

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Ордена Ленина и Ордена Октябрьской Революции
Институт геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского
Российской академии наук
(ГЕОХИ РАН)**

На правах рукописи



ДЖЕНЛОДА РУСТАМ ХАРСАНОВИЧ

**СУСПЕНЗИОННЫЕ КОЛОНКИ С УДЕРЖИВАЕМЫМИ
УЛЬТРАЗВУКОВЫМ ПОЛЕМ МЕЛКОЗЕРНИСТЫМИ СОРБЕНТАМИ ДЛЯ
КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ РАЗЛИЧНЫХ ВЕЩЕСТВ**

1.4.2 – Аналитическая химия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
чл.-корр. РАН, д-р.хим.наук, г.н.с.

Спиваков Б.Я.

д-р.хим.наук, в.н.с.
Шкинев В.М.

Москва – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	13
1.1 Ультразвук в химическом анализе	13
1.2. Основные физические понятия ультразвука	17
1.3 Ультразвук в методах разделения и концентрирования	18
1.3.1 Особенности применения ультразвука в интенсификации процессов выделения и концентрирования веществ	19
1.3.2 Ультразвуковое экстрагирование	21
1.3.3. Ультразвуковая экстракция жидких образцов	22
1.3.3.1. Ультразвуковая дисперсионная жидкостно-жидкостная микроэкстракция (УДЖЖМЭ)	23
1.3.3.2 Ультразвуковая эмульгирующая микроэкстракция (УЭМЭ)	27
1.3.4. Магнитная твердофазная экстракция в ультразвуке (МТФЭ)	28
1.3.5. Суспензионные колонки с удерживаемыми ультразвуковым полем сорбентами	31
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1	32
ГЛАВА 2 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ, РЕАГЕНТЫ, ПРИБОРЫ И ТЕХНИКА ЭКСПЕРИМЕНТА	33
2.1 Анализируемые образцы и используемые реагенты	33
2.2 Аппаратура и техника эксперимента	34
ГЛАВА 3 УДЕРЖИВАНИЕ СОРБЕНТОВ В СУСПЕНЗИОННЫХ КОЛОНКАХ И ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ДИНАМИЧЕСКОГО РЕЖИМА ДЛЯ КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ ВЕЩЕСТВ	44
3.1 Закономерности удерживания частиц сорбента в суспензионной колонке	44
3.1.1 Силы действующие на частицы сорбента в суспензионной колонке	45
3.1.2 Выбор параметров ультразвука для удерживания частиц сорбента в потоке жидкости	50
3.1.3 Исследование удерживания частиц в суспензионных колонках	53
3.2 Влияние характеристик частиц сорбентов	57
3.3 Зависимость эффективности выделения веществ от параметров суспензионной колонки	59
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3	62
ГЛАВА 4 СОРБЦИОННОЕ ВЫДЕЛЕНИЕ МЕТАЛЛОВ ИЗ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ И ВИН В СУСПЕНЗИОННЫХ КОЛОНКАХ	63

4.1 Выделение металлов из водных растворов.....	65
4.2 Выделение РЗЭ из вин.....	75
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4.....	84
ГЛАВА 5 ВЫДЕЛЕНИЕ И КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ ДНК В СУСПЕНЗИОННЫХ КОЛОНКАХ ИЗ ПРИРОДНЫХ ОБРАЗЦОВ	85
5.1 Выделение ДНК из водных растворов	90
5.2 Выделение ДНК из почв.....	94
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5.....	99
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ.....	100
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	100

ВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Сорбционные методы широко используют в науке и технологии для выделения и концентрирования растворенных веществ. Для сорбционного разделения веществ в большинстве случаев применяют зерна сорбента диаметром от 40 до 100 мкм. Сорбционные колонки или патроны, набитые такими сравнительно большими частицами, позволяют проводить сорбционные процессы при низком давлении.

Эффективность сорбционной колонки может быть увеличена за счет уменьшения размера зерен сорбента. Поскольку общая удельная поверхность, а значит, и поверхность контакта фаз у мелкозернистых сорбентов больше, скорость массопереноса аналитов между жидкой фазой и фазой сорбента может быть выше. В связи с этим в колонках для высокоэффективной жидкостной хроматографии применяют материалы с размером частиц от 2 до 10 мкм. Перспективным является применение колонок, заполненных сорбентом в виде суспензии, что позволяет, с одной стороны, использовать мелкозернистые сорбенты и, с другой стороны, обойтись без использования насосов, кранов и линий высокого давления. Перепад давления вдоль суспензионной колонки должен быть значительно ниже, чем вдоль набивной колонки.

Сорбент в виде суспензии может удерживаться в колонке в потоке жидкой фазы без применения каких-либо фильтров. Для создания таких колонок необходимо добиться устойчивого удерживания сорбента в ограниченном объеме проточной системы под действием силового поля. При этом могут быть созданы условия, при которых разделяются не сами частицы, а растворенные аналиты, взаимодействующие с частицами сорбента, удерживаемыми в виде суспензии.

Ультразвуковое излучение успешно применяют в аналитической химии при пробоподготовке. Значительно реже акустические поля используют в процессах разделения и анализа частиц, хотя эта область представляется весьма

перспективной для неорганического и биоорганического анализа. Комбинация ультразвукового источника и соответствующей проточной системы позволила разработать схемы разделения частиц, частично или полностью удерживаемых в поле стоячей ультразвуковой волны.

Возникающие в ультразвуковом поле микроакустические течения создают необходимые условия для ускоренного протекания сорбционного процесса благодаря интенсификации массопереноса в системе сорбат-сорбент. Известно также, что ультразвуковое воздействие может оказывать значительное влияние на кинетику сорбции ионов металлов из водных растворов комплексообразующими и ионообменными материалами, используемыми в аналитической химии и технологии.

Таким образом, стоячие ультразвуковые волны могут играть две роли в сорбционных процессах: удерживать мелкие зерна сорбента в суспензионной ячейке в динамическом режиме и одновременно ускорять сорбционный процесс. Следовательно, развитие нового способа пробоподготовки, основанного на применении суспензионных ультразвуковых колонок, является весьма актуальным и перспективным.

Цель и задачи работы

Основная цель исследования заключалась в разработке способа концентрирования (выделения веществ из различных образцов), основанного на удерживании сорбентов в суспензионных ультразвуковых колонках специальной конструкции и оценки его применимости для решения аналитических задач.

Основные задачи работы:

- изучение закономерностей удерживания сорбентов в суспензионной ультразвуковой колонке под действием стоячих ультразвуковых волн;
- разработка оптимальной конструкции суспензионной ультразвуковой колонки для удерживания сорбционного материала и увеличения скорости массопереноса;

– оценка возможностей использования суспензионной ультразвуковой колонки для выделения и концентрирования ионов металлов из водных растворов;

– применение суспензионной ультразвуковой колонки для концентрирования РЗЭ при анализе вин;

– использование суспензионной ультразвуковой колонки для концентрирования ДНК (микобактерий туберкулеза) из почвы и воды.

Научная новизна

Развит способ концентрирования веществ в динамическом режиме с использованием суспензионной ультразвуковой колонки. Оценена возможность применения данного способа для выделения и концентрирования металлов и биоорганических соединений перед их последующим определением.

Предложен способ выделения и концентрирования элементов из водных сред, в том числе вин с использованием суспензионной ультразвуковой колонки. Показано преимущество данного способа пробоподготовки перед существующими методиками, используемыми для элементного анализа вин.

Впервые показана перспективность применения комбинированного действия акустического и магнитного полей на выделение ДНК из образцов и их последующего качественного и количественного определения методом ПЦР-РВ.

Практическая ценность работы

Предложен оригинальный способ концентрирования с использованием суспензионных ультразвуковых колонок в динамическом режиме при действии стоячих ультразвуковых волн, позволяющие использовать сорбент размером 3-10 мкм.

Предложен метод динамического сорбционного концентрирования ионов металлов из сложных водных растворов с использованием ультразвукового поля, позволяющего сократить время сорбции.

Показана возможность применения суспензионных колонок для выделения редкоземельных металлов из винных материалов для возможной идентификации географического происхождения вин.

Предложен способ выделения нуклеиновых кислот на примере плазмидной ДНК *Mycobacterium tuberculosis* из почвенных вытяжек и воды с использованием суспензионных ультразвуковых колонок и последующей идентификации методом полимеразной цепной реакции. Предложенный способ позволяет проводить выделение ДНК из объемов, значительно превышающих стандартные (100-1000 мкл), а соответствующее аппаратное оформление помогает автоматизировать процесс и создать безопасные условия работы с высоковирулентными микроорганизмами и вирусами.

Автор выносит на защиту:

- закономерности удерживания сорбентов в ультразвуковой суспензионной колонке;
- закономерности сорбционного концентрирования веществ в суспензионных ультразвуковых колонках из различных образцов;
- оригинальный способ осуществления сорбционного концентрирования элементов в динамическом режиме под действием акустического поля;
- сравнительные результаты концентрирования веществ, полученные при использовании сорбции в суспензионных ультразвуковых колонках и других методов пробоподготовки;
- способ выделения ДНК при комбинированном действии стоячих ультразвуковых волн и магнитного поля.

Апробация работы

Основные результаты работы были представлены на Всероссийских и Международных конференциях: 2-й и 3-й Съезды аналитиков России (Москва, 2013, 2017); 4-й, 5-й и 6-й Всероссийские симпозиумы «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» (Краснодар, 2014, 2018, 2021); 1st International conference on ultrasonic-based applications: from analysis to synthesis «ULTRASONICS-2014» (Лиссабон, Португалия, 2014); The

European Conference on Analytical Chemistry «EUROANALYSIS XVIII» (Бордо, Франция, 2015); I Всероссийская конференция «Химический анализ и медицина» (Москва, 2015); The International Conference on Environmental Analytical Chemistry and Food Monitoring «ISEAC 39», (Гамбург, Германия, 2019); X Всероссийская конференция по анализу объектов окружающей среды «Экоаналитика-2016» (Углич, 2016); 10th International Conference on Instrumental Methods of Analysis: Modern Trends and Application (Ираклион, Греция, 2017); XIII Международная научная конференции «Актуальные вопросы биологической физики и химии БФФХ – 2018» (Севастополь, 2018); XV Международный Российско-Китайский Симпозиум «Новые материалы и технологии» (Сочи, 2019).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в международных и отечественных научных рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, и 16 тезисов докладов на российских и международных конференциях.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, пяти глав, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 114 страницах и включает 26 рисунков, 12 таблиц и библиографию из 126 наименований.

Личный вклад автора состоял в поиске, изучении и систематизации литературных данных, посвященных использованию ультразвука в методах разделения и концентрирования веществ, в выполнении экспериментов, в обработке и интерпретации экспериментальных данных, подготовке материалов к публикации, представлении полученных результатов на конференциях.

Вклад соавторов печатных работ

чл.-корр. РАН, д.х.н. Спиваков Б.Я., д.х.н. Шкинев В.М. – постановка цели и задач исследования, обсуждение полученных результатов; к.х.н. Карандашев В.К. – определение содержания элементов в растворах методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой; к.т.н. Князьков Н.Н.

(ИАП РАН) – помощь в теоретическом описании физических сил; Данилова Т.В. – помощь в проведении экспериментов; Петров Д.Г. – помощь в постановке ПЦР-РВ.

Публикации

Основное содержание работы опубликовано в 5 статьях и 16 тезисах докладов:

1. Дженлода Р.Х., Князьков Н.Н., Макарова Е.Д., Шарфарец Б.П., Шкинев В.М. Теоретическое описание удерживания частиц в ультразвуковой суспензионной колонке // Научное приборостроение. 2013. Т. 23. №3. С. 44-55.

2. Коншина Дж.Н., Коншин В.В., Дженлода Р.Х., Шкинев В.М., Данилова Т.В., Карандашев В.К. Получение и исследование свойств силикагелей с ковалентно иммобилизованными азогидразонными (формазановыми) группами для извлечения благородных металлов // Сорбционные и хроматографические процессы. 2014. Т. 14. Вып. 3. С. 485-493.

3. Дженлода Р.Х., Шкинев В.М., Данилова Т.В., Темердашев З.А., Карандашев В.К., Спиваков Б.Я. Суспензионные колонки с удерживаемыми в ультразвуковом поле зернистыми сорбентами для выделения и определения редкоземельных элементов в винах // Журнал аналитической химии. 2015. Т.70. № 12. С. 1264-1270.

4. Dzhenloda R.Kh., Petrov D.G., Shkinev V.M., Spivakov B.Ya. DNA recovery from environmental samples on suspension columns under a combined action of ultrasound and magnetic fields followed by polymerase chain reaction detection // Mendeleev Communications. 2017. V. 27. P. 302-303.

5. Аюпова В.В., Дженлода Р.Х., Данилова Т.В. Разделение микро- и наночастиц в ультразвуковой суспензионной колонке // Успехи химии и химической технологии. 2018. Т.32. №10. С. 8-10

6. Дженлода Р.Х., Шкинев В.М., Спиваков Б.Я., Данилова Т.В. Концентрирование веществ с использованием ультразвуковых суспензионных

колонок / Тезисы докладов «Второй съезд аналитиков России», Москва, 23-27 сентября 2013 г., С.454.

7. Дженлода Р.Х., Коншина Д.Н., Шкинев В.М., Коншин В.В., Данилова Т.В. Сорбционное концентрирование металлов на силикагелях модифицированных формазаповыми группами / Тезисы докладов «Второй съезд аналитиков России», Москва, 23-27 сентября 2013 г., С.456.

8. Shkinev V.M., Spivakov B.Ya., Dzhenloda R.Kh., Danilova T.V., Knyazkov N.N., Temerdashev Z.A. Ultrasound-assisted retention of bead sorbents in columns for the recovery of trace elements from aqueous samples / Book of abstracts, 1st International conference on ultrasonic-based applications: from analysis to synthesis «ULTRASONICS-2014», Lisbon, Portugal, 15-17 September 2014, P. 65.

