

ISSN 0044-4502

Том 78, Номер 10

Октябрь 2023



ЖУРНАЛ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ



www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 78, номер 10, 2023

**Номер посвящен тематике IV Всероссийской конференции
по аналитической спектроскопии
(продолжение).**

Редактор-составитель – З.А. Темердашев

ОБЗОРЫ

- Перестраиваемые диодные лазеры для аналитики и диагностики
М. А. Большов, Ю. А. Курицын, В. В. Лигер, В. Р. Мироненко, Я. Я. Понуровский 867
- Современные подходы к извлечению и концентрированию биологически
активных веществ из растительных объектов с применением методов
микроэкстракции для их хромато-масс-спектрометрического определения
Е. А. Бессонова, Д. А. Карпицкий, Л. А. Карцова 883
- Атомно-спектральные методы в исследовании свойств и поведения
наноразмерных магнитных материалов в биологических системах
*И. В. Кубракова, О. Н. Гребнева-Балюк, Д. В. Пряжников,
М. С. Киселева, О. О. Ефанова* 897
- Особенности методологии инфракрасной фурье-спектроскопии и интерпретации
спектроскопических данных при анализе микробиологических объектов
А. А. Камнев, А. В. Тугарова 914

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- S,N-содержащие сорбенты для дугового атомно-эмиссионного анализа
соединений редкоземельных элементов
*А. А. Архипенко, М. С. Доронина, Н. А. Короткова, А. С. Шевченко,
В. Б. Барановская, Ю. С. Дальнова* 929
- Определение 15 биомаркеров функционального состояния в моче человека методом
высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим
детектированием
М. А. Ленинский, Е. И. Савельева, М. В. Беляков, Г. В. Каракашев, Н. А. Самченко 942
- Концентрирование и тест-определение фенолов с применением нановолокна
на основе полиамида
Т. М. Махова, А. И. Аржанухина, С. Ю. Доронин 953
-
-

УДК 543.42;621.373.826

ПЕРЕСТРАИВАЕМЫЕ ДИОДНЫЕ ЛАЗЕРЫ ДЛЯ АНАЛИТИКИ И ДИАГНОСТИКИ

© 2023 г. М. А. Большов^{а, *}, Ю. А. Курицын^а, В. В. Лигер^а, В. Р. Мироненко^а, Я. Я. Понуровский^б

^аИнститут спектроскопии Российской академии наук
ул. Физическая, 5, Троицк, Москва, 108840 Россия

^бИнститут общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук
ул. Вавилова, 38, Москва, 119991 Россия

*e-mail: mbolshov@mail.ru, bolshov@isan.troitsk.ru

Поступила в редакцию 23.05.2023 г.

После доработки 06.06.2023 г.

Принята к публикации 07.06.2023 г.

Диодные лазеры (ДЛ) непрерывного действия с перестраиваемой длиной волны излучения нашли широкое применение в самых различных областях аналитической спектроскопии и диагностики. Перестраиваемые ДЛ работают в ближней и средней ИК-области спектра, поэтому они успешно используются для детектирования большого числа простых молекул, представляющих интерес для экологического мониторинга атмосферы, контроля производственных процессов, диагностики процессов в до- и сверхзвуковых газовых потоках. Отсутствие коммерческих ДЛ, работающих в спектральном диапазоне короче 400 нм, ограничило их использование в элементном анализе, поскольку резонансные линии подавляющего большинства свободных атомов элементов лежат в области 250–400 нм. Настоящий обзор посвящен обсуждению разнообразных вариантов применения ДЛ непрерывного действия, которые малоизвестны химикам-аналитикам. Кратко перечислены основные характеристики таких лазеров и обсуждены их достоинства, обеспечившие их успешное применение, как в решении традиционных задач аналитической спектроскопии, так и для диагностики параметров удаленных газовых объектов, включая диагностику процессов горения в смешивающихся газовых потоках.

Ключевые слова: диодные лазеры, абсорбционная спектроскопия, газовый анализ, диагностика горячих зон.

DOI: 10.31857/S0044450223100055, **EDN:** ZHBQJF

Диодные лазеры (ДЛ) непрерывного действия с перестраиваемой частотой излучения нашли широкое применение в самых разнообразных областях аналитической спектроскопии и диагностики [1–12]. Диодные лазеры обладают рядом уникальных характеристик, обеспечивших их разнообразное применение как для локального, так и для дистанционного определения аналитов и/или параметров зондируемых сред:

1. Коммерчески доступные ДЛ с распределенной обратной связью (РОС-ДЛ) работают в одномодовом режиме при комнатной температуре в спектральном диапазоне ~760 нм–3 мкм;

2. Одномодовые ДЛ обладают узкой спектральной шириной излучения ($<10^{-3}$ см⁻¹ или $<10^{-4}$ нм в спектральном диапазоне 1 мкм), которая существенно уже типичной ширины линии поглощения свободных атомов и молекул (~0.05 нм). Столь малая спектральная ширина линии ДЛ устраняет необходимость использования габаритных и дорогостоящих оптических спектрометров для спектральной селекции полезного аналитического сигнала;

3. Длина волны излучения ДЛ может перестраиваться быстро за время порядка 1 мкс в диапазоне 0.1–0.3 нм за счет изменения тока инжекции или более медленно за время порядка секунды в диапазоне 1–1.5 нм за счет изменения температуры лазерного чипа;

4. Мощность ДЛ, используемых в аналитике, может варьироваться в пределах 1–50 мВт. Такая мощность достаточна для регистрации сигнала, прошедшего через исследуемую газовую среду даже при больших длинах оптического пути и значительном неселективном поглощении;

5. Излучение ДЛ может быть легко сколлимировано простой оптической системой и доставлено к достаточно удаленному объекту. Как правило, выходящее из лазерного чипа излучение эффективно вводится в одномодовый световод и может доставляться без потерь на большие расстояния.

6. Диодные лазеры очень компактны, в результате чего сенсоры на их основе имеют малые габариты и вес;

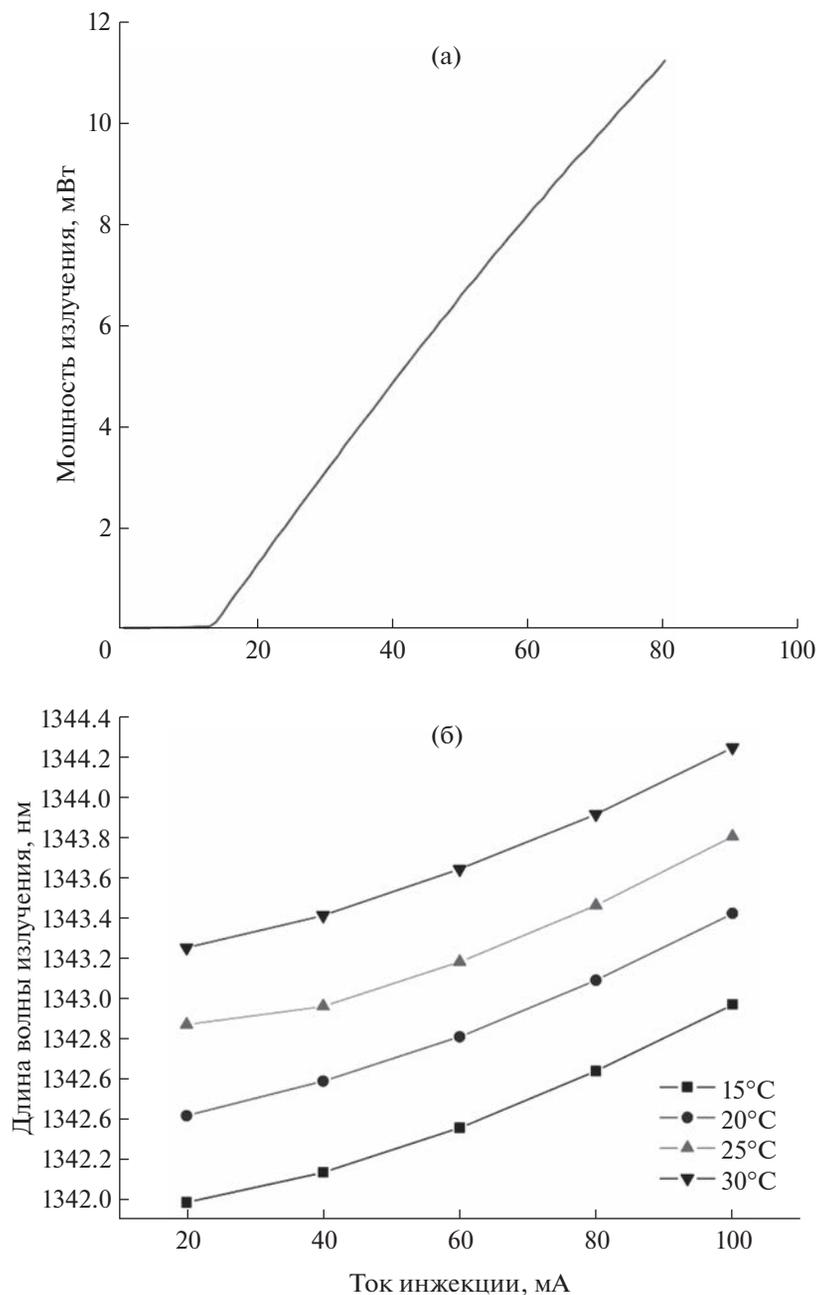


Рис. 1. Зависимости мощности излучения типичного лазера с распределенной обратной связью (а) и длины волны излучения (б) от тока инжекции.

7. Диодные лазеры простейших конструкций сравнительно дешевы, что обеспечивает приемлемые стоимости спектрометров на их основе.

Зависимости мощности излучения и длины волны от тока инжекции для типичного однододового ДЛ приведены на рис. 1. С увеличением тока инжекции через лазерный чип возрастает мощность и увеличивается длина волны излучения. К сожалению, у большинства наиболее широко применяемых РОС-ДЛ перестроечная характеристика (зависимость частоты излучения от

тока) нелинейна, и это создает определенные проблемы при обработке результатов измерений.

В настоящем обзоре приведены примеры использования ДЛ в различных областях аналитической спектроскопии при определении содержания атомарных или молекулярных компонентов в образцах различного агрегатного состояния и для определения параметров горячих зон (температуры, парциального и полного давления газовых смесей).

ПРИМЕРЫ ПРИМЕНЕНИЯ ДИОДНЫХ ЛАЗЕРОВ

Комбинированный метод определения изотопов урана. Определение изотопов урана ^{235}U , ^{238}U является важнейшей задачей аналитического контроля при производстве ядерных материалов и переработке ядерных отходов. Традиционно эта задача решается достаточно дорогими методами масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (МС-ИСП), масс-спектрометрией с термической ионизацией (МСТИ) или нейтронно-активационным анализом. Элегантным методом определения малораспространенного изотопа ^{235}U на фоне основного изотопа ^{238}U оказалась комбинация метода лазерного испарения твердого материала (лазерной абляции) и метода лазерно-индуцированной флуоресценции (ЛИФ) [13] или атомно-абсорбционной спектрометрии (ААС) [14] с использованием перестраиваемого излучения ДЛ. В работах [13, 14] описаны методики определения минорного изотопа урана в твердом образце на фоне доминирующего содержания основного изотопа ^{238}U . Образцами служили три спрессованные таблетки графита, равномерно перемешанного с оксидом урана с содержаниями изотопа ^{235}U 0.714% (естественное содержание изотопа), 0.204 и 0.407% (оксид урана, обедненный по ^{235}U).

Излучение импульсного твердотельного лазера на неодимовом стекле фокусировалось на поверхность твердого образца, и область плазмы испаренного материала просвечивалась излучением перестраиваемого по частоте ДЛ. Наибольший изотопический сдвиг для изотопов ^{235}U , ^{238}U наблюдается для атомарных линий 682.6913 нм (^{238}U) и 682.6736 нм (^{235}U) и составляет величину $\Delta\nu^{238-235} = -0.3798 \text{ см}^{-1}$ ($\Delta\lambda = 17.7 \text{ пм}$). В эксперименте ДЛ включался в момент генерации короткого испаряющего импульса твердотельного лазера, а частота ДЛ сканировалась в области линий поглощения изотопов.

Регистрация прошедшего излучения ДЛ (ААС) или флуоресценции свободных атомов урана (ЛИФ) проводилась только за промежуток времени, длительность и начало которого выбирались по максимальному значению сигнал/шум. При лазерной абляции формируется сгусток плазмы испаренного материала над поверхностью мишени, и эта плазма разлетается от поверхности, в результате чего концентрация испаренного материала существенно уменьшается во времени. При этом и сплошной фон, определяемый излучением плазмы, также уменьшается во времени, в результате чего существует пространственно-временное окно, в течение которого величина сигнал/шум максимальна. Пример регистрации спектров флуоресценции изотопов урана для трех образцов с различными содержаниями минорного изотопа

приведен на рис. 2. Важно отметить, что исключительно узкая ширина линии излучения ДЛ позволила не использовать оптический монохроматор для спектральной фильтрации полезного аналитического сигнала. При этом на рисунке отчетливо видна сверхтонкая структура излучения флуоресценции, которую методами оптической спектроскопии возможно разрешить только габаритными и дорогостоящими тройными монохроматорами. Пределы обнаружения составили 0.6 мг/г (ЛИФ) и 0.1 мг/г (ААС).

Определение скорости потока газа. Скорость потока газа является важным параметром при диагностике различных процессов в потоках. Наиболее простым методом измерения скорости потока является измерение доплеровского сдвига максимума линии поглощения какой-либо тестовой молекулы. Использование для таких измерений узкополосных ДЛ обеспечивает и достаточную простоту, и точность измерения скорости. Излучение ДЛ разделяется на два луча, которые пересекают поток в противоположных направлениях под некоторым углом θ . Определяются максимумы линии поглощения тестовой молекулы при зондировании потока под углом 90° к направлению потока и под углами к направлению потока $\pm\theta$. Легко показать, что сдвиг максимумов линии поглощения при зондировании потока под углами $\pm\theta$ будет равен: $\Delta\nu_D = 2V/cv_0\sin\theta$, где V – скорость потока, c – скорость света, v_0 – максимум линии поглощения при нормальном зондировании потока. Использование двух направлений зондирования $\pm\theta$ удваивает разность измеряемых сдвигов, т.е. увеличивает точность измерения скорости. Для ДЛ ближнего ИК-диапазона доплеровский сдвиг приблизительно равен $3 \times 10^{-5} \text{ см}^{-1}$ на скорость 1 м/с. Обсуждение точности оценки скорости потока и особенности такой оценки при неоднородном потоке приведены в работе [15].

АБСОРБЦИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ С ДИОДНЫМИ ЛАЗЕРАМИ

Наибольшее распространение получил метод абсорбционной спектроскопии с диодными лазерами (ДЛАС).

Элементный анализ. В 80–90-х гг. прошлого века были разработаны методики определения малых содержаний элементов методом ДЛАС в пламенах или графитовых атомизаторах [16]. Первые опыты по определению щелочных металлов оказались вполне успешными; были заметно снижены пределы обнаружения аналитов методом ДЛАС в сравнении с методом ААС с классическими источниками резонансного излучения типа ламп с полым катодом. Однако ахиллесовой пятой ДЛАС явилось отсутствие диодных лазеров, излучающих в УФ-диапазоне спектра короче 400 нм, где

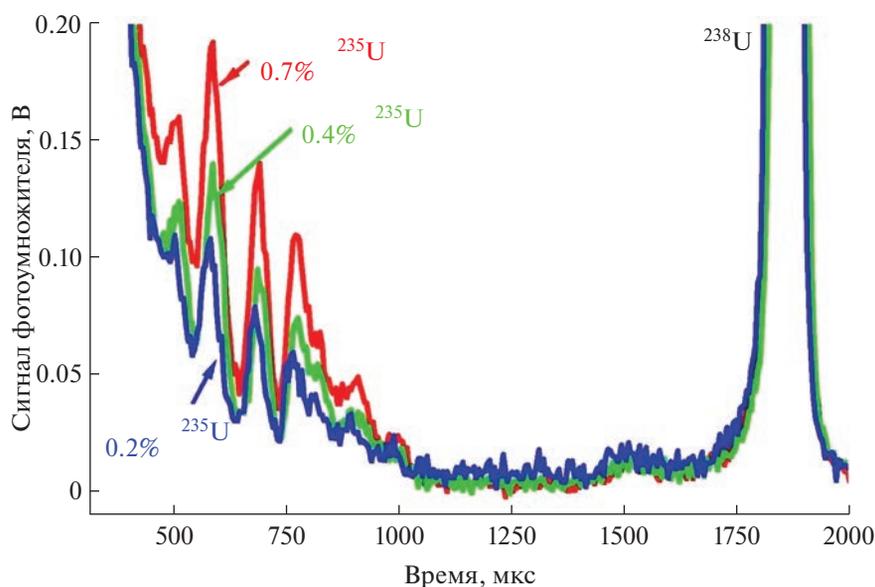


Рис. 2. Спектры флуоресценции трех образцов урана с концентрациями ^{235}U 0,2, 0,4 и 0,7%. Начало регистрации спектров совпадает с импульсом испаряющего лазера. Флуоресценция основного изотопа ^{238}U регистрируется примерно через 750 мкс после начала регистрации, когда концентрация испаренного материала в зоне зондирования существенно уменьшилась [13].

лежат сильные резонансные линии подавляющего большинства элементов. Поэтому метод ДЛАС оказался непригодным для элементного анализа.

Молекулярная спектроскопия. Метод ДЛАС стал наиболее востребованным для определения концентрации молекул в различных газовых смесях, а также для бесконтактного определения параметров горячих зон и процессов, в них протекающих.

В методе ДЛАС зондирующее излучение ДЛ проходит через исследуемый газовый объект, а система регистрации измеряет интенсивность прошедшего излучения. Длина волны ДЛ перестраивается в пределах выбранного спектрального диапазона и при совпадении длины волны ДЛ с линией поглощения тестовой молекулы регистрируется уменьшение интенсивности прошедшего излучения ДЛ. Если линия поглощения достаточно сильная ($\Delta I/I_0 \geq 10^{-3}$), то возможно прямое детектирование этого провала. Для регистрации слабых линий разработаны модуляционные варианты ДЛАС, которые будут обсуждаться ниже.

ИЗМЕРЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ ГОРЯЧИХ ЗОН

Режим измерения прямого поглощения. Метод ДЛАС широко используется для диагностики параметров горячих зон, в частности для бесконтактной диагностики процессов горения в смешивающихся потоках топлива (водород, углеводороды) и окислителя (кислород, воздух) [5–8]. Основными параметрами, подлежащими постоянному контролю, являются температура, кон-

центрация основных молекулярных компонентов смеси, полное давление в зоне горения. Ключевым достоинством ДЛАС как метода такой диагностики является “бесконтактность”, поскольку любое измерительное устройство типа термопары, введенное в поток, искажает тепловое и гидродинамическое поле вокруг такого объекта, что приводит к существенному искажению результатов измерений. Зондирующий луч ДЛ никак не влияет на пространственное и временное распределение тепловых и акустических полей в зондируемой области и обеспечивает правильное определение требуемых параметров среды.

Измерение температуры газовой среды методом ДЛАС основывается на предположении о термодинамическом равновесии (ТДР) в зоне горения. Это предположение выполняется при характерных временах процессов порядка долей миллисекунд и при полном давлении газовой смеси больше 0,1 атм. Перестраивая длину волны излучения ДЛ можно зарегистрировать интенсивности разных линий поглощения и по их отношению определить температуру. При выполнении условия ТДР распределение молекул по энергетическим уровням подчиняется закону Больцмана, и отношение интегральных интенсивностей двух линий поглощения тестовой молекулы R с различными нижними уровнями $E_{1,2}$ подчиняется соотношению

$$R = \left(\frac{S_1}{S_2} \right)_{T_0} \exp \left[-\frac{hc\Delta E}{k} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \right],$$

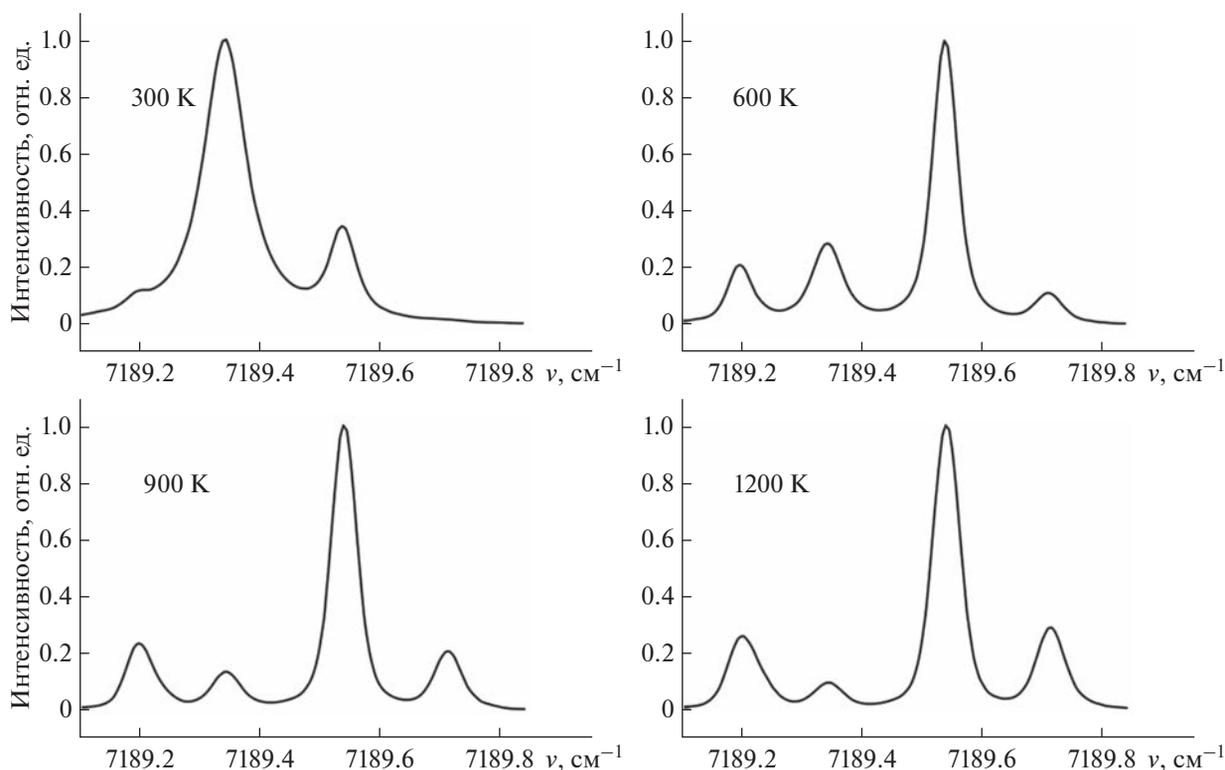


Рис. 3. Спектры молекулы воды, рассчитанные для разных температур на основании спектроскопических баз данных.

где $S_{1,2}$ – интенсивности линий для некоторой температуры T_0 ; ΔE – разность энергий нижних уровней; T – температура; h, c, k – мировые константы.

Типичные параметры зон горения в газовых потоках: размер тестируемой зоны 70–150 мм, полное давление смеси 0.1–3 атм, температура до 3000 К, длительность процесса горения 0.1–10 с, топливо – водород, углеводороды, скорости потоков до $M \sim 2-3$ (M – число Маха). Наибольшее число работ с РОС-ДЛ посвящено детектированию молекул воды, которая является конечным продуктом реакции горения углеводородов и концентрация которой на последних стадиях процесса определяет эффективность использования топлива.

В зависимости от конкретных условий процесса горения выбирают оптимальные схемы метода ДЛАС. В цикле работ [17–19], выполненных совместно с Объединенным Институтом Высоких Температур (ОИВТ), исследовалось развитие процесса горения водорода или этилена при статическом давлении в потоке ~ 150 Торр и скорости потока $M = 2$. В этих условиях линии поглощения воды достаточно узкие и удалось найти спектральный диапазон, в котором лежат три линии с небольшим перекрытием крыльев. Эти линии имеют различные нижние уровни энергии и населенность этих уровней, а, следовательно, и интенсивность линий зависит от температуры

смеси. Используя спектроскопические базы данных [20], были рассчитаны интенсивности выбранных линий для разных температур. Результаты расчета приведены на рис. 3, который демонстрирует сильное изменение соотношений интенсивностей линий для разных температур.

Опыты проводились в ОИВТ на экспериментальном стенде, в конструкцию которого был введен оптический блок с парами окон для ввода и вывода пучка, зондирующего ДЛ, пересекающего поток газов в перпендикулярном направлении. Зондировались различные участки зоны горения. Процесс горения в смешивающихся потоках водорода и воздуха инициировался и поддерживался электрическим разрядом. Время одного пуска установки составляет 0.5 с, разряд включается после выхода потока на квазистационарный режим и поддерживается 80–100 мс. Инжекция топлива включается через 20–30 мс после начала разряда и выключается через 20–30 мс после его окончания. Отметим, что горение прекращается в момент выключения разряда.

При исследовании нестационарных процессов быстрая перестройка длины волны ДЛ позволяет многократно сканировать исследуемый газовый объект. Длину волны ДЛ можно просканировать во всем диапазоне перестройки за ~ 1 мс. За времена развития нестационарного процесса ~ 1 с возможно прозондировать интересующий нас объект 10^3 раз.

При этом реально важные события развиваются только на определенном временном интервале всего процесса.

В работе [17] разработан метод первичной обработки массива данных, который позволяет найти наиболее важные и интересные этапы исследуемого нестационарного процесса. Зарегистрированные спектры первоначально обрабатывались путем преобразования зарегистрированных сканов в двумерное изображение. Это значительно упрощало первоначальный общий обзор зарегистрированного цикла и позволяло быстро выделить основные временные этапы развития процесса горения.

Пример записи одного пуска приведен на рис. 4. Полученные за один пуск экспериментальные результаты представляют собой массив данных, состоящий из 2×10^6 точек. Массив содержит запись ~600 сканов перестройки длины волны ДЛ в выбранном спектральном диапазоне. В каждом скане ток инжекции изменяется по пилообразному закону, причем в первой половине скана ток линейно нарастает, а во второй – линейно убывает. Полное время записи составляет 500 мс. Параметры режима в данном пуске были следующими: статическое давление в испытательной секции 130 Торр, расход водорода 0.5 г/с. Слева на рис. 4 приведено сконструированное двумерное изображение процесса, справа – спектры поглощения в окрестности 7189 см^{-1} , полученные путем усреднения по 60 соседним сканам. В интервале времени, обозначенном на рисунке (I), в камере находится воздух при давлении ~120 Торр. И на двумерном изображении, и на соответствующем этому интервалу времени спектре хорошо видна “холодная” линия 7189.344 см^{-1} (линия I). В конце интервала (I) поток в канале выходит на сверхзвуковой режим, статическая температура газа при этом составляет $T \approx 200 \text{ К}$, т.е. значительно ниже комнатной. Это приводит к вымораживанию паров воды, в результате чего в течение примерно 20–30 мс после начала пуска установки происходит ослабление, а потом и исчезновение линий поглощения воды, что отчетливо регистрируется и на двумерном изображении, и на соответствующем интервалу времени (II) спектре. В момент ~120 мс от начала пуска происходит включение разряда и примерно через 20 мс начинается инжекция топлива. В этот момент инициируется процесс горения, сопровождающийся быстрым подъемом температуры и появлением в зоне горения паров воды. На рисунке отчетливо видны высоко лежащие линии поглощения H_2O : 7189.715 , 7189.541 и 7189.199 см^{-1} (линии 2, 3 и слабая линия, не вошедшая в обработку результатов). В то же время низко лежащая “холодная” линия 7189.344 см^{-1} заметно ослабла. Такой характер спектра сохраняется на всем интервале времени (III) примерно

50 мс, когда поддерживается процесс горения. По окончании этого времени процесс горения прекращается (IV), температура сверхзвукового потока быстро падает, что приводит к вымораживанию паров воды и исчезновению практически всех линий поглощения воды. Это хорошо видно на левом рисунке после примерно 200-й мс.

Для пуска, представленного на рис. 4, средние за указанный временной интервал температура зондируемой зоны и пересчитанное из концентрации молекул парциальное давление воды составили 1050 К и 21 Торр соответственно. Значение полного давления смеси в зондируемой зоне $P = 200 \text{ Торр}$ хорошо согласуется с независимыми измерениями датчиками статического давления.

Более сложной оказалась задача, которую пришлось решать в совместной работе с Центральным аэрогидродинамическим институтом имени профессора Н.Е. Жуковского (ЦАГИ). Требовалось определить температуру в потоке газовой смеси в зоне горения в камере испытательного стенда. Давление в потоке могло меняться до 3 атм, температура варьировалась в пределах 300–2000 К. В этих условиях линии поглощения уширяются до величин $\sim 0.2\text{--}0.5 \text{ см}^{-1}$, что исключает возможность нахождения спектрального диапазона $\sim 1\text{--}3 \text{ см}^{-1}$ с неперекрывающимися линиями поглощения. В такой ситуации схема ДЛАС с одним ДЛ, регистрирующим за один цикл перестройки несколько линий, перестает работать. Альтернативным решением является использование двух ДЛ, работающих в разных спектральных диапазонах. Такое решение позволяет выбирать сильные линии поглощения так, чтобы каждый лазер регистрировал одну уширенную и, желательнее, изолированную линию молекулы.

Новая конструкция ДЛАС была установлена на испытательном стенде Т-131 в ЦАГИ [21, 22]. Использовались два ДЛ, работавших в диапазоне 1.392 мкм ($\nu_1 = 7185 \text{ см}^{-1}$) и 1.343 мкм ($\nu_2 = 7444 \text{ см}^{-1}$). В процессе одного пуска включался сначала поток горячего воздуха при пониженном давлении, затем в определенный момент поток дросселировался заслонкой, давление и температура возрастали, и после определенного времени заслонка открывалась и поток охлаждался. Пример записи одного пуска установки приведен на рис. 5. Первичная обработка массива данных проводилась по описанной выше схеме. На рисунке отчетливо видна вся динамика развития процесса: I) начальный этап, при котором интенсивности линий соответствуют температуре горячего воздуха (~700 К) при пониженном давлении; II) этап с дросселированием, при котором растет температура, линии уширяются вследствие увеличения давления, при этом интенсивность “горячей” линии (1.343 мкм) растет; III) на этом этапе работы установки происходит отключение дросселя и воздухоподогре-

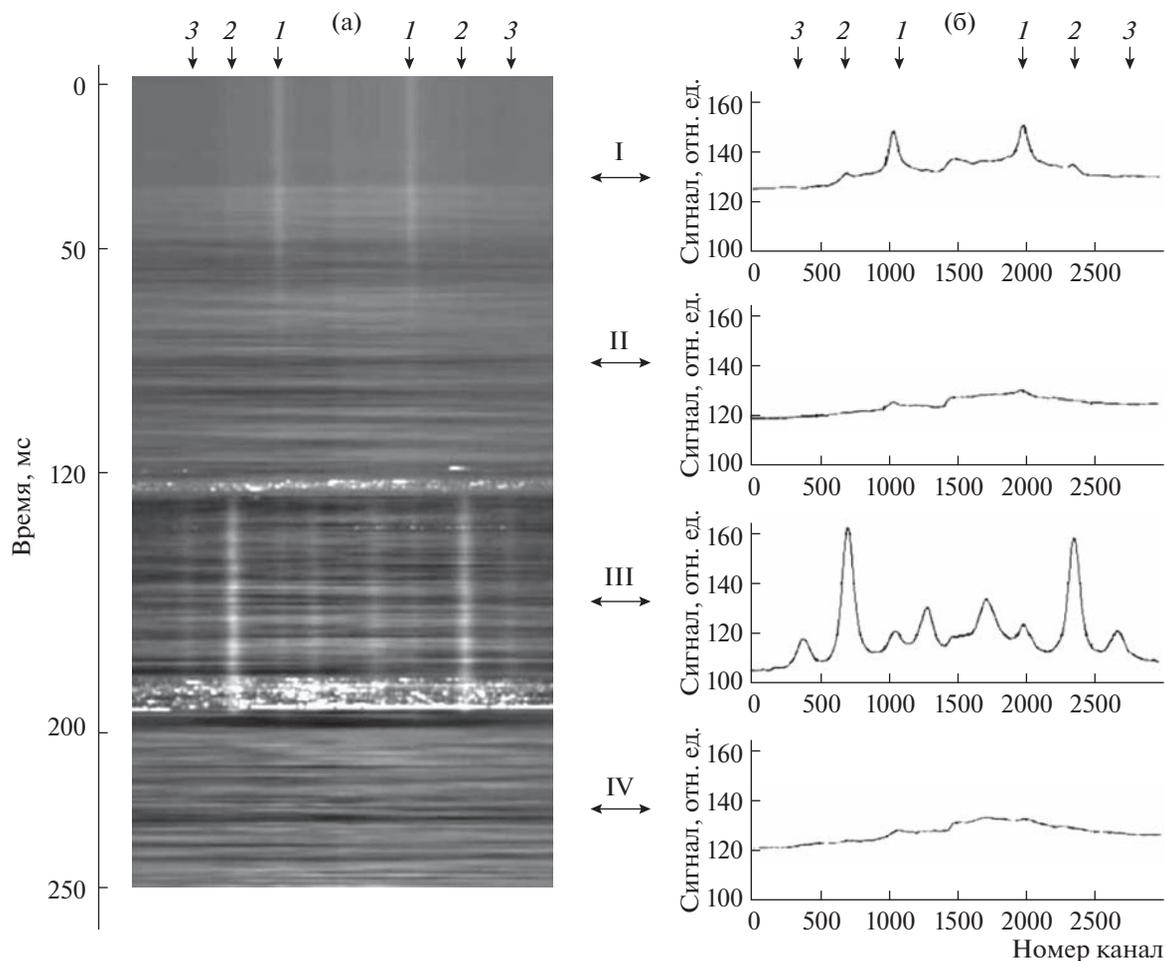


Рис. 4. Пример обработки массива данных, полученного в результате записи одного пуска силовой установки в ОИВТ РАН [17]. Слева показано двумерное изображение всех сканов, зарегистрированных за первые 250 мс. Справа – усредненные за 60 сканов спектры поглощения H_2O в разные интервалы развития процесса горения. Арабскими цифрами указаны положения максимумов линий поглощения, по которым проводилась последующая обработка. Идентификация линий: 1 – 7189.344, 2 – 7189.541, 3 – 7189.714 cm^{-1} .

вателя; IV) завершение пуска, включается холодная продувка, воздух в камере остывает и температура понижается до ~ 400 К. Видно, что “горячая” линия на завершающем этапе практически исчезает, а интенсивность “холодной” восстанавливается.

Томографический вариант абсорбционной спектроскопии с диодными лазерами. До сих пор рассматривались варианты использования метода ДЛАС для диагностики газовых объектов, основанные на зондировании объекта одним пучком лазера диаметром порядка 1 мм. В этом случае определяются параметры исследуемого объекта вдоль одного выбранного направления. Как правило, исследуемый газовый объект имеет протяженный размер в трех измерениях, например зона горения и зона выхлопных газов в больших авиационных двигателях, горячие зоны тепловых турбин и т.п. Получить полную информацию о таких объектах можно только перемещая зондирующий луч ДЛ в

двух измерениях, что затрудняет и увеличивает продолжительность процесса диагностики. В случае определения параметров стационарных процессов получение полной картины хотя и требует большего времени, но возможно. Особенно остро встает вопрос в случае диагностики коротких, однократных процессов, особенно при невоспроизводимости условий в горячей зоне.

Для таких ситуаций разработана методика томографического анализа газового объекта. В этой методике луч ДЛ расщепляется оптическими устройствами на несколько лучей, которые пересекают исследуемую зону по различным траекториям в выбранном сечении, и каждый прошедший через объект луч регистрируется собственным оптическим детектором. Система регистрации одновременно обрабатывает сигналы всех приемников, что позволяет получить пространственное распределение искомых параметров одновремен-

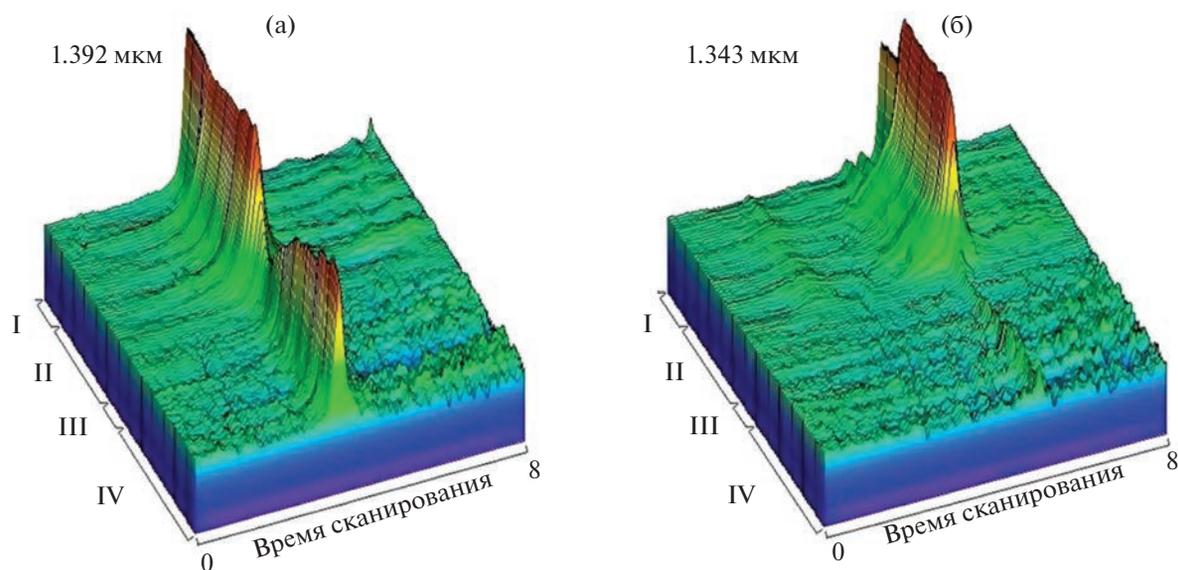


Рис. 5. 3D образы спектров поглощения, полученных в процессе одного запуска силового агрегата Т-131 в ЦАГИ [21] (объяснения см. в тексте).

но в каждом цикле пуска двигателя. Пример такой системы ДЛАС приведен на рис. 6, на котором показана оптическая система ДЛАС, условная геометрия эксперимента и приведены результаты определения температуры в потоке газов, исходящих из турбины сверхзвукового двигателя [23]. На рис. 6а ход зондирующих лучей указан сеткой прямых линий. Каждый луч, пройдя через зондируемую область выхлопных газов, попадает на соответствующий фотоприемник, сигнал с которого обрабатывается системой сбора и обработки данных. Такая методика использования ДЛАС дает более полную картину о процессах, происходящих в исследуемом объекте, однако она значительно сложнее технически, требует более сложной программы обработки результатов и, конечно, значительно дороже. Томографическая методика рассчитана на диагностику свободных газовых потоков, например выхлопов двигателей. Однако она неприменима для диагностики замкнутых объемов, например камер внутреннего сгорания.

Модуляционный режим абсорбционной спектроскопии с диодными лазерами. До сих пор обсуждались режимы прямого измерения интенсивности прошедшего через зондируемую область излучения ДЛ. Как уже отмечалось, такой режим реализуется для сравнительно сильных линий поглощения и в условиях, когда величина и флуктуации фона не слишком велики и интегральная интенсивность линий поглощения может быть определена с достаточной точностью. Ситуация усложняется, когда измерения приходится проводить в условиях значительных электрических и акустических шумов в объекте наблюдения и/или в регистрирующей аппаратуре. Для таких случаев разработан

вариант метода ДЛАС с дополнительной модуляцией длины волны излучения. Для этого к току инжекции через лазерный чип добавляется высокочастотный ток от дополнительного источника. Таким образом, помимо медленного сканирования частоты излучения ДЛ в пределах спектрального диапазона его перестройки со скоростями порядка 1 кГц производится быстрая модуляция его длины волны с частотой f порядка 50–100 кГц. Трюк заключается в том, что сигнал поглощения детектируется на частотах, кратных частоте модуляции: $f, 2f, \dots, nf$. В большинстве экспериментальных ситуаций основная область шумов располагается в низкочастотной области <20–30 кГц, поэтому регистрация сигнала на частотах больше 50 кГц приводит к снижению уровня шумов и увеличивает отношение сигнал/шум. За счет такого приема оказывается возможным регистрировать малые сигналы поглощения ($\Delta I/I_0 \leq 10^{-5-6}$). Пример эффективности такого варианта ДЛАС приведен на рис. 7 [24]. На левой панели показан результат регистрации линий поглощения методом прямого детектирования, а на правом – детектирование тех же линий модуляционной методикой. На левом рисунке видно уверенное детектирование линий при отсутствии избыточных шумов и полное исчезновение аналитического сигнала, когда включены избыточные шумов. На правом же рисунке линии поглощения уверенно детектируются с хорошим отношением сигнал/шум даже в присутствии избыточных шумов. Отметим, что в данном варианте модуляционного ДЛАС использовалась регистрация на первой производной частоты модуляции f .

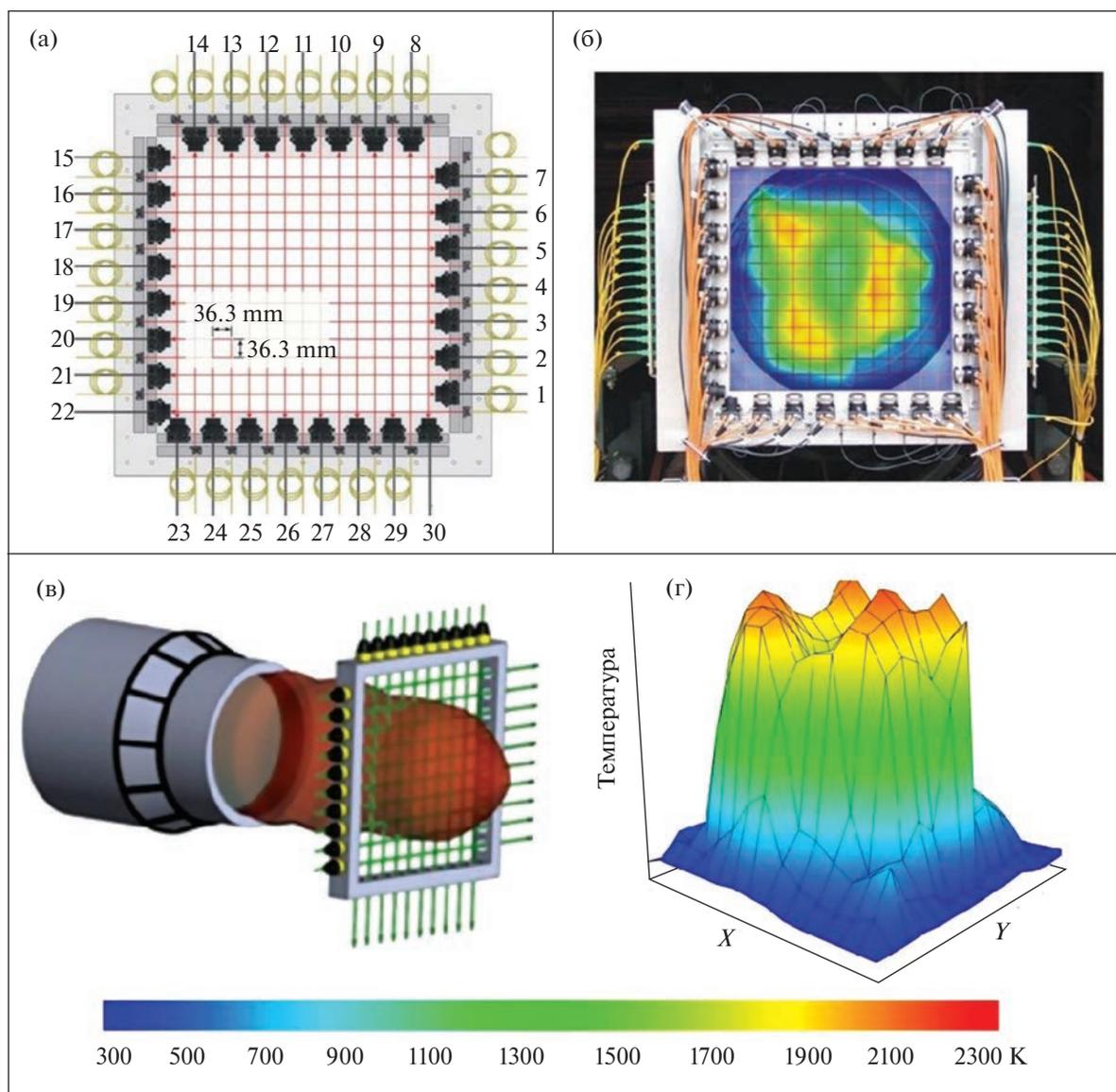


Рис. 6. Результат томографической диагностики выхлопных газов авиационного сверхзвукового двигателя [23]. Геометрия расположения зондирующих лучей диодного лазера и фотоприемников (а), вид реальной компоновки оптических элементов (б), расположение томографического устройства в струе выхлопных газов (в), 3D профиль распределения температуры в струе выхлопных газов (г).

ДРУГИЕ ПРИМЕРЫ ПРИМЕНЕНИЯ АБСОРБЦИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ С ДИОДНЫМИ ЛАЗЕРАМИ

Диагностика двигателей внутреннего сгорания. Схемы прямого детектирования и модуляционной ДЛАС успешно использовались несколькими группами для диагностики рабочих камер двигателей внутреннего сгорания (ДВС) [12]. Для совершенствования конструкций ДВС создавались специальные конструкции экспериментального цилиндра с оптическими окнами для ввода и вывода зондирующего луча ДЛ. Одна из таких схем эксперимента приведена на рис. 8 [25]. В данном

эксперименте использовались лазеры другого типа (квантово-каскадные лазеры), работающие в диапазонах 4.55, 4.59 мкм, в которых располагаются сильные линии поглощения CO. В эксперименте использовались два ДЛ, работавшие поочередно в импульсном режиме. На рис. 8б отчетливо видны провалы в излучении ДЛ, прошедшем через область зондирования, в момент совпадения длины волны ДЛ с линиями поглощения CO. Температура определялась по отношению интегральных интенсивностей поглощения на двух выбранных линиях. Особенностью данной схемы ДЛАС явилось детектирование поглощения при достаточно высоком давлении смеси (15–20 атм). При таком давлении

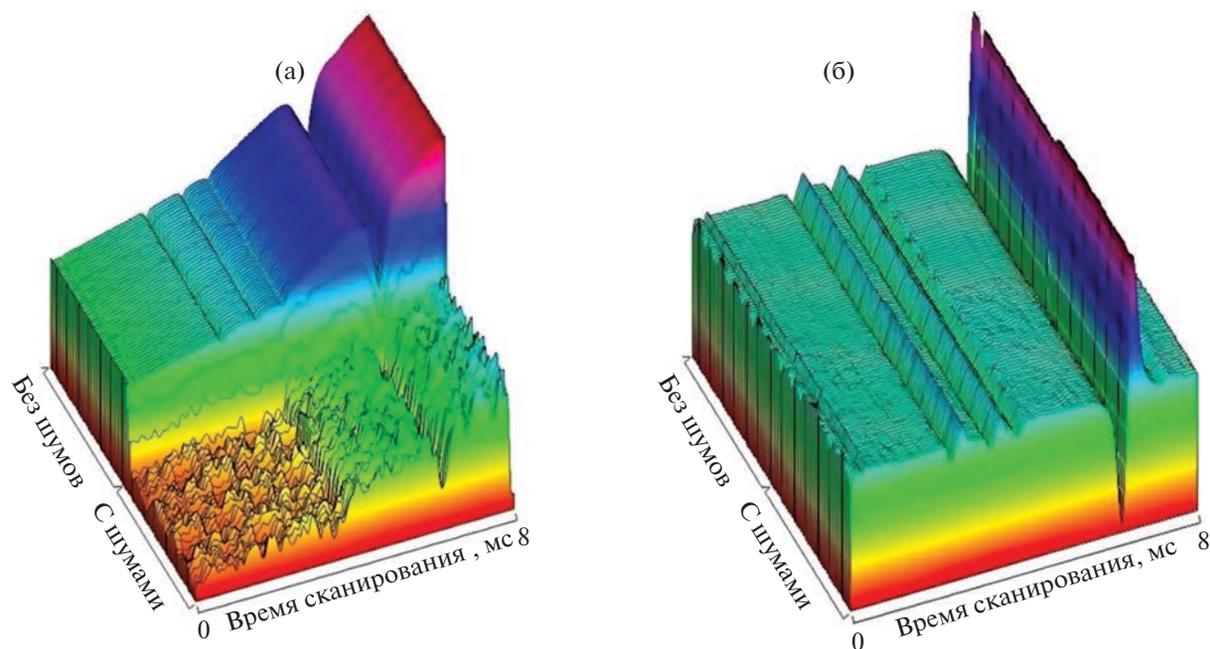


Рис. 7. Демонстрация эффективности модуляционного варианта абсорбционной спектроскопии с диодными лазерами (ДЛАС) [24]. 3D образ процесса, диагностированного методом регистрации прямого поглощения (а); такой же процесс, диагностированный методом модуляционного ДЛАС (б). При включении избыточных шумов линии поглощения полностью пропадают при прямом детектировании (а) и четко регистрируются методом модуляционной ДЛАС (б).

нии линии поглощения значительно уширяются. Использовался режим быстрой перестройки длины волны ДЛ, при котором лазеры перестраивались в пределах 2.8 см^{-1} с частотами порядка 100 кГц .

Контроль чистоты молекулярных примесей при производстве газообразных гидридов. Разработан комплекс аппаратуры и методы непрерывного контроля газообразных примесей CO_2 , H_2O , CH_4 , C_2H_2 , C_2H_4 и др. в процессе низкотемпературной ректификационной очистки газообразных гидридов [26]. Высокочистые гидриды NH_3 , PH_3 , AsH_3 , SiH_4 , GeH_4 являются важными компонентами в технологии изготовления электронных и оптоэлектронных изделий, и требования к чистоте изготавливаемых гидридов предъявляются достаточно

жесткие. Изменение примесного состава гидридов может существенно влиять на результаты его аттестации и на качество получаемых из него материалов. Перечень молекулярных примесей, аналитических линий и пределов обнаружения примесей приведен в табл. 1.

Основой приборов явились ДЛ ближнего ИК-диапазона от 0.7 до 2.0 мкм , где находятся полосы поглощения обертонов и составных частот исследуемых примесей. Системы обладают высокой чувствительностью и быстродействием при определении концентрации примеси. Благодаря компактности и низкому энергопотреблению они легко встраиваются в технологическое оборудование (в узлы ректификационной колонны) и

Таблица 1. Примеси, определяемые с помощью ДЛ-газоанализаторов [26]

Примесь	Длина волны регистрации, мкм	Гидриды	Предел обнаружения, мол. %
H_2O	1.391	NH_3 , PH_3	1×10^{-4}
NH_3	1.512	AsH_3	5×10^{-5}
C_2H_4	1.635	SiH_4	2×10^{-4}
CH_4	1.651	SiH_4	4×10^{-5}
CO_2	2.004	PH_3 , SiH_4 , AsH_3	1×10^{-4}
H_2S	1.601	AsH_3	1×10^{-3}
C_2H_2	1.531	PH_3 , SiH_4	1×10^{-3}

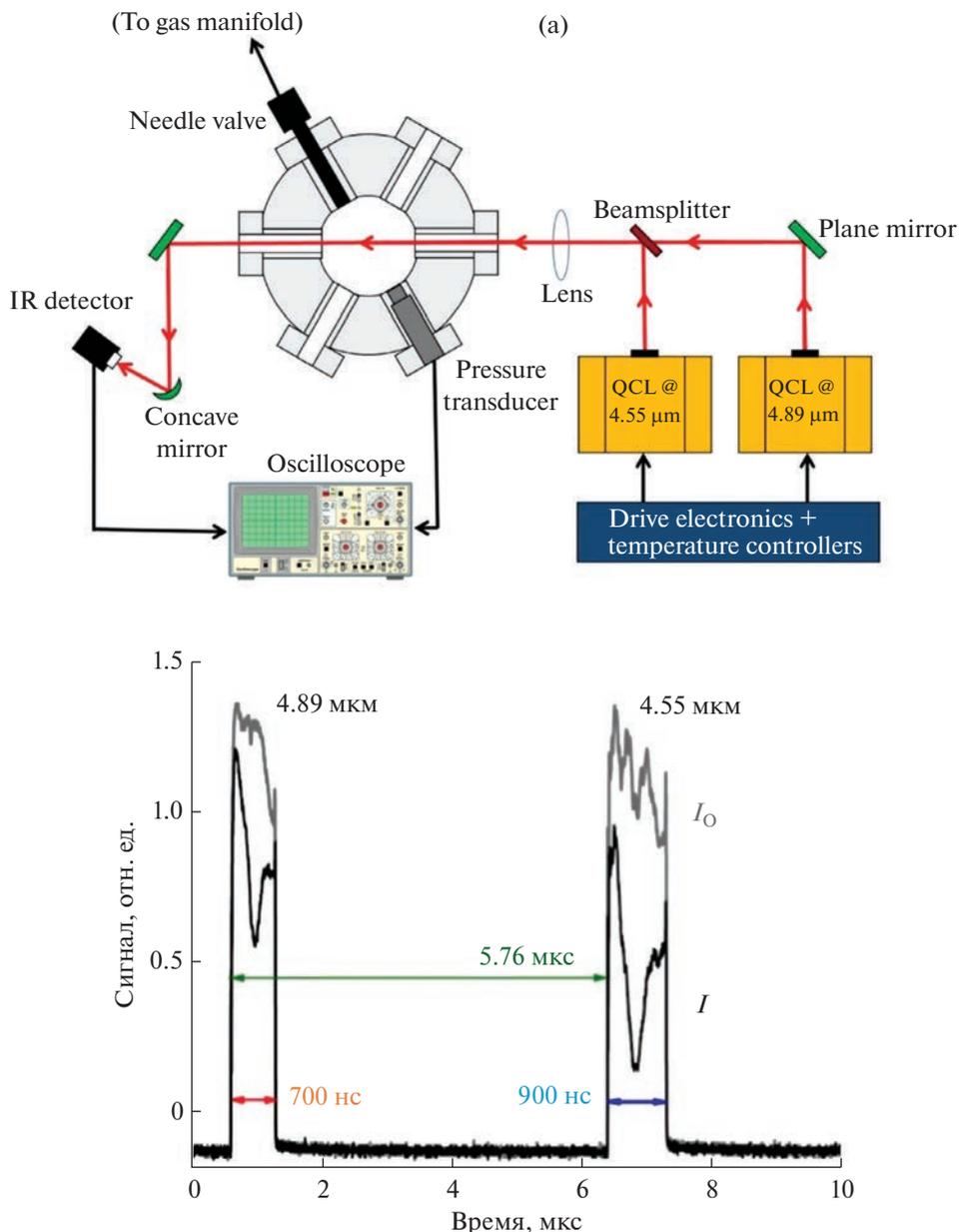


Рис. 8. (а): Схема диагностики процесса горения в цилиндре двигателя внутреннего сгорания [25]; QCL – два квантово-каскадных лазера. (б): Сигналы, зарегистрированные при сканировании диодных лазеров в окрестности линий поглощения молекул CO.

позволяют проводить непрерывный долговременный контроль степени очистки гидридов.

Для достижения высокой чувствительности использовались многопроходные оптические кюветы с волоконным входом для введения излучения ДЛ. Разработаны кюветы с базовой (геометрической) длиной 40 см. За счет многократного прохода зондирующего излучения внутри кюветы полная оптическая длина лазерного пучка достигала 25.5 м. Поскольку в подавляющем большинстве экспериментов метод ДЛАС используется для определения малых концентраций аналитов,

аналитический сигнал поглощения линейно зависит от длины оптического пути. Исследуемая газовая смесь могла отбираться и подаваться в кювету на различных этапах процесса ректификации. Для размещения кюветы в различных местах ректификационной колонны предусмотрено удаление кюветы от электронного блока управления на расстояние до 15 м. Разработаны новые модуляционно-корреляционные методы для надежной регистрации слабого молекулярного поглощения определяемой примеси на фоне сильного селек-

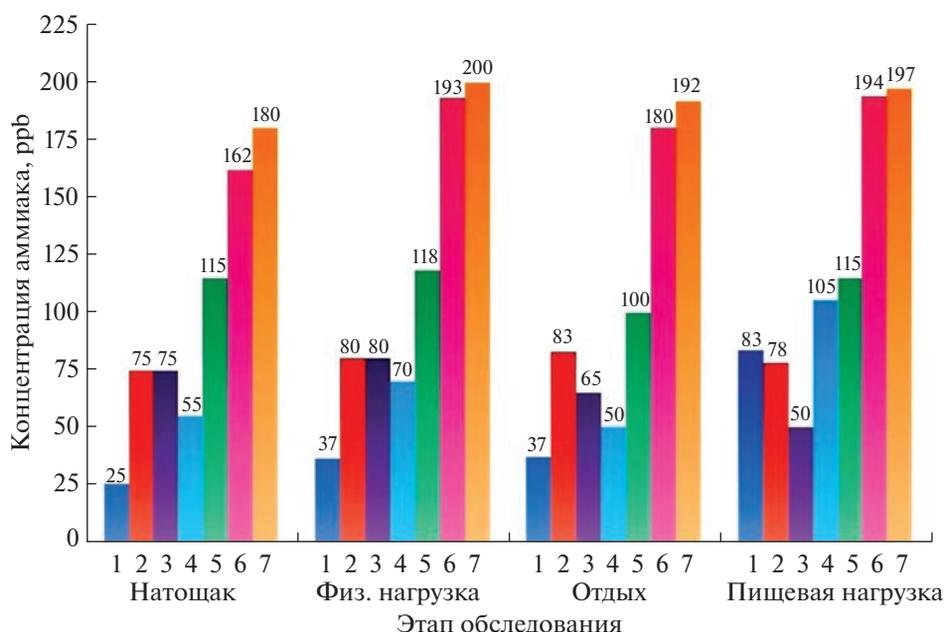


Рис. 9. Содержание аммиака в выдыхаемом воздухе здорового пациента и пациентов с язвенной болезнью в различных режимах и в состоянии ремиссии или обострения [9, 29]: 1 – здоровый; 2–4 – язвенная болезнь в фазе ремиссии; 5–7 – язвенная болезнь в фазе обострения. Отметим, что у здорового пациента во всех режимах, кроме пищевой нагрузки, содержание аммиака существенно ниже, чем у больных.

