоресценции $Eu(III)$ на целлюлозной бумаге и пластинках ТСХ	Реакция на целлюлозной бумаге для хроматографии и пластинках ВЭТСХ	RGBer	A_T	0.6–500 мкг/мл	0.2–4 мкг/мл	ЛП (на примере таблеток)	[111]

Таблица 5. Окончание

Аналит	Цветометрическая система	Принцип анализа	Устройство/приспособление	Приложение (программное обеспечение)	Аналитический параметр	ДОС	$c_{\min}$	Объект анализа	Литература
Нестероидные противовоспалительные средства (НПВС) (4 вещества)	RGB	Цветометрия твердофазной сенсibilизированной аналитами флуоресценции Eu(III) и Tb(III) на целлюлозной бумаге и пластинках ТСХ	Реакция на целлюлозной бумаге для хроматографии и пластинках ВЭТСХ	RGBer	A_T	3–500 мкг/мл	1–5 мкг/мл	ЛП (на примере таблеток)	[112]
Хинолоны (17 веществ)	RGB	Цветометрия флуоресценции индикаторных зон	Тест-система	RGBer	A_T	0.5–250 мкг/мл	—*	ЛП (на примере таблеток)	[113]
Пенициллины (6 веществ)	RGB	Цветометрия окраски экстрактов ионных пар аналитов с метиленовым синим после ДЖЖМЭ	Устройство для измерения цветометрических характеристик стик ДЖЖМЭ-экстрактов	RGBer	A_T	(0.6–0.8)–10 мкг/мл	0.2 мкг/мл	ЛП (на примере таблеток)	[114]
Тетрациклины (6 веществ)	RGB	Цветометрия флуоресценции индикаторных зон	Тест-система	RGBer	A_T	8–500 мкг/мл	—	ЛП (на примере таблеток)	[115]
Четвертичные аммониевые соединения (ЧАС)	RGB	Цветометрия окраски экстрактов ионных пар аналитов с эозином после ДЖЖМЭ	Устройство для измерения цветометрических характеристик стик ДЖЖМЭ-экстрактов	RGBer	A_T	(0.02–0.4)–(2–10) мкг/мл	0.007–0.100 мкг/мл	ЛП и дезинфицирующие средства	[116]

* Информация не указана.

лы обнаружения и определения составили 0.007–0.100 и 0.02–0.40 мг/л соответственно. Относительное стандартное отклонение результатов анализа не превышало 0.13–0.15. Продолжительность анализа составила 15–20 мин.

Предложен простой и доступный способ определения антибиотиков хинолонового ряда с использованием цифровой цветометрии твердофазной флуоресценции [111]. Изучены собственная флуоресценция 17 хинолонов и сенсibilизированная хинолонами флуоресценция европия(III) на целлюлозной бумаге (ЦБ) и тонком слое силикагеля. При облучении ультрафиолетовым светом (365 нм) нанесенных на матрицу растворов хинолонов наблюдается синяя (ЦБ, высокоэффективная тонкослойная хроматография (ВЭТСХ)) и розовая (ЦБ–Eu, ВЭТСХ–Eu) флуоресценция. Измерение интенсивности флуоресценции на поверхности матриц осуществляли с помощью смартфона. В качестве аналитического сигнала (A_r) использовали значения цветометрических параметров в системе RGB: $A_r = \sqrt{(R_0 - R_x)^2 + (G_0 - G_x)^2 + (B_0 - B_x)^2}$. Пределы обнаружения и определения составили 0.2–4 и 0.6–12 мкг/мл соответственно для всех рассматриваемых аналитов. Диапазоны определяемых содержаний – 0.6–500 мкг/мл. Предложена методика определения фторхинолонов в лекарственных препаратах. Относительное стандартное отклонение результатов анализа не превышало 0.05.

На этом же принципе основана методика определения нестероидных противовоспалительных средств (НПВС) [112]. Изучена сенсibilизированная НПВС флуоресценция европия и тербия на целлюлозной бумаге и тонком слое силикагеля. При облучении ультрафиолетовым светом (365 нм) пятен, нанесенных на матрицу растворов НПВС, наблюдается зеленая флуоресценция толфенамовой, мефенамовой и нифлумовой кислот и красная мелоксикама. Пределы обнаружения и определения составили 1–5 и 3–17 мкг/мл соответственно для всех рассматриваемых аналитов. Диапазоны определяемых содержаний 3–500 мкг/мл. Методика проверена на лекарственных препаратах. Относительное стандартное отклонение результатов анализа не превышало 0.08.

Использование хемометрики при идентификации в химическом анализе. Наряду с развитием цветометрического метода с привлечением смартфона в качестве регистратора сигнала, обусловленного наличием аналита, значительное распространение в анализе продуктов питания и лекарственных средств получили подходы, позволяющие сравнивать, различать и классифицировать объекты сходного состава. Состав объектов может различаться в силу специфики климатических и геологических условий региона происхождения, особенностей технологических

процессов изготовления, времени хранения и наличия добавок. Образцы в таком случае разделяют по их индивидуальным сигналам, не выполняя многокомпонентный аппаратный анализ. При реализации подобных дискриминационных стратегий анализируемые объекты идентифицируют и классифицируют, используя хемометрические методы [18, 20, 45, 115, 117–126].

Привлечение алгоритмов хемометрической обработки массивов данных способствует совершенствованию методологии экспресс-анализа на базе цифровой цветометрии в рамках решения сложнейших задач идентификации, аутентификации и выявления фальсификации продукции различного происхождения. Подобная консолидация имеет неоспоримые преимущества в сравнении с традиционными инструментальными подходами, к которым можно отнести низкие материальные затраты на реализацию, доступность аппаратного оформления, мобильность и возможность быстрого принятия решения.

В работе [119] описана новая процедура классификации минеральных вод на основе цифровых изображений, полученных с помощью смартфона. В пробы воды коммерческого производства из восьми минеральных источников, а также в дистиллированную и водопроводную воду добавляли раствор эриохромового черного Т или мурексида. Смесь переносили в кювету, которую помещали в камеру с контролируемым освещением. Значения базисных компонентов цвета в системе RGB полученных цифровых изображений кюветы регистрировали в режиме реального времени с помощью бесплатного приложения для смартфона и использовали в качестве переменных для дальнейшего исследования. Разброс (дисперсия) данных по компоненте В для мурексида и по компоненте R для эриохромового черного Т обеспечивает четкую визуализацию кластеров с использованием необработанных переменных. Иерархический кластерный анализ, примененный к этим данным, подтвердил эффективное разделение образцов, обеспечивающее характеристику девяти кластеров для десяти исследованных образцов воды. Классификация выборок на основе метода k-ближайших соседей (k-NN) смоделирована с коэффициентом эффективности 100% для восьми образцов, 94.4 и 50% для остальных образцов соответственно, что указывает на высокую эффективность предложенной стратегии. Принимая во внимание низкую стоимость приборов и реагентов, а также экспрессность процедуры, разработанная процедура может применяться для выявления фальсификации воды коммерческого производства.

Комбинированный подход на основе цветометрического и хемометрических методов использован для определения срока годности каль-

маров [120]. Предложен колориметрический датчик, состоящий из шести нанесенных на пластину для тонкослойной хроматографии индикаторов (бромкрезоловый пурпурный, бромфеноловый синий, бромтимоловый синий, тимоловый синий и двудерные комплексы родия (*cis*-[Rh₂(C₆H₄PPh₂)₂(O₂CCN₃)₂](HO₂CCN₃)₂)). Образцы, упакованные с датчиком, хранили в холодильнике в течение 12 дней. Порчу кальмаров при хранении контролировали также физико-химическими и микробиологическими методами. Образцы превысили допустимые пределы микробного числа на третий день. Анализ методом главных компонент, проведенный с помощью цветометрической системы CIELab, показал, что колориметрический датчик способен отличить свежего кальмара, пригодного для употребления, от испорченного.

Представлен новый подход для обнаружения и распознавания пяти взрывчатых веществ (трипероксида триацетона, гексаметилентрипероксиддиамина, 4-амино-2-нитрофенола, нитробензола и пикриновой кислоты) в почве [45]. Исследования проводили с использованием недорогого и одноразового колориметрического датчика на бумажной основе, изготовленного методом восковой печати. Применяемые в колориметрических реакциях реагенты (KI, креатинин и анилин) при взаимодействии с аналитами создавали уникальный цветовой узор для каждого химического соединения. Взрывчатые вещества дифференцировали друг от друга по профилям изменения цвета, которые можно было легко различить по истечении 15 мин с привлечением иерархического кластерного анализа и метода главных компонент. При регистрации базисных компонентов цвета в аддитивной системе RGB применяли специально разработанное программное обеспечение. В целях избежания проблем с освещением, обычно встречающихся в других устройствах, работу проводили с закрытой камерой (боксом). При апробации описанного способа минимальная определяемая концентрация составила 0.2 мкг (для трипероксида триацетона).

Для оценки порчи рыбы по летучим биогенным аминам использовали кислотно-основные красители бромкрезоловый зеленый, бромкрезоловый пурпурный, крезоловый красный и 6 металлопорфиринов [121]. Обнаружение аналитов в голавле проводили каждые 24 ч в течение семи дней. Профиль изменения цвета для каждого образца получали путем дифференциации изображений массива датчиков до и после воздействия летучих аминов. Цифровые данные, представляющие профили изменения цвета рыбы, анализировали с использованием метода главных компонент. Образцы голавля разделили на три группы свежести с использованием нейронной сети ра-

диальной базисной функции с общей точностью классификации 87.5%.

Использование хеометрического анализа массива данных, полученных с помощью смартфона, позволило идентифицировать этаноламин, диметиламин и тетраметиламин в донных отложениях [123]. Использовали колориметрический датчик, состоящий из семи индикаторных зон с pH-индикаторами.

Метод главных компонент и иерархический кластерный анализ использовали для классификации и идентификации 18 сортов пива и 14 безалкогольных напитков [124, 125]. Применяли колориметрический датчик из 25 индикаторных зон (в основном pH-индикаторы). Надежность идентификации составила 97–98%. Этот же датчик использовали для идентификации 10 образцов кофе по его аромату (электронный нос) [126]. Во всех случаях для регистрации аналитического сигнала использовали смартфон.

Возможности современной цифровой цветометрии на базе портативных персональных устройств (смартфона) в настоящее время сравнимы с привычными спектральными методами (спектрофотометрия и флуориметрия), а зачастую и превосходят их по числу решаемых задач, простоте реализации, мобильности и доступности. Во многом это обусловлено разработкой и совершенствованием специализированных программных продуктов, мобильных приложений с графическими редакторами, устройств и приспособлений для регистрации аналитического сигнала и интерпретации полученных данных. Развитие метода в значительной степени связано с увеличением разнообразия практических решений для различных научных направлений, а также с возможностью анализа видео и видеофайлов, что позволит реализовать кинетические исследования, особенно актуальные в фармацевтической области.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rezaeadeh M., Seidi Sh., Lid M., Pedersen-Bjergaard S., Yamini Y. The modern role of smartphones in analytical chemistry // Trends Anal. Chem. 2019. V. 118. P. 548.
2. Моногарова О.В., Осолок К.В., Аняри В.В. Цветометрия в химическом анализе // Журн. аналит. химии. 2018. Т. 73. № 11. С. 857.
3. Аняри В.В., Горбунова М.В., Исаченко А.И., Дмитриенко С.Г., Золотов Ю.А. Использование бытовых цветорегистрирующих устройств в количественном химическом анализе // Журн. аналит. химии. 2017. Т. 72. № 11. С. 963.

4. Иванов В.М., Кузнецова О.В. Химическая цветометрия: возможности метода, области применения и перспективы // Успехи химии. 2001. Т. 70. № 5. С. 411.
5. Huang X., Xu D., Chen J., Liu J., Li Y., Song J., Ma X., Guo J. Smartphone-based analytical biosensors // Analyst. 2018. V. 143. P. 5339.
6. Vidal E., Lorenzetti A.S., Aguirre M.A., Canals A., Domini C.E. New, inexpensive and simple 3D printable device for nephelometric and fluorimetric determination based on smartphone sensing // RSC Adv. 2020. V. 10. P. 19713.
7. Da Silva G.O., De Araujo W.R., Paixao T.R.L.C. Portable and low-cost colorimetric office paper-based device for phenacetin detection in seized cocaine samples // Talanta. 2018. V. 176. P. 674.
8. Adkins J.A., Boehle K., Friend C., Chamberlain B., Bisha B., Henry C.S. Colorimetric and electrochemical bacteria detection using printed paper- and transparency-based analytic devices // Anal. Chem. 2017. V. 89. P. 3613.
9. Nogueira S.A., Sousa L.R., Silva N.K.L., Rodrigues P.H.F., Coltro W.K.T. Monitoring acid-base titrations on wax printed paper microzones using a smartphone // Micromachines. 2017. V. 8. P. 139.
10. Merli D., Profumo A., Tinivella S., Protti S. From smart drugs to smartphone: A colorimetric spot test for the analysis of the synthetic cannabinoid AB-001 // Forensic Chem. 2019. V. 14. Article 100167.
11. Jaikang P., Wangkarn S., Paengnakorn P., Grudpan K. Microliter operation for determination of nitrate-nitrogen via simple zinc reduction and color formation in a well plate with a smartphone // Anal. Sci. 2019. V. 35. P. 421.
12. Shalaby A.A., Mohamed A.A. Sensitive assessment of hexavalent chromium using various uniform and non-uniform color space signals derived from digital images // Water. Air. Soil. Pollut. 2020. V. 231. Article 516.
13. Coutinho M.S., Morais C.L.M., Neves A.C.O., Menezes F.G., Lima K.M.G. Colorimetric determination of ascorbic acid based on its interfering effect in the enzymatic analysis of glucose: an approach using smartphone image analysis // J. Braz. Chem. Soc. 2017. V. 28. № 12. P. 2500.
14. Pessoa K.D., Suarez W.T., dos Reis M.F., de Oliveira Krambeck Franco M., Moreira R.P.L., dos Santos V.B. A digital image method of spot tests for determination of copper in sugar cane spirits // Spectrochim. Acta A. 2017. V. 185. P. 310.
15. Ravazzi C.G., Franco M.D.O.K., Vieira M.C.R., Suarez W.T. Smartphone application for captopril determination in dosage forms and synthetic urine employing digital imaging // Talanta. 2018. V. 189. P. 339.
16. Santos V.B.D., Silva E.K.N.D., Oliveira L.M.A.D., Suarez W.T. Low cost in situ digital image method, based on spot testing and smartphone images, for determination of ascorbic acid in Brazilian Amazon native and exotic fruits // Food Chem. 2019. V. 285. P. 340.
17. Амелин В.Г., Шаока З.А.Ч., Большаков Д.С. Использование смартфона для определения тетрациклинов в воде и молоке по сенсibilизированной твердофазной флуоресценции европия на его гидроксиде // Журн. аналит. химии. 2021. Т. 76. № 10. С. 952.
18. Амелин В.Г., Шаока З.А.Ч., Большаков Д.С., Третьяков А.В. Использование смартфона и хеометрического анализа для определения тетрациклинов в природной воде по сенсibilизированной твердофазной флуоресценции европия на его гидроксиде // Заводск. лаборатория. Диагностика материалов. 2022. Т. 88. № 5. С. 5.
19. Амелин В.Г., Шаока З.А.Ч., Большаков Д.С. Сорбционно-флуориметрическое определение хинолонов в сточных и природных водах с использованием смартфона // Вестн. Моск. ун-та. Серия 2. Химия. 2021. Т. 62. № 4. С. 371.
20. Амелин В.Г., Шаока З.А.Ч., Большаков Д.С., Третьяков А.В. Сорбционно-флуориметрическое определение фторхинолонов в природных водах с использованием смартфона и хеометрического анализа // Сорбционные и хроматографические процессы. 2022. Т. 22. № 2. С. 126.
21. Sumriddetchkajorna S., Chaitavon K., Intaravanne Y. Mobile device-based self-referencing colorimeter for monitoring chlorine concentration in water // Sens. Actuators B: Chem. 2013. V. 182. P. 592.
22. Moonrungssee N., Pencharee S., Jakmunee J. Colorimetric analyzer based on mobile phone camera for determination of available phosphorus in soil // Talanta. 2015. V. 136. P. 204.
23. Levin S., Krishnan S., Rajkumar S., Halery N., Balkunde P. Monitoring of fluoride in water samples using a smartphone // Sci. Total Environ. 2016. V. 551–552. P. 101.
24. Kilic V., Alankus G., Horzum N., Mutlu A.Y., Bayram A., Solmaz M.E. Single-image-referenced colorimetric water quality detection using a smartphone // ACS Omega. 2018. V. 3. № 5. P. 5531.
25. Lima M.J.A., Nascimento C.F., Rocha F.R.P. Feasible photometric measurements in liquid-liquid extraction by exploiting smartphone-based digital images // Anal. Methods. 2017. V. 9. № 14. P. 2220.
26. Shahvar A., Saraji M., Shamsaei D. Headspace single drop microextraction combined with mobile phone-based on-drop sensing for the determination of formaldehyde // Sens. Actuators B: Chem. 2018. V. 273. P. 1474.
27. Moslemzadeh M., Larki A., Ghanemi K. A combination of dispersive liquid-liquid microextraction and smartphone-based colorimetric system for the phenol measurement // Microchem. J. 2020. V. 159. Article 105583.
28. Khoshmaram L., Mohammadi M. Combination of a smart phone based low-cost portable colorimeter with air-assisted liquid-liquid microextraction for speciation and determination of chromium (III) and (VI) // Microchem. J. 2021. V. 164. Article 105991.
29. Peng B., Xu J., Fan M., Guo Y., Ma Y., Zhou M., Fang Y. Smartphone colorimetric determination of hydrogen peroxide in real samples based on B, N, and S co-doped carbon dots probe // Anal. Bioanal. Chem. 2020. V. 412. P. 861.

30. *Acevedo M.S.F., Lima M.J.A., Nascimento C.F., Rocha F.R.P.* A green and cost-effective procedure or determination of anionic surfactants in milk with liquid-liquid microextraction and smartphone-based photometric detection // *Microchem. J.* 2018. V. 143. P. 259.
31. *De Oliveira Krambeck Franco M., Suarez W.T., dos Santos V.B.* Digital image method smartphone-based for furfural determination in sugarcane spirits // *Food Anal. Methods.* 2017. V. 10. P. 508.
32. *Soares S., Campos K.R.R., Melchert W.R., Rocha F.R.P.* A spot test for total esters determination in sugarcane spirits exploiting smartphone-based digital images // *Anal. Methods.* 2020. V. 12. P. 3918.
33. *Perez-Bernal J.L., Villar-Navarro M., Morales M.L., Ubeda C., Callejon R.M.* The smartphone as an economical and reliable tool for monitoring the browning process in sparkling wine // *Comput. Electron Agric.* 2017. V. 141. P. 248.
34. *De Oliveira Krambeck Franco M., Suarez W.T., Maia M.V., Dos Santos V.B.* Smartphone application for methanol determination in sugar cane spirits employing digital image-based method // *Food. Anal. Methods.* 2017. V. 10. № 6. P. 2102.
35. *Masawat P., Harfield A., Namwong A.* An iPhone-based digital image colorimeter for detecting tetracycline in milk // *Food Chem.* 2015. V. 184. P. 23.
36. *Maroubo L.A., Pedrina G., Melchert W.R.* Total sulfonamides determination in bovine milk using smartphone-based digital images // *Microchem. J.* 2021. V. 170. Article 106657.
37. *Peng B., Zhou J., Xu J., Fan M., Ma Y., Zhou M., Li T., Zhao S.* A smartphone-based colorimetry after dispersive liquid-liquid microextraction for rapid quantification of calcium in water and food samples // *Microchem. J.* 2019. V. 149. Article 104072.
38. *Lamarca R.S., Luchiarri N.D.C., Bonjorno A.F., Filho J.P., Cardoso A.A., Gomes P.C.F.L.* Determination of formaldehyde in cosmetic products using gas-diffusion microextraction coupled with a smartphone reader // *Anal. Methods.* 2019. V. 11. P. 3697.
39. *Soares S., Nunes L.C., Melchert W.R., Rocha F.R.P.* Spot test exploiting smartphone-based digital images for determination of biodiesel in diesel blends // *Microchem. J.* 2020. V. 152. Article 104273.
40. *Resque I.S., Dos Santos V.B., Suarez W.T.* An environmentally friendly analytical approach based on spot test and digital image to evaluate the conformity of bleaching products // *Chem. Pap.* 2019. V. 73. № 7. P. 1659.
41. *Soares S., Fernandes G.M., Moraes L.M.B., Batista A.D., Rocha F.R.P.* Single-phase determination of calcium and magnesium in biodiesel using smartphone-based digital images // *Fuel.* 2022. V. 307. Article 121837.
42. *Sun H., Jia Y., Dong H., Fan L., Zheng J.* Multiplex quantification of metals in airborne particulate matter via smartphone and paperbased microfluidics // *Anal. Chim. Acta.* 2018. V. 1044. P. 110.
43. *Wei Q., Nagi R., Sadeghi K., Feng S., Yan E., Jung Ki S., Caire R., Tseng D., Ozcan A.* Detection and spatial mapping of mercury contamination in water samples using a smart-phone // *ACS Nano.* 2014. V. 8. № 2. P. 1121.
44. *Garcia A., Erenas M.M., Marinetto E.D., Abad C.A., de Orbe-Paya I., Palma A.J., Capitan-Vallvey L.F.* Mobile phone platform as portable chemical analyzer // *Sens. Actuators B: Chem.* 2011. V. 156. P. 350.
45. *Salles M.O., Meloni G.N., De Araujo W.R., Paixao T.R.L.C.* Explosive colorimetric discrimination using a smartphone, paper device and chemometrical approach // *Anal. Methods.* 2014. V. 6. № 7. P. 2047.
46. *Sicard C., Glen C., Aubie B., Wallace D., Jahanshahi-Anbuhi S., Pennings K., Daigger G.T., Pelton R., Brennan J.D., Filipe C.* Tools for water quality monitoring and mapping using paper-based sensors and cell phones // *Water Research.* 2015. V. 70. P. 360.
47. *Oncescu V., Mancuso M., Erickson D.* Cholesterol testing on a smartphone // *Lab Chip.* 2014. V. 14. P. 759.
48. *Jia Y., Sun H., Li X., Sun D., Hu T., Xiang N., Ni Z.* Paper-based graphene oxide biosensor coupled with smartphone for the quantification of glucose in oral fluid // *Biomed. Microdevices.* 2018. V. 20. P. 89.
49. *Oncescu V., O'Dell D., Erickson D.* Smartphone based health accessory for colorimetric detection of biomarkers in sweat and saliva // *Lab Chip.* 2013. V. 13. № 16. P. 3232.
50. *Bueno L., Meloni G.N., Reddy S.M., Paixao T.R.L.C.* Use of plastic-based analytical device, smartphone and chemometric tools to discriminate amines // *RSC Adv.* 2015. V. 5. P. 20148.
51. *Cao Y., Liu Y., Li F., Guo S., Shui Y., Xue H., Wang L.* Portable colorimetric detection of copper ion in drinking water via red beet pigment and smartphone // *Microchem. J.* 2019. V. 150. Article 104176.
52. *Lee S., Kim G., Moon J.* Performance improvement of the one-dot lateral flow immunoassay for aflatoxin B1 by using a smartphone based reading system // *Sensors.* 2013. V. 13. № 4. P. 5109.
53. *Shahvar A., Saraji M., Gordan H., Shamsaei D.* Combination of paper-based thin film microextraction with smartphone-based sensing for sulfite assay in food samples // *Talanta.* 2019. V. 197. P. 578.
54. *Li X., Wang J., Yi C., Jiang L., Wu J., Chen X., Shen X., Sun Y., Lei H.* A smartphone-based quantitative detection device integrated with latex microsphere immunochromatography for on-site detection of zearalenone in cereals and feed // *Sens. Actuators B: Chem.* 2019. V. 290. P. 170.
55. *Liu C., Wang Y., Fu L., Chen K.* Microfluidic paper-based chip platform for benzoic acid detection in food // *Food Chem.* 2018. V. 249. P. 162.
56. *Lopez-Ruiz N., Martinez-Olmos A., de Vargas-Sansalvador I.M.P., Fernandez-Ramos M.D., Carvajal M.A., Capitan-Vallvey L.F., Palma A.J.* Determination of O₂ using colour sensing from image processing with mobile devices // *Sens. Actuators B: Chem.* 2012. V. 171–172. P. 938.
57. *Böck F.C., Helfer G.A., Costa A., Dessuy M.B., Ferrao M.F.* PhotoMetrix and colorimetric image analysis using smartphones // *J. Chemom.* 2020. <https://doi.org/10.1002/cem.3251>