9. Дженлода Р.Х., Шкинев В.М., Прудковский А.Г., Князьков Н.Н., Данилова Т.В., Спиваков Б.Я. Теоретическое описание процесса удерживания частиц сорбента в ультразвуковом поле стоячей волны при сорбции из потока раствора / Тезисы докладов IV Всероссийского симпозиума «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» с международным участием, Краснодар, 28 сентября – 04 октября 2014 г., С.

10. Шкинев В.М., Дженлода Р.Х., Данилова Т.В., Карандашев В.К., Темердашев З.А., Спиваков Б.Я. Сорбционное концентрирование редкоземельных элементов при анализе вин / Тезисы докладов IV Всероссийского симпозиума «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» с международным участием, Краснодар, 28 сентября – 04 октября 2014 г., С.207

11. Spivakov B., Dzhenloda R., Petrov D., Kurochkin V., Knyazkov N., Shkinev V. Dynamic recovery and determination of DNA in solutions using ultrasound suspension columns and magnetic sorbents. // Book of abstracts, EUROANALYSIS XVIII 18 th edition of EuroAnalysis. The European Conference on Analytical Chemistry, Bordeaux, France, 6-10 September 2015, P. 291.

12. Дженлода Р.Х., Шкинев В.М., Петров Д.Г., Князьков Н.Н., Курочкин В.Е., Спиваков Б.Я. Концентрирование и определение ДНК в

больших объемах растворов с использованием суспензионных колонок и комбинации ультразвукового и магнитного полей / Тезисы докладов I Всероссийской конференции с международным участием «Химический анализ и медицина», Москва, 9-12 ноября 2015 г, С 26.

13. Dzhenloda R.Kh., Petrov D.G., Shkinev V.M., Spivakov B.Ya. Ultrasound and magnetic fields in the determination of dna in soil. / Book of abstracts, ISEAC 39, Hamburg, 19 - 22 july, 2016, <http://www.iseac-conferences.org/index.php/2-uncategorised/114-poster-group-1>.

14. Дженлода Р.Х., Петров Д.Г., Шкинев В.М., Данилова Т.В., Спиваков Б.Я. Выделение ДНК из почвы с использованием стоячих ультразвуковых волн и магнитного поля // Тезисы докладов X Всероссийской конференции по анализу объектов окружающей среды «Экоаналитика -2016», Углич, 26 июня-2 июля 2016 г., С.48.

15. Shkinev V.M., Dzhenloda R.Kh., Danilova T.V., Spivakov B.Ya. Separation and preconcentration of particles and solutes before analysis using ultrasonic standing waves. // Book of abstract, 10th International Conference on Instrumental Methods of Analysis: Modern Trends and Application, Heraklion, Greece, 17-22 September 2017, P. 9

16. Spivakov B.Ya., Dzhenloda R.Kh., Shkinev V.M., Petrov D.G. Flow sample preparation using standing wave ultrasound and magnetic fields in the determination of nucleic acids by real-time polymerase chain reaction // Book of abstract, 10th International Conference on Instrumental Methods of Analysis: Modern Trends and Application, Heraklion, Greece, 17-22 September 2017, p.111

17. Дженлода Р.Х., Шкинев В.М., Спиваков Б.Я., Данилова Т.В. Разделение и концентрирование частиц и растворенных веществ в поле стоячей ультразвуковой волны / Тезисы докладов Третьего съезда аналитиков России, Москва, 8-13 октября 2017 г., <http://www.wssanalytchem.org/car2017/Publications/2017-Abstracts.pdf>. С. 247

18. Дженлода Р.Х., Шкинев В.М. Разделение и концентрирование частиц и растворимых веществ в ультразвуковых стоячих волнах / Тезисы

докладов V Всероссийского симпозиума «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» с международным участием, Краснодар, 07–13 октября 2018 г., С. 120.

19. Шкинев В.М., Дженлода Р.Х., Данилова Т.В., Аюпова В.В., Спиваков Б.Я. Разделение и концентрирование частиц в ультразвуковых стоячих волнах / Тезисы докладов V Всероссийский симпозиум «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» с международным участием, Краснодар, 07–13 октября 2018 г., С. 134.

20. Дженлода Р.Х., Шкинев В.М., Петров Д.Г., Спиваков Б.Я. Ультразвуковая суспензионная колонка для анализа *Mycobacterium tuberculosis* с использованием наноструктурированного магнитного сорбента / Тезисы докладов XIII Международной научной конференции «Актуальные вопросы биологической физики и химии БФФХ – 2018», Севастополь, 17 - 21 сентября 2018 г. с.43-45

21. Дженлода Р.Х., Шкинев В.М., Спиваков Б.Я. Ультразвуковые стоячие волны в анализе различных объектов / VI Всероссийский симпозиум «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» с международным участием, 26 сентября по 2 октября 2021 г., г. Краснодар, Россия, https://www.analytconf.ru/files/2021/analytconf2021-nauchnaya-programma-simpoziuma_v4.pdf

ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Ультразвук в химическом анализе

Важнейшей стадией анализа, на которую затрачивается более 95% всего времени, является пробоподготовка. Применение ультразвука в пробоподготовке интересно для ускорения анализа [1]. Например, при ультразвуковом облучении длительность растворения проб в кислотах может составлять несколько минут [2,3].

В работе [4] Золотов Ю.А., рассматривая использование ультразвука в химическом анализе, отмечает, что наибольшее значение имеют следующие свойства ультразвука:

1. Зависимость скорости ультразвука в растворах и смесях от концентрации растворенного вещества и связанная с этим возможность количественного определения соединений и отдельных элементов.
2. Деполяризующее действие ультразвука и ускорение электролитического выделения элементов.
3. Эффект озвучивания газов под действием прерываемого потока тепловой радиации и основанные на этом оптико-акустический метод анализа газов и метод изучения спектров поглощения в инфракрасной области.
4. Диспергирующее, коагулирующее, перемешивающее действие ультразвука, окисление в ультразвуковом поле, изменение скорости растворения веществ и др.

Опубликован ряд обзорных работ посвященных использованию ультразвука в химическом анализе [1,3–8].

Ультразвуковая интенсификация процессов постепенно становится довольно распространенным явлением в аналитической химии [9]. Различные стадии аналитического процесса, которые могут быть ускорены и/или улучшены с использованием ультразвуковых полей представлены на рис.1.1. На этом рисунке показано различие между применением ультразвука для

методов пробоподготовки и непосредственно для методов детектирования. Эта классификация была сделана в соответствии с публикациями о различных аспектах использования ультразвука в работах [6,9,10]. Луке де Кастро и Приего Капоте было обобщено большое количество информации в книге «Аналитическое применение ультразвука» [10].

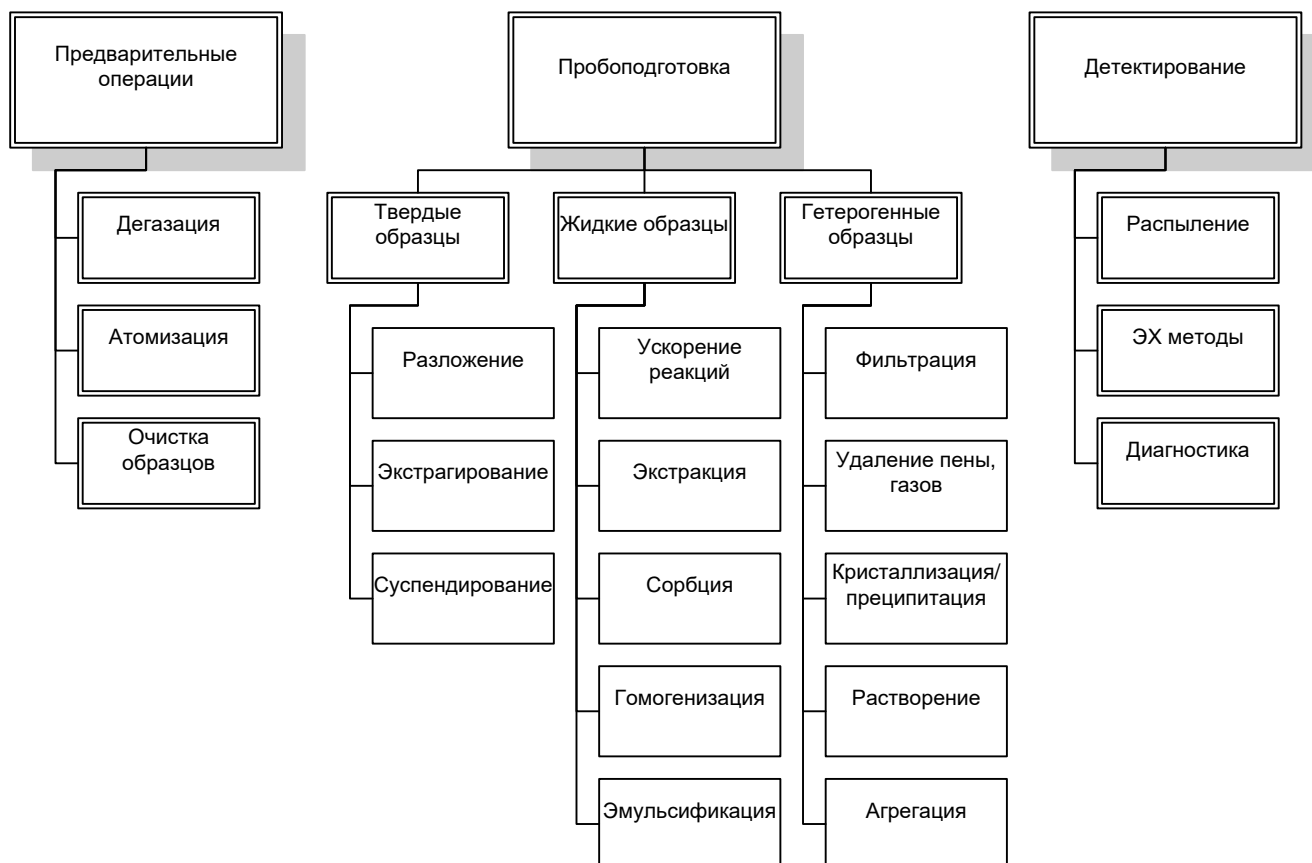


Рисунок 1.1. Использование ультразвука в аналитической химии

Одним из наиболее распространенных применений ультразвука является пробоподготовка, которая может быть использована как для микро- так и макро- вариантах. Следует отметить, что ультразвук может быть также использован в пробоподготовке объектов, находящихся в различных агрегатных состояниях (твердом, жидком и гетерогенном).

Твердые образцы. Для твердых образцов ультразвук может быть использован в пробоподготовке с целью интенсификации таких процессов как разложение, выщелачивание, образование суспензий и разрушение [10,11].

Подготовка твердых образцов к анализу неизбежна из-за невозможности прямого определения аналитов в этих образцах. ИЮПАК определяет «разложение» как «химический процесс для размягчения или солубилизации материала с помощью тепла, химических веществ, реагентов и воды». Например, матрица образца разлагается и теряет большую часть своей первоначальной структуры. Для увеличения скорости разложения образца тепловая энергия может быть заменена или дополнена другим видом энергии, например ультразвуком. При ультразвуковом воздействии разложение может быть как механическое, так и химическое [10].

Еще один способ выделения аналитов в жидкую фазу – это экстрагирование или выщелачивание [12,13]. Выщелачивание отделяет растворимые компоненты от некоторого материала путем перколяции. Однако выщелачивание не является основным этапом подготовки пробы, а только более избирательным, чем разложение, поскольку оно сохраняет большинство матричных элементов в твердом веществе [10]. Другим способом для подготовки твердых проб является приготовление суспензий. Суспензии получают путем добавления жидкости к предварительно измельченной, просеянной и взвешенной твердой пробе; это обеспечивает стабильность суспензии в течение времени, необходимого для распределения пробы в объеме и для передачи в измерительный прибор вручную или автоматически [9,10]. Во всех указанных процессах ультразвук может быть использован для интенсификации процессов.

Гетерогенные образцы. Основная цель работы с гетерогенными средами состоит в том, чтобы отделить твердую фазу от жидкой, растворить ее, уплотнить, ускорить образование твердой фазы. В основном применение ультразвука для газожидкостных гетерогенных систем включает распыление, дегазацию и пеногашение [9,10,14]. Фильтрация является одним из стандартных способов разделения фаз, но она может быть значительно облегчена с использованием ультразвука. Агрегация или агломерация, представляет собой образование крупных частиц из мелких, которые могут

быстро объединяться под воздействием ультразвука [9,10]. Сонокристаллизация и соноосаждение – это применение ультразвука для образования твердых фаз [10,15,16]. Сонокристаллизация — это общепринятое в настоящее время название использования мощного ультразвука для контроля и ускорения хода процесса кристаллизации [9,10]. Ультразвук также эффективно способствует образованию мелкодисперсных и однородных частиц, процесс образования которых можно назвать соноосаждение [9,10]. Использование этого эффекта в аналитической химии, может облегчить подготовку образцов в нефелометрических и турбидиметрических методах [9,10].

Жидкий образец. Применение ультразвука при подготовке жидких образцов можно разделить на две основные группы. Первая группа – в которой ультразвук только ускоряет физические процессы. В эту группу можно включить жидкостно-жидкостную экстракцию, эмульгирование, сорбцию, гомогенизацию и образование липосом [10,17,18]. Во вторую группу входят те, которые проходят с химическими превращениями. Эта группа включает в себя такие процессы как дериватизация, окисление/восстановление, гидролиз, органический синтез и интенсификация химических реакций [10,19]. В работах авторов [6,7] было подробно описано влияние ультразвука на различные химические реакции [7]. Большинство химических реакций в ультразвуковых полях не используется в химическом анализе, тогда как первая группа заслуживает больше внимания в аналитической химии. Кастро была опубликована работа о роли ультразвука в аналитической дериватизации [20,21]. Эмульгирование — это явление, происходящее между двумя жидкими несмешивающимися фазами, при котором одна (дисперсная) фаза распределяется в другой фазе в виде мелких капель диаметром, обычно превышающим 0,1 мкм [9,10]. Ультразвуковой эффект основан на разрушении капель в ультразвуковых жидкостно–жидкостных системах в результате кавитации. Липосомы представляют собой сферические везикулы, образованные агрегацией молекул амфифильных фосфолипидов в виде

бислойной структуры [22]. Липосомы вызывают интерес в самых разных областях - от биохимии и молекулярной биологии до косметической и пищевой технологий, где для их получения используется ультразвуковое излучение.