тивного поглощения основным молекулярным компонентом смеси (исследуемым гидридом).

В качестве примера эффективности разработанной методики контроля степени очистки отметим результаты по контролю степени чистоты аммиака. В процессе ректификации давление смеси аммиака не превышало 5 кПа, температура измерения 23°C. Контроль очистки длился более 1.5 сут. Среднее содержание примеси H_2O в аммиаке до и после очистки методом ректификации, по данным ДЛАС, составило соответственно 3.0×10^{-3} и $1.0 \times 10^{-5}\%$. Полученные результаты хорошо согласуются с данными газовой хроматографии.

Диагностика состояния пациента по выдыхаемому воздуху. Метод ДЛАС успешно применяется для медицинской диагностики [27]. В работах [28, 29] продемонстрирована возможность получения объективной информации о состоянии пациента, основанной на определении биомаркеров $^{12}CO_2$, $^{13}CO_2$, CH_4 , H_2S , NH_3 и H_2O в выдыхаемом воздухе. Разработан ДЛАС-спектроанализатор на трех ДЛ, излучающих на длинах волн 1.51, 1.60, 1.65 мкм. Диодные лазеры работают одновременно, что позволяет регистрировать сразу все интересующие биомаркеры. Выдыхаемый пациентом воздух попадал в кювету и регистрировались сигналы поглощения одновременно всех молекулярных примесей. Для увеличения чувствительности и точности детектирования аналитов использовалась многопроходная кювета Эррио с базой 30 см и полной длиной оптиче-

ского пути 26 м. За счет увеличения эффективной длины оптического слоя аналитический сигнал поглощения существенно увеличивался.

Клинико-физиологические испытания прибора проводились в рамках совместного проекта ИОФ РАН с РГМУ им. Н.И. Пирогова и ГКБ № 12 им. В.М. Буянова. Определялась граница физиологической “нормы” и возможная корреляция между отклонениями от “нормы” и наличием тех или иных заболеваний. На рис. 9 приведена гистограмма, показывающая концентрацию аммиака в выдыхаемом воздухе у людей относительно здоровых и с язвенной болезнью в фазе ремиссии и обострения. Видно, что концентрация аммиака в выдыхаемом воздухе здорового пациента существенно ниже, чем у пациентов с язвенной болезнью для всех исследованных режимов (натошак, нагрузка, отдых, пищевая нагрузка). Также отчетливо регистрируются отличия этого параметра у больных в состоянии ремиссии и обострения.

Контроль утечек метана на магистральных трубопроводах. Контроль технического состояния магистральных трубопроводов является важнейшей экономической и экологической проблемой. Одним из методов такого контроля является сенсор на основе ДЛАС для определения содержания метана в атмосфере около трубопровода. В ИОФ РАН разработан сенсор для детектирования метана в атмосфере, позволяющий определять концентрации в пределах 200 ppb – 1.7% (нижний концентрационный предел возгорания) [30]. Измерения

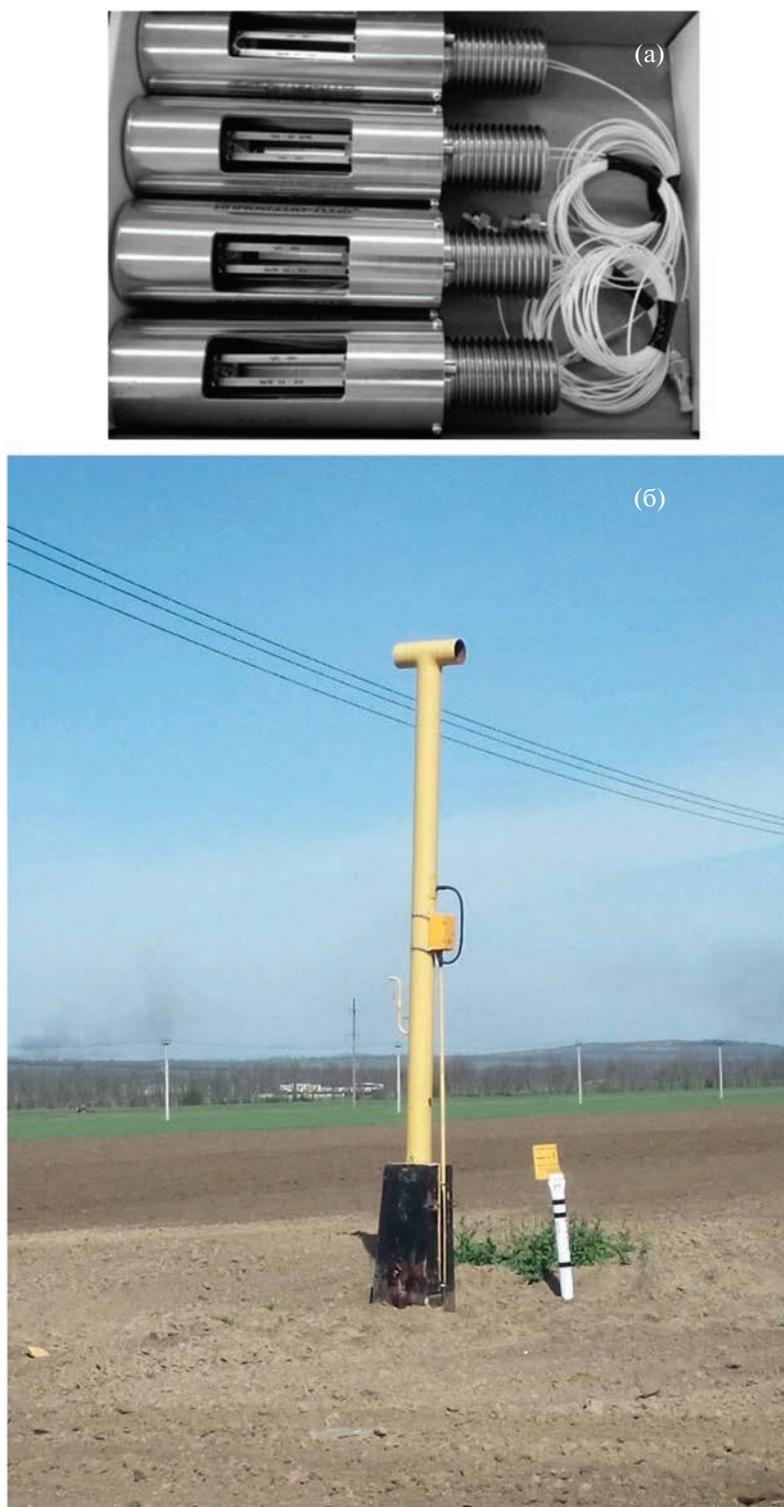


Рис. 10. Вид однопроходных кювет для детектирования метана в атмосфере около стойки, расположенной в 40 м от прохода трубопровода через автомобильную дорогу или ж/д полотно (а). Вид стойки с укрепленным на ней ДЛАС-детектором метана (б). Такие стойки установлены возле каждого из 60 пересечений трубопровода с магистралями.

проводятся в однопроходной кювете, сообщаемой с окружающим воздухом. Ввод и вывод из кюветы излучения ДЛ производится через опто-

волокно, укрепляемое на торцах кюветы с помощью специальных фланцев (рис. 10а). ДЛАС-сенсор монтируется на стойках, которые установлены в

местах “прокола” трубопровода под автодорогами и ж/д путями (рис. 106). Длина оптоволоконной линии достигает 60 км, что позволяет монтировать сенсоры на всех стойках вдоль трассы трубопровода и собирать информацию о концентрации метана на одном узле управления. Таких датчиков в Анапском Хабе южного потока более 60 шт. Они контролируют утечки метана в газопроводе в точках пересечения с авто- и ж/д магистралью.

* * *

В обзоре рассмотрены основы метода абсорбционной спектроскопии с диодными лазерами и приведены наиболее характерные примеры его применения для определения концентраций элементов и диагностики процессов в горячих зонах. Диодные лазеры с перестраиваемой длиной волны излучения являются уникальными источниками резонансного излучения. Длина волны ДЛ может перестраиваться с частотами до сотни МГц в пределах нескольких см⁻¹, что позволяет регистрировать поглощение на нескольких выбранных линиях аналита за времена порядка 0.1 мс. Ширина линии генерации ДЛ на 2–3 порядка меньше ширины линий поглощения свободных атомов и молекул в типичных аналитических условиях. За счет этого в сенсорах на основе ДЛ не требуется применение габаритных и дорогостоящих оптических спектральных приборов. Эти источники малогабаритны, управляются токами порядка сотен мА, они легко сопрягаются с отрезками оптических световодов, что позволяет передавать их излучение на сотни метров до объекта исследования без значительных потерь мощности.

Диодные лазеры используются в самых разнообразных аналитических и диагностических задачах. В обзоре приведены примеры их использования для регистрации изотопов урана, детектирования молекулярных примесей при производстве чистых гидридов, детектирования набора молекул в выдыхаемом воздухе с целью медицинской диагностики состояния пациента. Одной из важных задач, решаемых с помощью ДЛАС-сенсоров, является контроль утечек метана на магистральных трубопроводах России, общая длина которых превышает 170 тыс. км.

Важнейшей областью применения ДЛАС является бесконтактная диагностика горячих зон, до- и сверхзвуковых потоков газа, процессов в ударных трубах. Методом ДЛАС определяются температура исследуемого объекта, полное давление газа и парциальные давления молекулярных составляющих газового объекта. Для определения этих параметров проводится измерение интенсивностей двух (как минимум) линий поглощения тестовой молекулы, а температура определяется в предположении термодинамического равновесия в среде по отношению интенсивно-

стей линий, имеющих различные нижние уровни энергии перехода. Приведены примеры диагностики зон горения в смешивающихся потоках горючего и окислителя, процессов в камерах сгорания двигателей, в потоках газов, исходящих из силовых агрегатов авиационных двигателей.

Основная часть работ, рассмотренных в данном обзоре, выполнена с наиболее простыми ДЛ ближнего ИК-диапазона. В последние годы разработаны более дорогие полупроводниковые лазеры с большим диапазоном перестройки и на спектральный диапазон выше 3 мкм – так называемые квантово-каскадные лазеры. С использованием квантово-каскадных лазеров метод ДЛАС успешно используется для определения большого набора молекул и радикалов в зоне горения: C_nH_m, CO, CO₂, NH и др. [6], а также для экологического мониторинга, исследования атмосферных явлений [31–33].

Исследования выполнены в рамках Государственной Программы для Института спектроскопии РАН. Часть работ выполнялась в соответствии с грантом № 270ГРНТИС5/42613 от 08.08.2018 г. Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере и грантом Российского научного фонда № 19-19-00712 от 2022 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Imasaka T.* Diode lasers in analytical chemistry // *Talanta*. 1999. V. 48. № 2. P. 305. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(98\)00244-6](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(98)00244-6)
2. *Landgraf S.* Application of semiconductor light sources for investigations of photochemical reactions // *Spectrochim. Acta A*. 2001. V. 57. № 10. P. 2029. [https://doi.org/10.1016/S1386-1425\(01\)00502-9](https://doi.org/10.1016/S1386-1425(01)00502-9)
3. *Zeller W., Naehle L., Fuchs P., Gerschuetz F., Hildebrandt L., Koeth J.* DFB lasers between 760 nm and 16 μm for sensing applications // *Sensors*. 2010. V. 10. № 4. P. 2492. <https://doi.org/10.3390/s100402492>
4. *Li J., Yu B., Zhao W., Chen W.* A Review of signal enhancement and noise reduction techniques for tunable diode laser absorption spectroscopy // *Appl. Spectrosc. Rev.* 2014. V. 49. № 8. P. 666. <https://doi.org/10.1080/05704928.2014.903376>
5. *Bolshov M.A., Kuritsyn Yu.A., Romanovskii Yu. V.* Tunable diode laser spectroscopy as a technique for combustion diagnostics // *Spectrochim. Acta B*. 2015. V. 106. P. 45. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2015.01.010>
6. *Goldenstein C.S., Spearrin R.M., Jeffries J.B., Hanson R.K.* Infrared laser-absorption sensing for combustion gases // *Prog. Energy Combust. Sci.* 2017. V. 60. P. 132. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2016.12.002>
7. *Liu C., Xu L.* Laser absorption spectroscopy for combustion diagnosis in reactive flows: A review // *Appl. Spectrosc. Rev.* 2018. V. 54. № 1. P. 1. <https://doi.org/10.1080/05704928.2018.1448854>

8. *Лигер В.В., Мироненко В.Р., Курицын Ю.А., Большов М.А.* Диагностика горячих зон методом абсорбционной спектроскопии с диодными лазерами (обзор) // Оптика и спектроскопия. 2019. Т. 127. № 1. С. 55. (*Liger V.V., Mironenko V.R., Kuritsyn Yu.A., Bolshov M.A.* Diagnostics of hot zones by absorption spectroscopy with diode lasers (Review) // Opt. Spectrosc. 2019. V. 127. № 1. P. 49.) <https://doi.org/10.1134/S0030400X19070166>
9. *Понуровский Я.Я.* Новое поколение газоаналитических систем на основе диодных лазеров // Аналитика. 2019. Т. 9. № 1. С. 68. <https://doi.org/10.22184/2227-572x.2019.09.1.68.7>
10. *Li J., Yu Z., Du Z., Ji Y., Liu C.* Standoff chemical detection using laser absorption spectroscopy: A Review // Remote Sens. 2020. V. 12. № 17. P. 2771. <https://doi.org/10.3390/rs12172771>
11. *Fu B., Zhang C., Lyu W., Sun J., Shang C., Cheng Y., Xu L.* Recent progress on laser absorption spectroscopy for determination of gaseous chemical species // Appl. Spectrosc. Rev. 2022. V. 57. № 2. P. 112. <https://doi.org/10.1080/05704928.2020.1857258>
12. *Farooq A., Alqaity A.B.S., Raza M., Nasir E.F., Yao S., Ren W.* Laser sensors for energy systems and process industries: Perspectives and directions // Prog. Energy Combust. Sci. 2022. V. 91. Article 100997. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2022.100997>
13. *Smith B.W., Quentmeier A., Bolshov M., Niemax K.* Measurement of uranium isotope ratios in solid samples using laser ablation and diode laser-excited atomic fluorescence spectrometry // Spectrochim. Acta B. 1999. V. 54. № 6. P. 943. [https://doi.org/10.1016/S0584-8547\(99\)00022-1](https://doi.org/10.1016/S0584-8547(99)00022-1)
14. *Quentmeier A., Bolshov M., Niemax K.* Measurement of uranium isotope ratios in solid samples using laser ablation and diode laser atomic absorption spectrometry // Spectrochim. Acta B. 2001. V. 56. № 1. P. 45. [https://doi.org/10.1016/S0584-8547\(00\)00289-5](https://doi.org/10.1016/S0584-8547(00)00289-5)
15. *Li F., Yu X., Cai W., Ma L.* Uncertainty in velocity measurement based on diode-laser absorption in nonuniform flows // Appl. Opt. 2012. V. 51. № 20. P. 4788. <https://doi.org/10.1364/AO.51.004788>
16. *Zybin A., Schnürer-Patschan C., Bolshov M., Niemax K.* Elemental analysis by diode laser spectroscopy // Trends Anal. Chem. 1998. V. 17. P. 513. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(98\)00063-6](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(98)00063-6)
17. *Большов М.А., Курицын Ю.А., Лигер В.В., Мироненко В.Р., Леонов С.Б., Яранцев Д.А.* Применение диодной лазерной спектроскопии для измерения параметров газа при плазменно-индуцированном сверхзвуковом горении // Квантовая электроника. 2009. Т. 39. № 9. С. 869. (*Bolshov M.A., Kuritsyn Yu.A., Liger V.V., Mironenko V.R., Leonov S.B., Yarantsev D.A.* Measurements of gas parameters in plasma-assisted supersonic combustion processes using diode laser spectroscopy // Quantum Electron. 2009. V. 39. № 9. P. 869.) <https://doi.org/10.1070/QE2009v039n09ABEH014044>
18. *Большов М.А., Курицын Ю.А., Леонов С.Б., Лигер В.В., Мироненко В.Р., Савелкин К.В., Яранцев Д.А.* Измерение температуры и концентрации паров воды в сверхзвуковой камере сгорания методом абсорбционной спектроскопии // Теплофизика высоких температур. 2010. № 1. (доп. выпуск). С. 9.
19. *Bolshov M.A., Kuritsyn Yu.A., Liger V.V., Mironenko V.R., Leonov S.B., Yarantsev D.A.* Measurements of the temperature and water vapor concentration in a hot zone by tunable diode laser absorption spectrometry // Appl. Phys. B. 2010. V. 100. № 2. P. 397. <https://doi.org/10.1007/s00340-009-3882-4>
20. *Gordon I.E., Rothman L.S., Hargreaves R.J., Hashemi R., Karlovets E.V. et al.* The HITRAN2020 molecular spectroscopic database // J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf. 2022. V. 277. Article 107949. <https://doi.org/10.1016/j.jqsrt.2021.107949>
21. *Большов М.А., Курицын Ю.А., Лигер В.В., Мироненко В.Р., Колесников О.М.* Измерение параметров нестационарных газовых потоков методом диодной лазерной абсорбционной спектроскопии при повышенных давлении и температуре среды // Оптика и спектроскопия. 2017. Т. 122. № 5. С. 20. (*Bolshov M.A., Kuritsyn Yu.A., Liger V.V., Mironenko V.R., Kolesnikov O.M.* Measurements of parameters of transient gas flows by a diode laser absorption spectroscopy at elevated pressures and temperatures // Opt. Spectrosc. 2017. V. 122. № 5. P. 705.)
22. *Лигер В.В., Курицын Ю.А., Мироненко В.Р., Большов М.А., Понуровский Я.Я., Колесников О.М.* Измерение параметров нестационарных газовых потоков методом диодной лазерной абсорбционной спектроскопии в условиях высоких температур и давлений // Теплофизика высоких температур. 2018. Т. 56. № 1. С. 92. (*Liger V.V., Kuritsyn Yu.A., Mironenko V.R., Bolshov M.A., Ponurovskii Ya.Ya., Kolesnikov O.M.* Measurement of non-stationary gas flow parameters using diode laser absorption spectroscopy at high temperatures and pressures // High Temperature. 2018. V. 56. № 1. P. 98.) <https://doi.org/10.1134/S0018151X18010108>
23. *Ma L., Li X., Sanders S.T., Caswell A.W., Roy S., Plemmons D.H., Gord J.R.* 50-kHz-rate 2D imaging of temperature and H₂O concentration at the exhaust plane of a J85 engine using hyperspectral tomography // Opt. Express. 2013. V. 21. № 1. P. 1152. <https://doi.org/10.1364/OE.21.001152>
24. *Liger V.V., Mironenko V.R., Kuritsyn Yu.A., Bolshov M.A.* Temperature measurements by wavelength modulation diode laser absorption spectroscopy with logarithmic conversion and 1f signal detection // Sensors. 2023. V. 23. № 2. P. 622. <https://doi.org/10.3390/s23020622>
25. *Nasir E.F., Farooq A.* Time-resolved temperature measurements in a rapid compression machine using quantum cascade laser absorption in the intrapulse mode // Proc. Combust. Inst. 2017. V. 36. P. 4453. <https://doi.org/10.1016/j.proci.2016.07.010>
26. *Понуровский Я.Я., Ставровский Д.Б., Шаповалов Ю.П., Спиридонов М.В., Кузьмичев А.С., Надеждинский А.И., Котков А.П., Гришнова Н.Д., Аношин О.С., Скосырев А.И., Полежаев Д.М.* Контроль степени ректификационной очистки неорганических гидридов методом абсорбционной диодной лазерной спектроскопии // Неорганические материалы. 2020. Т. 56. № 12. С. 1356. (*Ponurovskii Y.Y., Stavrovskii D.B., Shapovalov Y.P., Spiridonov M.V., Kuz'michev A.S., Na-dezhinskii A.I., Kotkov A.P., Grishnova N.D., Anoshin O.S., Skosyrev A.I., Polezhaev D.M.* Monitor-

- ing the fractional distillation purification of inorganic hydrides by diode laser absorption spectroscopy // *Inorg Mater.* 2020. V. 56. P. 1284.)
<https://doi.org/10.1134/S0020168520120158>
27. Wang C., Sahay P. Breath analysis using laser spectroscopic techniques: breath biomarkers, spectral fingerprints, and detection limits // *Sensors.* 2009. V. 9. № 10. P. 8230.
<https://doi.org/10.3390/s91008230>
28. Понуровский Я.Я., Надеждинский А.И., Ставровский Д.Б., Шаповалов Ю.П., Спиридонов М.В., Кузьмичев А.С., Карабиненко А.А., Петренко Ю.М. Диодный лазерный спектрометр для скрининг-диагностики компонентов выдыхаемого воздуха // *Современные технологии в медицине.* 2020. Т. 12. № 5. С. 71. (Ponurovsky Ya.Ya., Nadezhdinsky A.I., Stavrovsky D.B., Shapovalov Yu.P., Spiridonov M.V., Kuzmichev A.S., Karabinenko A.A., Petrenko Yu.M. Diode laser spectrometer for diagnostic assessment of exhaled air components // *Sovremennye tehnologii v medicine.* 2020. V. 12. № 5. P. 71.)
<https://doi.org/10.17691/stm2020.12.5.08>
29. Karabinenko A.A., Nadezhdinsky A.I., Ponurovsky Ya.Ya., Presnova E.D., Nikitin I.G. Phenomena detected by the method of diode laser spectrometry of gaseous metabolites of the exhaled air of a human being // *Wschodnioeuropejskie Czasopismo Naukowe.* 2018. V. 29. № 1. P. 30.
30. Плешков Д.И., Кулаков А.Т., Понуровский Я.Я., Шаповалов Ю.П., Надеждинский А.И. Устройство и способ измерения концентрации газообразных веществ. Патент РФ № 2598694С2. Заявка 2014151119/28, 2014.12.17 от 17.12.2014, опублик. 27.09.2016.
31. Risby T.H., Tittel F.K. Current status of mid-infrared quantum and interband cascade lasers for clinical breath analysis // *Opt. Eng.* 2010. V. 49. № 11. Article 111123.
<https://doi.org/10.1117/1.3498768>
32. Li J.S., Chen W., Fischer H. Quantum cascade laser spectrometry techniques: A new trend in atmospheric chemistry // *Appl. Spectr. Rev.* 2013. V. 48. № 7. P. 523.
<https://doi.org/10.1080/05704928.2012.757232>
33. Du Z., Zhang S., Li J., Gao N., Tong K. Mid-infrared tunable laser-based broadband fingerprint absorption spectroscopy for trace gas sensing: A review // *Appl. Sci.* 2019. V. 9. № 2. P. 338.
<https://doi.org/10.3390/app9020338>

УДК 543.545

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ИЗВЛЕЧЕНИЮ И КОНЦЕНТРИРОВАНИЮ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ РАСТИТЕЛЬНЫХ ОБЪЕКТОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДОВ МИКРОЭКСТРАКЦИИ ДЛЯ ИХ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ

© 2023 г. Е. А. Бессонова^а *, Д. А. Карпицкий^а, Л. А. Карцова^а

^аСанкт-Петербургский государственный университет

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

*e-mail: lena_pol@inbox.ru

Поступила в редакцию 10.04.2023 г.

После доработки 28.05.2023 г.

Принята к публикации 28.05.2023 г.

В обзоре рассмотрены основные тенденции активно развивающихся методов твердофазной и жидкостной микроэкстракции для извлечения, очистки и концентрирования аналитов из лекарственных растений и растительных материалов, применение новых экстрагентов и подходов к пробоподготовке объектов растительного происхождения, совместимость их с масс-спектрометрическим детектированием. Особое внимание уделено аналитическим возможностям, достоинствам и ограничениям каждого из подходов для извлечения аналитов из растительных материалов для последующего хромато-масс-спектрометрического анализа полученных экстрактов.

Ключевые слова: микроэкстракционные методы, растительные объекты, ВЭЖХ-МС, ГХ-МС, концентрирование, биологически активные вещества.

DOI: 10.31857/S0044450223100031, **EDN:** ZJFKPV

Контроль качества продуктов питания и новых лекарственных средств на основе растительного сырья крайне актуален, что подтверждается и данными экологического мониторинга о загрязнении растений, произрастающих в конкретной местности. В последние годы во всем мире вырос интерес к использованию фитотерапии для профилактики и лечения различных заболеваний.

Растительные объекты представляют собой сложные матрицы, содержащие большое количество веществ (белки, жиры, углеводы, витамины, полифенолы, каротиноиды, пигменты и др.), отличающихся молекулярной массой, полярностью, химическими свойствами. Подготовка пробы — ключевой этап в анализе растительных объектов, обеспечивающий селективное извлечение биологически активных веществ (БАВ), что является непростой задачей, поскольку компоненты, присутствующие в матрице, могут не только затруднить экстракцию аналитов, но и влиять на аналитические параметры (чувствительность, точность) дальнейшего определения этих соединений. Все это необходимо учитывать для последующего хромато-масс-спектрометрического (ГХ-МС и ВЭЖХ-МС) анализа экстрактов.

Достоинством хромато-масс-спектрометрического метода анализа природных объектов является, в первую очередь, высокая селективность и чувствительность анализа (единицы пг/г), возможность идентификации неизвестных компонентов в растительных экстрактах по МС- и МС²-спектрам и получение информации о составе анализируемой пробы даже при неполном хроматографическом разделении компонентов. На сегодняшний день хромато-масс-спектрометрия активно востребована не только при выполнении научно-исследовательских работ, но и в рутинной производственной практике.

Тем не менее при выполнении хромато-масс-спектрометрических анализов, особенно в случае ВЭЖХ-МС/МС, возникает ряд проблем, например, таких как сильные матричные эффекты, вызывающие подавление или, наоборот, усиление сигнала аналитов. Это требует особого внимания к разработке способов пробоподготовки растительных объектов.

Основные задачи, решаемые на этапе подготовки пробы к хромато-масс-спектрометрическому анализу, включают в себя:

- селективное извлечение аналитов из матрицы пробы;
- очистка образца от мешающих компонентов, уменьшение матричного эффекта;
- концентрирование аналитов;
- перевод образца в форму совместимую с последующим методом анализа (ВЭЖХ и ГХ с масс-спектрометрическим детектированием);
- сохранение максимально полной информации о составе исследуемого растительного объекта.

Эффективность экстракции БАВ зависит от таких параметров, как их растворимость, скорость массообмена между образцом и растворителем, природа матрицы пробы и образца. В случае жидких проб (растительные соки, масла) целевые аналиты могут быть непосредственно экстрагированы подходящим растворителем; твердые образцы (плоды, листья, корни растений и др.) требуют до экстракции проведения некоторых предварительных процедур: измельчения для повышения эффективности массопереноса, сушки для снижения содержания влаги. Нередко твердые образцы перед измельчением высушивают с применением вымораживания или лиофилизации, удаляя значительные количества воды и максимально сохраняя содержание БАВ в пробе, обеспечивая тем самым ее репрезентативность. Далее твердый порошок экстрагируют подходящим растворителем, который затем обрабатывают как жидкий образец.

Классическими методами извлечения БАВ из растительных объектов являются различные варианты жидкостной экстракции: мацерация, экстракция по Сокслету, гидродистилляция, перколяция, перфорация, а также применение таких методов, как сверхкритическая флюидная экстракция, экстракция субкритической водой, жидкостная экстракция под давлением и ферментативная экстракция, которые для повышения степени извлечения могут быть дополнены вихревой, микроволновой (микроволновая экстракция, и ультразвуковой обработкой (ультразвуковая экстракция). При этом неселективное извлечение аналитов и недостаточная очистка образцов от мешающих компонентов (липидов, стеролов, хлорофиллов и т.д.) может потребовать включения дополнительных стадий очистки экстрактов перед их анализом методами ГХ-МС или ВЭЖХ-МС, усложняя и увеличивая продолжительность самого процесса экстракции с применением значительных количеств токсичных органических растворителей. К современным методам экстракции предъявляют следующие требования: высокая селективность, экспрессность и простота технологии, соответствие основным принципам “зеленой химии” [1]. Методы экстракции с учетом указанных требований развиваются по следующим направлениям [2–26]:

- разработка методов селективной твердофазной и жидкостной микроэкстракции (ТФМЭ и ЖМЭ) БАВ;
- поиск новых эффективных и экологически безопасных экстрагентов (ионные жидкости (ИЖ), глубокие эвтектические растворители (ГЭР), растворители с переключаемой гидрофильностью, субкритическая вода, сверхкритические флюиды), так называемые “дизайнерские экстрагенты”;
- сочетание методов жидкостной и твердофазной экстракции (диспергирование сорбента);
- автоматизация процесса, создание специальных наборов и устройств для пробоподготовки.

В последние десятилетия разработаны эффективные методы микроэкстракции, основанные на твердофазной экстракции (ТФЭ) и жидкостно-жидкостной экстракции (ЖЖЭ). Так, на основе ЖЖЭ предложены жидкостно-жидкостная микроэкстракция (ЖЖМЭ), дисперсионная жидкостно-жидкостная микроэкстракция (ДЖЖМЭ), капельная микроэкстракция и жидкофазная микроэкстракция в полых волокнах. Миниатюризация коснулась и сорбционных вариантов: твердофазная микроэкстракция, микроТФЭ в наконечнике пипетки, дисперсионная ТФЭ (ДТФЭ), матричное твердофазное диспергирование (МТФД), магнитная ТФЭ (МТФЭ) [23–26] с реализацией методологии QuEChERS – Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (быстро, просто, дешево, эффективно, надежно, безопасно) [21]. При МТФД сорбент предварительно диспергируется и смешивается с пробой, а затем уже смесь переносится в картридж. В ДТФЭ можно использовать любой тип сорбента, а в МТФЭ – только магнитные наночастицы. Эти методы микроэкстракции все чаще применяют при исследовании растительных объектов в качестве альтернативных традиционным вариантам экстракции, поскольку, являясь более экологичными, они отвечают запросам “зеленой химии”.

ТВЕРДОФАЗНАЯ МИКРОЭКСТРАКЦИЯ ДЛЯ ИЗВЛЕЧЕНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ ИЗ РАСТЕНИЙ

Твердофазная микроэкстракция, впервые предложенная Артур и Павлишиным в начале 1990-х гг. [27], широко используется при извлечении следовых количеств летучих и среднелетучих органических соединений из растительных объектов с последующим их определением методами газовой хроматографии, в том числе с МС-детектированием [28–31]. Это – экспрессный, простой, чувствительный и высокоэффективный метод, объединяющий отбор пробы, экстракцию, концентрирование и ввод пробы в хроматограф в одном аналитическом цикле, что удобно в полевых условиях, когда подготовленные образцы могут

быть проанализированы в лаборатории значительно позже без существенных потерь [32–35].

Существует три основных варианта ТФМЭ: i) прямое погружение волокна в матрицу образца; ii) отбор проб в свободном пространстве, в котором аналиты адсорбируются из газовой фазы, находящейся в равновесии с образцами; iii) экстракция на сорбенте с мембранной оболочкой для извлечения менее летучих соединений. Методы ТФМЭ широко применяются для экстракции летучих органических соединений (ЛОС) из растительных объектов (цветы, плоды и листья растений) при изучении видов растений, для оценки влияния климатических условий на метаболизм и условий хранения, в селекционных работах и др. [28–31, 33]. Природа покрытия сорбционного волокна в существенной степени определяет селективность и эффективность экстракции. В качестве покрытий используют различные сорбционные материалы: полидиметилсилоксан (ПДМС), полидивинилбензол (ПДВБ), полиэтиленгликоль, карбовакс (КВ), полиакрилонитрил, карбоксен (КС), силикагель с привитыми октадецильными группами (С18), а также блок-сополимеры, состоящие из разных по полярности мономеров для совместного извлечения веществ с различными свойствами: ПДМС-КС, ПДМС-ДВБ, ПДМС-ДВБ-КС, КВ-ДВБ and Carborpack Z-ПДМС.

Так, с применением ТФМЭ в сочетании с парофазным анализом (ПФА) и последующим ГХ-МС-определением выявлены летучие компоненты цветочного аромата растений *Aquilegia japonica* L. и *A. amurensis* L., распространенных на северо-востоке Китая, в Северной и Южной Корее, Японии, Сибири и Монголии [28]. Авторы сравнивали эффективность трех типов ТФМЭ-покрытий волокон (ПДМС-ДВБ, ПДМС-КС, ПДМС-ДВБ-КС). Методом ТФМЭ-ГХ-МС с волокном состава ПДМС-ДВБ-КС в работе [30] показано, что обработка роз стимуляторами роста (бензиладен и нафталинуксусная кислота) приводит к значительно увеличению выделений ЛОС, повышая ароматическую ценность цветков. В работе [29] установлен состав ЛОС в цветках пяти видов растения *Abeliophyllum distichum* Nakai – перспективного объекта для получения ароматических масел в парфюмерной промышленности. Методом ГХ-МС получены хроматографические профили ЛОС с применением ТФМЭ с волокнами состава ПДМС-ПДВБ-КС. Выявлена связь между обнаруженными структурными фрагментами молекул аналитов и их морфологическими признаками. Применение данного подхода позволило идентифицировать и определить содержание 66 летучих компонентов этого растения. В работе [36] установлена зависимость изменения аромата семян льна обыкновенного (*Linum usitatissimum* L.) от продолжительности нагревания при помощи концентрирования летучих компонен-

тов в реальном времени на стержнях с покрытием КС и ПДМС. В работе [37] методом ТФМЭ-ГХ-МС и последующей хемотрической обработкой полученных характеристических профилей удалось разделить на кластеры образцы сырого и обработанного риса в зависимости от региона произрастания. Сочетание ТФМЭ и “электронного носа” позволило достоверно установить качество плодов актинидии деликатесной (*Actinidia deliciosa* A. Chev., киви) [38], сделать заключение о происхождении сычуаньского перца (*Zanthoxylum* L. spp.) [39], моделировать запах ложнозвездчатки разнолистной (*Pseudostellaria heterophylla* Rupr. & Maxim.) [40] и лука клубневого (*Allium tuberosum* L.) [41]. В настоящее время продолжается активный поиск и применение новых сорбционных покрытий [42–45].

Предложен интересный подход к фитохимическому анализу, где реализован непосредственный контакт зондов ТФМЭ с межклеточной жидкостью растений. Показано, что ТФМЭ *in vivo* наносит минимальный ущерб растениям, занимает меньше времени, чем традиционная жидкостная экстракция, и позволяет получать уникальные “отпечатки пальцев” для всех исследованных растений, которые не обнаруживаются традиционной экстракцией. Сообщается [46] о специально изготовленных стальных стержневых картриджах – микроэкстракционных зондов, содержащих смесь С16-амидного и пентафторфенильного сорбентов для ТФЭ алкалоидов *in vivo* из нескольких видов рода Психотрия (*Psychotria* Ruiz & Pav.), Табернемонтана (*Tabernaemontana* L.), Ункария (*Uncaria* Schreb.) и Паслен (*Solanum* L.) с последующим профилированием. Такой картридж (микроэкстракционный зонд) вводили в лист, плод или просверленное отверстие в коре, а спустя 30 мин извлекали, запаивали в вакуумированном сосуде и охлаждали до проведения анализа.

Значительное улучшение аналитических характеристик и упрощение пробоподготовки обеспечили сорбенты с молекулярными отпечатками, которые получали в форме волокон для анализа пирролизидиновых алкалоидов цветков мать-и-мачехи (*Tussilago farfara* L.). Так, в работе [47] предложен вариант ультраВЭЖХ (УВЭЖХ)-МС в сочетании с твердофазной микроэкстракцией сорбентом с молекулярным отпечатком для экспрессного определения следовых количеств токсичных пирролизидиновых алкалоидов из *Farfarae Flos* – высушенных цветочных бутонов *Tussilago farfara* L. Пирролизидиновые алкалоиды представляют собой класс широко распространенных фитотоксинов, проявляющих сильную гепатотоксичность, а растения, содержащие пирролизидиновые алкалоиды, являются наиболее распространенными ядовитыми растениями, поражающими человека. Полученные в работе волокна показали способность к селективной адсорбции четырех пир-

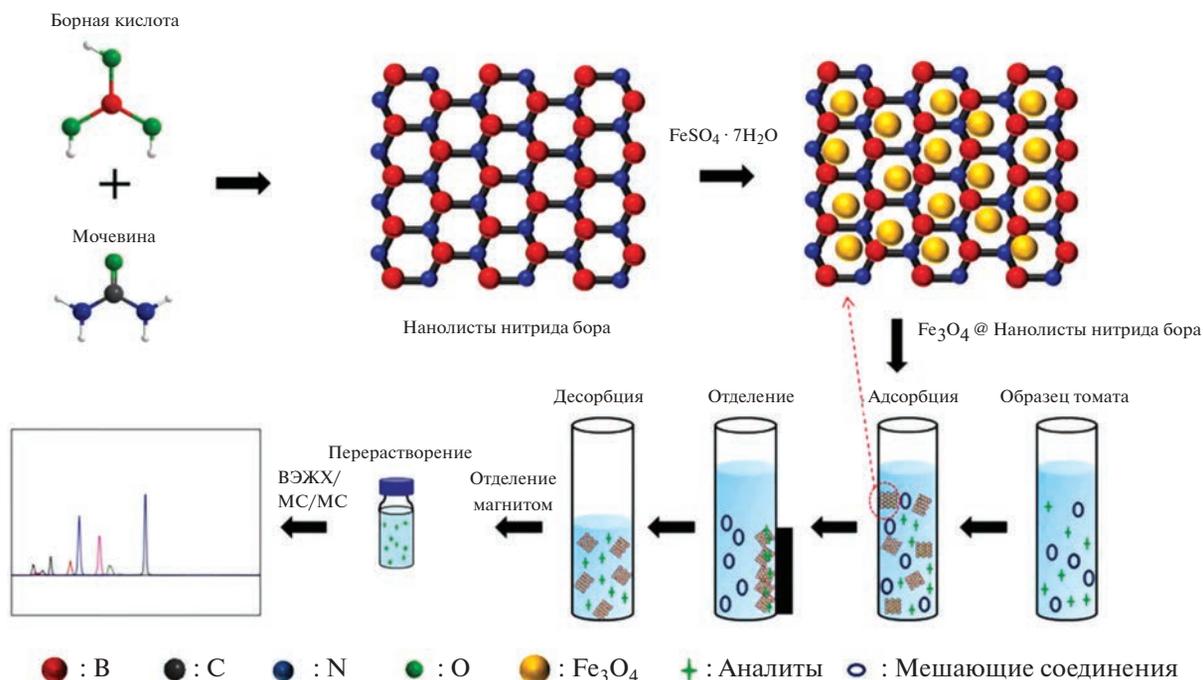


Рис. 1. Схема синтеза и применения наноллистов нитрида бора с включениями оксида железа (II, III) [50].

ролизидиновых алкалоидов, включая европин, эхимидин, лазиокарпин и гелиотрин с пределами обнаружения в диапазоне 0.32–0.60 нг/г. В работе [48] производные коричной кислоты определяли с экстракцией в полое волокно, в котором в качестве экстрагента присутствовала гидрофобная ГЭР состава хлорид тетрабутиламмония–гексановая кислота (1 : 1, мольн.). Пределы обнаружения (ПО) при этом оказались на уровне 10–30 нг/г.

Возможности экстракции фенольных соединений хитозаном изучали в работе [49]. В экстракте из плодов оливы (*Olea europaea* L.) обнаружены как фенольные кислоты (галловая, эллаговая), так и флавоноиды (рутин, гликозид лютеолина), ПО – 69.6–358.4 нг/г. Успешно применены магнитные наночастицы на основе хитозана [50], а для реэкстракции аналитов применили ГЭР состава β -циклодекстрин–молочная кислота (1 : 10, мольн.). Селективность принимающей фазы обеспечила ПО 20–160 нг/мл.

Известно, что гормоны растений несут регуляторную функцию и управляют процессами роста и развития. Изучение изменений их метаболизма вследствие стрессовых условий крайне актуально. Фитогормоны активно используют и в сельском хозяйстве, что требует поиска подходов к эффективному контролю их содержания. При этом гормоны растений характеризуются крайне низкими действующими концентрациями. Хромато-масс-спектрометрический анализ предоставляет возможность как качественного, так и количе-

ственного их определения. В работе [51] обсуждается применение магнитных наночастиц для ГФМЭ. Предложена схема синтеза сорбента на основе нанослоев нитрида бора с включенными в его полости частицами Fe_3O_4 (рис. 1), который использовали для анализа смеси регуляторов роста в плодах томата. Такой подход обеспечил определенное 0.007 нг/г 2-нафтоксиуксусной и абсцизовой кислот, а также ряда других фитогормонов. Авторы подчеркивают, что полученные частицы могут быть использованы для селективной экстракции полярных аналитов (гетероциклических фитогормонов, фитогормонов с полярными группами, сульфонамидов). При этом малополярные молекулы не сорбируются даже при наличии в их составе сопряженных систем. Достоинством таких сорбентов является возможность их многократного использования.

Интересный вариант микроГФЭ рассмотрен в работе [52]. Предложено использовать стеклянные бусины с пришитыми через полидиметилсилоксан частицами металлоорганической матрицы (МОМ). Для определения фитогормонов в цитрусовых выбрана МОМ на основе циркония. Удалось достичь пределов обнаружения 0.09–0.17 нг/г. Несомненным достоинством предложенного подхода является возможность самостоятельного нетрудоемкого изготовления сорбента, упрощенная операция пробоподготовки (фаза экстрагента извлекается пинцетом), возможность повторного использования, а также малые объемы анализируемых проб.

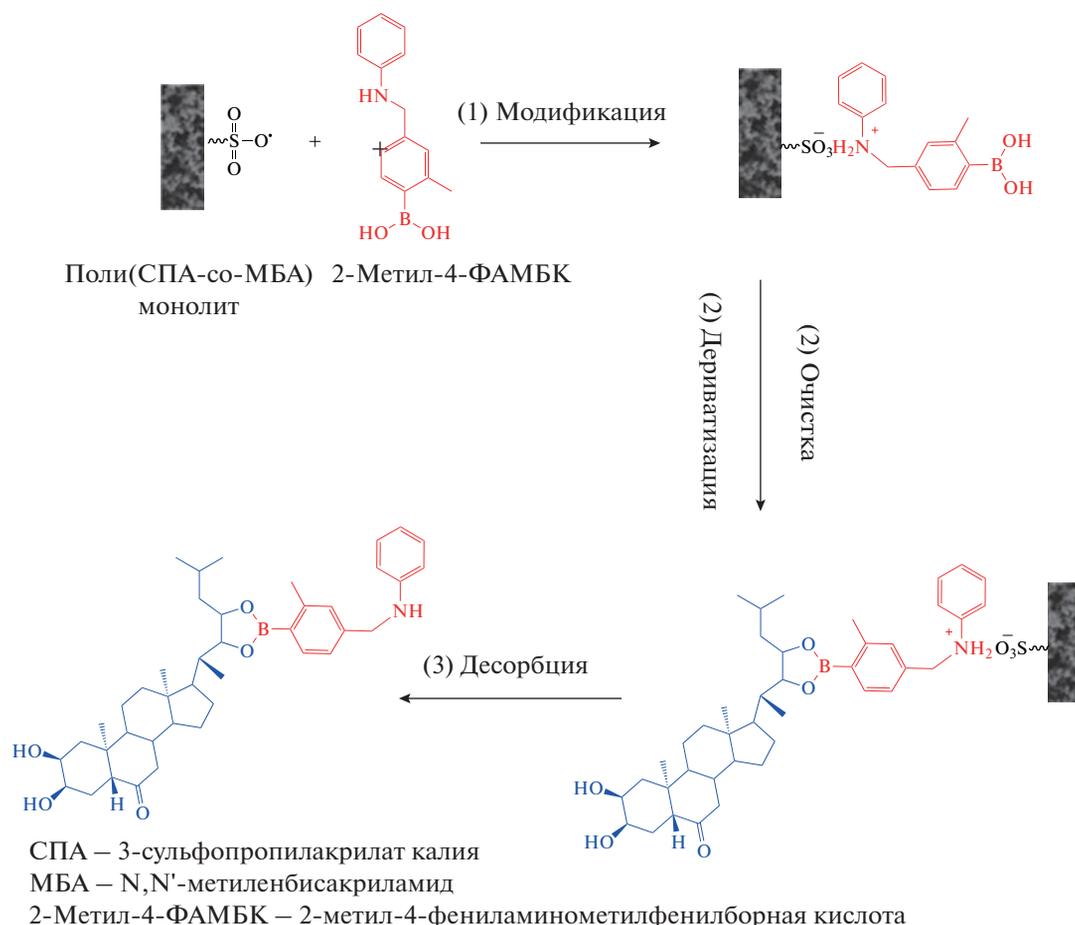


Рис. 2. Общая схема взаимодействия brassinостероида с сорбентом [27].

Другой пример [53] касается синтеза в капиллярах монолитного слоя полиакриламида с поверхностными сульфогруппами, дериватизации подготовленного монолита 2-метил-4-фениламинометилфенилборной кислотой и онлайн концентрирования brassinостероидов (рис. 2). Достигнутые пределы определения составляют десятые доли нг/г. Основные преимущества такого подхода – возможность автоматизации, экспрессность и существенное снижение матричного эффекта.

МЕТОДЫ ЖИДКОСТНОЙ МИКРОЭКСТРАКЦИИ АНАЛИТОВ ИЗ РАСТИТЕЛЬНЫХ ОБЪЕКТОВ

В ЖМЭ аналиты экстрагируют из водной пробы (донорная фаза) в небольшой объем (несколько мкл) несмешивающегося с водой органического растворителя (акцепторная фаза) [23, 54, 55]. Основные варианты ЖМЭ: капельная микроэкстракция, жидкофазная микроэкстракция с использованием полых волокон и дисперсионная жидкостно-жидкостная микроэкстракция. Как и в ЖЖЭ, выбор растворителя

является главным параметром, определяющим эффективность и селективность извлечения аналитов. Растворитель должен обладать хорошим сродством к целевым аналитам, низкой растворимостью в воде, стабильностью в течение всей процедуры экстракции и совместимостью с условиями хромато-масс-спектрометрического определения аналитов. Несмешивающиеся с водой органические растворители, такие как 1-бутанол, *n*-октанол и изооктан, обычно используют в капельной микроэкстракции, 1-октанол, толуол, *n*-гексан, *o*-ксилол – в ЖМЭ с полыми волокнами, а хлорбензол, четыреххлористый углерод, дихлорметан используют в ДЖЖМЭ [23, 54, 55]. В соответствии с принципами “зеленой химии” многие исследования посвящены поиску экологически безопасных растворителей в качестве экстрагентов. В связи с этим большой интерес представляют ионные жидкости и глубокие эвтектические растворители благодаря их уникальным свойствам. Ионные жидкости обладают низким давлением паров, высокой вязкостью и термической стабильностью, не воспламеняются, обладают специфическими электрохимическими характери-

стиками, способны растворять различные органические и неорганические соединения, являясь альтернативой традиционным органическим растворителям [56–58].

Методы ЖЖМЭ эффективно используют для извлечения биологически активных веществ из растительных объектов и продуктов на основе растительных экстрактов. В случае твердых растительных образцов применяют предварительную экстракцию подходящим растворителем. В работе [59] для предварительного концентрирования и определения кофеина в образцах чая и кофе разработана простая и экспрессная методика гомогенной ЖЖМЭ, основанная на изменении объемного соотношения растворителей, в сочетании с ГХ-МС. В предлагаемой методике первичную экстракцию аналитов из твердых образцов проводили смесью этанол–вода (2 : 1, по объему). Затем гомогенизировали систему небольшим объемом дихлорметана. После энергичного встряхивания добавляли дополнительный объем воды, что приводило к фазовому разделению из-за изменения объемного соотношения растворителей. В работе [60] для реализации жидкостно-жидкостно-жидкостной микроэкстракции использовали вихревой смеситель для извлечения четырнадцати фенольных кислот из меда, чая и кофейных напитков. Применяли небольшой объем тройной смеси органических растворителей (1-пентанол, пропилацетат и 1-гексанол), диспергированной в водном образце; для реэкстракции аналитов из органического растворителя добавляли раствор щелочи. Этот способ может быть совмещен с последующим хромато-масс-спектрометрическим определением. Дисперсионная жидкостно-жидкостная микроэкстракция основана на экстракции аналитов микроэмульсией экстрагента, содержащей целевые аналиты, что значительно повышает эффективность экстракции [23]. Сообщается о применении ДЖЖМЭ для извлечения ряда биоактивных соединений из растительных объектов с последующим определением хроматографическими методами: фенолов из листьев сливы *Prunus domestica* L. [61], витамина Е и фенолов из корней растения *Harpagophytum procumbens* Burch. (Дьявольский коготь) [62], флавонолов и серосодержащих органических соединений из чеснока [63, 64]. Разработан [65] эффективный способ определения фитостеролов в лекарственных травах и функциональных пищевых продуктах (растительное масло, апельсиновый сок, молоко) с помощью ДЖЖМЭ с ультразвуковой обработкой в сочетании с микроволновой дериватизацией с последующим анализом методом УВЭЖХ с МС/МС-детектированием. В работе [66] для определения фенилпропаноидов в растительных маслах использовали ДЖЖМЭ с гидрофильными ГЭР на основе бетаина и молочной, пироглициевой и фенилуксусной

кислот, растворенными в изопропанол. Испытан [67] ряд гидрофобных ГЭР для осуществления ДЖЖМЭ каннабиоидов и флавоноидов в *Cannabis sativa* L. Диспергирование проводили в ультразвуковой ванне, а затем выполняли хроматографический анализ фазы ГЭР, разбавленной метанолом. Отмечена селективность извлечения в отношении кислотных производных каннабиоида за счет неполярных взаимодействий. Аналогичный подход с использованием ГЭР холин хлорид–сезамол (1 : 3) предложен для определения антиоксиданта *трет*-бутилгидрохинона [68] в соевых маслах.

Капельная микроэкстракция – еще один пример жидкостной микроэкстракции, позволяющий достигать высоких коэффициентов концентрирования аналитов, поскольку объем экстрагирующего растворителя ограничен одной каплей. Капля экстрагирующего растворителя с помощью микрошприца (или пипетки) вносится в раствор пробы и затем извлекается из него. Авторы работы [69] предложили использовать в капельной микроэкстракции магнитные ИЖ (М-ИЖ), диспергируя одну каплю растворителя, содержащего М-ИЖ, в растворе образца и извлекая ее обратно с помощью магнита. Используя М-ИЖ, содержащие тетрахлорманганат-анион, достигнуты низкие значения ПО (0.43 нМ) при определении аскорбиновой кислоты в апельсиновом соке. Подобный подход может быть с успехом совмещен с последующим хромато-масс-спектрометрическим определением.

Жидкостная микроэкстракция с полым волокном в значительной мере упростила процесс экстракции и концентрирования аналита в экстрагенте за счет облегчения процедур дозирования и фиксации экстрагента и получила распространение для экстракции БАВ из жидких растительных объектов. Аналогичный подход [70] с использованием ГЭР состава серин–молочная кислота (1 : 5) позволил определить содержание кофейной кислоты в образцах кофе, зеленого чая и томата.

СОЧЕТАНИЕ МЕТОДОВ ЖИДКОСТНОЙ И ТВЕРДОФАЗНОЙ ЭКСТРАКЦИИ. ЭКСТРАКЦИЯ С ДИСПЕРСИЕЙ СОРБЕНТА

При экстракции биологически активных веществ из твердых растительных объектов обычно на первом этапе извлекают вещества органическим растворителем для получения экстракта, который на следующем этапе очищают с использованием селективных сорбционных материалов [71, 72]. Значительное разнообразие сорбентов (обращенно-фазовые, ионообменные, смешанные, полимеры с молекулярным отпечатком, магнитные наночастицы (МНЧ), многостенные углеродные нанотрубки, металлоорганические каркасы и т. д.) обеспечивает широкие возможности

для селективного извлечения аналитов с различными химическими свойствами. В настоящее время ведется поиск и разработка новых сорбционных материалов со специфическими характеристиками в зависимости от типа аналитов, что позволяет достигать высокой эффективности экстракции и степени очистки образца от примесей.

Одним из направлений является миниатюризация методов на основе сорбентов, микрочастицы которых диспергируются в растворе (в жидком образце), что позволяет увеличить площадь поверхности и эффективность экстракции. Так, в методе дисперсионной твердофазной экстракции [73–83] основными подходами являются матричное твердофазное диспергирование, магнитная твердофазная экстракция, микротвердофазная экстракция и метод μ QuEChERS. Матричное ТФД – эффективный универсальный метод выделения широкого спектра лекарственных средств, компонентов природного происхождения, пестицидов и других соединений из сложных растительных объектов. Образец диспергируется по поверхности материала носителя связанной фазы, образуя за счет гидрофобных и гидрофильных взаимодействий различных компонентов фазу смешанного состава для выделения целевого аналита [72]. Магнитная ТФЭ основана на использовании сорбционных материалов, нанесенных на магнитные наночастицы, такие как углеродные нанотрубки [84], природные материалы (хитозан) [85], полимеры с молекулярным отпечатком [85, 86]. Основное преимущество МТФЭ состоит в том, что сорбент содержит магнитные наночастицы, которые могут быть легко модифицированы, и быстро извлекается из раствора с помощью магнита.

Метод ДТФЭ применен для идентификации и определения розмариновой кислоты в лекарственных растениях [85], для экстракции *n*-кумаровой кислоты и *n*-гидроксibenзойной кислоты из фруктовых соков [80], флаванолов из цитрусовых [81]. Матричное ТФД успешно использовали для экстракции различных полифенолов из плодов оливы [49, 82]. В работе [83] применение матричного ТФД на основе диольного сорбента обеспечило извлечение 13 биоактивных соединений (семь кумаринов и шесть фенольных кислот) из *Angelica Pubescens Radix* (высушенный корень *Angelica pubescens Maxim.*) с последующим анализом методом УВЭЖХ [83]. Для определения изотиоцианатов в растениях предложен [87] подход с дериватизацией *N*-ацетил-*L*-цистеином и использованием картриджа С18 с последующим ВЭЖХ-УФ-МС-анализом. Авторы отмечают, что подобная схема применима и при определении индолов, которые в растениях выполняют гормональную функцию.

Одно из направлений развития методов ТФЭ с диспергированием сорбента в растворе пробы

связано с разработкой новых сорбентов для селективной экстракции аналитов из сложной матрицы. Увеличение селективности экстракции БАВ из растительных объектов может быть достигнуто за счет использования МНЧ, покрытых сорбентами с различными специфическими свойствами. Так, магнитная ТФЭ на основе синтезированного нанокompозитного материала, состоящего из графена и магнитных наночастиц оксида железа Fe_3O_4 , использовалась для извлечения флавоноидов (кемпферола, кверцетина, лютеолина) из образцов чая, а также вина и мочи для последующего ВЭЖХ определения [75]. Гидрофильные группы на поверхности оксида графена и его большая площадь поверхности обеспечили высокую эффективность экстракции. В работах [84, 86] применение МНЧ, покрытых молекулярно-импринтированным полимерным сорбентом, обеспечило высокую селективность при извлечении фенольных кислот (галловая и хлорогеновая кислота) из фруктов и соков.

Другой пример селективного сорбента – синтезированный мезопористый силикагель, модифицированный октадецилсиланольными (С18) группами [88]. Полученный гибридный материал обеспечил одновременное извлечение и очистку 20 полифенолов из смешанных фруктово-овощных соков методом ДТФЭ (рис. 3). Получены более высокие значения степеней извлечения по сравнению с коммерческим аморфным силикагелем, модифицированным С18. Стадию экстракции объединили с определением методом ультра-ВЭЖХ с тандемным масс-спектрометрическим детектированием с ионной ловушкой.

Интересный вариант ДТФЭ рассмотрен в работе [52, 89]. Авторы обратили внимание на неполное разделение фаз при ДТФЭ, что, в свою очередь, сказывается на величине повторяемости и приводит к сокращению срока службы хроматографических систем. В качестве альтернативы предложено использовать стеклянные бусины с пришитыми через ПДМС частицами МОМ. Для определения фитогормонов в цитрусовых выбрали МОМ на основе циркония – U_iO-66 . Удалось достичь пределов обнаружения 0.09–0.17 нг/г и пределов определения 0.29–0.56 нг/г. Несомненным достоинством предложенного подхода является возможность самостоятельного нетрудооемкого изготовления сорбента, упрощенная операция пробоподготовки (фаза экстрагента извлекается пинцетом), возможность повторного использования, а также малые объемы анализируемых проб.

Для уменьшения негативного воздействия на окружающую среду традиционно используемых органических растворителей в качестве возможных элюентов на стадии десорбции аналитов в дисперсионной ТФЭ исследованы ИЖ и ГЭР, позволяющие увеличить эффективность извлечения и уменьшить влияние матрицы про-

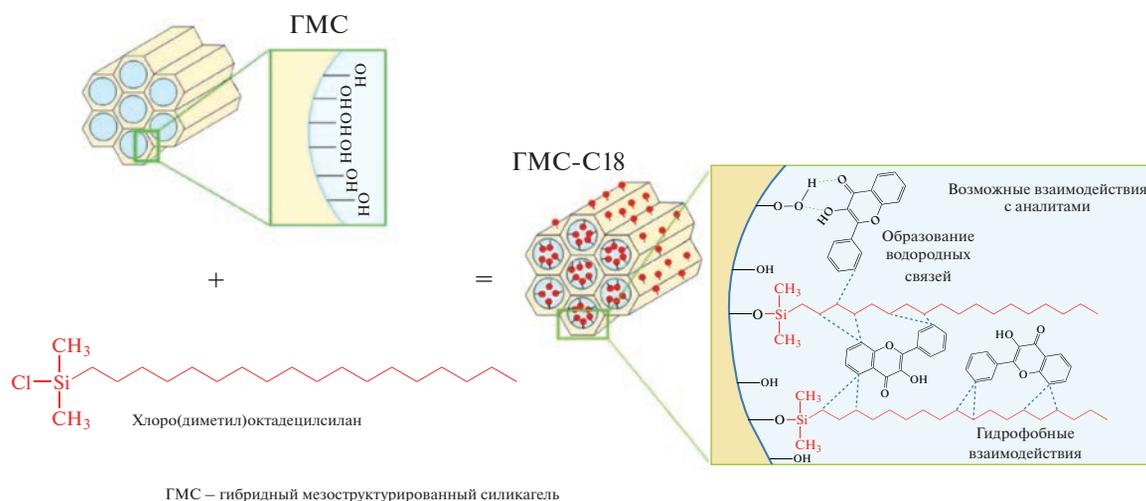


Рис. 3. Механизм возможных взаимодействий полифенолов с поверхностными группами мезоструктурированного модифицированного силикагеля [85].