58. Li F., Hu Y., Li Z., Liu J., Lei Guo L., He J. Three-dimensional microfluidic paper-based device for multiplexed colorimetric detection of six metal ions combined with use of a smartphone // *Anal. Bioanal. Chem.* 2019. V. 411. P. 6497.
59. Muhammad-aree S., Teepoo S. On-site detection of heavy metals in wastewater using a single paper strip integrated with a smartphone // *Anal. Bioanal. Chem.* 2020. V. 412. P. 1395.
60. Sun H., Li W., Dong Z., Hu C., Leung C., Ma D., Ren K. A suspending-droplet mode paper-based microfluidic platform for low-cost, rapid, and convenient detection of lead (II) ions in liquid solution // *Biosens. Bioelectron.* 2018. V. 99. P. 361.
61. Kang S., Jang S., Haldorai Y., Vilian A.T.E., Rethinasabapathy M., Roh C., Han Y., Huh Y.S. Facile fabrication of paper-based analytical devices for rapid and highly selective colorimetric detection of cesium in environmental samples // *RSC Adv.* 2017. V. 7. P. 48374.
62. Jarujamrus P., Meelapsom R., Pencharee S., Obma A., Amatongchai M., Ditcharoen N., Chairam S., Tamuang S. Use of a smartphone as a colorimetric analyzer in paper-based devices for sensitive and selective determination of mercury in water samples // *Anal. Sci.* 2018. V. 34. P. 75.
63. Cheng N., Xu Y., Huang K., Chen Y., Yang Z., Luo Y., Xu W. One-step competitive lateral flow biosensor running on an independent quantification system for smart phones based in-situ detection of trace Hg(II) in tap water // *Food Chem.* 2017. V. 214. P. 169.
64. Moraes E.P., da Silva N.S.A., de Moraes C. de L.M., das Neves L.S., de Lima K.M.G. Low-cost method for quantifying sodium in coconut water and seawater for the undergraduate analytical chemistry laboratory: flame test, a mobile phone camera, and image processing // *J. Chem. Educ.* 2014. V. 91. № 11. P. 1958.
65. Shen L., Hagen J.A., Papautsky I. Point-of-care colorimetric detection with a smartphone // *Lab Chip.* 2012. V. 12. P. 4240.
66. Sankar K., Lenisha D., Janaki G., John J. Rajaram S.K., Selvi M.C., Srinivasan G. Digital image-based quantification of chlorpyrifos in water samples using a lipase embedded paper based device // *Talanta.* 2020. V. 208. Article 120408.
67. Ansari N., Lodha A., Pandayac A., Menon S.K. Determination of cause of death using paper-based microfluidic device as a colorimetric probe // *Anal. Methods.* 2017. V. 9. P. 5632.
68. Liu C., Gomez F.A., Miao Y., Cui P., Lee W. A colorimetric assay system for dopamine using microfluidic paper-based analytical devices // *Talanta.* 2019. V. 194. P. 171.
69. Lee S., Oncescu V., Mancuso M., Mehta S., Erickson D. A smartphone platform for the quantification of vitamin D levels // *Lab Chip.* 2014. V. 14. P. 1437.
70. Fashi A., Cheraghi M., Ebadipur H., Ebadipur H., Zamani A., Badiie H., Pedersen-Bjergaard S. Exploiting agarose gel modified with glucose-fructose syrup as a green sorbent in rotating-disk sorptive extraction technique for the determination of trace malondialdehyde in biological and food samples // *Talanta.* 2020. V. 217. Article 121001.
71. Zhang C., Kim J.P., Creer M., Yang J., Liu Z. A smartphone-based chloridometer for point-of-care diagnostics of cystic fibrosis // *Biosens. Bioelectron.* 2017. V. 9. P. 164.
72. Calabria D., Caliceti C., Zangheri M., Mirasoli M., Simoni P., Roda A. Smartphone-based enzymatic biosensor for oral fluid L-lactate detection in one minute using confined multilayer paper reflectometry // *Biosens. Bioelectron.* 2017. V. 94. P. 124.
73. Jalal U.M., Jin G.J., Shim J.S. Paper-plastic hybrid microfluidic device for smartphone-based colorimetric analysis of urine // *Anal. Chem.* 2017. V. 89. P. 13160.
74. Wang X., Li F., Cai Z., Liu K., Li J., Zhang B., He J. Sensitive colorimetric assay for uric acid and glucose detection based on multilayer-modified paper with smartphone as signal readout // *Anal. Bioanal. Chem.* 2018. V. 410. P. 2647.
75. Shrivastava K., Monisha, Kant T., Karbhal I., Kurrey R., Sahu B., Sinha D., Patra G.K., Deb M.K., Pervez S. Smartphone coupled with paper-based chemical sensor for on-site determination of iron (III) in environmental and biological samples // *Anal. Bioanal. Chem.* 2020. V. 412. P. 1573.
76. He J., Xiao G., Chen X., Qiao Y., Xu D., Lu Z. A thermoresponsive microfluidic system integrating a shape memory polymer-modified textile and a paper-based colorimetric sensor for the detection of glucose in human sweat // *RSC Adv.* 2019. V. 9. P. 23957.
77. Rasouli Z., Ghavami R. Simultaneous optical detection of human serum albumin and transferrin in body fluids // *Microchim. Acta.* 2020. V. 187. P. 208.
78. Abaoag C.J., Alforque R., Ordonez J.B., Quinto E. Non-invasive detection of human body liquor intake based on optical biosensor / MATEC Web of Conferences (The 24th Regional Symposium on Chemical Engineering (RSCE 2017)). 2018. V. 156. Article 05005.
79. Koh A., Kang D., Xue Y., Lee S., Pielak R.M., Kim J., Hwang T., Min S., Banks A., Bastien P., Manco M.C., Wang L., Ammann K.R., Jang K.I., Won P., Han S., Ghaffari R., Paik U., Slepian M.J., Balooch G., Huang Y., Rogers J.A. A soft, wearable microfluidic device for the capture, storage, and colorimetric sensing of sweat // *Sci. Transl. Med.* 2016. V. 8. № 366. P. 1.
80. Лаврухина О.И., Амелин В.Г., Прохвятилова Л.Б., Ручнова О.И. Риски загрязнения пищевых продуктов на различных стадиях их производства // *Ветеринария сегодня.* 2017. № 3 (22). С. 33.
81. Oliveira L.M.A., Santos V.B., Silva E.K.N., Lopes A.S., Dantas-Filho H.A. An environment-friendly spot test method with digital imaging for the micro-titration of citric fruits // *Talanta.* 2020. V. 206. Article 120219.
82. Calabria D., Mirasoli M., Guardigli M., Simoni P., Zangheri M., Severi P., Caliceti C., Roda A. Paper-based smartphone chemosensor for reflectometric on-site total polyphenols quantification in olive oil // *Sens. Actuators B: Chem.* 2020. V. 305. Article 127522.
83. Luchiari N. da C., da Silva G.A., Marasco Jr. C.A., Gomes P.C.F. de L. Development of miniaturized fluorimetric device for caffeine determination using a smartphone // *RSC Adv.* 2019. V. 9. P. 35033.
84. Mahato K., Chandra P. Paper-based miniaturized immunosensor for naked eye ALP detection based on digital

- image colorimetry integrated with smartphone // Biosens. Bioelectron. 2019. V. 128. P. 9.
85. Li Z., Li Z., Zhao D., Wen F., Jiang J., Xu D. Smartphone-based visualized microarray detection for multiplexed harmful substances in milk // Biosens. Bioelectron. 2017. V. 87. P. 874.
 86. Valek T., Valkova P., Pohanka M. Colorimetric method for the determination of proteins using immobilized microbial protease and a smartphone camera // Anal. Lett. 2021. V. 54. P. 1023.
 87. Yu L., He C., Zheng Q., Feng L., Xiong L., Xiao Y. Dual Eu-MOFs based logic device and ratiometric fluorescence paper microchip for visual H₂O₂ assay // J. Mater. Chem. 2020. V. 8. P. 3562.
 88. Zeng X., Hu J., Zhang M., Wang F., Wu L., Hou X. Visual detection of fluoride anions using mixed lanthanide metal-organic frameworks with a smartphone // Anal. Chem. 2020. V. 92. № 2. P. 2097.
 89. Shrivastava K., Monisha, Patel S., Thakur S.S., Shankar R. Food safety monitoring of the pesticide phenthoate using a smartphone-assisted paper-based sensor with bimetallic Cu@Ag core-shell nanoparticles // Lab. Chip. 2020. V. 20. P. 3996.
 90. Botelho B.G., Dantas K.C.F., Sena M.M. Determination of allura red dye in hard candies by using digital images obtained with a mobile phone and N-PLS // Chemom. Intel. Lab. Syst. 2017. V. 167. P. 44.
 91. Fang J., Qiu X., Wan Z., Zou Q., Su K., Hu N., Wang P. A sensing smartphone and its portable accessory for on-site rapid biochemical detection of marine toxins // Anal. Methods. 2016. V. 8. № 38. P. 6895.
 92. Lin B., Yu Y., Cao Y., Guo M., Zhu D., Dai J., Zheng M. Point-of-care testing for streptomycin based on aptamer recognizing and digital image colorimetry by smartphone // Biosens. Bioelectron. 2018. V. 100. № 378. P. 482.
 93. Coskun A.F., Wong J., Khodadadi D., Nagi R., Tey A., Ozcan A. A personalized food allergen testing platform on a cellphone // Lab. Chip. 2013. V. 13. № 4. P. 636.
 94. Khoshmaram L., Mohammadi M., Babadi A.N. A portable low-cost fluorimeter based on LEDs and a smart phone // Microchem. J. 2021. V. 171. Article 106773.
 95. Sergeeva T.A., Yarynka D., Piletska E., Linnik R., Zaporozhets O., Brovko O., Piletsky S.A., El'skaya A.V. Development of a smartphone-based biomimetic sensor for aflatoxin B1 detection using molecularly imprinted polymer membranes // Talanta. 2019. V. 201. P. 204.
 96. Hu X., Shi J., Shi Y., Xiaobo Z., Arslan M., Zhang W., Xiaowei H., Zhihua L., Xu Y. Use of a smartphone for visual detection of melamine in milk based on Au@Carbon quantum dots nanocomposites // Food Chem. 2019. V. 272. P. 58.
 97. Yang N., Xie L., Pan C., Yuan M., Tao Z., Mao H. A novel on-chip solution enabling rapid analysis of melamine and chloramphenicol in milk by smartphones // J. Food Process Eng. 2018. V. 42. Article e12976.
 98. Li Y., He L., Ge Y., Song G., Zhou J. Smartphone-assisted visual ratio-fluorescence detection of hypochlorite based on copper nanoclusters // Spectrochim. Acta A. 2021. V. 255. Article 119740.
 99. Zangheri M., Nardo F.D., Calabria D., Marchegiani E., Anfossi L., Guardigli M., Mirasole M., Baggiani C., Roda A. Smartphone biosensor for point-of-need chemiluminescence detection of ochratoxin A in wine and coffee // Anal. Chim. Acta. 2021. V. 1163. Article 338515.
 100. Амелин В.Г., Шаока З.А.Ч., Большаков Д.С. Микроэкстракционно-цветометрическое (флуориметрическое) определение катионных и анионных ПАВ в пищевых продуктах // Журн. аналит. химии. 2021. Т. 76. № 3. С. 234.
 101. Thom N.K., Lewis G.G., Yeung K., Phillips S.T. Quantitative fluorescence assays using a self-powered paper-based microfluidic device and a camera-equipped cellular phone // RSC Adv. 2014. V. 4. P. 1334.
 102. Kaoutit E.H., Estevez P., Garcia F.C., Serna F., Garcia J.M. Sub-ppm quantification of Hg(II) in aqueous media using both the naked eye and digital information from pictures of a colorimetric sensory polymer membrane taken with the digital camera of a conventional mobile phone // Anal. Methods. 2013. V. 5. P. 54.
 103. Joao A.F., Squizzato A.L., Fernandes G.M., Cardoso R.M., Batista A.D., Munoz R.A.A. Iron(III) determination in bioethanol fuel using a smartphone-based device // Microchem. J. 2019. V. 146. P. 1134.
 104. Koesdjojo M.T., Pengpumkiat S., Wu Y., Boonloed A., Huynh D., Remcho T.P., Remcho V.T. Cost effective paper-based colorimetric microfluidic devices and mobile phone camera readers for the classroom // J. Chem. Educ. 2015. V. 92. № 4. P. 737.
 105. Kumar A., Sahoo P.R., Arora P., Kumar S. A light controlled, sensitive, selective and portable spiropyran based receptor for mercury ions in aqueous solution // J. Photochem. Photobiol. 2019. V. 384. Article 112061.
 106. Espino M., Fernandez M.D.L.A., Silva M.F., Gomez F.J.V. Paper microzone plates integrating natural deep eutectic solvents: Total phenolic compounds and antioxidant capacity as performed by nature // Microchem. J. 2020. V. 158. Article 105296.
 107. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. I. М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения, 2018. 1814 с.
 108. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. III. М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения, 2018. 5187 с.
 109. ГОСТ Р 52249-2009. Правила производства и контроля качества лекарственных средств. М.: Стандартинформ, 2010. 139 с.
 110. Амелин В.Г., Шаока З.А.Ч., Большаков Д.С. Твердофазно-флуориметрическое определение тетрациклинов на целлюлозной бумаге и тонком слое силикагеля в лекарственных препаратах с использованием смартфона // Хим.-фарм. журн. 2021. Т. 55. № 3. С. 52.
 111. Амелин В.Г., Шаока З.А.Ч., Большаков Д.С. Твердофазно-флуориметрическое определение хинолонов на целлюлозной бумаге и тонком слое силикагеля в лекарственных препаратах с использова-

- нием смартфона // Журн. аналит. химии. 2021. Т. 76. №7. С. 593.
112. *Амелин В.Г., Шаока З.А.Ч., Большаков Д.С.* Использование смартфона в твердофазно-флуориметрическом определении некоторых нестероидных противовоспалительных средств в лекарственных препаратах // Хим.-фарм. журн. 2021. Т. 55. № 9. С. 54.
113. *Амелин В.Г., Шаока З.А.Ч., Большаков Д.С., Третьяков А.В.* Цифровая цветометрия индикаторных тест-систем с использованием смартфона и хеометрического анализа при определении хинолонов в лекарственных препаратах // Журн. прикл. спектроск. 2022. Т. 89. № 1. С. 84.
114. *Амелин В.Г., Шаока З.А.Ч., Большаков Д.С.* Микроэкстракционно-цветометрическое определение и идентификация антибиотиков пенициллинового ряда в лекарственных средствах с использованием смартфона и хеометрического анализа // Вестн. Моск. ун-та. Серия 2. Химия. 2022. Т. 63. № 3. С. 222.
115. *Амелин В.Г., Шаока З.А.Ч., Большаков Д.С., Третьяков А.В.* Цифровая цветометрия индикаторных тест-систем с использованием смартфона и хеометрического анализа при определении тетрациклинов в лекарственных препаратах // Изв. вузов. Химия и хим. технология. 2022. Т. 65. Вып. 7. С. 17.
116. *Амелин В.Г., Майя М., Большаков Д.С.* Микроэкстракционно-цветометрическое определение четвертичных аммониевых соединений в лекарственных и дезинфицирующих средствах // Вестн. Моск. ун-та. Серия 2. Химия. 2021. Т. 62. № 2. С. 121.
117. *Амелин В.Г., Шаока З.А.Ч.* Использование смартфона при идентификации и классификации природных минеральных вод по цветометрии индикаторных бумаг // Журн. аналит. химии. 2022. Т. 77. № 7. С. 638.
118. *Шаока З.А.Ч., Амелин В.Г., Репкин Р.В.* Идентификация природных минеральных вод Владимирской области по цветометрии индикаторных бумаг с использованием смартфона // Вестн. Моск. ун-та. Серия 2. Химия. 2022. Т. 63. № 3. С. 233.
119. *Silva Neto G.F., Braga A.F.J.W.B.* Classification of mineral waters based on digital images acquired by smartphones // Quim. Nova. 2016. V. 39. № 7. P. 876.
120. *Zaragoza P., Fuentes A., Ruiz-Rico M., Vivancos J., Fernandez-Segovia I., Ros-Lis J.V., Barat J.M., Martinez-Manez R.* Development of a colorimetric sensor array for squid spoilage assessment // Food Chem. 2015. V. 175. P. 315.
121. *Huang X., Xin J., Zhao J.* A novel technique for rapid evaluation of fish freshness using colorimetric sensor array // J. Food Eng. 2011. V. 105. P. 632.
122. *Bueno L., Paixao T.R.L.C.* A copper interdigitated electrode and chemometrical tools used for the discrimination of the adulteration of ethanol fuel with water // Talanta. 2011. V. 87. P. 210.
123. *Nguyen T.T., Huy B.T., Lee Y.* Disposable colorimetric paper-based probe for the detection of amine-containing gases in aquatic sediments // ACS Omega. 2019. V. 4. P. 12665.
124. *Zhang C., Bailey D.P., Suslick K.S.* Colorimetric sensor arrays for the analysis of beers: A feasibility study // J. Agric. Food Chem. 2006. V. 54. P. 4925.
125. *Zhang C., Suslick K.S.* Colorimetric sensor array for soft drink analysis // J. Agric. Food Chem. 2007. V. 55. P. 237.
126. *Suslick B.A., Feng L., Suslick K.S.* Discrimination of complex mixtures by a colorimetric sensor array: coffee aromas // Anal. Chem. 2010. V. 82. P. 2067.
127. *Feng L., Musto C.J., Kemling J.W., Lim S.H., Zhong W., Suslick K.S.* Colorimetric sensor array for determination and identification of toxic industrial chemicals // Anal. Chem. 2010. V. 82. № 22. P. 9433.

УДК 543.5:543.9

ПРИМЕНЕНИЕ МАГНИТНЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОКОМПОЗИТОВ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ РАСПОЗНАЮЩЕГО СЛОЯ ПЬЕЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ИММУНОСЕНСОРА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЕНИЦИЛЛИНА G

© 2023 г. Е. В. Бизина^{а, *}, О. В. Фарафонова^а, Н. И. Золотарева^б,
С. С. Гражулене^б, Т. Н. Ермолаева^а

^аЛипецкий государственный технический университет
ул. Московская, 30, Липецк, 398055 Россия

^бИнститут проблем технологии микроэлектроники и особо чистых материалов Российской академии наук
ул. Академика Осипьяна, 6, Черноголовка, 142432 Россия

*e-mail: katarina.bizina1821@mail.ru

Поступила в редакцию 12.08.2022 г.

После доработки 22.10.2022 г.

Принята к публикации 24.10.2022 г.

Изучены условия формирования распознающего слоя пьезоэлектрического иммуносенсора на основе магнитных углеродных наноконкомпозитов (МУНК) под действием внешнего магнитного поля. Установлено влияние размера и количества магнитных наночастиц (МНЧ) в композите на аналитические характеристики гравиметрического иммуносенсора. Методом сканирующей электронной микроскопии определены средние размеры магнитных наночастиц Fe_3O_4 , синтезированных методом соосаждения. Отмечено, что минимальная масса и стабильность распознающего слоя наблюдаются для наноконкомпозита, полученного при соотношении углеродных нанотрубок и МНЧ со средним диаметром 22 нм, равном 3 : 1. Методом ИК-спектроскопии установлено образование пептидных связей между МУНК и конъюгатом пенициллина G. Показано, что применение магнитных углеродных наноконкомпозитов при формировании распознающего слоя позволяет существенно упростить процедуру подготовки пьезоэлектрического сенсора к анализу и сократить ее продолжительность с 24 до 1.5 ч. Диапазон определяемых концентраций антибиотика составляет 1–450 нг/мл, предел обнаружения равен 0.5 нг/мл.

Ключевые слова: пьезоэлектрический иммуносенсор, магнитные углеродные наноконкомпозиты, распознающий слой, магнитные наночастицы, многослойные углеродные нанотрубки, пенициллин G.

DOI: 10.31857/S0044450223040060, EDN: KZKTKE

Существенным преимуществом гравиметрических пьезоэлектрических иммуносенсоров является возможность прямого измерения аналитического сигнала по увеличению массы распознающего слоя при протекании гетерогенной иммунохимической реакции без применения специальной метки [1–4]. Такие устройства просты в обращении и позволяют с высокими чувствительностью и экспрессностью проводить селективное определение аналитов в пробах сложного состава в присутствии большого числа посторонних веществ [5].

Важнейшей задачей при разработке пьезоэлектрических иммуносенсоров является формирование устойчивого распознающего слоя, позволяющего осуществлять многократные измерения после регенерации, а также увеличение концентрации и поверхностной доступности активных “сайтов” связывания. Наиболее часто в

качестве распознающего слоя используют многослойные покрытия с прочными связями между отдельными слоями, включающие создание на поверхности электрода самоорганизованного монослоя тиолов или силанов, электрогенерированных пленок, активацию их бифункциональным реагентом и иммобилизацию антител или белковых конъюгатов аналитов [6, 7]. Процесс формирования многослойного покрытия, как правило, продолжителен и не всегда приводит к образованию устойчивого слоя. Для повышения площади активной поверхности сенсора, обеспечивающей высокую чувствительность определения, наиболее перспективно использование углеродных нанотрубок (УНТ), характеризующихся низкой массой и высокоразвитой поверхностью [8, 9].

Другим многообещающим наноматериалом, используемым в химической сенсорике, являются

ся магнитные наночастицы (МНЧ) [10–12]. Это связано с их уникальными свойствами: простотой синтеза, легкостью функционализации поверхности, высоким магнетизмом и низкой цитотоксичностью [13, 14]. Имеется информация о применении МНЧ в пьезоэлектрических сенсорах, предназначенных для предварительного концентрирования [15] и определения высокомолекулярных соединений в прямом или конкурентном форматах иммуноанализа [16, 17].