Также в ряде в работе [23] показано, что ультразвук может играть значительную роль в подготовке различных датчиков [23].

1.2. Основные физические понятия ультразвука

Ультразвук (УЗ) – это акустические волны, частота которых превышает $1,0-2,0 \cdot 10^4$ Гц (10 – 20 кГц) и определяется физиологическими особенностями человеческого слуха [24]. Указанная величина является условной, т.к. верхняя граница восприятия звука имеет значительный разброс для различных индивидумов. При распространении в жидкостях верхняя граница УЗ достигает величины 10^{13} Гц. Область частот УЗ разделяют на три подобласти: низкие частоты – 10-100, средние – 10^2-10^4 и высокие – 10^4-10^6 кГц. Упругие волны с частотами 10^6-10^9 называют гиперзвуком. Хотя УЗ не отличается по своей природе от упругих волн слышимого диапазона и его распространение подчиняется общим законам распространения звуковых волн, он обладает специфическими особенностями. Законы распространения и поглощения УЗ достаточно полно освещены в литературе, поэтому в работе кратко рассмотрены лишь те специфические особенности УЗ, которые важны для интенсификации аналитических процессов. В этом смысле прежде всего следует отметить возможность получения высоких значений интенсивности, т.е. средней по времени энергии, переносимой звуковой волной через единичную площадку, перпендикулярную к направлению распространению волны при относительно небольших значениях амплитуд колебательного смещения. При воздействии на жидкость УЗ значительной интенсивности (свыше 1 Вт/см^2) возникают различные нелинейные эффекты, среди которых наиболее важными для интенсификации аналитических процессов являются акустические течения и кавитация.

Акустические течения – это регулярное смещение среды вихревого характера, заключающееся в том, что переносимое звуковой волной количество

движения, связанное с колебаниями частиц среды, при поглощении волны передается среде, вызывая ее регулярное движение. Акустические течения способствуют интенсификации массообменных процессов, являясь важнейшим фактором интенсификации процессов концентрирования соосаждением и экстракцией при воздействии на систему УЗ колебаний.

К важнейшим нелинейным эффектам, возникающим в жидкости при прохождении УЗ, относится кавитация. Кавитация – это образование в жидкости пульсирующих пузырьков, заполненных паром, газом или их смесью. Кавитационные пузырьки образуются в тех местах жидкости, где давление становится ниже некоторого критического значения, при котором начинается кавитация. Это давление называется порогом кавитации. Для идеальной воды порог кавитации равен 1500 кг/см^2 . Однако для реальных жидкостей порог кавитации соответствует значительно меньшим растягивающим напряжениям; так, для бидистиллированной воды он составляет 250 кг/см^3 . Низкая прочность реальной жидкости связана с наличием в ней зародышей кавитации – микроскопических пузырьков газа, твердых частиц, имеющих трещины, заполненные газом и т.д.

Степень развития кавитации, характер ее протекания меняются при изменении газосодержания жидкости, а также ее температуры и давления, параметров УЗ (частоты и интенсивности). Это позволяет, изменяя вышеперечисленные условия, управлять процессами кавитации.

1.3 Ультразвук в методах разделения и концентрирования

Низкая концентрация некоторых органических и неорганических веществ, сложная матрица в объектах окружающей среды и пищевых продуктах затрудняют определение веществ. Поэтому для определения веществ с низким содержанием в сложных матрицах используют пробоподготовку, которая позволяет выделить и/или концентрировать определяемое вещество. Разработка надежных, быстрых методов пробоподготовки является одной из основных задач аналитической химии. Классические методы выделения, такие как жидкостная экстракция или сорбция иногда требуют значительного

времени для проведения процесса. Также, например в экстракции часто используются токсичные органические растворители, представляющие опасность для окружающей среды. Использование ультразвука в этих методах позволяет интенсифицировать процессы выделения веществ и сократить расход растворителя в экстракционных процессах.

1.3.1 Особенности применения ультразвука в интенсификации процессов выделения и концентрирования веществ

В анализе чаще всего проводят сорбцию из жидких фаз, в которых, наряду с молекулярной адсорбцией, могут проходить процессы ионного обмена и комплексообразования.

Несмотря на широкое использование сорбции в химическом анализе, его использование бывает затруднено из-за недостатков сорбционной емкости сорбента и продолжительного времени, необходимого для полного извлечения аналита из раствора.

Возможными методами интенсификации сорбции могут служить способы с применением ультразвукового поля.

При использовании ультразвука для интенсификации сорбционных процессов важным фактором, ограничивающим его применение, может быть кавитация, приводящая к разрушению частиц сорбента. В различных исследованиях было показано, что повреждения сорбционного материала могут происходить из-за всхлопывания кавитационных пузырьков (если центр коллапса находится на расстоянии радиуса пузырька от поверхности сорбента), за счет сильных течений, вызывающих соударения между частицами, а также за счет столкновений частиц между собой, вызванных кавитацией [25,26].

Для частиц сорбента, которые проявляют хорошую прочность и деформационные свойства, разрушения не наблюдается или происходят незначительные повреждения. Эти частицы способны преобразовывать энергию удара в энергию деформации. Они имеют высокую разрушающую нагрузку и высокую эластичность. Это основные механические свойства,

которые необходимо учитывать при выборе материалов для применения с использованием ультразвука [27].

Ультразвук используется для повышения скорости реакций, время протекания которых определяется внешней диффузией. Ультразвуковое воздействие способствует значительному ускорению гетерогенных реакций за счет интенсификации, в первую очередь, внешней диффузии. Константы скорости внешней диффузии увеличиваются практически в три раза [27–29]. Авторы [30] предполагают, что причина ускорения связана с развитием в системе кавитационных явлений (нарушение связности жидкости и образования кавитационных пузырьков). Пузырьки сосредотачиваются на границе раздела жидкость-твердое тело. Их поверхность заряжена, диполи воды, окружающие пузырек, частично расположены перпендикулярно к его поверхности с положительным зарядом в глубь раствора. Кавитационные пузырьки окружены двойным электрическим слоем, в котором, скорее всего, и происходит концентрирование ионов металла, что приводит к увеличению их содержания вблизи поверхности частиц сорбента и, как следствие, к увеличению скорости диффузии к поверхности силикагеля и ускорению взаимодействия.

Также было установлено, что интенсивность диффузии при равных условиях зависит от диаметра пор в частицах твердой фазы и частоты ультразвука [31,32].

Ультразвук также способствует десорбции адсорбированных молекул с поверхности и пор. В работе [33] показано, что десорбция увеличивается с увеличением частоты и интенсивности ультразвука.

В работе [34] авторы предполагают, что увеличение скорости протекания сорбции на поверхности сорбентов вызвано, возникающими акустическими течениями (шлихтинговским и релеевским) вблизи препятствий (частицы сорбентов), помещенных в ультразвуковое поле. Шлихтинговское течение представляет собой вихревые потоки в пограничном слое (жидкость-твердое тело) и обуславливает ускоренную диффузию вещества через границу раздела.

Рэлеевское течение – вихревые потоки, образующиеся на внешней части пограничных вихрей в результате взаимодействия слоев жидкости, и обуславливают ускоренный массообмен в пограничном слое.

1.3.2 Ультразвуковое экстрагирование

В последнее время ультразвук используется при извлечении неорганических и органических соединений из твердых образцов главным образом потому, что это экономичная и эффективная альтернатива классическим методам выделения [35,36]. Классические методы выделения часто требуют большого расхода растворителя и на них затрачивается продолжительное время. Для преодоления или минимизации этих недостатков были разработаны современные способы выделения веществ, такие как жидкостная экстракция под давлением, сверхкритическая жидкостная экстракция и микроволновая экстракция. Эти методы выполняются с применением высокой температуры и/или давления для повышения эффективности выделения, а также осуществляются на дорогостоящем оборудовании. Преимущество экстрагирования под действием ультразвука перед другими современными методами выделения более низкая стоимость оборудования. На рис.1.2 показан схематический вид различных методов экстрагирования веществ, выполняемые в пробирках с использованием зонда или ультразвуковой ванны. После обработки ультразвуком систему разделяют центрифугированием для последующего отбора экстракта либо экстрагирование осуществляется в колонках с последующей вакуумной фильтрацией.

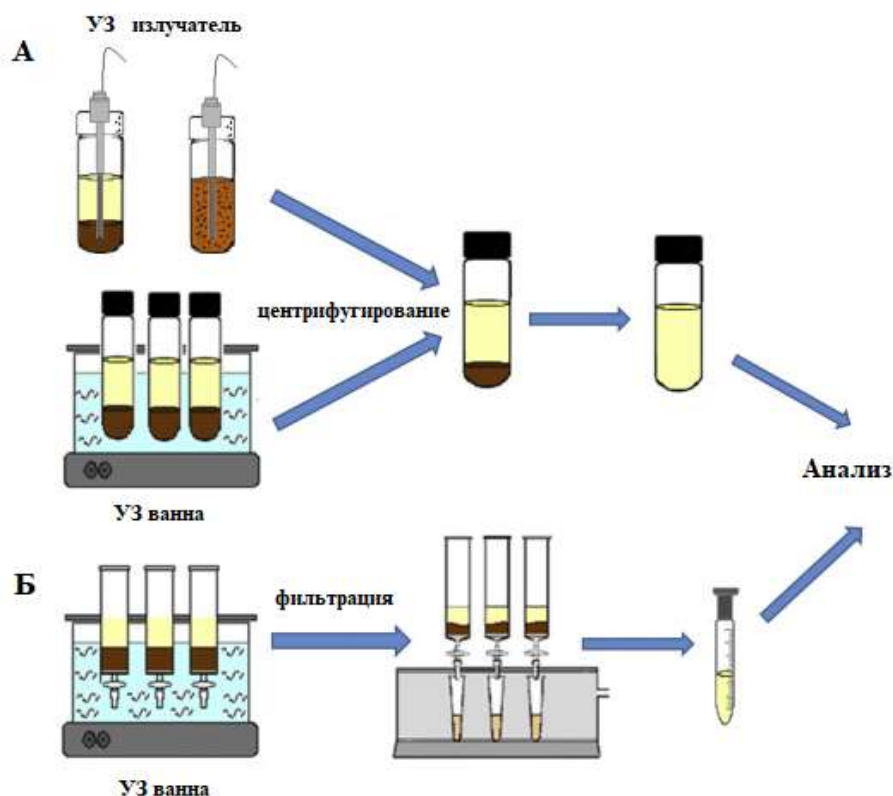


Рисунок 1.2. Схема извлечения веществ из твердых образцов с использованием УЗ излучателя (А) и УЗ ванны (Б).

1.3.3. Ультразвуковая экстракция жидких образцов

В последние годы наблюдается значительный рост использования ультразвука при извлечении веществ из жидких образцов, однако первоначально его применение ограничивалось твердыми образцами. В настоящее время созданы миниатюрные методы выделения веществ с помощью ультразвука в которых уменьшен расход элюента и сорбента. Это послужило созданию экономичных, быстрых и экологически безопасных аналитических методов. Анализ литературы за последние годы по методам выделения веществ показал, что исследователи уделяют внимание использованию новых экстрагентов (ПАВ, ионные жидкости), новых сорбентов (молекулярно-импрегнированные полимеры, магнитные наночастицы), а также новых материалов (полые волокна) [37,38].

1.3.3.1. Ультразвуковая дисперсионная жидкостно-жидкостная микроэкстракция (УДЖЖМЭ)

УДЖЖМЭ в последние годы стала использоваться, как экологически безопасный метод пробоподготовки для выделения органических соединений. Это обусловлено простотой, скоростью, низкой стоимостью и высоким коэффициентом разделения при малых объемах пробы. В данном методе экстрагент смешивают с диспергатором перед их вводом в образец. Мутный раствор, образованный микрокаплями экстрагента, диспергированными в водном образце, позволяет выделить целевые аналиты водной фазы в экстрагент. Разделение фаз достигается после стадии центрифугирования и экстракт, содержащий целевые соединения, собирают с помощью микрошприца для анализа. Применение ультразвука в данном методе используется для увеличения скорости массопереноса аналитов из водной фазы в экстрагент. Извлечение аналитов с использованием УДЖЖМЭ зависит от нескольких факторов, таких как выбор экстрагента и диспергатора, объема этих жидкостей, количества образца, ионной силы или рН. Разработка экологически чистых, эффективных и устойчивых методов выделения является наиболее развиваемой исследователями темой исследований в последние годы [39–41]. Общая схема различных методов на основе УДЖЖМЭ представлена на рис. 1.3.

Ультразвуковое излучение является эффективным инструментом для облегчения эмульгирования, т.к. увеличивается скорость процесса массопереноса между двумя несмешивающимися фазами, поэтому нет необходимости вводить жидкость-диспергатор. Кроме того, отсутствие диспергатора предотвращает снижение коэффициента распределения аналитов в экстрагенте.