бы [90–94]. Магнитная ДТФЭ на основе магнитных наночастиц агарозы с применением глубоких эвтектических растворителей в качестве элюентов в процессе десорбции аналитов разработана для выделения и предварительного концентрирования трех флавоноидов (морин, кверцетин и кемпферол) из растительных продуктов (чай, овощные и фруктовые соки) с последующим ВЭЖХ-МС-определением [90]. Матричная ДТФЭ с природными ГЭР на основе холин хлорида и молочной кислоты позволила эффективно извлекать фенольные соединения из растений *Helichrysum arenarium* L., такие как хлорогеновая кислота, нарингенин-4'-О-глюкозид, томорозид А, нарингенин-5-О-глюкозид, изосалипурпозид и нарингенин [91]. Для определения морина, кверцетина, апигенина и нарингенина в образцах соков и зеленого чая оптимизированы условия сорбции на частицах состава оксид графена–хитозан–Fe₃O₄ и последующего элюирования ГЭР холин хлорид–мочевина (1 : 2) с добавлением геля алоэ настоящего (*Aloe vera* L.) [92]. Успешно проявляют себя и ионные жидкости: в работе [93] неогесперидин и нарингин сорбировали на флорисил из плода лайма (*Citrus aurantium* L.) совместным перетиранием, затем элюировали в картридже 1-бутил-3-метилимидазолия тетрафторборатом. Аналогичным способом, но с использованием силикагеля и 1-додецил-3-метилимидазолия бромид в горце многоцветковом (*Polygoni multiflora* L.) определяли содержание нескольких катехинов, флавоноидов и терпеноидов [94].

МЕТОД МИКРОЭКСТРАКЦИИ μ QuEChERS

В 2003 г. предложен новый подход к пробоподготовке, характеризующийся как быстрый, простой, дешевый, эффективный, надежный и без-

опасный (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe – QuEChERS) [95]. Это двухстадийный процесс разделения твердой и жидкой фаз с эффектом высаливания и ДТФЭ. На первой стадии проводят извлечение аналитов из гомогенизированной пробы органическим растворителем, часто ацетонитрилом, в присутствии высаливателей и буферных растворов до достижения равновесия (для обеспечения более эффективной экстракции рН-зависимых аналитов, а также снижения степени деградации нестабильных аналитов). Затем следует этап очистки экстракта от мешающих компонентов матрицы пробы методом ДТФЭ с использованием различных пористых сорбентов, таких как С18, полярный сорбент на основе первичного-вторичного амина (PSA) и графитированная сажа (GCB) [96].

Первоначально стратегию QuEChERS применяли для определения загрязняющих веществ в объектах окружающей среды [97–100]. Однако в последние годы методологию QuEChERS успешно миниатюризировали и область ее применения существенно расширилась, включая определение БАВ [101–105] и загрязняющих веществ в растительных объектах [106]. Так, применение данного подхода позволило эффективно экстрагировать 12 полифенолов из детского питания на фруктовой основе (фруктовые соки и пюре) [101]. Изучены профили полифенольных соединений в цветках мальвы голубой (*Malva sylvestris* L.), гибискуса (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) и настурции (*Tropaeolum majus* L.), полученные с использованием μ QuEChERS с последующим хроматографическим анализом методом УВЭЖХ-ДМД [102]. В работе [103] стратегия μ QuEChERS успешно применена для экстракции горьких кислот и ксантогумола из хмеля (*Humulus lupulus* L.).

Показана эффективность применения стратегии $\mu\text{QuEChERS}$ с последующим УВЭЖХ-МС/МС-анализом для определения фенольных кислот и флавоноидов в малоизученных сортах красного перца (*Capsicum* spp.), что актуально для косметической и фармацевтической промышленности [104].

В работе [105] метод $\mu\text{QuEChERS}$ в сочетании с УВЭЖХ-МС/МС использовали для одновременного обнаружения инсектицида толфенпирада и его четырех основных метаболитов в пяти образцах чая (листья *Camellia sinensis* L.) (свежие побеги чая, зеленый чай, черный чай, настой зеленого чая и настой черного чая). Для экстракции аналитов выбрали ацетонитрил с 1% муравьиной кислоты в сочетании с C18, графитированной сажей, гидроксильными углеродными нанотрубками и MgSO_4 для очистки экстракта.

В настоящее время ведется поиск и исследование новых сорбентов для очистки в формате QuEChERS . В качестве альтернативных материалов предложены сорбенты на основе мезопористого силикагеля, который представляют собой золь-гель материал с улучшенными текстурными свойствами. Так, в работе [106] предложена стратегия $\mu\text{QuEChERS}$ для одновременного извлечения 21 пирролизидинового алкалоида из различных ароматических трав (тимьян (*Thymus vulgaris* L.), базилик (*Ocimum basilicum* L.), розмарин (*Rosmarinus officinalis* L.)) в сочетании с ВЭЖХ-МС/МС. В качестве сорбентов изучены аналитические возможности различных мезопористых силикагелей, как немодифицированных, так и модифицированных аминогруппами.

* * *

Анализ растительных объектов представляет собой непростую задачу из-за сложного состава матрицы пробы в сочетании с низкой концентрацией аналитов. Подготовка подобных объектов, включая процесс экстракции, является одним из наиболее важных этапов любого анализа, обеспечивающая селективность и точность определения аналитов и влияющая на методологию последующего анализа. В обзоре рассмотрены современные подходы к пробоподготовке, используемые для извлечения биоактивных соединений из образцов растительного происхождения, их возможности и влияние на аналитические параметры при последующем хромато-масс-спектрометрическом определении аналитов. В последние годы в пробоподготовке растительных объектов отмечена тенденция к переходу от традиционных вариантов экстракции (жидкостная и твердофазная) к миниатюрным форматам, более простым, быстрым, экономичным и удобными для применения, учитывающих основные принципы “зеленой” аналитической химии, таких как методы

ТФМЭ, ЖЖМЭ, ДТФЭ и др. Одним из новейших направлений в экстракции растительных объектов можно отметить применение ИЖ и ГЭР в качестве экстрагентов в разных форматах микроэкстракции. Они оказались полезными как в качестве растворителей для экстракции, так и для модификации и повышения эффективности экстракции и селективности других сорбентов, таких как наночастицы и диоксид кремния. Серьезным ограничением многих инновационных подходов к микроэкстракции является их коммерческая малодоступность, что ограничивает их дальнейшее применение. С этой точки зрения такие варианты микроэкстракции, как микроТФЭ будут выигрывать от использования традиционных форматов, но их потенциал, безусловно, будет повышаться за счет внедрения более эффективных сорбентов. Таким образом, перспективы “зеленых” методов микроэкстракции зависят от разработки новых сорбционных материалов, дальнейшей миниатюризации и автоматизации и возможности сочетания с аналитическими приборами.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Galuszka A., Migaszewski Z., Namieśnik J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices // Trends Anal. Chem. 2013. V. 50. P. 78.
2. Ramos L. Use of new tailored and engineered materials for matrix solid-phase dispersion // Trends Anal. Chem. 2019. V. 118. P. 751.
3. Câmara J.S., Perestrelo R., Berenguer C.V., Andrade C.F.P., Gomes T.M., Olayanju B., Kabir A., M R Rocha C., Teixeira J.A., Pereira J.A.M. Green extraction techniques as advanced sample preparation approaches in biological, food, and environmental matrices: A review // Molecules. 2022. V. 27. № 9. P. 2953.
4. Zhang Q.-W., Lin L.-G., Ye W.-C. Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review // Chin. Med. 2018. V. 13. № 1. P. 20.
5. Krakowska-Sieprawska A., Kielbasa A., Rafińska K., Ligor M., Buszewski B. Modern methods of pre-treatment of plant material for the extraction of bioactive compounds // Molecules. 2022. V. 27. № 3. P. 730.
6. Da Silva R.F., Carneiro C.N., de Sousa C.B. do C., Gomez F.J.V., Espino M., Boiteux J., Fernández M. de los Á., Silva M.F., Dias F. de S. Sustainable extraction bioactive compounds procedures in medicinal plants based on the principles of green analytical chemistry: A review // Microchem. J. 2022. V. 175. Article 107184.
7. Armenta S., Garrigues S., de la Guardia M. The role of green extraction techniques in green analytical chemistry // Trends Anal. Chem. 2015. V. 71. P. 2.

8. *Kissoudi M., Samanidou V.* Recent advances in applications of ionic liquids in miniaturized microextraction techniques // *Molecules*. 2018. V. 23. № 6. P. 1437.
9. *Zilfidou E., Kabir A., Furton K.G., Samanidou V.* Fabric phase sorptive extraction: Current state of the art and future perspectives // *Separations*. 2018. V. 5. № 3. P. 40.
10. *Manousi N., Zachariadis G.A., Deliyanni E.A., Samanidou V.F.* Applications of metal-organic frameworks in food sample preparation // *Molecules*. 2018. V. 23. № 11. P. 2896.
11. *Manousi N., Sarakatsianos I., Samanidou V.* Extraction techniques of phenolic compounds and other bioactive compounds from medicinal and aromatic plants / *Engineering Tools in the Beverage Industry*. Elsevier, 2019. P. 283.
12. *Manousi N., Rosenberg E., Deliyanni E., Zachariadis G.A., Samanidou V.* Magnetic solid-phase extraction of organic compounds based on graphene oxide nanocomposites // *Molecules*. 2020. V. 25. № 5. P. 1148.
13. *Lashgari M., Singh V., Pawliszyn J.* A critical review on regulatory sample preparation methods: Validating solid-phase microextraction techniques // *Trends Anal. Chem.* 2019. V. 119. Article 115618.
14. *Hansen F.A., Pedersen-Bjergaard S.* Emerging extraction strategies in analytical chemistry // *Anal. Chem.* 2020. V. 92. № 1. P. 2.
15. *Psillakis E.* Vortex-assisted liquid-liquid microextraction revisited // *Trends Anal. Chem.* 2019. V. 113. P. 332.
16. *Kalogiouri N.P., Samanidou V.F.* Recent trends in the development of green microextraction techniques for the determination of hazardous organic compounds in wine // *Curr. Anal. Chem.* 2019. V. 15. № 7. P. 788.
17. *Abdel-Rehim M., Pedersen-Bjergaard S., Abdel-Rehim A., Lucena R., Moein M.M., Cárdenas S., Miró M.* Microextraction approaches for bioanalytical applications: An overview // *J. Chromatogr. A*. 2020. V. 1616. Article 460790.
18. *Tartaglia A., Locatelli M., Samanidou V.* Trends in the analysis of biopharmaceuticals by HPLC // *Curr. Anal. Chem.* 2020. V. 16. № 1. P. 52.
19. *Nastić N., Švarc-Gajić J., Delerue-Matos C., Barroso M.F., Soares C., Moreira M.M., Morais S., Mašković P., Srček V.G., Slivac I., Radošević K., Radojković M.* Subcritical water extraction as an environmentally-friendly technique to recover bioactive compounds from traditional Serbian medicinal plants // *Ind. Crops Prod.* 2018. V. 111. P. 579.
20. *Pereira J.A.M., Casado N., Porto-Figueira P., Câmara J.S.* The potential of microextraction techniques for the analysis of bioactive compounds in food // *Front. Nutr.* 2022. V. 9. Article 825519.
21. *Soares da Silva Burato J., Vargas Medina D.A., de Toffoli A.L., Vasconcelos Soares Maciel E., Mauro Lanças F.* Recent advances and trends in miniaturized sample preparation techniques // *J. Sep. Sci.* 2020. V. 43. № 1. P. 202.
22. *Billiard K.M., Dershem A.R., Gionfriddo E.* Implementing green analytical methodologies using solid-phase microextraction: A review // *Molecules*. 2020. V. 25. № 22. P. 5297.
23. *Дмитриенко С.Г., Аняри В.В., Толмачева В.В., Горбунов М.В.* Дисперсионная жидкостно-жидкостная микроэкстракция органических соединений. Обзор обзоров // *Журн. аналит. химии*. 2020. Т. 75. № 10. С. 867.
24. *Дмитриенко С.Г., Аняри В.В., Толмачева В.В., Горбунова М.В.* Жидкостная экстракция органических соединений в каплю экстрагента. Обзор обзоров // *Журн. аналит. химии*. 2021. Т. 76. № 8. С. 675.
25. *Дмитриенко С.Г., Аняри В.В., Горбунова М.В., Толмачева В.В., Золотов Ю.А.* Гомогенная жидкостная микроэкстракция органических соединений // *Журн. аналит. химии*. 2020. Т. 75. № 11. С. 963.
26. *Дмитриенко С.Г., Аняри В.В., Толмачева В.В., Горбунова М.В.* Жидкофазное микроэкстракционное концентрирование органических соединений / Под ред. Золотова Ю.А. М.: Наука, 2020. 133 с.
27. *Arthur C.L., Pawliszyn J.* Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers // *Anal. Chem.* 1990. V. 62. № 19. P. 2145.
28. *Wang H.-Y., Zhang W., Dong J.H., Wu H., Wang Y.-H., Xiao H.-X.* Optimization of SPME-GC-MS and characterization of floral scents from *Aquilegia japonica* and *A. amurensis* flowers // *BMC Chem.* 2021. V. 15. № 1. P. 26.
29. *Lee Y.-G., Choi W.S., Yang S.O., Hwang-Bo J., Kim H.G., Fang M., Yi T.H., Kang S.C., Lee Y.H., Baek N.I.* Volatile profiles of five variants of *Abeliophyllum distichum* flowers using headspace solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS) analysis // *Plants*. 2021. V. 10. № 2. P. 224.
30. *Baky M.H., Farag M.A., Rasheed D.M.* Metabolome-based analysis of herbal cough preparations via headspace solid-phase microextraction GC/MS and multivariate data analyses: A prospect for its essential oil equivalency // *ACS Omega*. 2020. V. 5. № 48. P. 31370.
31. *Ibrahim M., Agarwal M., Yang J.O., Abdulhussein M., Du X., Hardy G., Ren Y.* Plant growth regulators improve the production of volatile organic compounds in two rose varieties // *Plants*. 2019. V. 8. № 2. P. 35.
32. *Fung A.G., Yamaguchi M.S., McCartney M.M., Aksenov A.A., Pasamontes A., Davis C.E.* SPME-based mobile field device for active sampling of volatiles // *Microchem. J.* 2019. V. 146. P. 407.
33. *Zhu F., Xu J., Ke Y., Huang S., Zeng F., Luan T., Ouyang G.* Applications of in vivo and in vitro solid-phase microextraction techniques in plant analysis: A review // *Anal. Chim. Acta*. 2013. V. 794. P. 1.
34. *Zhang Q.-H., Zhou L., Chen H., Wang C.Z., Xia Z., Yuan C.S.* Solid-phase microextraction technology for in vitro and in vivo metabolite analysis // *Trends Anal. Chem.* 2016. V. 80. P. 57.

35. Wang Y., Wang D., Lv Z., Zeng Q., Fu X., Chen Q., Luo Z., Luo C., Wang D., Zhang W. Analysis of the volatile profiles of kiwifruits experiencing soft rot using E-nose and HS-SPME/GC-MS // LWT. 2023. V. 173. P. 114405.
36. Ma X.-L., Wang X.C., Zhang J.N., Liu J.N., Ma M.H., Ma F.L., Lv Y., Yu Y.J., She Y. A study of flavor variations during the flaxseed roasting procedure by developed real-time SPME GC-MS coupled with chemometrics // Food Chem. 2023. V. 410. Article 135453.
37. Zhao Q., Wang X.C., Zhang J.N., Liu J.N., Ma M.H., Ma F.L., Lv Y., Yu Y.J., She Y. A comparative HS-SPME/GC-MS-based metabolomics approach for discriminating selected japonica rice varieties from different regions of China in raw and cooked form // Food Chem. 2022. V. 385. Article 132701.
38. Wang Y., Wang D., Lv Z., Zeng Q., Fu X., Chen Q., Luo Z., Luo C., Wang D., Zhang W. Analysis of the volatile profiles of kiwifruits experiencing soft rot using E-nose and HS-SPME/GC-MS // LWT. 2023. V. 173. Article 114405.
39. Shao Y., Liu X., Zhang Z., Wang P., Li K., Li C. Comparison and discrimination of the terpenoids in 48 species of huajiao according to variety and geographical origin by E-nose coupled with HS-SPME-GC-MS // Food Res. Int. 2023. V. 167. Article 112629.
40. Huang T., Sun Y., Guo Y., Wang W., He T., Cao J. Application of HS-SPME-GC-MS combined with electronic nose technology in the odor recognition of pseudostellariae radix // Nat. Prod. Res. 2022. P. 1.
41. Hanif M., Xie B., Wei Sh., Li J., Gao C., Wang R., Ali S., Xiao X., Yu J., Al-Hashimi A., Brestic M. Characterization of the volatile profile from six different varieties of Chinese chives by HS-SPME/GC-MS coupled with E. NOSE // J. King Saud Univ. – Sci. 2022. V. 34. № 4. Article 101971.
42. Li Y., Zang X., Li Y., Zhang S., Wang C., Wang Z. Selective extraction of fungicides from fruit samples with defective UiO-66 as solid-phase microextraction fiber coating // Microchem. J. 2023. V. 190. Article 108608.
43. Hashemi B., Zohrabi P., Shamsipur M. Recent developments and applications of different sorbents for SPE and SPME from biological samples // Talanta. 2018. V. 187. P. 337.
44. Delińska K., Rakowska P.W., Kloskowski A. Porous material-based sorbent coatings in solid-phase microextraction technique: Recent trends and future perspectives // Trends Anal. Chem. 2021. V. 143. Article 116386.
45. Paiva A.C., Crucello J., Porto N. de Aguiar, Hantao L. Fundamentals of and recent advances in sorbent-based headspace extractions // Trends Anal. Chem. 2021. V. 139. Article 116252.
46. Musteata F.M., Musteata F.M., Sandoval M., Ruiz-Macedo J.C., Harrison K., McKenna D., Millington W. Evaluation of in vivo solid phase microextraction for minimally invasive analysis of nonvolatile phytochemicals in Amazonian plants // Anal. Chim. Acta. 2016. V. 933. P. 124.
47. Luo Z., Chen G., Li X., Wang L., Shu H., Cui X., Chang C., Zeng A., Fu Q. Molecularly imprinted polymer solid-phase microextraction coupled with ultra high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry for rapid analysis of pyrrolizidine alkaloids in herbal medicine // J. Sep. Sci. 2019. V. 42. № 21. P. 3352.
48. Zhang S., Zhang X., Chen X., Hu S., Bai X. Deep eutectic solvent-based hollow fiber liquid-phase microextraction for quantification of Q-markers of cinnamic acid derivatives in traditional Chinese medicines and research of their plasma protein binding rates // Microchem. J. 2020. V. 155. Article 104696.
49. Peng L.-Q., Li Q., Chang Y.X., An M., Yang R., Tan Z., Hao J., Cao J., Xu J.J., Hu S.S. Determination of natural phenols in olive fruits by chitosan assisted matrix solid-phase dispersion microextraction and ultrahigh performance liquid chromatography with quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry // J. Chromatogr. A. 2016. V. 1456. P. 68.
50. Majidi S.M., Hadjmohammadi M.R. Development of magnetic dispersive micro-solid phase extraction based on magnetic agarose nanoparticles and deep eutectic solvents for the isolation and pre-concentration of three flavonoids in edible natural samples // Talanta. 2021. V. 222. Article 121649.
51. Li M.-J., Li N., Xu G., Zhao L.X., Chen X., Zhao Y., Zhao R.S. Magnetic boron nitride nanosheets as a novel magnetic solid-phase extraction adsorbent for the determination of plant growth regulators in tomatoes // Food Chem. 2021. V. 348. Article 129103.
52. Zhang Q., Mao X., Yuan C., Zhao J., Hu H., Yan A., Wang Y., Xiao W. A simplified dispersive solid-phase extraction using a shaped zirconium-based metal-organic framework: Constructing a novel, facile and efficient method for detecting plant growth regulators in citrus fruits // Food Chem. 2023. V. 405. Article 134862.
53. Wang X.-Y., Xiong C.-F., Ye T.-T., Ding J., Feng Y.-Q. Online polymer monolith microextraction with in-situ derivatization for sensitive detection of endogenous brassinosteroids by LC-MS // Microchem. J. 2020. V. 158. Article 105061.
54. Mousavi L., Tamiji Z., Khoshayand M. R. // Talanta. 2018. V. 190. P. 335.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.08.002>
55. Diuzheva A., Locatelli M., Tartaglia A., Goga M., Ferrone V., Carlucci G., Andruch V. Application of liquid-phase microextraction to the analysis of plant and herbal samples // Phytochem. Anal. 2020. V. 31. № 6. P. 687.
56. Ho T.D., Zhang C., Hantao L.W., Anderson J.L. Ionic Liquids in Analytical Chemistry: Fundamentals, Advances, and Perspectives // Anal. Chem. 2014. V. 86. № 1. P. 262.
57. Passos H., Freire M.G., Coutinho J.A.P. Ionic liquid solutions as extractive solvents for value-added compounds from biomass // Green Chem. 2014. V. 16. № 12. P. 4786.

58. Ventura S.P.M., E Silva F.A., Quental M.V., Mondal D., Freire M.G., Coutinho J.A.P. Ionic-Liquid-Mediated Extraction and Separation Processes for Bioactive Compounds: Past, Present, and Future Trends // Chem. Rev. 2017. V. 117. № 10. P. 6984.
59. Amini T., Hashemi P. Preconcentration and GC-MS determination of caffeine in tea and coffee using homogeneous liquid-liquid microextraction based on solvents volume ratio alteration // J. Chromatogr. B. 2018. V. 1092. P. 252.
60. Shalash M., Makahleh A., Salhimi S.M., Saad B. Vortex-assisted liquid-liquid-liquid microextraction followed by high performance liquid chromatography for the simultaneous determination of fourteen phenolic acids in honey, iced tea and canned coffee drinks // Talanta. 2017. V. 174. P. 428.
61. Mocan A., Diuzheva A., Carradori S., Andruch V., Mas-safra C., Moldovan C., Sisea C., Petzer J.P., Petzer A., Zara S., Marconi G.D., Zengin G., Crişan G., Locatelli M. Development of novel techniques to extract phenolic compounds from Romanian cultivars of Prunus domestica L. and their biological properties // Food Chem. Toxicol. 2018. V. 119. P. 189.
62. Diuzheva A., Carradori S., Andruch V., Locatelli M., De Luca E., Tiecco M., Germani R., Menghini L., Nocentini A., Gratteri P., Campestre C. Use of Innovative (Micro)Extraction Techniques to Characterise Harp-agophytum procumbens Root and its Commercial Food Supplements // Phytochem. Anal. 2018. V. 29. № 3. P. 233.
63. Ramirez D.A., Locatelli D.A., Torres-Palazzolo C.A., Altamirano J.C., Camargo A.B. Development of garlic bioactive compounds analytical methodology based on liquid phase microextraction using response surface design. Implications for dual analysis: Cooked and biological fluids samples // Food Chem. 2017. V. 215. P. 493.
64. Ramirez D.A., Altamirano J.C., Camargo A.B. Multi-phytochemical determination of polar and non-polar garlic bioactive compounds in different food and nutraceutical preparations // Food Chem. 2021. V. 337. P. 127648.
65. Sun J., Zhao X.E., Dang J., Sun X., Zheng L., You J., Wang X. Rapid and sensitive determination of phytosterols in functional foods and medicinal herbs by using UHPLC-MS/MS with microwave-assisted derivatization combined with dual ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction // J. Sep. Sci. 2017. V. 40. № 3. P. 725.
66. Ferrone V., Genovese S., Carlucci M., Tiecco M., Germani R., Prezioso F., Epifano F., Carlucci G., Taddeo V.A. A green deep eutectic solvent dispersive liquid-liquid micro-extraction (DES-DLLME) for the UHPLC-PDA determination of oxyprenylated phenylpropanoids in olive, soy, peanuts, corn, and sunflower oil // Food Chem. 2018. V. 245. P. 578.
67. Mastellone G., Marengo A., Sgorbini B., Rubiolo P., Cagliero C. Development of a dispersive solid-liquid microextraction method using natural eutectic solvents for a greener extraction of phytochemicals from fiber-type Cannabis sp // Ind. Crops Prod. 2022. V. 187. P. 115476.
68. Liu W., Zong B., Bi Y. Ultrasonic-Assisted Liquid-Liquid Microextraction Based on Natural Deep Eutectic Solvent for the HPLC-UV Determination of Tert-Butylhydroquinone from Soybean Oils // Food Anal. Methods. 2018. V. 11. № 6. P. 1797.
69. Jahromi Z., Mostafavi A., Shamspur T., Mohamadim M. Magnetic ionic liquid assisted single-drop microextraction of ascorbic acid before its voltammetric determination // J. Sep. Sci. 2017. V. 40. № 20. P. 4041.
70. Nia N.N., Hadjmohammadi M.R. Amino acids-based hydrophobic natural deep eutectic solvents as a green acceptor phase in two-phase hollow fiber-liquid microextraction for the determination of caffeic acid in coffee, green tea, and tomato samples // Microchem. J. 2021. V. 164. Article 106021.
71. Armenta, S., Esteve-Turillas, F.A. Garrigues S., de la Guardia M. Smart materials for sample preparation in bioanalysis: A green overview // Sustain Chem. Pharm. 2021. V. 21. Article 100411.
72. Diuzheva A., Locatelli M., Tartaglia A., Goga M., Ferrone V., Carlucci G., Andruch V. Application of liquid-phase microextraction to the analysis of plant and herbal samples // Phytochem. Anal. 2020. V. 31. № 6. P. 687.
73. Casado N., Morante-Zarcero S., Pérez-Quintanilla D., Câmara J.S., Sierra I. Two novel strategies in food sample preparation for the analysis of dietary polyphenols: Micro-extraction techniques and new silica-based sorbent materials // Trends Food Sci. Technol. 2020. V. 98. P. 167.
74. Barker S.A. Matrix solid phase dispersion (MSPD) // J. Biochem. Biophys. Methods. 2007. V. 70. № 2. P. 151.
75. Wu J., Xiao D., Zhao H., He H., Peng J., Wang C., Zhang C., He J. A nanocomposite consisting of graphene oxide and Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for the extraction of flavonoids from tea, wine and urine samples // Microchim. Acta. 2015. V. 182. № 13–14. P. 2299.
76. Speltini A., Scalabrini A., Maraschi F., Sturini M., Profumo A. Newest applications of molecularly imprinted polymers for extraction of contaminants from environmental and food matrices: A review // Anal. Chim. Acta. 2017. V. 974. P. 1.
77. Sierra I., Morante-Zarcero S. New advances in food sample preparation with nanomaterials for organic contaminants analysis by liquid chromatography / Nanomaterials in Chromatography. Elsevier, 2018. P. 118.
78. Augusto F., Carasek E., Silva R.G., Rivellino S.R., Batista A.D., Martendal E. New sorbents for extraction and microextraction techniques // J. Chromatogr. A. 2010. V. 1217. № 16. P. 2533.
79. Filippou O., Bitas D., Samanidou V. Green approaches in sample preparation of bioanalytical samples prior to chromatographic analysis // J. Chromatogr. B. 2017. V. 1043. P. 44.

80. Soltani R., Shahvar A., Dinari M., Saraji M. Environmentally-friendly and ultrasonic-assisted preparation of two-dimensional ultrathin Ni/Co-NO₃ layered double hydroxide nanosheet for micro solid-phase extraction of phenolic acids from fruit juices // *Ultrason. Sonochem.* 2018. V. 40. P. 395.
81. Cao W., Ye L.H., Cao J., Xu J.J., Peng L.Q., Zhu Q.Y., Zhang Q.Y., Hu S.S. Quantitative analysis of flavanones from citrus fruits by using mesoporous molecular sieve-based miniaturized solid phase extraction coupled to ultrahigh-performance liquid chromatography and quadrupole time-of-flight mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* 2015. V. 1406. P. 68.
82. Peng L.-Q., Cao J. Modern microextraction techniques for natural products // *Electrophoresis.* 2020. V. 42. P. 219.
83. Ding M., Bai Y., Li J., Yang X., Wang H., Gao X., Chang Y.-X. A diol-based-matrix solid-phase dispersion method for the simultaneous extraction and determination of 13 compounds from *Angelicae Pubescentis Radix* by ultra high-performance liquid chromatography // *Front. Pharmacol.* 2019. V. 10.
84. Hao Y., Gao R., Liu D., He G., Tang Y., Guo Z. Selective extraction and determination of chlorogenic acid in fruit juices using hydrophilic magnetic imprinted nanoparticles // *Food Chem.* 2016. V. 200. P. 215.
85. Alipanahpour Dil E., Asfaram A., Goudarzi A., Zabihi E., Javadian H. Biocompatible chitosan-zinc oxide nanocomposite based dispersive micro-solid phase extraction coupled with HPLC-UV for the determination of rosmarinic acid in the extracts of medical plants and water sample // *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. V. 154. P. 528.
86. Hao Y., Gao R., Liu D., Tang Y., Guo Z. Selective extraction of gallic acid in pomegranate rind using surface imprinting polymers over magnetic carbon nanotubes // *Anal. Bioanal. Chem.* 2015. V. 407. № 25. P. 7681.
87. Pilipczuk T., Kusznierevicz B., Chmiel T., Przychodzeń W., Bartoszek A. Simultaneous determination of individual isothiocyanates in plant samples by HPLC-DAD-MS following SPE and derivatization with N-acetyl-L-cysteine // *Food Chem.* 2017. V. 214. P. 587.
88. Casado N., Morante-Zarcelero S., Pérez-Quintanilla D., Câmara J.S., Sierra I. Dispersive solid-phase extraction of polyphenols from juice and smoothie samples using hybrid mesostructured silica followed by ultra-high-performance liquid chromatography-ion-trap tandem mass spectrometry // *J. Agric. Food Chem.* 2019. V. 67. № 3. P. 955.
89. Mao X., Xiao W., Wan Y., Li Z., Luo D., Yang H. Dispersive solid-phase extraction using microporous metal-organic framework UiO-66: Improving the matrix compounds removal for assaying pesticide residues in organic and conventional vegetables // *Food Chem.* 2021. V. 345. P. Article 128807.
90. Majidi S.M., Hadjmohammadi M.R. Development of magnetic dispersive micro-solid phase extraction based on magnetic agarose nanoparticles and deep eutectic solvents for the isolation and pre-concentration of three flavonoids in edible natural samples // *Talanta.* 2021. V. 222. Article 121649.
91. Ivanović M., Krajnc P., Mlinarič A., Razboršek M.I. Natural deep eutectic solvent-based matrix solid phase dispersion (MSPD) extraction for determination of bioactive compounds from sandy everlasting (*Helichrysum arenarium* L.): A case of stability study // *Plants.* 2022. V. 11. № 24. P. 3468.
92. Jafari Z., Hadjmohammadi M.R. Development of magnetic solid phase extraction based on magnetic chitosan-graphene oxide nanoparticles and deep eutectic solvents for the determination of flavonoids by high performance liquid chromatography // *Anal. Methods.* 2021. V. 13. № 48. P. 5821.
93. Xu J.J., Yang R., Ye L.H., Cao J., Cao W., Hu S.S., Peng L.Q. Application of ionic liquids for elution of bioactive flavonoid glycosides from lime fruit by miniaturized matrix solid-phase dispersion // *Food Chem.* 2016. V. 204. P. 167.
94. Du K.Z., Chen Y., Li J., Tang G., Tian F., He J., Chang Y. Quantification of eight active ingredients in crude and processed radix *Polygoni multiflori* applying miniaturized matrix solid-phase dispersion microextraction followed by UHPLC // *J. Sep. Sci.* 2018. V. 41. № 17. P. 3486.
95. 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.
96. Perestrelo R., Silva P., Porto-Figueira P., Pereira J.A.M., Silva C., Medina S., Câmara J.S. QuEChERS – Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends // *Anal. Chim. Acta.* 2019. V. 1070. P. 1.
97. Bhattacharyya S., Poi R., Sen M.B., Hazra D.K., Ghosh R., Mandal S., Karmakar R. Establishment of modified QuEChERS-GC-MS-LC-MS/MS method for simultaneous screening of multi-class multi-pesticide residues in betelvine and consumer risk assessment // *Microchem. J.* 2022. V. 179. Article 107444.
98. Álvarez-Ruiz R., Picó Y., Sadutto D., Campo J. Development of multi-residue extraction procedures using QuEChERS and liquid chromatography tandem mass spectrometry for the determination of different types of organic pollutants in mussel // *Anal. Bioanal. Chem.* 2021. V. 413. № 15. P. 4063.
99. McManus M.M., Oates R.P., Subbiah S., Klein D., Cañas-Carrell J.E. Matrix-matched standards in the liquid chromatography-mass-spectrometry determination of neonicotinoids in soil and sediment // *J. Chromatogr. A.* 2019. V. 1602. P. 246.
100. Xiu-Ping Z., Lin M., Lan-Qi H., Jian-Bo C., Li Z. The optimization and establishment of QuEChERS-UP-LC-MS/MS method for simultaneously detecting various kinds of pesticides residues in fruits and vegetables // *J. Chromatogr. B.* 2017. V. 1060. P. 281.
101. Casado N., Perestrelo R., Silva C.L., Sierra I., Câmara J.S. An improved and miniaturized analytical strategy based on μ -QuEChERS for isolation of polyphenols. A powerful approach for quality control of baby foods // *Microchem. J.* 2018. V. 139. P. 110.
102. Izcara S., Perestrelo R., Morante-Zarcelero S., Câmara J.S., Sierra I. High throughput analytical approach based on μ QuEChERS combined with UHPLC-PDA for analysis of bioactive secondary metabolites in edible flowers // *Food Chem.* 2022. V. 393. Article 133371.

103. *Marques S.P.D., Owen R.W., da Silva A.M.A., Alves Neto M.L., Trevisan M.T.S.* QuEChERS extraction for quantitation of bitter acids and xanthohumol in hops by HPLC-UV // *Food Chem.* 2022. V. 388. Article 132964.
104. *Rodrigues C.A., Zomer A.P.L., Rotta E.M., Visentainer J.V., Maldaner L.* A μ -QuEChERS method combined with UHPLC-MS/MS for the analysis of phenolic compounds in red pepper varieties // *J. Food Compos. Anal.* 2022. V. 112. Article 104647.
105. *Wang Z., Wang X., Wang M., Li Z., Zhang X., Zhou L., Sun H., Yang M., Lou Z., Chen Z., Luo F.* Establishment of a QuEChERS-UPLC-MS/MS method for simultaneously detecting tolfenpyrad and its metabolites in tea // *Agronomy.* 2022. V. 12. № 10. P. 2324.
106. *Izcara S., Casado N., Morante-Zarcero S., Pérez-Quintanilla D., Sierra I.* Miniaturized and modified QuEChERS method with mesostructured silica as clean-up sorbent for pyrrolizidine alkaloids determination in aromatic herbs // *Food Chem.* 2022. V. 380. Article 132189.

АТОМНО-СПЕКТРАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ В ИССЛЕДОВАНИИ СВОЙСТВ И ПОВЕДЕНИЯ НАНОРАЗМЕРНЫХ МАГНИТНЫХ МАТЕРИАЛОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

© 2023 г. И. В. Кубракова^а, *, О. Н. Гребнева-Балюк^а,
Д. В. Пряжников^а, М. С. Киселева^а, О. О. Ефанова^а

^аИнститут геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского
Российской академии наук
ул. Косыгина, 19, Москва, 119991 Россия

*e-mail: kubrakova@geokhi.ru

Поступила в редакцию 03.04.2023 г.

После доработки 17.05.2023 г.

Принята к публикации 17.05.2023 г.

Кратко рассмотрены способы получения и некоторые виды магнитных наночастиц (МНЧ), перспективных для биомедицинских исследований. Показана связь строения и свойств частиц с областями их применения в медицинской диагностике и биоанализе. Особое внимание уделено МНЧ, содержащим благородные металлы в качестве биомаркеров или действующего вещества. Рассмотрены биомедицинские задачи, реализуемые с помощью МНЧ, и аналитические пути их решения. Обобщены данные о применении прямых и комбинированных атомно-спектральных (ЭТААС, АЭС/МС-ИСП) методов в биомедицинских исследованиях. Рассмотрены экспериментальные подходы к изучению поведения и превращений МНЧ *in vitro* и *in vivo*. Подчеркнута ключевая роль пробоподготовки в экспериментальном моделировании поведения НЧ в биологических средах. Отмечены особенности подготовки при определении растворенных и наноразмерных форм в биообъектах. Оценены перспективы комплексных исследований поведения МНЧ в сложных биологических системах.

Ключевые слова: наноразмерные магнитные материалы, биомедицинские исследования, электро-термическая атомно-абсорбционная спектрометрия (ЭТААС), масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой (МС-ИСП) в режимах высокого разрешения, детектирования одиночных частиц (SP-ICP-MS) или анализа отдельных клеток (SC-ICP-MS).

DOI: 10.31857/S0044450223100122, EDN: UYOXMY

Наноразмерные материалы весьма перспективны для использования в медицине и являются объектом активных биомедицинских исследований [1, 2]. Особое внимание привлекают многофункциональные частицы с модифицированной поверхностью, сочетающие в себе ряд диагностических и терапевтических заранее заданных свойств. Так, наночастицы (НЧ) различной природы находят широкое применение в современной медицинской практике в качестве носителя лекарственных средств, обеспечивая так называемую направленную доставку лекарств (controlled drug delivery).

Необходимость направленной доставки обусловлена недостатками многих лекарственных препаратов, связанных с их негативным воздействием на ткани. Локализация поступления препарата уменьшает объем его распределения, токсичность, в ряде случаев обеспечивает контролируемое высвобождение и снижает влияние на организм в целом. Направленная доставка может

осуществляться по различным механизмам и быть активной или пассивной; отдельным способом является магнитоуправляемая доставка, основанная на перемещении модифицированных магнитных носителей под действием магнитного поля [3].

Особый интерес представляют лекарственные препараты, закрепленные на химически модифицированных нанодисперсных носителях и способные изменять структуру под воздействием изменений параметров окружающей среды (рН, температуры, окислительно-восстановительных условий [4, 5]), характерных для определенного патологического процесса. При этом НЧ участвует не только в доставке, но и в высвобождении лекарственного средства.

К настоящему времени разработаны наноразмерные носители различной природы: биогенные, полимерные, органические и неорганические. В рамках данного обзора основные свойства и возможности наноразмерных материалов для биоме-

дицины и диагностики будут рассмотрены на примере частиц, обладающих магнитными свойствами (МНЧ) и вследствие этого управляемых воздействием магнитного поля. Обычно они представляют собой наночастицы (или их агрегаты) магнетита с модифицированной поверхностью, на которой закреплены молекулы биологически активных веществ, или везикулы с инкапсулированными модифицированными частицами магнетита [6].

Несмотря на то, что препараты на наноносителях обладают огромным потенциалом, их введение в организм подразумевает соблюдение целого ряда требований: носители должны быть нетоксичными и биосовместимыми, иметь определенную структуру и размеры, чтобы проникать сквозь клеточные мембраны, обладать определенной динамикой сорбции/десорбции и доставлять лекарственные препараты без потери их фармакологических свойств.

Последствия, связанные с попаданием в организм компонентов фармакологической системы, в частности носителей, должны быть тщательно изучены. В соответствии с этим исследование поведения НЧ в биологических средах направлено главным образом на детальную характеристику преобразований наноразмерных частиц, происходящих в естественных условиях (*in vivo*) [7]. Несмотря на актуальность этой задачи, зачастую определяющей саму возможность применения НЧ в биомедицинских исследованиях, ее решение находится в стадии разработки, что является следствием многообразия физико-химических свойств наноматериалов, а также различного состояния, происхождения и состава определяемых веществ, являющихся компонентами биологических образцов, подлежащих изучению [8].

Сложность биологических систем порождает необходимость применения для исследования свойств и поведения в них НЧ наиболее совершенных инструментальных аналитических методов, к числу которых относятся и различные виды атомной спектроскопии – атомно-абсорбционная спектроскопия с электротермической атомизацией (ЭТААС), атомно-эмиссионная спектроскопия с индуктивно связанной плазмой (АЭС-ИСП), различные варианты масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (МС-ИСП), включая режимы высокого разрешения, мониторинга одиночных частиц (single particle inductively coupled plasma mass spectrometry, SP-ICP-MS) или анализа отдельных клеток (single cell inductively coupled plasma mass spectrometry, SC-ICP-MS)) [9]. Однако и для них тем не менее остается потребность в упрощении состава анализируемого материала перед инструментальным определением, что достигается путем мягкой деструкции органической матрицы или применением высокоэффективных способов разделения. Предварительная подготовка остав-

ся актуальной и при определении растворенных и наноразмерных форм в биообъектах с целью оценки степени изменения частиц при изменении свойств среды.

В настоящем обзоре проанализированы данные о применении прямых и комбинированных методов для изучения состава синтетических наноразмерных частиц, входящих в состав лекарственных препаратов, и их превращений в модельных и реальных биологических средах. Рассмотрены способы подготовки таких систем к анализу, в частности, особенности подготовки при определении растворенных и наноразмерных форм в биообъектах. Оценены перспективы комплексных исследований поведения НЧ в сложных биологических системах.

ВИДЫ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Наночастицы оксида железа являются наиболее распространенными природными магнитными наноматериалами *in vivo* [10]. Они же являются основой искусственно получаемых МНЧ, некоторые из которых уже разрешены к клиническому применению [11]. Сочетание широких возможностей направленного модифицирования развитой поверхности и магнитных свойств делают МНЧ эффективным материалом для решения задач, включающих магнитоуправляемую доставку лекарств, часто в сочетании с МРТ-визуализацией или гипертермией. Существуют многочисленные варианты получения НЧ магнитного носителя (магнетита Fe_3O_4 и др.): соосаждение, синтез в мицеллах, гидротермальный синтез, термическое разложение металлорганических соединений, микроволновый синтез. Данные методы достаточно давно и полно изучены применительно к синтезу НЧ; подробнее указанные способы, достоинства и недостатки каждого из них рассмотрены в обзорах [12, 13]. Функционализацию поверхности носителя можно осуществить путем ковалентного “пришивания” или силанизации, а также путем нековалентной адсорбции поверхностно-активных веществ (ПАВ) на поверхности оксида [14]. Цели модификации поверхности – поддержание коллоидной стабильности ионов и обеспечение их биосовместимости, устойчивости к среде крови человека, нагрузочной способности, повышенного поглощения клетками, а также способности к контролируемому высвобождению лекарственного средства. На поверхности МНЧ могут присутствовать как модифицирующие оболочки из различных материалов (золото, силикагель, ПАВ, органические соединения), так и разнообразные функциональные группы (лиганды, пептиды, радиоактивные метки, антитела), способные обеспечить специфическое взаимодействие (связывание) с целевыми объек-

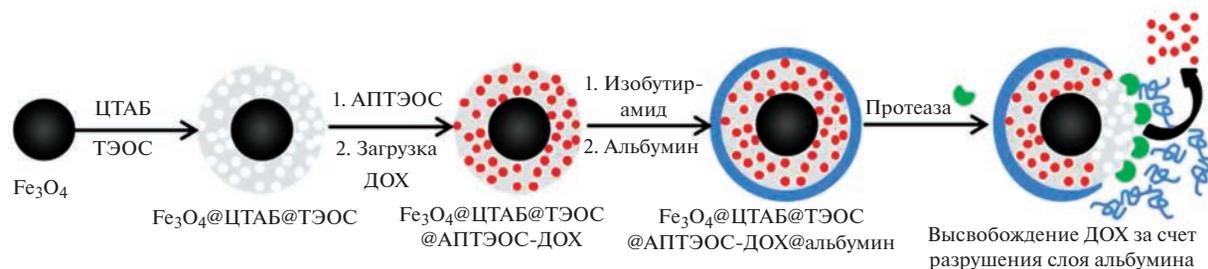


Рис. 1. Получение магнитных наночастиц для доставки доксорубина и высвобождение препарата при разрушении защитного поверхностного слоя под действием фермента [28]. ЦТАБ – бромид цетилтриметиламмония, ТЭОС – тетраэтоксисилан, АПТЭОС – 3-аминопропилтриэтоксисилан, ДОХ – доксорубин.

тами [15]. Носитель удобно синтезировать в условиях микроволнового нагрева; таким же образом в наших работах проводилось модифицирование поверхности [16, 17]. Пути синтеза и методы исследования магнитных материалов со структурой ядро–оболочка, ядро–многослойная оболочка, магнитных везикул описаны, в частности, в работе [14]. Некоторые интересные примеры МНЧ для биомедицинских приложений, полученных и исследованных в последние годы, приведены ниже.

Наиболее просты структуры *ядро–оболочка*. Обычно оболочка представляет собой слой органических молекул или полимеров на поверхности МНЧ [18] и служит защитным барьером для магнитного носителя. Она может содержать компоненты, необходимые для визуализации НЧ и, кроме этого, может быть использована для загрузки и высвобождения лекарственных средств, например, широко используемых платиносодержащих препаратов [19]. Лекарственное средство может связываться с НЧ ковалентно либо нековалентно. В обоих случаях высвобождение лекарственного средства обычно достигается за счет изменения pH [20, 21]. Такие структуры характеризуются низкой емкостью загрузки лекарственного средства (drug loading capacity, DLC), что связано с потерями через покрытие НЧ. Более предпочтительно ковалентное связывание лекарств с НЧ, обеспечивающее управляемое разрушение поверхностного слоя [22, 23] и контролируемое высвобождение препарата.

Неорганические покрытия МНЧ, например мезопористый диоксид кремния, обеспечивают более высокий уровень загрузки лекарственным средством по сравнению с органическими – до 30–48% [24–26]. Чтобы избежать самопроизвольного высвобождения препарата, МНЧ защищают дополнительным внешним органическим или полимерным слоем. В зависимости от триггера (которым могут быть pH, окислительно-восстановительные процессы, температура) для высвобождения препарата могут быть использованы различные пути. Например, для обеспечения чувствительно-

го к pH высвобождения доксорубина, химиотерапевтического средства, срабатывающего при снижении pH с 7.4 до 5.6, в работе [24] использован полимерный гидрогель полиакриловой кислоты, привитый на мезопористый слой силикагеля. В работе [27] для инкапсуляции доксорубина в НЧ и высвобождения его при плавлении липидной фазы выше 40°C использован термочувствительный липидный слой.

Среди биологических триггеров особый интерес представляет высвобождение лекарственного средства, которое обеспечивается действием фермента на биодеградацию защитного слоя на поверхности нанокомпозита. В работе [28] предложена конструкция биоразлагаемых материалов на основе МНЧ размером 30 нм, покрытых мезопористым слоем силикагеля. Поры этого слоя размером 3 нм были заполнены доксорубином (35 мас. %). Для инкапсуляции действующего вещества было нанесено покрытие из альбумина¹, связанного изобутирамидом (рис. 1). С помощью трехмерной клеточной модели и конфокальной визуализации показано, что эта белковая наноструктура разрушается под действием протеаз, высвобождая доксорубин. Предложенная структура особенно интересна для разработки защитных слоев, использующих ферментативное разрушение в качестве триггера для высвобождения лекарств, и перспективна для высвобождения противоопухолевых препаратов и МРТ-диагностики.

Для получения *наноразмерных липидных везикул (липосом, керасом и магнитосом)* используют свойство молекул фосфолипидов за счет своих поверхностно-активных свойств самопроизвольно образовывать в водной среде бислои, которые, в свою очередь, склонны к дальнейшему образованию полых пузырьковых структур (липосом). Это обеспечивает эффективное взаимодействие наноносителя с клеточной мембраной. Лекарствен-

¹ Альбумин используется для решения двух задач: обеспечения (1) биосовместимости и снижения токсичности нанопрепаратов; (2) высвобождения нагруженного лекарственного средства под действием ферментов, разрушающих защитный белковый слой.

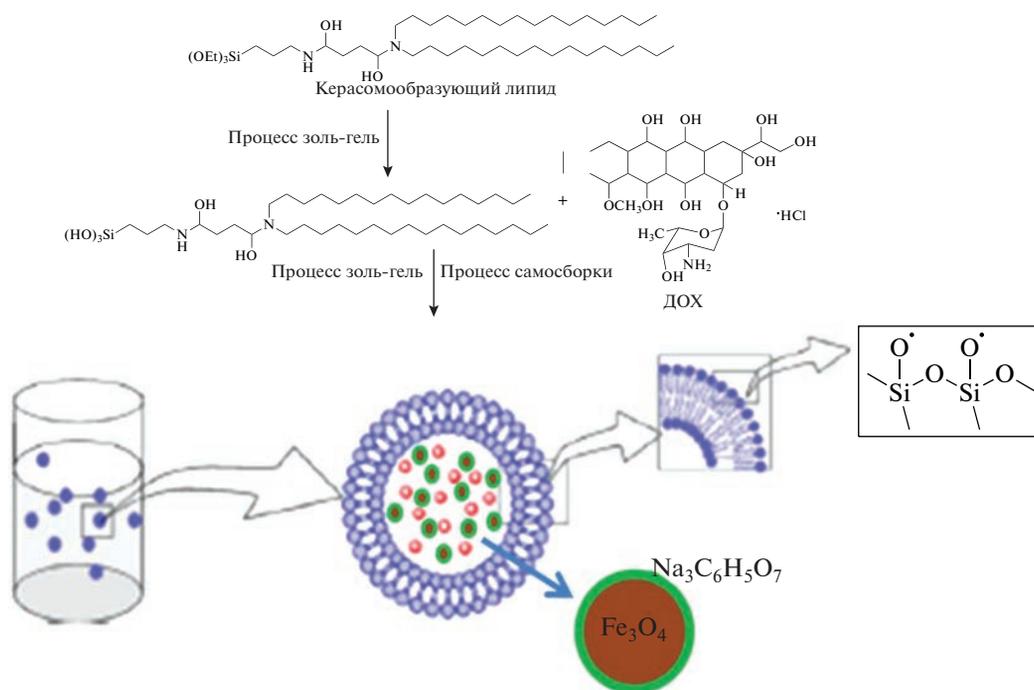


Рис. 2. Строение магнитосом, нагруженных доксорубицином [30].

ное средство может располагаться как в ядре липосомы, если оно водорастворимое, так и в ее оболочке, если лекарство жирорастворимое. Гораздо более высокую стабильность, чем у обычных липосом [29], демонстрируют керасомы. Магнитосомы [30–32] (рис. 2) – липосомы с дополнительно встроенными в структуру МНЧ – применяются не только в качестве магнитно-управляемого доставщика лекарств [31], но и позволяют контролировать свое распределение *in vivo* при помощи средств магнитно-резонансной визуализации. В работе [32] показано, что высокая устойчивость нагруженных доксорубицином магнитных керасом сохраняется в течение длительного времени.

Своеобразной оболочкой для МНЧ могут служить и другие объемные структуры, содержащие полости, размер которых достаточен для размещения МНЧ. Например, разработана [33] многофункциональная наноплатформа для мультимодальной визуализации и радиотерапии на основе наночастиц золота, стабилизированных поли(амидоамином) – дендримером 5-го порядка ветвления (G5), в которые добавлены НЧ оксида железа. Образующиеся стабилизированные дендримером МНЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ имели диаметр около 100 нм, демонстрировали хорошую коллоидную стабильность, цитосовместимость и способность поглощать в ближней ИК-области.

Предложены и другие интересные структуры. Так, широкими потенциальными возможностями обладают многофункциональные материалы, описанные, в частности, в работе [34]: гантелеоб-

разные (dumbbell) МНЧ $\text{Au}-\text{Fe}_3\text{O}_4$ с высоким значением магнитного момента, обеспечивающие визуализацию, характеризацию и определение на клеточном и субклеточном уровнях, а также полые МНЧ для доставки цисплатина и доксорубицина.

Следует отметить, что препараты, содержащие благородные металлы (Au, Ag, Pt, Pd) в виде инкорпорированных молекулярных форм, нанослоев на поверхности МНЧ или НЧ в их структуре, находят широкое применение в биомедицинских исследованиях [19, 34]: AuНЧ оптически активны и используются в оптической визуализации на основе светорассеяния, фотолюминисценции и гигантского комбинационного рассеяния (surface enhanced Raman scattering), а также поверхностного плазмонного резонанса в области 500–800 нм. Платина и палладий используются в основном в виде молекулярных форм.

Всесторонняя характеристика получаемых наноструктур – важнейшее условие последующего эффективного практического применения наноматериалов, поскольку их уникальные характеристики непосредственно зависят от структурных изменений на наноуровне, от конкретных размеров НЧ, степени их полидисперсности и морфологии (геометрии НЧ, размеров ядра и оболочек). В работах [8, 10, 35] детально рассмотрены преимущества и недостатки методов, применяемых для характеристики размеров, полидисперсности и геометрических характеристик ядра и оболочек НЧ.

БИМЕДИЦИНСКИЕ ЗАДАЧИ, РЕШАЕМЫЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ, И ИХ АНАЛИТИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ

Наиболее важным свойством МНЧ для биомедицинского применения является биосовместимость и способность к биологическому разложению, что позволяет транспортировать их по пути метаболизма железа [36]. Однако исследований, посвященных этой важнейшей проблеме, недостаточно, и взаимодействия в сыворотке крови человека из-за их сложности изучаются редко [37].

Ключевым вопросом при оценке клинической применимости препаратов является оценка их поведения в организме. В случае МНЧ как краткосрочные последствия применения (время циркуляции крови, биораспределение на суборганном и клеточном уровнях), так и долгосрочные (токсичность, скорость деградации частиц и выведения из организма) не вполне ясны. На эти факторы в экспериментах *in vivo* будет влиять, в частности, время циркуляции МНЧ в крови, которое может варьировать от нескольких минут до дней вследствие формирования на их поверхности *белковой короны*, которая неизбежно образуется за счет практически мгновенной сорбции белков из плазмы крови при контакте с НЧ [38]. Состав и структура белковой оболочки НЧ во многом зависит от физико-химических параметров НЧ: поверхности частицы, ее размера, формы, а также условий взаимодействия (источника белка, температуры, pH, длительности экспонирования) (рис. 3).

Классическое описание белковой короны подразумевает наличие “твердой” и “мягкой” корон [40]. Предполагают, что белки жесткой короны взаимодействуют непосредственно с поверхностью НЧ, а белки мягкой короны связываются с белками жесткой короны через слабые белок-белковые взаимодействия [41]; первоначальный состав короны формируется уже через 30 с инкубации НЧ [42]. Последствия таких нанобиовзаимодействий разнообразны и пока плохо предсказуемы. Они могут включать увеличение растворимости НЧ; иммунный ответ организма, направленный на устранение НЧ из кровотока; маскировку химических или биологических функций, специально придаваемых НЧ [38]. Например, установлено, что сорбция белков сыворотки крови на магнитных носителях (т.е. образование короны) препятствует агрегации МНЧ [43]. В детальных исследованиях, посвященных деградации МНЧ *in vitro* в имитируемых лизосомальных условиях [44, 45] и клеточных культурах [46, 47], установлены такие аспекты биотрансформации магнитных частиц, как высвобождение ионов металлов, участие комплекса метаболического белка железа в поглощении железа, постепенный переход частиц в форму ферритина и возможность синтеза частиц de

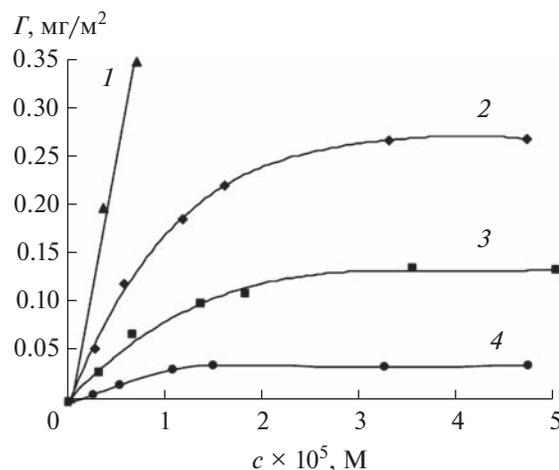


Рис. 3. Изотермы адсорбции человеческого сывороточного альбумина на кремнеземе, модифицированном: 1 — полиэтиленимин; 2 — немодифицированном; 3 — 3-аминопропилтриэтоксисиланом; 4 — метилтриэтоксисиланом [39].

ново из продуктов распада [48]. Вместе с тем комплексные исследования биотрансформации частиц железа в организмах проводятся редко [7]. В связи с этим выявление закономерностей формирования и последующего нанобиовзаимодействия белковой короны (с конкретным составом и структурой) для каждого типа НЧ является актуальной задачей.

Основными направлениями использования атомно- и масс-спектральных методов в биомедицинских исследованиях являются анализ биологических жидкостей и тканей, содержащих НЧ; определение растворенных и наноразмерных форм лекарственных препаратов в биообъектах (с разделением и без); определение размера НЧ, выявление характера распределения НЧ по размерам и его изменения при контакте с биологическими средами.

Общее содержание элементов, входящих в состав НЧ наноматериалов, чаще всего определяют методами МС-ИСП, реже — АЭС-ИСП или ЭТААС [49]; для решения этой задачи НЧ должны быть растворены в процессе минерализации матрицы или после ее щелочного или ферментативного расщепления.

Вследствие сложности биологических систем, содержащих НЧ, поведение частиц (например, скорость и степень деградации) в таких системах на начальных этапах часто исследуют в модельных экспериментах с использованием растворов, имитирующих биологические жидкости (белковые растворы, плазма или сыворотка крови), и на более простых биологических системах (инкубирование НЧ в присутствии клеточных культур, растительных и биологических матриц). При этом в любом случае необходима пробоподготовка,

направленная на отделение матрицы, а также разделение растворенных и наноразмерных форм. Отделение наночастиц может быть выполнено путем магнитной сепарации, ультрафильтрации, с использованием методов капиллярного электрофореза или хроматографии. Например, для изучения изменений МНЧ при инкубации с белками в имитируемых физиологических условиях были исследованы возможности капиллярного электрофореза (КЭ) в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (КЭ-МС/МС-ИСП) [50].