Перспективно также использование в иммуносенсорах магнитных углеродных наноконкомпозитов (МУНК) — комбинации магнитных наночастиц с углеродными нанотрубками. Применение МУНК способствует не только увеличению площади активной поверхности распознающего слоя сенсора, но и позволяет осуществлять формирование рецепторного покрытия под действием внешних магнитных сил [18]. Однако влияние размера и концентрации МНЧ, присутствующих в структуре МУНК, на метрологические характеристики гравиметрического пьезоэлектрического иммуносенсора пока практически не изучено.

Целью работы являлось изучение условий формирования распознающего слоя пьезоэлектрического сенсора на основе МУНК, влияния размеров и концентрации МНЧ на чувствительность детектирования и диапазон определяемых содержаний пенициллина G (Пен G).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и оборудование. Использовали следующие иммунореагенты: бензилпенициллина натриевую соль (пенициллин G) (Биохимик, Россия), поликлональные антитела к Пен G (Abscam, Великобритания).

В ходе исследования применяли следующие реагенты: $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Na_2CO_3 , KH_2PO_4 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, NaHCO_3 , HCl ($\rho = 1.198$ г/мл), KCNS (Реахим, Россия); NH_3 , NaOH , NaCl и KCl (База № 1 Химреактивов, Россия); малоновую кислоту (Вектон, Россия); Тритон X-100, 2-амино-3-меркаптопропановую кислоту (цистеин), N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида гидрохлорид (ЭДАК), N-гидроксисукцинимид (N-ГС), N,N'-дициклогексилкарбодиимид (ДСС) 3-аминопропилтриэтоксисилан (АПТЕС) (Sigma-Aldrich, США); диметилформамид (ДМФ) (Sigma, Германия); ацетон и этанол (Química, Испания); бычий сывороточный альбумин (БСА) (ПанЭко, Россия).

Для синтеза магнитных углеродных наноконкомпозитов использовали многостенные углеродные нанотрубки (Институт проблем технологии микроэлектроники и особо чистых материалов РАН, Черноголовка) [19].

В качестве сенсоров применяли пьезокварцевые резонаторы АТ-среза с собственной частотой колебаний 10 МГц с золотыми электродами с двух сторон кристалла диаметром 8 мм, полученными методом магнетронного напыления (ЭТНА, Россия). Аналитический сигнал регистрировали на измерительной установке CPNA-330 (ЭТНА, Россия).

Массу покрытия рассчитывали по уравнению Зауэрбрея [20]:

$$\Delta f = \frac{-2.3 f_0^2 \times 10^6 \Delta m}{A}, \quad (1)$$

где Δf — изменение частоты колебаний кристалла кварца, Гц; f_0 — собственная частота колебаний кристалла, 10 МГц; Δm — масса нанесенного на электрод покрытия, г; A — площадь поверхности электрода, 0.10066 см^2 .

Число циклов измерений (N) — число последовательных измерений, при котором аналитический сигнал сенсора не изменяется более чем на 5%.

Закрепление МНЧ на поверхности углеродных нанотрубок, а также их размер контролировали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на электронно-ионном микроскопе TESCAN VEGA3 SBH (Tescan, Чехия).

Образование связей между конъюгатом Пен G и МУНК контролировали методом ИК-спектрометрии (ИК-Фурье спектрометр Irtaffinity-1 (Shimadzu, Япония)). ИК-спектры регистрировали после нанесения на подложку (пластина монокристаллического кремния КЭС-0.01, “ПРОМТЕХ”, Россия) 100 мкл исследуемого раствора и высушивания в потоке теплого воздуха.

Для предотвращения агломерации дисперсий МУНК и УНТ использовали ультразвуковую ванну (ПСБ-Галас, Россия).

Синтез магнитных наночастиц. Использовали МУНК, полученные путем иммобилизации на поверхности УНТ магнитных наночастиц Fe_3O_4 , синтезированных по методу соосаждения при разных мольных соотношениях ионов $\text{Fe}^{2+} : \text{Fe}^{3+} : \text{OH}^-$, pH реакционной среды, температуре [21–23] и продолжительности ультразвуковой обработки (τ , ч) (табл. 1).

Наночастицы отделяли от раствора при помощи магнита, промывали до pH 7 и высушивали при 60°C до постоянной массы. Силанизацию Fe_3O_4 осуществляли двумя способами:

Способ 1: наночастицы Fe_3O_4 массой 100 мг вносили в раствор, содержащий 200 мл этанола и 4 мл дистиллированной воды, обрабатывали ультразвуком в течение 1 ч. Далее вводили 40 мл АПТЕС и перемешивали в течение 7 ч. Осадок отделяли центрифугированием (10000 об./мин),

Таблица 1. Условия синтеза магнитных наночастиц

Способ	Молярное соотношение $\text{Fe}^{2+} : \text{Fe}^{3+} : \text{OH}^-$	pH	Температура, °C	τ , ч	Литература
1	2 : 1 : 6.5	7	80	1	[22]
2	2 : 1 : 6.5	7	80	14	[22]
3	2 : 1 : 37.5	4	80	1	[23]
4	2 : 1 : 6.5	7	70–90	1	[24]

промывали до pH 7 и высушивали при 80°C до постоянной массы [24].

Способ 2: наночастицы Fe_3O_4 массой 300 мг помещали в колбу, содержащую 150 мл 0.05 М раствора NaOH, нагревали до 65°C в течение 5 ч и оставляли на ночь при комнатной температуре. Образующийся осадок активированных магнитных наночастиц отделяли при помощи магнита, промывали дистиллированной водой до pH 7 и высушивали до постоянной массы. Далее проводили силанизацию магнитных частиц: 190 мг активированных МНЧ вносили в 96 мл этанола и подвергали ультразвуковой обработке в течение 10 мин. К полученной суспензии добавляли 111 мл АПТЕС и перемешивали в течение 20 ч. Органическую фазу удаляли, удерживая магнитные наночастицы при помощи магнита, осадок промывали водой до pH 7 и высушивали до постоянной массы [25].

Синтез магнитных углеродных нанокмполитов осуществляли смешиванием магнитных наночастиц с углеродными нанотрубками в 30 мл деионизованной воды. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин. Образующийся магнитный композит промывали деионизованной водой и высушивали под ИК-лампой до постоянной массы. Таким образом синтезировали ряд нанокмполитов с разным соотношением УНТ : МНЧ – 1 : 1, 2 : 1, 3 : 1, 7 : 1 и 10 : 1 [26].

Формирование распознающего слоя на основе МУНК. Перед формированием распознающего слоя поверхность электрода очищали с помощью 1 М HCl, ацетона и этанола.

Для предотвращения агломерации 1 мг МУНК вносили в 1 мл 1%-ного водного раствора Тритона X-100 и подвергали ультразвуковой обработке в течение 1 ч [18]. Иммунизацию молекул Пен G–БСА на поверхности МУНК осуществляли следующим образом: к 10 мкл дисперсии нанокмполита в 1%-ном водном растворе Тритона X-100 добавляли 10 мкл активационной смеси (2.5 мг ЭДАК и 5 мг N-ГС в 200 мкл 1%-ного водного раствора Тритона X-100) и оставляли на 20 мин при комнатной температуре. Далее в систему вводили 10 мкл раствора Пен G–БСА фиксированной концентрации и оставляли на 10–12 ч при 4°C для получения устойчивого нанокмполита МУНК/Пен G–БСА.

сированной концентрации и оставляли на 10–12 ч при 4°C для получения устойчивого нанокмполита МУНК/Пен G–БСА.

Сенсор помещали в ячейку детектирования над неодимовым магнитом, наносили на золотой электрод 2 мкл дисперсии МУНК/Пен G–БСА и оставляли на 90 мин на воздухе при комнатной температуре, после чего промывали 200 мкл дистиллированной воды для удаления несвязавшихся компонентов и высушивали в потоке теплого воздуха.

Формирование распознающего слоя на основе углеродных нанотрубок. В 1 мл ДМФ вносили 1 мг карбоксилированных углеродных нанотрубок и подвергали ультразвуковой обработке в течение 1 ч, после чего разбавляли дисперсию ДМФ в соотношении 1 : 7 (143 мкг/мл) и вновь обрабатывали ультразвуком в течение 1 ч. Для иммобилизации белкового конъюгата Пен G на поверхность пьезоэлектрического сенсора помещали 2 мкл 1 М этанольного раствора цистеина и высушивали при комнатной температуре в течение 90 мин, после чего наносили 2 мкл суспензии УНТ и оставляли при 4°C на 24 ч. Сенсор промывали 200 мкл дистиллированной воды, высушивали в потоке теплого воздуха и проводили активацию карбоксильных групп на поверхности УНТ с помощью 2 мкл активационной смеси, содержащей 2.5 мг ЭДАК и 5 мг N-ГС в 200 мл ДМФ. Выдерживали сенсор 90 мин при комнатной температуре и наносили 5 мкл белкового конъюгата Пен G, после чего помещали сенсор во влажную камеру при 4°C на 10–12 ч. Вновь промывали дистиллированной водой и сушили в потоке теплого воздуха [9].

Процедура измерения аналитического сигнала иммуносенсора методом “deep-and-dry”. Для определения Пен G в конкурентном формате иммуноанализа к пробе добавляли раствор антител с концентрацией, соответствующей 50%-ному связыванию в гомогенный иммунокомплекс, и выдерживали 15 мин. Далее 2 мкл пробы наносили на поверхность распознающего слоя сенсора и после завершения реакции (15 мин) между свободными антителами пробы и конъюгатом Пен G–БСА промывали поверхность сенсора дистиллированной водой.

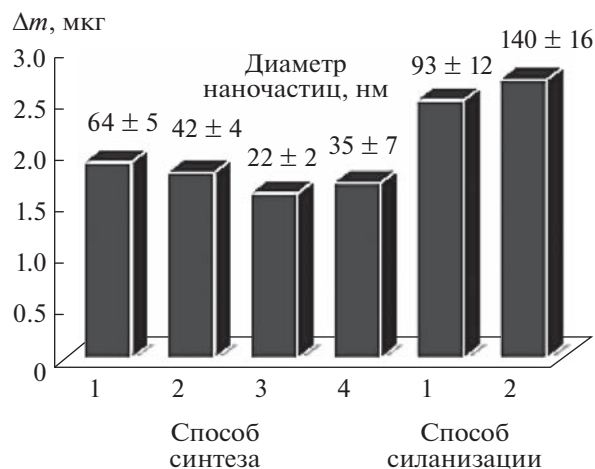


Рис. 1. Влияние способа синтеза на массу и диаметр магнитных наночастиц.

ной водой для удаления несвязавшихся биореагентов и высушивали до постоянной массы в потоке теплового воздуха [27].

После измерения аналитического сигнала поверхность распознающего слоя регенерировали 200 мкл 0.003 М раствора тиоционата калия. Через 15 мин сенсор промывали дистиллированной водой и высушивали до постоянной массы в потоке воздуха.

Синтез белкового конъюгата пенициллина G. Белковый конъюгат Пен G синтезировали по следующей методике: 50 мг Пен G, 45 мг N-ГС и 72 мг ДСС растворяли в 1 мл ДМФ и перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч, после чего выдерживали при 4°C в течение 12 ч. Образовавшийся осадок отделяли центрифугированием (4 мин, 8000 об./мин). Верхний слой жидкости объемом 0.5 мл отделяли и при перемешивании по каплям добавляли к раствору, содержащему 50 мг БСА в 3.5 мл 0.1 М карбонатного буферного раствора (pH 9.5), смесь перемешивали в течение 3 ч при 25°C и оставляли на 12 ч при 4°C. После инкубации полученный раствор очищали диализом против фосфатного буферного раствора (pH 7.2) в течение двух суток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Формирование распознающего слоя пьезоэлектрического сенсора на основе магнитных углеродных наноконкомпозитов. Важнейшими характеристиками распознающего слоя пьезоэлектрического сенсора являются:

— масса (высокая масса слоя приводит не только к сужению диапазона определяемых концентраций, но и может быть причиной срыва аналитического сигнала сенсора);

— площадь активной поверхности, влияющая на концентрацию и доступность активных “сайтов” связывания, обеспечивающих чувствительность определения;

— устойчивость, позволяющая осуществлять регенерацию поверхности после каждого цикла измерения без существенного изменения свойств покрытия.

Изучили влияние способа синтеза на диаметр и массу МНЧ, которые устанавливали методами СЭМ и пьезокварцевого микровзвешивания соответственно (рис. 1). Ранее показано [28], что магнитные свойства в максимальной степени проявляются у МНЧ со средним диаметром 10–20 нм. При синтезе наночастиц способом 1 происходит формирование крупных ядер Fe_3O_4 ($\Phi = 64 \pm 5$ нм). Наноконкомпозит на их основе продемонстрировал хорошие магнитные свойства, обеспечивающие стабильное закрепление покрытия на поверхности сенсора, но при этом высокую массу формируемого слоя ($\Delta m = 1.9 \pm 0.1$ мкг), негативно влияющую на диапазон определяемых содержаний. При получении наночастиц способом 2, отличающимся от предыдущего способа продолжительностью УЗ-обработки, наблюдали уменьшение среднего диаметра ($\Phi = 42 \pm 4$ нм), но увеличение дисперсии размеров частиц. Среди синтезированных магнитных наночастиц Fe_3O_4 наименьший средний диаметр и масса формируемого слоя отмечены у структур, полученных способом 3 ($\Phi = 22 \pm 2$ нм, $\Delta m = 1.6 \pm 0.1$ мкг). Установили, что увеличение концентрации OH^- -ионов при постоянном соотношении $\text{Fe}^{3+} : \text{Fe}^{2+}$ и ультразвуковая обработка по окончании синтеза способствуют уменьшению диаметра МНЧ (способ 3). Постепенное увеличение температуры синтеза от 70 до 90°C приводит к получению МНЧ небольшого диаметра (способ 4, $\Phi = 35 \pm 7$ нм, $\Delta m = 1.7 \pm 0.3$ мкг), но неоднородных по размеру, что также не позволяет использовать их в гравиметрических пьезоэлектрических сенсорах.

Для более надежного закрепления магнитных наночастиц на поверхности углеродных нанотрубок изучили возможность применения МНЧ с оболочкой на основе кремнезема. Силанизация приводит к образованию на поверхности МНЧ аминогрупп, которые связываются с карбоксильными группами УНТ с образованием пептидной связи. Отмечено, что синтез кремниевой оболочки на поверхности наночастиц Fe_3O_4 (рис. 1) со средним диаметром 22 нм приводит к увеличению диаметра МНЧ до 93 нм (способ 1) или 140 нм (способ 2). Соответственно происходит увеличение массы слоя МУНК на базе МНЧ, модифицированных АПТЕС, до 2.5 ± 0.1 мкг (способ 1) и до 2.7 ± 0.2 мкг (способ 2). В дальнейших исследованиях применяли наноконкомпозиты с МНЧ Fe_3O_4 минимального размера с $\Phi = 22 \pm 2$ нм

Таблица 2. Влияние соотношения компонентов на характеристики массы покрытия

Соотношение УНТ : МНЧ	$\Delta m_{\text{МУНК}}, \text{ мкг}$	$\Delta m_{\text{слоя}}, \text{ мкг}$	$\Delta m_{\text{биомолекул}}, \text{ мкг}$	N
1 : 1	1.5 ± 0.3	2.0 ± 0.4	0.4	34
2 : 1	1.6 ± 0.1	2.1 ± 0.1	0.5	33
3 : 1	1.7 ± 0.1	2.2 ± 0.1	0.6	32
7 : 1	1.3 ± 0.4	1.8 ± 1.2	0.5	14
10 : 1	1.2 ± 0.2	1.5 ± 0.1	0.3	6

(МУНК_А) и с МНЧ Fe₃O₄@SiO₂, обеспечивающими более высокую стабильность распознающего слоя, с $\Phi = 93 \pm 12 \text{ нм}$ (МУНК_В).

На характеристики рецепторного слоя пьезоэлектрического сенсора существенно влияет соотношение количества углеродных нанотрубок и МНЧ в МУНК. Избыточная концентрация частиц Fe₃O₄ может не только быть причиной срыва аналитического сигнала гравиметрического сенсора, но и приводить к стерическим затруднениям при связывании МУНК с белковым конъюгатом Пен G через поверхностные карбоксильные группы УНТ, и, соответственно, к уменьшению чувствительности определения аналита. С другой стороны, недостаток МНЧ в составе МУНК уменьшает магнитные свойства [26], что приводит к снижению устойчивости покрытия сенсора, сформированного под действием внешних магнитных сил.

Методом пьезокварцевого микровзвешивания контролировали массу распознающего слоя на каждом этапе его формирования (табл. 2). Сначала регистрировали массу нанокompозита ($\Delta m_{\text{МУНК}}$) после нанесения его на поверхность электрода сенсора. А затем определяли массу нанокompозита с иммобилизованным на его поверхности белковым конъюгатом ($\Delta m_{\text{слоя}}$). Массу биомолекул конъюгата антибиотика, иммобилизованных на поверхности МУНК, рассчитывали по разности ($\Delta m_{\text{биомолекул}}$).

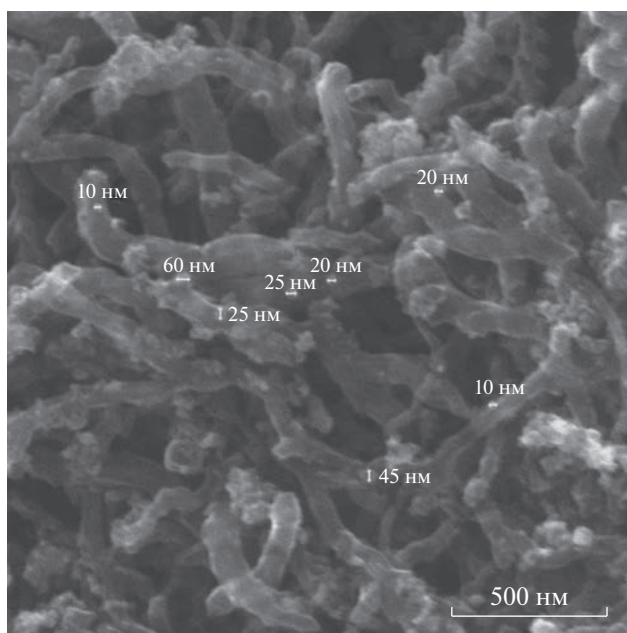
Увеличение соотношения УНТ : МНЧ свыше 3 : 1 приводит к получению нестабильного покрытия (N ниже 15), так как присутствующие в композите МНЧ не обеспечивают достаточно прочного удерживания МУНК на поверхности сенсора под действием магнитного поля. Для нанокompозитов с соотношениями УНТ : МНЧ 7 : 1 и 10 : 1 уменьшается масса распознающих молекул Пен G—БСА, зафиксированных на поверхности. Это связано с тем, что нанокompозиты с низким содержанием МНЧ не обеспечивают надежное закрепление на поверхности МУНК высоких концентраций Пен G—БСА, из-за чего часть их

теряется при промывке сенсора, что приводит к снижению чувствительности определения антибиотика. При использовании подложки на базе нанокompозита с соотношением УНТ : МНЧ, равным 1 : 1, отмечается низкая воспроизводимость значений $\Delta m_{\text{МУНК}}$ и $\Delta m_{\text{слоя}}$, что недопустимо для гравиметрического сенсора. В то же время покрытия на основе МУНК с соотношениями УНТ : МНЧ, равными 2 : 1 и 3 : 1, показали близкие характеристики. Однако для соотношения 3 : 1 наблюдали максимальное количество достижимых «сайтов» связывания, а также высокие магнитные свойства нанокompозита, обеспечивающие надежную фиксацию распознающего слоя на поверхности пьезоэлектрического сенсора под действием внешних магнитных сил.

При анализе нанокompозитов методом сканирующей электронной микроскопии установили, что, независимо от формы и размера, МНЧ в МУНК располагаются на сгибах и разломах углеродных нанотрубок. В случае нанокompозита с концентрацией компонентов, равной 3 : 1 (МУНК_А), магнитные наночастицы равномерно распределяются на поверхности углеродных нанотрубок за счет физической сорбции (рис. 2). Аналогичные закономерности отмечены и для нанокompозита на основе наночастиц Fe₃O₄@SiO₂. Схемы формирования нанокompозитов МУНК_А и МУНК_В представлены на рис. 3.

На массу распознающего слоя МУНК значительное влияние оказывает способ перевода нанокompозита в дисперсное состояние [18]. Для предотвращения агломерации магнитные углеродные нанокompозиты вносили в водный раствор Тритона X-100, так как данное неионогенное поверхностно-активное вещество обеспечивает достаточную смачиваемость наноматериала водой, что позволяет добиться равномерного распределения МУНК на поверхности пьезоэлектрического гравиметрического сенсора.

Образование связей между конъюгатом антибиотика и магнитными углеродными нанокompозитами подтверждено методом ИК-спектроскопии.


 Рис. 2. СЭМ-изображение МУНК_А.

рии (рис. 4). В случае МУНК_А (рис. 4а) значительное уширение и сдвиг пика карбоксильных групп в спектре МУНК_А/Пен G–БСА относительно спектра МУНК_А с 1720 до 1800 см⁻¹ свидетельствует об их участии в образовании связей. О связывании конъюгата с наноккомпозитом также говорит пик амидной связи в спектре МУНК_Б (1485 см⁻¹) объясняется взаимодействием аминогрупп наночастиц Fe₃O₄@SiO₂ и карбоксильных групп УНТ. Его уширение в спектре четкое проявление пика при 1496 см⁻¹ в спектре МУНК_А/Пен G–БСА, соответствующего пептидной связи. В спектре МУНК_Б/Пен G–БСА (рис. 4б) пик, отвечающий колебаниям группы C=O, смещается и вытягивается относительно спектра МУНК_Б (1705 вместо 1655 см⁻¹). ре наноккомпозита МУНК_Б/Пен

G–БСА указывает на образование связей между карбоксильными группами УНТ и белковым конъюгатом антибиотика. Присутствие в спектрах МУНК_Б и МУНК_Б/Пен G–БСА пика в области 1100 см⁻¹ свидетельствуют о наличии оболочки SiO₂ на поверхности наночастиц магнетита.

Методика определения пенициллина G с помощью пьезоэлектрического иммуносенсора. Пенициллин G определяли при помощи пьезоэлектрического иммуносенсора в конкурентном формате иммуноанализа. Рабочую концентрацию иммобилизованного на поверхности сенсора конъюгата Пен G–БСА, существенно влияющую на концентрацию активных сайтов связывания, определяли по максимуму на графике зависимости аналитического сигнала от концентрации конъюгата. Для МУНК_А рабочая концентрация конъюгата

Таблица 3. Аналитические характеристики пьезоэлектрических иммуносенсоров для определения пенициллина G с распознающими покрытиями на основе УНТ, МУНК_А и МУНК_Б

Вид покрытия	Диапазон определяемых содержаний, нг/мл	Уравнение градуировочного графика	R ²	c _{min} , нг/мл
УНТ	6–300	$\Delta f = (1522 \pm 155) - (3.3 \pm 0.9)c$	0.97	3
МУНК _А	1–450	$\Delta f = (2740 \pm 100) - (3.8 \pm 0.4)c$	0.99	0.5
МУНК _Б	10–300	$\Delta f = (2072 \pm 172) - (5.1 \pm 1.8)c$	0.97	5

Примечание: Δf , Гц; c, нг/мл.