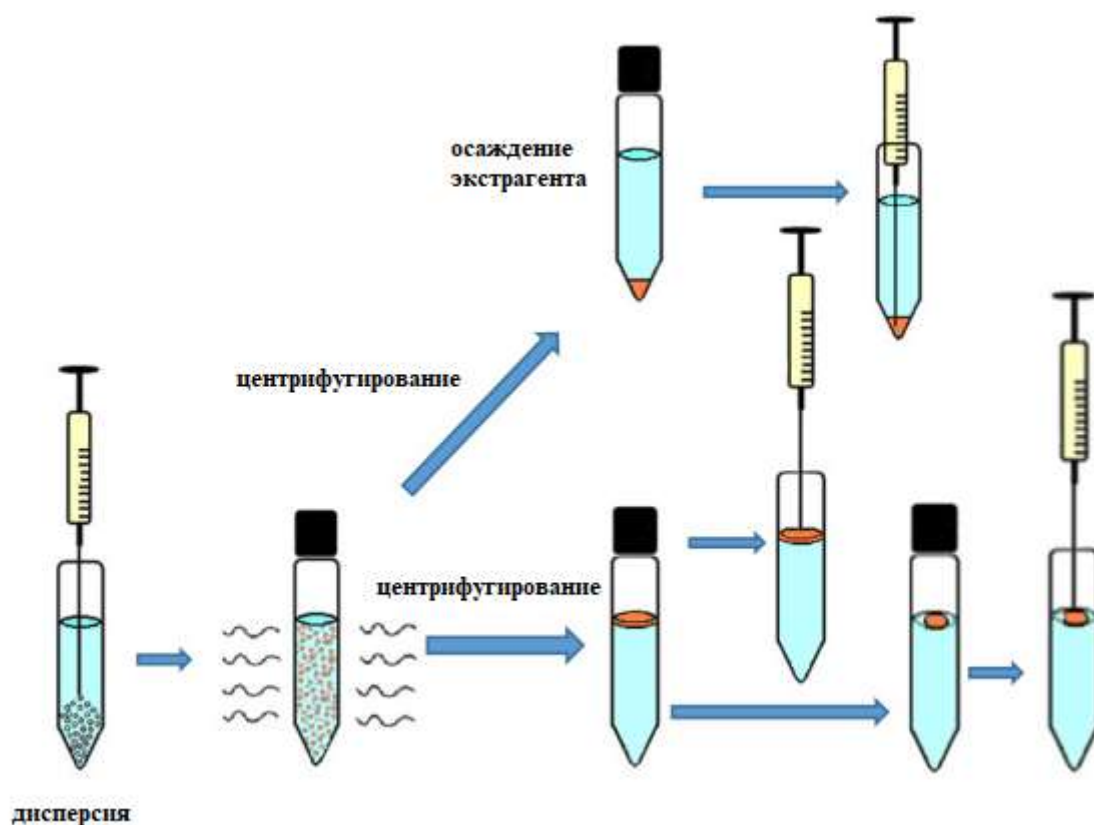


Рисунок 1.3. Схема ультразвуковой дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции

Современные направления в методе УДЖЖМЭ – это использование органических реагентов, таких как ионные жидкости (ИЖ) и поверхностно-активные вещества, как наиболее экологически безопасные. Таким образом, использование экстрагентов, меньших по плотности чем вода, позволяет создать экстракт в виде капли на поверхности жидкого образца. Однако необходимость центрифугирования для разделения фаз является недостатком этого метода. В работе [42] было предложено добавлять высаливающий реагент для устранения этого недостатка. Авторы работы объединили ультразвуковую дисперсионную микротвердофазную экстракцию (УЗ-ДМТФЭ) с УДЖЖМЭ для обнаружения трех нестероидных противовоспалительных препаратов (диклофенак, ибупрофен и мефенамовая кислота) в образцах плазмы, мочи человека и сточных водах. Слоистый нанокompозит - двойной гидроксид-углеродная нанотрубка (8 мг) использовали в УЗ-ДМИФЭ. На следующем этапе

полученный раствор разбавляли 5 мл деионизированной воды, рН доводили до 3,0 и добавляли 1-ундеканол (60 мкл) для проведения УДЖЖМЭ. Затем смесь пропускали через небольшую колонку, заполненную NaCl (5 г); из-за эффекта высаливания образовывались мелкие капли 1-ундеканола. Поскольку растворитель имеет меньшую плотность чем вода, капли поднимались на поверхность раствора. На обоих этапах применение ультразвука ускоряло массоперенос и сократило время выделения диклофенака, ибупрофена и мефенамовой кислоты.

Ионные жидкости (ИЖ) заменяют хлорированные токсичные растворители, используемые в УДЖЖМЭ благодаря своим уникальным физико-химическим свойствам, таким как переменная вязкость, высокая термическая стабильность и незначительное давление пара [43]. Кроме того, сочетание органических катионов с различными анионами обеспечивает ИЖ гидрофобные или гидрофильные свойства. В ИЖ-УДЖЖМЭ чаще всего используется гексафторфосфат 1-алкил-3-метилимидазолия ($[C_nMIM]PF_6$) с 2-8 атомами углерода в алкильной цепи (гексил, октил). В ИЖ-УДЖЖМЭ ультразвук использовали для сокращения времени (от 2 до 8 мин.) и получения более эффективного диспергирования экстракционного растворителя. В работе [41] авторы разработали метод УЗ-ИЖ-ДЖЖМЭ для выделения девяти веществ из сточных вод с использованием ИЖ – 1-октил-3-метилимидазолия ($[C_8MIM][PF_6]$) была использована в качестве экстрагента, а ацетонитрил в качестве диспергатора. Были оптимизированы различные условия, влияющие на эффективность экстракции, такие как тип и объем ионной жидкости, тип и объем диспергатора, охлаждение в воде, время обработки ультразвуком, время центрифугирования, рН образца и ионная сила.

Метод определения четырнадцати загрязняющих веществ в воде и также различных фармацевтических препаратах был разработан с проведением дериватизации перед процессом УДЖЖМЭ [44]. Дериватизация целевых аналитов была достигнута с использованием этилхлорформиата, пиридина и этанола, которые также действовали, как диспергатор 100 мкл хлороформа в

УДЖЖМЭ. Пределы обнаружения определяемых соединений составляли от 0,01–0,03 нг / мл в воде и от 0,06 до 0,15 нг/мл в различных фармацевтических препаратах.

В некоторых работах УДЖЖМЭ используется в сочетании с другими методами, такими как вихревое перемешивание, для улучшения процесса диспергирования. Это называется ультразвуковой вихревой дисперсионной жидко-жидкостной микроэкстракцией. Так, в работе [45] предложен метод для чувствительного определения семи фосфорорганических и триазиновых пестицидов в винах. В этом методе диспергатор не добавлялся, т.к. матрица содержит от 10 до 15% спирта по объему. Это содержание спирта играет роль дополнительного поверхностно-активного вещества, а ультразвуковая ванна обеспечивает энергией, достаточной для получения мелкодисперсной фазы. Вихрь играет важную роль в начальной дисперсии экстракционного растворителя. Для достижения хорошей экстракции пять экстрагентов с разной плотностью, полярностью и растворимостью в воде были оценены как экстрагенты, среди них был выбран 1,2-дихлорэтан. Данный метод позволяет повысить коэффициент обогащения аналитов от 210 до 232 раз, с извлечением от 92,0% до 103,4% [46] для определения трех эфиров фталевой кислоты в дистиллятах с помощью ГХ-МС. Вортекс использовали для растворения необходимого количества NaCl в разбавленном образце и получения эмульсии путем тонкого диспергирования экстрагента (без использования диспергатора) с последующей обработкой ультразвуком в течение 10 минут.

Иногда коэффициент концентрирования, достигаемый с помощью УДЖЖМЭ недостаточно высок для определения следов некоторых органических веществ, и требуются большие объемы образца для улучшения пределов обнаружения метода. В работе [47] предложен метод определения девяти полициклических ароматических углеводородов в больших объемах поверхностных вод. Сутью разработанной методики стало использование большого объема воды (1 л). Экстракцию проводили 300 мкл изооктана, но без дисперсионного растворителя. Ультразвуковое излучение обеспечивало

достаточную энергию для эмульгирования. Использование такого большого объема пробы улучшило пределы обнаружения из-за достигнутого высокого коэффициента предварительного концентрирования до 100 000 раз.

1.3.3.2 Ультразвуковая эмульгирующая микроэкстракция (УЭМЭ)

УЭМЭ – одна из наиболее распространенных процедур, используемых при анализе органических загрязнителей в жидких пробах. Основное различие данного метода от УДЖЖМЭ заключается в отсутствии диспергатора, поскольку ультразвуковое излучение является единственным способом увеличения разделения между образцом и экстракционным растворителем. В УЭМЭ экстрагент (≤ 200 мкл) добавляется к раствору образца (от 1 до 12 мл). Затем смесь подвергают ультразвуковому облучению в течение ≤ 5 мин. Затем, как и в ДЖЖМЭ, эмульсию разделяют центрифугированием. Далее осажденный или плавающий экстракт, содержащий определяемые соединения, отбирается шприцем для последующего анализа. Наиболее часто используемые экстрагенты в УЭМЭ – опасные органические растворители, такие как хлороформ, четыреххлористый углерод, хлорбензол, дихлорметан и тетрахлорэтилен, поэтому используется только несколько микролитров (≤ 100 мкл). Экстрагенты плотностью легче воды (1-ундеканол, 1-додеканол или 1-деканол) применяются, когда необходим отбор экстракта с поверхности. Также в УЭМЭ используют ИЖ в качестве экстрагентов, как экологически безопасные. В работе [36] разработан метод ИЖ-УЭМЭ с использованием $[C_8MIM][PF_6]$ в качестве экстрагента для определения четырех фунгицидов в природных водах. Были исследованы и оптимизированы различные параметры (тип и объем ИЖ, время ультразвукового эмульгирования, температура, тип соли), влияющие на эффективность выделения. Оптимизированные условия включали 5,0 мл образца, 1% NaCl, 40 мкл экстрагента $[C_8MIM][PF_6]$ и обработка ультразвуком продолжительностью 15 мин.

Модификацией процедуры УЭМЭ является добавление поверхностно-активного вещества в качестве эмульгатора для улучшения диспергирования экстрагента в водной фазе, ускоряя образование капель под действием

ультразвукового излучения. Таким образом, процесс экстракции сокращается и как следствие предотвращается разложение аналитов. Этот альтернативный подход известен как УЭМЭ-ПАВ (ультразвуковая эмульгированная микроэкстракция с ПАВ). В методе УЭПЭ-ПАВ, представленный в работе [48], 20 минут ультразвукового излучения были необходимы для эффективного выделения пяти пестицидов во фруктовых соках. Выделение снизилось, когда время обработки ультразвуком увеличилось с 20 до 30 мин. Это было связано с повышением температуры из-за обработки ультразвуком, которая способствовала образованию мицелл, препятствующих массопереносу.

1.3.4. Магнитная твердофазная экстракция в ультразвуке (МТФЭ)

Использование магнитных наночастиц в качестве твердой основы для извлечения веществ из жидких проб в последние годы привлекает внимание многих исследователей. Оксид железа Fe_3O_4 (магнетит) является наиболее используемым для получения сорбентов и применения в МТФЭ. Это связано с его стабильностью, низкой токсичностью и биосовместимостью, а также с его высоким магнитным моментом, а простые методы синтеза позволяют получать его в больших количествах. Магнитные частицы также могут быть покрыты различными оболочками (силикагель, полимеры) и далее модифицированы различными функциональными группами. Особенность магнитных частиц – способность реагировать на магнитное поле, поэтому ими можно управлять с помощью магнита, что является важным с точки зрения простоты их использования. При использовании УЗ в МТФЭ сорбент добавляется непосредственно в раствор и после обработки УЗ магнитные частицы с сорбированным аналитом отделяются магнитом от раствора. Далее раствор удаляют, а определяемые соединения могут быть десорбированы с сорбента с использованием небольшого количества подходящего элюента. После десорбции магнитные частицы снова отделяют от элюата с помощью магнита. Обработка ультразвуком может применяться на разных этапах процедуры МТФЭ: для диспергирования магнитных частиц в жидком образце, на этапе сорбции или для десорбции аналитов с сорбента. Этот метод является простым

и быстрым, т.к. легкое отделение сорбента с помощью магнита устраняет необходимость центрифугирования и ручного отбора элюента. На рис. 1.4 показана схема проведения МТФЭ



Рисунок 1.4. Схема магнитной твердофазной экстракции в ультразвуковом поле

В МТФЭ обычно используются нано- или микрочастицы Fe_3O_4 с различными модифицированными поверхностями. Например, наноструктуры $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{C18}$, Fe_3O_4 -графен-углеродные нанотрубки и $\text{Fe}_3\text{O}_4@n$ -октил являются хорошими магнитными сорбентами для извлечения фосфорорганических пестицидов из воды [49–51], а $\text{Fe}_3\text{O}_4@n$ -нафталин-1-тиол является эффективным сорбентом для извлечения кадмия (II) из образцов крови [52].

В работах [51,53,54] было описано применение магнитных наночастиц в методике двухэтапной микроэкстракции, УЭМЭ в сочетании с МТФЭ. В этих методах при использовании комбинации УЭМЭ с МТФЭ отсутствует необходимость в длительных этапах процесса, таких как центрифугирование или охлаждение, потому что органическая фаза, содержащая аналиты, отделяется от твердой фазы действием магнита. В работе [53] показано использование магнетита с модифицированной поверхностью n -октилтриэтоксисилана в методе УДЖЖМЭ с помощью МТФЭ для определения 4- n -нонилфенола в воде. В данной работе ДЖЖМЭ проводили путем впрыскивания 1 мл диспергатора (метанола), содержащего 10 мкл экстрагента (1-октанол) в 15

мл пробы воды. Магнитные частицы (10 мг) добавляли к раствору, который обрабатывали ультразвуком в течение 4 мин для извлечения экстракционного растворителя и целевого соединения. Затем рядом с емкостью помещали магнит, чтобы отделить магнитные частицы, которые были высушены вымораживанием, а аналит десорбировали с магнитных частиц обработкой ультразвуком с метанолом. В методе, разработанным авторами в работе [51], для определения фосфорорганических пестицидов в воде УДЖЖМЭ сочетали с МТФЭ, где наночастицы магнетита были модифицированы н-октилом для повышения эффективности. ДЖЖМЭ выполняли с применением 15 мл воды, 10 мкл хлорбензола (экстрагент) и 1 мл метанола (диспергатор) с последующим добавлением 10 мг магнитных частиц. Затем флакон герметично закрывали и обрабатывали ультразвуком в течение 8 мин. После этого магнитные частицы были отделены от водного раствора с помощью магнита. Затем магнитные частицы промывали 5 мл воды и сушили в вакууме перед добавлением ацетонитрила для последующей экстракции пестицидов магнитными наночастицами и обработкой ультразвуком в течение одной минуты.