Спрос на быструю и эффективную методологию разделения и очистки продуктов, содержащих НЧ различной степени полидисперсности, в известной степени может быть удовлетворен за счет ВЭЖХ в ее эксклюзионном варианте. Однако этот вид разделения обычно обладает низкой эффективностью разделения по причине медленной диффузии НЧ в жидкой фазе; возможны потери пробы из-за сорбционных взаимодействий НЧ с неподвижной фазой. В качестве альтернативы на примере ряда НЧ (золота, серебра и палладия, поверхностно-модифицированных органическими соединениями) показана возможность применения для разделения НЧ обращенно-фазовой ВЭЖХ (ОФ-ВЭЖХ) [51, 52]. Этот вариант ВЭЖХ отличается быстрым установлением динамического равновесия на колонке и, соответственно, высокой эффективностью разделения. По нашим предварительным данным, полученным при ОФ-ВЭЖХ-разделении гидрофильных НЧ магнетита, модифицированных цитрат-ионом ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Cit}$), этот вариант ОФ-ВЭЖХ вполне работоспособен. В сочетании со спектрофотометрическим детектированием в видимом диапазоне (400–450 нм), характерном для указанных НЧ, были получены хроматограммы, имеющие несколько воспроизводимых пиков, соответствующих фракциям, одновременно содержащим растворенное железо и МНЧ (подтверждено АЭС-ИСП-анализом фракций на содержание общего железа).

По сравнению с классическими вариантами МС-ИСП и оптической эмиссионной спектрометрией с ИСП, имеющих ряд инструментальных ограничений, SP-ICPMS позволяет получить гораздо больше информации, в частности, данные о концентрации частиц в единице объема анализируемого раствора и о распределении частиц по размерам. На основании этих данных можно судить об изменениях, происходящих с НЧ при контакте с биологической средой: происходит ли растворение НЧ, их агрегирование, накопление и какова скорость этих изменений. Однако даже для SP-ICPMS магнитные (т.е. железосодержащие) НЧ наиболее сложны. Несмотря на то, что метод позволяет определить число НЧ и их размеры [53], предел обнаружения железа в виде частиц существенно ухудшается из-за присутствия в организме эндогенного железа [54], главным образом в виде ком-

плекса с ферритином и гемосидерином. Вследствие значимости метода SP-ICPMS для современных биомедицинских исследований мы рассмотрим его ниже более подробно.

К последним достижениям масс-спектрометрии относится также SC-ICPMS [55] – вариант, который позволяет анализировать отдельные клетки [56]. Отметим, что состав клетки намного сложнее, чем состав НЧ, содержание неорганических компонентов значительно ниже, они являются более крупными и хрупкими объектами, чем НЧ. Опубликованные к настоящему времени работы по SC-ICP-MS можно разделить на две основные категории [57]. Одна из них включает подходы, разработанные и используемые для мониторинга объектов, импортируемых в клетки (например, наночастиц, квантовых точек, металлсодержащих препаратов) [58, 59]. Ко второй, часто более сложной категории, относятся работы, посвященные определению эндогенных элементов в клетках [60–62]. В сложных экспериментах авторам работы [63] удалось выполнить определение в единичных клетках как эндогенных элементов (P, S, Fe, Cu и Zn), так и платины, введенной в виде цисплатина. Полученные результаты выявили различия в абсолютном количестве эндогенных элементов в клетках между различными типами клеток, что указывает на потенциал SC-ICP-MS в качестве инструмента “металлофингерпринтинга”.

Ключевым аспектом в развитии этого подхода является совершенствование способов введения клеточных суспензий в ИСП путем разработки специализированных систем ввода растворов (распылителей и распылительных камер), обеспечивающих целостность и максимальную эффективность транспортировки анализируемых клеток в источник.

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ В РЕЖИМЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЯ ОДИНОЧНЫХ ЧАСТИЦ В БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Один из наиболее перспективных современных методов описания и определения НЧ, SP-ICP-MS, был предложен как альтернатива микроскопическим исследованиям и вначале рассматривался как идеальный метод для атомной спектрометрии [64]. Основы и методология анализа в режиме SP-ICP-MS изложены в работах [65–68].

В качестве аналитов обычно выступают металлические НЧ на основе Au, Ag, Pt, НЧ, имеющие в своем составе оксиды – Fe_xO_y , CeO_2 , CuO , SiO_2 , TiO_2 , ZnO и “квантовые точки” (quantum dots) – CdSe , ZnS и т.д. [69].

Анализ в режиме SP-ICP-MS выглядит следующим образом. Наночастицы в виде разбавленного коллоидного раствора, проходя через систе-

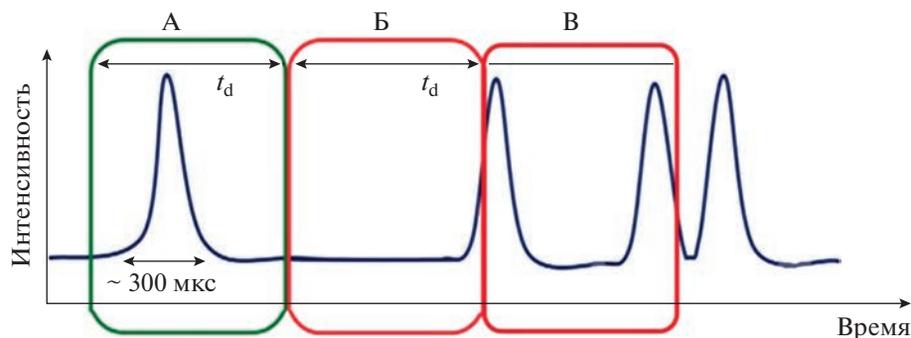


Рис. 4. Корреляция между t_d и событиями, связанными с генерацией сигналов наночастиц (НЧ). А: Идеальное совпадение – одна НЧ регистрируется в течение выбранного t_d . Полученная интенсивность сигнала может быть использована для вычисления характеристик этой НЧ. Б: Неполная регистрация – сигнал НЧ регистрируется в двух временных отрезках. В: Регистрация события с двумя или несколькими НЧ, что может приводить к завышению размера НЧ.

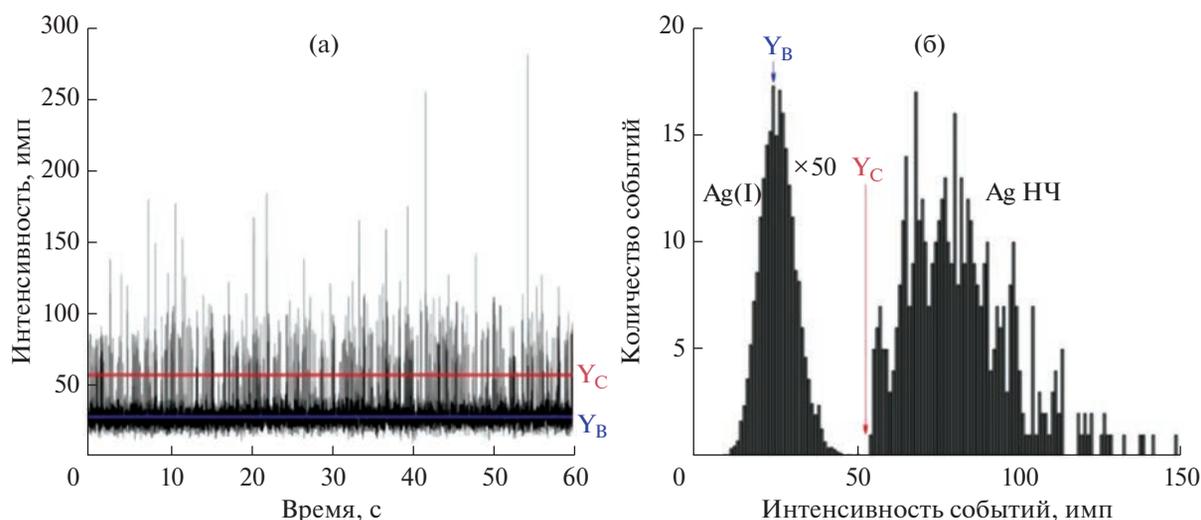


Рис. 5. (а): Временной скан в режиме МС-ИСП одиночных частиц коллоидного раствора, содержащего НЧ Ag (100 нм) и 1 нг/мл растворенного серебра. (б): Гистограмма, построенная с учетом данных временного скана (а). Y_b – среднее значение фонового сигнала, Y_c – интенсивность, выше которой сигналы приписываются наночастицам [70].

му вводу пробы масс-спектрометра, попадают в плазму, где ионизируются, генерируя ионное облако. Правильно выбранное время интегрирования одиночного сигнала (dwell time, t_d) (от нескольких сотен микросекунд до нескольких миллисекунд) позволяет детектировать НЧ как одно событие (рис. 4). Количество событий, подсчитанных за время сбора данных, напрямую связано с количеством НЧ, поступающих в плазму. Далее количество событий может быть пересчитано в количество НЧ в растворе. Интенсивность каждого события пропорциональна количеству ионов в каждой отдельной НЧ и, следовательно, массе элемента в НЧ. Массу каждой НЧ можно преобразовать в ее размер, если известны состав, форма и плотность НЧ.

В SP-ICP-MS сигналы, генерируемые НЧ, записываются как временные развертки (рис. 5),

которые состоят из “всплесков” (количество событий, связанных с НЧ), регистрируемых выше непрерывной базовой линии (фона). Полученные временные сканы можно обработать, построив зависимость количества событий от интенсивности событий (или количество событий за фиксированное время сбора данных). Полученные таким образом гистограммы позволяют выделить область, связанную с информацией о растворенной форме элемента-аналита, и область, связанную с информацией о НЧ (рис. 5).

В зависимости от выбранного t_d , события, связанные с НЧ, могут быть представлены в виде пиков, построенных с использованием одного (t_d в миллисекундном диапазоне 3–10 мс) или нескольких значений (t_d в микросекундном диапазоне 10–200 мкс) аналитических сигналов. Поскольку длительность события НЧ находится в

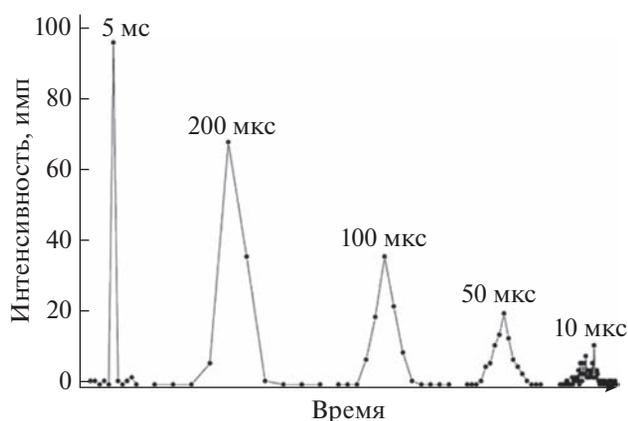


Рис. 6. Профили событий частиц, зарегистрированных в разное t_d для наночастиц золота 50 нм [72].

диапазоне 300–1000 мкс [71], сигналы, полученные при разных значениях t_d , будут отличаться друг от друга (рис. 6).

Как отмечалось выше, временные сканы могут быть обработаны путем построения гистограмм зависимости количества событий от интенсивностей событий (рис. 5). Для отделения фоновых событий и событий с НЧ используют критерии отбора, выбор которых влияет на предел определения размера НЧ (**ПрО размера НЧ**). Обычно используют критерий 3δ , основанный на стандартном отклонении базовой линии [68]. Показано [72], что появления ложных результатов позволяет избежать использование критерия 5δ . Все предложенные алгоритмы могут быть реализованы пользователями, экспортирующими необработанные данные в собственные программы и электронные таблицы.

В методе SP-ICP-MS выделяют ПрО размера НЧ (LOD_{size}), минимальную концентрацию НЧ ($c_{мин}$ НЧ или $LOD_{НЧ}$) и минимальную массу регистрируемой НЧ ($m_{мин}$ НЧ).

ПрО размера НЧ в SP-ICP-MS определяется элементарным составом, плотностью и формой НЧ и зависит от чувствительности спектрометра, а также выбранных условий измерений, особенно от t_d и от значений фона. ПрО размера НЧ, полученные для чистых водных коллоидных растворов, недостижимы для реальных образцов. Важную роль при нахождении ПрО размера НЧ играют изобарические и полиатомные влияния, которые обычно присутствуют в сложных матрицах; все возможные спектральные и неспектральные влияния должны быть выявлены, минимизированы и учтены. В качестве ориентира по ПрО размера НЧ, получаемым методом квадрупольной МС-ИСП, можно использовать теоретические расчеты для 40 различных синтезированных НЧ на фоне деионизованной воды [73]. В табл. 1 приведена информация о ПрО размера для наиболее хорошо изученных НЧ.

Минимальная концентрация $c_{мин}$ НЧ определяется минимальным количеством НЧ, которое достигает системы детектирования. Данное значение, как и число НЧ в 1 мл, рассчитывается по формуле (1):

$$c = \frac{D_{НЧ}}{\eta q D t_d}, \quad (1)$$

где $D_{НЧ}$ – общее количество событий, связанных с НЧ; D – общее количество событий за выбранный промежуток времени измерения; η – эффективность распыления; q – скорость подачи раствора, мл/с; t_d – время накопления сигнала, с.

Содержание НЧ в 1 мл зависит от эффективности транспортировки аэрозоля η (количество растворенной формы аналита или НЧ, которое достигает плазмы; формула (2)) и доли частиц в растворе с размером выше ПрО размера НЧ. Допускают, что максимальное число событий с НЧ в холостых растворах не должно превышать 10 НЧ за минуту анализа, а минимальное количество событий НЧ в анализируемых растворах должно

Таблица 1. Пределы определения размера некоторых наночастиц в зависимости от t_d^* [72, 74]

Элемент	Изотоп	Состав НЧ	ПрО размера НЧ, нм	
			$t_d = 5$ мс	$t_d = 100$ мкс
Ag	107	Ag	17.4	12.3
Au	197	Au	12.7	9.0
Pt	195	Pt	5.3	3.7
Si	29	SiO ₂	148.0	105.0
Ti	47	TiO ₂	41.4	29.3
Fe	56	Fe	36**	

* Получены на квадрупольном масс-спектрометре с ИСП. Эффективность транспортировки – 5%; общее время анализа – 60 с; фон – ультрачистая вода.

** Результаты получены на квадрупольном масс-спектрометре с ИСП, оснащенном реакционной ячейкой с водородом; $t_d = 3$ мс; общее время анализа – 60 с.

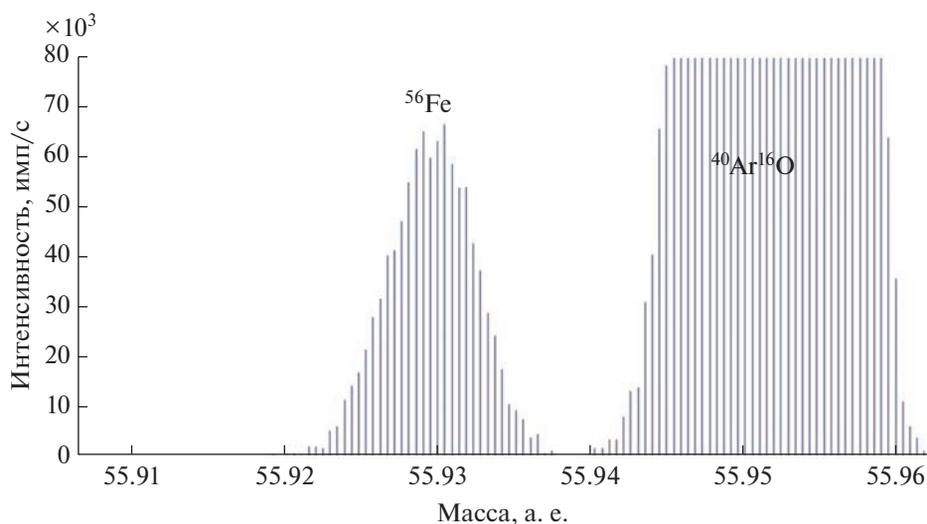


Рис. 7. Скан вблизи изотопа $^{56}\text{Fe}^+$ (“среднее разрешение”).

быть не менее 100 в минуту [75]. Обычно $S_{\text{мин}}$ НЧ имеет порядок 10^3 НЧ/мл [76, 77].

$$\eta = \frac{d S f_a \pi \rho}{6 (I_{\text{НЧ}} - I_{\text{ф}}) t_d q}, \quad (2)$$

где d – диаметр НЧ, нм; S – наклон градуировочного графика для растворенной (ионной) формы аналита, имп/мкг/мл; f_a – массовое распределение элемента-аналита в НЧ; ρ – плотность элемента-аналита; $I_{\text{НЧ}}$ – среднее значение сигнала НЧ, имп; $I_{\text{ф}}$ – фоновый сигнал; t_d – время накопления сигнала, с; q – скорость подачи раствора, мл/с.

Величина $m_{\text{мин}}$ НЧ зависит от размера частиц и чувствительности спектрометра [78]. Массу НЧ определяет плотность вещества и доля аналита в НЧ. $m_{\text{мин}}$ НЧ, как и масса НЧ, рассчитывается по формуле (3):

$$m = \rho f_a (\pi d^3 / 6), \quad (3)$$

где ρ – плотность вещества, из которого состоит НЧ; f_a – массовое распределение элемента-аналита в НЧ; d – диаметр НЧ, нм. При расчете массы делается допущение, что НЧ имеет сферическую форму.

Для режима МС-ИСП одиночных частиц характерны те же спектральные и матричные влияния, что и для обычного анализа методом МС-ИСП. Хорошо известны полиатомные влияния $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ на изотоп $^{56}\text{Fe}^+$ и $^{40}\text{Ar}^{16}\text{OH}^+$ на изотоп $^{57}\text{Fe}^+$. Минимизировать влияния аргона на изотоп $^{56}\text{Fe}^+$ при работе с МНЧ можно за счет использования реакционной ячейки с водородом [75, 79], с аммиаком [75], а также коллизионной ячейки, наполненной гелием, или за счет высокого разрешения масс-спектрометра, например магнитно-

секторного [80]. На рис. 5 представлен спектр изотопа ^{56}Fe и $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$, полученный нами на МС-ИСП-спектрометре Element XR (Finnigan Mat, Германия) в среднем разрешении. Видно, что пики $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ и $^{56}\text{Fe}^+$ хорошо разрешаются (рис. 7).

Для получения количественной информации о размере и концентрации НЧ используют стандартные образцы НЧ разных размеров, имеющие тот же элементный состав, ту же геометрию и плотность, что и целевая НЧ. Однако нехватка монодисперсных, хорошо охарактеризованных и стабильных стандартов НЧ ограничивает применимость этого подхода. Можно использовать “home made” НЧ при условии их тщательного описания другими методами анализа, в частности с привлечением различных вариантов электронной микроскопии (просвечивающая, сканирующая), а также метода динамического рассеяния света. Рабочие коллоидные растворы должны быть стабильны при длительном хранении.

Кроме обычных требований к анализируемой пробе по составу и минерализации со стороны метода МС-ИСП, важным условием подготовки проб, содержащих НЧ, является исключение изменения и/или потери НЧ. Необходимо учитывать устойчивость суспензий НЧ в процессе хранения, обращения, пробоподготовки, поскольку изменение состава дисперсионной среды, разбавление, взаимодействие с материалом контейнера, условия и время хранения могут изменить состояние поверхностного слоя или размер НЧ и вызывать агрегацию. Принципиально важно учитывать возможность изменения состояния НЧ при фильтровании (в результате взаимодействия с материалом мембраны), а также вероятность взаимопревращений растворенных форм и НЧ при экстракции (извлечении), разложении или хранении.

Прямой анализ жидких образцов без пробоподготовки возможен только для наиболее простых систем; в этом случае чаще всего необходимо разбавление [81]. При этом для количественного МС-ИСП-анализа в режиме одиночных частиц необходимо скорректировать коэффициент разбавления таким образом, чтобы уменьшить вероятность обнаружения более чем одной НЧ в пределах выбранного t_d (исключить событие с несколькими НЧ), т.е. определить верхнюю границу содержаний НЧ в растворе. В то же время количество НЧ должно быть достаточным для удовлетворительных расчетов (чтобы уменьшить случайную погрешность, определяемую статистикой Пуассона), т.е. определить нижнюю границу содержаний НЧ в растворе [71]. Многократные разбавления пробы помогают снизить влияние матрицы, например при определении НЧ оксида железа в присутствии растворенного железа [82], или снизить влияния растворимого железа, входящего в состав гемоглобина [83]. Данные об определении НЧ золота и серебра различных размеров в растворах, полученных разбавлением биологических жидкостей водой, приведены в работах [84–86].

Анализ более сложных объектов может быть проведен после ферментативного или щелочного гидролиза, а также с привлечением лазерной абляции (ЛА). Ферментативный гидролиз [86–88] позволяет разрушить структуру матрицы, при этом фермент должен соответствовать типу образца. Например, протеиназы выбирают для гидролиза мышечной ткани, липазы для жировой ткани и т.д. Для проведения ферментативного гидролиза необходимо создать условия, способствующие максимальной активности фермента (оптимальный pH, присутствие Mg или Ca и аденозинтрифосфата). Широко используемым ферментом является протеиназа К, проявляющая активность в диапазоне pH 7.5–12.0 при 37°C [89]. Протеиназа К является Са-зависимым ферментом, поэтому для гидролиза биологических матриц используют реакционную смесь, содержащую 1–5 М раствор Ca^{2+} , часто в сочетании с 1%-ным раствором Тритона X-100 и/или 0.5%-ным раствором додецилсульфата натрия [90, 91].

Для подготовки биологических тканей для МС-ИСП-анализа в режиме одиночных частиц используют также щелочной гидролиз в присутствии гидроксида тетраметиламмония (ТМАОН) при $\text{pH} > 14$. Схема щелочного гидролиза включает добавление ТМАОН до концентрации 10–20% (масса/объем) и объема 20–50 мкл на 1 мг биологической ткани, в результате чего конечный объем составляет 0.25–10 мл. Исключением являются случаи, например, с клеточными культурами, где образцы состоят из небольшого количества биомассы, поэтому ТМАОН находится в большом избытке по сравнению с ней [92, 93]. Перед анализом полученные гидролизаты разбавляют

сверхчистой водой таким образом, чтобы конечная концентрация ТМАОН составляла 1%.

Сравнивая щелочной (на основе ТМАОН) и ферментативный гидролиз (с использованием протеиназы К), авторы отмечают, что если исследованные образцы содержат большое количество липидов, то ТМАОН более предпочтителен, так как протеиназа К не расщепляет жировые ткани [94, 95]. Вместе с тем можно предположить, что жесткие условия щелочного гидролиза приведут к изменению состояния НЧ и их оболочек. Имеющиеся данные о влиянии условий на размеры частиц противоречивы, особенно для наиболее мелких из детектируемых НЧ, что обусловлено, скорее всего, значительной погрешностью определения их размера вблизи PrO [84, 93, 96–98].

Перспективным подходом для получения дополнительной информации о смесях НЧ представляется онлайн сочетание SP-ICP-MS с методами разделения. Основной проблемой этого сочетания является то, что SP-ICP-MS дискретно детектирует индивидуальные НЧ, тогда как методы разделения обеспечивают локальное концентрирование аналитов определенного вида (в виде пика), которые потом совместно элюируются с колонки/капилляра. Кроме того, в методах разделения используют среды (в основном органические соединения), которые при введении в плазму могут приводить к матричным спектральным влияниям. По этой причине совместное использование методов разделения и SP-ICP-MS требует тщательной оптимизации условий, которые должны обеспечить возможность детектирования отдельных частиц, отсутствие превращений НЧ в процессе выделения, а также исключить влияние органического буфера на детектирование.

Как следует из детального обзора [77], число комбинированных методов SP-ICP-MS-определения НЧ невелико. Описаны онлайн сочетания SP-ICP-MS с методами гидродинамической хроматографии, капиллярного электрофореза, фракционирования в потоке. Большинство методов для стабилизации частиц использует ПАВ (додецилсульфат натрия). Работы выполнены в основном на модельных смесях золотых и серебряных НЧ. Отдельные работы посвящены Pt-содержащим препаратам и разделению частиц и их растворенных форм [99, 100]. В работе [99] поведение НЧ на основе оксидов железа контролировали с помощью ВЭЖХ-МС-ИСП с детектором, работающим в режиме коллизионной ячейки для устранения $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ и $^{40}\text{Ar}^{16}\text{OH}^+$ при измерении $^{56}\text{Fe}^+$ одновременно с $^{195}\text{Pt}^+$.

В SP-ICP-MS для анализа образцов, содержащих НЧ, кроме прямого ввода коллоидного раствора в масс-спектрометр, можно использовать лазерную абляцию. Сочетание масс-спектрометра и системы ЛА является оптимальным для био-

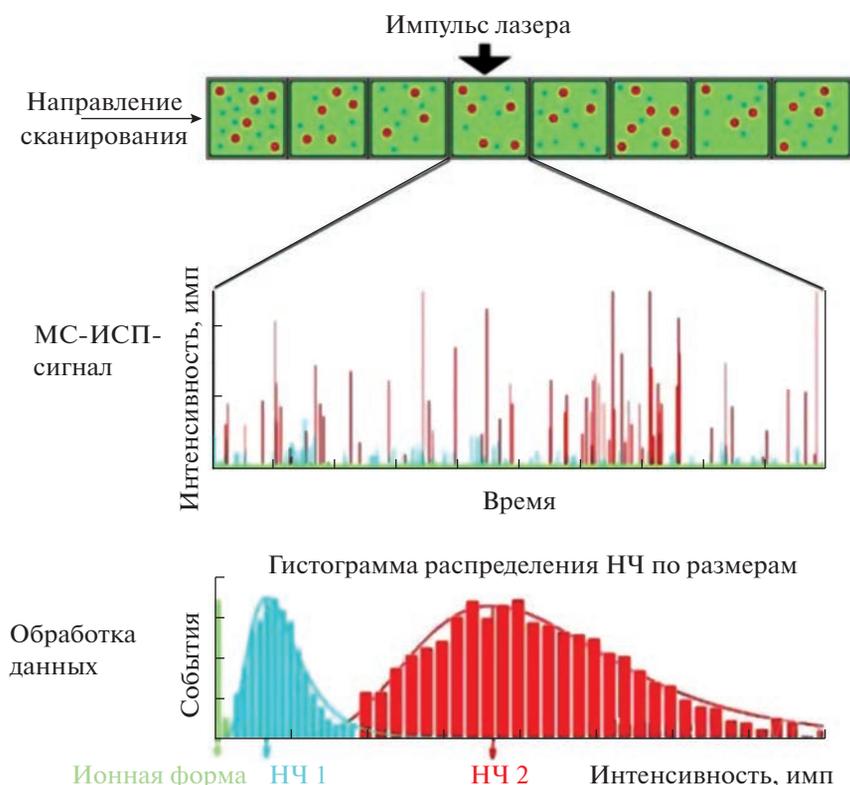


Рис. 8. Этапы получения и обработки аналитического сигнала методом ЛА-МС-ИСП в режиме детектирования одиночных частиц [101].

визуализации, поскольку обеспечивает возможность многоэлементного анализа, характеризуется низкими пределами определения элементов (на уровне мкг/г) и высоким пространственным разрешением (до уровня мкм) [101].

При ЛА-SP-ICP-MS-анализе биологической матрицы, содержащей растворенную форму и НЧ элемента-аналита, формируется комбинированный сигнал, состоящий из непрерывного сигнала растворенной формы и импульсов НЧ (рис. 8) [102]. Далее обработка сигналов идет как в обычном режиме SP-ICP-MS. При этом могут возникнуть трудности, обусловленные высоким содержанием растворенной формы элемента, которое мешает определению НЧ. Кроме того, локализация НЧ на одном участке биоматериала может привести к одновременному обнаружению нескольких НЧ. В отличие от анализа растворов методом SP-ICP-MS, где события можно разрешить, например, за счет разбавления, в ЛА-SP-ICP-MS меньше возможностей при выборе и варьировании условий эксперимента.

Отсутствие сертифицированных эталонных материалов для приложений биовизуализации является большой проблемой как для ЛА-SP-ICP-MS, так и для SP-ICP-MS в целом. В настоящее время большое внимание уделяется поиску и разработке стандартных образцов, в том числе на основе биологиче-

ских матриц. Так, для градуировки предложены стандарты на полимерной основе (желатине) [103].

Перспективным подходом к анализу сложных биологических матриц представляется сочетание изотопного разбавления и SP-ICP-MS [104]. Так, предложена методика определения размеров НЧ Ag (от 30 до 80 нм) с добавлением изотопа $^{109}\text{Ag}^+$. В данном случае изотопное разбавление позволяет компенсировать подавление сигнала элемента-аналита в присутствии высоких концентраций NaCl.

Большой интерес к функционализированным наноматериалам с заданными свойствами для разработки терапевтических средств и других бионанотехнологических приложений обусловлен широкими возможностями, которые предоставляют такие материалы для решения задач диагностики и целевой доставки лекарственных препаратов. Отличительной чертой подходов, реализуемых при решении задач с использованием наноразмерных материалов (в том числе обладающих магнитными свойствами), является вовлечение в исследование большого числа инструментальных методов. Это обусловлено тем, что для рационального проектирования микро- и наночастиц с контролируемой скоростью разложения и низкой токсично-

стью *in vivo* необходима их полная характеристика и выявление фундаментальных закономерностей, обуславливающих скорость биотрансформации магнитного материала и его выведения из организма в зависимости от дозы частиц, их гидродинамического размера, внутренней структуры и природы внешнего покрытия. Значимое место в исследованиях частиц, входящих в состав наноматериалов, занимают многоэлементные спектроскопические методы, особенно масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой. Различные ее варианты позволяют всесторонне охарактеризовать поведение нанопрепаратов в биосистемах, предоставляя информацию не только о числе и размерах частиц, но и об их растворенных формах в биологических жидкостях и тканях. Сочетание же МС-детектирования с методами разделения характеризует распределение элементов и их форм даже в отдельных клетках. Вместе с тем новые подходы к анализу сложных биологических сред пока находятся в стадии разработки, требуют инновационных инструментальных и методических решений и создания надежной методической базы для проведения комплексных аналитических и биомедицинских исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Nochehdehi A.R., Thomas S., Sadri M., Afghahi S.S.S., Mehdi Hadavi S.M.* Iron oxide biomagnetic nanoparticles (IO-BMNPs); synthesis, characterization and biomedical application – A review // *J. Nanomed. Nanotechnol.* 2017. V. 8. № 1. P. 423. <https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000423>
2. *Королев Д.В.* Разработка препаратов для таргетной и направленной доставки кардиопротективных субстанций на основе кремнеземных и магнитных наночастиц Дис. ... док. хим. наук. Санкт-Петербург: Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова Министерства здравоохранения РФ, 2019. 384 с.
3. *Sandler S.E., Fellows B., Mefford O.T.* Best practices for characterization of magnetic nanoparticles for biomedical applications // *Anal. Chem.* 2019. V. 91. P. 14159. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b03518>
4. *Ganta S., Devalapally H., Shahiwala A., Amiji M.* A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery // *J. Control. Release.* 2008. V. 126. № 3. P. 187. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.12.017>
5. *Nanoparticles for Drug Delivery / Eds. Joshy K.S., Sabu Thomas, Vijay Kumar Thakur.* Springer Nature Singapore Pte Ltd., 2021. <https://doi.org/10.1007/978-981-16-2119-2>
6. *Xu C., Sun S.* New forms of superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2013. V. 65. № 5. P. 732. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.10.008>
7. *Zelepukin I.V., Yaremenko A.V., Ivanov I.N., Yuryev M.V., Cherkasov V.R., Deyev S.M., Nikitin P.I., Nikitin M.P.* Long-term fate of magnetic particles in mice: A comprehensive study // *ACS Nano.* 2021. V. 15. P. 11341. <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c00687>
8. *Handbook of Bioanalytics / Eds. Buszewski B., Baranowska I.* Springer Nature Switzerland AG, 2022. P. 1091. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-95660-8>
9. ICPMS and trace element analysis as tools for better understanding medical conditions / *Comprehensive Analytical Chemistry / Eds. Aurélio M., Arruda Z., Jemmyson Romário de Jesu,* 2022. V. 97. P. 2. <https://www.sciencedirect.com/science/journal/0166526X/97/supp/Cю>
10. *Hurley K.R., Ring H.L., Kang H., Klein N.D., Haynes C.L.* Characterization of magnetic nanoparticles in biological matrices // *Anal. Chem.* 2015. V. 87. P. 11611. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b02229>
11. *Anselmo A.C., Mitragotri S.* Nanoparticles in the clinic: An update // *Bioeng. Transl. Med.* 2019. V. 4. № 3. Article e10143. <https://doi.org/10.1002/btm2.10143>
12. *Kharisov B.I., Rasika Dias H.V., Kharisova O.V., Vazquez A., Pena Y., Gomez J.* Solubilization, dispersion and stabilization of magnetic nanoparticles in water and non-aqueous solvents: Recent trends // *RSC Adv.* 2014. V. 4. № 85. P. 45354. <https://doi.org/10.1039/C4RA06902A>
13. *Xie L., Jiang R., Zhu F., Liu H., Ouyang G.* Application of functionalized magnetic nanoparticles in sample preparation // *Anal. Bioanal. Chem.* 2014. V. 406. № 2. P. 377. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7302-6>
14. *Пряжников Д.В., Кубракова И.В.* Магнитные наноразмерные материалы с модифицированной поверхностью: получение и исследование структуры, состава и свойств // *Журн. аналит. химии.* 2021. Т. 76. № 6. С. 496. <https://doi.org/10.31857/S0044450221060098> (*Pryazhnikov D.V., Kubrakova I.V.* Surface-modified magnetic nanoscale materials: Preparation and study of their structure, composition, and properties // *J. Anal. Chem.* 2021. Т. 76. № 6. P. 685.)
15. *Kudr J., Haddad Y., Richtera L., Heger Z., Cernak M., Adam V., Zitka O.* Magnetic nanoparticles: From design and synthesis to real world applications // *Nanomaterials.* 2017. V. 7. № 9. P. 243. <https://doi.org/10.3390/nano7090243>
16. *Pryazhnikov D.V., Kubrakova I.V., Kiseleva M.S., Martynov L.Yu., Koshcheeva I.Ya.* Preparation and structural characterization of nanosized magnetic solid-phase extractants // *Mendelev Commun.* 2014. V. 24. № 2. P. 130. <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2014.03.023>
17. *Кубракова И.В., Пряжников Д.В.* Микроволновый синтез наноразмерных магнитных сорбентов // *Журн. аналит. химии.* 2021. Т. 76. № 1. С. 20. <https://doi.org/10.31857/S0044450221010047> (*Kubrakova I.V., Pryazhnikov D.V.* Microwave-assisted synthesis of nanosized magnetic sorbents // *J. Anal. Chem.* 2021. Т. 76. № 1. С. 15.)
18. *Mekseriwattana W., Srisuk S., Kriangsaksri R., Niamsiri N., Prapainop K.* The impact of serum proteins and surface chemistry on magnetic nanoparticle colloidal stability and cellular uptake in breast cancer cells //

- AAPS PharmSciTech. 2019. V. 20. P. 55.
<https://doi.org/10.1208/s12249-018-1275-x>
19. *Timerbaev A.R.* Analytical methodology for developing nanomaterials designed for magnetically-guided delivery of platinum anticancer drugs // *Talanta*. 2022. V. 243. Article 123371.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123371>
20. *Nigam S., Chandra S., Newgreen D.F., Bahadur D., Chen Q.* Poly (ethylene glycol)-modified PAMAM-Fe₃O₄-doxorubicin triads with the potential for improved therapeutic efficacy: generation-dependent increased drug loading and retention at neutral pH and increased release at acidic pH // *Langmuir*. 2014. V. 30. P. 1004.
<https://doi.org/10.1021/la404246h>
21. *Gaihre B., Khil M.S., Lee D.R., Kim H.Y.* Gelatin-coated magnetic iron oxide nanoparticles as carrier system: Drug loading and in vitro drug release study // *Int. J. Pharm.* 2009. V. 365. P. 180.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.08.020>
22. *Lee J.E., Lee D.J., Lee N., Kim B.H., Choi S.H., Hyeon T.* Multifunctional mesoporous silica nanocomposite nanoparticles for pH controlled drug release and dual modal imaging // *J. Mater. Chem.* 2011. V. 21. P. 16869.
<https://doi.org/10.1039/C1JM11869B>
23. *N'Guyen T.T.T., Duong H.T.T., Basuki J., Montembault V., Pascual S., Guibert C., Fresnais J., Boyer C., Whittaker M.R., Davis T.P., Fontaine L.* Functional iron oxide magnetic nanoparticles with hyperthermia-induced drug release ability by using a combination of orthogonal click reactions // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2013. V. 52. P. 14152.
<https://doi.org/10.1002/anie.201306724>
24. *Yuan L., Tang Q., Yang D., Zhang J.Z., Zhang F., Hu J.* Preparation of pH-responsive mesoporous silica nanoparticles and their application in controlled drug delivery // *J. Phys. Chem. C*. 2011. V. 115. P. 9926.
<https://doi.org/10.1021/jp201053d>
25. *Shen J., He Q., Gao Y., Shi J., Li Y.* Mesoporous silica nanoparticles loading doxorubicin reverse multidrug resistance: Performance and mechanism // *Nanoscale*. 2011. V. 3. P. 4314.
<https://doi.org/10.1039/c1nr10580a>
26. *Пряжников Д.В., Ефанова О.О., Киселева М.С., Кубракова И.В.* Микроволновый синтез наноразмерных материалов типа “ядро–оболочка” на основе магнетита, функционализированного золотом и доксорубицином // *Российские нанотехнологии*. 2017. Т. 12. № 3–4. С. 69. doi: 10.1134/S1995078017020094 (*Pryazhnikov D.V., Efanova O.O., Kiseleva M.S., Kubrakova I.V.* Microwave synthesis of core–shell nanosize materials on the basis of magnetite functionalized with gold and doxorubicine // *Nanotechnologies in Russia*. 2017. V. 12. № 3–4. P. 199.)
27. *Liu J., Detrembleur C., De Pauw-Gillet M.-C., Mornet S., Vander Elst L., Laurent S., Jérôme C., Duguet E.* Heat-triggered drug release systems based on mesoporous silica nanoparticles filled with a maghemite core and phase-change molecules as gatekeepers // *J. Mater. Chem. B*. 2014. V. 2. P. 59.
<https://doi.org/10.1039/c3tb21229g>
28. *Ménard M., Meyer F., Affolter-Zbaraszczuk C., Rabin-eau M., Adam A., Duenas Ramirez P., Bégin-Colin S., Mertz D.* Design of hybrid protein-coated magnetic core mesoporous silica shell nanocomposites for MRI and drug release assessed in a 3D tumor cell model // *Nanotechnology*. 2019. V. 30. № 17. Article 174001.
<https://doi.org/10.1088/1361-6528/aafe1c>
29. *Wang Y., Wang B., Liao H., Song X., Wu H., Wang H., Shen H., Ma X., Tan M.* Liposomal nanohybrid cerasomes for mitochondria-targeted drug delivery // *J. Mater. Chem. B*. 2015. V. 3. P. 7291.
<https://doi.org/10.1039/c5tb01197c>
30. *Jin Y., Yue X., Zhang Q., Wu X., Cao Z., Dai Z.* Cerasomal doxorubicin with long-term storage stability and controllable sustained release // *Acta Biomaterialia*. 2012. V. 8. P. 3372.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.05.022>
31. *Bixner O., Reimhult E.* Controlled magnetosomes: Embedding of magnetic nanoparticles into membranes of monodisperse lipid vesicles // *J. Colloid Interface Sci.* 2016. V. 466. P. 62.
<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.11.071>
32. *Pryazhnikov D.V., Efanova O.O., Kubrakova I.V.* Cerasomes containing magnetic nanoparticles: Synthesis and gel-filtration chromatographic characterization // *Mendeleev Commun.* 2019. V. 29. № 2. P. 226.
<https://doi.org/10.1016/j.mencom.2019.03.038>
33. *Lu S., Li X., Zhang J., Peng C., Shen M., Shi X.* Dendrimer-stabilized gold nanoflowers embedded with ultrasmall iron oxide nanoparticles for multimode imaging-guided combination therapy of tumors // *Adv Sci (Weinh)*. 2018. V. 5. № 12. Article 1801612.
<https://doi.org/10.1002/advs.201801612>
34. *Xu C., Sun S.* New forms of superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2013. V. 65. P. 732.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.10.008>
35. *Rios A., Zougagh M.* Recent advances in magnetic nanomaterials for improving analytical processes // *Trends Anal. Chem.* 2016. V. 84 A. P. 72.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.03.001>
36. *Alshehri S., Imam S.S., Rizwanullah M., Akhter S., Mahdi W., Kazi M., Ahmad J.* Progress of cancer nanotechnology as diagnostics, therapeutics, and theranostics nanomedicine: preclinical promise and translational challenges // *Pharmaceutics*. 2021. V. 13. P. 24.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13010024>
37. *Timerbaev A.R.* How well can we characterize human serum transformations of magnetic nanoparticles // *Analyst*. 2020. V. 145. P. 1103.
<https://doi.org/10.1039/C9AN01920K>
38. *Ke P.C., Lin S., Parak W.J., Davis T.P., Caruso F.* Decade of the Protein Corona // *ACS Nano*. 2017. T. 11. № 12. P. 11773.
<https://doi.org/10.1021/acsnano.7b08008>
39. *Куликова Г.А., Парфенюк Е.В.* Поверхностные свойства модифицированных наноразмерных кремнезёмов и их влияние на иммобилизацию человеческого сывороточного альбумина // *Физиохимия поверхности и защита материалов*. 2010. Т. 46. № 5. С. 473. (*Kulikova G.A., Parfenyuk E.V.* Surface properties of modified nanosized silica and their in-

- fluence on human serum albumin immobilization // *Prot. Met. Phys. Chem. Surf.* 2010. Т. 46. № 5. P. 546.)
40. Winzen S., Schoettler S., Baier G., Rosenauer C., Mailaender V., Landfester K., Mohr K. Complementary analysis of the hard and soft protein corona: sample preparation critically affects corona composition // *Nanoscale.* 2015. Т. 7. № 7. С. 2992. <https://doi.org/10.1039/c4nr05982d>
 41. Lundqvist M., Stigler J., Elia G., Lynch I., Cedervall T., Dawson K.A. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008. V. 105. № 38. P. 14265. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805135105>
 42. Tenzer S., Docter D., Kuharev J., Musyanovych A., Fetz V., Hecht R., Schlenk F., Fischer D., Kiouptsi K., Reinhardt C., Landfester K., Schild H., Maskos M., Knauer S.K., Stauber R.H. Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology // *Nat. Nanotechnol.* 2013. Т. 8. № 10. P. 772. <https://doi.org/10.1038/nnano.2013.181>
 43. Sikorski J., Matczuk M., Kaminska A., Kruszewska J., Trzaskowski M., Timerbaev A.R., Jarosz M. Protein-mediated transformations of superparamagnetic nanoparticles evidenced by single-particle inductively coupled plasma tandem mass spectrometry: A disaggregation phenomenon // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. P. 1088. <https://doi.org/10.3390/ijms23031088>
 44. Rabel M., Warncke P., Grüttner C., Bergemann C., Kurland H.-D., Müller R., Dugandzic V., Thamm J., Müller R., Popp J., Cialla-May D., Fischer D. Simulation of the long-term fate of superparamagnetic iron oxide-based nanoparticles using simulated biological fluids // *Nanomedicine.* 2019. V. 14. P. 1681. <https://doi.org/10.2217/nnm-2018-0382>
 45. Gutiérrez L., Romero S., Da Silva G.B., Costo R., Vargas M.D., Ronconi C.M., Serna C.J., Veintemillas-Verdaguer S., Del Puerto Morales M. Degradation of magnetic nanoparticles mimicking lysosomal conditions followed by AC susceptibility // *Biomed. Tech.* 2015. V. 60. P. 417. <https://doi.org/10.1515/bmt-2015-0043>
 46. Rojas J.M., Gavilán H., Del Dedo V., Lorente-Sorolla E., Sanz-Ortega L., Da Silva G.B., Costo R., Perez-Yagüe S., Talelli M., Marciello M., Morales M.P., Barber D.F., Gutiérrez L. Time course assessment of the aggregation and metabolization of magnetic nanoparticles // *Acta Biomater.* 2017. V. 58. P. 181. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.05.047>
 47. Yurenja A., Nikitin A., Garanina A., Gabbasov R., Polikarpov M., Cherepanov V., Chuev M., Majouga A., Panchenko V. Synthesis and Mössbauer study of ⁵⁷Fe-based nanoparticles biodegradation in living cells // *J. Magn. Magn. Mater.* 2019. V. 474. P. 337. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2018.11.040>
 48. Mazuel F., Espinosa A., Luciani N., Reffay M., Le Borgne R., Motte L., Desboeufs K., Michel A., Pellegrino T., Lalatonne Y., Wilhelm C. Massive intracellular biodegradation of iron oxide nanoparticles evidenced magnetically at single-endosome and tissue levels // *ACS Nano.* 2016. V. 10. P. 7627. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b02876>
 49. Седых Э.М., Дементьева О.В., Карцева М.Е., Румянцева Т.Б., Тунян А.А., Банных Л.Н., Громьяк И.Н., Рудой В.М. Возможности методов атомной спектроскопии при анализе наночастиц на основе золота и серебра в синтезируемых золях и биологических объектах // *Журн. аналит. химии.* 2016. Т. 71. № 1. С. 65. doi: 10.7868/S0044450216010138 (Sedykh E.M., Dement'eva O.V., Kartseva M.E., Roumyantseva T.B., Tunyan A.A., Bannykh L.N., Rudyak I.N., Rudoy V.M. Possibilities of atomic spectroscopy in the analysis of gold- and silver-based nanoparticles in synthesized sols and biological samples // *J. Anal. Chem.* 2016. V. 71. P. 62.)
 50. Kruszewska J., Sikorski J., Samsonowicz-Górski J., Matczuk M. A CE-ICP-MS/MS method for the determination of superparamagnetic iron oxide nanoparticles under simulated physiological conditions // *Anal. Bioanal. Chem.* 2020. V. 412. P. 8145. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02948-3>
 51. Choi M.M.F., Douglas A.D., Murray R.W. Ion-pair chromatographic separation of water-soluble gold monolayer-protected clusters // *Anal. Chem.* 2006. V. 78. № 8. P. 2779. <https://doi.org/10.1021/ac052167m>
 52. Zhang Y., Shuang S., Dong C., Lo C.K., Paau M.C., Choi M.M.F. Application of HPLC and MALDI-TOF MS for studying As-synthesized ligand-protected gold nanoclusters products // *Anal. Chem.* 2009. V. 81. № 4. P. 1676. <https://doi.org/10.1021/ac8026349>
 53. Pace H.E., Rogers N.J., Jarolimek C., Coleman V.A., Higgins C.P., Ranville J.F. Correction to determining transport efficiency for the purpose of counting and sizing nanoparticles via single particle inductively coupled plasma mass spectrometry // *Anal. Chem.* 2012. V. 84. P. 4633. <https://doi.org/10.1021/ac201952t>
 54. Levy M., Luciani N., Alloyeau D., Elgrabli D., Deveaux V., Pechoux C., Chat S., Wang G., Vats N., Gendron F., Factor C., Lotersztajn S., Luciani A., Wilhelm C., Gazeau F. Long term in vivo biotransformation of iron oxide nanoparticles // *Biomaterials.* 2011. V. 32. P. 3988. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.02.031>
 55. Montes-Bayón M., Corte-Rodríguez M., Álvarez-Fernández García R., Severo Fagundes J. Biomedical analysis by ICP-MS: A focus on single cell strategies // *Comprehensive Analytical Chemistry.* 2022. V. 97. Ch. 4. P. 109. <https://doi.org/10.1016/bs.coac.2022.03.002>
 56. Ivask A., Mitchell A.J., Malysheva A., Voelcker N.H., Lombi E. Methodologies and approaches for the analysis of cell nanoparticle interactions // *Nanomed. Nanobiotechnol.* 2018. V. 10. Article e1486. <https://doi.org/10.1002/wnan.1486>
 57. Yu X., He M., Chen B., Hu B. Recent advances in single-cell analysis by inductively coupled plasma-mass spectrometry: A review // *Anal. Chim. Acta.* 2020. V. 1137. P. 191. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.07.041>
 58. Sun Q.-X., Wei X., Zhang S.-Q., Chen M.-L., Yang T., Wang J.-H. Single cell analysis for elucidating cellular uptake and transport of cobalt curcumin complex with detection by time-resolved ICPMS // *Anal. Chim.*

- Acta. 2019. V. 1066. P. 13.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.03.062>
59. *García R.A.-F., Corte-Rodríguez M., Macke M., LeBlanc K., Mester Z., Montes-Bayon M., Bettmer J.* Addressing the presence of biogenic selenium nanoparticles in yeast cells: Analytical strategies based on ICP-TQ-MS // *Analyst*. 2020. V. 145. P. 1457.
<https://doi.org/10.1039/c9an01565e>
60. *Cao Y., Feng J., Tang L., Yu C., Mo G., Deng B.* A highly efficient introduction system for single cell-ICP-MS and its application to detection of copper in single human red blood cells // *Talanta*. 2020. V. 206. Article 120174.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120174>
61. *Amor M., Tharaud M., Gelabert A., Komeili A.* Single-cell determination of iron content in magnetotactic bacteria: Implications for the iron biogeochemical cycle // *Environ. Microbiol.* 2020. V. 22. P. 823.
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.14708>
62. *Wang H., Wang M., Wang B., Zheng L., Chen H., Chai Z., Feng W.* Interrogating the variation of element masses and distribution patterns in single cells using ICP-MS with a high efficiency cell introduction system // *Anal. Bioanal. Chem.* 2017. V. 409. P. 1415.
<https://doi.org/10.1007/s00216-016-0075-y>
63. *Liu T., Bolea-Fernandez E., Mangodt C., De Wever O., Vanhaecke F.* Single-event tandem ICP-mass spectrometry for the quantification of chemotherapeutic drug-derived Pt and endogenous elements in individual human cells // *Anal. Chim. Acta*. 2021. V. 1177. Article 338797.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338797>
64. *Hieftje G.M.* Howard Malmstadt – Toward the ideal // *Spectrochim. Acta B*. 2006. V. 61. P. 597.
<https://doi.org/10.1016/j.sab.2006.05.006>
65. *Degueldre C., Favarger P.-Y.* Colloid analysis by single particle inductively coupled plasma-mass spectroscopy: A feasibility study // *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*. 2003. V. 217. P. 137.
[https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(02\)00568-X](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(02)00568-X)
66. *Laborda F., Bolea E., Jiménez-Lamana J.* Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry for the analysis of inorganic engineered nanoparticles in environmental samples // *Trends Environ. Anal. Chem.* 2016. V. 9. P. 15.
67. *Bolea E., Jimenez M.S., Perez-Arantegui J., Vidal J.C., Bakir M., Ben-Jeddou K., Gimenez-Ingalaturre A.C., Ojeda D., Trujillo C., Laborda F.* Analytical applications of single particle inductively coupled plasma mass spectrometry: A comprehensive and critical review // *Anal. Methods*. 2021. V. 13. P. 2742.
<https://doi.org/10.1039/d1ay00761k>
68. *Pace H.E., Rogers N.J., Jarolimek C., Coleman V.A., Higgins C.P., Ranville J.F.* Determining transport efficiency for the purpose of counting and sizing nanoparticles via single particle inductively coupled plasma mass spectrometry // *Anal. Chem.* 2011. V. 83. P. 9361.
<https://doi.org/10.1021/ac201952t>
69. *Laborda F., Bolea E., Cepriá G., Gómez M.T., Jiménez M.S., Pérez Arantegui J., Castillo J.R.* Detection, characterization and quantification of inorganic engineered nanomaterials: A review of techniques and methodological approaches for the analysis of complex samples // *Anal. Chim. Acta*. 2016. V. 904. P. 10.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.11.008>
70. *Laborda F., Gimenez-Ingalaturre A.C., Bolea E.* Single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry for the analysis of inorganic engineered nanoparticles: Metrological and quality issues // *Compr. Anal. Chem.* 2021. V. 93. P. 35.
<https://doi.org/10.1016/bs.coac.2021.02.012>
71. *Abad-Alvaro I., Pena-Vazquez E., Bolea E., Bermejo-Barera P., Castillo J.R., Laborda F.* Evaluation of number concentration quantification by single particle inductively coupled plasma mass spectrometry: Microsecond vs. millisecond dwell times // *Anal. Bioanal. Chem.* 2016. V. 408. P. 5089.
<https://doi.org/10.1007/s00216-016-9515-y>
72. *Laborda F., Gimenez-Ingalaturre A.C., Bolea E., Castillo J.R.* About detectability and limits of detection in single particle inductively coupled plasma mass spectrometry // *Spectrochim. Acta B*. 2020. V. 169. Article 105883.
<https://doi.org/10.1016/j.sab.2020.105883>
73. *Lee S., Bi X., Reed R.B., Ranville J.F., Herckes P., Westerhoff P.* Nanoparticle size detection limits by single particle ICP-MS for 40 elements // *Environ. Sci. Technol.* 2014. V. 48. P. 10291.
<https://doi.org/10.1021/es502422v>
74. *Vidmar J., Oprčkal P., Milačič R., Mladenovič A., Ščančar J.* Investigation of the behaviour of zero-valent iron nanoparticles and their interactions with Cd²⁺ in wastewater by single particle ICP-MS // *Sci. Total Environ.* 2018. V. 634. P. 1259.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.081>
75. *Laycock A., Clark N.J., Clough R., Smith R., Handy R.D.* Determination of metallic nanoparticles in biological samples by single particle ICP-MS: A systematic review from sample collection to analysis // *Environ. Sci. Nano*. 2022. V. 9. P. 420.
<https://doi.org/10.1039/d1en00680k>
76. *Laborda F., Jiménez-Lamana J., Bolea E., Castillo J.R.* Critical considerations for the determination of nanoparticle number concentrations, size and number size distributions by single particle ICP-MS // *J. Anal. At. Spectrom.* 2013. V. 28. P. 1220.
<https://doi.org/10.1039/C3JA50100K>
77. *Mozhayeva D., Engelhard C.* A critical review of single particle inductively coupled plasma mass spectrometry – A step towards an ideal method for nanomaterial characterization // *J. Anal. At. Spectrom.* 2020. V. 35. P. 1740.
<https://doi.org/10.1039/C9JA00206E>
78. *ISO/TS19590:2017.* Nanotechnologies – Size distribution and concentration of inorganic nanoparticles in aqueous media via single particle inductively coupled plasma mass spectrometry. 2017. P. 19.
79. *Nelson J., Yamanaka M., Lopez-Linares F., Poirier L., Rogel E.* Characterization of dissolved metals and metallic nanoparticles in asphaltene solutions by single particle inductively coupled plasma mass spectrometry // *Energy Fuels*. 2017. V. 31. P. 11971.
<https://doi.org/10.1021/ACS.ENERGYFU-ELS.7B02380>
80. *Rua-Ibarza A., Bolea-Fernandez E., Pozo G., Dominguez-Benetton X., Vanhaecke F., Tirez K.* Characterization of iron oxide nanoparticles by means of single-parti-

- cle ICP-mass spectrometry (SP-ICP-MS) – Chemical versus physical resolution to overcome spectral overlap // *J. Anal. At. Spectrom.* 2020. V. 35. P. 2023. <https://doi.org/10.1039/D0JA00183J>
81. *Темердашев З.А., Галицкая О.А., Большов М.А., Романовский К.А.* Определение размеров наночастиц серебра в водных дисперсиях методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой в режиме детектирования одиночных частиц // *Журн. аналит. химии.* 2022. Т. 77. № 1. С. 39. <https://doi.org/10.1039/D0JA00183J> (*Temerdashev Z.A., Galitskaya O.A., Bol'shov M.A.* Determination of sizes of silver nanoparticles in an aqueous dispersions by single particle inductively coupled plasma mass spectrometry // *J. Anal. Chem.* 2022. V. 77. № 1. P. 53.)
 82. *Venkatesan K.A., Rodríguez B.T., Marcotte A.R., Bi X., Schoepf J., Ranville J.F., Herckes P., Westerhoff P.* Using single-particle ICP-MS for monitoring metal-containing particles in tap water // *Environ. Sci.: Water Res. Technol.* 2018. V. 4. P. 1923. <https://doi.org/10.1039/C8EW00478A>
 83. *Nwoko K.C., Raab A., Cheyne L., Dawson D., Krupp E., Feldmann J.* Matrix-dependent size modifications of iron oxide nanoparticles (Ferumoxytol) spiked into rat blood cells and plasma: Characterisation with TEM, AF4-UVMALS-ICP-MS/MS and spICP-MS // *J. Chromatogr. B.* 2019. V. 1124. P. 356. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.06.029>
 84. *Sun Y., Liu N., Wang Y., Yin Y., Qu G., Shi J., Song M., Hu L., He B., Liu G., Cai Y., Liang Y., Jiang G.* Monitoring AuNP dynamics in the blood of a single mouse using single particle inductively coupled plasma mass spectrometry with an ultralow-volume high-efficiency introduction system // *Anal. Chem.* 2020. V. 92. P. 14872. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c02285>
 85. *Bocca B., Battistini B., Petrucci F.* Silver and gold nanoparticles characterization by SP-ICP-MS and AF4-FFF-MALS-UV-ICP-MS in human samples used for biomonitoring // *Talanta.* 2020. V. 220. Article 121404. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121404>
 86. *Van der Zande M., Vandebriel R.J., Van Doren E., Kramer E., Herrera Rivera Z., Serrano-Rojero C.S., Gremmer E.R., Mast J., Peters R.J.B., Hollman P.C.H., Hendriksen P.J.M., Marvin H.J.P., Peijnenburg A.A.C.M., Bouwmeester H.* Distribution, elimination, and toxicity of silver nanoparticles and silver ions in rats after 28-day oral exposure // *ACS Nano.* 2012. V. 6. P. 7427. <https://doi.org/10.1021/nn302649p>
 87. *Logozzia M., Mizzonnia D., Boccab B., Di Raimoa R., Petruccib F., Caimib S., Alimontib A., Falchic M., Cappellod F., Campanellad C., Bavisottod C.C., Davidd S., Bucchierid F., Angelinig D.F., Battistinig L., Faisa S.* Human primary macrophages scavenge AuNPs and eliminate it through exosomes. A natural shuttling for nanomaterials // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2019. V. 137. P. 23. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.02.014>
 88. *García R.Á.-F., Fernández-Iglesias N., López-Chaves C., Sánchez-González C., Llopis J., Montes-Bayón M., Bettemer J.* Complementary techniques (spICP-MS, TEM, and HPLC-ICP-MS) reveal the degradation of 40 nm citrate-stabilized Au nanoparticles in rat liver after intraperitoneal injection // *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2019. V. 55. P. 1. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.05.006>
 89. *Ebeling W., Hennrich N., Klockow M., Metz H., Orth H.D., Lang H.* Proteinase K from *Tritirachium album limber* // *Eur. J. Biochem.* 1974. V. 47. P. 91. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03671.x>
 90. *Bajorath J., Hinrichs W., Saenger W.* The enzymatic activity of proteinase K is controlled by calcium // *Eur. J. Biochem.* 1988. V. 176. P. 441. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1988.tb14301.x>
 91. *Loeschner K., Navratilova J., Købler C., Mølhav K., Wagner S., Von der Kammer F., Larsen E.H.* Detection and characterization of silver nanoparticles in chicken meat by asymmetric flow field flow fractionation with detection by conventional or single particle ICP-MS // *Anal. Bioanal. Chem.* 2013. V. 405. P. 8185. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7228-z>
 92. *Johnson M.E., Hanna S.K., Bustos A.R.M., Sims C.M., Elliott L.C.C., Lingayat A., Johnston A.C., Nikoobakht B., Elliott J.T., Holbrook R.D., Scoto K.C.K., Murphy K.E., Petersen E.J., Yu L.L., Nelson B.C.* Separation, sizing, and quantitation of engineered nanoparticles in an organism model using inductively coupled plasma mass spectrometry and image analysis // *ACS Nano.* 2017. V. 11. P. 526. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.6b06582>
 93. *Noireaux J., Grall R., Hullo M., Chevillard S., Oster C., Brun E., Sicard-Roselli C., Loeschner K., Fiscaro P.* Gold nanoparticle uptake in tumor cells: Quantification and size distribution by sp-ICPMS // *Separations.* 2019. V. 6. P. 3. <https://doi.org/10.3390/separations6010003>
 94. *Zhou Q., Liu L., Liu N., He B., Hu L., Wang L.* Determination and characterization of metal nanoparticles in clams and oysters // *Ecotoxicol. Environ. Safety.* 2020. V. 198. P. 110670. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110670>
 95. *Clark N.J., Clough R., Boyle D., Handy R.D.* Development of a suitable detection method for silver nanoparticles in fish tissue using single particle ICP-MS // *Environ. Sci.: Nano.* 2019. V. 6. P. 3388. <https://doi.org/10.1039/C9EN00547A>
 96. *Ishizaka T., Nagano K., Tasaki I., Tao H., Gao J.Q., Harada K., Hirata K., Saito S., Tsujino H., Higashisaka K., Tsutsumi Y.* Optimization and evaluation of pretreatment method for sp-ICP-MS to reveal the distribution of silver nanoparticles in the body // *Nanoscale Res. Lett.* 2019. V. 14. P. 1. <https://doi.org/10.1186/s11671-019-3016-9>
 97. *Vidmar J., Buerki-Thurnherr T., Loeschner K.* Comparison of the suitability of alkaline or enzymatic sample pre-treatment for characterization of silver nanoparticles in human tissue by single particle ICP-MS // *J. Anal. At. Spectrom.* 2018. V. 33. № 5. P. 752. <https://doi.org/10.1039/C7JA00402H>
 98. *Gao Ya., Zhang R., Sun H., Guo Y., Chen L., Shi X., Ge G.* High-efficiency mechanically assisted alkaline extraction of nanoparticles from biological tissues for spICP-MS analysis // *Anal. Bioanal. Chem.* 2022. V. 414. P. 4401. <https://doi.org/10.1007/s00216-022-03972-1>

99. *Fernandez-Trujillo S., Rodríguez-Farinas N., Jimenez-Moreno M., Martín-Doimeadios R.D.C.R.* Speciation of platinum nanoparticles in different cell culture media by HPLC-ICP-TQ-MS and complementary techniques: A contribution to toxicological assays // *Anal. Chim. Acta.* 2021. V. 1182. Article 338935. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338935>
100. *Turiel-Fernandez D., Gutiérrez-Romero L., Corte-Rodríguez M., Bettmer J., Montes-Bayon M.* Ultrasmall iron oxide nanoparticles cisplatin (IV) prodrug nanoconjugate: ICP-MS based strategies to evaluate the formation and drug delivery capabilities in single cells // *Anal. Chim. Acta.* 2021. V. 1159. Article 338356. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338356>
101. *Lores-Padín A., Pereiro R., Fernández B.* Laser ablation ICP-MS: New instrumental developments, applications and trends / *Recent Advances in Analytical Techniques.* 2020. V. 4. P. 1. <https://doi.org/10.2174/9789811405112120040003>
102. *Metarapi D., Šala M., Vogel-Mikuš K., Šelih V.S., Van Elteren J.T.* Nanoparticle analysis in biomaterials using laser ablation–single particle–inductively coupled plasma mass spectrometry // *Anal. Chem.* 2019. V. 91. P. 6200. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b00853>
103. *Metarapi D., van Elteren J.T., Šala M., Vogel-Mikuš K., Arčon I., Šelih V.S., Kolar M., Hočevar S.B.* Laser ablation–single–particle–inductively coupled plasma mass spectrometry as a multimodality bioimaging tool in nano-based omics // *Environ. Sci.: Nano.* 2021. V. 8. P. 647.
104. *Sotebier C.A., Kutscher D.J., Rottmann L., Jakubowski N., Panne U., Bettmer J.* Combination of single particle ICP-QMS and isotope dilution analysis for the determination of size, particle number and number size distribution of silver nanoparticles // *J. Anal. At. Spectrom.* 2016. V. 31. P. 2045.