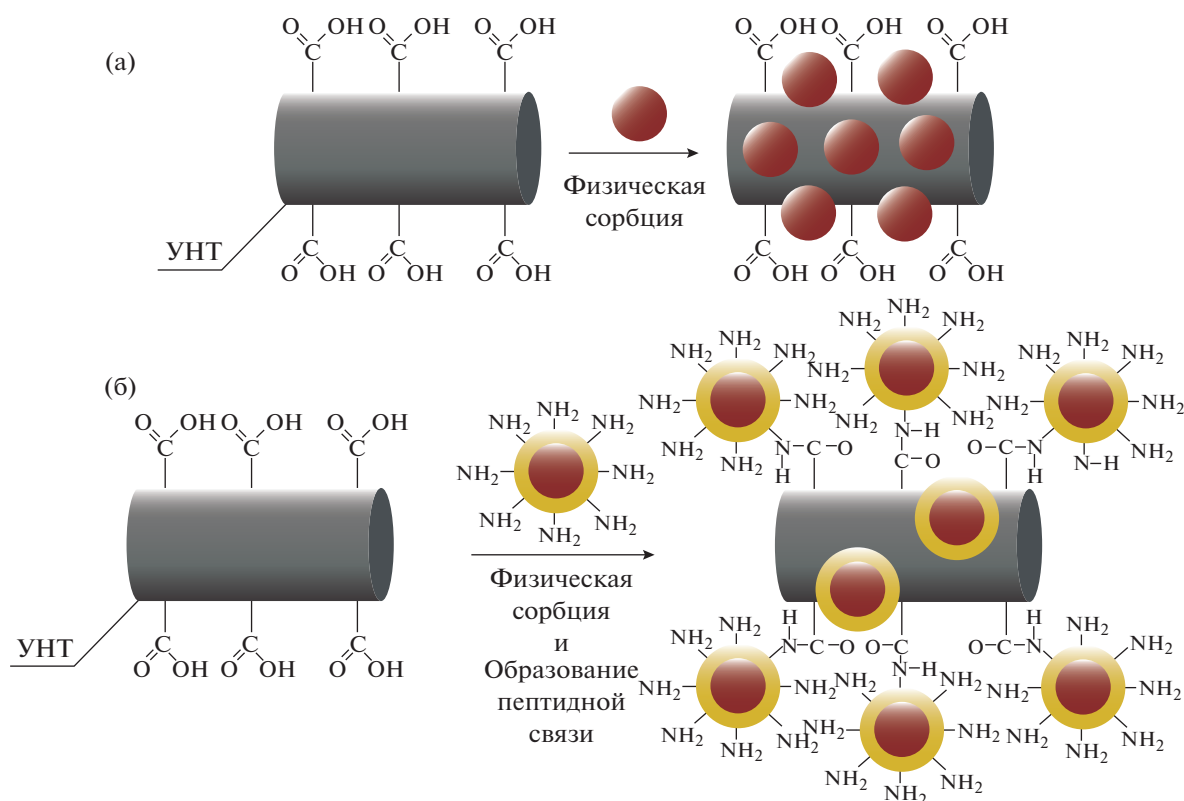


Рис. 3. Схема формирования магнитных углеродных нанокомпозитов на основе наночастиц Fe_3O_4 (а) и $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ (б).

югата составила 0.67 мМ (рис. 5а), для МУНК_Б – 0.43 мМ (рис. 5б).

Разбавление сыворотки антител, соответствующей 50%-ному связыванию с конъюгатом на поверхности сенсора, выбирали на линейном участке зависимости аналитического сигнала от концентрации антител: для подложки на основе МУНК_А разбавление первичной сыворотки антител составило 20/80 (рис. 5в), а для МУНК_Б – 12/88 (рис. 5г). Как видно, применение в МУНК магнитных наночастиц меньшего диаметра сопровождается увеличением концентрации иммобилизованного на поверхности сенсора конъюгата и, следовательно, количества активных “сайтов” связывания. Установлены характеристики сенсоров с распознающим слоем на основе раз-

личных магнитных углеродных нанокомпозитов (табл. 3). Для сравнения приведены характеристики пьезоэлектрического сенсора на базе УНТ.

Наибольший диапазон определяемых содержаний Пен G достигается при применении МУНК_А. Использование для формирования распознающего слоя, включающего магнитные частицы $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$, УНТ или МУНК_Б сопровождается сужением диапазона определяемых содержаний из-за более низкой концентрации конъюгата Пен G на поверхности электрода сенсора. Кроме того, увеличивается продолжитель-

Таблица 4. Результаты (нг/мл) определения пенициллина G в модельных растворах методом введено–найденно ($t_{\text{табл}} = 2.1$, $n = 5$, $P = 0.95$)

Введено	Найдено	s_r	$t_{\text{эксп}}$
50	53 ± 1	0.02	2.0
100	101 ± 4	0.01	0.8
300	305 ± 8	0.01	1.9

Таблица 5. Результаты (нг/мл) определения пенициллина G в молоке и мясе ($n = 5$, $P = 0.95$)

Введено	Найдено		s_T
	с добавкой	без добавки	
Свинина			
50	52 ± 9	2 ± 1	0.07
100	102 ± 11	2 ± 1	0.04
Молоко			
50	55 ± 8	5 ± 1	0.06
100	108 ± 8	8 ± 2	0.03

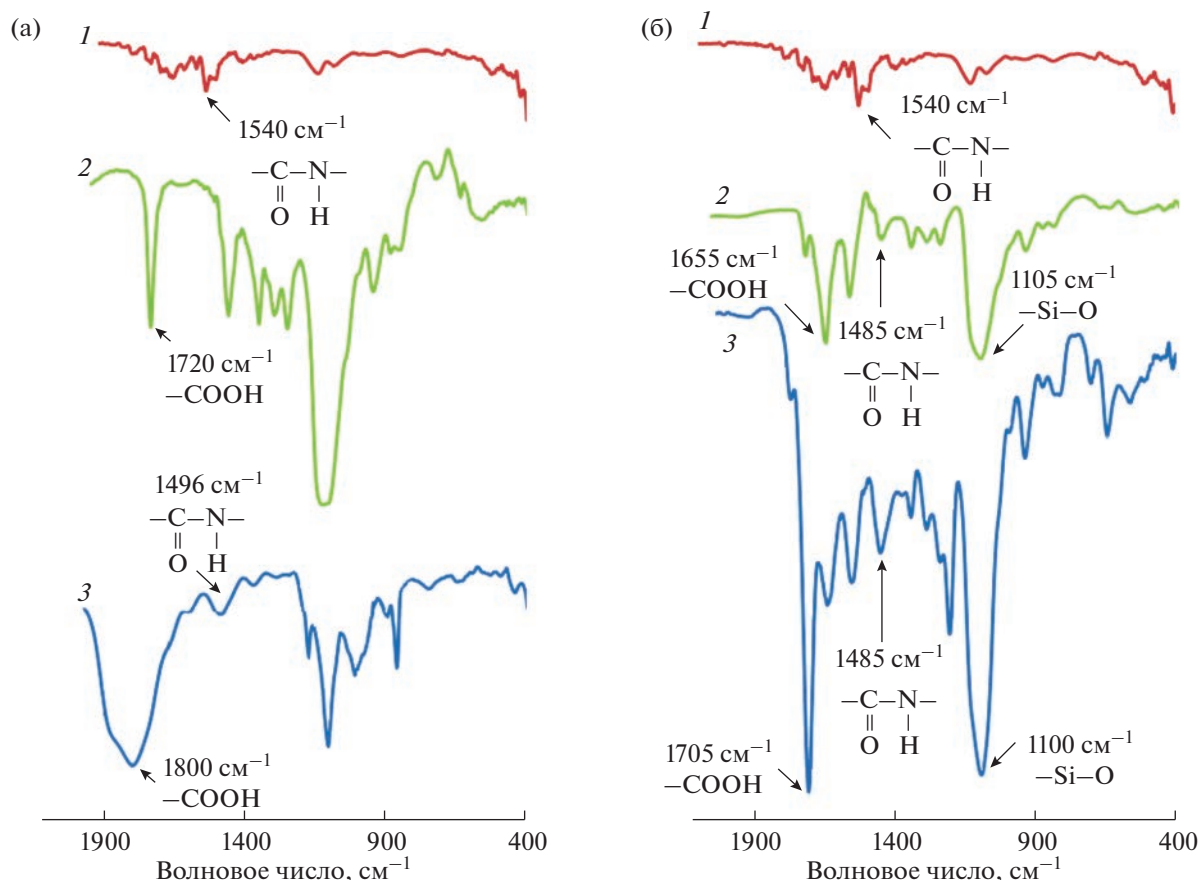


Рис. 4. ИК-спектр МУНК_А (а) и МУНК_В (б): 1 – Пен Г–БСА; 2 – МУНК; 3 – композит МУНК/Пен Г–БСА.

ность и усложняется процедура подготовки к анализу сенсора на базе УНТ из-за необходимости послойного нанесения модификаторов для создания устойчивого слоя. Формирование подложки на основе МУНК_А под действием внешних магнитных сил позволяет упростить процедуру иммобилизации биомолекул на поверхности электрода пьезокварцевого сенсора. При этом время подготовки сенсора к анализу сокращается в шестнадцать раз по сравнению с покрытием на основе УНТ (с 24 ч в случае УНТ до 1.5 ч при применении МУНК). Кроме того, удаление распознающего слоя после снижения его характеристик не требует применения агрессивных растворителей, что позволяет продлить срок службы сенсора.

Методом введено–найдену оценена правильность определения Пен Г с помощью сенсора на основе МУНК_А в модельных растворах. Отсутствие систематической погрешности в результатах анализа подтверждено с помощью критерия Стьюдента ($t_{\text{эксп}} < t_{\text{табл}}$). Значения s_r свидетельствуют о высокой прецизионности результатов анализа (табл. 4). Разработанные сенсоры апробированы при определении Пен Г в молоке и

мясе методом добавок (табл. 5). Белки осаждали обработкой проб этанолом и насыщенным раствором сульфата аммония с последующим центрифугированием (3 мин, 7000 об./мин) [18]. Прочие присутствующие в матрице компоненты не мешали определению антибиотика.

Предложена методика формирования рецепторного слоя на основе МУНК на поверхности пьезоэлектрического сенсора под действием внешнего магнитного поля. Установлено влияние размера и концентрации магнитных наночастиц, полученных различными способами, на характеристики распознающего покрытия сенсора. Сенсор на основе МУНК апробирован при определении Пен Г в жидких средах. Наибольший диапазон определяемых концентраций составил 1–450 нг/мл, предел обнаружения равен 0.5 нг/мл.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Липецкой области в рамках научного проекта № 20-43-480001. В ИПТМ РАН работа выполнена в рамках Госзадания 075-01304-23-00.

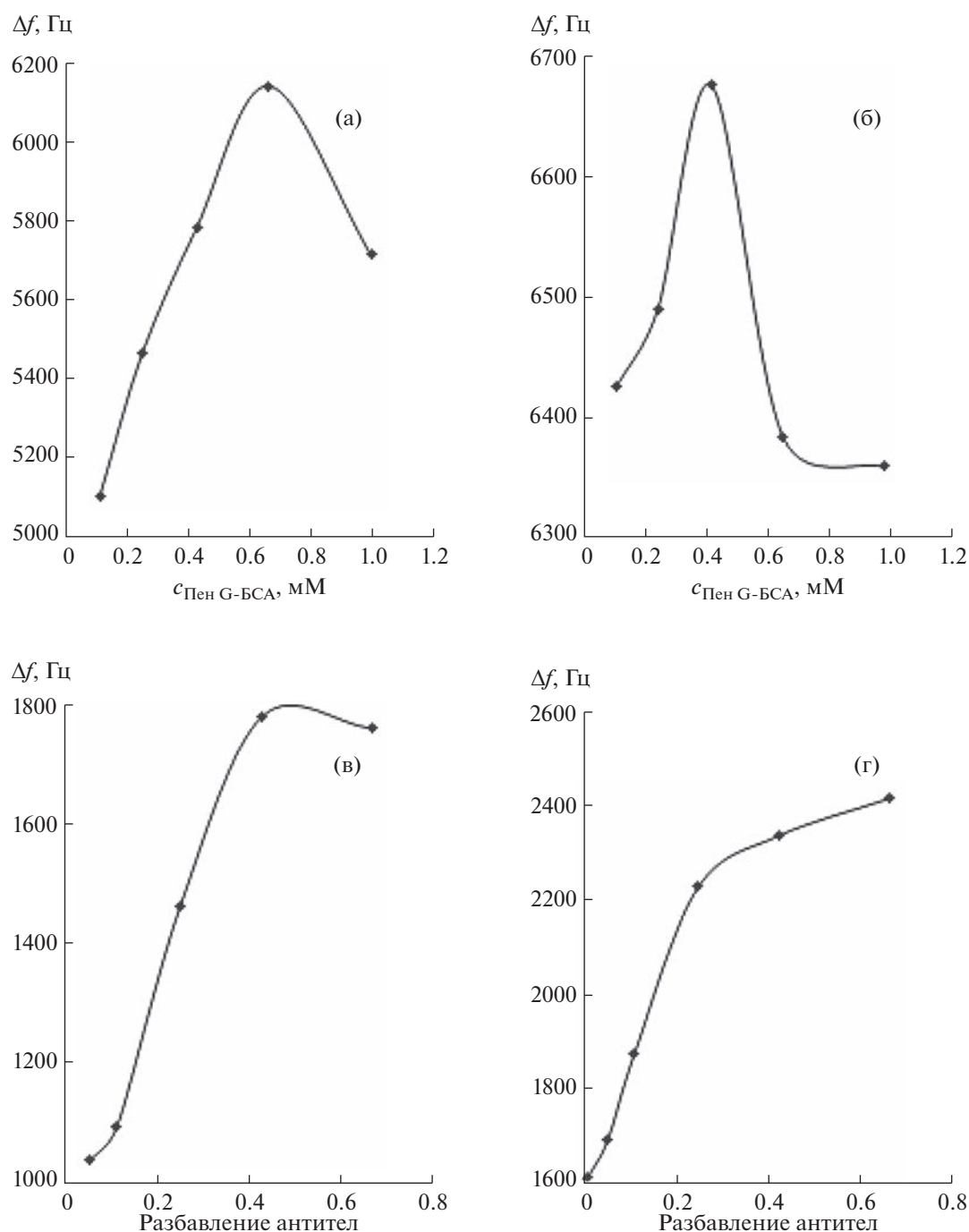


Рис. 5. Выбор рабочей концентрации конъюгата Пен G–БСА для МУНК_А (а) и МУНК_Б (б) и разбавления первичной сыворотки антител в случае МУНК_А (в) и МУНК_Б (г).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gupta B.K., Yadav A., Koch P., Mishra P. Piezoelectric biosensors: Principle, techniques, and their application in food analysis / Biosensors in Food Safety and Quality / Eds. Mishra P., Sahu P.P. CRC Press, 2022. P. 37.
2. Zhang J., Zhang X., Wei X., Xue Y., Wan H., Wang P. Recent advances in acoustic wave biosensors for the detection of disease-related biomarkers: A review // Anal. Chim. Acta. 2021. V. 1164. Article 338321.
3. Гулий О.И., Зайцев Б.Д., Алсовэйдиди А.К.М., Караваева О.А., Ловцова Л.Г., Бородин И.А. Биосенсорные системы для определения антибиотиков // Биофизика. 2021. Т. 66. № 4. С. 657. (Guliy O.I., Karavaeva O.A., Lovtsova L.G., Zaitsev B.D., Borodina I.A., Alsowaidi A.K.M. Biosensor systems for antibiotic detection // Biophysics. 2021. V. 66. № 4. С. 555.)

4. *Алсоевзиди А.К.М., Караваева О.А., Гулий О.И.* Методы и подходы для определения антибиотиков // Антибиотики и химиотерапия. 2022. Т. 67. № 1–2. С. 53.
5. *Ермолаева Т.Н., Калмыкова Е.Н., Шашканова О.Ю.* Пьезоэлектрические биосенсоры для анализа объектов окружающей среды, пищевых продуктов и клинической диагностики // Рос. хим. журн. 2008. Т. 52. № 2. С. 17. (*Ermolaeva T.N., Kalmykova E.N., Shashkanova O.Y.* Piezoquartz biosensors for the analysis of environmental objects, foodstuff and for clinical diagnostic // Russ. J. Gen. Chem. 2008. V. 78. № 12. P. 2430.)
6. *Tripathi A., Melo J.S.* Immobilization Strategies. Biomedical, Bioengineering and Environmental Applications. Springer, 2021. P. 666.
7. *Karaseva N.A., Ermolaeva T.N.* Piezoelectric immunosensors for the detection of individual antibiotics and the total content of penicillin antibiotics in foodstuffs // Talanta. 2014. V. 120. P. 312.
8. *Pohanka M.* Overview of piezoelectric biosensors, immunosensors and DNA sensors and their applications // Materials. 2018. V. 11 № 3. P. 448.
9. *Шукишина Е.И., Фарафонова О.В., Шанин И.А., Гражулене С.С., Еремин С.А., Ермолаева Т.Н.* Аффинные взаимодействия на поверхности пьезоэлектрического сенсора, модифицированного углеродными нанотрубками, при определении фторхинолонов // Сорбционные и хроматографические процессы. 2018. Т. 18. № 3. С. 394.
10. *Tajyani S., Babaei A.* A new sensing platform based on magnetic Fe₃O₄@NiO core/shell nanoparticles modified carbon paste electrode for simultaneous voltammetric determination of Quercetin and Tryptophan // J. Electroanal. Chem. 2018. V. 808. P. 50.
11. *Santos A.M., Wong A., Prado T.M., Fava E.L., Fatibello-Filho O., Sotomayor M.D.P.T., Moraes F.C.* Voltammetric determination of ethinylestradiol using screen-printed electrode modified with functionalized graphene, graphene quantum dots and magnetic nanoparticles coated with molecularly imprinted polymers // Talanta. 2021. V. 224. Article 121804.
12. *Sohouli E., Khosrowshahi E.M., Radi P., Naghian E., Rahimi-Nasrabadi M., Ahmadi F.* Electrochemical sensor based on modified methylcellulose by graphene oxide and Fe₃O₄ nanoparticles: Application in the analysis of uric acid content in urine // J. Electroanal. Chem. 2020. V. 877. Article 114503.
13. *Reddy K.R., Reddy P.A., Reddy C.V., Shetti N.P., Babu B., Ravindranadh K., Shankar M.V., Reddy M.C., Soni S., Naveen S.* Functionalized magnetic nanoparticles/biopolymer hybrids: Synthesis methods, properties and biomedical applications // Methods Microbiol. 2019. V. 46. P. 227.
14. *Kouhpanji M.R.Z., Stadler B.J.H.* A guideline for effectively synthesizing and characterizing magnetic nanoparticles for advancing nanobiotechnology: A Review // Sensors. 2020. V. 20. № 9. P. 2554.
15. *Bayramoglu G., Ozalp V.C., Oztekin M., Arica M.Y.* Rapid and label-free detection of Brucella melitensis in milk and milk products using an aptasensor // Talanta. 2019. V. 200. P. 263.
16. *Pohanka M.* QCM immunosensor for the determination of Staphylococcus aureus antigen // Chem. Pap. 2020. V. 74. P. 451.
17. *Wan Y., Zhang D., Hou B.* Determination of sulphate-reducing bacteria based on vancomycin-functionalised magnetic nanoparticles using a modification-free quartz crystal microbalance // Biosens. Bioelectron. 2010. V. 25. P. 1847.
18. *Бизина Е.В., Фарафонова О.В., Золотарева Н.И., Гражулене С.С., Ермолаева Т.Н.* Пьезоэлектрический иммуносенсор на основе магнитных углеродных наноконпозитов для определения ципрофлоксацина // Журн. аналит. химии. 2022. Т. 77. № 4. С. 375. (*Bizina E.V., Farafonova O.V., Zolotareva N.I., Grazhulene S.S., Ermolaeva T.N.* A piezoelectric immunosensor based on magnetic carbon nanocomposites for the determination of ciprofloxacin // J. Anal. Chem. 2022. V. 77. № 4. P. 375.)
19. *Гражулене С.С., Золотарева Н.И., Редькин А.Н., Шилкина Н.Н., Митина А.А., Ходос И.И.* Сорбционные свойства магнитного композита на основе модифицированных углеродных нанотрубок в зависимости от условий синтеза // Журн. прикл. химии. 2020. Т. 93. № 1. С. 66. (*Grazhulene S.S., Zolotareva N.I., Red'kin A.N., Shilkina N.N., Mitina A.A., Khodos I.I.* sorption properties of a magnetic composite based on modified carbon nanotubes: Influence of the synthesis conditions // Russ. J. Appl. Chem. 2020. V. 93. № 1. P. 57.)
20. *Sauerbrey G.* Verwendung von Schwingquarzen zur Wigung dünner Schichten und zur Mikrowigung // Zeitschrift für Physik. 1959. V. 55. P. 206.
21. *Гражулене С.С., Золотарева Н.И., Редькин А.Н., Шилкина Н.Н., Митина А.А., Колесникова А.М.* Магнитный сорбент на основе магнетита и модифицированных углеродных нанотрубок для извлечения некоторых токсичных элементов // Журн. прикл. химии. 2018. Т. 91. № 11. С. 1642. (*Grazhulene S.S., Zolotareva N.I., Red'kin A.N., Shilkina N.N., Mitina A.A., Kolesnikova A.M.* Magnetic sorbent based on magnetite and modified carbon nanotubes for extraction of some toxic elements // Russ. J. Appl. Chem. 2018. V. 91. № 11. P. 1849.)
22. *Wang J., Zheng S., Shao Y., Liu J., Xu Z., Zhu D.* Amino-functionalized Fe₃O₄@SiO₂ core-shell magnetic nanomaterial as a novel adsorbent for aqueous heavy metals removal // J. Colloid Interface Sci. 2010. V. 349. P. 293.
23. *Singh S., Barick K.C., Bahadur D.* Surface engineered magnetic nanoparticles for removal of toxic metal ions and bacterial pathogens // J. Hazard. Mater. 2011. V. 192. P. 1539.
24. *Eguílaz M., Villalonga R., Yanez-Sedeno P., Pingarron J.M.* Designing electrochemical interfaces with functionalized magnetic nanoparticles and wrapped carbon nanotubes as platforms for the construction of high-performance bienzyme biosensors // Anal. Chem. 2011. V. 83. P. 7807.
25. *Mikhaylova M., Kim D.K., Berry C.C., Zagorodni A., Toprak M., Curtis A.S.G., Muhammed M.* BSA immobilization on amine-functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles // Chem. Mater. 2004. V. 16. № 12. P. 2344.

26. Netto C.G.C.M., Toma H.E, Andrade L.H. Superparamagnetic nanoparticles as versatile carriers and supporting materials for enzymes // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2013. V. 85. P. 71.
27. Нартова Ю.В., Еремин С.А., Ермолаева Т.Н. Массочувствительные иммуносенсоры для определения хлорацетанилидных гербицидов // Журн. аналит. химии. 2008. Т. 63. № 12. С. 1302. (Nartova Yu.V., Ermolaeva T.N., Eremin S.A. Mass-sensitive immunosensors for determining chloroacetanilide herbicides // J. Anal. Chem. 2008. V. 63. № 12. P. 1191.)
28. Гражулене С.С., Золотарева Н.И., Редькин А.Н., Шилкина Н.Н., Митина А.А., Ходос И.И. Сорбционные свойства магнитного композита на основе модифицированных углеродных нанотрубок в зависимости от условий синтеза // Журн. прикл. химии. 2020. Т. 93. № 1. С. 66. (Grazhulene S.S., Zolotareva N.I., Red'kin A.N., Shilkina N.N., Mitina A.A., Khodos I.I. Sorption properties of a magnetic composite based on modified carbon nanotubes: Influence of the synthesis conditions // Russ. J. Appl. Chem. 2020. V. 93. № 1. P. 57.)