Магнетит обычно используется в МТФЭ как твердый носитель, но были опубликованы сообщения о других магнитных сорбентах без оболочки ядра. Так, квантовые точки оксида графена с нулевым валентным восстановлением были описаны как новый и эффективный сорбент для экстракции фосфорорганических пестицидов из воды и образцов фруктовых соков [55].

Графен с привитым Fe_3O_4 ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{G}$) обладает большой площадью поверхности и суперпарамагнетизмом, являясь подходящим носителем для ионных жидкостей. Ультразвуковая МТФЭ с ИЖ- $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{G}$ позволяет одновременно определять пять нитробензольных соединений в пробах окружающей среды [37]. $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{G}$ и $[\text{C}_7\text{MIM}][\text{PF}_6]$ (используемый в качестве ИЖ) добавляли к 10 мл воды и обрабатывали ультразвуком в течение 20 мин. Затем супернатант сливали, а магнитные частицы, содержащие аналиты, собирали с помощью магнита и элюировали 0,3 мл метанола, обрабатывая ультразвуком в течение 15 с. При оптимизации метода экстракции были

оценены несколько параметров, которые влияют на эффективность экстракции, такие как типы магнитных частиц и ИЖ, объем ИЖ и количество магнитных частиц, время экстракции, ионная сила и pH. Был сделан вывод, что с помощью ультразвукового излучения экстракция определяемых соединений ИЖ и самоагрегация ИЖ на поверхность $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{G}$ протекали одновременно, позволяя проводить экстракцию в течение 20 минут с использованием 144 мкл ИЖ ($[\text{C}_7\text{MIM}][\text{PF}_6]$) и 3 мг $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{G}$.

Определение веществ, содержащихся в образцах в малых концентрациях требует использования аналитических процедур выделения и концентрирования. Сама подготовка проб играет ключевую роль в анализе веществ. Применение методов выделения веществ, в которых используется ультразвук требует минимального количества экстрагента, а также использование безопасных и нетоксичных веществ. Существенным недостатком рассмотренных выше методов является также ограниченный объем исходной пробы, что может быть преодолено с использованием динамических методов концентрирования и выделения.

1.3.5. Суспензионные колонки с удерживаемыми ультразвуковым полем сорбентами

В работе Спивакова Б.Я. и соавт. [56] был предложен новый подход к концентрированию и разделению веществ в динамическом режиме, основанный на использовании суспензии мелкозернистых сорбентов вместо традиционных набивных колонок. Это позволило использовать зерна сорбента микронного размера, которые удерживаются в колонне при атмосферном давлении благодаря ультразвуковому полю без каких-либо фильтров. Было показано, что с использованием нового вида колонок возможно проводить концентрирование микроэлементов из вод и сорбцию иммуноглобулинов.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1

Из представленного в этой главе материала можно сделать два основных вывода. Первый вывод говорит о том, что ультразвук можно с успехом использовать в методах разделения и концентрирования для интенсификации применяемых процессов. К этим методам относится ультразвуковое экстрагирование, ультразвуковая экстракция из жидких образцов, ультразвуковая дисперсионная жидкость-жидкостная микроэкстракция. Во всех используемых методах не применились суспензионные ультразвуковые колонки с мелкими сорбентами для извлечения и концентрирования ионов металлов и биоорганических веществ. В единственной работе сотрудников ГЕОХИ РАН и специалистов из Института аналитического приборостроения сделана попытка применения таких колонок для извлечения ионов металлов из чистых водных растворов и сорбции иммуноглобулинов. При этом сколь-либо подробно не изучались закономерности удерживания частиц сорбента в суспензионных колонках, что необходимо для выбора самих сорбентов и подходящих колонок. Не была показана возможность извлечения различных аналитов из сложных по составу сред, содержащих высокомолекулярные вещества и/или коллоидные частицы. И, конечно, никак сведений о выделении и концентрировании таких веществ как ДНК. Поэтому второй вывод заключается в том, что возможности ультразвуковых суспензионных колонок должны подробно изучаться, что и сделано в рамках данной диссертационной работы.

ГЛАВА 2 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ, РЕАГЕНТЫ, ПРИБОРЫ И ТЕХНИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

2.1 Анализируемые образцы и используемые реагенты

Анализируемые образцы

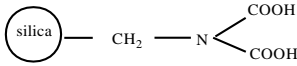
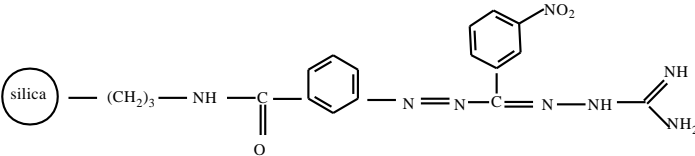
Исследование процессов выделения металлов в суспензионных колонках было проведено на стандартных растворах (стандартные растворы ICP-MS-68A Solution A, ICP-MS-Solution C, High-Purity Standart, США), на образцах природной воды (озеро Имандра, Кольский полуостров), в дистиллированной воде (получена стандартным способом), на образцах вин (Chantarel Russian, 2010, Франция; Алиготе, Легенда Крыма, Крым, 2014; Алиготе; Красное сухое Racimo De Uva, Испания). Очистка и выделение ДНК проводилось из модельных растворов плазмиды *Mycobacterium tuberculosis*: модельный раствор на основе водопроводной воды, растворы почвенных вытяжек (почва дерново-подзолистая супесчаная САДПП-08/3 ГНУ ВНИИА, почва чернозема типичного легкосуглинистого САПЧ-03/01 ГПУ ВНИИА).

Реагенты и сорбенты

Азотная кислота 65% р-р (Merck, Германия), соляная кислота, набор реагентов для выделения ДНК Ампли-Туб (Синтол, Россия).

В таблице 2.1. представлены сорбенты, использованные в работе.

Таблица 2.1. Используемые сорбенты

№ п/ п	Сорбент	Группы	Производитель
1	Диасорб ИДК – 130		ЗАО БиоХимМак СТ
2	Куб 2		КубГУ, кафедра аналитической химии

№ п/ п	Сорбент	Группы	Производитель
3	Куб 3		КубГУ, кафедра аналитической химии
4	Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ 2	SiO ₂	ЗАО «СИНТОЛ»
5	SiO ₂ @ИЖ	Cyphos®IL-101	ГЕОХИ РАН, лаборатория концентрировани я

Модельные растворы

Применяли растворы многоэлементных стандартов с концентрацией каждого элемента 0,4 мкг/л.

Раствор плазмиды ДНК *M.tuberculosis* с концентрацией 1000 копий/мл.

2.2 Аппаратура и техника эксперимента

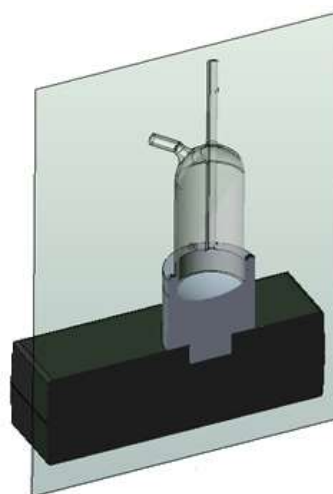
Суспензионная колонка

Для выделения и концентрирования веществ в динамическом режиме было использовано акустическое устройство – суспензионная ячейка. Устройство состоит из рабочей камеры с подводным и отводящим патрубками, установленная в охлаждающей камере, включенной в систему циркуляции охлаждающей жидкости, и ультразвуковой излучатель, размещенный в охлаждающей камере. Ультразвуковой излучатель выполнен в виде шарового сегмента, обращенного вогнутой поверхностью к рабочей камере, плоскость основания шарового сегмента параллельна продольной центральной оси рабочей камеры. Камера представляет собой стеклянную цилиндрическую трубку постоянного диаметра, сочлененную под прямыми

углами с трубками меньшего диаметра для подвода и отвода жидкостей. Общий вид суспензионной колонки представлен на рис. 2.1



а)



б)



в)

Рисунок 2.1. Суспензионная колонка

а) общий вид; б) разрез; в) фотография установки

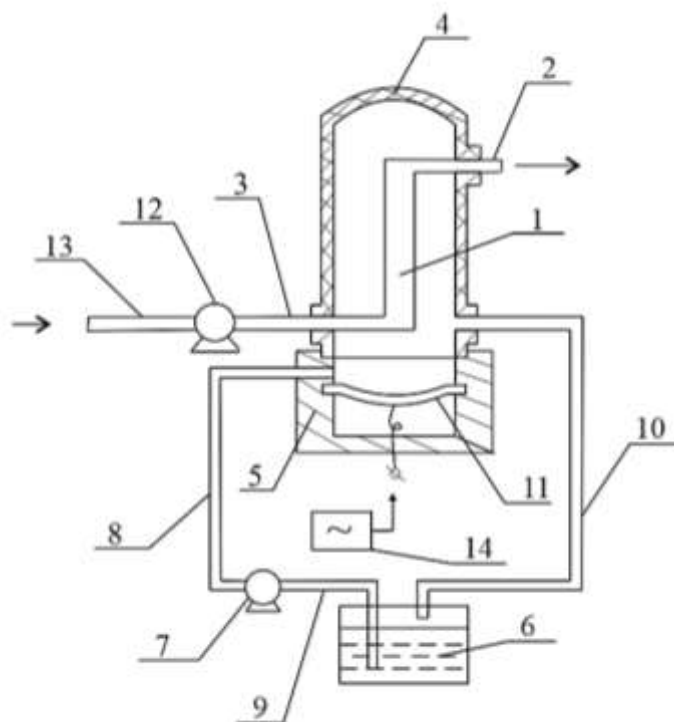


Рисунок 2.2. Схема для выделения и концентрирования веществ с использованием ультразвуковой суспензионной колонки: 1 – ячейка; 2,3 – выходной и входной патрубков ячейки; 4 – кожух для термостатирования ячейки; 5 – корпус; 6 – термостат; 7 – циркуляционный насос; 8,9 – трубопровод для ввода воды для термостатирования; 10 – трубопровод для вывода воды; 11 – пьезоэлектрический излучатель; 12 – перистальтический насос; 13 – трубопровод ввода сорбента, ананта, элюента; 14 – компьютер для управления колонки по беспроводной связи bluetooth.

Изучение удерживания сорбента в суспензионной колонке

Для определения максимальной массы сорбента, удерживаемой в суспензионной колонке под действием ультразвуковой волны, реализована схема последовательного соединения суспензионной колонки со спектрофотометрическим детектором (при $\lambda = 254$ нм). Полученные графики обрабатывали с помощью программы ХромП (ИАП РАН, Россия). Для исследования удерживания сорбентов готовились суспензии с навесками сорбента 10 – 50 мг. Для реализации максимального удерживания проводили

подбор мощности ультразвука. Для изучения удерживания были разработанные различные стеклянные ячейки диаметром от 5 до 10 мм и высотой от 10 до 200 мм.

Выделение металлов из водных растворов

Статический режим

К образцу водного раствора объемом 10 мл добавляли навеску сорбента от 10 мг до 250 мг, встряхивали на шейкере 10–60 мин. Разделение суспензии проводили при помощи центрифугирования (3500 об/мин) течение 5 мин. Надосадочную жидкость сливали и проводили отмывку сорбента с использованием бидистиллированной воды объемом 5 мл. После отделения сорбента центрифугированием, проводили десорбцию извлекаемых элементов 5–6 мл элюента. Определение элементов в элюате проводили методом МС-ИСП.

Динамический режим

В суспензионную колонку вводилась суспензия сорбента заданной концентрации. Для удерживания сорбента в потоке создавалось УЗ поле заданной мощности. После ввода сорбента через колонку прокачивалось необходимое количество аналита со скоростью 1 мл/мин, затем последовательно осуществлялся ввод 5 мл промывочной и необходимого количества элюирующей жидкостей. Определение элементов в элюате осуществляли методом МС-ИСП.

Выделение и определение редкоземельных металлов в винах

Кислотная минерализация

К образцу вина объемом 10 мл добавляли 10 мл конц. HNO_3 , перемешивали и упаривали до сухого остатка при 90°C в течение 10 ч. Сухой остаток растворяли в 10 мл 2 М HNO_3 и определяли РЗЭ и У методом МС-ИСП.

Пробоподготовка вина разбавлением

Образцы вина разбавляли в 10 раз 2%-ной HNO_3 .

Извлечение металлов в статическом режиме

В мерную пробирку емк. 50 мл помещали от 20 до 250 мг сорбента, добавляли 10–50 мл вина, требуемую кислотность создавали добавлением раствора аммиака. Далее пробирку встряхивали на шейкере в течение 10 мин. Для отделения раствора от сорбента использовали центрифугу (3000 об/мин), отбирали 5 мл фильтрата для элементного анализа методом МС-ИСП. Для промывки сорбента в пробирку добавляли от 10 до 50 мл бидистиллированной воды в зависимости от массы сорбента, и все операции с использованием шейкера и центрифугирования повторяли. Для десорбции металлов в пробирку с сорбентом добавляли 5 мл 1 М азотной кислоты, встряхивали 10 мин и затем центрифугировали, фильтрат отбирали для анализа методом МС-ИСП.