УДК 543.421/.424:579.22:577.11

ОСОБЕННОСТИ МЕТОДОЛОГИИ ИНФРАКРАСНОЙ ФУРЬЕ-СПЕКТРОСКОПИИ И ИНТЕРПРЕТАЦИИ СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИХ ДАННЫХ ПРИ АНАЛИЗЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

© 2023 г. А. А. Камнев^а *, А. В. Тугарова^а

^аИнститут биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра “Саратовский научный центр Российской академии наук”

просп. Энтузиастов, 13, Саратов, 410049 Россия

*e-mail: a.a.kamnev@mail.ru, aakamnev@ibprrm.ru

Поступила в редакцию 08.04.2023 г.

После доработки 27.04.2023 г.

Принята к публикации 03.05.2023 г.

В данном мини-обзоре рассмотрены некоторые из наиболее значимых с точки зрения авторов особенностей методологии инфракрасной фурье-спектроскопии и интерпретации экспериментально получаемых спектроскопических данных в применении к молекулярно-спектроскопическому анализу микробиологических объектов на примерах, опубликованных в специальной научной литературе в основном в последние годы. Приведены и кратко обсуждены также примеры характерных неточностей и ошибок как методологического характера, так и возникающих при интерпретации спектроскопических данных.

Ключевые слова: биологические и медицинские объекты, инфракрасная спектроскопия, молекулярная микробиология, клеточная биомасса, биопленки, биомакромолекулярный состав.

DOI: 10.31857/S0044450223100109, **EDN:** Z1HVZI

Инфракрасные (ИК) спектры различных типов микроорганизмов (бактерий, дрожжей, грибов, микроводорослей (algae), вирусов) начали изучать еще в середине XX в. При этом в обзоре на данную тему Норрис (1959) [1] отмечал основные трудности, заключающиеся, помимо высокой стоимости аппаратуры и сильного поглощения содержащихся в микробиологических образцах следов воды, в целом в непрактичности и трудоемкости методологии, в особенности для целей идентификации микроорганизмов. Отмечалось также, что при ИК-спектроскопическом исследовании вирусов основной сложностью является их отделение от сопутствующего биологического материала [1]. Следует отметить, что ИК-спектроскопическое оборудование того периода не отличалось высокой чувствительностью и разрешающей способностью. Впоследствии, начиная с 80-х годов XX в., положение улучшилось с появлением ИК-фурье-спектрометров, в значительной степени способствовавших развитию данной области исследований [2, 3], которое продолжается до сих пор.

Одним из наиболее ценных, профессиональных и высокоинформативных руководств как для специалистов, так и для начинающих применять

метод ИК-фурье-спектроскопии (ИКФС) в микробиологии, на наш взгляд, до сих пор остается ставшая классической энциклопедическая обзорная глава Науманна в книге [3], впервые опубликованная в 2000 г., содержащая большое число примеров, экспериментальных данных, а также информативное обсуждение сути метода ИК-спектроскопии, его возможностей и основных наблюдаемых с его помощью характеристик. Среди огромного и ежегодно увеличивающегося числа микробиологических исследований с использованием ИКФС последних лет можно выделить ряд обзорных работ. В некоторые из них наряду с прочими инструментальными методами изучения микробиологических объектов включена достаточно общая информация о методе ИК-спектроскопии (в разных вариантах измерений), обычно ограниченная по объему [4–11]. Информация иного рода, чаще всего более детальная, содержится как в обзорах по различным аспектам применения ИКФС в микробиологии [12–17], так и в общих обзорах по разным аспектам применения метода к биологическим объектам (см., например, [18, 19]). Особый интерес представляют обзоры данных по ИК-спектроскопическому изучению отдельных типов био(макро)молекул, составляющих значительную

Таблица 1. Общий биомакромолекулярный состав (% от сухой биомассы) клеток микроорганизмов – прокариотов (бактерии) и эукариотов (дрожжи) (по данным [3])

Тип биомакромолекул	Бактерии	Дрожжи
Белки	40–60	40–50
Углеводы	10–20	10–25
Жиры	10–15	5–20
РНК	5–15	3–10
ДНК	2–4	1–3

часть любых микробиологических систем, в первую очередь белков [20–24], сахаров, олиго- и полисахаридов [25], липидов [24, 26]. Эти обзорные статьи наряду с отдельными профессионально выполненными экспериментальными работами в совокупности представляют собой ценную “базу данных” для исследователей, интерпретирующих ИК-спектры собственных микробиологических образцов.

С точки зрения методологии ИКФС в некоторой степени близкими к тематике настоящей статьи можно рассматривать публикации обзорного типа с описанием специализированных протоколов измерений для биологических систем (см., например, [27–31], а также главы 9, 11, 15, 16 в монографии [32]). Отметим, что, хотя некоторые из указанных протоколов включают ИК-спектроскопический анализ биологических тканей [29, 31], некоторые существенные методологические детали биоспектроскопического анализа являются во многом общими, особенно для таких сложных супрамолекулярных объектов, как микробные клетки и биопленки. Сам факт регулярного появления целого ряда таких руководств свидетельствует о сложности и неоднозначности методологических приемов ИКФС при работе с подобными биологическими образцами и об актуальности данной тематики.

В настоящей работе нами не ставилась задача рассмотреть основные опубликованные даже за последние годы работы по применению ИКФС в микробиологических исследованиях – их число слишком велико, причем уровень представленных материалов как в методологическом отношении, так и в отношении интерпретации спектроскопических данных сильно различается. Вместо этого обсуждены некоторые наиболее значимые, с точки зрения авторов, особенности методологии ИКФС и интерпретации экспериментально получаемых спектроскопических данных в применении к анализу микробиологических объектов на характерных примерах из результатов, опубликованных в специальной научной литературе, включая собственные работы авторов. Рассмотрены также некоторые типичные неточности и ошибки, встречающиеся даже в статьях, публикуемых достаточно высокорейтинговыми специализированными

международными журналами. Приведенные сведения дополняют имеющиеся в литературе обзорные работы, обсуждавшиеся выше, и будут полезны исследователям, использующим метод ИКФС для микробиологических анализов.

ОСОБЕННОСТИ МЕТОДОЛОГИИ ИК-ФУРЬЕ-СПЕКТРОСКОПИИ ПРИ АНАЛИЗЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

Одним из основных факторов, которые могут затруднять изучение относительного содержания и структуры биомакромолекул в клетках микроорганизмов (общий состав которых приведен в табл. 1) методом ИКФС, является обычное для нативных биологических материалов значительное содержание воды в образцах, молекулы которой сильно поглощают в соответствующих областях ИК-спектра [33, 34]. В частности, наиболее существенной является заметно уширенная¹ достаточно интенсивная полоса поглощения в области деформационных (ножничных) колебаний $\delta(\text{H}-\text{O}-\text{H})$ около 1640 см^{-1} , перекрывающаяся с областью колебаний амид-I пептидных связей белков с различными типами вторичной структуры (полосы в области $\sim 1620-1690 \text{ см}^{-1}$) [20, 35, 36]. Исключение вклада воды в этом случае представляет собой известную проблему и требует применения специальных приемов, строгой стандартизации параметров образцов и режимов измерений [35–40]. В случае микробиологических образцов это не всегда легко достижимо, в том числе при применении специального оборудования и методологии, например микрогидродинамической системы и ИК-фурье-микроспектроскопии с использованием синхротронного излучения [41]. В случае применения ИК-спектроскопической методологии нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО; attenuated total reflectance, ATR) [35–37, 40] при исследовании водных суспензий бактериальной биомассы или биопленок (как и в случае исследования, к примеру, водных растворов белков) используют вычитание вклада воды, полученного контрольным измерением ИК-спектра водного слоя. При этом точность измерений может снижаться из-за значительно более высокой интенсивности поглощения воды по сравнению с интенсивностью полос самого биоматериала [35].

Другим подходом к снижению вклада содержащейся в образце воды является высушивание биомассы отделенных от культуральной среды клеток (или биопленок) [30, 42–45]. В основе применимо-

¹ Для колебательных полос воды (в том числе в виде примесей) в конденсированной фазе в ИК-спектрах характерно заметное уширение, связанное с наличием достаточно прочных водородных связей, образуемых молекулами H_2O , энергия которых, влияющая на частоту всех колебаний $\text{H}-\text{O}-\text{H}$, различна в зависимости от локального молекулярного окружения молекул воды [33, 34].

сти этого способа, как показали многочисленные исследования, лежит то, что нативная структура и функциональная активность биомакромолекул и надмолекулярных структур при этом в определенных условиях могут существенно не изменяться; при этом клетки микроорганизмов обратимо переходят в физиологически неактивную (дормантную) форму [46–49]. Как известно, высушенные препараты микроорганизмов (в том числе путем лиофилизации) могут достаточно длительно храниться, и клетки в них остаются живыми, что широко используется в различных областях биотехнологии [50–52]. Следует, однако, отметить, что при высушивании некоторых микроорганизмов возможно протекание окислительно-восстановительных процессов, в том числе разрушительных – в особенности при хранении сухих препаратов [53]. При этом метод ИКФС (наряду с другими инструментальными неразрушающими методами) может быть весьма информативен для сравнительного анализа общего макромолекулярного состава сухих клеток и последствий указанных процессов [45, 47, 54–56].

Высушенные образцы микробной биомассы могут быть исследованы методом ИКФС как в режиме НПВО, так и в режимах пропускания или диффузного отражения (ДО) [3, 30, 42–45, 54, 56]. Методология ИКФС-ДО, хотя и требует специальной приставки к прибору, позволяет использовать сухую биомассу практически без дополнительной пробоподготовки и в малом количестве (в том числе без использования галогенидной матрицы (KBr) для запрессовывания образцов). При этом сравнительный анализ интенсивности и положения полос (в целом совпадающих с полосами поглощения ввиду того, что ИК-излучение, диффузно отраженное от поверхности порошкообразного или шероховатого материала и “собираемое” специальным вогнутым зеркалом, содержит информацию о его поглощении в поверхностном слое) дает во многом ту же структурную и количественную информацию, что и традиционный режим поглощения [2, 43, 54, 57].

Экспериментально показано [30, 50], что для исследования сухих микробных биомасс методом ИКФС лиофилизация необязательна. Для проведения достаточно информативного анализа вполне приемлемо высушивание биомассы, отмытой от компонентов культуральной среды, на воздухе (при комнатной температуре, в том числе для ускорения процесса – в эксикаторе с водопоглощающим агентом, либо в сушильной камере при небольшом нагревании, которое не должно превышать $\sim 45\text{--}50^\circ\text{C}$, чтобы исключить процессы термической денатурации клеточных белков) [3, 27, 30, 42–48, 54, 57, 58]. Отметим, что стадия отмывания биомассы клеток или биопленки от компонентов, входящих в состав питательной среды (в большинстве случаев это источники углерода –

соли карбоновых кислот или дрожжевой экстракт, а также неорганические соли (включая фосфаты) калия, натрия, аммония и небольшого количества микроэлементов – железа, кальция, магния, молибдена и др.), является существенной: как показано в работе [59], для исключения вклада полос указанных компонентов в ИК-спектр сухой биомассы необходимо использовать более одной стадии ее отмывания физиологическим раствором (его лучше применять вместо воды для исключения осмотического стресса для клеток). Помимо этого, длительность высушивания (в зависимости от его условий) должна быть достаточной (для не слишком малых количеств биомассы обычно используется высушивание “до постоянной массы”).

Рис. 1 иллюстрирует воспроизводимость ИК-спектров биомассы (использованы несколько миллиграммов) бактерий при высушивании на воздухе при 45°C в течение 1.5 ч (что приводит к получению визуально практически сухого образца) и в течение 23 ч (по данным [60]; все параллельно измеренные спектры для сравнения интенсивностей пиков были нормированы по интенсивности полосы амид-I клеточных белков с максимумом $\sim 1650\text{ см}^{-1}$). Результаты показывают, что варианты образцов, высушенных в течение 1.5 ч (рис. 1а), заметно различаются (максимальные различия интенсивностей полос достигают 20–39% в разных областях спектра), что указывает на наличие различных количеств остаточных следов воды в данных образцах и ее неодинаковое влияние на полосы поглощения разных функциональных групп, в том числе в области их перекрывания. Как известно [33, 34, 37–40, 30, 58], вода в конденсированной фазе обладает сильным поглощением в области валентных колебаний водородосвязанных групп О–Н (широкая асимметричная область поглощения при $\sim 3500\text{--}2500\text{ см}^{-1}$; в этой же области поглощают все ОН-группы биомакромолекул, в первую очередь полисахаридов) и ниже 1000 см^{-1} (широкая интенсивная полоса с максимумом в области $600\text{--}800\text{ см}^{-1}$; либрационные колебания H_2O). Выше отмечена также роль умеренно интенсивной полосы поглощения в области деформационных (ножничных) колебаний $\delta(\text{H-O-H})$ около 1640 см^{-1} , перекрывающейся с областью колебаний амид-I пептидных связей белков, что в данном случае вносит дополнительные различия в ИК-спектры при изучении недостаточно высушенного образца. (Заметим, однако, что при значительно более тонком слое образцов биомассы полное высушивание, достаточное для получения качественного ИК-спектра, разумеется, может быть достигнуто быстрее, за время порядка 1–2 ч [27, 58], даже при комнатной температуре [45].)

Высушивание в течение 23 ч (рис. 1б) привело к удовлетворительному совпадению спектров при параллельных измерениях. Таким обра-

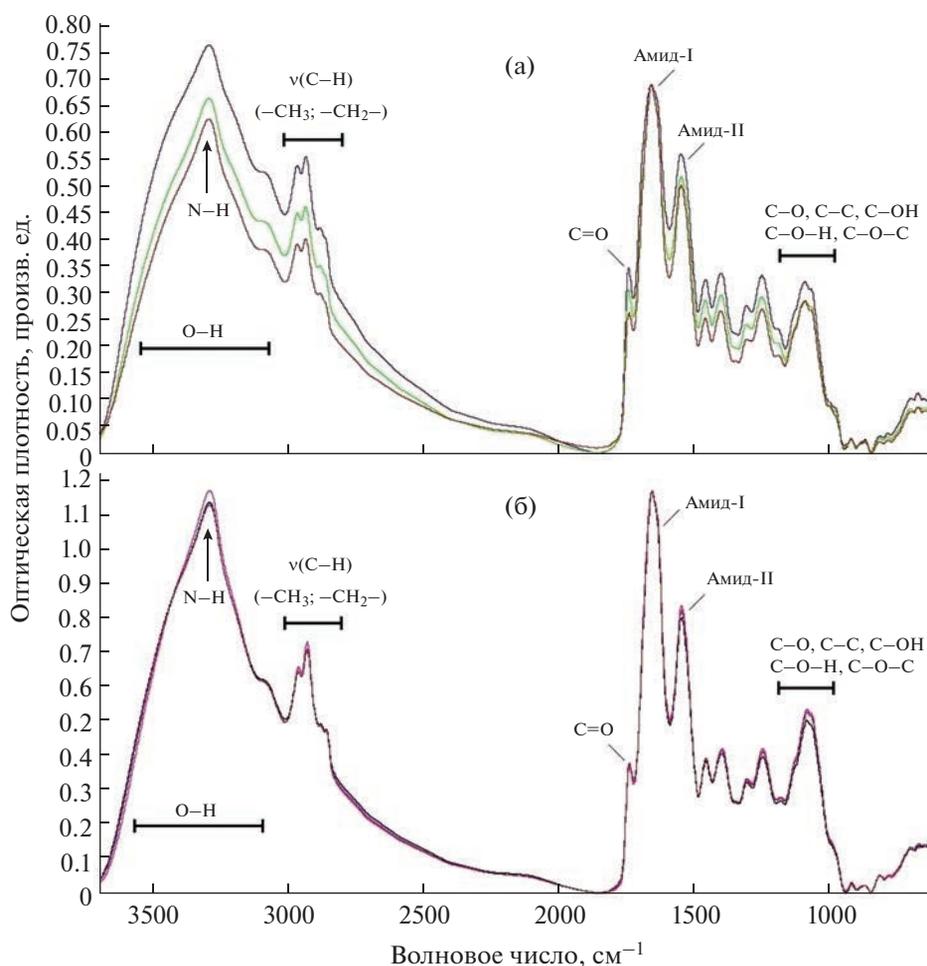


Рис. 1. ИК-спектры образцов биомассы бактерии *Azospirillum brasilense* Sp7, высушенных при 45°C в течение (а) 1.5 ч и (б) 23 ч (по три параллельных измерения с наложением спектров, нормированных по интенсивности полосы амид-I клеточных белков). Спектры измерены в режиме пропускания в виде тонких пленок на дисках из ZnSe (рисунок подготовлен авторами с использованием данных, представленных в работе [60]).

зом, указанный режим высушивания вполне подходит для подготовки не слишком малых количеств клеточной биомассы или биопленок для сравнительных ИК-спектроскопических анализов, особенно при необходимости проведения дополнительных химических анализов их состава [59, 60].

Отметим также, что рис. 1б представляет собой типичный пример спектра образцов сухой клеточной биомассы бактерий, в котором на фоне широкой области валентных колебаний ОН-групп $\nu(\text{O-H})$ полисахаридов выделяются полосы валентных колебаний амидов $\nu(\text{N-H})$ и характерная область различных валентных колебаний $\nu(\text{C-H})$ алифатических групп (в первую очередь симметричные (ν_s) и антисимметричные (ν_{as}) колебания групп $-\text{CH}_3$ и $-\text{CH}_2-$, представляющие серию менее интенсивных полос в области ~ 3000 – 2800 cm^{-1}) [59, 60]. Наиболее информативны типичные для всех белков полосы амид-I и амид-II [3, 20, 23, 35, 36, 43, 61–63]; очень характерная по-

лоса валентных колебаний карбонильной группы $\nu(\text{C=O})$, в данном случае (около 1740 cm^{-1}) небольшой интенсивности, отвечающая в основном сложноэфирной группе (клеточные липиды, а также синтезируемые и накапливающиеся в определенных условиях резервные вещества класса сложных полиэфиров – полигидроксиалканоатов, ПГА) [3, 30, 42–44, 54, 57–60, 64–69]; область различных колебаний полисахаридов и полисахаридсодержащих биомакромолекулярных комплексов (~ 1200 – 950 cm^{-1}) [3, 25, 30, 59, 60].

Использование тонкой пленки биомассы бактерий при измерениях ИК-фурье-спектров в режиме НПВО в процессе спонтанного высушивания позволяет проследить не только за изменением в спектрах в процессе удаления воды (рис. 2а), но и выявить различия в поведении внутриклеточного резервного биополимера – поли-3-гидроксibuтирата (ПГБ) (рис. 2б, 2в). На рис. 2 приведены ИК-спектры НПВО для бактерии *Cupria-*

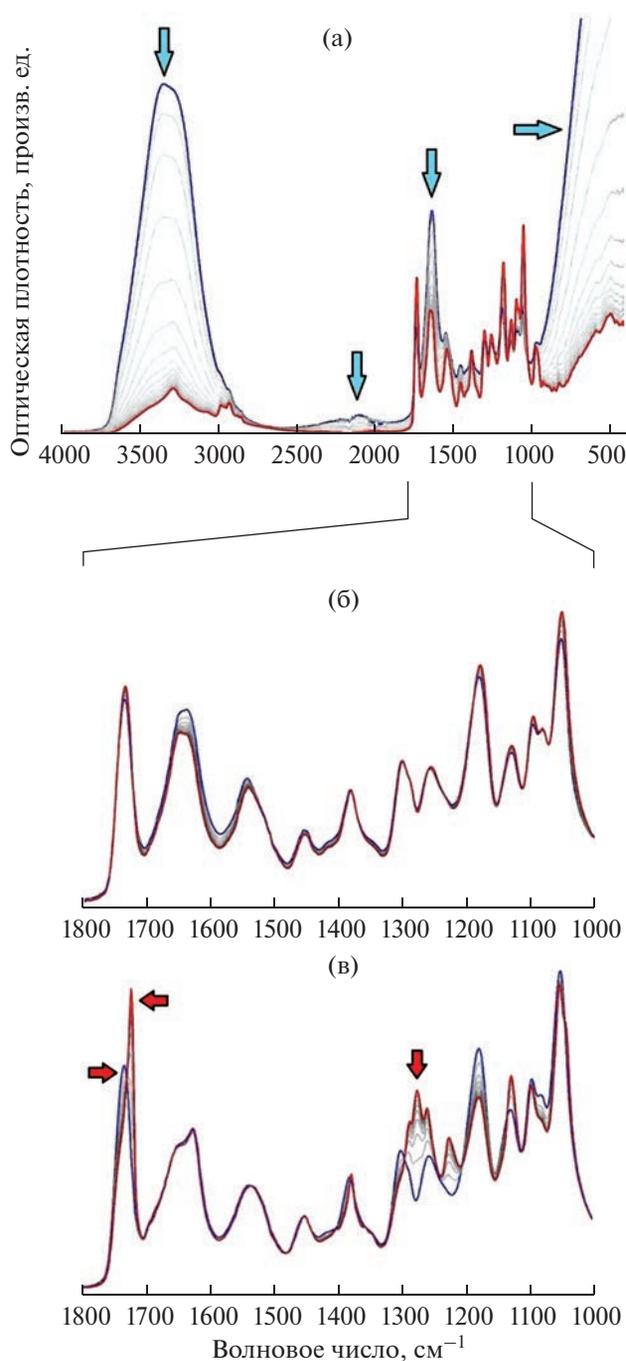


Рис. 2. ИК-спектры в режиме нарушенного полного внутреннего отражения (алмазная приставка с однократным отражением) тонкой пленки биомассы бактерии *Cupriavidus necator* H16. (а) Измерения в процессе высыхания в течение времени от 0 (спектр с наибольшими интенсивностями полос, отмеченных стрелочками) с интервалами 10 мин (промежуточные спектры) до 160 мин (спектр с наименьшими интенсивностями полос, отмеченных стрелочками); стрелочками отмечены характерные полосы колебаний воды. (б) Измерения в области 1800–1000 см⁻¹ в процессе высыхания от 60 до 150 мин (с промежуточными спектрами с интервалом 10 мин) той же биомассы (контроль). (в) Измерения в области 1800–1000 см⁻¹ в процессе высыхания от 60 до 150 мин (с промежуточными спектрами с интервалом 10 мин) биомассы, предварительно подвергнутой термическому стрессу (80°C в течение 90 мин в фосфатном буферном растворе с рН 7.4); основные изменения в спектрах, связанные с кристаллизацией резервного вещества (поли-3-гидроксibuтирата), указаны стрелочками. (Рисунок подготовлен авторами с использованием данных, представленных в работе [58]).

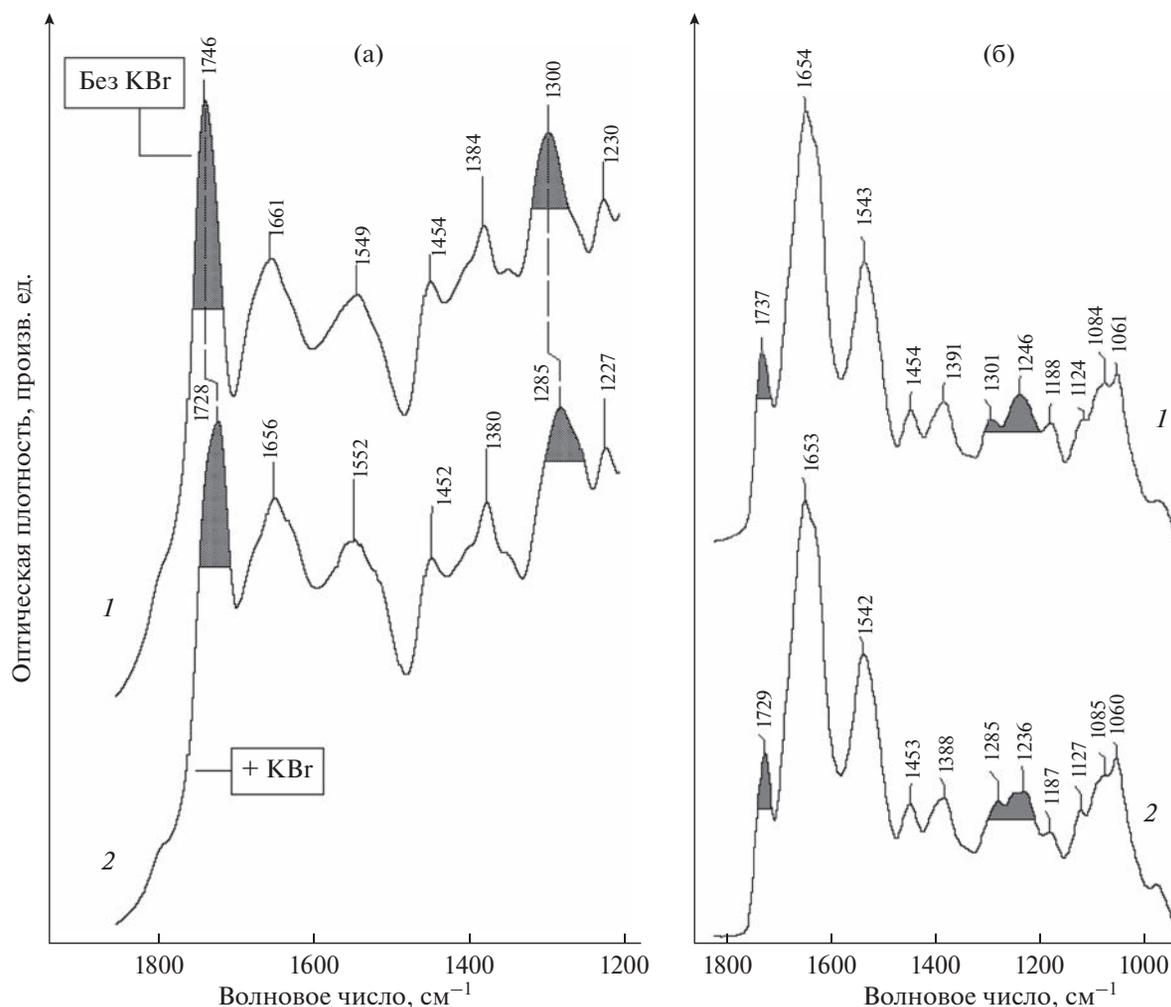


Рис. 3. ИК-спектры образцов высушенной биомассы бактерии *Azospirillum baldaniorum* Sp245. Измерения проведены (а) в режиме диффузного отражения (1) в виде порошка без применения KBr и (2) после измельчения с KBr [66]; (б) в режиме пропускания в виде пленки на поверхности диска из ZnSe (1) без измельчения сухой биомассы и (2) после ее измельчения [60]. Полосы, для которых наблюдаются наибольшие сдвиги частот максимумов, выделены штриховкой (рисунок подготовлен авторами с использованием данных, представленных в работах [60, 66]).

vidus necator, являющейся важным продуцентом ПГБ, накапливающим его до 90% от сухой биомассы [69], в процессе спонтанного удаления воды (по данным [58]). Из данных рис. 2б (увеличенная по масштабу часть рис. 2а со спектрами, измеренными в интервале от 60 до 150 мин) видно, что после 60 мин спонтанного высушивания вплоть до 2.5 ч изменения, наблюдаемые в наиболее информативной части спектра (1800–1000 см⁻¹), незначительны; в частности, полосы поглощения практически не меняют своего положения. Тем не менее аналогичный спектр для той же биомассы, предварительно подвергнутой термическому стрессу (80°C в течение 90 мин в фосфатном буферном растворе с pH 7.4), показал, что в процессе удаления воды полосы ПГБ претерпели изменения (рис. 2в). Указанный сдвиг полосы $\nu(\text{C}=\text{O})$ (от 1734 до 1719 см⁻¹) и соответствующие измене-

ния в области колебаний С–С–О сложноэфирной группы ПГБ (1300–1200 см⁻¹) свидетельствуют о протекании спонтанной кристаллизации биополимера [58]. Авторы работы [58] на основании наблюдения за морфологическими изменениями клеток *C. necator* при указанной гидротермической обработке с последующим высушиванием связывали эти изменения степени кристалличности с коагулирующей гранул биополимера и удалением из них следов воды, играющей роль “пластификатора”. (Отметим также, что сравнение рис. 2б и 2в показывает отчетливое изменение формы полос клеточных белков, в особенности полосы амид-I около 1650 см⁻¹, очевидно, связанное с денатурацией белков при термической обработке (см. рис. 2в)).

В ряде случаев при ИК-спектроскопических исследованиях небольших количеств биомассы

Таблица 2. Химический состав (содержание компонентов, мас. %) липополисахарида (ЛПС), выделенного из клеток, матрикса биопленки (МБ) и его фракций (МБ1 и МБ2), полученных хроматографическим разделением матрикса, а также полисахаридной фракции матрикса биопленки (МБ3), полученной его мягким кислотным гидролизом, бактерии *Azospirillum baldaniorum* Sp245 (по данным [59])

Компонент	ЛПС	МБ	МБ1	МБ2	МБ3
Общие сахара	55.4 ± 4.5	9.1 ± 1.0	42.1 ± 3.4	10.4 ± 1.8	62.3 ± 4.8
Белки	—	67.4 ± 0.4	18.7 ± 1.5	53.2 ± 3.7	—

до сих пор используется прессование перетертых и смешанных с порошком КВг сухих образцов в специальные таблетки при измерениях в режиме пропускания [30, 39, 45], а также без прессования – для использования метода ИКФС-ДО (см. работу [66] и цитируемые в ней публикации). Однако специальное исследование на примерах различных биологических образцов, включая высушенную микробную биомассу, показало [66], что растирание биомассы с КВг (даже без прессования) приводит к сдвигам максимумов основных полос ряда полярных функциональных групп.

На рис. 3а представлены ИК-фурье-спектры, полученные в режиме ДО, для порошка сухой биомассы бактерии *Azospirillum baldaniorum* Sp245 (выращенной в условиях, соответствующих накоплению в клетках резервного материала – ПГБ [66], гомополимера, характерного для азоспирилл [42, 43, 54, 57]), в том числе после измельчения с КВг. Как видно из спектроскопических данных, основные полосы ПГБ – $\nu(\text{C}=\text{O})$ (около 1740 см^{-1}) и колебания $\text{C}-\text{C}-\text{O}$ (около 1300 см^{-1}) сложноэфирного фрагмента – после измельчения в присутствии КВг сдвигались соответственно с 1746 до 1728 см^{-1} и с 1300 до 1285 см^{-1} , т.е. на 18 и 15 см^{-1} . Такое значительное смещение максимумов полос, которые, как известно, чувствительны к степени кристалличности ПГБ [43, 58, 60, 67], свидетельствует об индуцируемом данным механическим воздействием (в присутствии полярной матрицы КВг) процессе кристаллизации клеточного ПГБ, изначально присутствующего в клетках в виде аморфных гранул [66, 68].

Важно отметить, что для сухой биомассы *A. baldaniorum* Sp245, выращенной в отличающихся условиях (с меньшим накоплением ПГБ), процесс измельчения в отсутствие КВг приводил к аналогичному по направлению, хотя и меньшему по величине сдвигу указанных полос (8 см^{-1} для полосы $\nu(\text{C}=\text{O})$ около 1740 см^{-1} [60]) (рис. 3б). Для остальных полос в спектрах на рис. 3 положение максимумов практически не изменялось в пределах инструментальной погрешности прибора ($\pm 2-4\text{ см}^{-1}$), хотя на рис. 3а (в случае более “жесткого” воздействия полярной матрицы КВг) можно также заметить некоторые изменения формы полос амид-I и амид-II.

Таким образом, для анализа *in situ* нативных внутриклеточных биополимеров (без их выделения) методом ИКФС следует учитывать возможное влияние подобных воздействий при пробоподготовке [60]. При этом в процессе кристаллизации ПГБ (и других ПГА) форма и ширина полосы $\nu(\text{C}=\text{O})$, которая наиболее удобна для количественного анализа *in situ* данного биополимера (и других полигидроксиалканоатов [3, 67]), могут в существенной степени меняться (см., например, рис. 2в). В этом случае, как показано в работе [68], более точное определение и сравнение содержания ПГБ в биомассе клеток следует проводить с учетом не интенсивности (высоты) пика $\nu(\text{C}=\text{O})$, а его площади.

ОСОБЕННОСТИ ИНТЕРПРЕТАЦИИ ИК-СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИХ ДАННЫХ ПРИ АНАЛИЗЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

Одной из важнейших характеристик метода ИКФС является его чувствительность не только к структуре и количественному содержанию определенных соединений (в биологических образцах это соответствует наличию определенных функциональных групп в биомакромолекулах и надмолекулярных биоорганических комплексах), но и к различным внутри- и межмолекулярным взаимодействиям [3, 19]. Последние, как известно, играют важнейшую роль в поддержании нативной структуры биомакромолекул и их функциональной активности. Эта чувствительность ИКФС, с одной стороны, может в значительной степени затруднять интерпретацию спектроскопических данных, поскольку под воздействием внутри- и межмолекулярных взаимодействий (в первую очередь, водородных связей) энергия молекулярных колебаний и, соответственно, частота полос определенных функциональных групп может меняться; могут также появляться дополнительные полосы в спектре. С другой стороны, в этом заключается существенное преимущество метода, позволяющее данные взаимодействия детектировать и исследовать в неразрушающем режиме *in situ* и *in vivo* [3, 19, 30]. Указанные физико-химические закономерности метода ИКФС, а также перекрывание диапазонов частот, характерных для различных функциональных групп, являются основной сложностью,

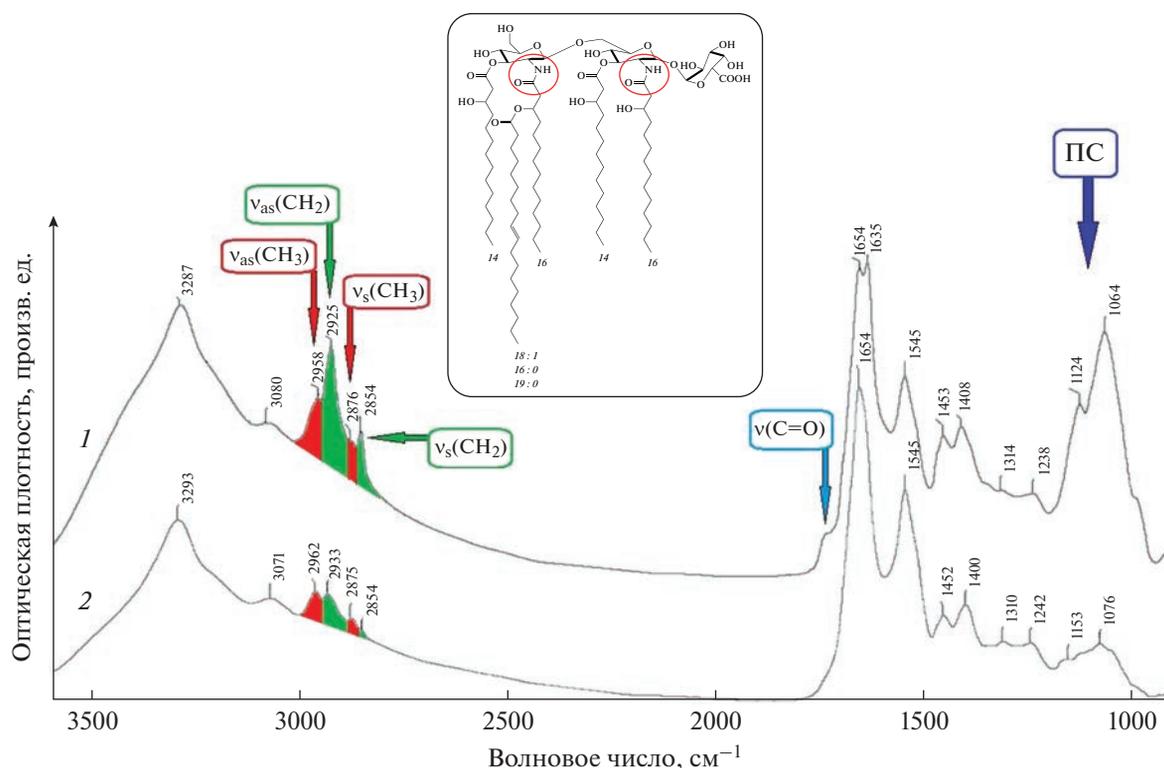


Рис. 4. ИК-спектры двух фракций матрикса биоупленки бактерии *Azospirillum baldaniorum* Sp245, полученных его хроматографическим разделением: (1) МБ1 и (2) МБ2 (см. табл. 2; по данным [59]). Стрелочки отмечены характерные полосы симметричных (ν_s) и антисимметричных (ν_{as}) валентных колебаний групп $-\text{CH}_3$ и $-\text{CH}_2-$, $\nu(\text{C}=\text{O})$ сложноэфирного фрагмента, а также характерная область колебаний полисахаридов (ПС). Во вставке показана структурная формула липида А липополисахарида, типичного для азоспирилл [70] (с выделенными овалом областями амидных связей $(\text{C}=\text{O})-\text{NH}$). (Рисунок подготовлен авторами с использованием данных, представленных в работах [59, 70]).

требующей определенного опыта и квалификации исследователя. Этим объясняется тот факт, что метод ИКФС, давно использующийся в области материаловедения в качестве рутинного инструмента, в науках о жизни, включая микробиологию, до сих пор не стал рутинным, несмотря на постоянно растущее число работ с его применением.

Помимо анализа характерных интенсивных полос, в первую очередь тех, которые не перекрываются с другими полосами колебаний (таких как обсуждавшаяся выше полоса $\nu(\text{C}=\text{O})$ около 1740 см^{-1} , характерная для сложных полиэфигов класса ПГА [3, 43, 57–60, 66–68]), более слабые полосы в ИК-спектрах, например, в области различных колебаний $\nu(\text{C}-\text{H})$ алифатических групп ($\sim 3000\text{--}2800\text{ см}^{-1}$), также могут дать ценную информацию, особенно в совокупности с данными других методов или результатами химического анализа. В качестве примера рассмотрим ИК-фурье-спектры образцов двух фракций матрикса биоупленки бактерии *Azospirillum baldaniorum* Sp245, полученных его хроматографическим разделением (рис. 4), характеризующихся различным распределением молекулярных масс макрокомпонентов (80–40 кДа для МБ1 и 35–20 кДа для МБ2; табл. 2) [59].

В первую очередь из спектров на рис. 4 следует, что поглощение в полисахаридной области колебаний ($\sim 1200\text{--}950\text{ см}^{-1}$) для фракции МБ1 значительно более интенсивно, чем для МБ2. Это хорошо соответствует данным химического анализа (см. табл. 2), показывающим, что общее содержание сахаров в МБ1 в четыре раза выше, чем в МБ2. Поскольку углеводная часть данных фракций представлена липополисахаридом [59, 70], этому вполне соответствует более заметное плечо на спектре фракции МБ1 в области колебаний $\nu(\text{C}=\text{O})$ около 1740 см^{-1} .

Следует специально отметить, что в сложных полиэфирах класса ПГА (и, в частности, ПГБ) каждая единица мономера содержит карбонильную группу, и при его накоплении в заметных количествах полоса $\nu(\text{C}=\text{O})$ в ИК-спектрах становится заметной даже в микробной биомассе [3, 57, 66–68]. В отличие от этого, в составе липида доля сложноэфирного фрагмента $[-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-]$ невелика (см., например, вставку на рис. 4); кроме того, содержание липидов в клетке бактерий обычно порядка 10% (см. табл. 1). В результате при отсутствии накопления ПГА в ИК-спектрах клеточной биомассы полоса $\nu(\text{C}=\text{O})$ около 1740 см^{-1}

липидных компонентов представлена в виде очень слабого (часто малозаметного) плеча у левого крыла полосы амид-I клеточных белков [3, 68].

Из рис. 4 также видно, что в целом область более слабых колебаний алифатических групп $\nu(\text{C-H})$ ($3000\text{--}2800\text{ см}^{-1}$) для фракции МБ1 также заметно интенсивнее (вклад в нее вносят алифатические группы не только липидов, но и боковых цепей аминокислотных остатков белков и других биомолекул). Более того, сравнение этой области для фракций МБ1 и МБ2 показывает, что для МБ1 относительная интенсивность обеих полос валентных колебаний метиленовых групп $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ и $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ по сравнению с соответствующими колебаниями концевых метильных групп $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$ и $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_3)$ значительно выше, чем для МБ2. Это находится в полном соответствии с повышенным содержанием сахаров (представленных в составе липополисахарида, ЛПС) в МБ1 по сравнению с МБ2 (см. табл. 2), поскольку липидная часть ЛПС содержит длинные алифатические цепи жирнокислотных остатков (см. вставку на рис. 4).

Таким образом, тщательный анализ различных областей ИК-спектра даже для таких многокомпонентных и неоднородных по составу объектов, как микробные клетки, био пленки и их макросоставляющие, измерение которого значительно менее трудоемко, чем проведение химических анализов, может дать ценную информацию об относительном макромолекулярном составе образцов.

Что касается анализа состава матрикса био пленки, необходимо отметить еще один важный момент. Для полисахаридной фракции матрикса, полученной его мягким кислотным гидролизом [59], в ИК-спектре данной фракции (МБ3; см. также табл. 2) присутствуют характерные полосы в области амид-I и амид-II при 1638 и 1545 см^{-1} соответственно (рис. 5). При этом как по данным химического анализа (табл. 2), так и по результатам электрофореза в полиакриламидном геле (SDS-PAGE) в составе данной фракции белок отсутствует, а полисахарид представлен в составе ЛПС [59] (в левом крыле широкой полосы амид-I на рис. 5 выше 1700 см^{-1} можно заметить вклад колебаний $\nu(\text{C=O})$, соответствующих ЛПС, сложноэфирных фрагментов $[-(\text{C=O})-\text{O}-]$; см. вставку к рис. 4). В данном случае появление полос амид-I и амид-II в отсутствие белковых макрокомпонентов объясняется наличием амидных связей в липиде А в составе ЛПС (см. вставку к рис. 4; амидные связи $[-\text{NH}-(\text{C=O})-]$ выделены овалом). Этот факт необходимо учитывать при анализе спектроскопических данных сложных (микро)биологических образцов.

Отметим также, что полоса амид-I на рис. 5 имеет максимум при 1638 см^{-1} . Вероятно, с этим может быть связано расщепление полосы амид-I в спектре фракции МБ1 (см. рис. 4, спектр I), ко-

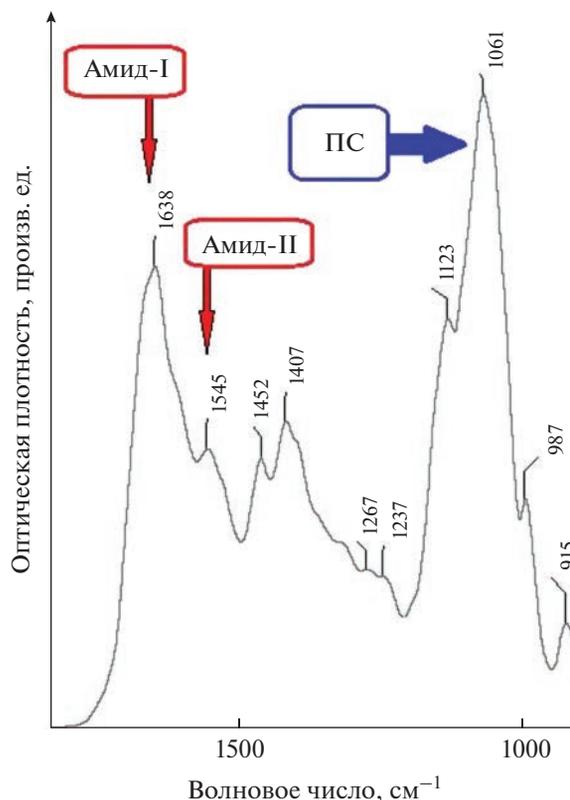


Рис. 5. ИК-спектр полисахаридной фракции матрикса био пленки бактерии *Azospirillum baldaniorum* Sp245, полученной его мягким кислотным гидролизом (МБ3; см. табл. 2; по данным [59]). Стрелочками отмечены полосы амид-I и амид-II, а также характерная область колебаний полисахаридов (ПС). (Рисунок подготовлен авторами с использованием данных, представленных в работе [59]).

торая, помимо белка (ему соответствует обычная полоса амид-I с максимумом при 1654 см^{-1} , характерным для α -спирали [3, 20, 23, 35, 36]), содержит также значительную долю ЛПС (см. табл. 2 по содержанию сахаров в составе ЛПС), с появлением соответствующего ему “амидного” пика с максимумом при 1635 см^{-1} .

В заключение необходимо заметить, что вместе с ростом числа публикаций, в которых метод ИКФС в разных вариантах с успехом применяется для исследования микроорганизмов и иных биологических объектов, нередко в работах встречаются неточности как методологического характера (их обычно легко различить по нехарактерной для данных объектов форме спектров и (или) относительной интенсивности типичных пиков [71], наличию сильного дублета CO_2 около 2350 см^{-1} (см. [72]), заметного, например, в работе [73], свидетельствующего о недостаточной продувке камеры спектрометра для удаления CO_2 и возможных сопутствующих паров воды [27], и др.), так и интерпретации спектроскопических дан-

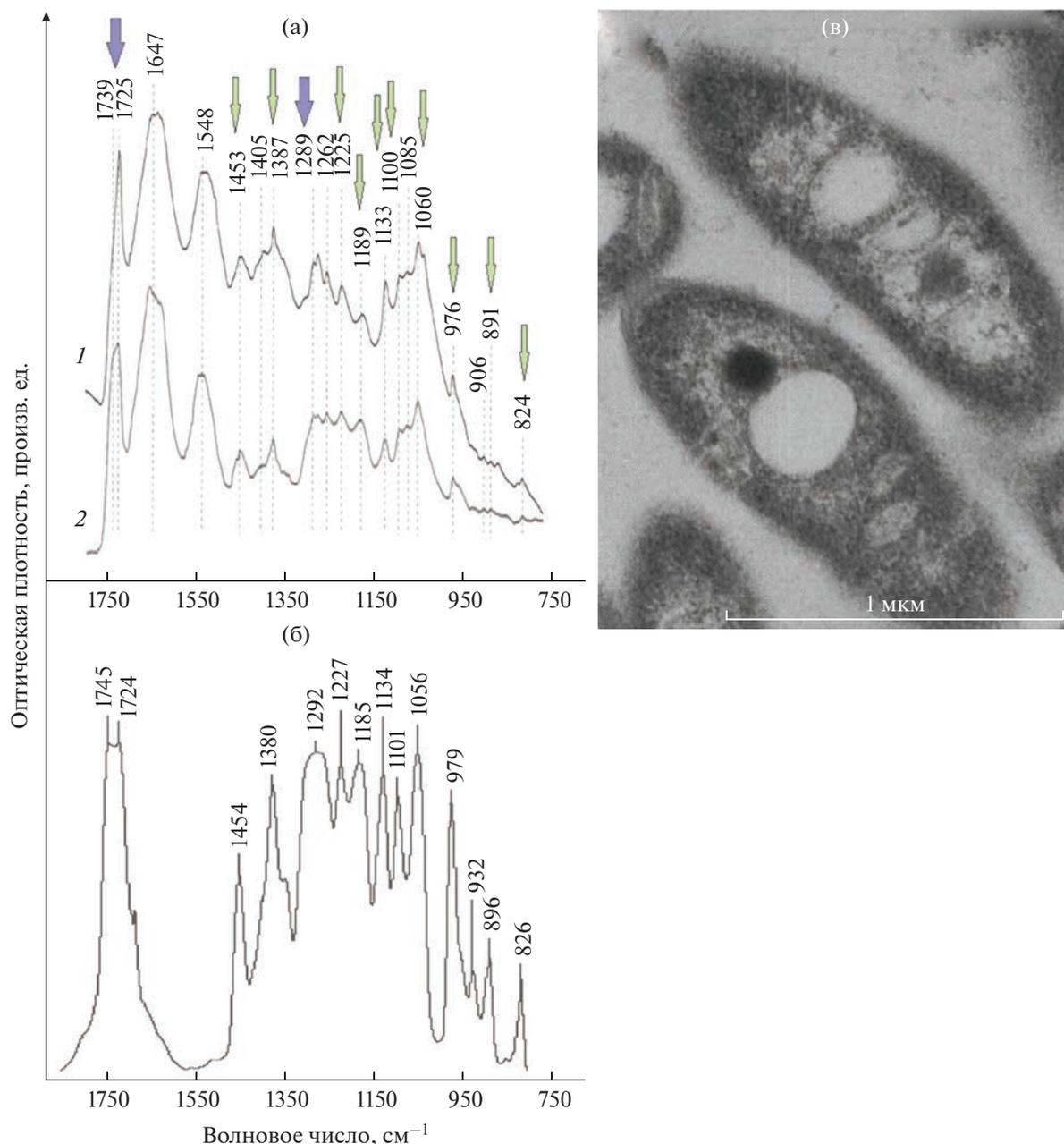


Рис. 6. ИК-спектры (а) сухой биомассы бактерии *Aquabacterium commune* (1) в виде биопленки, сформированной на поверхности нержавеющей стали в течение 100 ч, и (2) в виде планктонной культуры, выделенной из той же среды культивирования (измерения проведены методом микро-ИКФС в режиме отражения [45]); (б) тонкой пленки поли-3-гидроксибутирата (ПГБ), выделенного из биомассы бактерии *Azospirillum baldaniorum* Sp245 [66] (измерения проведены в режиме пропускания), а также (в) электронные микрофотографии клеток *Aquabacterium commune* (масштабная линейка 1 мкм) [77]. На рисунке (а) стрелочками показаны положения полос, соответствующих полосам ПГБ на рисунке (б); двумя более крупными темными стрелками обозначены области основных полос ПГБ, соответствующих колебаниям связей С=О (около 1740 cm^{-1}) и С–О–С (около 1290 cm^{-1}) сложноэфирного фрагмента, чувствительных к степени кристалличности ПГБ [66–68]. На рисунке (в) на изображениях клеток видны включения полифосфата (темные) и крупные гранулы полигидроксиалканоев (белые) [77]. (Рисунок подготовлен авторами с использованием данных, представленных в работах [45, 66, 77]).

ных. В качестве примера можно привести отнесение авторами работы [74] в ИК-спектре биопленки бактерии *Acinetobacter baumannii* аналогичного слабого дублета CO_2 при 2352 cm^{-1} к “изоцианату”.

В ИК-спектрах выделенных авторами работы [75] образцов ПГБ и его сополимера с поли-3-гидроксиивалератом наряду с типичными полосами ПГА (в частности, наиболее интенсив-

ной полосой $\nu(\text{C}=\text{O})$ при 1729 см^{-1} присутствуют также интенсивные полосы амид-I и амид-II при ~ 1648 и 1547 см^{-1} , а также широкая интенсивная полоса в области $\nu(\text{O}-\text{H})$ ($\sim 3500-3000 \text{ см}^{-1}$). Эти данные указывают на очевидную недостаточную очистку биополимеров от биомассы клеток и (или) ее макрокомпонентов. Аналогичная ошибка допущена авторами работы [76], в которой в ИК-спектре, как указано в подписи к рисунку, выделенного из биомассы бактерии *Bacillus cereus* образца ПГБ имеются интенсивные полосы, характерные для белков (включая амид-I и амид-II при ~ 1634 и 1533 см^{-1}). При этом практически отсутствует полоса $\nu(\text{C}=\text{O})$ в области $\sim 1740 \text{ см}^{-1}$, что ставит под сомнение наличие “выделенного” авторами [76] биополимера в образце.

Авторы замечательного по информативности сравнительного исследования различных режимов измерения ИК-фурье-спектров образцов бактерии *Aquabacterium commune* [45] при интерпретации данных описывали асимметричную полосу поглощения $\nu(\text{C}=\text{O})$ значительной интенсивности в области $1739-1725 \text{ см}^{-1}$, сравнимой по величине с полосами белков (амид-I и амид-II), как отвечающую мембранным липидам и жирным кислотам. Такая интерпретация, на наш взгляд, не соответствует физиологичному составу клеток (в частности, содержанию липидов), поскольку полоса $\nu(\text{C}=\text{O})$ такой интенсивности в клетках бактерий наблюдается лишь при накоплении значительных количеств резервных сложных полиэфиров (ПГА) [3, 66–68]. В статье с первым описанием данной бактерии [77] упоминалось, что она содержала ПГА в качестве резервных биополимеров, причем на опубликованных в статье [77] микрофотографиях этой бактерии и других описанных видов *Aquabacterium* видны достаточно крупные множественные гранулы ПГА. (Отметим, что авторы работы [45] выращивали культуру *A. commune* на той же среде и в условиях, аналогичных указанному в работе [77], поэтому общий состав и морфология клеточной биомассы должны быть аналогичными.) Сравнение ИК-спектров сухих биомасс (биопленки и планктонной культуры) бактерии *A. commune* [45] и выделенного из клеток бактерии *Azospirillum baldaniorum* (ранее известна как *A. brasilense*) чистого образца ПГБ [66] (рис. 6а–6б) показывает, что все основные полосы, характерные для ПГБ (и других ПГА [65, 67]), присутствуют в спектрах бактериальных биомасс *A. commune* (кроме того, крупные гранулы ПГА видны на микрофотографиях клеток бактерии [77]; рис. 6в). При этом важно также подчеркнуть, что основные изменения формы полос на рис. 6а (спектры 1 и 2 биомасс *A. commune*) соответствуют двум основным областям колебаний ПГБ, чувствительным к степени его кристалличности (выделены на рис. 6а крупными темными стрелками).