УДК 543.054;543.544.5.068.7

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ЭКСТРАКТАХ РОМАШКИ АПТЕЧНОЙ (*MATRICARIA CHAMOMILLA* L.) В РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ ИЗВЛЕЧЕНИЯ

© 2023 г. З. А. Темердашев^{a, *}, Т. К. Чубукина^a, Е. А. Виницкая^{a, b}, Н. В. Киселева^a

^a Кубанский государственный университет
ул. Ставропольская, 149, Краснодар, 350040 Россия

^b Субтропический научный центр Российской академии наук
ул. Яна Фабрициуса, 2/28, Сочи, 354002 Россия

*e-mail: TemZA@kubsu.ru

Поступила в редакцию 09.09.2022 г.

После доработки 04.10.2022 г.

Принята к публикации 04.10.2022 г.

Обсуждаются результаты исследования водных и водно-спиртовых экстрактов фенольных соединений ромашки аптечной (*Matricaria chamomilla* L.) в зависимости от условий их извлечения различными способами. Объект исследований – собранная в различных регионах России ромашка аптечная. Фенольные компоненты в их нативных формах извлекали из лекарственного сырья различными способами: настаиванием, мацерацией, микроволновым, ультразвуковым, субкритическим и фармакопейным. Содержания индивидуальных компонентов и суммарное содержание фенольных соединений в экстрактах ромашки аптечной оценивали хроматографическими методами. ВЭЖХ-определение фенольных соединений с диодно-матричным и масс-спектрометрическим детектированием проводили в градиентном режиме элюирования смесью ацетонитрил–0.1%-ная муравьиная кислота. В водных и водно-спиртовых экстрактах ромашки аптечной идентифицировали хлорогеновую кислоту, гликозиды феруловой кислоты, лютеолин-7-О-глюкозид, дикофеилхинную и цикориювую кислоты, апигенин-7-глюкозид, апигенин. По содержаниям фенольных соединений в экстрактах цветов ромашки различных производителей с различных территорий изучили зависимость данного показателя от географического места произрастания растительного сырья. Максимальное суммарное содержание фенольных соединений (10.1 мг/г) наблюдали в экстракте ромашки аптечной торговой марки “Фармацвет” (Московская обл., Красногорск).

Ключевые слова: ромашка аптечная (*Matricaria chamomilla* L.), фенольные соединения, экстракция, ВЭЖХ.

DOI: 10.31857/S0044450223040151, EDN: KZWUNC

Широкое распространение при производстве препаратов терапевтического воздействия получили лекарственные растения семейства Астровые (*Asteraceae*) – полынь, тысячелистник, ромашка, череда, календула, одуванчик и другие [1–3]. Эти лекарственные растения обладают антиоксидантной активностью и проявляют разнообразные терапевтические свойства, обусловленные наличием в их составе комплекса ряда действующих соединений [2–6]. Например, антиоксидантное, противоопухолевое, гепатопротекторное, химиопротекторное и противовоспалительное действие связано с наличием в экстрактах лекарственного растительного сырья (ЛРС) лупеола. Противовоспалительное, антиоксидантное и противораковое действие обусловлено присутствием апигенина и

лютеолина, а цинарин обеспечивает антимикробные и противовоспалительные свойства [4]. Фенольные соединения (ФС) в этих лекарственных растениях преимущественно представлены флавоноидами, фенольными кислотами (гидроксibenзойными и гидроксикоричными) и их производными [7].

Для определения ФС в экстрактах лекарственных растений традиционно используют методы суммарного их определения в пересчете на рутин [8]. Однако для полноценной оценки фармакологической активности ЛРС важно знать качественный состав и содержание индивидуальных компонентов, определяющих фитотерапевтические свойства ромашки аптечной. Для этих целей применяют высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) [4, 9–11], которая в со-

четании с разными вариантами детектирования позволяет идентифицировать и определять содержание ФС в их нативном виде [11, 12].

Способ экстракции сказывается на содержании ФС в экстракте ромашки аптечной [13]. При хроматографическом определении ФС в экстрактах ЛРС в зависимости от выбранного способа экстракции меняется также состав (качественный и количественный) извлечений, что усложняет оценку компонентного состава экстрактов. Для экстракции фенольных веществ из растительного сырья семейства Астровые используют жидкостную экстракцию водно-спиртовыми смесями — мацерацию [4, 10, 14], водой — настаивание [15–21], а также жидкостную экстракцию с дополнительным физическим воздействием — ультразвуковым [1, 22], микроволновым [11, 23], повышением температуры и давления [11, 24].

Ромашка аптечная (*Matricaria chamomilla* L.) исследуется достаточно широко [5, 6], но сведения по оценке эффективности способов извлечения целевых соединений, позволяющие сопоставить различные способы экстракции компонентов из растительного материала, практически отсутствуют. В табл. 1 приведены некоторые примеры способов извлечения целевых соединений из ромашки аптечной.

Целью данной работы является хроматографическая оценка индивидуального и суммарного содержания фенольных соединений в водных и водно-спиртовых экстрактах в условиях различных способов извлечения из ромашки аптечной (*Matricaria chamomilla* L.).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Растительный материал. Объекты исследования — цветки ромашки аптечной (*Matricaria chamomilla* L.) производителя “Родные травы” (республика Адыгея, партия 250321); цветки ромашки (*Chamomillae flores*) торговых марок “ФармаЦвет” (Московская обл., Красногорск, партия 210820), “Грин Сайд” (Алтайский край, Барнаул, партия 02) и “Фитофарм” (Краснодарский край, Анапа, серия 010215). Также осуществляли сбор ромашки в стадии цветения на территории г. Краснодара (Краснодарский край). Растительное сырье предварительно измельчали и просеивали, выделяя фракции размером 0.5–1.0 мм, затем растительный материал усредняли путем перемешивания [8].

Реактивы и стандартные образцы. Использовали ацетонитрил (HPLC-S, Biosolve BV, Нидерланды), муравьиную кислоту (85%, ЛенРеактив, Россия), этанол (ректифицированный, высшей очистки) и метанол х.ч. (Вектон, Россия). Деионизованную воду с удельным сопро-

тивлением 18.2 МОм·см (25°C) получали на установке Milli-Q-UV (Millipore, Франция).

Для идентификации аналитов использовали стандартные образцы хлорогеновой кислоты, лютеолин-7-О-гликозида, *транс*-феруловой кислоты, цикориевой кислоты и апигенина (Sigma-Aldrich, Германия).

Экстракция фенольных компонентов из ромашки аптечной. Извлечение фенольных соединений из ромашки аптечной проводили с учетом рекомендаций Государственной Фармакопеи РФ (ГФ) [8], традиционными и современными способами с интенсификацией процесса ультразвуком и микроволновым излучением, а также при повышенных давлении и температуре.

Для извлечения ФС из ромашки аптечной рекомендованным ГФ методом навеску пробы (1.0000 г) помещали в колбу со шлифом емк. 250 мл, прибавляли 70%-ный этанол (100 мл). Колбу с содержимым присоединяли к обратному холодильнику, нагревали на кипящей водяной бане в течение 45 мин, периодически встряхивая. Затем колбу с экстрактом охлаждали до комнатной температуры, фильтровали раствор через вату в мерную колбу емк. 100 мл, объем раствора доводили до метки 70%-ным этанолом. Перед хроматографическим анализом полученный экстракт фильтровали через фильтр с диаметром пор 45 мкм.

Для экстракции ФС *мацерацией* из ромашки аптечной навеску пробы (1.0000 г) помещали в коническую колбу со шлифом емк. 250 мл, добавляли растворитель (100 мл) и оставляли отстаиваться при комнатной температуре. В качестве растворителя использовали 70%-ный этанол. Перед хроматографическим анализом полученный экстракт фильтровали через фильтр с диаметром пор 45 мкм.

Для извлечения ФС ромашки аптечной также готовили *настой*. Для этого навеску измельченной пробы (0.5000 г) помещали в коническую колбу с притертой пробкой объемом 100 мл и заливали деионизованной водой (25 мл) при ~95°C. Перед хроматографическим анализом полученный экстракт фильтровали через фильтр с диаметром пор 45 мкм.

Для проведения *ультразвуковой экстракции* (УЗЭ) ФС из ромашки аптечной навеску сухой измельченной пробы (0.5000 г) помещали в коническую колбу с притертой пробкой объемом 100 мл. В качестве растворителя использовали водно-спиртовые смеси разного состава (25 мл). Экстракция проходила в ультразвуковой ванне УЗВ–4.0/1 ТТЦ (Сапфир, Россия) с частотой ультразвукового излучения 35 кГц в течение 30 мин. После фильтрования через вату в мерную колбу емк. 25 мл объем раствора доводили до метки растворителем. Перед хроматографическим анали-

Таблица 1. Примеры извлечения фенольных соединений из цветов ромашки аптечной (*Matricaria chamomilla* L.) различными способами

Способ экстракции	Экстрагент	Условия экстракции	Метод анализа	Определяемые компоненты	Литература
Мacerация	80%-ный метанол	Встряхивание 90 мин	ВЭЖХ–МС/МС	4-Гидроксифенилуксусная кислота, изоскополетин, ресвератрол, ализарин, дантрон, хризин, пиноцембрин, ликвиритигенин, изоликвиритигенин, <i>цис, транс</i> -абсцисовая кислота, формонетин, алоэ-эмодин, эмодин, пиностробин, галангин, рейн, диосметин, гесперетин, морин, эллаговая кислота, рамнетин, урсоловая кислота, 18β-глициретиновая кислота, нарингин, глицирризин	[4]
	70%-ный метанол	Нагрев до 70°C	ВЭЖХ–ДМД	Апигенин-7-О-(4"-ацетил)-глюкозид, апигенин-7-О-(3"-ацетил)-глюкозид, апигенин-7-О-(6"-ацетил)-глюкозид, лютеолин, апигенин, эвпатолигитин, хризоспленол D, хризоспленгитин	[10]
	80%-ный метанол	Встряхивание 30 мин, выдерживание в течение 5 дней в темноте	УВЭЖХ–МС/МС	Хлорогеновая кислота, кофейная кислота, умбеллиферон, кверцетин-3-глюкозид, рутин, апигенин-7-глюкозид, кверцитрин, кверцетин, лютеолин, кемпферол, апигенин, изораменгитин	[14]
Настой	Вода	Выдерживание в течение 10–15 мин	ВЭЖХ–МС/МС	Лютеолин, рутин, гесперидин, гесперетин, апигенин, <i>p</i> -гидроксibenзойная кислота, галловая кислота, кофейная кислота, <i>p</i> -кумаровая кислота, хлорогеновая кислота	[16]
	Вода	Выдерживание в течение 10 мин	ВЭЖХ–МС/МС	Апигенин, лютеолин, гесперетин, рутин	[20]
	Вода	Выдерживание в течение 3–40 мин	ВЭЖХ–ДМД–МС/МС	Неохлорогеновая кислота, хлорогеновая кислота, криптохлорогеновая кислота, глюкозиды феруловой кислоты, галактозид кверцетина, глюкозид кверцетина, глюкозид лютеолина, 3,4-дикафеоилхнинная кислота, 3,5-дикафеоилхнинная кислота, 4,5-дикафеоилхнинная кислота, ацетилглюкозид апигенина, глюкозид апигенина	[21]
УЗЭ	70%-ный этанол	Выдерживание в течение 40 мин	УВЭЖХ–ДМД–МС/МС	Апигенин-7-О-глюкозид, фенилэтиловый эфир кофейной кислоты, катехин, галловая кислота, димер проантоцианидина, глюкозид феруловой кислоты, 5-О-ферулоилхнинная кислота, хлорогеновая кислота, лютеолин, эпикатехин, лютеолин-7-О-глюкозид, кофеоил-гексозид-метилглютарат, кверцетин-3-глюкозид, 3- <i>p</i> -кумароилхнинная кислота, пеларгонидин-сулциниларабинозид или пеларгонидин-малонилтрамозид, <i>p</i> -кумароил-гексозидметилглютарат, апигенин-дикафеоилхнинная кислота, пинобанксин-3-О-бутират, гиперфидин, апигенин-О-глокуронид, алгиперфидин	[11]
	100%-ный метанол	Выдерживание в течение 30 мин при 40°C	УВЭЖХ–МС	Хлорогеновая кислота, (Z)-2-β-D-глюкопиранозилокси-4-метоксикоричная кислота, кверцетин-7-β-D-глюкопиранозид, кверцетин-глюкозид, (E)-2-β-D-глюкопиранозилокси-4-метоксикоричная кислота, лютеолин-7-О-β-D-глюкозид, патулетин-7-О-глюкозид, апигенин-7-О-глюкозид, ацетил-глюкозид апигенина, герниарин, апигенин, хризоспленгитин, енин-дишкислэфир	[25]

Таблица 1. Окончание

Способ экстракции	Экстрагент	Условия экстракции	Метод анализа	Определяемые компоненты	Литература
УЗЭ	80%-ный этанол	Выдерживание в течение 30 мин при 40°C	ВЭЖХ-МС/МС	Протокатехиновая, гентизиновая, 4-ОН-бензойная кислота, ванильная, кофейная, сирингиновая, <i>p</i> -кумаровая, салициловая, феруловая, синаптическая, розмариновая кислоты, рутин, гиперозид, изокверцетин, кемпферол-3-рутинозид, астрагалин, апигенин-7-глюкозид	[22]
МВЭ	70%-ный этанол	Выдерживание в течение 40 мин, 480 Вт, 70°C	УВЭЖХ-ДМД-МС/МС	Апигенин-7-О-глюкозид, фенилэтиловый эфир кофейной кислоты, катехин, галловая кислота, димер проантоцианидина, глюкозид феруловой кислоты, 5-О-ферулоилхиновая кислота, хлорогеновая кислота, лютеолин, эпикатехин, лютеолин-7-О-глюкозид, кофеил-гексозид-метилглютарат, кверцетин-3-глюкозид, 3- <i>p</i> -кумароилхиновая кислота, пеларгонидин-сукциниларабинозид или пеларгонидин-малониларабинозид, <i>p</i> -кумароил-гексозидметилглютарат, апигенин, дикаффеолихиновая кислота, пинобанксин-3-О-бутират, гиперфирин, апигенин-О-глюкуронид, алгиперфирин	[11]
СКЭ	Вода	Выдерживание в течение 40 мин при 1.6 бар, 200°C	УВЭЖХ-ДМД-МС/МС	Апигенин-7-О-глюкозид, фенилэтиловый эфир кофейной кислоты, катехин, галловая кислота, димер проантоцианидина, глюкозид феруловой кислоты, 5-О-ферулоилхиновая кислота, хлорогеновая кислота, лютеолин, эпикатехин, лютеолин-7-О-глюкозид, кофеил-гексозид-метилглютарат, кверцетин-3-глюкозид, 3- <i>p</i> -кумароилхиновая кислота, пеларгонидин-сукциниларабинозид или пеларгонидин-малониларабинозид, <i>p</i> -кумароил-гексозидметилглютарат, апигенин, дикаффеолихиновая кислота, пинобанксин-3-О-бутират, гиперфирин, апигенин-О-глюкуронид, алгиперфирин	[11]
	Вода	Выдерживание при 5 МПа, 200°C, дериватизация с БСТФА	ГХ-МС	Лютеолин, 3,5,7-флавонол, 2-фенилэтанол, 4-фенилбутан-2-ол, изооугенол, инозит, метоксibenзол, 3-гидроксибутилбензол, гидроксиметилбензол, гидроксиэтилбензол, <i>p</i> -крезол, 2-гидрокси-4-метоксиацетифенон, 4-гидроксиацетифенон, умбеллиферон, 6,7-гидроксикумарин, β-D-глюкопиранозид, масляная, бензойная, фенилуксусная, валериановая, винилиновая, пропионовая, винная, 4-гидроксibenзойная, гидроксимасляная, 2-гидроксизогексановая, <i>p</i> -гидроксикоричная, каприловая, каприновая, 2-кетовалериановая, кофейная, лимонная, линолевая, миристиновая, молочная, малоновая, олеиновая, пальмитиновая, пеларгоновая, протокатехиновая, себациновая, стеариновая, янтарная, тетроническая, феруловая, фумаровая, хиновая, этилмалоновая кислоты и др., 2,2-диметилсукцинат, этилинолеат, этилпальмитат, углеводороды	[24]

Обозначения: УЗЭ – ультразвуковая экстракция; МВЭ – микроволновая экстракция; СКЭ – экстракция при повышенных температуре и давлении (субкритическая экстракция); БСТФА – N, O-бис(триметилсилил)трифторацетамид; ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с tandemным масс-спектрометрическим детектированием; УВЭЖХ-МС/МС – ультра высокоэффективная жидкостная хроматография с tandemным масс-спектрометрическим детектированием; ВЭЖХ-ДМД-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с диодно-матричным и tandemным масс-спектрометрическим детектированием; УВЭЖХ-ДМД-МС/МС – ультра высокоэффективная жидкостная хроматография с диодно-матричным и tandemным масс-спектрометрическим детектированием; ГХ-МС – газовая хромато-масс-спектрометрия.

зом полученный экстракт фильтровали через фильтр с диаметром пор 45 мкм.

Микроволновую экстракцию (МВЭ) ФС из ромашки аптечной проводили с использованием микроволновой системы ETHOS EX (Milestone, Италия). Навеску сухой измельченной пробы (0.5000 г) помещали в ячейку-экстрактор, куда добавляли растворитель (25 мл). В качестве растворителя использовали водно-спиртовые смеси различного состава. Продолжительность экстракции составляла 30 мин при мощности микроволнового излучения 300 Вт и температуре 75°C. Далее экстракт фильтровали через вату в мерную колбу емк. 25 мл и доводили объем раствора до метки растворителем. Перед хроматографическим анализом экстракт пропускали через фильтр с диаметром пор 45 мкм.

Экстракцию ФС из ромашки аптечной *в динамических условиях при повышенных температуре и давлении* (субкритическая экстракция, СКЭ) проводили на экспериментальной установке, подробно описанной в работе [26]. Экстрагент (деионизованная вода/водно-спиртовые смеси) подавали насосом от жидкостного хроматографа LC20AD (Shimadzu, Япония), в качестве ячейки-экстрактора использовали стальной корпус хроматографической колонки размером 150 × 4.6 мм, которую подключали к установке двумя стальными капиллярами. Для предотвращения закипания экстрагента и поддержания требуемого давления в системе использовали ограничитель давления P-455 (Upchurch Scientific, США). Высушенную и измельченную навеску пробы (0.2000 г) помещали в ячейку-экстрактор в печи термостата. Экстрагент предварительно продували азотом для удаления растворенного кислорода и с помощью насоса заполняли им систему. Затем останавливали поток экстрагента и включали нагрев термостата. По достижении термостатом заданной температуры выдерживали систему в течение 10 мин при постоянной температуре и остановленном потоке экстрагента, после чего его подавали в систему со скоростью 1 мл/мин. Давление в системе по показаниям манометра насоса составляло 80–150 атм. На выходе собирали 10 мл экстракта в стеклянные емкости. Перед хроматографическим анализом экстракт пропускали через фильтр с диаметром пор 45 мкм.

ВЭЖХ-определение фенольных соединений с диодно-матричным и масс-спектрометрическим детектированием в экстрактах ромашки аптечной. ВЭЖХ-определение ФС в полученных экстрактах проводили на хроматографе LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония), состоящем из дегазатора DGU-20A₅, насоса LC20AD, автоматического дозатора SIL-20A, термостата колонок CTO-20AC, спектрофотометрического детектора на основе диодной матрицы SPD-M20A, масс-спектрометриче-

ского детектора LCMS2010EV. Фенольные соединения разделяли на хроматографической колонке Luna C18 100A, 250 × 2.0 мм, 5 мкм (Phenomenex, США) с предколонкой C18 4 × 2.0 мм, 5 мкм (Phenomenex, США) в режиме градиентного элюирования. Подвижной фазой являлась смесь ацетонитрил (А)—0.1%-ная муравьиная кислота (В): 0.01–2 мин от 95 до 90% В, 2–10 мин от 90 до 80% В, 10–18 мин от 80 до 70% В, 18–28 мин от 70 до 10% В, 28–30 мин 10% В, 30–31 мин от 10 до 95% В. Скорость потока подвижной фазы составляла 0.40 мл/мин при температуре термостата колонки 40°C и объеме вводимой пробы 5 мкл. Спектрофотометрическое детектирование на диодно-матричном детекторе осуществляли в диапазоне длин волн 190–800 нм. При МС-детектировании веществ применяли ионизацию электро-распылением: напряжение интерфейса — 3.5 кВ, напряжение на скимере — 1.5 В, температура ионного источника — 180°C, скорость потока азота — 1.5 л/мин, скорость сканирования масс-спектра 2000 а.е.м./с, диапазон сканируемых масс 120–700 *m/z*. Анализ проводили в режиме отрицательной ионизации. Сбор и последующую обработку первичных данных осуществляли с помощью программного обеспечения LCMS Solution (Shimadzu, Япония).

Фенольные соединения идентифицировали сопоставлением времен удерживания, спектров поглощения и масс-спектров с аналогичными характеристиками стандартов индивидуальных соединений, приведенными в литературе (табл. 2). Пример хроматограммы водно-спиртового экстракта ромашки аптечной, полученного по методике Фармакопеи РФ, в оптимальных условиях хроматографирования представлен на рис. 1.

При оценке содержания ФС в экстрактах ромашки аптечной использовали рассчитанные метрологические характеристики (табл. 3). Для всех соединений получили градуировочные зависимости, диапазоны линейности, пределы определения и обнаружения с использованием соответствующих стандартных образцов в 70%-ном этаноле. Все градуировочные кривые строили по данным шести параллельных измерений; в каждом случае проводили не менее трех параллельных определений одной концентрации раствора ФС. Содержание гликозидов феруловой кислоты в сырье определяли по градуировочной зависимости, полученной для феруловой кислоты, умножая на отношение молекулярной массы аналита к молекулярной массе феруловой кислоты ввиду их структурного подобия и схожести коэффициентов поглощения [28]. Аналогично рассчитывали содержание дикофеилхинной кислоты по градуировочной зависимости цикориевой кислоты, апигенин-7-глюкозида — по апигенину.