Извлечение металлов в ультразвуковой суспензионной колонке

Принципиальная схема системы приведена на рис. 2.2. В установке реализован принцип фракционирования жидких дисперсных систем – селективное удерживание микрочастиц ультразвуковым полем, созданным в потоке жидкой среды. Ультразвуковое поле создается в проточной камере и играет роль “объемного управляемого фильтра”, обеспечивающего селективное удерживание тех или иных микрочастиц в зависимости от их характеристик и параметров поля. Объем камеры для сорбции составляет 1 мл.

Выделение ДНК из природных образцов

Статический режим

Для выделения ДНК в статическом режиме используется 100 мкл аналита. Данный метод является стандартным для выделения ДНК и на него существуют протоколы по выделению ДНК из различных образцов. Аналит обрабатывают лизирующим раствором и выдерживают при температуре 75 °С. После лизиса аналита проводится сорбция и осаждение ДНК на магнитном сорбенте ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$). Отделение сорбента от жидкости на стадиях промывки и элюирования осуществляется посредством магнитного поля, получаемого

постоянными неодимовыми магнитами. Далее осуществляется промывка от продуктов лизиса. После промывки проводится элюирование ДНК буферным раствором.

Поликапиллярные колонки

Для выделения ДНК использовались также поликапиллярные колонки, представляющие собой наконечники для автоматических пипеток-дозаторов с носиком из скрепленных между собой капилляров из кварцевого стекла. Методика выделения ДНК с помощью поликапиллярных колонок состоит в лизисе 50 мкл аналита лизирующим буфером и последующем инкубировании при 60°C в течение 10 мин. Данный метод является одностадийным; авторы методики предлагают производить очистку ДНК посредством осаждения органических продуктов распада патогенов на поверхности капилляров.

Суспензионная колонка

Образцы для анализа приготавливались путем добавления к воде и образцам почвы соответствующего количества ДНК (1000 копий/мкл). В воде и водных почвенных вытяжках проводилась обработка лизирующим раствором. Каждый из полученных растворов вводился в систему СК со скоростью 1 мл/мин. В системе последовательно проводились процессы сорбции ДНК на магнитном сорбенте, отмывка сорбента, элюирование ДНК в объем 1 мл. Для определения концентрации ДНК отбирали по 10 мкл раствора, полученного при элюировании ДНК, и проводили анализ методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) с использованием калибровочных образцов на приборе АНК-32.

Методы определения

Масс-спектральный анализ (МС-ИСП)

Содержание Sc, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Y, Ag, Cd, Sn, Ba, La, Ce, Pr, Nd, Sm, W и Pb в образцах определяли методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (X-7, *Thermo Elemental, США*).

Определение проводили при следующих параметрах работы X-7:

выходная мощность генератора:	1250 Вт;
распылитель:	концентрический PolyCon;

распылительная камера: кварцевая охлаждаемая (3°C);
 расход плазмообразующего потока Ar: 13 л/мин;
 расход вспомогательного потока Ar: 0.9 л/мин;
 расход потока Ar в распылителе: 0.89 л/мин;
 расход анализируемого образца: 0.8 мл/мин;
 разрешение: 0.8 М.

Основные параметры процедуры измерения масс-спектров приведены ниже:

режим работы детектора: Двойной (счет импульсов и аналоговый);
 режим сканирования: Обзорный (Survey Scan) и по точкам (Peak Jumping).

Установки обзорного сканирования (Survey Scan)		Установки измерения по точкам (Peak Jumping):	
Число проходов	5;	Sweeps	25;
Dwell Time	0.6 мс;	Dwell Time	10 мс;
Channels Per Mass	10;	Channels Per Mass	1;
Acquisition Duration	6 сек.	Acquisition Duration	34 сек.

Определение элементов в образцах проводили количественным методом с использованием эталонных растворов, содержащих от 1 до 500 мкг/л определяемых элементов. Для увеличения точности определения элементов использовали внутренний стандарт – барий и стронций. Содержание этих элементов в пробах предварительно было определено атомно-эмиссионным методом.

Обработку масс-спектров и расчеты содержания элементов в пробах проводили с использованием программного обеспечения масс-спектрометра. Sc, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Y, Ag, Cd, Sn, Ba, La, Ce, Pr, Nd, Sm, W и Pb в образце рассчитывали как среднее значение, измеренное по их изотопам. Предел обнаружения (ПО) рассчитывали как:

$$\text{ПО} = C_i + 3 \cdot s$$

где: C_i – среднее значение содержания изотопа i при измерениях контрольных образцов; s – стандартное отклонение для изотопа i при измерениях контрольных образцов.

Для элементов с несколькими изотопами, в дальнейших расчетах использовали величину ПО для наиболее распространенного изотопа.

Относительное стандартное отклонение для всех элементов не превышало 0.3 при измерении содержания этих элементов до 5·ПО и не превышало 0.15 при измерении содержания >5·ПО.

Полимеразная цепная реакция в реальном времени

Для качественной и количественной идентификации ДНК методом ПЦР-РВ был использован амплификатор нуклеиновых кислот АНК 32 (Россия, Институт аналитического приборостроения). Работа устройства основана на применении метода полимеразной цепной реакции с одновременным детектированием сигнала флуоресценции непосредственно в процессе амплификации. Для проведения ПЦР анализируемые образцы смешиваются в пробирках с реакционной смесью, в состав которой входят: праймеры (искусственно синтезированные олигонуклеотиды); Taq ДНК-полимераза (термостабильный фермент); смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов; интеркалирующий краситель или специфические зонды; буферная смесь катионов и анионов.

Используются одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР с герметичными крышками. Пробирки устанавливаются в термостат, работающий в циклическом температурном режиме. При нагревании пробирок до 95°C молекулы анализируемых образцов ДНК расплетаются с образованием двух одноцепочечных молекул. Праймеры присоединяются к одноцепочечной ДНК-мишени и ограничивают искомый фрагмент. При температуре порядка 60°C Taq ДНК-полимераза достраивает вторую цепь ДНК с 3'-конца праймера.

При малой концентрации анализируемых образцов температурный цикл амплификации повторяется до 40 раз. Реактивы обеспечивают избирательность полимеразной цепной реакции и позволяют выделить искомую ДНК на фоне других. При этом происходит экспоненциальное увеличение количества копий фрагмента исходной ДНК. Концентрация исходных специфических фрагментов ДНК увеличивается приблизительно как 2^N , где N- количество циклов.

В основе используемого метода лежит наблюдение в ходе реакции в реальном времени (on-line) сигналов флуоресценции специфического для данной ДНК зонда, который подобно праймеру в ходе реакции связывается с одной из цепей ДНК. По мере накопления продукта реакции сигнал флуоресценции возрастает.

Процесс завершения ПЦР обусловлен расходом реагентов при накоплении специфических продуктов амплификации. При этом увеличение сигнала флуоресценции прекращается.

По динамике сигнала флуоресценции можно проследить кинетику ПЦР и использовать полученные данные для расчета значения порогового цикла – величины, позволяющей судить об исходном количестве копий ДНК и сравнивать образцы между собой.

В АНК 32 применен многоцветный флуориметр, благодаря которому устройство позволяет использовать до четырех (пяти) красителей и обнаружить соответствующее количество разных специфических фрагментов ДНК в каждой пробирке одновременно.

Целью качественного анализа является подтверждение присутствия в исследуемых образцах специфических фрагментов ДНК.

Качественный анализ выполняется в два этапа.

На первом этапе в тепловой блок устанавливаются положительные и отрицательные контрольные образцы с двумя красителями RG6 и ROX из рабочего набора реактивов и выполняется ПЦР. В результате сигналы получаются в двух каналах устройства: в канале RG6 и в канале внутреннего положительного контроля ROX.

Канал RG6 используется для регистрации рабочего набора реактивов сигналов от внешних (специфических) положительных (ПКО) и отрицательных контрольных образцов (ОКО), подтверждающих необходимые качества рабочего набора реактивов.

Канал ROX используется для регистрации сигналов от образцов внутреннего положительного контроля (ВПК), подтверждающих работоспособность устройства.

Обработка всех сигналов выполняется в автоматическом или ручном режиме. В результате при получении положительных сигналов ПКО и ВПК, а также при отсутствии положительных сигналов ОКО, получается отчет первого этапа, подтверждающий качество рабочего набора реактивов и работоспособность устройства.

На втором этапе в тепловой блок устанавливаются исследуемые образцы (ИО) с реактивами из рабочего набора и выполняется ПЦР. В результате также получаются сигналы в двух каналах устройства: в канале RG6 (сигналы ИО) и в канале ROX (сигналы ВПК).

Обработка этих сигналов выполняется в автоматическом или ручном режиме. В результате при получении положительных сигналов ИО и ВПК, а также при положительном заключении в отчете первого этапа, получается общий отчет, подтверждающий присутствие в исследуемых образцах специфических фрагментов ДНК.

Количественный анализ выполняется методом сравнения исследуемых образцов с калибровочными образцами с известной концентрацией специфических фрагментов ДНК.

ГЛАВА 3 УДЕРЖИВАНИЕ СОРБЕНТОВ В СУСПЕНЗИОННЫХ КОЛОНКАХ И ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ДИНАМИЧЕСКОГО РЕЖИМА ДЛЯ КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ ВЕЩЕСТВ

3.1 Закономерности удерживания частиц сорбента в суспензионной колонке

К настоящему времени разработаны теоретические модели поведения твердых частиц в ультразвуковом поле в заполненных жидкостью стеклянных трубках [57]. Сформулированы рекомендации по удерживанию частиц различной плотности в ультразвуковом поле стоячей волны [57,58]. Существующие исследования в основном направлены на оптимизацию и создание методов разделения микрообъектов в ультразвуковом поле по размерам и плотности, т.е. целью данных исследований был выбор оптимальных параметров, при котором бы проходило разделение микрообъектов в колонках. Однако для сорбционного концентрирования веществ из различных жидких объектов необходимо знать условия полного удерживания частиц в суспензионной колонке. Было установлено, что на удерживание сорбента в СК могут влиять геометрия колонки, параметры ультразвука и характеристики сорбентов. Для понимания закономерностей удерживания частиц в потоке жидкости в ультразвуковом поле стоячей волны необходимо рассмотреть силы, действующие на частицы.

Стоячие УЗ волны способны удерживать твердые частицы в узлах переменного давления. Этот эффект обусловлен действием различных сил в поле стоячей УЗ волны на частицы сорбента в суспензиях, главным образом, сил радиационного давления F_R , Стокса F_S , гравитации F_G (рис. 3.1).

Простейшее математическое описание для стационарного состояния (удерживания частиц дисперсной фазы в вертикально расположенной колонке) может быть получено в виде уравнения (1):

$$F_S + F_R = F_G \quad (1)$$

где сила гравитации для частицы в среде описывается уравнением [57]:

$$F_G = (4/3) \pi \cdot R^3 (\rho - \rho_0) \cdot g \quad (2)$$

максимальное значение силы радиационного давления описывается уравнением [57]:

$$F_R = (4/3) \pi k R^3 E \Phi (\rho^*, \rho, \beta^*, \beta) \quad (3)$$

сила Стокса описывается уравнением:

$$F_S = 6 \pi \eta R \cdot v \quad (4)$$

где g – ускорение свободного падения; Φ – фактор, учитывающий относительные плотности материала частиц и среды; η – динамическая вязкость; v – скорость потока жидкости, ρ^* , ρ – относительные плотности материала частиц и среды соответственно; β^* , β – скорость звука в материале частиц и среде соответственно.

Эти уравнения позволяют установить взаимосвязь физических характеристик дисперсной системы с параметрами стоячей УЗ волны и скоростью потока жидкости, и рассчитать условия удерживания частиц с определенными характеристиками.

3.1.1 Силы действующие на частицы сорбента в суспензионной колонке

Акустические силы

Основными силами, возникающими в камере вследствие наличия акустического поля являются:

- силы радиационного давления (РД), вызванные наличием стоячей акустической волны в объеме трубки и собирающие частицы в места с наименьшей для них потенциальной энергией; в этих местах РД от стоячей волны должно быть равно нулю, вне этих мест РД должно принимать свои промежуточные, либо максимальные по модулю значения;

- сила радиационного давления, вызванная наличием бегущей волны в сторону от излучателя; эта сила должна быть направлена вдоль оси трубки от излучателя. Относительно соотношения влияния этой составляющей РД с составляющей, вызванной стоячей волной, известно, что с ростом волновых размеров включений эта составляющая начинает доминировать над

составляющей от стоячей волны при гораздо меньших плотностях энергии в бегущей волне по сравнению со стоячей волной [58].

- сила, оказываемая на частицы и вызванная акустическими течениями (которые равны нулю в отсутствии акустического поля); эти течения являются стационарными, линии тока таких течений замкнуты; эта сила родственна силе Стокса, действующей на частицы, находящиеся в стационарном течении в вязкой жидкости [59].

Помимо дрейфа под действием радиационного давления и постоянных течений, частицы могут совершать однонаправленные движения, вызванные другими силами. Например, дрейф, связанный с изменением вязкости в поле звуковой волны. Кроме того, возникает сила Бьеркнеса [60], обязанная своим появлением взаимодействием рассеянных на включениях волн, и, как следствие, возникающей при этом потере импульса, ведущей к появлению средних сил взаимодействия между включениями. Возникают также силы взаимодействия между частицами вследствие их гидродинамического обтекания (сила Бернулли) и ряд других сил.

Гидродинамические и другие силы Сила Стокса

Для тех случаев, когда прямолинейное равномерное течение жидкости совершается при малых числах Рейнольдса $Re \ll 1$, Стокс нашел выражение для силы F , действующей на обтекаемый неподвижный шар [59]

$$F = 6\pi\eta ua, \quad (5)$$

Здесь η - коэффициент динамической (сдвиговой) вязкости; u - постоянная скорость движения жидкости; ρ - плотность жидкости; a - радиус шара;

$Re = \frac{\rho ua}{\eta} = \frac{ua}{\nu}$ - число Рейнольдса для шара; $\nu = \eta / \rho$ - кинематическая вязкость.