В публикациях встречались, к сожалению, и более существенные ошибки. Так, в работах [78, 79] ИК-фурье-спектры биогенных наночастиц селе-на микробного происхождения, измеренные в режиме поглощения (с максимумами, направленными вверх), были представлены в координатах пропускания по оси ординат (с описанием минимумов на спектрах вместо пиков) и, соответственно, с неверной интерпретацией. Следует тем не менее заметить, что в обоих случаях были опубликованы исправления (соответственно [80, 81]).

Из приведенных сведений об имеющихся в литературе неточностях, допущенных при проведении измерений и интерпретации полученных данных, можно сделать следующие основные выводы. Поскольку метод ИКФС, особенно при наличии современных приборов и аксессуаров, зачастую не требует особо сложной пробоподготовки даже для микробиологических образцов, эта кажущаяся “простота” может отвлекать от необходимости строгого соблюдения рекомендуемых в руководствах [3, 27, 30] основных этапов подготовки прибора и образцов. Сам метод, однако, достаточно “коварен” – в том смысле, что при неправильных измерениях и (или) подготовке образцов ИК-спектр всегда удается получить, но он может не соответствовать реальной структуре и составу исследуемой системы. Тем не менее эти методологические нюансы достаточно просто учесть. Наиболее важной частью исследования после получения адекватных экспериментальных ИК-спектров является именно их интерпретация, требующая значительной квалификации, опыта и наблюдательности. Выше уже отмечались сложность и высокая информативность ИК-спектров биологических образцов, связанные как с возможным перекрытием областей (величин энергии) колебаний различных функциональных групп молекул, так и с их чувствительностью к межмолекулярным и внутримолекулярным взаимодействиям. Таким образом, при интерпретации данных важно принимать во внимание многозначность информации, заключенной в спектрах. При этом, разумеется, обязательно следует учитывать и наличие разных типов колебаний (валентные, различные типы деформационных, симметричные и асимметричные колебания и др.), что особенно важно для многоатомных функциональных групп. Эти “отпечатки” следует фиксировать в анализируемых спектрах с учетом их относительной интенсивности, которая может в значительных пределах меняться, в том числе в зависимости от межмолекулярных взаимодействий, состояния образца, условий его получения и т.д.

В настоящем мини-обзоре на отобранных авторами примерах из литературы, опубликован-

ных в основном в последние 10–15 лет, рассмотрена важность основных этапов пробоподготовки микробиологических образцов, и в первую очередь биомассы клеток и биопленок. Особо отмечены возможности изменения нативного состояния исследуемой системы при подготовке проб (высушивание, измельчение и др.). Таким образом, хотя метод ИКФС является неразрушающим (не изменяющим состав образца) и в значительной степени неинвазивным (не влияющим на его химическую и морфологическую структуру), важно соблюдать это правило также при отборе и подготовке образцов. Рассмотрены некоторые важные особенности интерпретации спектрохимических данных, возможности сравнительных количественных оценок содержания макрокомпонентов при анализе относительных интенсивностей характерных колебаний. Приведены примеры некоторых типичных методологических и аналитических неточностей и ошибок, встречающихся в литературе по изучению микробиологических объектов методом ИКФС, проанализированы их причины; даны рекомендации для обеспечения правильной подготовки и проведения ИК-спектроскопического биоанализа.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант 22-26-00142).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Norris K.P. Infra-red spectroscopy and its application to microbiology // *J. Hyg.* 1959. V. 57. № 3. P. 326. <https://doi.org/10.1017/S0022172400020192>
2. Naumann D., Helm D., Labischinski H. Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy // *Nature.* 1991. V. 351. № 6321. P. 81. <https://doi.org/10.1038/351081a0>
3. Naumann D. Infrared spectroscopy in microbiology / *Encyclopedia of Analytical Chemistry* / Ed. Meyers R.A. Wiley: Chichester, UK, 2000. P. 102. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a0117>
4. Franco-Duarte R., Kadam S., Kaushik K.S., Painuli S., Semwal P., Cruz-Martins N., Rodrigues C.F. Quick detection and confirmation of microbes in food and water / *Present Knowledge in Food Safety. A Risk-Based Approach Through the Food Chain* / Eds. Knowles M.E., Anelich L.E., Boobis A.R., Popping B. London: Acad. Press, 2023. Ch. 59. P. 893. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819470-6.00030-5>
5. Ramzan M., Raza A., un Nisa Z., Musharraf S.G. Recent studies on advance spectroscopic techniques for the identification of microorganisms: A review // *Arab. J. Chem.* 2023. V. 16. № 3. Article 104521. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.104521>
6. Sportelli M.C., Kranz C., Mizaikoff B., Cioffi N. Recent advances on the spectroscopic characterization of microbial biofilms: A critical review // *Anal. Chim. Acta.* 2022. V. 1195. Article 339433. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.339433>
7. Cheah Y.T., Chan D.J.C. A methodological review on the characterization of microalgal biofilm and its extracellular polymeric substances // *J. Appl. Microbiol.* 2022. V. 132. № 5. P. 3490. <https://doi.org/10.1111/jam.15455>
8. Xin Z., Chen J., Peng H. Advances in spectral techniques for detection of pathogenic microorganisms // *Zoonoses.* 2022. V. 2. Article 8. <https://doi.org/10.15212/ZOONOSES-2021-0027>
9. Fernández-Domínguez D., Guilayn F., Patureau D., Jimenez J. Characterising the stability of the organic matter during anaerobic digestion: A selective review on the major spectroscopic techniques // *Rev. Environ. Sci. Bio/Technol.* 2022. V. 21. P. 691. <https://doi.org/10.1007/s11157-022-09623-2>
10. Harrison J.P., Berry D. Vibrational spectroscopy for imaging single microbial cells in complex biological samples // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. Article 675. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00675>
11. Pan M., Zhu L., Chen L., Qiu Y., Wang J. Detection techniques for extracellular polymeric substances in biofilms: A review // *BioResources.* 2016. V. 11. № 3. P. 8092. <https://doi.org/10.15376/biores.11.3.8092-8115>
12. Jansson M.M., Kögler M., Hörrkö S., Ala-Kokko T., Rieppo L. Vibrational spectroscopy and its future applications in microbiology // *Appl. Spectrosc. Rev.* 2023. V. 58. № 2. P. 132. <https://doi.org/10.1080/05704928.2021.1942894>
13. Novais Â., Peixe L. Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) for food and water microbiology / *Application and Integration of Omics-Powered Diagnostics in Clinical and Public Health Microbiology* / Eds. Moran-Gilad J., Yagel Y. Cham: Springer, 2021. P. 191. https://doi.org/10.1007/978-3-030-62155-1_11
14. Chirman D., Pleshko N. Characterization of bacterial biofilm infections with Fourier transform infrared spectroscopy: A review // *Appl. Spectrosc. Rev.* 2021. V. 56. № 8–10. P. 673. <https://doi.org/10.1080/05704928.2020.1864392>
15. Novais Â., Freitas A.R., Rodrigues C., Peixe L. Fourier transform infrared spectroscopy: unlocking fundamentals and prospects for bacterial strain typing // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2019. V. 38. P. 427. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3431-3>
16. Quintelas C., Ferreira E.C., Lopes J.A., Sousa C. An overview of the evolution of infrared spectroscopy applied to bacterial typing // *Biotechnol. J.* 2018. V. 13. № 1. Article 1700449. <https://doi.org/10.1002/biot.201700449>
17. Faghihzadeh F., Anaya N.M., Schiffman L.A., Oyanedel-Craver V. Fourier transform infrared spectroscopy to assess molecular-level changes in microorganisms exposed to nanoparticles // *Nanotechnol. Environ. Eng.* 2016. V. 1. Article 1. <https://doi.org/10.1007/s41204-016-0001-8>
18. Faehelebom K.M., Saleh A., Al-Tabakha M.M.A., Ashames A.A. Recent applications of quantitative analytical FTIR spectroscopy in pharmaceutical, biomedical, and clinical fields: A brief review // *Rev. Anal. Chem.* 2022. V. 41. № 1. P. 21. <https://doi.org/10.1515/revac-2022-0030>
19. Baiz C.R., Blasiak B., Bredenbeck J., Cho M., Choi J.-H., Corcelli S.A., Dijkstra A.G., Feng C.-J., Garrett-Roe S., Ge N.-H., Hanson-Heine M.W.D., Hirst J.D., Jansen T.L.C., Kwac K., Kubarych K.J., Londergan C.H.,

- Maekawa H., Reppert M., Saito S., Roy S., Skinner J.L., Stock G., Straub J.E., Thielges M.C., Tominaga K., Tokmakoff A., Torii H., Wang L., Webb L.J., Zanni M.T.* Vibrational spectroscopic map, vibrational spectroscopy, and intermolecular interaction // *Chem. Rev.* 2020. V. 120. № 15. P. 7152.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00813>
20. *Yang S., Zhang Q., Yang H., Shi H., Dong A., Wang L., Yu S.* Progress in infrared spectroscopy as an efficient tool for predicting protein secondary structure // *Int. J. Biol. Macromol.* 2022. V. 206. P. 175.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.02.104>
21. *Lorenz-Fonfria V.A.* Infrared difference spectroscopy of proteins: From bands to bonds // *Chem. Rev.* 2020. V. 120. № 7. P. 3466.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00449>
22. *Ganim Z., Chung H.S., Smith A.W., DeFlores L.P., Jones K.C., Tokmakoff A.* Amide I two-dimensional infrared spectroscopy of proteins // *Acc. Chem. Res.* 2008. V. 41. № 3. P. 432.
<https://doi.org/10.1021/ar700188n>
23. *Barth A.* Infrared spectroscopy of proteins // *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Bioenergetics.* 2007. V. 1767. № 9. P. 1073.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2007.06.004>
24. *Tatulian S.A.* Attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy: A method of choice for studying membrane proteins and lipids // *Biochemistry.* 2003. V. 42. № 41. P. 11898.
<https://doi.org/10.1021/bi034235>
25. *Wiercigroch E., Szafraniec E., Czamara K., Pacia M.Z., Majzner K., Kochan K., Kaczor A., Baranska M., Malek K.* Raman and infrared spectroscopy of carbohydrates: A review // *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 2017. V. 185. P. 317.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.05.045>
26. *Lewis R.N.A.H., McElhaney R.N.* Membrane lipid phase transitions and phase organization studied by Fourier transform infrared spectroscopy // *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Biomembranes.* 2013. V. 1828. № 10. P. 2347.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.10.018>
27. *Yang H., Shi H., Feng B., Wang L., Chen L., Alvarez-Ordóñez A., Zhang L., Shen H., Zhu J., Yang S., Ding C., Prietod M., Yang F., Yu S.* Protocol for bacterial typing using Fourier transform infrared spectroscopy // *STAR Protocols.* 2023. V. 4. № 2. Article 102223.
<https://doi.org/10.1016/j.xpro.2023.102223>
28. *Morais C.L.M., Paraskevaidi M., Cui L., Fullwood N.J., Isabelle M., Lima K.M.G., Martin-Hirsch P.L., Sreedhar H., Trevisan J., Walsh M.J., Zhang D., Zhu Y.-G., Martin F.L.* Standardization of complex biologically derived spectrochemical datasets // *Nat. Protoc.* 2019. V. 14. P. 1546.
<https://doi.org/10.1038/s41596-019-0150-x>
29. *Baker M.J., Trevisan J., Bassan P., Bhargava R., Butler H.J., Dorling K.M., Fielden P.R., Fogarty S.W., Fullwood N.J., Heys K.A., Hughes C., Lasch P., Martin-Hirsch P.L., Obinaju B., Sockalingum G.D., Sulé-Suso J., Strong R.J., Walsh M.J., Wood B.R., Gardner P., Martin F.L.* Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials // *Nat. Protoc.* 2014. V. 9. P. 1771.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2014.110>
30. *Ojeda J.J., Dittrich M.* Fourier transform infrared spectroscopy for molecular analysis of microbial cells / *Microbial Systems Biology: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology.* V. 881 / Ed. Navid A. Totowa, NJ, USA: Humana Press, 2012. Ch. 8. P. 187.
https://doi.org/10.1007/978-1-61779-827-6_8
31. *Martin F.L., Kelly J.G., Llabjani V., Martin-Hirsch P.L., Patel I.I., Trevisan J., Fullwood N.J., Walsh M.J.* Distinguishing cell types or populations based on the computational analysis of their infrared spectra // *Nat. Protoc.* 2010. V. 5. P. 1748.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2010.133>
32. *Bacterial Amyloids: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology.* V. 2538 / Eds. Arluison V., Wien F., Marcoleta A. Totowa, NJ, USA: Humana Press, 2022. 337 p.
<https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2529-3>
33. *Bridelli M.G.* Fourier transform infrared spectroscopy in the study of hydrated biological macromolecules / *Fourier Transforms – High-tech Application and Current Trends* / Eds. Nikolić G.S., Cakić M.D., Cvetković D.J. Rijeka, Croatia: InTech, 2017. P. 191.
<https://doi.org/10.5772/66576>
34. *Kristiansson O., Lindgren J.* Infrared spectroscopic studies of concentrated aqueous electrolyte solutions // *J. Phys. Chem.* 1991. V. 95. № 3. P. 1488.
<https://doi.org/10.1021/j100156a085>
35. *De Meutter J., Goormaghtigh E.* FTIR imaging of protein microarrays for high throughput secondary structure determination // *Anal. Chem.* 2021. V. 93. № 8. P. 3733.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c03677>
36. *Wilcox K.E., Blanch E.W., Doig A.J.* Determination of protein secondary structure from infrared spectra using partial least-squares regression // *Biochemistry.* 2016. V. 55. № 27. P. 3794.
<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00403>
37. *Kafle B., Böcker U., Wubshet S.G., Dankel K., Mage I., Marion O., Afseth N.K.* Fourier-transform infrared spectroscopy for characterization of liquid protein solutions: A comparison of two sampling techniques // *Vibr. Spectrosc.* 2023. V. 124. Article 103490.
<https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2022.103490>
38. *Shi H., Sun J., Han R., Ding C., Hu F., Yu S.* The strategy for correcting interference from water in Fourier transform infrared spectrum based bacterial typing // *Talanta.* 2020. V. 208. Article 120347.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120347>
39. *Gordon S.H., Harry-O'kuru R.E., Mohamed A.A.* Elimination of interference from water in KBr disk FT-IR spectra of solid biomaterials by chemometrics solved with kinetic modeling // *Talanta.* 2017. V. 174. P. 587.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.06.043>
40. *Rahmelow K., Hubner W.* Infrared spectroscopy in aqueous solution: Difficulties and accuracy of water subtraction // *Appl. Spectrosc.* 1997. V. 51. № 2. P. 160.
<https://opg.optica.org/as/abstract.cfm?URI=as-51-2-160>
41. *Holman H.-Y.N., Miles R., Hao Z., Wozzi E., Anderson L.M., Yang H.* Real-time chemical imaging of bacterial activity in biofilms using open-channel microfluidics and synchrotron FTIR spectromicroscopy // *Anal. Chem.* 2009. V. 81. № 20. P. 8564.
<https://doi.org/10.1021/ac9015424>

42. Kamnev A.A. FTIR spectroscopic studies of bacterial cellular responses to environmental factors, plant-bacterial interactions and signalling // *Spectroscopy*. 2008. V. 22. P. 83.
<https://doi.org/10.3233/SPE-2008-0329>
43. Kamnev A.A., Sadovnikova J.N., Tarantilis P.A., Polissiou M.G., Antonyuk L.P. Responses of *Azospirillum brasilense* to nitrogen deficiency and to wheat lectin: A diffuse reflectance infrared Fourier transform (DRIFT) spectroscopic study // *Microb. Ecol.* 2008. V. 56. № 4. P. 615.
<https://doi.org/10.1007/s00248-008-9381-z>
44. Tugarova A.V., Sheludko A.V., Dyatlova Yu.A., Filip'echeva Yu.A., Kamnev A.A. FTIR spectroscopic study of biofilms formed by the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 and its mutant *Azospirillum brasilense* Sp245.1610 // *J. Mol. Struct.* 2017. V. 1140. P. 142.
<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.12.063>
45. Ojeda J.J., Romero-González M.E., Banwart S.A. Analysis of bacteria on steel surfaces using reflectance micro-Fourier transform infrared spectroscopy // *Anal. Chem.* 2009. V. 81. P. 6467.
<https://doi.org/10.1021/ac900841c>
46. Boza Y., Barbin D., Scamparini A.R.P. Effect of spray-drying on the quality of encapsulated cells of *Beijerinckia* sp. // *Process Biochem.* 2004. V. 39. № 10. P. 1275.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.06.002>
47. Hlaing M.M., Wood B.R., McNaughton D., Ying D., Dumsday G., Augustin M.A. Effect of drying methods on protein and DNA conformation changes in *Lactobacillus rhamnosus* GG cells by Fourier transform infrared spectroscopy // *J. Agric. Food Chem.* 2017. V. 65. № 8. P. 1724.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b05508>
48. Alsvéd M., Holm S., Christiansen S., Smidt M., Rosati B., Ling M., Boesen T., Finster K., Bilde M., Löndahl J., Šantl-Temkiv T. Effect of aerosolization and drying on the viability of *Pseudomonas syringae* cells // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. Article 3086.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03086>
49. Shelud'ko A.V., Mokeev D.I., Evstigneeva S.S., Filip'echeva Yu.A., Burov A.M., Petrova L.P., Katsy E.I. Suppressed biofilm formation efficiency and decreased biofilm resistance to oxidative stress and drying in an *Azospirillum brasilense* *ahpC* mutant // *Microbiology*. 2021. V. 90. P. 56.
<https://doi.org/10.1134/S0026261721010100>
50. Morgan C.A., Herman N., White P.A., Vesey G. Preservation of micro-organisms by drying; A review // *J. Microbiol. Methods*. 2006. V. 66. № 2. P. 183.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.02.017>
51. García A.H. Anhydrobiosis in bacteria: from physiology to applications // *J. Biosci.* 2011. V. 36. № 5. P. 939.
<https://doi.org/10.1007/s12038-011-9107-0>
52. Sahu P.K., Gupta A., Singh M., Mehrotra P., Brahma-prakash G.P. Bioformulation and fluid bed drying: A new approach towards an improved biofertilizer formulation / *Eco-friendly Agro-biological Techniques for Enhancing Crop Productivity* / Eds. Sengar R., Singh A. Singapore: Springer, 2018. P. 47.
https://doi.org/10.1007/978-981-10-6934-5_3
53. França M.B., Panek A.D., Eleutherio E.C.A. Oxidative stress and its effects during dehydration // *Compar. Biochem. Physiol. Part A: Mol. Integr. Physiol.* 2007. V. 146. № 4. P. 621.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.02.030>
54. Kamnev A.A., Tugarova A.V., Shchelochkov A.G., Kovács K., Kuzmann E. Diffuse reflectance infrared Fourier transform (DRIFT) and Mössbauer spectroscopic study of *Azospirillum brasilense* Sp7: Evidence for intracellular iron(II) oxidation in bacterial biomass upon lyophilisation // *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 2020. V. 229. Article 117970.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117970>
55. Камнев А.А., Тугарова А.В. Биоаналитические применения мессбауэровской спектроскопии // *Успехи химии*. 2021. Т. 90. № 11. С. 1415. (Kamnev A.A., Tugarova A.V. Bioanalytical applications of Mössbauer spectroscopy // *Russ. Chem. Rev.* 2021. V. 90. № 11. P. 1415.
<https://doi.org/10.1070/RCR5006>
<https://doi.org/10.1070/RCR5006?locatt=label:RUSSIAN>
56. Спицын А.Н., Уткин Д.В., Кузнецов О.С., Ерохин П.С., Осина Н.А., Кочубей В.И. Применение оптических технологий для изучения и идентификации микроорганизмов (обзор) // *Опт. спектроск.* 2021. Т. 129. № 1. С. 100. (Spitsyn A.N., Utkin D.V., Kuznetsov O.S., Erokhin P.S., Osina N.A., Kochubei V.I. Application of optical techniques to investigation and identification of microorganisms: A review // *Opt. Spectrosc.* 2021. V. 129. № 1. P. 135.
<https://doi.org/10.1134/S0030400X21010057>
<https://doi.org/10.21883/OS.2021.01.50446.200-20>
57. Kamnev A.A., Tugarova A.V., Tarantilis P.A., Gardiner P.H.E., Polissiou M.G. Comparing poly-3-hydroxybutyrate accumulation in *Azospirillum brasilense* strains Sp7 and Sp245: The effects of copper(II) // *Appl. Soil Ecol.* 2012. V. 61. P. 213.
<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.10.020>
58. Sedlacek P., Slaninova E., Enev V., Koller M., Nebesárova J., Marova I., Hrubanova K., Krzyzanek V., Samek O., Obruca S. What keeps polyhydroxyalkanoates in bacterial cells amorphous? A derivation from stress exposure experiments // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2019. V. 103. P. 1905.
<https://doi.org/10.1007/s00253-018-09584-z>
59. Kamnev A.A., Dyatlova Yu.A., Kenzhegulov O.A., Fedonenko Yu.P., Evstigneeva S.S., Tugarova A.V. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of biofilms formed by the rhizobacterium *Azospirillum baldaniorum* Sp245: Aspects of methodology and matrix composition // *Molecules*. 2023. V. 28. № 4. Article 1949.
<https://doi.org/10.3390/molecules28041949>
60. Kamnev A.A., Dyatlova Yu.A., Kenzhegulov O.A., Vladimirova A.A., Mamchenkova P.V., Tugarova A.V. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic analyses of microbiological samples and biogenic selenium nanoparticles of microbial origin: Sample preparation effects // *Molecules*. 2021. V. 26. № 4. Article 1146.
<https://doi.org/10.3390/molecules26041146>
61. Yang H., Yang S., Kong J., Dong A., Yu S. Obtaining information about protein secondary structures in aqueous solution using Fourier transform IR spectroscopy // *Nat. Protoc.* 2015. V. 10. P. 382.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2015.024>
62. Skvortsova P., Valiullina Yu., Baranova N., Faizullin D., Zuev Yu., Ermakova E. Spectroscopic study of antimi-

- crobal peptides: Structure and functional activity // Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc. 2022. V. 264. Article 120273.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.120273>
63. Mayerhöfer T.G., Pahlow S., Ivanovski V., Popp J. Dispersion related coupling effects in IR spectra on the example of water and Amide I bands // Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc. 2023. V. 288. Article 122115.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.122115>
64. Volova T.G. Polyhydroxyalkanoates — Plastic Materials of the 21st Century: Production, Properties, Application. New York, NY, USA: Nova Science Pub., 2004. 282 p.
65. Волова Т.Г., Жила Н.О., Шишацкая Е.И., Миронов П.В., Васильев А.Д., Суковатый А.Г., Sinskey A.J. Физико-химические свойства полигидроксиканоатов различного химического строения // Высокомолекулярное соединение. Сер. А. 2013. Т. 55. № 7. С. 775. (Volova T.G., Zhila N.O., Shishatskaya E.I., Mironov P.V., Vasil'ev A.D., Sukovaty A.G., Sinskey A.J. The physicochemical properties of polyhydroxyalkanoates with different chemical structures // Polym. Sci. Ser. A. 2013. V. 55. P. 427.
<https://doi.org/10.1134/S0965545X13070080>
<https://doi.org/10.7868/S0507547513070210>
66. Kamnev A.A., Tugarova A.V., Dyatlova Yu.A., Taranilis P.A., Grigoryeva O.P., Fainleib A.M., De Luca S. Methodological effects in Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy: Implications for structural analyses of biomacromolecular samples // Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc. 2018. V. 193. P. 558.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.12.051>
67. Kansiz M., Domínguez-Vidal A., McNaughton D., Lendl B. Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy for monitoring and determining the degree of crystallization of polyhydroxyalkanoates (PHAs) // Anal. Bioanal. Chem. 2007. V. 388. P. 1207.
<https://doi.org/10.1007/s00216-007-1337-5>
68. Tugarova A.V., Dyatlova Yu.A., Kenzhegulov O.A., Kamnev A.A. Poly-3-hydroxybutyrate synthesis by different *Azospirillum brasilense* strains under varying nitrogen deficiency: A comparative in-situ FTIR spectroscopic analysis // Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc. 2021. V. 252. Article 119458.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.119458>
69. Pavan F.A., Junqueira T.L., Watanabe M.D.B., Bonomi A., Quines L.K., Schmidell W., de Aragao G.M.F. Economic analysis of polyhydroxybutyrate production by *Cupriavidus necator* using different routes for product recovery // Biochem. Eng. J. 2019. V. 146. P. 97.
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.03.009>
70. Sigida E.N., Kokoulin M.S., Dmitrenok P.S., Grinev V.S., Fedonenko Yu.P., Konnova S.A. The structure of the O-specific polysaccharide and lipid A of the type strain *Azospirillum rugosum* DSM-19657 // Russ. J. Bioorg. Chem. 2020. V. 46. № 1. P. 60.
<https://doi.org/10.1134/S1068162020010112>
71. Younis U., Rahi A.A., Danish S., Ali M.A., Ahmed N., Datta R., Fahad S., Holatko J., Hammerschmidt T., Brtnicky M., Zarei T., Baazeem A., El Sabagh A., Glick B.R. Fourier transform infrared spectroscopy vibrational bands study of *Spinacia oleracea* and *Trigonella corniculata* under biochar amendment in naturally contaminated soil // PLoS ONE. 2021. V. 16. № 6. Article e0253390.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253390>
72. Carbon dioxide / NIST Chemistry WebBook. <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C124389&Type=IR-SPEC&Index=0#IR-SPEC> (07.04.2023)
73. Huq M.A. Green synthesis of silver nanoparticles using *Pseudoduganella eburnea* MAHUQ-39 and their antimicrobial mechanisms investigation against drug resistant human pathogens // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. № 4. Article 1510.
<https://doi.org/10.3390/ijms21041510>
74. Yang Q., Olaiya K., Andrew F.P., Ajibade P.A., Ajunwa O.M., Marsili E. Assessment of physiological and electrochemical effects of a repurposed zinc dithiocarbamate complex on *Acinetobacter baumannii* biofilms // Sci. Rep. 2022. V. 12. № 1. Article 11701.
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-16047-z>
75. Das R., Pal A., Paul A.K. Optimization of process parameters for production of poly(3-hydroxybutyrate) by *Bacillus pumilus* AHSD 04, a seed borne endophyte of oleaginous plant *Arachis hypogaea* L. // Biointerf. Res. Appl. Chem. 2022. V. 12. № 4. P. 5280.
<https://doi.org/10.33263/BRIAC124.52805295>
76. Narayanan M., Kandasamy G., Murali P., Kandasamy S., Ashokkumar V., Nasif O., Pugazhendhi A. Optimization and production of polyhydroxybutyrate from sludge by *Bacillus cereus* categorized through FT-IR and NMR analyses // J. Environ. Chem. Eng. 2021. V. 9. № 1. Article 104908.
<https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104908>
77. Kalmbach S., Manz W., Wecke J., Szewzyk U. *Aquabacterium* gen. nov., with description of *Aquabacterium citratiphilum* sp. nov., *Aquabacterium parvum* sp. nov. and *Aquabacterium commune* sp. nov., three *in situ* dominant bacterial species from the Berlin drinking water system // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 1999. V. 49. № 2. P. 769.
<https://doi.org/10.1099/00207713-49-2-769>
78. Wang Y., Shu X., Zhou Q., Fan T., Wang T., Chen X., Li M., Ma Y., Ni J., Hou J., Zhao W., Li R., Huang S., Wu L. Selenite reduction and the biogenesis of selenium nanoparticles by *Alcaligenes faecalis* Se03 isolated from the gut of *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) // Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 19. № 9. Article 2799.
<https://doi.org/10.3390/ijms19092799>
79. Wang Y., Shu X., Hou J., Lu W., Zhao W., Huang S., Wu L. Selenium nanoparticle synthesized by *Proteus mirabilis* YC801: an efficacious pathway for selenite biotransformation and detoxification // Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 19. № 12. Article 3809.
<https://doi.org/10.3390/ijms19123809>
80. Wang Y., Shu X., Zhou Q., Fan T., Wang T., Chen X., Li M., Ma Y., Ni J., Hou J., Zhao W., Li R., Huang S., Wu L. Correction: Wang, Y.T., et al. Selenite reduction and the biogenesis of selenium nanoparticles by *Alcaligenes faecalis* Se03 isolated from the gut of *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 2799 // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 4. Article 1294.
<https://doi.org/10.3390/ijms21041294>
81. Wang Y., Shu X., Hou J., Lu W., Zhao W., Huang S., Wu L. Correction: Wang Y.T. et al. Selenium nanoparticle synthesized by *Proteus mirabilis* YC801: An efficacious pathway for selenite biotransformation and detoxification. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 3809 // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 7. Article 2638.
<https://doi.org/10.3390/ijms21072638>

УДК 543.42

S,N-СОДЕРЖАЩИЕ СОРБЕНТЫ ДЛЯ ДУГОВОГО АТОМНО-ЭМИССИОННОГО АНАЛИЗА СОЕДИНЕНИЙ РЕДКОЗЕМЕЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ

© 2023 г. А. А. Архипенко^{a, *}, М. С. Доронина^a, Н. А. Короткова^a,
А. С. Шевченко^{a, b}, В. Б. Барановская^a, Ю. С. Дальнова^c

^aИнститут общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова
Российской академии наук

Ленинский просп., 31, стр. 1, Москва, 119071 Россия

^bМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
химический факультет

Ленинские горы, 1, стр. 3, Москва, 119991 Россия

^cГосударственный научно-исследовательский и проектный институт редкометаллической
промышленности “Гиредмет”

ул. Электродная, 2, Москва, 111524 Россия

*e-mail: alexandra622@mail.ru

Поступила в редакцию 18.05.2023 г.

После доработки 23.05.2023 г.

Принята к публикации 02.06.2023 г.

Исследована возможность использования S,N-содержащих сорбентов для дугового атомно-эмиссионного анализа материалов на основе редкоземельных элементов с определением примесей в фазе сорбционного концентрата. Изучены свойства S,N-содержащих сорбентов в водных растворах и различных редкоземельных матрицах. Описан методический подход к предварительному сорбционному концентрированию примесей в материалах на основе РЗЭ и дальнейшему прямому дуговому атомно-эмиссионному анализу сорбционного концентрата. Представлены результаты разработки химико-спектральной методики определения примесей в редкоземельных материалах, оценены метрологические характеристики.

Ключевые слова: сорбционное извлечение, дуговой атомно-эмиссионный анализ, материалы на основе редкоземельных элементов, разработка методики.

DOI: 10.31857/S004445022310002X, **EDN:** ZPWIGM

Создание функциональных материалов на основе редкоземельных элементов (РЗЭ) – важное направление развития науки и техники, неотъемлемая часть атомной, химической, авиационной, медицинской, оптической отраслей производства [1–3]. Качество и эффективность применения данных материалов напрямую зависят от их химического состава, структуры и свойств [4–6]. Первичным в этой триаде является химический состав, который необходимо контролировать, начиная с исходных чистых соединений [7–9].

Чистота материала может быть оценена разными способами – “академическим”, т.е. посредством определения полного примесного состава и вычитания суммы содержаний примесей из 100%; по содержанию металлов, газообразующих примесей и т.д. Но для целей химической диагностики функциональных материалов наиболее востребованным подходом является оценка

“целевой” чистоты, что подразумевает определение примесей, оказывающих наиболее значимое влияние на конечные эксплуатационные характеристики материала.

Для контроля содержания примесей в РЗЭ и их соединениях традиционно использовались методы атомно-эмиссионного, атомно-абсорбционного, химико-спектрального, люминесцентного, нейтронно-активационного, колориметрического, спектрофотометрического, ионометрического, полярографического, вольтамперометрического и турбидиметрического анализа [10, 11]. Оборудование, с помощью которого разрабатывали эти методики в семидесятих годах, устарело, а вследствие претерпевшего серьезные изменения, повлиявшие как на физико-химические процессы при анализе, так и на метрологические характеристики. Такие методы, как колориметрический, ионометрический, вольтамперометрический и тур-

бидиметрический уже практически не используются для решения перспективных задач.

Обзор актуальной современной литературы показывает, что для определения химического состава веществ и материалов на основе редкоземельных элементов применяют методы масс-спектрального [12–14], спектрального [15–19] и ядерно-физического [20–22] анализа. Спектральные и масс-спектральные методы анализа имеют схожие ограничения – матричное влияние и спектральные интерференции, которые в случае РЗЭ значимы [23]. Методы дугового атомно-эмиссионного анализа (ДАЭА) и рентгенофлуоресцентной спектроскопии имеют преимущество в связи с возможностью анализа твердых образцов и отсутствием необходимости перевода пробы в раствор. Однако для точного определения необходимо изготовление образцов сравнения, что в случае функциональных материалов может быть затруднено. При использовании методов с растворением пробы (масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой и атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой (АЭС-ИСП)) можно строить градуировочные зависимости с использованием водных растворов. Применение ядерно-физических методов анализа, в том числе нейтронно-активационного, для анализа РЗЭ осложнено необходимостью длительного облучения пробы из-за высокого сечения радиационного захвата тепловых нейтронов ядрами лантаноидов, низкой производительностью и интерференциями от побочных реакций. Все эти сложности приводят к тому, что на практике данный вид анализа применяется крайне редко для исследования материалов на основе РЗЭ.

Исходя из указанных ограничений прямых методов, необходимы исследование и разработка способов химического преобразования пробы. На основании оценки большого количества методов разделения и концентрирования применительно к аналитическим объектам, содержащим редкоземельные металлы [24], можно сделать вывод, что наиболее распространенными подходами являются жидкостная экстракция и хроматография. Также применяют сорбцию, мицеллярную экстракцию и соосаждение. Что касается ДАЭА, химико-спектральные решения включают в себя отгонку матрицы и сорбционное извлечение с прямым анализом сорбционного концентрата.

Наиболее рациональным способом концентрирования примесей для дальнейшего ДАЭА является отделение основы. Так, например, для снижения пределов определения в высокочистом германии и его оксидах используют выпаривание основы в виде GeCl_4 в специальных вкладышах в микроволновой печи с последующим определением примесей в остатке [25]. При анализе триоксида вольфрама применяли отгонку основы пробы

в виде летучих оксохлоридов вольфрама, образующихся при взаимодействии WO_3 с парами четыреххлористого углерода, с последующим анализом концентрата дуговой атомно-эмиссионной спектроскопией [26]. Такой же подход использовали для анализа триоксида молибдена [27] и оксида висмута [28]. Описаны [29] способы выпаривания матрицы селена непосредственно на графитовом порошке с дальнейшим дуговым спектральным определением. К сожалению, соединения РЗЭ не обладают летучестью, способы отгонки матрицы для таких материалов не подходят.

Перспективным и приемлемым способом концентрирования является сорбционное извлечение с последующим определением примесей в фазе сорбента. Удобнее всего использовать сорбенты, не обладающие многолинейчатым спектром, т.е. на основе органической матрицы. К таким сорбентам относятся пенополиуретан [30] и силикагель [31]. Однако сильноокислые иониты обладают низкой избирательностью, работа со слабокислыми катионитами осложнена ограниченным диапазоном кислотности, высокоселективные сорбенты обладают невысокой сорбционной емкостью и не всегда отвечают заданным требованиям [32]. Использование активированных углей также ограничено низкой сорбционной емкостью [33]. Все преимущества природных сорбентов не оправдываются вследствие сложности работы с ними и низкой устойчивостью в кислых средах [34–36]. Сорбционная емкость сорбента D-001, являющегося макропористой катионообменной смолой с полистирольной матрицей и сульфокислотными активными группами, в присутствии кальциевой матрицы снижается [37, 38]. Использование сульфокислотного полистиролового катионита Amberlite IRC-120 ограничено в концентрированной матрице, так как наблюдается снижение сорбционного извлечения в присутствии натрия [32].

Интерес представляют S-содержащие и S,N-содержащие сорбенты, которые ранее применяли для улучшения метрологических характеристик как ДАЭА [39–42], так и других аналитических методов [43–45]. Эта группа сорбентов, в частности на основе полиизоэфира [46] и полиэтиленамина [47, 48], исторически использовалась для концентрирования цветных, тяжелых и платиновых металлов. Преимущество S,N-содержащих сорбентов заключается в возможности образования связей со многими элементами, иногда для этого необходимо введение дополнительных реагентов [49–51]. Благодаря такому приему можно расширить возможности применения S,N-содержащих сорбентов.

Цель работы – исследование и разработка методического подхода к предварительному сорбционному концентрированию примесей в материалах на основе РЗЭ и дальнейшему прямому дуговому

Таблица 1. Рабочие параметры атомно-эмиссионного комплекса “Гранд-Глобула”

Параметр	Значение
Рабочий спектральный диапазон, нм:	
• 1-й непрерывный диапазон (полихроматор высокого разрешения $F = 1000$ мм, 0.4 нм/мм)	195–350
• 2-й непрерывный диапазон (полихроматор высокого разрешения $F = 1000$ мм, 1 нм/мм)	350–700
Ширина входной щели, мкм	7
Спектральное разрешение, нм	0.012
Обратная линейная дисперсия, нм/мм	0.4
Минимальное время экспозиции, мс	3

атомно-эмиссионному анализу сорбционного концентрата.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Аппаратура. Для взятия навесок применяли весы лабораторные ВЛ-224В (Госметр, Россия). Смесь стандартных образцов и сорбционного концентрата высушивали с использованием ИК-сушки TROMMELBERG IR 1 ECONOMY (TROMMELBERG, Германия). Для обеспечения постоянной температуры сорбции пробирки помещали в ультразвуковую ванну с механическим таймером и подогревом ОДА Сервис 2 л ОДА-МН20 (ОдаСервис, Россия) без включения ультразвука. Для растворения проб использовали нагреватель-

ную поверхность ПН-400 (ОАО “Электроприбор”, Россия) и лабораторную систему MARS 6 (SEM Corp., США).

Извлеченные примеси в фазе сорбента определяли с использованием атомно-эмиссионного комплекса “Гранд-Глобула” (ВМК-Оптоэлектроника, Россия), оснащенного многоканальным анализатором эмиссионных спектров МАЭС, спектроаналитическим генератором “Шаровая молния”, штативом “Глобула”. Рабочие параметры прибора указаны в табл. 1. Полученные спектры обрабатывали в программном обеспечении “Атом 3.3”. Графитовые электроды готовили к работе с использованием устройства Кратер-2М (ВМК-Оптоэлектроника, Россия).

Таблица 2. Рабочие параметры атомно-эмиссионного спектрометра ICAP PRO XP

Параметр	Значение
Выходная мощность генератора, Вт	1300
Диапазон длин волн, нм	167–852
Скорость плазмообразующего потока аргона, л/мин	15
Скорость вспомогательного потока аргона, л/мин	0.35
Скорость распылительного потока, л/мин	0.5
Скорость перистальтического насоса, об./мин	60
Диаметр капилляров для перистальтического насоса, мм	0.64
Высота наблюдения в радиальном режиме, мм	10
Диаметр инжектора, мм	2
Тип пневматического распылителя	SeaSpray Nebulizer, Glass Expansion
Тип распылительной камеры	Cyclonic Spray Chamber, Glass Expansion
Аналитические линии определяемых элементов при анализе Er_2O_3 , нм	As 189.042, Bi 190.234*, Cu 217.894, Se 196.090, Te 200.202, Mo 204.598, Sb 217.581, Sn 226.891, Ti 336.121, Zr 349.621
Аналитические линии определяемых элементов при анализе Nd_2O_3 и NdFeB , нм	As 193.759, Bi 223.061, Cu 219.958, Se 196.090, Te 225.902, Mo 281.615, Sb 217.581, Sn 175.790, Ti 337.280, Zr 267.863*
Аналитические линии определяемых элементов при анализе Sm-Co , нм	As 228.812, Bi 222.822, Cu 327.396, Se 196.090, Te 182.215*, Mo 203.844, Sb 259.805, Sn 283.999, Ti 336.121, Zr 257.139

* Для учета спектральных наложений от матричного элемента на линии определяемых элементов использовали метод математической коррекции с применением коэффициентов наложения.

Сорбционное извлечение контролировали с использованием АЭС-ИСП-спектрометра ICAP PRO XR (Thermo Electron Corp., США), рабочие параметры которого представлены в табл. 2. Аналитические линии, по которым определяли целевые примеси, указаны в табл. 3.

Реагенты и материалы. Применительно к задачам данной работы выбрали тиоэфирный и аминотиоэфирные полимерные сорбенты (схема 1). Их выбор обусловлен высокой сорбционной емкостью по отношению к ряду элементов [52], эффективным установлением координационных связей

между металлом и сорбентом. Сорбент ПТЭ относится к классу политиоэфиров. Сорбенты АМ, ЭД и ТОЛ – полиаминотиоэфиры на основе амиака, этилендиамина и *n*-толуидина соответственно. Сорбенты синтезированы в Государственном научно-исследовательском и проектном институте редкометаллической промышленности (АО “Гиредмет”). Тиоэфирные сорбенты синтезировали взаимодействием формальдегида и газообразного сероводорода/сульфида натрия [52]. Для введения атома азота в структуру сорбента во время синтеза добавляли этилендиамин. В случае ТОЛ вместо этилендиамина использовали *n*-толуидин.

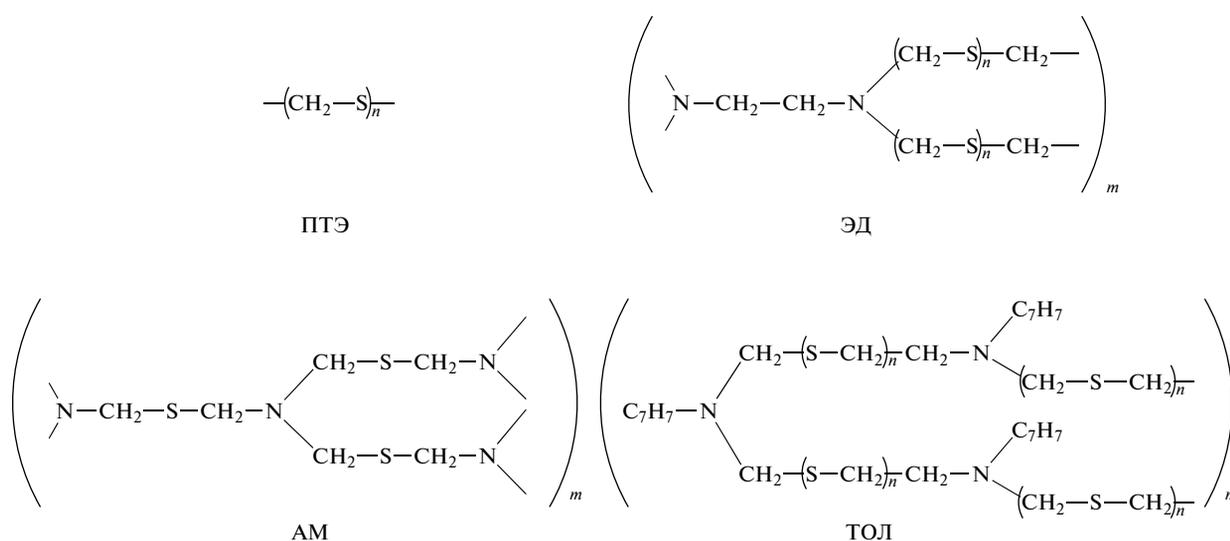


Схема 1. Изучаемые S-содержащий и S,N-содержащие сорбенты.

Модельные смеси готовили из стандартных растворов эрбия, неодима, самария, кобальта, железа (High-Purity Standards, США) с концентрацией 10000 мг/л и стандартного раствора бора (High-Purity Standards, США) с концентрацией 1000 мг/л.

Таблица 3. Аналитические линии элементов в атомно-эмиссионных спектрах с индуктивно связанной плазмой

Элемент	Линия
Cu	327.396*
Mo	202.030
	204.598
Sb	206.833
	231.147
Bi	306.770*

* Для учета спектральных наложений от эрбия на линии определяемых элементов использовали метод математической коррекции с помощью коэффициентов наложения.

Для определения сорбционной способности сорбента использовали стандартные одноэлементные и многоэлементные растворы производства High-Purity Standards (США) с концентрацией 1000 мг/л. Применяли азотную кислоту марки ос. ч. по ГОСТ 1125-84; соляную кислоту марки ос. ч. по ГОСТ 14261-77.

Использовали одноразовые пробирки из полипропилена объемом 15 и 50 мл (Corning, США), фильтры “белая лента” (ОАО “Завод Химреактив-комплект”, Россия), воронки стеклянные В-56-80 (ПАО “Химлаборприбор”, Россия).

Электроды изготавливали из графитовых стержней ОСЧ-7-3 диаметром 6 мм. В качестве спектрального буфера использовали графитовый порошок особой чистоты (ОСЧ 8-4) по ГОСТ 23463-79. В качестве носителей применяли Ga₂O₃ (99.999%, Редкийметалл.рф, Россия), GeO (99.99%, Химкрафт, Россия), NaCl (ОСЧ 6-4 по ТУ 6-09-3658-74), KCl (х. ч. по ГОСТ 4568-95), NaF (99.97%, Химкрафт, Россия), NaI (99.99%, Ланхит, Россия). Стандартные образцы для построения градуировочной зависимости изготавливали с использованием CuO

(99.9%, Химкрафт, Россия), MoO_3 (99.9%, Химкрафт, Россия), Sb_2O_3 (99.7%, Химкрафт, Россия), Bi_2O_3 (99.99%, Химкрафт, Россия). Стандартные образцы замешивали в агатовой ступке объемом 90 мл (ПАО “Химлаборприбор”, Россия).

Объекты исследования. В качестве объектов исследования выбрали оксиды редкоземельных металлов – эрбия и неодима, а также отходы магнитных материалов – SmCo и NdFeB . Образцы отходов SmCo -магнитов аттестованы по содержанию искомым компонентам в Испытательном аналитико-сертификационном центре АО “Гиредмет”.

Пробоподготовка материалов на основе РЗЭ. Навеску оксида эрбия или оксида неодима массой 0.05 г помещали в пластиковую пробирку емк. 15 мл и растворяли в 0.1 мл конц. HCl . Затем разбавляли дистиллированной водой до 10 мл.

Образец SmCo - или NdFeB -магнитов растворяли в закрытой системе путем микроволнового разложения. Для этого навеску образца 0.2 г помещали в фторопластовый сосуд и приливали 10 мл соляной кислоты (1 : 1). Растворение проводили при температуре 200°C в течение 1 ч. В случае наличия в образце большого количества примесей тугоплавких металлов к навеске образца 0.2 г приливали 10 мл H_2O , 2 мл конц. HNO_3 , 0.25 мл конц. HF , 10 мл конц. HCl и 1 мл конц. H_2SO_4 . Растворение проводили при 250°C в течение 30 мин [53].

Общий методический подход к исследованию сорбционных свойств включает следующие этапы: установление целевых примесей в выбранных объектах; исследование возможности их извлечения S,N-содержащими сорбентами из водных растворов; выбор на основании полученных результатов наиболее эффективного сорбента; изучение сорбционной емкости сорбента, условий сорбции применительно к выбранным объектам и модельным образцам, имитирующим их состав; разработка методики прямого дугового спектрального анализа полученного сорбционного концентрата; оценка ее метрологических характеристик и контроль правильности полученных результатов с использованием аттестованных по химическому составу образцов.

Оценка сорбционной способности сорбентов. В водных растворах. В пластиковую пробирку емк. 10 мл вводили 5 мл дистиллированной воды, стандартные растворы сорбируемых элементов (концентрация в итоговом растворе составляла 1 мг/л), азотную или соляную кислоту (не более 0.1 М в итоговом растворе). Дистиллированной водой доводили до метки. Туда же вводили 0.1 г сорбента. Пробирки помещали в ультразвуковую ванну, выдерживали 1 ч при 100°C, взбалтывая каждые 10 мин. Далее охлаждали в течение 10 мин и фильтровали. Фильтрат анализировали методом АЭС-ИСП. При выборе условий сорбционного концентрирования опирались на данные [40, 42].

Степень сорбционного извлечения рассчитывали по формуле:

$$R = \frac{c_{\text{исх}} - c_{\text{равн}}}{c_{\text{исх}}} \times 100\%, \quad (1)$$

где $c_{\text{исх}}$ и $c_{\text{равн}}$ – концентрация аналитов в растворе до и после сорбции, мг/л.

В модельных растворах объектов. Изучали сорбционные возможности сорбентов в матрицах материалов на основе РЗЭ – оксиде неодима, оксиде эрбия, самарий-кобальтовых магнитах, магнитах на основе NdFeB . Для этого использовали модельные растворы. В пластиковую пробирку емк. 10 мл вводили либо 2 мл стандартного раствора неодима с концентрацией 10000 мг/л (для получения модельного раствора оксида неодима), либо 2 мл стандартного раствора эрбия с концентрацией 10000 мг/л (для получения модельного раствора оксида эрбия), либо 1.2 мл стандартного раствора самария с концентрацией 10000 мг/л и 0.8 мл стандартного раствора кобальта с концентрацией 10000 мг/л (для получения модельного раствора самарий-кобальтового магнита), либо 0.8 мл стандартного раствора неодима с концентрацией 10000 мг/л, 1.2 мл стандартного раствора железа с концентрацией 10000 мг/л и 0.1 мл стандартного раствора бора с концентрацией 1000 мг/л (для получения модельного раствора NdFeB -магнита). Добавляли 0.1 мл соляной кислоты (что соответствует 0.6 М HCl при разбавлении до 10 мл). Далее в пробирку добавляли по 1 мл стандартных растворов элементов, сорбционное извлечение которых изучали, с концентрацией 10 мг/л. Дистиллированной водой доводили до метки. Туда же вводили 0.1 г сорбента. Пробирки помещали в ультразвуковую ванну, выдерживали в течение 1 ч при 100°C, взбалтывая каждые 10 мин. Охлаждали в течение 10 мин и фильтровали. Фильтрат анализировали методом АЭС-ИСП. При выборе условий сорбционного концентрирования опирались на данные [40, 42].

Степень сорбционного извлечения рассчитывали по формуле (1).

Исследование условий сорбционного концентрирования. Априорные данные по условиям сорбции в ряде случаев не подтверждаются, поэтому предварительный этап исследований посвятили их оптимизации. Алгоритм выбора условий сорбционного концентрирования в редкоземельных матрицах приведен ниже для примера извлечения Cu , Mo , Sb , Bi из эрбиевых растворов. В ходе эксперимента изучали влияние времени, температуры, массы сорбента и концентрации соляной кислоты на степень сорбционного извлечения. Также оценивали селективность S,N-содержащего сорбента.

Кинетика сорбционного концентрирования. Для обеспечения полного выделения аналитов из водной фазы в системе должно установиться сорбционное равновесие. Для этого необходимо изучить

кинетику сорбционного взаимодействия. Влияние времени на сорбционное извлечение примесей изучали путем определения содержания аналита в растворе через 30, 45, 60, 90 и 120 мин.

Влияние температуры. Температурный режим может значительно влиять на степень сорбционного извлечения. Изучали сорбцию при 20, 40, 60, 80 и 100°C.

Влияние массы сорбента. Очевидно, что чем больше масса сорбента, тем больше функциональных групп, способных к комплексообразованию, присутствует в системе. Необходимо установить минимальную массу сорбента, при которой степень сорбционного извлечения будет максимальной. Изучали сорбционное извлечение для следующих масс сорбента: 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2 г.

Влияние концентрации соляной кислоты. Соляная кислота способствует комплексообразованию сорбента с ионом металла, но слишком большое количество кислоты может разрушить функциональные группы сорбента. Изучали степень сорбционного извлечения примесей из модельных растворов при концентрации соляной кислоты в них 0, 0.6, 1.2, 2.4, 3.6 М.

Оценка селективности S,N-содержащего сорбента. Матричные компоненты влияют на извлечение примесей. Чтобы установить, сорбируется ли эрбий в процессе эксперимента, контролировали его количество до и после сорбции. Также анализировали промытый сорбционный концентрат методом ДАЭА.

Изучали влияние других примесей на извлечение целевых. Для этого готовили раствор, в котором помимо целевых примесей присутствовали Al, As, B, Ba, Be, Ca, Cd, Co, Cr, In, Fe, Ga, Hf, K, Li, Mg, Mn, Na, Nb, Ni, Pb, Sc, Se, Si, Sn, Sr, Ta, Te, Ti, Tl, V, Zn, Zr в концентрациях, близких к концентрациям аналитов.

Условия дугового атомно-эмиссионного анализа сорбционного концентрата значимо влияют на точность получаемых результатов и чувствительность определения. В рамках данного исследования выбрали аналитические линии, режим работы генератора, конфигурацию графитовых электродов, соотношение масс сорбента и графитового порошка, носитель, межэлектродное расстояние, время экспозиции.

Апробация методического подхода к определению примесей в фазе сорбента. Аликвотную часть растворенной пробы переносили в пластиковую пробирку и разбавляли дистиллированной водой до 10 мл. Вводили 0.1 г сорбента ЭД. Пробирки помещали в ультразвуковую ванну, выдерживали в течение 1 ч при 60°C, взбалтывая каждые 10 мин. После этого пробирки доставали и охлаждали в течение 10 мин. Далее раствор фильтровали. Сорбционный концентрат высушивали под ультразвуковой лампой в течение 30 мин.

На лабораторных весах отбирали навески промытого водой и высушенного сорбционного концентрата (5 мг), графитового порошка (25 мг) и GeO в качестве носителя и тщательно перемешивали. Навеску помещали в графитовый электрод (глубина 4 мм, диаметр 5 мм, толщина стенок кратера 0.5 мм) и зажимали нижней лапкой штатива "Глобула". В верхнюю лапку помещали электрод, заточенный на конус с углом 60°. Устанавливали межэлектродное расстояние 3 мм. Пробу испаряли при постоянном токе 20 А в течение 25 с.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка сорбционной способности сорбентов из водных сред. В табл. 4 представлены результаты сорбционного концентрирования наиболее значимых для анализа оптических и магнитных материалов на основе РЗЭ примесей из водных солянокислой и азотнокислых сред. Установлено, что As, Bi, Cu, Se, Te, Sb, Se, Mo можно извлечь с использованием АМ, ЭД, ТОЛ. Также сорбентом ТОЛ можно извлечь Sn, Ti, Zr. Стоит отметить, что при необходимости степень сорбционного извлечения можно повысить с помощью введения дополнительных реагентов [46–48].

Наиболее перспективными сорбентами являются ЭД и ПТЭ ввиду удобства работы с ними, поэтому их выбрали для дальнейших исследований сорбционного извлечения примесей из редкоземельных матриц. При изучении изотерм сорбции ЭД и ПТЭ отмечено, что на ее начальном участке в диапазоне концентраций 0.01–10 мг/л наблюдается линейная зависимость емкости сорбента от количества аналитов в растворе, что говорит о постоянстве степени извлечения в этом диапазоне.

Механизм взаимодействия. S,N-содержащие сорбенты характеризуются быстрым образованием донорно-акцепторных связей между атомами азота и металла. В данном комплексе атом металла переходит к атому серы посредством молекулярных взаимодействий. Образовавшаяся связь оказывается очень прочной, а при добавлении хлоридов, которые являются лигандами, комплекс становится еще стабильнее. Межмолекулярные взаимодействия обуславливают устойчивость комплексов на основе полимерных сорбентов.

Сорбция из редкоземельных матриц. При переходе от сорбции из водных растворов к сорбции из редкоземельных матриц степень извлечения примесей снижается (табл. 5), что может быть обусловлено введением в раствор больших количеств матричных элементов и сдвигом равновесия в растворе. Кроме того, высокая концентрация атомов основы может пространственно затруднять соединение целевых аналитов и атомов сорбента, вследствие чего не достигаются те же результаты, что и в водных растворах. В связи с этим

Таблица 4. Степень сорбционного извлечения элементов (%) из водных растворов

Элемент	АМ (0.1 М НСl)	АМ (0.1 М ННО ₃)	ПТЭ (0.1 М НСl)	ПТЭ (0.1 М ННО ₃)	ЭД (0.1 М НСl)	ЭД (0.1 М ННО ₃)	ТОЛ (0.1 М НСl)	ТОЛ (0.1 М ННО ₃)
As	100	100	100	100	100	100	100	100
Bi	99	100	100	100	97	98	95	92
Cu	98	99	90	52	97	97	79	82
Se	99	99	100	100	99	98	76	80
Te	96	99	100	99	98	99	90	95
Mo	99	66	73	20	93	97	93	95
Sb	100	100	95	98	100	97	99	99
Sn	46	47	63	62	59	41	98	98
Ti	42	13	0	0	56	37	90	90
Zr	25	28	56	48	70	54	93	93

Условия сорбции: 0.1 М НСl/ННО₃, $m_{\text{сорбента}} = 0.1 \text{ г}$, $V_{\text{жидкой фазы}} = 10 \text{ мл}$, $t = 1 \text{ ч}$, 100°C , $c_{\text{аналитов}} = 1 \text{ мг/л}$.

необходимо выбрать условия сорбционного концентрирования, способствующие полному извлечению примесей. Так, увеличение времени контакта фаз раствора и сорбента повышает вероятность образования связей сорбента и аналита; повышение температуры ускоряет тепловое движение частиц, отчего взаимодействие аналитов, хлоридов и сорбента становится более интенсивным. К тому же сорбция — эндотермический процесс, поэтому повышение температуры способствует извлечению элементов. При увеличении массы сорбента увеличивается число функциональных групп, и сорбент может извлечь большее количество аналитов. Повышение концентрации минеральных кислот, например соляной, ведет к увеличению количества лигандов в растворе, однако при значительной концентрации соляной кислоты повышается и кислотность, поэтому функциональные группы сорбента могут разрушаться. Таким образом, необходимо грамотно подходить к выбору условий сорбционного концентрирования.

Выбор условий сорбционного концентрирования. Ниже приведены детали разработки химико-спектральной методики с применением сорбента ЭД на примере оксида эрбия. Целевыми выбрали примеси Cu, Mo, Sb и Bi из-за их влияния на физические (оптические, магнитные и др.) свойства материалов, в изготовлении которых участвует оксид эрбия [54–57].

Кинетика сорбционного концентрирования. Результаты варьирования времени контакта фаз (рис. 1) показали, что при увеличении времени сорбции степень извлечения меняется незначительно или практически не меняется, следовательно, сорбционное равновесие устанавливается в первые минуты или даже секунды взаимодействия, для полного извлечения Cu, Mo, Sb, Bi достаточно 1 ч.