Таблица 2. Параметры ВЭЖХ-определения фенольных соединений с диодно-матричным и масс-спектрометрическим детектированием в водно-этанольных экстрактах цветов ромашки аптечной

Соединение	t_R , мин*	$\lambda_{\max}$, нм*	m/z
Хлорогеновая кислота (стандарт)	8.3	327	353
Гликозид феруловой кислоты I ([21, 27])	9.3	300	355
Гликозид феруловой кислоты II ([21, 27])	12.6	300	355
Лютеолин-7-О-гликозид (стандарт)	14.3	345	447
Дикофеилхинная кислота ([21])	15.9	327	515
Цикориевая кислота (стандарт)	16.2	327	473
Апигенин-7-гликозид ([21, 27])	16.4	268; 333	431
Апигенин (стандарт)	23.2	268; 327	269

* t_R — время удерживания; $\lambda_{\max}$ — длина волны поглощения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оптимальный состав растворителя для экстракции фенольных соединений из цветов ромашки аптечной. Правильный выбор растворителя позволяет повысить эффективность извлечения ФС из ромашки аптечной. Учитывая накопленный опыт [26, 29] и литературные данные [30], сравнили эффективность извлечения фенольных соединений из ромашки аптечной при УЗЭ и МВЭ с использованием водно-этанольных и водно-метанольных смесей с различной концентрацией спирта (30, 50, 70 и 100%, по объему). Эффективность извлечения компонентов оценивали по суммарному содержанию ФС: лютеолин-7-О-гликозида, гликозидов феруловой кислоты, апигенин-7-гликозида, апигенина, хлорогеновой, дикофеилхинной и цикориевой кислот (рис. 2). Из полученных диаграмм видно, что эффективность 70%-ных водно-метанольной и водно-эта-

нольной смесей при извлечении суммы ФС из растительного материала способами УЗЭ и МВЭ сопоставима. С другой стороны, 70%-ный этанол — более экологичный растворитель и перспективен для дальнейшего практического использования в медицинской практике, поэтому его выбрали для дальнейших исследований.

Эффективность экстракции фенольных соединений из ромашки аптечной различными способами. Изучали и сравнивали различные способы экстракции компонентов: экстракцию по Государственной Фармакопее РФ [8], мацерацию, настаивание, ультразвуковую, микроволновую и субкритическую экстракцию. Параметры каждого из способов экстракции оптимизировали по суммарному содержанию ФС в экстрактах ромашки.

Для определения оптимального времени экстрагирования строили зависимости суммарного содержания ФС от времени проведения мацера-

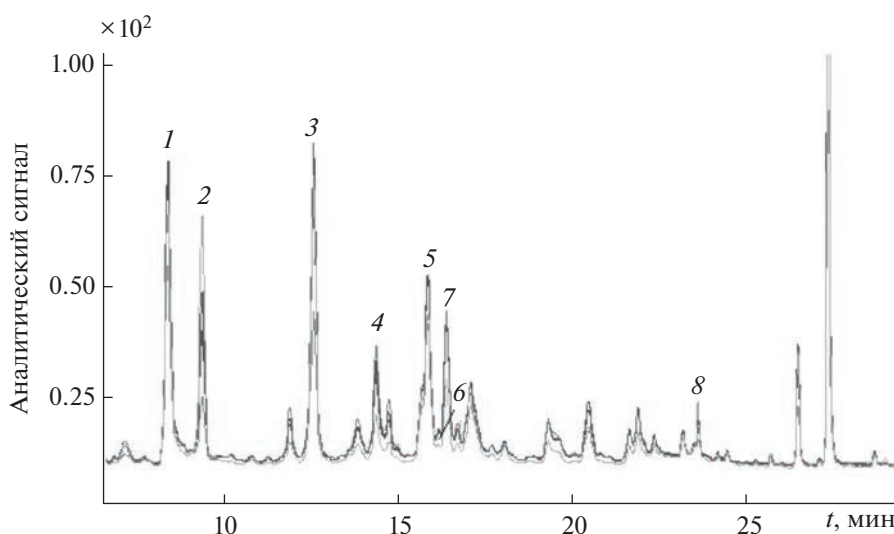


Рис. 1. ВЭЖХ-хроматограмма этанольного экстракта цветов ромашки аптечной, полученного по методике Фармакопее РФ, в режиме диодно-матричного и масс-спектрометрического детектирования: 1 — хлорогеновая кислота, 2 — гликозид феруловой кислоты I, 3 — гликозид феруловой кислоты II, 4 — лютеолин-7-О-гликозид, 5 — дикофеилхинная кислота, 6 — цикориевая кислота, 7 — апигенин-7-гликозид, 8 — апигенин.

Таблица 3. Метрологические характеристики методики определения фенольных соединений в экстрактах ромашки аптечной методом ВЭЖХ с диодно-матричным и масс-спектрометрическим детектированием

Фенольное соединение	Уравнение регрессии	R^2	Диапазон линейности, мкг/мл	$c_{\text{мин}}$, мкг/мл*	$c_{\text{н}}$, мкг/мл
Хлорогеновая кислота	$y = (33100 \pm 100)x$	0.9996	0.3–100	0.10	0.3
Лютеолин-7-О-глюкозид	$y = (36200 \pm 200)x$	0.9994	0.1–100	0.03	0.10
Цикориевая кислота	$y = (30200 \pm 100)x$	0.9995	0.3–200	0.10	0.3
Апигенин	$y = (51900 \pm 600)x$	0.9999	1–100	0.4	1.0
Феруловая кислота	$y = (48300 \pm 700)x$	0.9998	0.1–50	0.02	0.10

Примечание: $c_{\text{мин}}$ – предел обнаружения, $c_{\text{н}}$ – предел определения.

ции, настаивания и УЗЭ (рис. 3). В качестве экстрагентов для мацерации и УЗЭ использовали 70%-ный этанол, а для экстракции настаиванием – свежее кипяченую деионизованную воду. Для построения кинетической кривой извлечения ФС из ромашки различными способами отбирали аликвоты экстракта объемом 1 мл через заданный промежуток времени.

Суммарная концентрация ФС в экстракте мацерацией достигала максимальных значений в течение 1440 мин (24 ч) и далее оставалась неизменной (рис. 3а). В случае извлечения аналитов настаиванием (рис. 3б), концентрации соединений при экстрагировании сырья в течение свыше 15 мин не менялись. Более продолжительное время экстракции данным способом способствовало деградации некоторых фенольных соединений, например, лютеолин-7-О-глюкозида и дикофе-

илхинной кислоты. При настаивании практически не извлекается апигенин, так как агликоны флавоноидов нерастворимы в воде [31, 32]. Кинетическая кривая УЗЭ аналитов из ромашки аптечной (рис. 3в) позволила установить, что суммарное содержание ФС достигает максимальных значений (9.1 ± 0.1 мг/г) при экстракции в течение 30 мин непрерывного воздействия ультразвуком.

Субкритическая экстракция широко используется для извлечения различных классов соединений, в том числе фенольных, из лекарственного растительного сырья. При этом на эффективность извлечения компонентов влияют температура и состав используемого экстрагента. Для установления оптимальных значений данных параметров исследовали зависимость суммарного содержания ФС в экстракте ромашки от температуры СКЭ с использованием различных экстрагентов (рис. 4). В ка-

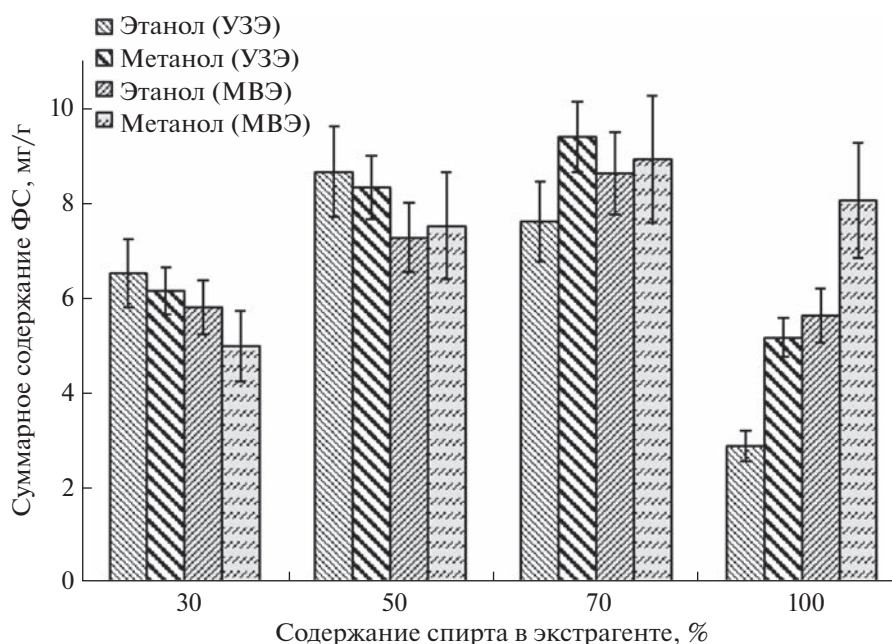


Рис. 2. Суммарное содержание фенольных соединений в экстрактах ромашки аптечной, полученных под воздействием ультразвука и микроволнового излучения.

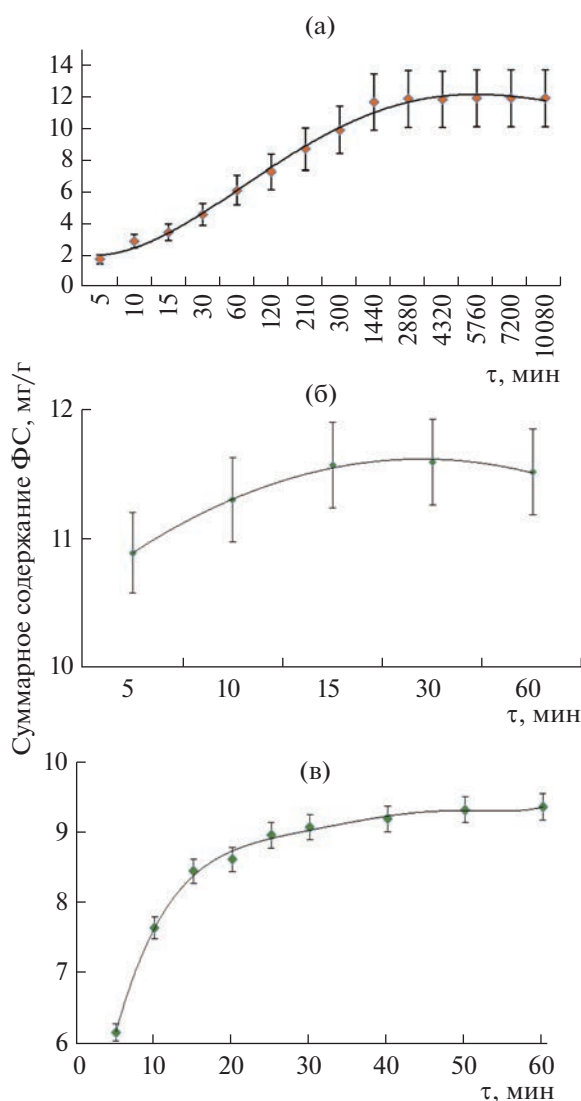


Рис. 3. Зависимость суммарного содержания фенольных соединений в экстракте ромашки аптечной от времени мацерации (а), настаивания (б) и воздействия ультразвука (в).

честве экстрагентов использовали деионизованную воду [11, 24], 50 и 70%-ный этанол [24]. Температуру варьировали в диапазоне 100–165°C с шагом в 15°C. Эффективность субкритического способа экстракции для извлечения ФС также оценивали по суммарному содержанию ФС в экстракте. Как известно [11, 24], применение воды и 70%-ной водно-этанольной смеси в качестве экстрагентов для СКЭ ФС различных классов из растительного материала достаточно эффективно. При 120°C эффективность извлечения суммы аналитов водой и 70%-ным этанолом максимальна (6.6 ± 0.2 и 11.7 ± 0.3 мг/г соответственно), но дальнейшее ее повышение приводит к снижению концентрации ФС, что обусловлено их термической деградацией (рис. 4). С учетом полученной

зависимости можно заключить, что оптимальная температура СКЭ ФС из ромашки аптечной деионизованной водой и 70%-ным этиловым спиртом составляет 120°C.

По данным [24], использование 50%-ного этанола в качестве экстрагента для СКЭ ФС из ромашки аптечной считается предпочтительным. В связи с этим изучили зависимость суммарного содержания ФС ромашки аптечной от температуры СКЭ 50%-ным этанолом. Полученные зависимости показывают целесообразность проведения СКЭ при более низких температурах (рис. 4). Строили зависимость суммарного содержания ФС от температуры в диапазоне от 75 до 135°C. Наибольшая суммарная концентрация ФС (11.1 ± 0.7 мг/г) в экстракте наблюдается при 100°C. Отметим, что эффективность извлечения ФС СКЭ 70%-ным этанолом при 120°C и 50%-ным этанолом при 100°C сопоставима.

Содержания ФС в экстрактах ромашки аптечной, полученные в оптимальных условиях для различных способов экстракции, представлены в табл. 4. Можно отметить, что выбор способа экстракции неоднозначен, и во многом он определяется поставленными задачами. Тем не менее отметим ряд отличий. Использование МВЭ для экстракции ФС малоэффективно, так как концентрации хлорогеновой кислоты и гликозидов феруловой кислоты имеют наименьшие значения, что, вероятно, связано с их деградацией под действием температуры и микроволнового излучения.

Сравнительный анализ способов извлечения (ГФ, мацерация, настаивание и СКЭ) по суммарному содержанию ФС показывает, что по своей эффективности они сопоставимы. Эффективность извлечения выбранных компонентов свежекипяченой деионизованной водой при настаивании оказалась сопоставима со способами, в которых в качестве экстрагентов использовали водно-спиртовые растворы. Однако, как отмечено ранее, водные системы не извлекают агликоны флавоноидов — достаточно ценные соединения, и это значительно снижает перспективность практического использования такой процедуры для экстракции ФС из ромашки аптечной. Содержания компонентов, полученных при мацерации и настаивании различными растворителями, сопоставимы, несмотря на схожий процесс их осуществления (табл. 4).

Суммарное содержание извлеченных при УЗЭ ФС несколько выше, чем при МВЭ, и ниже, чем при других способах экстракции (табл. 4). Однако процедура УЗЭ более экспрессна и позволяет оперативно проводить предварительный скрининг и идентификацию ФС, характерных для экстрактов ромашки аптечной.

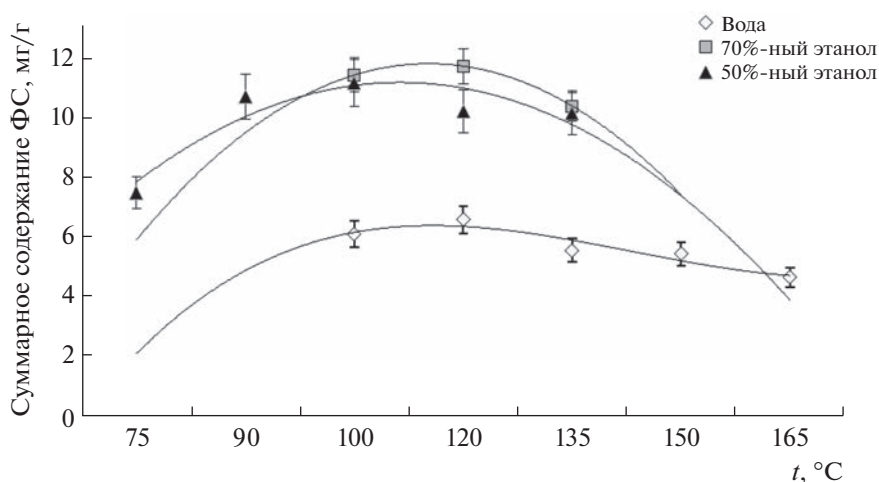


Рис. 4. Зависимость суммарного содержания фенольных соединений в экстракте ромашки аптечной от температуры субкритической экстракции различными экстрагентами.

Анализ экстрактов цветов ромашки аптечной различных торговых марок. Данные о качественном и количественном составе растительного материала используют при установлении качества выпускаемой продукции. Однако содержание активных компонентов в ромашке аптечной в значительной степени может зависеть от географических особенностей произрастания лекарственного растительного сырья, условий выращивания и хранения [21, 27]. В табл. 5 приведены содержания ФС в полученных при УЗЭ экстрактах образцов ромашки аптечной различных производителей, а также в собранном самостоятельно на территории г. Краснодара образце.

Содержания ФС в образцах торговых марок “Грин Сайд” и “Фитофарм” близки между собой как по концентрациям индивидуальных соединений, так и по суммарному содержанию анализов. Такое сходство, вероятно, связано с использова-

нием одного и того же растительного материала со схожими климатическими условиями его выращивания. Отметим высокое содержание хлорогеновой (2.0 ± 0.1 мг/г), дикофеилхинной (1.2 ± 0.3 мг/г) и цикориевой кислот (0.12 ± 0.01 мг/г), а также лютеолин-7-О-глюкозида (0.64 ± 0.05 мг/г) в экстракте образца “Родные травы” по сравнению с экстрактами ромашки аптечной других компаний.

Содержания ФС в экстрактах ромашки аптечной из полученного при самостоятельном сборе растительного материала сильно отличаются от их концентраций в других образцах. Показатель суммы ФС в данном образце (14.9 ± 0.5 мг/г) определяет дикофеилхинная кислота (12.0 ± 0.4 мг/г). В других образцах максимальное содержание ФС определяется концентрациями гликозидов феруловой кислоты (около 60%), что согласуется с данными [21, 27]. Кроме этого, содержание апи-

Таблица 4. Концентрации (мг/г) некоторых индивидуальных фенольных соединений и их суммарное содержание в экстрактах ромашки аптечной, полученных различными способами ($n = 3$, $P = 0.95$)

Соединение	Фармакопея РФ	Мацерация	Настаивание	УЗЭ	МВЭ	СКЭ
Хлорогеновая кислота	2.4 ± 0.1	2.4 ± 0.1	2.5 ± 0.2	2.0 ± 0.1	1.8 ± 0.4	2.3 ± 0.3
Гликозид феруловой кислоты I	2.2 ± 0.1	2.5 ± 0.1	2.55 ± 0.04	2.2 ± 0.3	1.68 ± 0.02	2.4 ± 0.2
Гликозид феруловой кислоты II	2.7 ± 0.1	3.0 ± 0.1	2.94 ± 0.03	2.5 ± 0.2	2.2 ± 0.4	2.9 ± 0.1
Лютеолин-7-О-глюкозид	0.80 ± 0.03	0.83 ± 0.01	0.52 ± 0.05	0.64 ± 0.05	0.6 ± 0.1	0.83 ± 0.03
Дикофеилхинная кислота	1.7 ± 0.1	1.8 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.2 ± 0.3	1.3 ± 0.2	1.5 ± 0.1
Цикориевая кислота	0.140 ± 0.003	0.14 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.12 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.102 ± 0.005
Апигенин-7-глюкозид	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.80 ± 0.04	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.2	1.1 ± 0.1
Апигенин	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.013 ± 0.003	0.02 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.051 ± 0.004
Суммарное содержание ФС	11.0 ± 0.5	11.7 ± 0.7	11.1 ± 0.3	9.4 ± 0.9	8.6 ± 0.1	11.1 ± 0.9

Таблица 5. Концентрации (мг/г) некоторых индивидуальных фенольных соединений и их суммарное содержание в водно-этанольных экстрактах образцов ромашки аптечной различных производителей, полученных ультразвуковой экстракцией ($n = 3$, $P = 0.95$)

Соединение	Самостоятельный сбор на территории г. Краснодар	ФармаЦвет	Грин Сайд	Фитофарм	Родные травы
Хлорогеновая кислота	1.50 ± 0.05	1.0 ± 0.2	0.50 ± 0.03	0.37 ± 0.02	2.0 ± 0.1
Гликозид феруловой кислоты I	0.017 ± 0.001	2.791 ± 0.008	1.804 ± 0.003	1.8 ± 0.3	2.2 ± 0.3
Гликозид феруловой кислоты II	0.017 ± 0.002	3.09 ± 0.07	1.83 ± 0.03	1.8 ± 0.2	2.5 ± 0.2
Лютеолин-7-О-глюкозид	0.258 ± 0.008	0.53 ± 0.08	0.369 ± 0.004	0.36 ± 0.05	0.64 ± 0.05
Дикофеилхинная кислота	12.0 ± 0.4	0.80 ± 0.10	0.488 ± 0.007	0.46 ± 0.04	1.2 ± 0.3
Цикориевая кислота	0.38 ± 0.04	0.051 ± 0.007	0.057 ± 0.004	0.077 ± 0.005	0.12 ± 0.01
Апигенин-7-глюкозид	0.21 ± 0.02	1.70 ± 0.10	0.61 ± 0.02	0.6 ± 0.1	0.8 ± 0.1
Апигенин	0.46 ± 0.04	0.05 ± 0.03	0.040 ± 0.002	0.050 ± 0.007	0.02 ± 0.01
Суммарное содержание ФС	14.9 ± 0.5	10.1 ± 0.4	5.7 ± 0.1	5.6 ± 0.6	9.4 ± 0.9

генина и цикориевой кислоты в образце, собранном на территории г. Краснодара, на порядок выше, чем в других образцах. Вероятно, что данный образец содержал ромашку других видов [27], однако это требует дальнейших исследований и подтверждения.

Изучены содержания нативных форм некоторых ФС в водных и водно-спиртовых экстрактах цветов ромашки аптечной (*Matricaria chamomilla* L.), полученных мацерацией, настаиванием, ультразвуковым, микроволновым, фармакопейным и субкритическим способами. Эффективность применения всех рассмотренных способов экстракции, за исключением ультразвуковой экстракции, по суммарному извлечению фенольных соединений из растительного сырья сопоставима. Определены суммарные содержания и концентрации индивидуальных фенольных соединений в экстрактах цветов ромашки аптечной различных производителей. Максимальное суммарное содержание фенольных соединений (10.1 мг/г) наблюдали в экстракте ромашки аптечной торговой марки “ФармаЦвет”.