В работе [59] представлено уравнение для силы Стокса, позволяющее использовать его при $Re \leq 2$.

$$F = 6\pi\eta ua \left(1 + \frac{3}{8} Re - \frac{9}{40} Re^2 \ln \frac{1}{Re} \right) \quad (6)$$

Результирующая сила тяжести представляет собой совокупную силу, действующую на сферическую частицу радиусом a и объемом V и плотностью ρ_1 , погруженную в жидкость плотностью ρ , очевидно, равна

$$F_G = Vg(\rho_1 - \rho) = \frac{4}{3}\pi a^3 g(\rho_1 - \rho) \quad (7)$$

Основные силы, влияющие на динамику процесса

Можно выделить следующие основные силы, влияющие на удерживание сорбента в УЗ суспензионной колонке:

- сила радиационного давления стоячих волн;
- результирующая сила тяжести;
- сила Стокса, образованная стационарными акустическими течениями, движущимися в противоположную сторону по отношению к основному течению.

Среди основных сил, влияющих на выталкивание сорбента можно выделить следующие:

- сила Стокса, которая образуется путем суммирования двух стационарных потоков, текущих в одном направлении – основного проточного течения и результирующего потока, образованного акустическими течениями, текущего в одном направлении с основным течением;
- сила радиационного давления, образованная бегущей волной, совпадающая по направлению с основным течением;
- сила, вызванная вихревым течением на сочленении основной камеры с выводящей трубкой, гораздо меньшей в диаметре, что может приводить к возникновению вихревых течений. Скорость этого течения возрастает по сравнению со скоростью проточного течения в основной камере в квадрат раз отношения диаметров основной камеры и выводящей трубки. А поскольку это течение параллельно силовым линиям сил радиационного давления стоячей волны, то оно обладает повышенной способностью к вымыванию частиц.

Саму же основу принципа удерживания частиц составляет способ организации ультразвукового поля стоячей волны и потока: ультразвуковая

стоячая волна накладывается параллельно направлению потока, под действием которого может удерживаться или перемещаться суспензия частиц сорбента. Линия действия F_R совпадает с линией действия на частицу силы F_S , обусловленной движением жидкости (рис. 3.1).



Рисунок 3.1. Схематическое изображение действующих сил радиационного давления и Стокса на частицы сорбента разного размера в потоке жидкости при наложенном ультразвуковом поле

Направление действия обеих сил совпадает или противоположно, в результате чего может происходить ускорение, торможение или остановка частиц. При равенстве величин сил, действующих на частицу со стороны УЗ стоячей волны и жидкости в противоположных направления, должна происходить остановка частиц с некоторыми определенными характеристиками (R , F), от величины которых зависит абсолютная величина и знак F_R . Реализация этого принципа позволяет перейти к принципам удерживания частиц и выбору оптимальной конструкции ячейки.

К основным процессам, оказывающим влияние на удерживание частиц сорбента, можно отнести [57]:

- движение частиц в поле ультразвуковых стоячих волн к узлам давления и удерживание в узлах давления, приводящее к концентрированию частиц в этих зонах. Основными параметрами оптимизации процесса являются: скорость потока, частота вынужденных колебаний. Частота вынужденных колебаний определяет число зон удерживания $n = L/(\lambda/2)$, где L - длина ячейки. Увеличение n уменьшает вероятность вымывания удерживаемых частиц в результате случайных процессов (броуновского движения, колебаний скорости потока и энергии поля и т. д.);

- образование слоев разной формы или «столбика» (рис. 3.2.) в поле ультразвуковой стоячей волны. Основными параметрами оптимизации процесса являются: соотношение поперечных размеров камеры и длины волны ультразвука. Основные влияющие факторы: концентрация дисперсной фазы, свойства частиц (поверхностные, стерические, гидрофильность/гидрофобность):

- движение частиц сорбента с потоком жидкости через свободные зоны и зоны уже аккумулялированных частиц, которое может увеличивать/уменьшать эффективность удерживания, приводить к агрегации частиц и пр. К основным факторам, влияющим на процесс, можно отнести концентрацию дисперсной фазы и скорость потока.

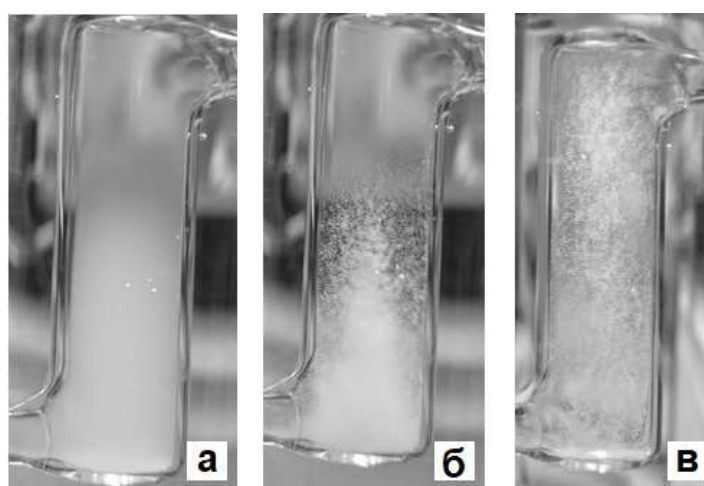


Рисунок 3.2. Удерживание частиц сорбента в поле стоячей ультразвуковой волны (1 млн/мин, 2,65 МГц, 10 Вт/м²). Время удерживания: а – 0; б – 2; в – 5 минут после включения ультразвука.

Показано, что для удерживания твердых частиц применим метод, основанный на создании стоячих УЗ волн с помощью фокусирующего излучателя, когда поток суспензии частиц осуществляется вдоль осевой линии, перпендикулярной к центру излучателя, в результате чего частицы удерживаются в узлах переменного давления стоячей УЗ волны (рис. 3.2.)

3.1.2 Выбор параметров ультразвука для удерживания частиц сорбента в потоке жидкости

Выбор параметров ультразвука для удерживания частиц сорбента определялся диапазоном наиболее часто используемых и легко реализуемых значений в интервале частот от 1 до 4,5 МГц, интенсивности ультразвука от 1 до 20 Вт/см².

Ограничения по размеру, удерживаемых частиц зависят в основном от частоты ультразвука, значения которой обычно находятся в интервале $1 \div 4.5$ МГц, т. е. $\lambda = 1,5 \cdot 10^{-3} \div 3,3 \cdot 10^{-4}$ м (вода, $c = 1500$ м/с). Поэтому радиус частиц должен составлять $< 1500 \div 33$ мкм. В работе [57] было показано, что удерживание частиц микронного размера происходит при частотах 1-3 МГц.

Экспериментально были установлены зоны удерживания, разделения и вымывания частиц в зависимости от скорости потока и интенсивности ультразвукового излучения (рис. 3.3)

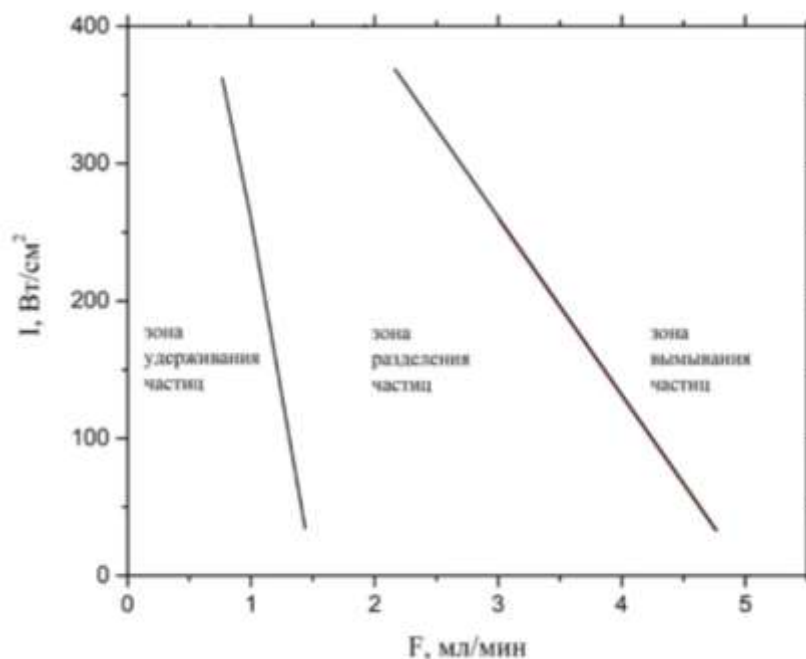


Рисунок 3.3. Зоны удерживания частиц в зависимости от скорости потока и интенсивности ультразвукового излучения

Были установлены оптимальные параметры удерживания частиц сорбента в потоке жидкости при которых происходит полное удерживание монодисперсных частиц сорбента. Для применяемых в работе СК различных размеров было установлено, что максимально удерживаемая масса сорбента ультразвуком, создаваемая излучателем составляет 20 мг сорбента размером 3-6 мкм при частоте 2,65 МГц и интенсивности ультразвука 10 Вт/см² в потоке жидкости с линейной скоростью 1 мл/мин.

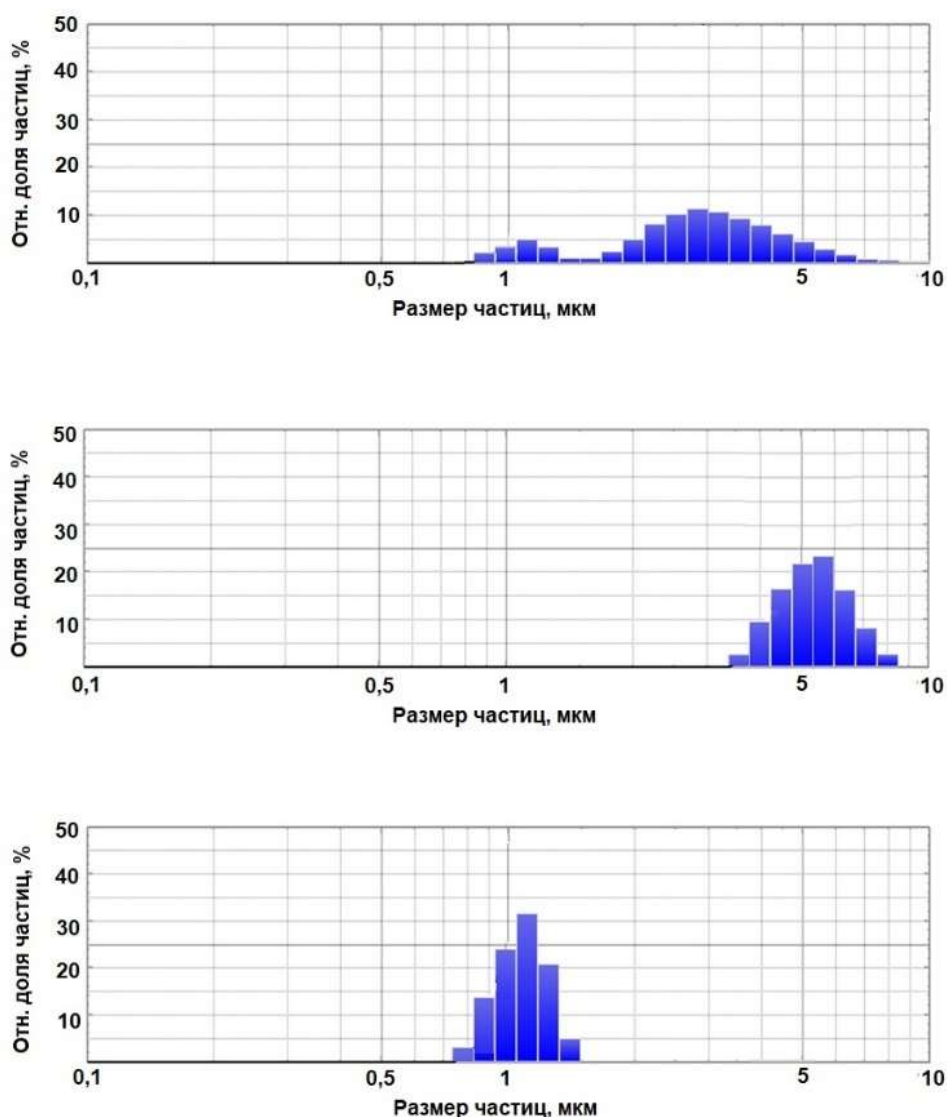


Рисунок 3.4. Гранулометрическое распределение силикагеля в суспензионной колонке при удерживании частиц (1 млн/мин, 2,65 МГц, 10 Вт/м²). А) исходный силикагель (средний диаметр частиц 5 мкм); Б) удержанные частицы силикагеля в суспензионной колонке; В) вымываемые частицы силикагеля.

В случае полидисперсного образца с основной фракцией сорбента в диапазоне 3-6 мкм происходит вымывание частиц менее 3 мкм (рис. 3.4). Для таких сорбентов необходимо проводить кондиционирование сорбента в СК под действием ультразвука с целью получения монодисперсного распределения частиц сорбента.

3.1.3 Исследование удерживания частиц в суспензионных колонках

Эксперименты по удерживанию частиц сорбента в колонках, представляющих собой стеклянные ячейки различных диаметров и длин, проводились при скоростях потока жидкости в диапазоне от 0,1 мл/мин до 5 мл/мин. В стеклянную колонку вводили суспензию используемого сорбента и удерживали при частоте ультразвука 2,65 МГц и интенсивности 10 Вт/см². Удерживание частиц в поле ультразвуковой стоячей волны происходит за счет действия радиационной силы, величина которой зависит от параметров ультразвукового поля (энергии/интенсивности звука и частоты), плотности и сжимаемости среды, радиуса частиц и акустических свойств материала частицы (плотности и сжимаемости). Под действием этой силы частицы исследуемого сорбента перемещаются в узлы стоячей волны, расположенные (перпендикулярно направлению действия ультразвука и оси камеры) на расстоянии половины длины звуковой волны друг от друга. После образования «столбиков» частиц в ультразвуковом поле стоячей волны в колонке проводили пропускание жидкости при различных скоростях и массах сорбента.