Варьирование температуры. Результаты изменения температуры нагревания сорбционных систем представлены на рис. 2. Как видно, температуры 20 и 40°C не хватает для полного извлечения Mo и Sb. При температуре выше 80°C степень сорбционного извлечения снижается, вероятно, из-за нарушения связей сорбента и иона металла или разрушения функциональных групп сорбента. Таким образом, наиболее подходящей для сорбционного извлечения Cu, Mo, Sb и Bi является температура 60°C.

Варьирование массы сорбента. Зависимость степени сорбции от массы сорбента (рис. 3) показала, что массы 0.1 г достаточно для полного извлечения Cu, Mo, Sb, Bi.

Варьирование концентрации соляной кислоты. Кривые зависимости степени извлечения аналитов сорбентом ЭД от кислотности раствора (рис. 4) показали, что концентрация 0.6 М (что соответствует растворению пробы в 0.1 мл НСl с последующим разбавлением до 10 мл) достаточна для полного растворения пробы и способствует полному извлечению целевых примесей. Кроме того, с увеличением концентрации ионов водорода степень извлечения хлорокомплексов целевых аналитов уменьшается. Полученная закономерность объясняется частичным разрушением сорбента в сильноокислых средах и возможным образованием сульфидов, нерастворимых в водных растворах и соляной кислоте.

Оценка селективности S,N-содержащего сорбента. Методом АЭС-ИСП установили, что в растворах до и после сорбции концентрация эрбия одинакова. Это означает, что сорбент ЭД не способен извлекать матричные редкоземельные элементы. В промывом сорбционном концентрате методом ДАЭА установлено содержание эрбия на уровне фонового сигнала, что не мешает определению целевых элементов.

Таблица 5. Степень сорбционного извлечения элементов (%) из растворов с редкоземельной матрицей

Элемент	Nd ₂ O ₃		Er ₂ O ₃		SmCo		NdFeB	
	ПТЭ	ЭД	ПТЭ	ЭД	ПТЭ	ЭД	ПТЭ	ЭД
As	15	84	4	100	24	70	11	19
Cu	100	100	64	61	49	95	5	25
Se	100	100	12	11	80	85	100	100
Te	100	100	79	76	92	93	85	87
Bi	100	100	74	65	93	96	100	100
Mo	17	75	40	87	100	100	89	75
Ti	88	87	78	70	47	51	63	71
Sn	100	100	82	85	79	85	67	84
Zr	86	81	78	75	58	39	62	40
Sb	77	77	81	92	64	62	87	70

Условия сорбции: 0.6 М HCl, $m_{\text{сорбента}} = 0.1$ г, $V_{\text{жидкой фазы}} = 10$ мл, $t = 1$ ч, 100°C, $c_{\text{аналитов}} = 1$ мг/л, $c_{\text{матричных элементов}} = 2000$ мг/л.

Присутствие других элементов не мешает выделению аналитов. В растворе помимо целевых примесей присутствовали Al, As, B, Ba, Be, Ca, Cd, Co, Cr, In, Fe, Ga, Hf, K, Li, Mg, Mn, Na, Nb, Ni, Pb, Sc, Se, Si, Sn, Sr, Ta, Te, Ti, Tl, V, Zn, Zr в концентрациях, близких к концентрациям аналитов. Установлено, что они не снижали степень сорбционного извлечения Cu, Mo, Sb, Bi.

Выбор условий дугового атомно-эмиссионного анализа сорбционного концентрата. Условия ДАЭА, экспериментально установленные для определения примесей в сорбционном концентрате, представлены в табл. 6. Выбраны аналитические линии, наиболее свободные от спектральных наложений. Оптимальным режимом работы генератора

является постоянный положительный ток силой 20 А. В этих условиях разряд стабильнее, пробу не выбрасывает из электрода, в отличие от переменных режимов.

Изучение испарения пробы из нижнего электрода показало, что наиболее устойчивое состояние столба дуговой плазмы обеспечивается использованием электрода с кратером диаметром 5 мм, глубиной 4 мм, толщиной стенок 0.5 мм, без обточки и без шейки. Это обусловлено тем, что сорбент состоит в основном из серы, которая является легкоионизируемым элементом. Самый устойчивый электрический разряд и самую высокую интенсивность аналитических линий удалось до-

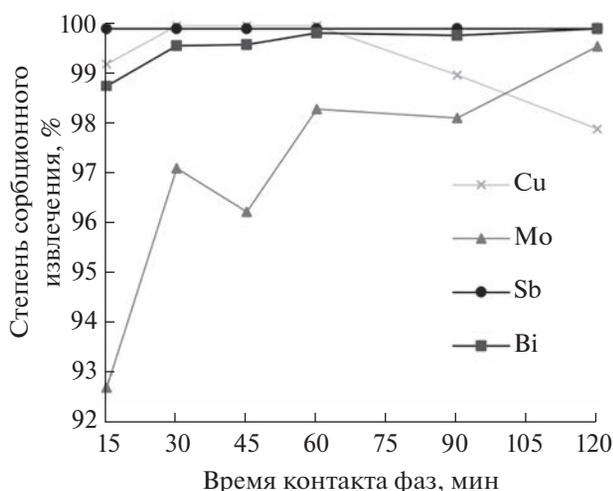


Рис. 1. Зависимость степени сорбционного извлечения от времени контакта фаз. Условия сорбции: 0.6 М HCl, $m_{\text{сорбента}} = 0.1$ г, $V_{\text{жидкой фазы}} = 10$ мл, 100°C, $c_{\text{аналитов}} = 1$ мг/л, $c_{\text{матричных элементов}} = 2000$ мг/л.

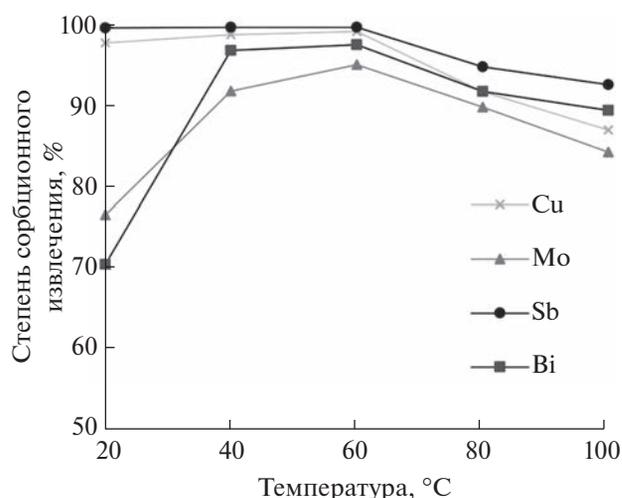


Рис. 2. Зависимость сорбционного извлечения от температуры. Условия сорбции: 0.6 М HCl, $m_{\text{сорбента}} = 0.1$ г, $V_{\text{жидкой фазы}} = 10$ мл, $t = 1$ ч, $c_{\text{аналитов}} = 1$ мг/л, $c_{\text{матричных элементов}} = 2000$ мг/л.

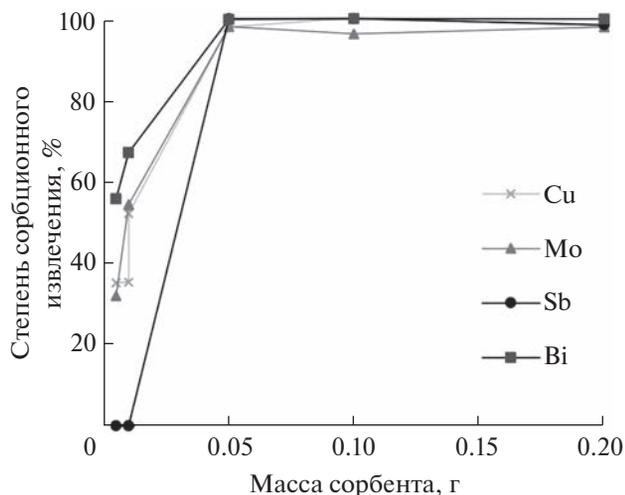


Рис. 3. Зависимость степени сорбционного извлечения от массы сорбента. Условия сорбции: 0,6 М HCl, $V_{\text{жидкой фазы}} = 10$ мл, $t = 1$ ч, 60°C , $c_{\text{аналитов}} = 1$ мг/л, $c_{\text{матричных элементов}} = 2000$ мг/л.

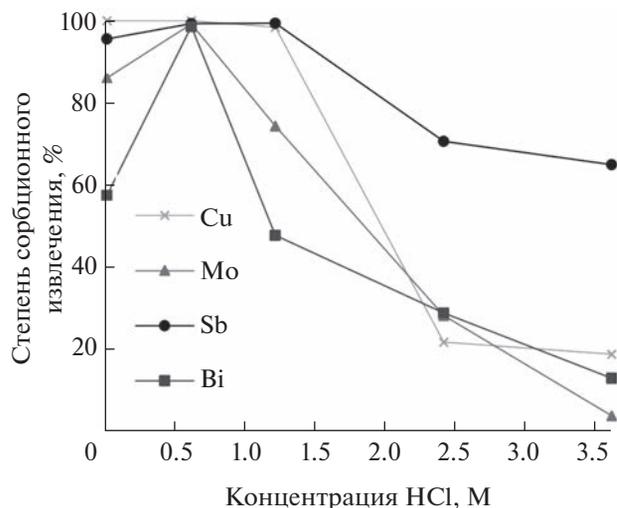


Рис. 4. Зависимость степени сорбционного извлечения от концентрации соляной кислоты. Условия сорбции: $m_{\text{сорбента}} = 0,1$ г, $V_{\text{жидкой фазы}} = 10$ мл, $t = 1$ ч, 60°C , $c_{\text{аналитов}} = 1$ мг/л, $c_{\text{матричных элементов}} = 2000$ мг/л.

стичь с использованием верхнего электрода в форме конуса с углом 60° .

Установили, что только в случае разбавления сорбента графитовым порошком (г. п.) в шесть раз пробу не выбрасывает из кратера электрода, поэтому для анализа выбрали соотношение $m_{\text{сорбент}} : m_{\text{г. п.}} = 1 : 5$.

Результаты эксперимента с носителями (Ga_2O_3 , GeO , NaCl , KCl , NaF , NaI) показали, что введение оксида германия способствует увеличению интенсивности аналитических линий, его выбрали для дальнейших экспериментов. Галогениды натрия и калия, наоборот, снижают интенсивности аналитических линий, к тому же в составе

сорбционного концентрата присутствуют хлорид-ионы из соляной кислоты.

Варьирование межэлектродного расстояния показало, что интенсивности аналитических линий изменяются незначительно, однако расстояние 3 мм является оптимальным с точки зрения стабильности плазменного разряда в процессе горения дуги. Несмотря на то, что при увеличении межэлектродного расстояния увеличивается интенсивность аналитических линий из-за большего времени пребывания элементов в зоне разряда вследствие увеличения размера области дуговой плазмы, приняли решение использовать меж-

Таблица 6. Условия дугового атомно-эмиссионного анализа

Параметр	Значение
Аналитические линии, нм	
• Bi	251.57; 289.80; 293.83; 299.33
• Cu	212.30; 228.66; 249.21; 282.44
• Mo	315.82; 320.88; 204.60; 345.64
• Sb	217.58; 231.15; 259.81; 277.00
Ток	Постоянный 20 А
Электрод нижний	\varnothing 5 мм
(\varnothing – диаметр электрода; \downarrow – глубина электрода; t – толщина стенок электрода)	\downarrow 4 мм
	t 0,5 мм
Электрод верхний	Конус 60°
Межэлектродное расстояние, мм	3
Соотношение $m(\text{сорбент}) : m(\text{г. п.})$	1 : 5
Носитель	GeO
Время экспозиции, с	25

Таблица 7. Результаты (мас. %) анализа образца с аттестованными значениями содержаний элементов ($x_i \pm \Delta_i$ при $P = 0.95$, $n = 3$)

Элемент	Найдено				Аттестованное значение			
	Nd ₂ O ₃	Er ₂ O ₃	SmCo	NdFeB	Nd ₂ O ₃	Er ₂ O ₃	SmCo	NdFeB
Cu	$(1.9 \pm 0.2) \times 10^{-2}$	$(3.7 \pm 0.2) \times 10^{-2}$	$(2.4 \pm 0.2) \times 10^{-4}$	$(8.7 \pm 0.2) \times 10^{-4}$	1.7×10^{-2}	3.7×10^{-2}	2.3×10^{-4}	8.9×10^{-2}
Mo	$(5.5 \pm 0.1) \times 10^{-4}$	$(2.6 \pm 0.2) \times 10^{-3}$	$(3.9 \pm 0.1) \times 10^{-5}$	$(7.2 \pm 0.1) \times 10^{-3}$	5.6×10^{-4}	2.8×10^{-3}	4.0×10^{-5}	7.1×10^{-3}
Sb	$(3.5 \pm 0.3) \times 10^{-3}$	$(5.5 \pm 0.3) \times 10^{-3}$	$(2.2 \pm 0.1) \times 10^{-2}$	$(2.2 \pm 0.2) \times 10^{-3}$	3.4×10^{-3}	5.4×10^{-3}	2.1×10^{-2}	2.4×10^{-3}
Bi	$(2.0 \pm 0.3) \times 10^{-4}$	$(8.9 \pm 0.3) \times 10^{-4}$	$(6.4 \pm 0.3) \times 10^{-5}$	$(1.9 \pm 0.3) \times 10^{-5}$	2.2×10^{-4}	8.7×10^{-4}	6.7×10^{-5}	2.0×10^{-4}

Условия сорбции: 0.6 М HCl, сорбент ЭД, $m_{\text{сорбента}} = 0.1$ г, $V_{\text{жидкой фазы}} = 10$ мл, $t = 1$ ч, 60°C , $m_{\text{навески}} = 0.05$ г.

электродное расстояние 3 мм, потому что при больших значениях межэлектродного расстояния пробу выбрасывает из кратера электрода.

В результате исследования кривых испарения выбрали индивидуальное время экспозиции для каждого элемента-примеси. Установили, что для полного испарения висмута достаточно 10 с, меди – 12 с, молибдена – 15 с, а сурьмы – 25 с.

Нижняя граница диапазона определяемых содержаний целевых элементов находится на уровне 1×10^{-5} – 1×10^{-4} мас. %; относительное стандартное отклонение лежит в диапазоне от 2 до 18%.

Анализ реальных проб методом дугового атомно-эмиссионного анализа с определением примесей в фазе концентрата. Правильность результатов, полученных по разработанной методике, контролировали анализом образцов с аттестованными значениями содержания аналитов. Как видно из данных табл. 7, полученные результаты согласуются с аттестованными значениями.

Применение сорбционного концентрирования в дуговом анализе применительно к матрицам на основе редкоземельных элементов является новым методическим решением, позволяющим с высокой чувствительностью (до 10^{-5} мас. %) и селективностью устанавливать целевую чистоту исходного сырья, полупродуктов и конечных продуктов с точностью 2–18%. Показана перспективность дальнейших разработок современных дуговых химико-спектральных методик для анализа веществ и материалов в твердой фазе.

Использовано оборудование ЦКП ФМИ ИОНХ РАН. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 20-13-00180-П).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhou B., Li Z., Chen C. Global potential of rare earth resources and rare earth demand from clean technologies // Minerals. 2017. V. 7. P. 203. <https://doi.org/10.3390/min7110203>
2. Binnemans K., Jones P.T., Müller T., Yurramendi L. Rare earths and the balance problem: How to deal with changing markets? // J. Sustain. Metall. 2018. V. 4. P. 126. <https://doi.org/10.1007/s40831-018-0162-8>
3. Ritter S.K. A whole new world for rare earths. How the technologically important metals rose from obscurity to ubiquity // Chem. Eng. News. 2017. V. 95. № 34. P. 30.
4. Zheng Z., Wang S., Long J., Wang J., Zheng K. Effect of rare earth elements on high temperature oxidation behaviour of austenitic steel // Corrosion Science. 2020. V. 164. Article 108359. <https://doi.org/10.1016/j.corsci.2019.108359>
5. Zhang M., Wang X.H., Qu K.L., Liu S.S. Effect of rare earth oxide on microstructure and high temperature oxidation properties of laser cladding coatings on 5CrNiMo die steel substrate // Optics Laser Technol. 2019. V. 119. Article 105597. <https://doi.org/10.1016/j.optlastec.2019.105597>
6. Mayilsamy P., Kumareshababu S.P., Nayan K., Srinivasan S.A. Mechanical property study on C90300 copper composites reinforced with rare earth oxide // Materials Today: Proceedings. 2019. V. 27. № 3. P. 2533. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.09.231>
7. Юрасова О.В., Самиева Д.А., Кошель Е.С., Карпов Ю.А. Получение и контроль качества высокочистых оксидов редкоземельных металлов для кристаллов сцинтилляторов детектирующих медицинских систем // Изв. высш. учеб. завед. Цветная металлургия. 2022. Т. 28. № 1. С. 27. <https://doi.org/10.17073/0021-3438-2022-1-27-38>
8. Кольчугина Н.Б. Очистка редкоземельных металлов цериевой подгруппы для фундаментальных исследований и разработки новых материалов: I. Зонная перекристаллизация // Перспективные материалы. 2011. № 4. С. 5.
9. Карпов Ю.А., Хомутова Е.Г., Никитина А.А., Богатырев В.С. Сравнительный анализ номенклатуры

- и требований по качеству редкоземельной продукции в России и за рубежом // Химическая технология. 2004. № 6. С. 43.
10. ТУ 48-4-483-87. Скандий кристаллический. Технические условия. Янв. 2007 с изм. 1–5. Гиредмет, 2007.
 11. ГОСТ 23862.0-79 – ГОСТ 23862.36-79. Редкоземельные металлы и их оксиды. Методы анализа. М.: Издательство стандартов, 2003. 276 с.
 12. Zhang X., Yi Y., Liu Y., Li X., Liu J., Jiang Y., Su Y. Direct determination of rare earth impurities in high purity erbium oxide dissolved in nitric acid by inductively coupled plasma mass spectrometry // Anal. Chim. Acta. 2006. V. 555. № 1. P. 57.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.08.055>
 13. Nikolaeva I.V., Paleskii S.V., Koz'menko O.A., Anoshin G.N. Analysis of geologic reference materials for REE and HFSE by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) // Geochem. Int. 2008. V. 46. P. 1016.
<https://doi.org/10.1134/S0016702908100066>
 14. Лейкин А.Ю., Карандашев В.К., Лисовский С.В., Волков И.А. Использование реакционно-столкновительной ячейки для определения примесных элементов в редкоземельных металлах методом ИСП-МС // Заводск. лаборатория. Диагностика материалов. 2014. Т. 80. № 5. С. 6.
 15. Евдокимов И.И., Пименов В.Г. Определение примесей в оптической керамике и ее прекурсорах методами атомной спектроскопии // Вестн. Нижегород. ун-та им. Н.И. Лобачевского. 2012. № 4 (1). С. 98.
 16. Цыганкова А.Р., Лундовская О.В., Сапрыкин А.И. Анализ соединений европия, иттрия и лантана методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой // Журн. аналит. химии. 2016. Т. 71. № 2. С. 185.
<https://doi.org/10.7868/S0044450216020158>
 17. Цветянский А.Л., Еритенко А.Н. Рентгенофлуоресцентное определение высоких содержаний иттрия в редкоземельных концентратах // Заводск. лаборатория. Диагностика материалов. 2006. Т. 72. № 6. С. 25.
 18. Schramm R. Use of X-ray fluorescence analysis for the determination of rare earth elements // Phys. Sci. Rev. 2016. V. 1. № 9. Article 20160061.
<https://doi.org/10.1515/psr-2016-0061>
 19. Papai R., Aparecida M., de Freitas S., da Fonseca K.T., de Almeida G.A., da Silveira J.R.F., da Silva A.L.N., Neto J.B.F., dos Santos C.A.L., Landgraf F.J.G., Luz M.S. Additivity of optical emissions applied to neodymium and praseodymium quantification in metallic didymium and (Nd,Pr)-Fe-B alloy samples by low-resolution atomic emission spectrometry: An evaluation of the mathematical approach used to solve spectral interferences // Anal. Chim. Acta. 2019. V. 1085. P. 21.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.07.049>
 20. Swain K.K., Kayasth S. High purity scandium and ion-exchangers: application in neutron activation analysis // J. Radioanal. Nucl. Chem. 2004. V. 260. № 3. P. 595.
 21. Трунов В.А. Исследование связи структурных и физико-химических свойств катализаторов на основе Zr- и редкоземельных элементов нейтронными методами (дифракция, активационный анализ): отчет о НИР/НИОКР С.-Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова РАН (СПБЯФ РАН); Санкт-Петербург, 1998. Номер гранта (контракта): 96-02-18462. <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=753214> (18.05.2023)
 22. Товтин В.И., Иванов Л.И., Платов Ю.М., Лазоренко В.М., Догадкин Н.Н., Колотов В.П. Многоэлементный гамма-активационный анализ металлов и сплавов с использованием источникускорителя электронов “Микротрон-Ст” // Перспективные материалы. 2011. № S13. С. 837.
 23. Карандашев В.К., Жерноклеева К.В., Туранов А.Н., Барановская В.Б., Карпов Ю.А. Определение примесей тугоплавких металлов в редкоземельных металлах и их соединениях // Журн. аналит. химии. 2012. Т. 67. № 4. С. 383.
 24. Петрова К.В., Еськина В.В., Барановская В.Б., Доронина М.С., Короткова Н.А., Архипенко А.А. Обзор способов извлечения и концентрирования примесей в материалах на основе редкоземельных элементов для методов спектрального и масс-спектрального анализов // Известия вузов. Цветная металлургия. 2022. Т. 28. № 4. С. 25. (Petrova K.V., Es'kina V.V., Baranovskaya V.B., Doronina M.S., Korotkova N.A., Arkhipenko A.A. Separation and pre-concentration of impurities in rare-earth-based materials for spectrometric methods // Russ. J. Non-ferrous Metals. 2022. V. 63. P. 510.
<https://doi.org/10.3103/S106782122205008X>
<https://doi.org/10.17073/0021-3438-2022-4-25-44>
 25. Гусельникова Т.Я., Цыганкова А.Р., Сапрыкин А.И. Атомно-эмиссионный спектральный анализ диоксида германия с предварительным концентрированием примесей // Заводск. лаборатория. Диагностика материалов. 2019. Т. 85. № 1. С. 50.
<https://doi.org/10.26896/1028-6861-2019-85-1-II-50-55>
 26. Шелпакова И.Р., Шестаков В.А., Цыганкова А.Р., Петрова Н.И. Методика анализа триоксида вольфрама с концентрированием примесей отгонкой основы пробы и физико-химическое моделирование поведения примесей в этом процессе // Аналитика и контроль, 2010. Т. 14. № 3. С. 157.
 27. Цыганкова А.Р., Шелпакова И.Р., Сапрыкин А.И. АЭС анализ триоксида молибдена с предварительным концентрированием примесей отгонкой основы / Материалы X Международного симпозиума “Применение анализаторов МАЭС в промышленности”. Новосибирск (Академгородок). 4–7 августа 2009 г. С. 60.
 28. Шелпакова И.Р., Чаяшсва Т.А., Цыганкова А.Р., Родионов С.Г., Троицкий Д.К., Петрова Н.И., Сапрыкин А.И. Атомно-эмиссионный спектральный анализ оксида висмута с концентрированием примесей реакционной отгонкой основы пробы // Заводск. лаборатория. Диагностика материалов. 2007. Т. 73. № 8. С. 15.
 29. Черняева Е.А., Лебедева Р.В., Туманова А.Н., Машин Н.И. Матричные влияния при атомно-эмиссионном анализе селена с концентрированием примесей // Вестн. Нижегород. ун-та им. Н.И. Лобачевского. 2013. № 6 (1). С. 119.
 30. Oskolok K.V., Dmitrienko S.G. Direct atomic-emission determination of metals on polyurethane foam sorbents

- with use of multichannel analyzer of emission spectra “МАЭС” / Материалы VIII Международного симпозиума “Применение анализаторов МАЭС в промышленности”. Новосибирск (Академгородок). 14–17 августа 2007 г. С. 77.
31. *Otruba V., Strnadová M., Skalníková B.* Determination of platinum in plants by emission spectrometry after preconcentration on modified silicagel // *Talanta*. 1993. V. 40. № 2. 1993. P. 221.
 32. *Бобылев А.Е.* Синтез, структура и функциональные свойства композиционных сорбентов “Катионит КУ-2 × 8-МеS (Me-Cu(II), Zn, Pb)” Дис. ... канд. хим. наук. Уральский федеральный университет имени первого президента России Б.Н. Ельцина (УрФУ), 2016. 160 с.
 33. *Zhang Y.-J., Ou J.-L., Duan Z.-K., Xing Z.-J., Wang Y.* Adsorption of Cr(VI) on bamboo bark-based activated carbon in the absence and presence of humic acid // *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*. 2015. V. 481. P. 108. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.04.050>
 34. *Bulut Y., Baysal Z.* Removal of Pb(I) from wastewater using wheat bran // *J. Environ. Manag.* 2006. V. 78. P. 107. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2005.03.010>
 35. *Wan Ngah W.S., Endud C.S., Mayanar R.* Removal of copper(II) ions from aqueous solution onto chitosan and cross-linked chitosan // *React. Funct. Polym.* 2002. V. 50. P. 181. [https://doi.org/10.1016/S1381-5148\(01\)00113-4](https://doi.org/10.1016/S1381-5148(01)00113-4)
 36. *Li N., Bai R.* Copper adsorption on chitosan-cellulose hydrogel beads: behaviors and mechanisms // *Sep. Purif. Technol.* 2005. V. 42. P. 237. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2004.08.002>
 37. *Pan B.C., Zhang Q.R., Du W., Zhang W.M., Pan B.J., Zhang Q.J., Xu Z.W., Zhang Q.X.* Selective heavy metals removal from waters by amorphous zirconium phosphate: Behavior and mechanism // *Water Research*. 2007. V. 41. № 14. P. 3103. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.03.004>
 38. *Pan B.C., Zhang Q.R., Zhang W.M., Pan B.J., Du W., Lv L., Zhang Q.J., Xu Z.W., Zhang Q.X.* Highly effective removal of heavy metals by polymer-based zirconium phosphate: A case study of lead ion // *J. Colloid Interface Sci.* 2007. V. 310. № 1. P. 99. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.01.064>
 39. *Петров А.М.* Определение примесного состава чистых цветных и редких металлов методом дугового атомно-эмиссионного анализа с применением МАЭС. Дис. ... канд. хим. наук. Москва: Государственный научно-исследовательский и проектный институт редкометаллической промышленности “Гиредмет”, 2012. 191 с.
 40. *Доронина М.С., Ширяева О.А., Филатова Д.Г., Петров А.М., Дальнова О.А., Барановская В.Б., Карпов Ю.А.* Сорбционно-атомно-эмиссионное определение As, Bi, Sb, Se и Te в возвратном металлсодержащем сырье // *Заводск. лаборатория. Диагностика материалов*. 2013. Т. 79. № 11. С. 3. (*Doronina M.S., Shiryaeva O.A., Petrov A.M., Dal'nova O.A., Baranovskaya V.B., Karpov Y.A., Filatova D.G.* Sorption atomic emission determination of As, Bi, Sb, Se, and Te in recyclable metal-containing raw material // *Inorg. Mater.* 2014. V. 50. № 14. P. 1426.) <https://doi.org/10.1134/S0020168514140040>
 41. *Петров А.М., Климова О.И., Дальнова О.А., Карпов Ю.А.* Определение золота и платиновых металлов во вторичном и техногенном сырье сорбционно-атомно-эмиссионным методом с МАЭС // *Заводск. лаборатория. Диагностика материалов*. 2013. Т. 79. № 2. С. 14. (*Petrov A.M., Klimova O.I., Dal'nova O.A., Karpov Y.A.* Determination of gold and platinum metals in second hand and technogenic materials with the use of the sorption atomic emission method with a multichannel emission spectrum analyzer // *Inorg. Mater.* 2014. V. 50. № 14. P. 1387.) <https://doi.org/10.1134/S0020168514140118>
 42. *Кошель Е.С., Барановская В.Б., Доронина М.С.* Дуговой атомно-эмиссионный анализ редкоземельных металлов и их оксидов с предварительным сорбционным концентрированием примесей // *Заводск. лаборатория. Диагностика материалов*. 2018. Т. 84. № 11. С. 9. <https://doi.org/10.26896/1028-6861-2018-84-11-9-14>
 43. *Доронина М.С., Ширяева О.А., Филатова Д.Г., Барановская В.Б., Карпов Ю.А.* Определение мышьяка, кадмия, селена и теллура в техногенном сырье после сорбционного концентрирования на гидроксидах методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой // *Заводск. лаборатория. Диагностика материалов*. 2013. Т. 79. № 8. С. 3.
 44. *Еськина В.В., Дальнова О.А., Карева Е.Н., Барановская В.Б., Карпов Ю.А.* Определение примесей в высокочистом оксиде ниобия(V) методом атомно-абсорбционной спектроскопии высокого разрешения с электротермической атомизацией и непрерывным источником спектра после предварительного сорбционного концентрирования // *Журн. аналит. химии*. 2017. Т. 72. № 6. С. 562. <https://doi.org/10.7868/S0044450217060056>
 45. *Филатова Д.Г., Архипенко А.А., Статкус М.А., Еськина В.В., Барановская В.Б., Карпов Ю.А.* Сорбция Se(IV) из водных растворов и его определение рентгенофлуоресцентным методом // *Заводск. лаборатория. Диагностика материалов*. 2020. Т. 86. № 10. С. 5. (*Filatova D.G., Arkhipenko A.A., Statkus M.A., Es'kina V.V., Baranovskaya V.B., Karpov Y.A.* Sorption of Se(IV) from aqueous solutions with subsequent determination by X-ray fluorescence analysis // *Inorg. Mater.* 2021. Т. 57. № 14. С. 1427. <https://doi.org/10.1134/S0020168521140053>) <https://doi.org/10.26896/1028-6861-2020-86-10-5-9>
 46. *Цизин Г.И., Малофеева Г.И., Петрухин О.М., Клещев Н.А., Гембицкий П.А., Золотов Ю.А.* Способ получения полимерного сорбционного материала. Патент СССР № 1578145. Номер заявки: 4292114 от 31.07.1987, опубл. 15.07.1990.
 47. *Шестаков В.А., Малофеева Г.И., Петрухин О.М., Марчева Е.В., Эсенова Н.К., Муринов Ю.И., Никитин Ю.Е., Золотов Ю.А.* Сорбционно-рентгенофлуоресцентное определение тяжелых металлов с использованием полимерного тиоэфира // *Журн. аналит. химии*. 1983. Т. 38. № 12. С. 2131.
 48. *Петрухин О.М., Малофеева Г.И., Нефедов В.И., Салынь Я.В., Марчева Е.В., Шестаков В.А., Ширя-*

- ева О.А., Муринов Ю.И., Никитин Ю.Е., Золотов Ю.А. Сорбция платиновых металлов полимерным тиоэфиром // Журн. аналит. химии. 1983. Т. 38. № 2. С. 250.
49. Филатова Д.Г., Архипенко А.А., Статкус М.А., Михеев И.В., Барановская В.Б., Карпов Ю.А. Сорбция As(III) и Se(IV) из водных растворов для определения методом рентгенофлуоресцентного анализа с полным внешним отражением // Заводск. лаборатория. Диагностика материалов. 2021. Т. 87. № 8. С. 19. (Filatova D.G., Arkhipenko A.A., Statkus M.A., Mikheev I.V., Baranovskaya V.B., Karpov Yu.A. Sorption of As(III) and Se(IV) from aqueous solutions for subsequent determination by total reflection X-ray fluorescence // Inorg Mater. 2022. V. 58. P. 1435. <https://doi.org/10.1134/S0020168522140060>) <https://doi.org/10.26896/1028-6861-2021-87-8-19-22>
50. Arkhipenko A.A., Petrova K.V., Baranovskaya V.B. Sorption preconcentration and analytical determination of Cu, Zr and Hf in waste samarium–cobalt magnet samples // Molecules. 2022. V. 27. P. 5275. <https://doi.org/10.3390/molecules27165275>
51. Дальнова Ю.С., Ковтуненко С.В., Иващенко А.А., Алексеев С.В., Орехов С.В. Способ интенсификации сорбционного процесса благородных металлов на сорбентах типа тиоэфиров и аминотиоэфиров. Патент РФ № 2205239. Заявка № 2001121211/02 от 27.07.2001, опубл. 27.05.2003.
52. Дальнова О.А., Барановская В.Б., Дальнова Ю.С., Карпов Ю.А. Новые комплексообразующие полимерные аминотиоэфирные сорбенты в аналитическом контроле возвратного металлосодержащего сырья редких и благородных металлов // Журн. аналит. химии. 2018. Т. 73. № 3. С. 181. <https://doi.org/10.7868/S0044450218030027>
53. Korotkova N.A., Baranovskaya V.B., Petrova K.V. Microwave digestion and ICP-MS determination of major and trace elements in waste Sm-Co magnets // Metals. 2022. V. 12. № 8. P. 1. <https://doi.org/10.3390/met12081308>
54. Shen H., Huang G., Zhang W.G., Ding W., Wang W.D., Zhou X.S., Shi L.Q., Peng S.M. Influencing factors of helium bubble growth in erbium tritides: Grain size and impurity element // J. Alloys Comp. 2021. V. 860. Article 157911. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2020.157911>
55. Liu X., He J.-H., Sakthivel R., Chung R.-J. Rare earth erbium molybdate nanoflakes decorated functionalized carbon nanofibers: An affordable and potential catalytic platform for the electrooxidation of phenothiazine // Electrochim. Acta. 2020. V. 358. Article 136885. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2020.136885>
56. Moustafa S.Y., Sahar M.R., Ghoshal S.K. Erbium ions oscillator strength and emission enhancement in antimony phosphate amorphous matrix // J. Non-Cryst. Solids. 2016. V. 433. P. 87. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2015.10.038>
57. Capoen E., Nowogrocki G., Chater R.J., Skinner S.J., Kilner J.A., Malys M., Boivin J.C., Mairesse G., Vanier R.N. Oxygen permeation in bismuth-based materials. Part II: Characterisation of oxygen transfer in bismuth erbium oxide and bismuth calcium oxide ceramic // Solid State Ionics. 2006. V. 177. № 5–6. P. 489. <https://doi.org/10.1016/j.ssi.2005.12.034>

ОПРЕДЕЛЕНИЕ 15 БИОМАРКЕРОВ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ В МОЧЕ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С ТАНДЕМНЫМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

© 2023 г. М. А. Ленинский^а, *, Е. И. Савельева^а,
М. В. Беляков^а, Г. В. Каракашев^а, Н. А. Самченко^а

^аНаучно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека
Федерального медико-биологического агентства России
ст. Капитолово, г.п. Кузьмоловский, Всеволожский район, Ленинградская обл., 188663 Россия

*e-mail: m.leninskii@yandex.ru

Поступила в редакцию 11.04.2023 г.

После доработки 24.04.2023 г.

Принята к публикации 25.04.2023 г.

Обсуждены возможности и ограничения комплексных процедур целевого метаболомного анализа с применением жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС). Представлена ВЭЖХ-МС/МС-методика, позволяющая одновременно определять содержание 15 биомаркеров функционального состояния человека в моче. В качестве целевых аналитов выступают биогенные вещества различной химической природы, базовые концентрации которых в биоматрицах могут различаться значительно – до трех порядков величины и более. Сложность комплексного анализа обусловлена также значительными различиями в гидрофильно-гидрофобных свойствах определяемых веществ. Апробация методики в биоаналитическом эксперименте позволила установить значимые различия в концентрациях ряда биомаркеров в моче людей с разным уровнем физической подготовки. При высоком уровне физической подготовки концентрации этих соединений в моче имеют более низкие значения в сравнении с контрольной группой.

Ключевые слова: жидкостная хроматография, масс-спектрометрическое детектирование, метаболомика, биомаркеры функционального состояния, анализ мочи.

DOI: 10.31857/S0044450223090074, **EDN:** ZWYNLZ

Масс-спектрометрические методы все чаще применяют в биомедицине, особенно для ранней диагностики и мониторинга заболеваний. Наиболее активно развиваются биоаналитические технологии, использующие в качестве анализируемого материала диагностические биосреды, отобранные неинвазивным способом и транспортируемые из фельдшерского пункта любой отдаленной территории в профильные лаборатории. Важнейшее приложение аналитической масс-спектрометрии в медицине – функциональная диагностика. Функциональная диагностика с помощью инструментальных методов позволяет установить причину плохого самочувствия пациента, особенно в тех случаях, когда симптомы не дают четкой клинической картины. С развитием современных технологий появляется возможность все более раннего выявления сбоев в регуляторных процессах организма. Аналитическая масс-спектрометрия решает многие задачи функциональной диагностики. Возможности хромато-масс-спектрометрии реализу-

ются в функциональной диагностике преимущественно в рамках метаболомики [1].

Функциональная метаболомика, согласно оптимистичным прогнозам, в обозримом будущем от диагностики сможет перейти к “метаболомному перепрограммированию” [2], но в настоящее время развитие метаболомного подхода в функциональной диагностике сдерживается не столько темпами поиска надежных биомаркеров функционального состояния, сколько недостатком надежных и в то же время высокопроизводительных аналитических методик их определения.

Метаболомика стресса. Влияние стресса на функциональное состояние организма исследуют с давних времен и до наших дней. Стресс может быть как провоцирующим, так и усугубляющим фактором для многих заболеваний и патологических состояний, включая резистентность к инсулину [3], метаболический синдром [4], сердечно-сосудистые заболевания [5] и др. Метаболические реакции на стресс настолько обширны, много-

планы и в то же время индивидуальны, что в большинстве случаев не поддаются точному прогнозу и должны быть диагностированы [6]. Метаболические профили тканей и биожидкостей отражают функциональные изменения в организме. Определение метаболомных показателей биожидкостей позволяет не только выявлять реакции организма на стресс и оценивать изменения в физиологическом статусе, но и проводить мониторинг эффективности фармакологической поддержки в условиях стрессовых воздействий или их последствий.

Многоплановый метаболический ответ на стрессовое воздействие включает такие процессы, как нарушение метаболизма аминокислот и белков, нарушение липидного и углеводного обмена, механическое и/или химическое повреждение миоцитов и многие другие. Профиль низкомолекулярных метаболитов в биожидкостях складывается в результате целого комплекса биохимических процессов. Установить ключевые маркерные соединения, которые являлись бы индикаторами стрессовых воздействий, крайне сложно. Сложность, как это ни парадоксально, обусловлена не дефицитом научных данных, а их огромным количеством. Многочисленные исследования, выполненные средствами нецелевой метаболомики, выявили множество сигнальных биомаркеров применительно к конкретным воздействиям или заболеваниям. Если исследования проводятся с привлечением больших массивов данных, то значимыми оказываются эффекты, обусловленные даже незначительными однонаправленными изменениями концентраций метаболитов в исследуемых биосредах. Неизбежно возникает вопрос: можно ли считать эти незначительные изменения достоверными с учетом крайне низкой точности определения концентрации биомаркеров в нецелевой метаболомике. С другой стороны, зачастую одни и те же биомаркеры характеризуют метаболические последствия воздействия на организм стрессовых факторов различной природы, включая физическое перенапряжение [7, 8]. Это обстоятельство позволяет выделить группу стресс-маркеров, не ассоциированных с конкретным видом стресса. Можно полагать, что концентрации стресс-маркеров в диагностических биожидкостях тем ниже, чем выше ресурс устойчивости организма к стрессу. Однако эта гипотеза нуждается в проверке. Наиболее перспективным направлением представляется исследование мочевой сигнатуры физиологического состояния человека, складывающейся в результате определения абсолютных или нормированных к определенному показателю концентраций ограниченного набора биогенных веществ — стресс-маркеров.

Обоснование выбора мочи в качестве оптимальной биоматрицы. Метаболомные исследования мочи в последние годы оформились в качестве самостоятельного научного направления — уриномики.

Средствами уриномики исследуют нутрицевтические маркеры, маркеры водного баланса, мышечного статуса и т.д. Важнейшими в этом ряду являются маркеры толерантности к стрессовым нагрузкам, т.е. стресс-маркеры. Отбор мочи неинвазивен, может быть осуществлен без участия медперсонала, не требует обеспечения стерильности. В отличие от плазмы крови, моча не требует специальной обработки сразу после отбора, состав органических соединений в моче в меньшей степени подвержен искажениям в процессе отбора, хранения и транспортировки. Как правило, концентрации биогенных аналитов в моче не меняются значительно при прохождении нескольких циклов заморозки-разморозки. Моча в сравнении с кровью менее насыщена органическими соединениями, которые могут окисляться сами, а также выступать в качестве промоторов процесса окисления. В работе [9] сообщается, что в образцах мочи уровни метаболитов признаны стабильными в течение как минимум 24 ч при 10°C и 4 недель при 4°C. Для плазмы и особенно для сыворотки крови установленные периоды стабильности значительно короче.

Моча, в отличие от крови, не имеет механизмов для поддержания гомеостаза, поэтому метаболические профили мочи более изменчивы и быстрее откликаются на стрессовые воздействия.

Целевая метаболомика мочи. В целевой метаболомике достижение низких пределов определения аналитов не всегда является приоритетом, поскольку биогенные аналиты (метаболиты) присутствуют в пробах преимущественно в высоких концентрациях. Наиболее жесткие требования в целевой метаболомике предъявляются к достоверности количественных определений. В настоящее время не существует единого мнения относительно оптимального способа нормализации концентраций биомаркеров в моче. Нормализация необходима, так как содержание воды в моче зависит от ее потребления и ряда других физиологических факторов. Нормализация с отнесением к таким показателям, как концентрация креатинина, плотность, осмоляльность, вероятностная или интегральная нормализация используется наиболее часто [10]. После проведения нецелевого метаболомного анализа с использованием ВЭЖХ-МС/МС в качестве аналитического метода Розен-Волмар с соавт. [11] сравнил эффективность трех распространенных подходов для корректировки концентраций мочевых метаболитов — нормализацию по креатинину, по удельному весу (плотности) и вероятностную нормализацию (probabilistic quotient normalization, **PQN**). Результаты показали, что нормализация по креатинину не является надежным подходом для корректировки данных метаболомики мочи. Нормализация по плотности, либо **PQN** были охарактеризованы как более надежные подходы. Причиной ненадежности нормали-

зации данных метаболомных исследований по креатинину, по всей вероятности, следует считать то обстоятельство, что креатинин сам является чувствительным биомаркером, вовлеченным в реализацию ответов на внешние воздействия.

Разработка, валидация и практическая реализация методик для контроля физиологического статуса человека предусматривают решение следующих задач:

– обоснование группы диагностических маркеров, определяемых в биообразцах и характеризующих процессы липолиза, гликолиза, энергетического метаболизма в целом, нейропередачи, метаболизма пуринов, холина, креатина;

– разработка аналитической стратегии для определения группы актуальных стресс-маркеров в биопробе;

– определение фоновых концентраций выбранных биомаркеров в исследуемой биопробе (моче), а также ориентировочная оценка вариаций фоновых концентраций, обусловленных влиянием стрессовых факторов;

– определение концентрационных интервалов, в рамках которых необходимо выполнять измерения для каждого аналита-биомаркера и построение градуировочных характеристик внутри установленных интервалов.

На сегодняшний день приемлемой точности определения концентраций биогенных веществ в биопробах можно добиться только в режиме целевого анализа. При определении органических кислот в моче, по мнению ряда авторов [12, 13], стоит отдавать предпочтение газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием, позволяющей добиваться эффективного разделения компонентов и работать в области низких матричных эффектов. Такие методики более длительны и трудоемки в исполнении по сравнению с ВЭЖХ-МС/МС, поскольку помимо экстракции включают проведение дериватизации.

Для определения аналитов, представленных группой веществ в широком диапазоне кислотно-основных свойств, методом выбора, как правило, является ВЭЖХ-МС/МС. В технике “dilute and shoot” [14] при подготовке к ВЭЖХ-МС/МС-анализу экстракция аналитов из биоматриц не проводится, поэтому нет необходимости последовательно извлекать аналиты кислой и основной природы, варьируя рН. Если предельную погрешность анализа установить на уровне 25–30%, то в рамках одной ВЭЖХ-МС/МС-методики можно определять все же ограниченное количество соединений, характеризующихся разной химической природой и разным уровнем фоновых концентраций. В целевой метаболомике мочи с 80-х годов прошлого века и до настоящего времени преобладают исследования, посвященные такой наиважнейшей теме, как диагностика врожденных мета-

болических расстройств. По мере появления новой информации о биомаркерах врожденных заболеваний появляется потребность в методиках, охватывающих определение все большего количества аналитов. В работе [15] описано определение в моче 71 аналита методом ВЭЖХ-МС/МС с времяпролетным детектором. Полного хроматографического разделения аналитов, судя по масс-хроматограммам, представленным в дополнительных материалах к статье, достичь не удалось, кроме того, не получены хроматографические пики правильной формы для большинства аналитов, однако методу удалось валидировать с приемлемыми метрологическими характеристиками.

Авторы работы [16] предложили процедуру для определения 142 мочевых метаболитов, относящихся к разным классам соединений. Из 142 метаболитов 67 определили количественно, остальные – полуквантитивно. В отличие от целевой метаболомики наследственных болезней, метаболомика стресса гораздо менее изучена, формирование метаболической сигнатуры стресса – вопрос будущего, несмотря на то, что биохимические основы стресса глубоко и всесторонне изучены.

Формирование группы целевых аналитов. Формируя набор стресс-маркеров, определяемых в моче, мы ориентировались на работы, выполненные в режиме нецелевой метаболомики, причем с использованием не только мочи, но и крови в качестве биоматрицы. При этом мы исходили из того, что неконъюгированные полярные аналиты быстро фильтруются через почки и выделяются с мочой. С учетом современных представлений о биохимии стресса [17] сформирована группа актуальных биомаркеров:

1) вторичные продукты метаболизма аденозинтрифосфорной кислоты: инозин и гипоксантин как маркеры сердечно-сосудистых рисков [18, 19];

2) ацетилкарнитин, аденозин и креатин как маркеры энергетического метаболизма и нейропередачи [20, 21];

3) 3-метилглутидин и 2-гидрокси-2-метилбутират как маркеры миофибрилярного протеолиза, риска потери мышечной массы [22, 23];

4) треонин как маркер катаболических процессов [24];

5) триптамин (продукт микробной биотрансформации триптофана) как маркер иммунного статуса организма [25, 26];

6) 3-гидроксибутират, 3-гидрокси-3-метилбутират и 2-гидроксибутират как маркеры катаболизма жирных кислот и кетоаминокислот [27];

7) молочная кислота как маркер гипоксии [28, 29];

8) уридин как маркер нейродегенеративных процессов [30];

9) креатинин как маркер нарушения функций выделительной системы [31].

Для выбранных биомаркеров возможность однозначной трактовки концентраций в моче отсутствует. Систематические данные по содержанию биомаркеров в моче как в норме, так и при отклонениях от нормы при нарушениях регуляторных процессов в организме практически отсутствуют. Немногочисленные данные об уровнях концентраций выбранных биомаркеров в моче в литературных источниках приведены по отношению к креатинину, границы нормального уровня которого в моче охватывают целый порядок величины, что не позволяет даже приблизительно пересчитать относительные концентрации на абсолютные. Кроме того, креатинин сам включен в группу выбранных биомаркеров (табл. 1).

Особенностью физиологического статуса людей, находящихся в хорошей физической форме, является хорошая переносимость физических нагрузок, которую в известной степени можно трактовать как стрессоустойчивость [32].

Цель настоящей работы – разработка методики определения 15 биогенных веществ в моче человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) и апробация методики в биоаналитическом эксперименте.

Разработанная методика определения стресс-маркеров в моче апробирована при анализе проб мочи молодых (20–35 лет) людей с высокой и недостаточной физической подготовкой.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты. Использовали ацетонитрил для высокоэффективной жидкостной хроматографии (Panreac, Испания); метанол HPLC grade (J.T. Baker, Нидерланды); формиат аммония (ACROS organics, Бельгия); креатинин, креатин, молочную кислоту, инозин, ацетилкарнитин, треонин, 2-гидроксибутират, 3-гидроксибутират, 2-гидроксиметилбутират, 3-гидроксиметилбутират, гипоксантин, 3-метилгистидин, аденозин, уридин (Sigma-Aldrich, США). Дейтерированный (D-3) 2-(2-карбок시에тил)-1,1,1-триметилгидразиний (изотопная чистота 99.9%) синтезирован в лаборатории химического моделирования НИИ ГПЭЧ в соответствии с процедурой, описанной в работе [33].

Приготовление градуировочных растворов. Исходные растворы 2-гидроксибутирата, 3-гидроксибутирата, 2-гидроксиметилбутирата, 3-гидроксиметилбутирата, молочной кислоты, креатинина, уридина, инозина, креатина, 3-метилгистидина, аденозина, треонина, ацетилкарнитина готовили растворением навесок веществ в деионизованной воде. Для полного растворения навески гипоксан-

тина в деионизованной воде раствор подщелачивали, добавляя 5%-ый водный раствор аммиака по каплям. Триптамин растворяли в ацетонитриле.

Отбор проб и пробоподготовка мочи. Пробы отбирали в утренние часы натощак при условии отсутствия интенсивных физических нагрузок в течение предшествующих суток. Образцы мочи замораживали и хранили при -18°C до начала проведения анализа.

В качестве внутреннего стандарта выбрали дейтерированный (D-3) 2-(2-карбоксиил)-1,1,1-триметилгидразиний. Использование изотопно-меченного стандарта позволило исключить предварительный контроль исследуемых образцов мочи на наличие фоновых сигналов в области регистрации пика внутреннего стандарта.

Пробоподготовку осуществляли следующим образом. В пластиковую пробирку, объемом 2.0 мл вносили 0.3 мл пробы мочи и 0.9 мл ацетонитрила, содержащего внутренний стандарт с концентрацией 3 мкг/мл, тщательно перемешивали и центрифугировали при скорости 14000 оборотов в минуту в течение пяти минут. Супернатант разбавляли в 10 и 1000 раз 0.1%-ной муравьиной кислотой в деионизованной воде и анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС. В пробах с разбавлением 10 раз определяли креатинин, уридин и инозин.

ВЭЖХ-МС/МС-анализ. Для анализа образцов мочи использовали жидкостной хроматограф LC-20 Prominence, оснащенный масс-спектрометрическим детектором LCMS-8050 с электрораспылительной ионизацией при атмосферном давлении (Shimadzu, Япония). Данные обрабатывали при помощи программного обеспечения Labsolution “Quant browser” (Shimadzu, Япония).

Хроматографическое разделение осуществляли на колонке Zorbax SB-C8 (Agilent, США) (150 мм × 4.6 мм, 1.8 мкм). Подвижная фаза: компонент А – 0.1%-ная муравьиная кислота и 10 мМ раствор формиата аммония в деионизованной воде; компонент В – 0.1%-ная муравьиная кислота и 10 мМ раствор формиата аммония в метаноле. Программа элюирования при скорости потока элюента 0.4 мл/мин: 0.0–1.0 мин 5% В; 1.0–7.0 мин 5–90% В; 7.0–10.0 мин 90% В; 10.1–15.0 мин 5% В. Температура термостата колонки 40°C . Температура термостата отделения для проб 5°C . Объем вводимой пробы составлял 5 мл.

Масс-спектрометрическое детектирование осуществляли в режиме мониторинга множественных реакций по заданным ионным реакциям (МРМ-переходам) – прекурсор-ион > продукт-ион (табл. 2).

Параметры источника ионизации: скорость потока газа-осушителя – 10 л/мин, вспомогательного газа – 10 л/мин, давление на распылителе – 3 л/мин, температура газа-осушителя – 300°C , температура вспомогательного потока – 350°C ,

Таблица 1. Список целевых биомаркеров для контроля в пробах мочи, их брутто формулы, константы гидрофобности ($\text{Log}P$), молярные массы и структурные формулы

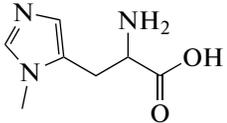
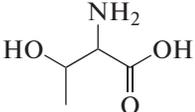
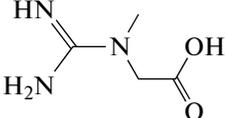
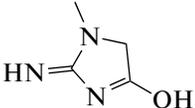
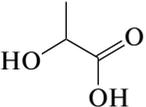
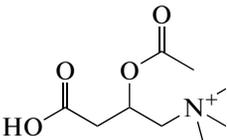
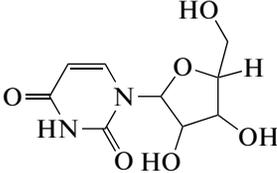
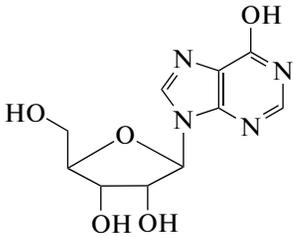
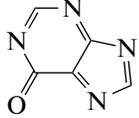
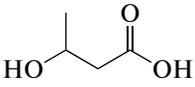
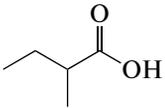
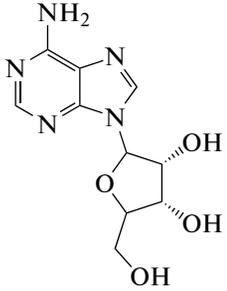
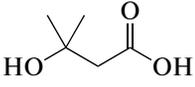
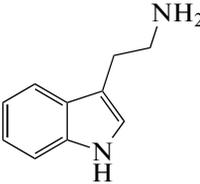
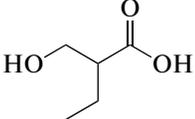
Название биомаркера	Брутто формула	$\text{Log}P^*$	Молярная масса, г/моль	Структурная формула
3-Метилгистидин	$\text{C}_7\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2$	-1.31	169.18	
Треонин	$\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}_3$	-1.23	119.12	
Креатин	$\text{C}_4\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$	-1.88	131.13	
Креатинин	$\text{C}_4\text{H}_7\text{N}_3\text{O}$	-1.68	113.12	
Молочная кислота	$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$	-0.70	90.08	
Ацетилкарнитин	$\text{C}_9\text{H}_{17}\text{NO}_4$	-3.56	203.24	
Уридин	$\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_6$	-1.61	244.20	
Инозин	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_5$	-1.45	268.23	
Гипоксантин	$\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}$	-2.51	136.11	
3-Гидроксибутират	$\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_3$	-1.14	104.10	

Таблица 1. Окончание

Название биомаркера	Брутто формула	Log P*	Молярная масса, г/моль	Структурная формула
2-Гидроксипутират	C ₄ H ₈ O ₃	-0.17	104.10	
Аденозин	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	-1.02	267.24	
3-Гидроксиметилпутират	C ₅ H ₁₀ O ₃	-0.79	118.13	
Триптамин	C ₁₀ H ₁₂ N ₂	1.38	160.22	
2-Гидроксиметилпутират	C ₅ H ₁₀ O ₃	0.18	118.13	

Примечание: значения констант гидрофобности (Log P) взяты с сайта <http://www.chemspider.com/> (дата обращения: 28.03.2023).

Таблица 2. Аналитические характеристики исследуемых биомаркеров: режим ионизации, Rt (время удерживания), МРМ-переход (прекурсор- > продукт-ионы), СЕ (энергия коллизии)

Биомаркер (режим ионизации)	Rt, мин	МРМ-переход, m/z (СЕ)
3-Метилгистидин (+)	3.83	170.10 > 109.15 (-16); 126.20 (-16)
Треонин (+)	4.04	120.00 > 74.10 (-12); 56.10 (-17)
Креатин (+)	4.47	132.00 > 44.10 (-14); 90.05 (-22)
Креатинин (+)	4.56	114.00 > 44.1 (-17); 86.1 (-14)
Молочная кислота (-)	6.13	89.00 > 43.1 (12); 45.05 (12)
Ацетил карнитин (+)	6.49	204.00 > 85.1 (-21); 145.15 (-13)
Уридин (+)	7.83	245.00 > 113.10 (-12); 70.10 (-35)
Инозин (+)	8.15	269.00 > 137.10 (-11); 110.10 (-23)
Гипоксантин (-)	8.24	135.00 > 92.00 (18); 65.00 (25)
3-Гидроксипутират (-)	8.24	103.00 > 59.00 (11); 45.00 (25)
2-Гидроксипутират (-)	8.63	103.00 > 57.05 (14)
Аденозин (+)	8.93	268.00 > 136.10 (-22); 119.10 (-44)
3-Гидроксиметилпутират (-)	9.29	117.00 > 59.10 (12); 41.20 (25)
Триптамин (+)	9.60	161.00 > 144.15 (-14); 117.15 (-25)
2-Гидроксиметилпутират (-)	9.96	117.00 > 71.15 (13)
Дейтерированный (D-3) 2-(2-карбоксиэтил)-1,1,1-три-метилгидразиний, внутренний стандарт (+)	4.84	150.00 > 61.15 (-16); 62.15 (-16)

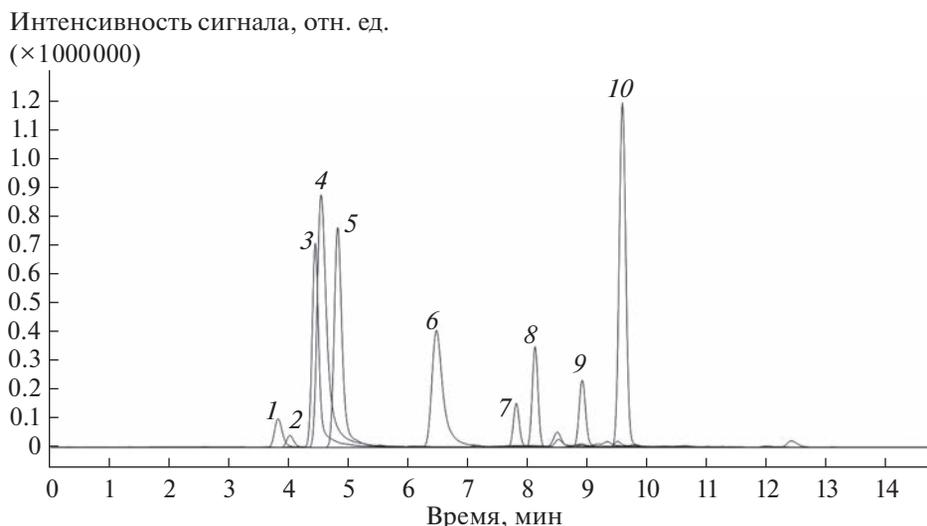


Рис. 1. Масс-хроматограмма в режиме положительной ионизации. 1 – метилгистидин; 2 – треонин; 3 – креатин; 4 – креатинин; 5 – дейтерированный (D-3) 2-(2-карбоксиэтил)-1,1,1-триметилгидразиний; 6 – ацетилкарнитин; 7 – уридин; 8 – инозин; 9 – аденозин; 10 – триптамин.