Работа выполнена в рамках Госзадания Минобрнауки РФ (проект № FZEN-2020-0022) с использованием научного оборудования ЦКП “Эколого-аналитический центр” Кубанского государственного университета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Oniszczyk A., Olech M., Oniszczyk T., Wójtowicz A., Krawczyk W. Puffed cereals with added chamomile – Quantitative analysis of polyphenols and optimization of their extraction method // Ann. Agric. Environ. Med. 2017. V. 24. № 2. P. 222.
<https://doi.org/10.5604/12321966.1233564>
2. Berechet M., Manaila E., Stelescu M., Crăciun G. The composition of essential oils obtained from *Achillea millefolium* and *Matricaria chamomilla* L., originary from Romania // Rev. Chim. 2018. V. 68. № 12. P. 2787.
<https://doi.org/10.37358/rc.17.12.5979>
3. Chau C.-F., Wu S.-H. The development of regulations of Chinese herbal medicines for both medicinal and food uses // Trends Food Sci Technol. 2006. V. 17. № 6. P. 313.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.12.005>
4. Šibul F., Orčić D., Berežni S., Anačkov G., Mimica-Dukić N. HPLC–MS/MS profiling of wild-growing scentless chamomile // Acta Chromatogr. 2020. V. 32. № 2. P. 86.
<https://doi.org/10.1556/1326.2019.00546>
5. Singh O., Khanam Z., Misra N., Srivastava M. Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): An overview // Pharmacogn. Rev. 2011. V. 5. № 9. P. 82.
<https://doi.org/10.4103/0973-7847.79103>
6. Srivastava J.K., Shankar E., Gupta S. Chamomile: A herbal medicine of the past with a bright future (Review) // Mol. Med. Rep. 2010. V. 3. № 6. P. 895.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2010.377>
7. Тараховский Ю.С., Ким Ю.А., Абдралилов Б.С., Музафаров Е.Н. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина. Пушино: Synchronbook, 2013. 310 с.
8. Государственная Фармакопея Российской Федерации. Изд. 14. М., 2018. Т. 4. С. 6394.
9. Bączek K.B., Wiśniewska M., Przybył J., Kosakowska O., Węglarz Z. Arbuscular mycorrhizal fungi in chamomile (*Matricaria recutita* L.) organic cultivation // Ind. Crops Prod. 2019. V. 140. P. 1.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111562>
10. Xie X.-Y., Chen F.-F., Shi Y.-P. Simultaneous determination of eight flavonoids in the flowers of *Matricaria chamomilla* by high performance liquid chromatography // J. AOAC Int. 2014. V. 97. № 3. P. 778.
<https://doi.org/10.5740/jaoacint.13-029>
11. Cvetojević A., Švare-Gajić J., Mašković P., Savić S., Nikolić L. Antioxidant and biological activity of chamomile extracts obtained by different techniques: Perspective of using superheated water for isolation of biologi-

- cally active compounds // *Ind. Crops Prod.* 2015. V. 65. P. 582.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.09.044>
12. Mulinacci N., Romani A., Pinelli P., Vincieri F.F., Prucher D. Characterization of *Matricaria recutita* L. flower extracts by HPLC-MS and HPLC-DAD analysis // *Chromatographia*. 2000. V. 51. № 5–6. P. 301.
<https://doi.org/10.1007/BF02490607>
13. Ajila C.M., Brar S.K., Verma M., Tyagi R., Godbout S., Valéro J. Extraction and analysis of polyphenols: Recent trends // *Crit. Rev. Biotechnol.* 2011. V. 31. № 3. P. 227.
<https://doi.org/10.3109/07388551.2010.513677>
14. Nováková L., Vildová A., Mateus J.P., Gonçalves T., Solich P. Development and application of UHPLC-MS/MS method for the determination of phenolic compounds in Chamomile flowers and Chamomile tea extracts // *Talanta*. 2010. V. 82. № 4. P. 1271.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.06.057>
15. Valduga A.T., Gonçalves I.L., Magri E., Delalibera Finzer J.R. Chemistry, pharmacology and new trends in traditional functional and medicinal beverages // *Food Res. Int.* 2019. V. 120. P. 478.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.091>
16. Sentkowska A., Biesaga M., Pyrzyńska K. Effects of brewing process on phenolic compounds and antioxidant activity of herbs // *Food Sci. Biotechnol.* 2016. V. 25. № 4. P. 965.
<https://doi.org/10.1007/s10068-016-0157-9>
17. Maschi O., Cero E.D., Galli G.V., Caruso D., Bosio E., Dell'Agli M. Inhibition of human cAMP-phosphodiesterase as a mechanism of the spasmolytic effect of *Matricaria recutita* L. // *J. Agric. Food Chem.* 2008. V. 56. № 13. P. 5015.
<https://doi.org/10.1021/jf800051n>
18. Kassi E., Papoutsis Z., Fokialakis N., Messari I., Mitakou S., Moutsatsou P. Greek plant extracts exhibit selective estrogen receptor modulator (SERM)-like properties // *J. Agric. Food Chem.* 2004. V. 52. № 23. P. 6956.
<https://doi.org/10.1021/jf0400765>
19. Macchioni F., Perrucci S., Cecchi F., Cioni P.L., Morelli I., Pampiglione S. Acaricidal activity of aqueous extracts of chamomile flowers, *Matricaria chamomilla*, against the mite *Psoroptes cuniculi* // *Med. Vet. Entomol.* 2004. V. 18. № 2. P. 205.
<https://doi.org/10.1111/j.0269-283X.2004.00488.x>
20. Sentkowska A., Biesaga M., Pyrzyńska K. Retention study of flavonoids under different chromatographic modes // *J. Chromatogr. Sci.* 2016. V. 54. № 4. P. 516.
<https://doi.org/10.1093/chromsci/bmv174>
21. Raal A., Orav A., Püssa T., Valner C., Malmiste B., Arak E. Content of essential oil, terpenoids and polyphenols in commercial chamomile (*Chamomilla recutita* L. Rauschert) teas from different countries // *Food Chem.* 2012. V. 131. № 2. P. 632.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.042>
22. Kobayashi Y., Nakano Y., Inayama K., Sakai A., Kamiya T. Dietary intake of the flower extracts of German Chamomile (*Matricaria recutita* L.) inhibited compound 48/80-induced itch-scratch responses in mice // *Phytomedicine*. 2003. V. 10. № 8. P. 657.
<https://doi.org/10.1078/0944-7113-00283>
23. Ramos M.F.S., Santos E.P., Bizarri C.H.B., Mattos H.A., Padilha M.R.S., Duarte H.M. Preliminary studies towards utilization of various plant extracts as antisolar agents // *Int. J. Cosmet. Sci.* 2007. V. 18. № 3. P. 87.
<https://doi.org/10.1111/j.1467-2494.1996.tb00140.x>
24. Павлова Л.В., Платонов И.А., Куркин В.А., Афанасьева П.В., Новикова Е.А., Муханова И.М. Оценка эффективности извлечения биологически активных соединений экстрагентами в субкритическом состоянии из цветков ромашки аптечной (*Chamomilla recutita* R.), произрастающей в Самарской области // *Сверхкритические флюиды: теория и практика*. 2018. Т. 13. № 1. С. 16. (Pavlova L.V., Platonov I.A., Kurkin V.A., Afanasyeva P.V., Novikova E.A., Mukhanova I.M. Evaluation of the extraction efficiency of biologically active compounds from chamomile flowers (*Chamomilla recutita* R.) grown in the Samara region by extractants in the subcritical state // *Russ. J. Phys. Chem. B*. 2018. V. 12. № 8. P. 1212.)
<https://doi.org/10.1134/S2070205114060173>
25. Avula B., Wang Y.-H., Isaac G., Yuk J., Wrona M., Yu K., Khan I. Metabolic profiling of Hoodia, Chamomile, Terminalia species and evaluation of commercial preparations using ultrahigh-performance liquid chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry // *Planta Med.* 2017. V. 83. № 16. P. 1297.
<https://doi.org/10.1055/s-0043-109239>
26. Милевская В.В., Статкус М.А., Темердашев З.А., Киселева Н.В., Бутыльская Т.С., Шилько Е.А. Экстракция и определение биологически активных компонентов зверобоя и препаратов на его основе // *Журн. аналит. химии*. 2016. Т. 71. № 7. С. 768. (Milevskaya V.V., Temerdashev Z.A., Kiseleva N.V., Butyl'skaya T.S., Shil'ko E.A., Statkus M.A. Extraction and determination of biologically active components of St. John's wort and its pharmaceutical preparations // *J. Anal. Chem.* 2016. V. 71. № 7. P. 741.)
<https://doi.org/10.7868/S0044450216070136>
27. Avula B., Wang Y.-H., Wang M., Avonto C., Zhao J., Smillie T.J., Rua D., Khan I.A. Quantitative determination of phenolic compounds by UHPLC-UV-MS and use of partial least-square discriminant analysis to differentiate chemo-types of Chamomile/Chrysanthemum flower heads // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2014. V. 88. P. 278.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.08.037>
28. Сычев К.С. Методы высокоэффективной жидкостной хроматографии и твердофазной экстракции. М., 2006. С. 90.
29. Милевская В.В., Статкус М.А., Темердашев З.А., Киселева Н.В., Верниковская Н.А. Способы экстрагирования биологически активных веществ из лекарственных растений на примере компонентов зверобоя // *Журн. аналит. химии*. 2015. Т. 70. № 12. С. 1255. (Milevskaya V.V., Statkus M.A., Temerdashev Z.A., Kiseleva N.V., Vernikovskaya N.A. Methods for the extraction of biologically active substances from medicinal plants based on an example of St. John's wort components // *J. Anal. Chem.* 2015. V. 70. № 12. P. 1432.)
<https://doi.org/10.7868/S0044450215120129>
30. Biesaga M. Influence of extraction methods on stability of flavonoids // *J. Chromatogr. A*. 2011. V. 1218. № 18. P. 2505.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.02.059>
31. Карпук В.В. Фармакогнозия. Минск: БГУ, 2011. С. 65.
32. The Science of Flavonoids / Ed. Grotewold E. N.Y.: Springer, 2006. P. 50.

УДК 543.544.5.068.7+632.951.2

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ДИФЛУБЕНЗУРОНА В СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ МАТРИЦАХ

© 2023 г. Е. Ю. Алексеев^а, Т. Д. Черменская^а, *

^аВсероссийский научно-исследовательский институт защиты растений
шоссе Подбельского, 3, Санкт-Петербург-Пушкин, 196608 Россия

*E-mail: tchermenskaya@yandex.ru

Поступила в редакцию 24.05.2022 г.

После доработки 28.07.2022 г.

Принята к публикации 15.10.2022 г.

Статья посвящена разработке способа определения дифлубензурана методом ВЭЖХ с диодно-матричным детектором в сельскохозяйственной продукции. Образцы экстрагировали ацетонитрилом, затем очищали способом твердофазной экстракции при использовании сорбентов C18E, PSA и патрона Диапак С. Разработанный способ апробирован на зеленой массе растений, клубнях картофеля, зерне кукурузы, бобах сои, семенах подсолнечника, рапса и растительном масле в диапазоне концентраций от 0.025 до 0.25 мг/кг. Средние значения степени извлечения составили 81–91% с погрешностью 1.3–2.3%.

Ключевые слова: дифлубензуран, бензоилмочевина, ВЭЖХ, диодно-матричный детектор, QuEChERS, масличные культуры.

DOI: 10.31857/S0044450223030027, EDN: PUIONF

Инструментом обеспечения продовольственной безопасности является мониторинг химических и биологических рисков, для которого необходима разработка современных способов определения веществ.

Дифлубензуран (1-(4-хлорфенил)-3-(2,6-дифторбензоил)мочевина) — инсектицид третьего поколения, относящийся к группе регуляторов роста насекомых (Димилин, Герольд, Локустин), производное бензоилмочевина. Он зарегистрирован во многих странах как средство защиты овощных культур и грибов, уничтожения личинок комаров и мух, снижения численности саранчовых, борьбы против большого числа хвоегрызущих и листогрызущих насекомых.

Дифлубензуран (схема 1) — это белое кристаллическое твердое вещество без запаха. Практически нерастворим в воде и плохо растворим в полярных органических растворителях, относительно стабилен в кислых и нейтральных средах [1].

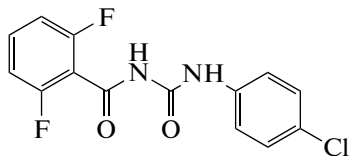


Схема 1. Структурная формула дифлубензурана.

В последние годы интерес к дифлубензурону и другим ингибиторам синтеза хитина возрос. Особенности механизма действия этих веществ позволяют эффективно бороться с популяциями членистоногих, резистентных к фосфорорганическим соединениям, пиретроидам, неоникотиноидам и другим группам инсектицидов.

На сегодняшний день существует несколько подходов к определению дифлубензурана в различных матрицах с использованием жидкостной хроматографии с различными типами детекторов [2–5]. В более ранних работах для этой цели использовали газовую хроматографию [6, 7].

Один из основных способов подготовки проб для определения остаточных количеств пестицидов на сегодняшний день — метод QuEChERS [8]. Использование данного метода для пробоподготовки позволяет за короткое время подобрать подходящие условия очистки широкого круга матриц, разработать условия пробоподготовки для смеси действующих веществ, обеспечить экспрессность анализа. Кроме того, подход QuEChERS допускает максимум модификаций, в отличие от других подходов. Большинство современных способов определения дифлубензурана базируется на данном подходе (табл. 1).

Как видно из табл. 1, основной метод, используемый для определения дифлубензурана, — тан-

Таблица 1. Сравнение методов определения дифлубензурина с использованием способа пробоподготовки QuEChERS

Объект исследования	Предел определения, мг/кг	Степень извлечения, %	Метод анализа	Условия экстракции	Метод очистки	Литература
Персики	0.01	83–119	ВЭЖХ-МС/МС*	Ацетонитрил; 3 г NaCl	дТФЭ: 100 мг PSA, 100 мг C18, 300 мг MgSO ₄	[9]
Мышцы и ткани печени	0.01	89–111	ВЭЖХ-МС/МС	Ацетон; 4 г MgSO ₄ ; 1 г NaCl; 1 г цитрата Na; 0.5 г динатрия цитрата полугидратного	ТФЭ: Smart-SPE ZAX-50 мг; Smart-SPE PSA-30 мг; Smart-SPE C18-50 мг; шприцевый фильтр (0.45 мкм)	[10]
Фундук	0.01	85–105	ВЭЖХ-МС/МС	50% ацетонитрил; 2 г MgSO ₄ ; 1 г CH ₃ COONa	дТФЭ: 50 мг PSA и 200 мг MgSO ₄ ; шприцевый фильтр (0.45 мкм)	[11]
Овощи	0.01	87–104	ВЭЖХ-МС/МС	Ацетонитрил; 4 г MgSO ₄ ; 1 г NaCl	дТФЭ: 75 мг C18, 100 мг MgSO ₄	[12]
Грибы	0.05	79–107	ВЭЖХ-МС/МС	Ацетонитрил; 4 г MgSO ₄ ; 1 г NaCl	дТФЭ: 50 мг PSA, 100 мг MgSO ₄ ; шприцевый фильтр (0.22 мкм)	[13]
Томат	0.01	96–115	ВЭЖХ-МС/МС	Ацетонитрил 1% CH ₃ COOH; 4 г MgSO ₄ ; 1.7 г CH ₃ COONa	Шприцевый фильтр (0.2 мкм)	[14]
Молоко	0.01	87–104	ВЭЖХ-МС/МС	Ацетонитрил; 4 г MgSO ₄ ; 1 г NaCl	дТФЭ: 100 мг PSA, 300 мг MgSO ₄	[15]
Молоко и ткани КРС	0.01	72–105	ВЭЖХ-ДМД	Ацетонитрил; 4 г MgSO ₄ ; 1 г NaCl	ТФЭ: Phenomenex Strata C18; шприцевый фильтр (0.45 мкм)	[3]

* ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с tandemной масс-спектрометрией; дТФЭ – дисперсионная твердофазная экстракция; ВЭЖХ-ДМД – высокоэффективная жидкостная хроматография с диодно-матричным детектированием.

демная масс-спектрометрия. Разрабатываются высокоэффективные комбинированные способы определения, такие как сочетание метода QuEChERS и дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции [16, 17], которые обеспечивают степень извлечения, близкую к 100%. Разработаны достаточно специфические перспективные подходы к определению дифлубензурана, пока широко не применяемые. Это, например, метод прямой лазерной фотоиндуцированной флуоресценции [18] или кинетический спектрофотометрический метод [19].

Большинство исследовательских работ направлено на разработку высокочувствительных методов, позволяющих определять минимальные следы пестицидов, иногда в ущерб продолжительности и стоимости анализа. При рутинном анализе образцов на содержание остаточных количеств пестицидов с учетом установленных максимально допустимых уровней (МДУ) высокая чувствительность не всегда необходима, более значимыми факторами становятся экспрессность анализа, его стоимость и трудозатраты. Наиболее перспективными с точки зрения приведенных критериев можно считать способы, основанные на пробоподготовке методом QuEChERS и его модификациях, и последующем детектировании методом жидкостной хроматографии с детектором на диодной матрице (ДМД). Реагенты для реализации данного метода общедоступны и недороги; стоимость ВЭЖХ-ДМД-системы и ее обслуживание намного ниже по сравнению с ВЭЖХ-МС, кроме того, последний метод предъявляет более высокие требования к чистоте и качеству растворителей.

Стоит отметить, что способы определения остаточных количеств всего класса бензоилмочевин в масличных культурах отсутствуют в отечественной и в зарубежной литературе.

Цель настоящей работы — создание универсального способа определения дифлубензурана в растениях разных групп, обеспечивающего экспрессность и высокую полноту извлечения на фоне снижения затрат на анализ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты и материалы. Для извлечения аналита применяли ацетонитрил (сорт 5, Кριοхром, Россия), гексан сорт 3 (Кριοхром, Россия), хлорид натрия ч. д. а. (Вектон, Россия), сульфат магния безводный (97%, Sigma-Aldrich, Германия), натрия цитрат двузамещенный сесквигидрат (99%, Sigma-Aldrich, Германия), натрия цитрат трехзамещенный дигидрат (98%, Sigma-Aldrich, США), этилацетат х. ч. (Вектон, Россия).

Для очистки экстрактов использовали сорбент на основе силикагеля с привитыми эндкепиро-

ванными октадецильными группами (C18E) и сорбент с привитыми пропиламинными группами (CH₂)₃NH₂ (PSA) (Supelco, США), Диапак С (гидрофильный слабокислотный сорбент с постоянной активностью, 3 мл, 40–63 мкм, 60 Å) (БиоХимМак СТ, Россия).

Для приготовления подвижной фазы использовали ацетонитрил сорт 0 (Кριοхром, Россия), воду (бидистиллированную, деионизированную), кислоту ортофосфорную х. ч. (Вектон, Россия).

Аппаратура. Использовали ультраэффективный жидкостный хроматограф ACQUITY (Waters) с быстросканирующим диодно-матричным детектором, дегазатором, автоматическим пробоотборником и термостатом колонки. Хроматографическая колонка ACQUITY UPLC BEH C18 длиной 100 мм, внутренним диаметром 2.1 мм и зернением фазы 1.7 мкм (Waters).

Аппарат для встряхивания Multi Reax (Heidolph), центрифуга 5810 (Eppendorf AG), воздушный испаритель (VLM GMBH), вакуумный манипулятор для работы с патронами для твердофазной экстракции (Waters) с мембранным насосом V 850 (Buchi).

Приготовление стандартных растворов. Стандартный раствор дифлубензурана с концентрацией 0.5 мг/мл готовили из аналитического стандарта с чистотой 99.8% (Sigma-Aldrich, Швейцария) путем его растворения (50 ± 0.5) мг в ацетонитриле в мерной колбе емк. 100 мл. Градуировочные растворы с концентрациями 0.05, 0.1, 0.2 и 0.5 мкг/мл готовили методом последовательного разбавления, используя подвижную фазу. Градуировочную зависимость строили по серии стандартных растворов, содержащих от 0.05 до 0.5 мкг/мл дифлубензурана в подвижной фазе.

Условия хроматографирования. Подвижная фаза: смесь ацетонитрила и 0.005 М Н₃Р₄ (45 : 55, по объему). Скорость потока элюента 0.2 мл/мин. Температура колонки 30°C. Рабочая длина волны детектора 270 нм. Объем вводимой пробы 10 мкл.

Дифлубензурон идентифицировали по времени удерживания, количественное определение проводили методом абсолютной градуировки. Для каждого из четырех уровней концентраций дифлубензурана в диапазоне 0.05–0.5 мкг/мл проводили по три измерения. Градуировочный график линейен с коэффициентом корреляции 0.999.

Полноту извлечения дифлубензурана определяли на четырех уровнях концентраций в пяти повторях.

Пробоподготовка. Экстракция дифлубензурана из зеленой массы и клубней картофеля. Навеску измельченной матрицы (10 г) помещали в полипропиленовую центрифужную пробирку емк. 50 мл, добавляли 10 мл ацетонитрила и 1 г хлорида натрия. После перемешивания и центрифугирова-

Таблица 2. Степень извлечения дифлубензурана в зависимости от исследуемой матрицы при использовании метода QuEChERS EN 15662

Матрица	Степень извлечения, %
Зеленая масса	—*
Картофель	59
Соя	53
Кукуруза	75
Подсолнечник	81
Рапс	69
Растительное масло	74

* Невозможно определить.

ния из верхнего ацетонитрильного слоя отбирали 5 мл экстракта и переносили в центрифужную пробирку емк. 15 мл, содержащую 150 мг сорбента для твердофазной экстракции (PSA) и 900 мг безводного сульфата магния. После перемешивания и центрифугирования из верхнего ацетонитрильного слоя отбирали 2 мл экстракта (аликвота, соответствующая навеске массой 2 г) (при необходимости уменьшения предела определения можно увеличить аликвоту, но не более 5 мл), переносили в стеклянную пробирку и упаривали досуха в токе воздуха при температуре не выше 40°C. Сухой остаток подвергали очистке на патроне для твердофазной экстракции Диапак С.

Экстракция дифлубензурана из зерна кукурузы, бобов сои, семян подсолнечника, рапса и растительного масла. Навеску измельченной матрицы или масла (10 г) помещали в полипропиленовую центрифужную пробирку емк. 50 мл, последовательно добавляли 10 мл ацетонитрила, 1 г хлорида натрия и 7 мл дистиллированной воды. После перемешивания и центрифугирования от верхнего ацетонитрильного слоя отбирали 5 мл (при необходимости уменьшения предела определения можно увеличить аликвоту, но не более 7 мл), переносили в центрифужную пробирку емк. 15 мл, содержащую 150 мг сорбента для твердофазной экстракции (PSA), 150 мг эндкепированного сорбента для твердофазной экстракции (C18E) и 900 мг безводного сульфата магния. После перемешивания и центрифугирования из верхнего слоя отбирали 2 мл экстракта (аликвота, соответствующая навеске массой 2 г) (при необходимости уменьшения предела определения можно увеличить аликвоту, но не более 5 мл), переносили в стеклянную пробирку и упаривали досуха в токе воздуха при температуре не более 40°C. Сухой остаток подвергали очистке на патроне для твердофазной экстракции Диапак С.

Очистка на патроне для твердофазной экстракции Диапак С. Полученный сухой остаток растворяли в 1 мл смеси гексан—этилацетат (9 : 1)

и наносили на предварительно кондиционированный патрон, процедуру повторяли с 1 мл смеси гексан—этилацетат (9 : 1). Патрон промывали 5 мл смеси гексан—этилацетат (9 : 1). Дифлубензурон элюировали 6 мл смеси гексан—этилацетат (1 : 1), элюат собирали, упаривали досуха в токе воздуха при температуре не выше 40°C, остаток растворяли в 1 мл подвижной фазы и 10 мкл вводили в хроматограф.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследовали следующие сельскохозяйственные культуры и продукты их переработки: зеленую массу (ботва картофеля), клубни картофеля, бобы сои, зерно кукурузы, семена подсолнечника и рапса, растительное масло.

Первоначально для экстракции дифлубензурана и очистки экстракта применили метод QuEChERS EN 15662 [20], основанный на извлечении аналита из образцов ацетонитрилом в присутствии цитратного буферного раствора, насыщенного сульфатом магния и обеспечивающего разделение водной и органической фаз; очистке ацетонитрильного экстракта с помощью дисперсионной твердофазной экстракции (ДФЭ) на PSA. Так как исследовали в том числе маслосодержащие матрицы, для очистки экстрактов добавляли сорбент C18E, обеспечивающий эффективное удаление белков, жиров и других коэкстрактивных веществ.

Как видно из табл. 2, значение степени извлечения более 80% было достигнуто только при анализе подсолнечника. Экстракты всех исследуемых растительных матриц были недостаточно очищены и, как следствие, хроматографический фон был высокий, что не позволило достоверно определить степень извлечения аналита (рис. 1). Кроме того, анализ плохо очищенных проб негативно сказывается на сроке службы колонки и других узлов ВЭЖХ-системы.