напряжение на капилляре – 3500 В, напряжение на фрагментаторе – 120 В.

Предварительная оптимизация параметров детектирования (m/z прекурсор- и продукт-ионов, энергия коллизии) осуществлялась в автоматическом режиме с помощью настройки “Auto-tuning”.

Статистическая обработка результатов измерений. Различия между концентрациями биомаркеров в пробах мочи двух групп добровольцев оценивали с помощью параметрического t -критерия Уэлча после логарифмического преобразования полученных данных. Статистически значимыми признавали результаты при уровне $p < 0.05$. Все вычисления выполнены в программе GraphPad Prizm 8.

В биоаналитическом исследовании по апробации методики принимали участие мужчины и женщины возраста 20–35 лет. Добровольцы были разделены на две группы: низко (Н/Т) и высоко (В/Т) тренированные. Группа Н/Т ($n = 9$) представлена людьми, ведущими малоактивный образ жизни: работа в офисе за компьютером, нерегулярные физические нагрузки, индекс массы тела >30 . В группу В/Т ($n = 29$) отобраны люди, ведущие активный образ жизни, посещающие тренажерный зал не менее двух раз в неделю, имеющие индекс массы тела 20–27. Для участия в эксперименте от добровольцев получали информированное согласие.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Процедура ВЭЖХ-МС/МС-анализа. Хроматограммы рассматриваемых веществ представлены на рис. 1 и 2. Из табл. 1 видно, что гидрофильно-гидрофобные свойства аналитов варьировали в

широких пределах, что следует учитывать при выборе режима хроматографического разделения. Как видно из представленных масс-хроматограмм, подобранный режим элюирования позволил достичь приемлемого разделения всех аналитов.

Метрологические характеристики предложенной процедуры совместного определения 15 биомаркеров функционального состояния человека получали на основе определения их концентраций в водных растворах и с учетом размаха уровней их концентраций в моче добровольцев (табл. 3).

Подготовка проб к анализу ограничивалась разбавлением с последующим центрифугированием, при этом достигались высокие степени извлечения аналитов: от 95.2 до 98.9%.

Сравнение результатов определения содержания стресс-маркеров в моче добровольцев групп В/Т и Н/Т. Перед выполнением статистической обработки полученные результаты проходили тест на нормальность/логнормальность распределения. В связи с малым количеством наблюдений в группе Н/Т для всех биомаркеров, кроме креатинина, распределение было логнормальным. Для креатинина наблюдалось нормальное распределение. По этой причине применение параметрического критерия было возможным после логарифмического преобразования полученных результатов [34], которое выполняли по формуле (1):

$$y = \lg(x + 0.01), \quad (1)$$

где y – преобразованное значение найденной концентрации биомаркера; x – найденное значение концентрации биомаркера; 0.01 – константа, необходимая для корректировки расчетов при на-

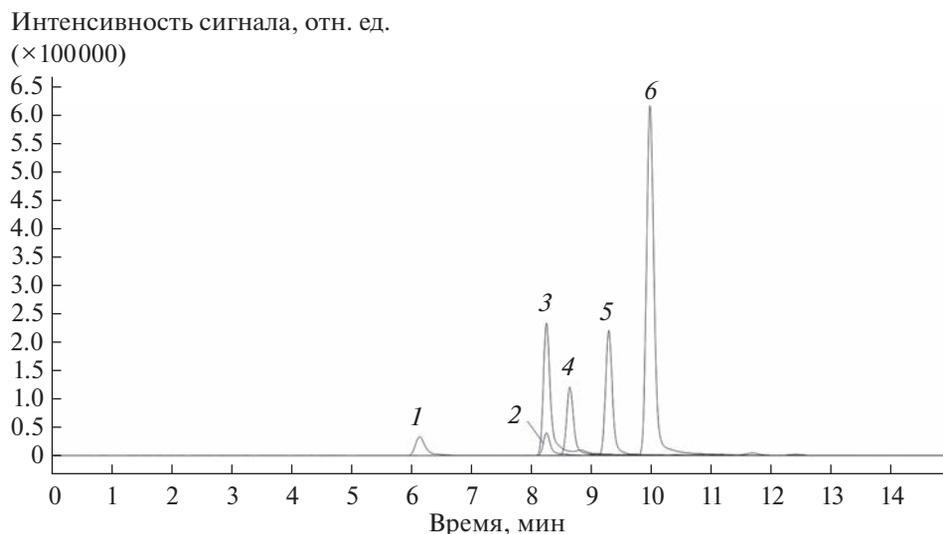


Рис. 2. Масс-хроматограмма в режиме отрицательной ионизации. 1 – молочная кислота; 2 – гипоксантин; 3 – 3-гидроксибутират; 4 – 2-гидроксибутират; 5 – 3-гидроксиметилбутират; 6 – 2-гидроксиметилбутират.

личии результатов ниже нижней границы определяемых содержаний.

После логарифмического преобразования полученные данные оценивали с помощью *t*-критерия Уэлча. Рассчитывали среднее арифметическое, среднеквадратическое отклонение и доверитель-

ный интервал. Затем обратным пересчетом получали молярные концентрации. Например, среднее арифметическое значение данных для молочной кислоты группы В/Г после логарифмического преобразования составляло 2.226, а значение доверительного интервала (при $p = 0.95$) – 0.080. В соответ-

Таблица 3. Метрологические характеристики предложенной процедуры

Биомаркер	Диапазон измерений, мкг/мл	Показатель воспроизводимости s_r , %	Показатель правильности (границы относительной систематической погрешности при $P = 0.95$), $\pm \delta_c$, %	Показатель точности (границы относительной погрешности при $P = 0.95$), $\pm \delta$, %
3-Метилгистидин	1–50	1.0	3.0	4.8
Треонин	1–50	7.0	1.3	7.1
Креатин	1–50	10.6	1.4	8.8
Креатинин	0.2–10	6.4	2.6	6.6
Молочная кислота	2–100	7.7	1.4	8.1
Ацетилкарнитин	2–100	6.7	0.9	7.2
Уридин	0.2–10	9.1	2.1	7.5
Инозин	0.2–10	4.0	1.2	5.2
Гипоксантин	1–50	11.3	1.1	10.3
3-Гидроксибутират	1–50	5.7	1.0	6.7
2-Гидроксибутират	1–50	4.8	1.3	5.4
Аденозин	1–50	6.0	1.4	6.5
3-Гидроксиметилбутират	2–100	5.6	1.0	6.5
Триптамин	1–50	7.2	1.8	8.1
2-Гидроксиметилбутират	1–50	3.8	2.2	5.5

Таблица 4. Результаты измерений (референтный диапазон) в моче добровольцев

Биомаркер	Референтный интервал (без нормализации по креатинину), мкМоль		Референтный интервал (с нормализацией по креатинину), мкМоль/ммоль креатинина	
	В/Т (<i>n</i> = 29)	Н/Т (<i>n</i> = 9)	В/Т (<i>n</i> = 29)	Н/Т (<i>n</i> = 9)
Креатинин (мм)	4.0–4.8	4.7–6.9*		
3-Метил гистидин	21.5–47.0	29.1–92.2	5.6–11.3	5.5–16.0
Треонин	94.4–162.1	119.2–254.9	22.5–38.1	25.1–39.6
Креатин	80.0–177.5	79.8–290.9	19.9–40.0	14.8–51.4
Молочная кислота	117.6–241.2	265.3–675.0	28.5–55.7	51.8–113.0**
Ацетилкарнитин	177.2–463.9	115.9–1106.6	36.3–98.2	32.0–176.4
Уридин	5.4–10.1	4.5–12.5	1.8–2.9	1.7–2.6
Инозин	1.8–3.4	3.8–15.0	2.2–5.4	1.6–3.0
Гипоксантин	97.8–142.1	84.4–245.3	23.8–32.7	17.8–38.0
3-Гидроксибутират	15.7–26.6	24.0–82.7*	3.8–5.9	4.1–16.1
2-Гидроксибутират	222.6–384.6	249.9–535.7	55.6–86.2	49.9–87.7
Аденозин	11.2–19.2	19.5–53.3	2.8–4.3	4.0–8.5*
3-Гидроксиметилбутират	173.9–314.1	371.2–971.1	43.7–70.0	69.4–169.9**
Триптамин	34.5–41.6	38.0–56.4	8.0–10.0	6.8–10.3
2-Гидроксиметилбутират	28.2–48.0	34.3–74.6	7.0–10.8	6.7–12.5

Примечание: достоверные различия при: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

ствии с предложенным автором работы [34] подходом референтный диапазон для молочной кислоты вычисляли следующим образом: $(2.226 \pm [1.96 \times \times 0.080])$ или $(2.070–2.382)$. При обратном преобразовании он составит $(10^{2.070}–10^{2.382})$, что соответствует $(117.6–241.2)$ мкМ. Аналогичным образом получали остальные данные, за исключением креатинина, для которого логарифмирование не проводили.

Для оценки концентраций биомаркеров, нормализованных по креатинину, сначала вычисляли их уровни относительно креатинина (мкМоль/ммоль креатинина), а затем выполняли логарифмическое преобразование и анализ полученных данных с дальнейшим пересчетом по описанному выше алгоритму.

Результаты измерений (референсный диапазон), пересчитанные из массовых в молярные концентрации с учетом молярной массы аналитов (табл. 1) и последующей нормализации по креатинину, представлены в табл. 4.

При использовании нормализации мочевых биомаркеров по креатинину обычно исходят из предположения о том, что скорость выведения креатинина с мочой для разных людей постоянна, а также из того, что концентрация растворенных в моче веществ зависит от процесса реабсорбции воды в почках [35]. Однако нормализация данных по креатинину для оценки результатов анализов мочи людей с аномальной функцией почек [35, 36] приводит к искажению их интерпретации.

Так как в нашем эксперименте принимали участие молодые люди без диагностированных заболеваний за счет относительно близких значений креатинина в моче нормализация к его уровню приводила к “сглаживанию” данных, поэтому приведены данные как с нормализацией по креатинину, так и без нее.

Результаты, полученные при апробации методики (табл. 4), следует интерпретировать с осторожностью. При всех отмеченных ранее преимуществах мочи как биоматрицы, нельзя не принимать во внимание и ограничения при интерпретации результатов метабомики мочи. Прежде всего, это влияние пищевого рациона на метаболические профили мочи. Добровольцы, принимавшие участие в эксперименте, по данным анкетирования не придерживались диеты и не принимали пищевых добавок или лекарств в течение недели, предшествовавшей тестированию, при этом их рацион не был стандартизован, что не могло не сказаться на результатах тестирования. Тем не менее полученные результаты позволяют отметить некоторые тенденции и сделать предварительные выводы. Несмотря на то, что группа Н/Т была менее многочисленной ($n = 9$) в сравнении с группой В/Т ($n = 29$), для нее могут быть отмечены более широкие интервалы значений концентраций для большинства биомаркеров, т.е. группа В/Т может быть охарактеризована как более однородная. Еще одной тенденцией является смешение концентраций большинства стресс-маркеров в

область более высоких значений в моче людей из группы Н/Т в сравнении с группой В/Т. Полученный результат можно объяснить тем, что состояние покоя (накануне отбора мочи физических нагрузок не было) в группе В/Т характеризуется как полная релаксация, а группой Н/Т это время проживается с ненулевым уровнем стресса. Другое возможное объяснение — пониженная способность у добровольцев группы Н/Т к реабсорбции стресс-маркеров почками и/или их распределению в ткани.

Достоверные различия в концентрациях стресс-маркеров в моче добровольцев из двух групп установлены для креатинина и 3-гидроксипутирата без нормализации по креатинину. Также значимые различия обнаружены для молочной кислоты, аденозина и 3-гидроксиметилбутирата без и при их нормализации по креатинину.

Полученный результат не противоречит литературным данным, свидетельствующим о том, что молочная кислота, гидроксипутираты и аденозин входят в группу биомаркеров, характеризующих уровень физической подготовки, в значительной мере определяемый переносимостью физических нагрузок [37–39].

Следует отметить, что в различных источниках [40, 41 и др.] установлены разные биомаркеры, характеризующие уровень физической подготовки. Все они пока имеют статус биомаркеров-кандидатов. Необходимым этапом на пути формирования перечня актуальных стресс-маркеров в различных диагностических биосредах является разработка методик определения биомаркеров-кандидатов.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Авторы выражают благодарность кандидату медицинских наук А.Л. Куцало за помощь в организации эксперимента по апробации методики, а также сотрудникам ФГУП «НТЦ РХБ» ФМБА России за участие в межлабораторном эксперименте по подтверждению валидационных характеристик методики.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Swiner D.J., Jackson S., Burris B.J., Badu-Tawiah A.K. Applications of mass spectrometry for clinical diagnostics: The influence of turnaround time // *Anal. Chem.* 2020. V. 92. № 1. P. 183.
2. Li H., Peng B., X.X. Peng. Functional metabolomics: From biomarker discovery to metabolome reprogramming // *Protein Cell.* 2015. V. 6. № 9. P. 628.
3. Blessing E.M., Reus V., Mellon S.H., Wolkowitz O.M., Flory J.D., Bierer L. Biological predictors of insulin resistance associated with posttraumatic stress disorder in young military veterans // *Psychoneuroendocrinology.* 2017. V. 82. P. 91.
4. Kuo W., Bratzke L.C., Oakley L.D., Kuo F., Wang H., Brown R.L. The association between psychological stress and metabolic syndrome: A systematic review and meta-analysis // *Obes. Rev.* 2019. V. 20. № 11. P. 1651.
5. Iliou A., Mikros E., Karaman I., Elliott F., Griffin J.L., Tzoulaki I., Elliott P. Metabolic phenotyping and cardiovascular disease: an overview of evidence from epidemiological settings // *Heart.* 2021. V. 107. № 14. P. 1123.
6. Yaribeygi H., Panahi Y., Sahraei H., Johnston T.P., Sahebkar A. The impact of stress on body function: A review // *EXCLI J.* 2017. V. 16. P. 1057.
7. Muradyan A., Macheiner T., Mardiyani M., Sekoyan E., Sargsyan K. The evaluation of biomarkers of physical activity on stress resistance and wellness // *Appl. Psychophysiol. Biofeedback.* 2022. V. 47. P. 121.
8. Morey J.N., Boggero I.A., Scott A.B., Segerstrom S.C. Current directions in stress and human immune function // *Curr. Opin. Psychol.* 2015. V. 5. P. 13.
9. Bernini P., Bertini I., Luchinat C., Nincheri P., Staderini S., Turano P. Standard operating procedures for pre-analytical handling of blood and urine for metabolomic studies and biobanks // *J. Biomol. NMR.* 2011. V. 49. № 3–4. P. 231.
10. Hertel J., Van der Auwera S., Friedrich N., Wittfeld K., Pietzner M., Budde K., Teumer A., Kocher T., Nauck M., Grabe H.J. Two statistical criteria to choose the method for dilution correction in metabolomic urine measurements // *Metabolomics.* 2017. V. 13. P. 42.
11. Rosen Vollmar A.K., Rattray N.J.W., Cai Y., Santos-Neto Á.J., Deziel N.C., Jukic A.M.Z., Johnson C.H. Normalizing untargeted periconceptional urinary metabolomics data: A comparison of approaches // *Metabolites.* 2019. V. 9. № 10. P. 198.
12. Christou C., Gika H.G., Raikos N., Theodoridis G. GC-MS analysis of organic acids in human urine in clinical settings: A study of derivatization and other analytical parameters // *J. Chromatogr. B.* 2014. V. 964. № 1. P. 195.
13. Keyfi F., Lukacs Z., Varasteh A. A description of reference ranges for organic acids in urine samples from a pediatric population in Iran // *Rep. Biochem. Mol. Biol.* 2017. V. 6. № 1. P. 40.
14. Greer B., Chevallier O., Quinn B., Botana L.M., Elliott C.T. Redefining dilute and shoot: The evolution of the technique and its application in the analysis of foods and biological matrices by liquid chromatography mass spectrometry // *Trends Anal. Chem.* 2021. V. 141. e. 116284
15. Körver-Keularts I.M.L.W., Wang P., Waterval H.W.A.H., Kluijtmans L.A.J., Wevers R.A., Langhans C.D., Scott C., Habets D.D.J., Bierau J. Fast and accurate quantitative organic acid analysis with LC-QTOF/MS facilitates screening of patients for inborn errors of metabolism // *J. Inher. Metab. Dis.* 2018. V. 41. № 3. P. 415.

16. Zheng J., Zhang L., Johnson M., Mandal R., Wishart D.S. Comprehensive targeted metabolomic assay for urine analysis // *Anal. Chem.* 2020. V. 92. № 15. P. 1062.
17. McKetney J., Jenkins C.C., Minogue C., Mach P.M., Hussey E.K., de Trevor G.G., Coon J., Dhumakupt E.S. Proteomic and metabolomic profiling of acute and chronic stress events associated with military exercises // *Mol. Omics.* 2022. V. 18. P. 279.
18. Farthing D.E., Farthing C.A., Xi L. Inosine and hypoxanthine as novel biomarkers for cardiac ischemia: From bench to point-of-care // *Exp. Biol. Med. (Maywood).* 2015. V. 240. № 6. P. 821.
19. Furuhashi M., Koyama M., Higashiura Y., Murase T., Nakamura T., Matsumoto M., Sakai A., Ohnishi H., Tanaka M., Saitoh S., Moniwa N., Shimamoto K., Miura T. Differential regulation of hypoxanthine and xanthine by obesity in a general population // *J. Diabetes Invest.* 2020. V. 11. № 4. P. 878.
20. База данных метаболитов человека HMDB IDHMDB0000050, URL: <https://hmdb.ca/> (дата обращения 10.04.2023).
21. Pettegrew J., Levine J., McClure R. Acetyl-L-carnitine physical-chemical, metabolic, and therapeutic properties: Relevance for its mode of action in Alzheimer's disease and geriatric depression // *Mol. Psychiatry.* 2000. V. 5. P. 616.
22. Sheffield-Moore M., Dillon E.L., Randolph K.M. Isotopic decay of urinary or plasma 3-methylhistidine as a potential biomarker of pathologic skeletal muscle loss // *J. Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2014. V. 5. № 1. P. 19.
23. Kuriyan R., Lokesh D.P., Selvam S., Jayakumar J., Mamatha P.G., Shreeram S., Kurpad A.V. The relationship of endogenous plasma concentrations of β -hydroxy β -methyl butyrate (HMB) to age and total appendicular lean mass in humans // *Exp. Gerontol.* 2016. V. 81. P. 13.
24. Cheng Z.X., Guo C., Chen Z.G., Yang T.C., Zhang J.Y., Wang J., Zhu J.X., Li D., Zhang T.T., Li H., Peng B., Peng X.X. Glycine, serine and threonine metabolism confounds efficacy of complement-mediated killing // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 3325.
25. Beloborodova N.V., Chernevskaya E.A., Getsina M.L. Indolic structure metabolites as potential biomarkers of non-infectious diseases // *Curr. Pharm. Des.* 2021. V. 27. № 2. P. 238.
26. Gao J., Xu K., Liu H., Liu G., Bai M., Peng C., Li T., Yin Y. Impact of the gut microbiota on intestinal immunity mediated by tryptophan metabolism // *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2018. V. 8. P. 13.
27. Miyazaki T., Honda A., Ikegami T., Iwamoto J., Monma T., Hirayama T., Saito Y., Yamashita K., Matsuzaki Y. Simultaneous quantification of salivary 3-hydroxybutyrate, 3-hydroxyisobutyrate, 3-hydroxy-3-methylbutyrate, and 2-hydroxybutyrate as possible markers of amino acid and fatty acid catabolic pathways by LC-ESI-MS/MS // *Springer Plus.* 2015. V. 4. P. 494.
28. Nikolaidis S., Karpouzi C., Tsalis G., Kabasakalis A., Papaioannou K.G., Mougios V. Reliability of urine lactate as a novel biomarker of lactate production capacity in maximal swimming // *Biomarkers.* 2016. V. 21. № 4. P. 328.
29. Zhang Z., Xu X., Chen K. Lactate clearance as a useful biomarker for the prediction of all-cause mortality in critically ill patients: A systematic review study protocol // *BMJ Open.* 2014. V. 4. Article e004752.
30. de Leeuw F.A., Tijms B.M., Doorduyn A.S., Hendriksen H.M.A., van de Rest O., de van der Schueren M., Visser M., van den Heuvel E.G.H.M., van Wijk N., Bierau J., Scheltens P., Kester M. I., van Der Flier W., Teunissen C. E. LDL cholesterol and uridine levels in blood are potential nutritional biomarkers of AD progression: The NUDAD project // *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring.* 2020. V. 16 (S4). Article e043108.
31. Waikar S.S., Betensky R.A., Bonventre J.V. Creatinine as the gold standard for kidney injury biomarker studies? // *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2009. V. 24. № 11. P. 3263.
32. Muradyan A., Macheiner T., Mardiyani M., Sekoyan E., Sargsyan K. The Evaluation of biomarkers of physical activity on stress resistance and wellness // *Appl. Psychophysiol. Biofeedback.* 2022. V. 47. P. 121.
33. Görgens C., Guddat S., Dib J., Geyer H., Schänzer W., Thevis M. Mildronate (Meldonium) in professional sports – monitoring doping control urine samples using hydrophilic interaction liquid chromatography – high resolution/high accuracy mass spectrometry // *Drug Test. Analysis.* 2015. V. 7. P. 973.
34. West R.M. Best practice in statistics: The use of log transformation // *Ann. Clin. Biochem.* 2022. V. 59. № 3. P. 162.
35. Tang K.W., Toh Q.C., Teo B.W. Normalization of urinary biomarkers to creatinine for clinical practice and research – when and why. // *Singapore Med. J.* 2015. V. 56. № 1. P. 7.
36. Wagner B.D., Accurso F.J., Laguna T.A. The applicability of urinary creatinine as a method of specimen normalization in the cystic fibrosis population // *J. Cystic Fibrosis: Official J. Eur. Cystic Fibrosis Soc.* 2010. V. 9. № 3. P. 212.
37. Kim H.Y., Lee J.D., Lee Y.H., Seo S.W., Lee H.S., Kim S., Kim K.B. Urinary metabolomics in young soccer players after winter training season // *Metabolites.* 2022. V. 12. P. 1283.
38. Moreira L.P., Silveira L. Jr., da Silva A.G., Fernandes A.B., Pacheco M.T.T., Rocco D.D.F.M. Raman spectroscopy applied to identify metabolites in urine of physically active subjects // *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 2017. V. 176. P. 92.
39. Simpson R.E., Phillis J.W. Adenosine in exercise adaptation // *Br. J. Sp. Med.* 1992. V. 26. № 1. P. 54.
40. Castro A., Duft R.G., Silva L.M., Ferreira M.L.V., Andrade A.L.L., Bernardes C.F., Cavaglieri C.R., Chacon-Mikahil M.P.T. Understanding the relationship between intrinsic cardiorespiratory fitness and serum and skeletal muscle metabolomics profile // *J. Proteome Res.* 2021. V. 20. № 5. P. 2397.
41. Duft R.G., Castro A., Bonfante I.L.P., Brunelli D.T., Chacon-Mikahil M.P.T., Cavaglieri C.R. Metabolomics approach in the investigation of metabolic changes in obese men after 24 weeks of combined training // *J. Proteome Res.* 2017. V. 16. № 6. P. 2151.

УДК 543.[33+054+421]

КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ И ТЕСТ-ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕНОЛОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ НАНОВОЛОКНА НА ОСНОВЕ ПОЛИАМИДА

© 2023 г. Т. М. Махова^а, А. И. Аржанухина^а, С. Ю. Доронин^а, *

^аСаратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского, Институт химии
ул. Астраханская, 83, Саратов, 410012 Россия

*e-mail: doroninsu@mail.ru

Поступила в редакцию 03.04.2023 г.

После доработки 28.04.2023 г.

Принята к публикации 03.05.2023 г.

Получены новые тест-средства из нановолокон на основе полиамида-6 (ПА-6) для предварительно-го сорбционного концентрирования некоторых фенолов в виде их азопроизводных и последующего их цветометрического определения. Предложены подходы к дериватизации фенола и хлорпроизводных по реакции азосочетания с 4-нитрофенилдиазонием и окислительной конденсации с 4-аминоантипирином для повышения сорбционных характеристик исследуемых фенолов. Проведена сравнительная оценка эффективности двух способов дериватизации. Изучены кинетика сорбции производных фенола, 2-хлорфенола и влияние pH на характер их сорбции. Интерпретированы особенности сорбции производных фенолов на нетканых материалах и соответствующие изотермы сорбции. Приведены примеры количественной оценки содержания фенолов в водных средах посредством математической обработки цифровых изображений окрашенных зон тест-средств. Показано, что предложенные способы могут быть применены для определения фенола и 2-хлорфенола с предварительным концентрированием их дериватизатов нановолокном ПА-6 в диапазоне 0.2–1.0 мкМ (≈ 0.02 – 0.09 мг/л для фенола, ≈ 0.03 – 0.13 мг/л для 2-хлорфенола) с погрешностью цветометрического определения не более 20% (ПДК_{хоз.-быт} фенола составляет 0.001 мг/л для суммы летучих фенолов в водных объектах при условии обеззараживания воды хлором; в иных случаях ПДК составляет 0.1 мг/л).

Ключевые слова: цветометрия, нановолокна, фенолы, дериватизация, сорбция, тест-методы.

DOI: 10.31857/S0044450223100134, **EDN:** ZINZZF

Фенол и его хлорпроизводные являются одними из приоритетных органических загрязнителей природных и сточных вод, вследствие их токсичного (в том числе и канцерогенного) действия на живые организмы; кроме того, они обладают биоаккумулятивностью и характеризуются устойчивостью в окружающей среде [1]. Определение фенола и его хлорпроизводных – актуальная аналитическая задача. Основными источниками загрязнения природных объектов фенолом и его производными являются производства пластмасс, лаков, красителей, лекарств, пестицидов, поверхностно-активных веществ и др. [1].

Фенолы, как правило, определяют методами высокоэффективной жидкостной хроматографии, газовой хроматографии (с пламенно-ионизационным детектированием после дериватизации фенолов), тонкослойной хроматографии, капиллярного электрофореза, спектрофотометрии, флуориметрии, а также электрохимическими и масс-спектрометрическими методами [2–5]. Однако прямое определение фенолов на уровне предельно допустимых концентраций (ПДК) (~ 1 мкг/л) ука-

занными методами требует их предварительного концентрирования для дальнейшего определения в объектах окружающей среды [6–8].

Наряду с методами жидкостной экстракции для концентрирования фенолов применяют способы твердофазной экстракции на основе высокоэффективных сорбентов, среди которых выделяют силикагели, активированные угли, природные и полимерные сорбенты [8–13]. Несмотря на огромное разнообразие применяемых сорбентов, некоторые из них характеризуются низкой механической прочностью, сложностью количественной десорбции и др. Разработка новых сорбентов, а также минимизация и/или устранение указанных недостатков имеющихся сорбентов для дальнейшего их использования в сорбционных процессах – актуальное направление развития сорбционных методов.

Современные тенденции в развитии методов твердофазной экстракции направлены на повышение коэффициентов извлечения и селективности извлечения аналитов. Полимерные сорбенты, в том числе нетканые материалы (НМ, на-

новолокна), полученные методом электроформования [14–22], обладают высокой удельной площадью поверхности, высокопористой структурой, улучшенными механическими свойствами, а также относительной простотой и низкой стоимостью получения.

Типичный процесс электроформования включает в себя применение электрического поля, индуцированного от источника высокого напряжения от единиц до ста киловольт, между раствором полимера и осадительным электродом (коллектором) [14]. Большое внимание при электроформовании уделяется выбору самого полимера и растворителя. Кроме того, управляя параметрами электроформования можно получать материалы с заданными свойствами, с контролируемыми размерами нановолокон и пор (межволоконных расстояний), нужной степенью гидрофильности или гидрофобности, что играет ключевую роль при изучении сорбции органических аналитов. Так, молекулы фенола и его производных можно отнести к относительно полярным, поэтому для их извлечения необходимо применение полимеров, обладающих гидрофильными свойствами, т.е. содержащих полярные функциональные группы, такие как $-C(O)-OH$, $-OH$, $-C(O)H$, $>C=O$, $-NH_2$, $-NH$, $-C(O)-NH_2$, $-C(NH)-OR$ и др. [15]. Химическая модификация полимера, например посредством гидролиза или сополимеризацией с гидрофильными мономерами, также позволяет варьировать его свойства, однако усложняет процесс получения нановолокон. Таким образом, указанные выше уникальные свойства нановолокон позволяют сочетать варианты твердофазной экстракции с различными аналитическими методами. Кроме того, высокая степень гибкости нановолокон, а также отсутствие окраски допускают колориметрическое определение при создании тест-средств на их основе.

Цель настоящей работы – разработка способов сорбционного концентрирования фенола и его хлорпроизводных в виде окрашенных дериватизатов, полученных реакциями азосочетания и окислительной конденсации, нановолоконном на основе полиамида-6 (**ПА-6**) для их дальнейшего определения методом цветометрии с применением цифровых технологий, которые в последние годы активно развиваются и находят широкое применение в аналитической практике [23–26].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты. В работе применяли: ПА-6 ($M_r \sim 60000$, Sigma, Германия), фенол ($\geq 99\%$, Sigma, Германия), 2-хлорфенол (**2-ХФ**) ($\geq 99\%$, Sigma, Германия), 4-аминоантипирин (**4-ААП**) ч. д. а. (ЛенРеактив, Россия), 4-нитроанилин (**4-НА**) ($\geq 99\%$, Sigma, Германия), $NaNO_2$ ч. ч. (Реахим, Россия),

Na_2CO_3 ч. д. а. (Реахим, Россия), $K_3Fe(CN)_6$ ч. ч. (Реахим, Россия).

Исходные 1×10^{-2} М растворы исследуемых фенолов готовили растворением их точных навесок в дистиллированной воде. 4-Нитрофенилдиазоний готовили смешением растворов 4-НА и $NaNO_2$ с концентрациями 4×10^{-3} М в присутствии 1 М HCl.

Аппаратура. Нетканый материал на основе ПА-6 получали на установке бескапиллярного электроформования Nanospider NS Lab 200 (Elmarco, Чехия). Электронные спектры поглощения исследуемых растворов регистрировали на двухлучевом сканирующем спектрофотометре Shimadzu UV-1800 (Япония). Для получения изображений применяли зеркальный фотоаппарат Nikon D 5100 (параметры фотоаппарата: ISO – 160, выдержка – 1/250, приближение – 18 мм, F – 3.5. Объектив AF-S Nikkor 18–55 мм. Качество изображений – RAW). Значения pH контролировали pH-метром рХ-150Mn (Беларусь), погрешность измерения ± 0.01 ед. pH.

Методики дериватизации фенолов. Для улучшения эффективности сорбции исследуемых фенолов их подвергали предварительной дериватизации. Соответствующие методики, в основе которых лежат различные реакции, приведены ниже.

Методика 1: в мерные колбы емк. 25 мл вносят от 3 до 5 мл водных растворов фенолов (рабочая концентрация 5×10^{-4} М), 3.25 мл 4-нитрофенилдиазония, 1.25 мл 2 М раствора Na_2CO_3 и доводят до метки дистиллированной водой. Смесь тщательно перемешивают и оставляют на ~ 10 мин.

Методика 2: в мерные колбы емк. 25 мл вносят от 3 до 5 мл растворов фенолов (рабочая концентрация 5×10^{-4} М), 0.25 мл 0.1 М спиртового раствора 4-ААП, 0.25 мл 8%-ного раствора $K_3Fe(CN)_6$, 5 мл 1.25 М раствора Na_2CO_3 и доводят до метки дистиллированной водой. Содержимое перемешивают в течение 2 мин.

В качестве сорбента фенолов применяли нетканый материал на основе ПА-6, полученный методом бескапиллярного электроформования. Методика приготовления формовочного раствора и условия электроформования подробно рассмотрены в работе [27].

Для сорбционно-цветометрического определения фенолов предварительно получали аналитические азо- и ациформы 4-нитрофенилазосоединений, после чего проводили сорбционное концентрирование нановолоконном ПА-6. Затем образцы НМ фотографировали в специализированном боксе, внутренняя поверхность которого имела черный матовый цвет, снабженном двумя лампами дневного света. Полученные цифровые изображения окрашенных нетканых материалов обрабатывали с помощью графического редактора Ado-

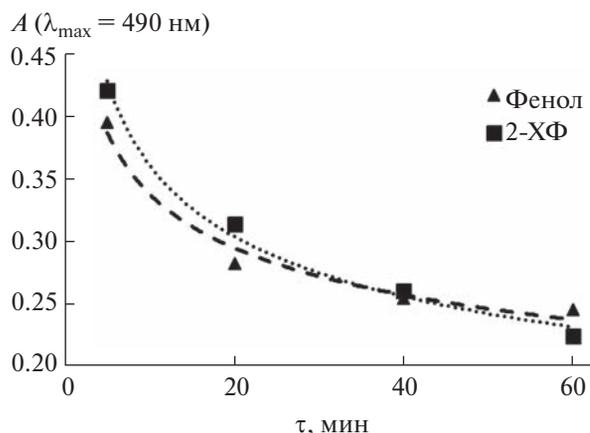


Рис. 1. Зависимость $A (\lambda_{\max} = 490 \text{ нм})$ от времени в системе: фенол (2-хлорфенол)–4-аминоантипирин– $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ – Na_2CO_3 .

be Photoshop CS6 для количественной оценки соответствующих цветовых параметров R, G, B, C, M, Y, K, а также для построения лепестковых диаграмм (ЛД) в указанных координатах цветности и зависимостей математически обработанных параметров цветности (линейные зависимости геометрических параметров ЛД) от концентрации аналитов: площади (S) и периметра (P) ЛД, рассчитанных по следующим формулам:

$$P = \sum \sqrt{a^2 + b^2 - 2ab \cos(ab)},$$

$$S = \sum \left(\frac{1}{2} ab \sin(ab) \right),$$

где a, b – длины сторон треугольника; $\cos(ab)$ – \cos угла между сторонами a, b ; $\sin(ab)$ – \sin угла между сторонами a, b (соседними радиусами на лепестковой диаграмме).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Дериватизация фенолов по реакциям азосочетания и окислительной конденсации. Предварительно полученные данные по сорбции фенола показали, что нановолокна на основе ПА-6 без дополнительных стадий модификации полимера и дериватизации аналитов малоэффективны для концентрирования как фенола, так и его монозамещенных. Для увеличения степени извлечения фенолов предложено получение их окрашенных аналитических форм реакциями азосочетания с 4-нитрофенилдиазонием (методика 1), а также окислительной конденсации с 4-аминоантипирин (методика 2). Фенол и его производные реагируют с 4-ААП в присутствии гексацианоферрата(III) калия при $\text{pH} \geq 10.2$ с образованием окрашенных соединений – антипириновых красителей (I, схема 1), содержащих хроморфорную группу – хиноидный фрагмент.

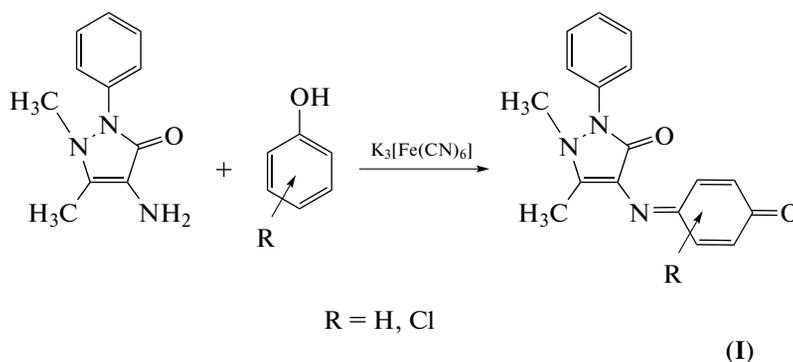


Схема 1. Схема реакции фенола/хлорфенола с 4-аминоантипирин.

Анализ кинетической зависимости (рис. 1) показывает, что антипириновый краситель, получа-

емый в ходе окислительной конденсации фенола или его хлорпроизводных, нестабилен, период

полураспада составляет от 50 до 60 мин, что затрудняет проведение сорбции таких аналитических форм в равновесных условиях.

В качестве диазосоставляющей в реакции азосочетания применяли диазотированный 4-нитро-

анилин (ДНА), выбор которого обусловлен наибольшей чувствительностью и устойчивостью азосоединения (II, схема 2). Ее максимальный выход достигается при концентрациях 4-НА 3×10^{-4} М, NaNO_2 3×10^{-4} М, Na_2CO_3 0.1 М.

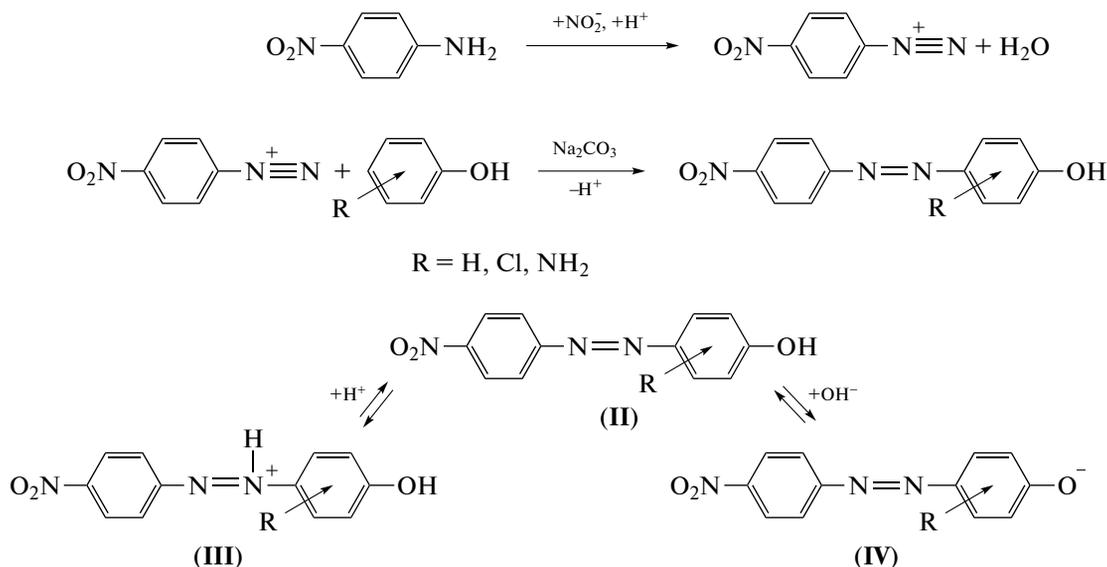


Схема 2. Схема диазотирования 4-нитроанилина и азосочетания фенолов с диазотированным 4-нитроанилином.

Важную роль при изучении сорбции фенолов играет pH. На рис. 2 представлены спектры поглощения 4-нитрофенилазофенола (4-НФАФ) в зависимости от кислотности среды. Так, 4-НФАФ может находиться в разных формах: в нейтральной

и слабокислой средах в форме II ($\lambda_{\text{max}} = 380$ нм), в щелочной – в форме IV ($\lambda_{\text{max}} = 480$ нм).

Варьирование pH позволяет селективно сорбировать одну из форм 4-нитрофенилазосоединений: форму II при pH ~ 5.0; форму III при pH < 4.0; форму IV при pH ~ 9.0. В дальнейших исследованиях применяли для дериватизации методику 1.

Сорбционные свойства нановолокна на основе полиамида-6. Кислотность среды является важнейшим фактором, влияющим и на эффективность сорбции фенолов. С одной стороны, в зависимости от pH молекула азокрасителя может находиться в растворе в различных формах, как показано выше (рис. 2). С другой стороны, pH влияет на состояние функциональных групп сорбента и величину его поверхностного заряда. Изучали влияния pH на сорбцию фенола и 2-ХФ в виде их азопроизводных на НМ (ПА-6). Наибольшая степень извлечения 4-НФАФ и 4-нитрофенилазо-2-хлорфенола (4-НФА-2-ХФ) достигается при pH 5 и составляет 86 ± 3 и $83 \pm 2\%$ соответственно (рис. 3а).

Установили оптимальное время сорбции фенолов в виде их азопроизводных нетканым волокном на основе ПА-6 в условиях: $m(\text{НМ}) = 0.03$ г, $V_{\text{р-ра}} = 10$ мл, $c_a = 5$ мг/л (рис. 3б). Сорбционное равновесие в системах устанавливается в течение 20–30 мин. При этом в начальный момент времени (5–10 мин) скорость сорбции достаточно вы-

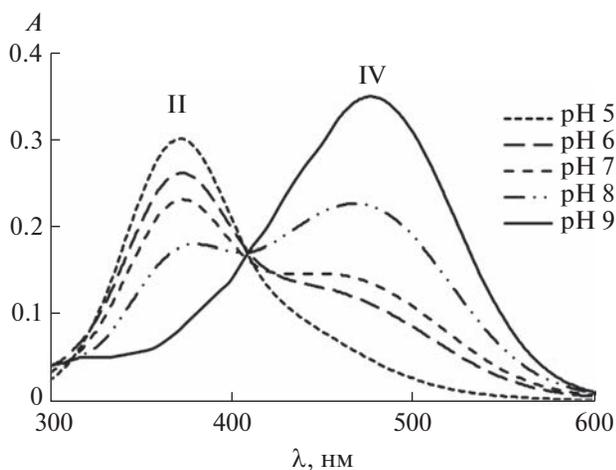


Рис. 2. Спектры поглощения системы 4-нитроанилин– NaNO_2 –фенол при разных значениях pH.

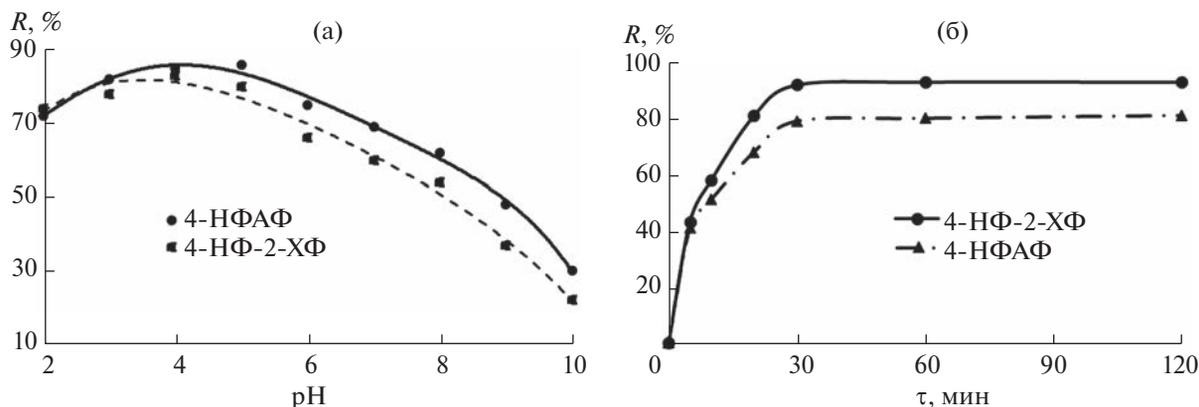


Рис. 3. (а): Зависимость степени извлечения 4-нитрофенилазофенола и 4-нитрофенилазо-2-хлорфенола нетканым материалом на основе полиамида-6 от рН исходных растворов. (б): Кинетика сорбции некоторых 4-нитрофенилазо-соединений полиамидом-6.

сока, но при достижении равновесия снижается. На основании полученных данных построили зависимости сорбционной емкости ПА-6 по отношению к 4-нитрофенилазосоединениям от их концентрации (рис. 4).

В интервале концентраций исследуемых фенолов от 4 до 20 мг/л изотермы сорбции описываются уравнением Ленгмюра, что свидетельствует о мономолекулярном характере сорбции. Область насыщения на изотермах не достигается, поскольку при увеличении концентрации азосоединений их аналитические формы агрегируют и, вследствие малой растворимости, образуют коллоидные системы.

Сорбционно-цветометрическое определение фенолов. В методиках цифрового цветометрического определения аналитов различной природы в качестве аналитического сигнала широко применяют координаты цветности цифровых изображений (как до, так и после математических преобразований), полученные с помощью различных устройств (видео-, фотокамер, планшетных сканеров и т.д.) [23–26]. Так, для цветометрического определения необходимо получение окрашенной аналитической формы, характеризующей спектральные свойства образца, что сопровождается изменением интенсивностей параметров цвета его цифрового изображения [28–32]. С помощью специализированных программ цифровые изображения преобразуют и анализируют, получая более удобный для интерпретации вторичный цифровой аналитический сигнал в виде алгебраических выражений, градуировочных кривых, геометрических фигур, матриц и т.д. Существует несколько цветовых моделей [23], возможности которых можно использовать для различных прикладных целей – это модели RGB (красный – R, зеленый – G, синий – B), HSB (тон – H, насыщенность – S, яркость – V), CMYK (голубой – C, пурпурный – M, желтый – Y,

черный – K), Lab (светлота – L, красно-зеленая ось – а, желто-синяя ось – в) и др. В настоящей работе реализована модель RGB в сочетании со СМУК ввиду возможности быстрого и легкого получения необходимых данных в графическом редакторе Adobe Photoshop.

Цветометрическому определению фенолов предшествовал перевод их в 4-нитрофенилазосоединения с последующим сорбционным концентрированием неткаными материалами на основе ПА-6. Для количественной оценки содержания фенолов строили лепестковые диаграммы с применением цветометрических параметров R, G, B, C, M, Y, K (рис. 5) и концентрационные зависимости интенсивностей цветовых сигналов I и площадей лепестковых диаграмм $S_{\text{лд}}$ со степенью аппроксимации, достаточной для построения градуировочных кривых ($R^2 \geq 0.95$). Наилучшие результаты по чув-

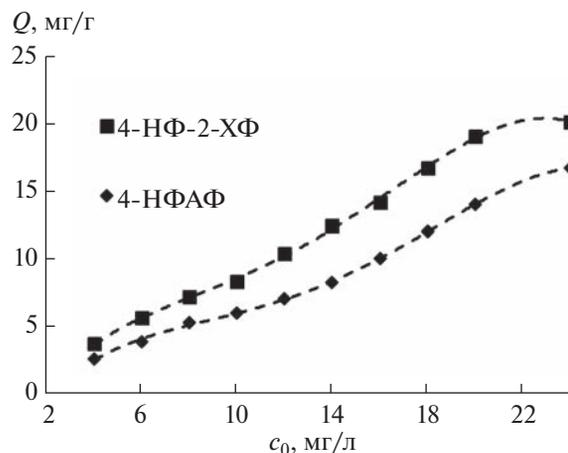


Рис. 4. Зависимости сорбционной емкости полиамида-6 по отношению к 4-нитрофенилазосоединениям от их концентрации.

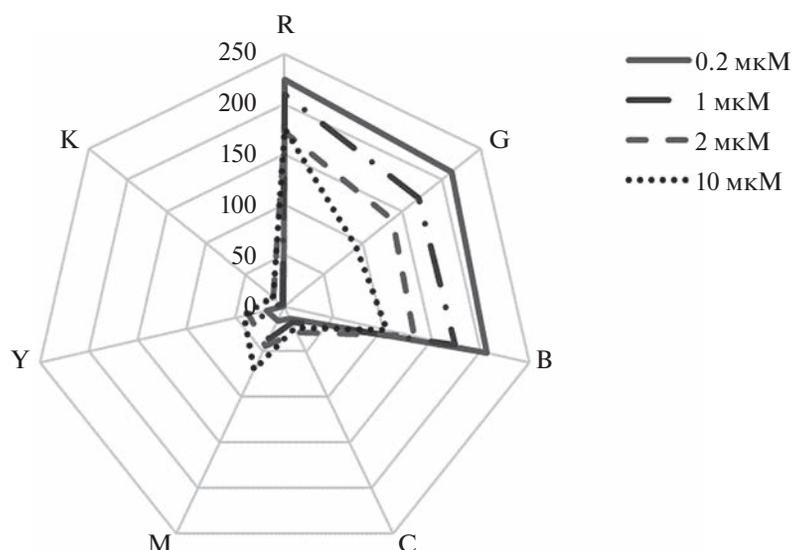


Рис. 5. Профили лепестковых диаграмм в координатах цветных каналов R, G, B, C, M, Y, K при различных концентрациях 2-хлорфенола.

Таблица 1. Уравнения градуировочных графиков для цветиметрического определения фенола и 2-хлорфенола

Аналит	Параметр	Уравнение градуировочного графика (c , мкМ)	R^2
Фенол	I_B	$I_B = -57c + 250$	0.980
	$S_{ЛД}$	$S_{ЛД} = -41400c + 118000$	0.985
2-Хлорфенол	I_B	$I_B = -60c + 230$	0.984
	$S_{ЛД}$	$S_{ЛД} = -36700c + 106000$	0.986

Таблица 2. Контроль правильности цветиметрического определения фенолов методом введено–найдено ($n = 3$, $P = 0.95$)

Аналит	Параметр	Введено, мкМ	Найдено, мкМ	$c_{мин}$, мкМ	S_f
Фенол	Цветиметрический, I_B	0.30	0.26 ± 0.03	0.09	0.05
		0.60	0.54 ± 0.06		0.05
		0.90	0.79 ± 0.13		0.07
	Геометрический, $S_{ЛД}$	0.30	0.27 ± 0.05	0.13	0.04
		0.60	0.53 ± 0.07		0.06
		0.90	0.78 ± 0.11		0.07
2-ХФ	Цветиметрический, I_B	0.30	0.27 ± 0.04	0.13	0.07
		0.60	0.53 ± 0.06		0.05
		0.90	0.78 ± 0.13		0.06
	Геометрический, $S_{ЛД}$	0.30	0.26 ± 0.04	0.11	0.05
		0.60	0.53 ± 0.07		0.06
		0.90	0.80 ± 0.09		0.06

ствительности и коэффициенту детерминации градуировочных зависимостей ($R^2 > 0.96$) получены для геометрического параметра $S_{лд}$ (табл. 1). В табл. 2 приведены пределы обнаружения фенола и 2-хлорфенола после их дериватизации по методике 1, которые не превышали 0.13 мкМ. Полученные данные могут быть применены для сорбционно-цветометрического определения фенолов в диапазоне концентраций от 0.2 до 1.0 мкМ с относительной погрешностью определения, не превышающей 20%.

Правильность сорбционно-цветометрического определения фенола и 2-хлорфенола контролировали методом введено-найдено (табл. 2). Полученные результаты показали, что при определении фенолов в водах по предложенной методике систематические погрешности отсутствуют.

Предложенные подходы к дериватизации фенолов позволили повысить сорбционную емкость полученного методом электроформования нетканого материала на основе ПА-6 по отношению к фенолу и 2-хлорфенолу. Установлено, что повышение эффективности сорбции (более 90%) аналитических форм фенолов достигается варьированием рН в диапазоне 3–5 и времени сорбции (20–30 мин). Показана возможность применения синтетического нановолокна на основе полиамида-6 для концентрирования фенола и 2-хлорфенола в виде их 4-нитрофенилазопроизводных с последующим определением этих соединений на уровне ПДК с применением математической обработки цифровых изображений окрашенных зон сорбентов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гагарина О.В. Оценка и нормирование качества природных вод: критерии, методы, существующие проблемы. Ижевск: Удмуртский университет, 2012. 199 с.
2. Kovács Á., Mörtl M., Kende A. Development and optimization of a method for the analysis of phenols and chlorophenols from aqueous samples by gas chromatography-mass spectrometry, after solid-phase extraction and trimethylsilylation // *Microchem. J.* 2011. Т. 99. № 1. С. 125.
3. Дедов А.Г., Зайцев Н.К., Некрасова В.В., Шкинев В.М., Дедиков Е.В. Определение фенолов в очищенных сточных водах предприятий нефте-газового комплекса (Обзор) // *Нефтехимия*. 2001. Т. 41. № 2. С. 84.
4. Karim F., Fakhruddin A.N.M. Recent advances in the development of biosensor for phenol: A review // *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 2012. Т. 11. № 3. С. 261.
5. Arfin T., Sonawane K., Tarannum A. Review on detection of phenol in water // *Adv. Mater. Lett.* 2019. Т. 10. № 11. С. 753.
6. Rodríguez I., Llompart M.P., Cela R. Solid-phase extraction of phenols // *J. Chromatogr. A.* 2000. Т. 885. № 1–2. С. 291.
7. Andrade-Eiroa A., Canle M., Leroy-Cancellieri V., Cerdà V. Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I) // *Trends Anal. Chem.* 2016. Т. 80. С. 641.
8. Fontanals N., Marcé R.M., Borrull F. New materials in sorptive extraction techniques for polar compounds // *J. Chromatogr. A.* 2007. Т. 1152. № 1–2. С. 14.
9. Djebbar M., Djafri F., Bouchekara M., Djafri A. Adsorption of phenol on natural clay // *Appl. Water Sci.* 2012. Т. 2. № 2. С. 77.
10. Gupta V.K., Saleh T.A. Sorption of pollutants by porous carbon, carbon nanotubes and fullerene – An overview // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2013. Т. 20. № 5. С. 2828.
11. Abussaud B., Asmaly H.A., Ihsanullah I., Saleh T.A., Gupta V.K., Laoui T., Atieh M.A. Sorption of phenol from waters on activated carbon impregnated with iron oxide, aluminum oxide and titanium oxide // *J. Mol. Liq.* 2016. Т. 213. С. 351.
12. Фазылова Г.Ф., Валинурова Э.Р., Хатмуллина Р.М., Кудашева Ф.Х. Сорбционные параметры производных фенолов на различных углеродных материалах // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2013. Т. 13. № 5. С. 728.
13. Nafees M., Waseem A. Organoclays as sorbent material for phenolic compounds: A review // *Clean – Soil, Air, Water.* 2014. Т. 42. № 11. С. 1500.
14. Матвеев А.Т., Афанасов И.М. Получение нановолокон методом электроформования. Учебное пособие / Под ред. Авдеева В.В., Алентьева А.Ю., Лазоряка Б.И., Шорниковой О.Н. М.: МГУ имени М.В. Ломоносова, Научно-образовательный центр по нанотехнологиям, Химический факультет, Кафедра химической технологии и новых материалов, 2010. 83 с.
15. Махова Т.М., Доронин С.Ю. Нановолокна как сорбенты для концентрирования органических токсикантов из водных сред // *Бутлеровские сообщения*. 2018. Т. 53. № 3. С. 55.
16. Luo C.J., Stoyanov S.D., Stride E., Pelan E., Edirisinghe M. Electrospinning versus fibre production methods: from specifics to technological convergence // *Chem. Soc. Rev.* 2012. Т. 41. № 13. С. 4708.
17. Ahmed F.E., Lalia B.S., Hashaikh R. A review on electrospinning for membrane fabrication: Challenges and applications // *Desalination*. 2015. Т. 356. С. 15.
18. Wang X., Hsiao B.S. Electrospun nanofiber membranes // *Curr. Opin. Chem. Eng.* 2016. Т. 12. С. 62.
19. Thavasi V., Singh G., Ramakrishna S. Electrospun nanofibers in energy and environmental applications // *Energy Environ. Sci.* 2008. Т. 1. № 2. С. 205.
20. Persano L., Camposo A., Tekmen C., Pisignano D. Industrial upscaling of electrospinning and applications of polymer nanofibers: A review // *Macromol. Mater. Eng.* 2013. Т. 298. № 5. С. 504.
21. Zhang W., He Z., Han Y., Jiang Q., Zhan C., Zhang K., Li Z., Zhang R. Structural design and environmental applications of electrospun nanofibers // *Compos. Part A: Appl. Sci. Manuf.* 2020. Т. 137. Article 106009.

22. *Nthunya L.N., Gutierrez L., Derese S., Mamba B.B., Verliefde A.R., Mhlanga S.D.* Adsorption of phenolic compounds by polyacrylonitrile nanofibre membranes: A pretreatment for the removal of hydrophobic bearing compounds from water // *J. Environ. Chem. Eng.* 2019. Т. 7. № 4. Article 103254.
23. *Аяри 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.
24. *Рудаков О.Б., Хорохордина Е.А., Данг Ч.Х., Рудакова Л.В.* Определение бисфенола А, триклозана и нонилфенола в материалах и экстрактах методом ТСХ, совмещенным с цифровой цветометрией // *Сорбционные и хроматографические процессы.* 2016. Т. 16. № 5. С. 686.
25. *Аяри В.В., Дмитриенко С.Г., Золотов Ю.А.* Аналитические возможности цифровых цветометрических технологий. Определение нитрит-ионов с использованием пенополиуретана // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия.* 2011. Т. 52. № 1. С. 36.
26. *Шульц Э.В., Моногарова О.В., Осолок К.В.* Цифровая цветометрия: аналитические возможности и перспективы использования // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия.* 2019. Т. 60. № 2. С. 79.
27. *Разуваева Л.М., Фомина А.Д., Махова Т.М., Аржанухина А.И., Доронин С.Ю.* Твердофазные сорбенты на основе синтетических нановолокон и глауконита для извлечения магнезона I из водных сред // *Изв. Саратовского ун-та. Новая Серия. Химия. Биология. Экология.* 2022. Т. 22. № 4. С. 382.
28. *Terra I.A.A., Mercante L.A.* Fluorescent and colorimetric electrospun nanofibers for heavy-metal sensing // *Biosensors.* 2017. Т. 7. № 61. С. 1.
29. *Rattanarat P., Dungchai W., Cate D., Volckens J., Chailapakul O., Henry C.S.* Multilayer paper-based device for colorimetric and electrochemical quantification of metals // *Anal. Chem.* 2014. Т. 86. № 7. С. 3555.
30. *Raj S., Shankaran D.R.* Curcumin based biocompatible nanofibers for lead ion detection // *Sens. Actuators B: Chem.* 2016. Т. 226. С. 318.
31. *Ariza-Avidad M., Salinas-Castillo A., Cuéllar M.P., Agudo-Acemel M., Pegalajar M.C., Capitán-Vallvey L.F.* Printed disposable colorimetric array for metal ion discrimination // *Anal. Chem.* 2014. Т. 86. № 17. С. 8634.
32. *Firdaus M.L., Alwi W., Trinoveldi F., Rahayu I., Rahmidar L., Warsito K.* Determination of chromium and iron using digital image-based colorimetry // *Procedia Environ. Sci.* 2014. Т. 20. С. 298.