При анализе проб сравнивали две аналитической колонки — заполненную сорбентом с привитыми монофункциональными полярными группами ВЕН С-18 (100 × 2.1 мм, 1.7 мкм) и колонку с привитыми монофункциональными полярными группами ВЕН С-8 (150 × 2.1 мм, 1.7 мкм), которую часто используют для определения дифлубензурана [21]. Вследствие отсутствия заметных различий в качестве разделения хроматографируемых экстрактов на указанных колонках и высокой стоимости колонки с фазой С-8 в дальнейшей работе использовали колонку ВЕН С-18.

При использовании УФ-детектора определение дифлубензурана обычно проводят при длинах волн 220, 254 нм или путем непрерывной регистрации спектра при использовании диодно-матричного детектора. В качестве компонентов

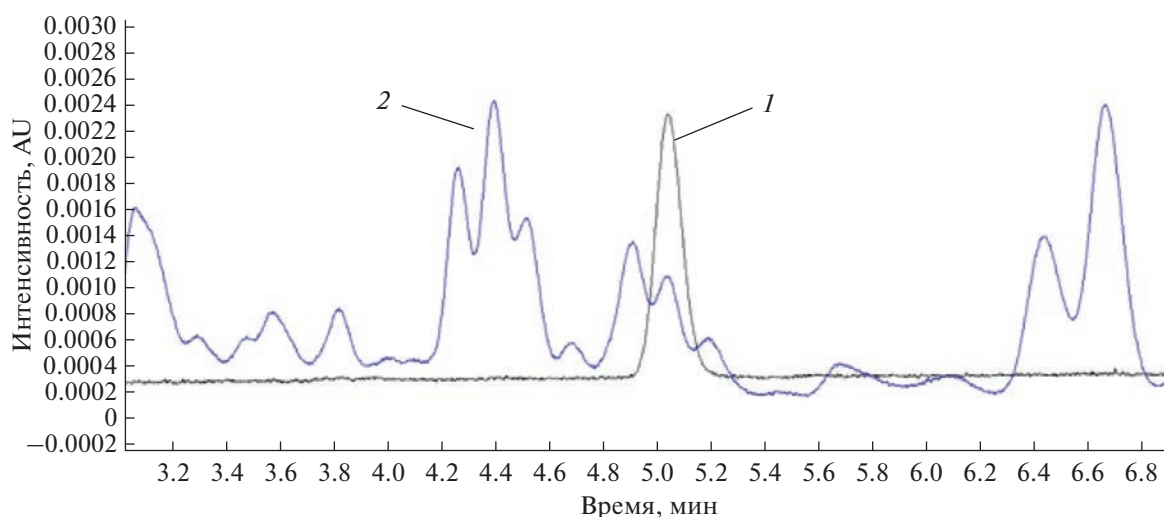


Рис. 1. Хроматограмма стандартного раствора дифлубензурана (ДФБ) с концентрацией 0.1 мкг/мл (1) и хроматограмма экстракта ботвы, полученная при пробоподготовке методом EN QuEChERS, с внесением 0.05 мг/кг дифлубензурана (2).

подвижной фазы, как правило, используют ацетонитрил, воду и метанол в разных соотношениях [2, 3, 17, 21]. Выбор таких значений длин волн вызывает вопрос, так как в этих условиях поглощает свет большое количество органических соединений. В УФ-спектре используемого нами аналитического стандарта дифлубензурана имеется один максимум поглощения при 257 нм. Чтобы снизить влияние примесей, мы использовали длину волны 270 нм. В этом случае практически без потери чувствительности поглощение компонентов матрицы не мешает идентификации аналита. Нижняя граница определяемых содержаний — 0.5 нг, предел обнаружения — 0.05 мкг/мл.

В процессе анализа, выявили следующие проблемы:

1. Хроматографический пик дифлубензурана при исследовании экстракта зеленой массы оказался недоступным для идентификации из-за недостаточной очистки и, как следствие, перекрытия пика определяемого вещества с пиками примесей.

2. Из-за высокого содержания природных липидов в некоторых исследуемых культурах при растворении проб в подвижной фазе образовывалась эмульсия масла и ацетонитрила. Особенно это было заметно при анализе сои. Очистки с помощью селективного для липидов сорбента C18E оказалось недостаточно.

Основываясь на полученных данных, сделали следующие предположения:

1. Недостаток влажности некоторых проб может негативно влиять на экстракцию и снижать процент извлечения;

2. Возможна адсорбция экстракционными солями исследуемого вещества;

3. Возможно химическое взаимодействие действующего вещества с экстракционными солями.

С учетом сделанных наблюдений и предположений предприняли следующие шаги:

1. В связи с недостаточной чистотой проб после дТФЭ ввели дополнительную стадию очистки с помощью патрона для ТФЭ по схеме, приведенной в “Экспериментальной части”;

2. Дополнительно увлажнили сухую пробу путем добавления 7 мл воды на 10 г сухой пробы;

3. В связи со стабильностью дифлубензурана и нейтральной средой изучаемых растительных матриц отказались от цитратного буферного раствора. Кроме того, исключили безводный сульфат магния. Хлорида натрия в количестве 1 г оказалось достаточно для повышения ионной силы раствора и разделения фаз. Повышение ионной силы водного раствора с помощью хлорида натрия — достаточно распространенный способ, который использовали ранее для определения абактина во фруктах и овощах [22].

В результате предложили модифицированный способ определения дифлубензурана, описанный выше в “Экспериментальной части”.

Избирательность способа определения дифлубензурана обеспечивается сочетанием условий подготовки проб и хроматографирования. Метрологические характеристики приведены в табл. 3.

Схема пробоподготовки апробирована на всех изученных матрицах (табл. 4). В результате удалось достичь степени извлечения выше 80% для всех изучаемых культур и около 90% для ботвы и клубней картофеля (рис. 2).

Таблица 3. Метрологические характеристики методики определения дифлубензурана

Характеристика	Значение
Показатель точности (границы относительной погрешности), $\pm\delta$, %	25
Показатель повторяемости (относительное среднее квадратическое отклонение повторяемости), σ_r , %	10
Показатель воспроизводимости (относительное среднее квадратическое отклонение воспроизводимости), σ_R , %	12.5
Предел повторяемости (значение допустимого расхождения между двумя результатами параллельных определений), r , %	28
Предел воспроизводимости (значение допустимого расхождения между двумя результатами измерений, полученных в разных лабораториях), R , %	36

Таблица 4. Характеристики методики определения остаточных количеств дифлубензурана в некоторых объектах природного происхождения ($n = 20$, $P = 0.95$)

Объект анализа	Предел определения, мг/кг	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Степень извлечения, %	Стандартное отклонение, %	Доверительный интервал среднего результата, $\pm$ %
Зеленая масса	0.025	0.025–0.25	89.9	5.31	2.33
Клубни картофеля	0.025	0.025–0.25	91.3	5.11	2.24
Зерно кукурузы	0.025	0.025–0.25	84.0	4.93	2.16
Бобы сои	0.025	0.025–0.25	80.7	3.29	1.44
Семена подсолнечника	0.025	0.025–0.25	83.0	4.56	2.00
Семена рапса	0.025	0.025–0.25	80.9	3.32	1.45
Растительные масла	0.025	0.025–0.25	81.0	2.98	1.31

Наибольшие сложности при извлечении дифлубензурана из исследуемых матриц в нашем случае связаны с тем, что часть их относится к масло-

содержащим растениям. В литературе преимущественно приведены сведения об экстракции дифлубензурана из матриц, содержащих доста-

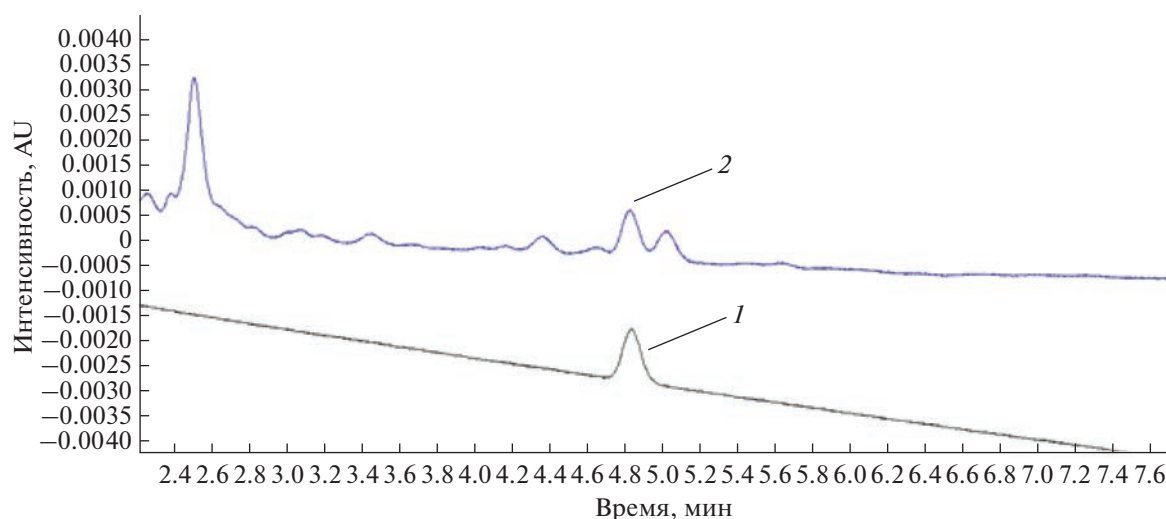


Рис. 2. Хроматограмма стандартного раствора дифлубензурана с концентрацией 0.05 мкг/мл (1) и хроматограмма экстракта ботвы с внесением 0.025 мг/кг дифлубензурана (2).

точное количество воды — из яблок, груш, винограда, томатов и пр. В этих случаях использование в качестве экстрагента органического растворителя и очистки на картриджах оказывается достаточным для достижения степени извлечения 88–100% и 92.9–105% для детекторов УФ/ДМД и МС с относительными стандартными отклонениями 2.9–11 и 3.7–14% соответственно [2, 23]. Более сложные методы связаны с использованием ионно-жидкостной дисперсионной микроэкстракции, что позволяет достичь низких пределов определения (0.005 мг/кг) с удовлетворительной полнотой извлечения и погрешностью выше 5% [16, 17]. Для жиросодержащих объектов описано определение дифлубензурина в тканях животных, молоке, рыбе, основанное на экстракции метанолом с последующей очисткой экстракта на картридже с C18 [3, 24].

Многоступенчатая пробоподготовка при анализе проб мандаринов и яблок на содержание нескольких пестицидов, описанная в литературе [5], позволила достичь степени извлечения, превышающей 94%. Однако с учетом использования МС-детектирования предел определения не сильно отличался от достигнутого нами и составил 0.02 мг/кг.

Несмотря на все большую популярность ВЭЖХ-МС при определении пестицидов, использование УФ-детектора или диодной матрицы по-прежнему актуально. Определение инсектицидов, фунгицидов и гербицидов в растениях и объектах окружающей среды с помощью ВЭЖХ-УФ также характеризуется высокой степенью извлечения аналитов с небольшой погрешностью и достаточно низкими пределами определения [25–28].

* * *

Таким образом, разработанный способ характеризуется следующими преимуществами: высокой степенью извлечения (80.7–91.3%); высокой воспроизводимостью; является универсальным для большого числа исследуемых сельскохозяйственных культур, в отличие от ранее применявшихся методов определения дифлубензурина. Введение дополнительной стадии очистки с помощью ТФЭ позволяет достичь однозначной идентификации исследуемого вещества даже в сложных (высокопигментированных, маслосодержащих) матрицах и снизить предел определения методики. Для некоторых анализируемых культур ранее отсутствовали способы определения остаточных количеств дифлубензурина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Junquera P., Hosking B., Gameiro M., Macdonald A.* Benzoylphenyl ureas as veterinary antiparasitics. *An*

overview and outlook with emphasis on efficacy, usage and resistance // *Parasite*. 2019. V. 26. P. 26.

2. *Rodriguez E., de Balugera Z.G., Goicolea M.A., Barrio R.J.* HPLC/diode-array method for the determination of the pesticide diflubenzuron and its major metabolites 2,6-difluorobenzamide, 4-chlorophenylurea, and 4-chloroaniline in forestry matrices // *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 1998. V. 21. № 12. P. 1857.
3. *Tfouni S.A.V., Furlani R.P.Z., Carreiro L.B., Loredi I.S.D., Gomes A.G., Alves L.A., Mata R.S.S., Fonseca A.M.D., Rocha R.M.S.* Determination of diflubenzuron residues in milk and cattle tissues // *Arq. Bras. Med. Veterinária e Zootec.* 2013. V. 65. № 1. P. 301.
4. *Yang X., Xia Y., Liao X., Zuo Y., Liao Y., Liu H.* Fragmentation study and analysis of benzoylurea insecticides and their analogs by liquid chromatography–electrospray ionization–mass spectrometry // *Talanta*. 2006. V. 70. № 1. P. 75.
5. *Kim J.-H., Seo J.-S., Moon J.-K., Kim J.-H.* Multi-residue method development of 8 benzoylurea insecticides in mandarin and apple using high performance liquid chromatography and liquid chromatography–tandem mass spectrometry // *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 2013. V. 56. № 1. P. 47.
6. *Mensah J.K., Lundanes E., Greibrokk T., Holen B.* Determination of diflubenzuron in apples by gas chromatography // *J. Chromatogr. A*. 1997. V. 765. № 1. P. 85.
7. *Wimmer M.J., Smith R.R., Jones J.P.* Analysis of diflubenzuron by gas chromatography/mass spectrometry using deuterated diflubenzuron as internal standard // *J. Agric. Food Chem.* 1991. V. 39. № 2. P. 280.
8. *Anastassiades M., Lehotay S.J., Stajnbaher D., Schenck F.J.* Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce // *J. AOAC Int.* 2003. V. 86. № 2. P. 412.
9. *Dong M., Ma L., Zhan X., Chen J., Huang L., Wang W., Zhao L.* Dissipation rates and residue levels of diflubenzuron and difenoconazole on peaches and dietary risk assessment // *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2019. V. 108. Article 104447.
10. *Hamamoto K., Iwatsuki K., Akama R., Koike R.* Rapid multiresidue determination of pesticides in livestock muscle and liver tissue via modified QuEChERS sample preparation and LC-MS/MS // *Food Addit. Contam.: Part A*. 2017. V. 34. № 7. P. 1162. <https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1319075>
11. *Cebi N., Manav O.G., Olgun E.O.* Analysis of pesticide residues in hazelnuts using the QuEChERS method by liquid chromatography–tandem mass spectrometry // *Microchem. J.* 2021. V. 166. Article 106208.
12. *An J., Zhang Y., Sheng Y., Liu Y., Yu H., Jing K.* Determination of residues of diflubenzuron and chlorbenzuron in vegetables by high performance liquid chromatography with QuEChERS purification // *Phys. Test. Chem. Anal. Part B*. 2022. V. 58. № 5. P. 603.
13. *Du P., Liu X., Gu X., Dong F., Xu J., Kong Z., Li Y., Zheng Y.* Rapid residue analysis of pyriproxyfen, avermectins and diflubenzuron in mushrooms by ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem

- mass spectrometry // *Anal. Methods*. 2013. V. 5. № 23. P. 6741.
14. *Stringhini F.M., Ribeiro L.C., Rocha G.I., de B. Kuntz J.D., Zanella R., Prestes O.D., Adaiame M.B.* Dilution of QuEChERS extracts without cleanup improves results in the UHPLC-MS/MS multiresidue analysis of pesticides in tomato // *Food Anal. Methods*. 2021. V. 14. № 8. P. 1511.
 15. *Furlani R., Gomes F., S. Tfouni, Camargo M., Ramos B., Daniel D.* Development of an analytical method for determination of antiparasitics residues in milk using QuEChERS and analysis by LC-MS/MS. Agilent Technologies, 2014. P. 4. URL: <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-3948EN.pdf> (28.07.2022).
 16. *Zeng H., Yang X., Yang M., Wu X., Zhou W., Zhang S., Lu R., Li J., Gao H.* Ultrasound-assisted, hybrid ionic liquid, dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of insecticides in fruit juices based on partition coefficients // *J. Sep. Sci.* 2017. V. 40. № 17. P. 3513.
 17. *Ruan C., Zhao X., Liu C.* Determination of diflubenzuron and chlorbenzuron in fruits by combining acetonitrile-based extraction with dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography // *J. Sep. Sci.* 2015. V. 38. № 17. P. 2931.
 18. *Diaw P.A., Maroto A., Mbaye O.M.A., Gaye-Seye M.D., Stephan L., Coly A., Deschamps L., Tine A., Aaron J.J., Giamarchi P.* Determination of phenylurea pesticides by direct laser photo-induced fluorescence // *Talanta*. 2013. V. 116. P. 569.
 19. *Pecev-Marinkovic E., Grahovac Z., Pavlović A., Tošić S., Rašić Mišić I., Mitić M., Miletić A., Sejmanović D.* Development of a kinetic spectrophotometric method for insecticide diflubenzuron determination in water and baby food samples // *Hem. Ind.* 2018. V. 72. № 5. P. 305.
 20. BS EN 15662:2018 Foods of plant origin. Multimethod for the determination of pesticide residues using GC- and LC-based analysis following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE. Modular QuEChERS-method – European Standards URL: <https://www.en-standard.eu/bs-en-15662-2018-foods-of-plant-origin.-multimethod-for-the-determination-of-pesticide-residues-using-gc-and-lc-based-analysis-following-acetonitrile-extraction/partitioning-and-clean-up-by-dispersive-spe.-modular-quechers-method/> (02.03.2021).
 21. FAO. FAO Specifications and Evaluations for Agricultural Pesticides – DIFLUBENZURON. Fao, 2011.
 22. *Chamkasem N., Papathakis M.L., Lee S.M.* Liquid chromatographic determination of abamectin in fruits and vegetables // *J. AOAC Int.* 1993. V. 76. № 3. P. 691.
 23. *Markoglou A.N., Bempelou E.D., Liapis K.S., Ziogas B.N.* Determination of benzoyleurea insecticide residues in tomatoes by high-performance liquid chromatography with ultraviolet-diode array and atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry detection // *J. AOAC Int.* 2007. V. 90. № 5. P. 1395.
 24. *Luvizotto-Santos R., Cordeiro P.J.M., Vieira E.M.* Analysis of diflubenzuron in tilapia filet by HPLC-DAD // *J. Chromatogr. Sci.* 2009. V. 47. № 9. P. 785.
 25. *Комарова А.С., Черменская Т.Д., Человечкова В.В.* Определение аметоктрадина в растительных остатках и объектах окружающей среды методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектором // *Журн. аналит. химии*. 2017. Т. 72. № 10. С. 904.
 26. *Алексеев Е.Ю., Черменская Т.Д.* Оптимизация метода определения остаточных количеств флорасулама в сельскохозяйственных культурах // *Вестник защиты растений*. 2018. Т. 3. № 97. С. 76.
 27. *Человечкова В.В., Комарова А.С., Черменская Т.Д.* Одновременное определение имидаклоприда и клотианидина в картофеле и сахарной свекле // *Агрохимия*. 2018. № 7. С. 81.
 28. *Черменская Т.Д., Алексеев Е.Ю.* Оптимизация совокупности процедур и условий одновременного определения амикарбазона и его метаболитов в объектах окружающей среды и растительных матрицах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектированием // *Журн. аналит. химии*. 2021. Т. 76. № 2. С. 151.

НОВЫЕ КНИГИ ИЗДАТЕЛЬСТВА ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY

DOI: 10.31857/S0044450223030179, EDN: PUJOPI

1. Pigmented Cereals and Millets: Bioactive Profile and Food Applications. Eds. Bangar S.P., Maqsood S., Siroha A.K. RSC PublishingБ 2023. 420 p.
2. Compendium of Terminology in Analytical Chemistry. Ed. Hibbert D.B. RSC PublishingБ 2022. 666 p.
3. *Saran R.* Analytical Techniques for Trace Elements in Geochemical Exploration. RSC PublishingБ 2022. 378 p.
4. Bio- and Nano-sensing Technologies for Food Processing and Packaging. Ed. Shukla A.K. RSC Publishing, 2022. 378 p.
5. Environmental Nanopollutants: Sources, Occurrence, Analysis and Fate. Eds. Szpunar J., Jiménez-Lamana J. RSC Publishing, 2022. 502 p.
6. Advances in Portable X-ray Fluorescence Spectrometry: Instrumentation, Application and Interpretation. Eds. Drake B.L., MacDonald B.L. RSC Publishing, 2022. 546 p.
7. Nuclear Magnetic Resonance: V. 48. Eds. Hodgkinson P., Sauri J. RSC Publishing, 2022. 546 p.
8. Ionic Polymer Metal Composites (IPMCs): Smart Multi-Functional Materials and Artificial Muscles, V. 1. Ed. Shahinpoor M. RSC Publishing, 2022. 454 p.
9. Conservation Science: Heritage Materials. Eds. Garside P., Richardson E. RSC Publishing, 2022. 478 p.
10. Fats and Associated Compounds. Eds. Lopez J.M.M., Saez A.C. RSC Publishing, 2022. 362 p.
11. Handbook of Antioxidant Methodology: Approaches to Activity Determination. Eds. Prenzler P.D., Ryan D., Robards K. RSC Publishing, 2022. 516 p.
12. MALDI Mass Spectrometry Imaging: From Fundamentals to Spatial Omics. Ed. Siegel T.P. RSC Publishing, 2022. 500 p.
13. Nuclear Magnetic Resonance: V. 47. Ed. Hodgkinson P. RSC Publishing, 2022. 284 p.
14. Analytical Applications of Functionalized Magnetic Nanoparticles. Ed. Hussain C.M. RSC Publishing, 2022. 606 p.
15. Analytical Strategies for Cultural Heritage Materials and their Degradation. Ed. Madariaga J.M. RSC Publishing, 2022. 302 p.
16. Challenges in Detection Approaches for Forensic Science. Ed. Dennany L. RSC Publishing, 2021. 232 p.
17. Food Proteins and Peptides: Emerging Biofunctions, Food and Biomaterial Applications. Ed. Udenigwe C.C. RSC Publishing, 2021. 232 p.
18. Disposable Electrochemical Sensors for Healthcare Monitoring: Material Properties and Design. Eds. Pandikumar A., Devi K.S.S. RSC Publishing, 2021. 448 p.
19. Droplet Microfluidics. Eds. Ren C., Lee A. RSC Publishing, 2021. 300 p.
20. Detection Methods in Precision Medicine. Eds. Yang M.(M.), Thompson M. RSC Publishing, 2021. 370 p.
21. Computational Techniques for Analytical Chemistry and Bioanalysis. Eds. Wilson P.B., Grootveld M. RSC Publishing, 2021. 366 p.
22. Advanced Fragmentation Methods in Biomolecular Mass Spectrometry: Probing Primary and Higher Order Structure with Electrons, Photons and Surfaces. Ed. Lermyte F. RSC Publishing, 2021. 342 p.
23. Electron Paramagnetic Resonance: V. 27. Eds. Chechik V., Murphy D.M., Bode B.E. RSC Publishing, 2021. 252 p.
24. Confining Electrochemistry to Nanopores: From Fundamentals to Applications. Ed. Long Y.-T. RSC Publishing, 2021. 256 p.
25. NMR and MRI of Electrochemical Energy Storage Materials and Devices. Eds. Yang Y., Fu R., Huo H. RSC Publishing, 2021. 550 p.
26. Nuclear Magnetic Resonance: V. 46. Ed. Hodgkinson. P. RSC Publishing, 2021. 290 p.

Н.Б. Зоров

Химический факультет МГУ

имени М.В. Ломоносова