Проведенные эксперименты по удерживанию сорбента в суспензионной колонке показали, что количество сорбента, удерживаемого в суспензионной колонке, составляет около 20 мг. Основные результаты по удерживанию частиц в зависимости от различных скоростей и масс представлены в таблице 3.1. Масса сорбента, оставшегося в камере после проведения опыта, определялась, в основном, разностным методом по измерениям концентрации частиц в порциях фильтрата на выходе из камеры. В ряде случаев баланс массы проверяли по измерению концентрации частиц, удержанных в колонке, после полного вымывания сорбента при выключенном ультразвуковом поле. Погрешность оценки массы сорбента составляла 1 – 2 мг.

Таблица 3.1. Масса сорбента, удерживаемого в колонке, после отмывки 100 мл воды

Масса сорбента, мг	масса сорбента в колонке после отмывки 100 мл воды, мг			
	1 мл/мин	2 мл/мин	4 мл/мин	5 мл/мин
10	10	5	1	
20	19	9	5	4
35	15	12	6	6
50	25	13	12	12

Графики удерживания сорбента различных масс (10, 20 35 мг) в суспензионной колонке под действием ультразвука в зависимости от скорости потока различных масс представлены на рисунках 3.5, 3.6, 3.7. Из графиков видно, что оптимальной скоростью потока, при которой не происходит вымывание частиц сорбента, – 1 мл/мин. С увеличением скорости более 1 мл/мин происходит постепенное вымывание частиц сорбента.

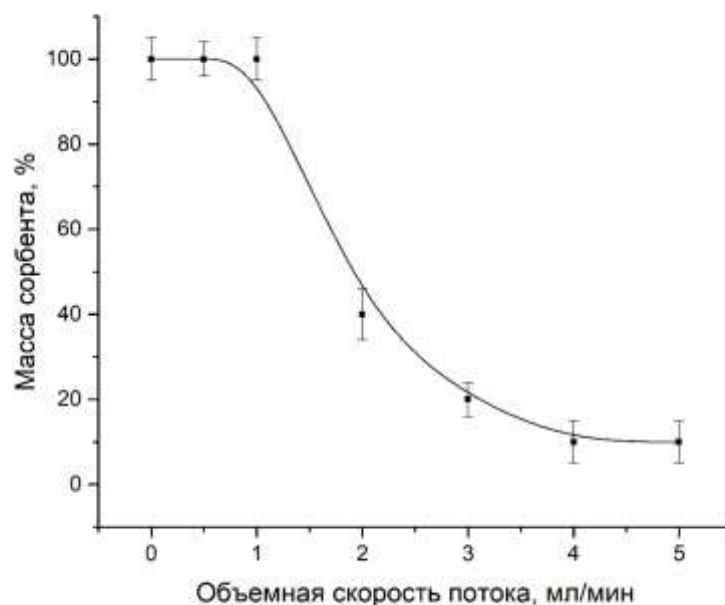


Рисунок 3.5. Зависимость массы удержанного сорбента от скорости потока в стоячей ультразвуковой волне (масса 10 мг). Сорбент Диасорб-130-ИДК, размер 6 мкм (для колонок всех размеров)

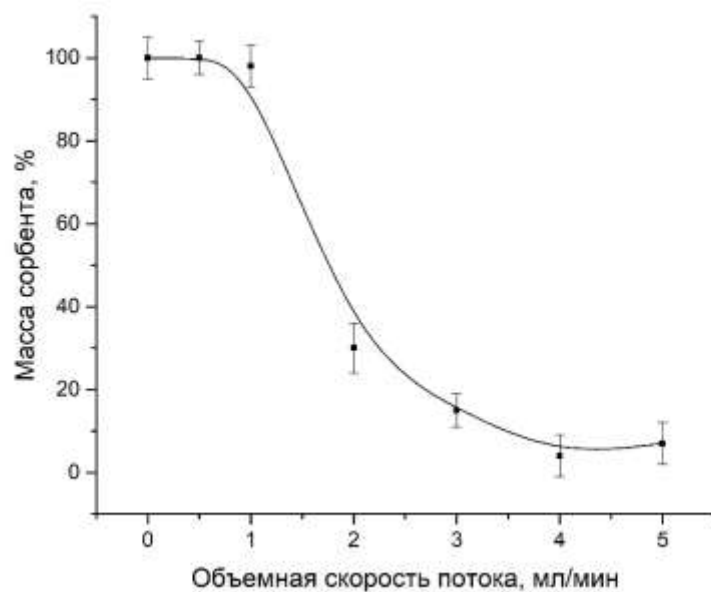


Рисунок 3.6. Зависимость массы удержанного сорбента от скорости потока в стоячей ультразвуковой волне (масса 20 мг). Сорбент Диасорб-130-ИДК, размер 6 мкм (для колонок всех размеров)

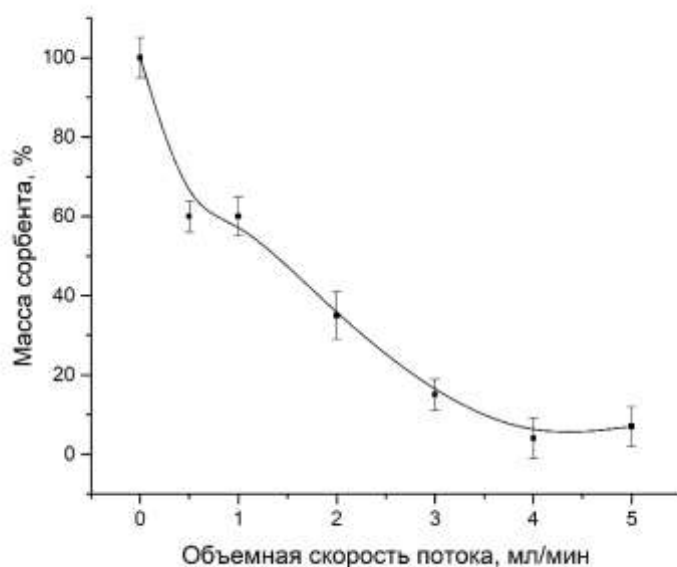


Рисунок 3.7. Зависимость массы удержанного сорбента от скорости потока в стоячей ультразвуковой волне (масса 35 мг). Сорбент Диасорб-130-ИДК, размер 6 мкм, диаметр и длина колонки 5x50 мм

В исследованиях проводилось изучение удерживания частиц в суспензионной колонке в ячейках с различными геометрическими

параметрами. Конструкции ячейки выбирались, исходя из конструктивных особенностей ультразвукового излучателя и теоретических моделей. Параметры ячеек и удерживаемые в них максимальные массы сорбента представлены в таблице 3.2.

Таблица 3.2. Параметры ячеек

Длина, см	Радиус, см	Объем, см ³	Площадь сечения, см ²	Максимальная удерживаемая масса сорбента, мг
1	0,25	0,2	0,20	10
3	0,25	0,6	0,20	15
5	0,25	1,0	0,20	20
3	0,35	1,0	0,36	19
1	1	0,8	0,79	18

При увеличении диаметра ячейки внутри нее снижалась линейная скорость потока (табл. 3.3), что в дальнейшем могло увеличить время контакта в системе сорбат-сорбент. Однако, происходило незначительное вымывание сорбента, что может объясняться резким возрастанием скорости потоков на выходе из ячейки из-за резкого сужения отводящей жидкость трубки.

Таблица 3.3. Соотношение объемной и линейной скоростей потока в суспензионной колонке различного диаметра

Объемная скорость потока, см ³ /мин	Линейная скорость потока, см/с		
	d = 5 мм	d = 7 мм	d = 10 мм
0,1	0,008	0,004	0,002
0,2	0,017	0,008	0,004
0,5	0,042	0,022	0,011
1	0,085	0,043	0,021

Объемная скорость потока, см ³ /мин	Линейная скорость потока, см/с		
	d = 5 мм	d = 7 мм	d = 10 мм
2	0,170	0,087	0,042
3	0,254	0,130	0,063
4	0,339	0,173	0,085
5	0,424	0,216	0,106

Было установлено, что в стеклянных колонках с диаметром больше 7 мм наблюдается расслаивание в потоке жидкости, а слои частиц, расположены под разными небольшими углами к оси ячейки и неоднородно распределены по объему ячейки, т.е. со значительными промежутками между слоями. Такое расположение заполненных слоев может, в свою очередь, оказывать влияние на гидродинамические характеристики течения.

Исследования показали, что оптимальной ячейкой для удерживания частиц сорбента в потоке жидкости будет цилиндрическая колонка с диаметром 5 мм и высотой 50 мм.

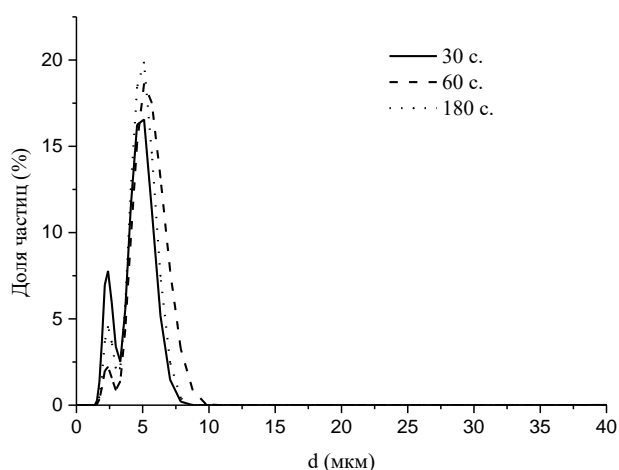
Проведенные исследования по удерживанию частиц сорбентов в СК полем ультразвуковой стоячей волны (частицы от 10 до 50 мг) показали, что при частоте ультразвука 2,65 МГц, интенсивности 10 Вт/см² максимальная удерживаемая масса составляет 20 мг, а оптимальной скоростью потока, при которой удерживаются частицы сорбента с размером 3-6 мкм, составляет 1 мл/мин.

3.2 Влияние характеристик частиц сорбентов

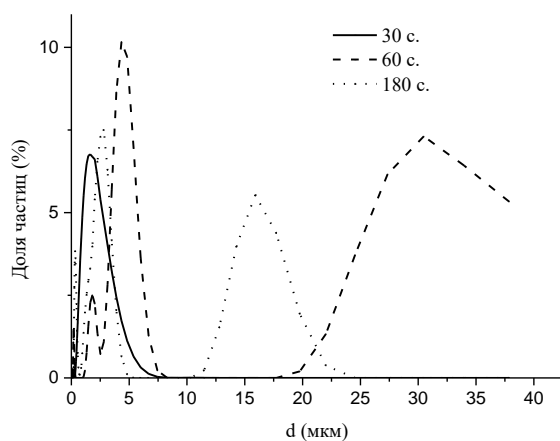
Поскольку в СК частицы сорбента подвержены влиянию ультразвуковых стоячих волн, были проведены исследования влияния ультразвука (2,65 МГц, 10 Вт/см²) на частицы исходного силикагеля и силикагеля с различной модификацией. Известно, что ультразвук может как разрушать агрегаты и частицы сорбента [7], так и, при определенных условиях, способствовать

агрегированию частиц сорбента; эту особенность ранее практически не учитывали.

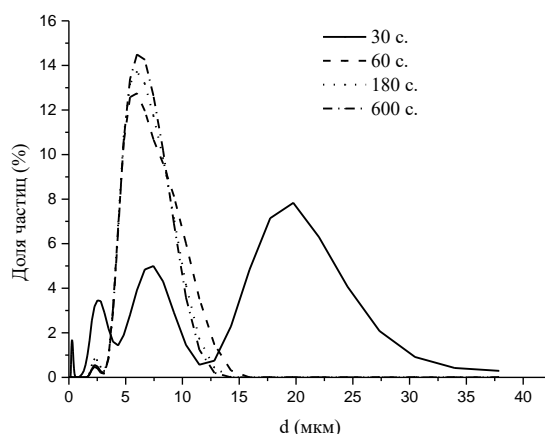
Было показано, что исходный силикагель обладает устойчивостью к агрегации при обработке ультразвуком, а после обработки он представляет собой относительно монодисперсный порошок. Используемый в работе сорбент (1) обладают устойчивостью к агрегации в ультразвуке указанной мощности в течение 3-10 минут (рис 3.8), а сорбенты (2), (3) при действии акустических волн подвергались агрегации. Отмечено, что сорбенты с ковалентно привитыми и привитыми по ионному механизму группами принципиально не отличаются по воздействию ультразвука, хотя при введении различных групп воздействие ультразвука на сорбент различно.



А



Б



В

Рисунок 3.8. Распределение частиц сорбентов по размерам после обработки ультразвуком

а – сорбент (1), б – сорбент (2), в – сорбент (3)

Полученные данные позволяют сделать вывод, что сорбенты, используемые в СК и подверженные ультразвуковому воздействию, предварительно необходимо изучать на способность к агрегации в стоячих ультразвуковых волнах, т.к. сорбенты могут выноситься из СК гидродинамическими потоками, а при превышении критической массы – оседать на дно. Агрегация сорбентов способствует также уменьшению активной поверхности сорбентов.

3.3 Зависимость эффективности выделения веществ от параметров суспензионной колонки

Известно, что на эффективность извлечения элементов оказывает влияние время контакта в системе сорбат-сорбент. При динамическом режиме сорбционного процесса время контакта зависит от скорости потока в системе и конструктивных особенностей используемых колонок.

Ранее было установлена оптимальная скорость потока для количественного удерживания сорбента Диасорб-130-ИДК в системе ($8,5 \cdot 10^{-4}$ м/с). Увеличение скорости потока выше указанной сопровождается

вымыванием частиц, а уменьшение скорости потока является нецелесообразным (за исключением некоторых случаев), поскольку при этом значительно увеличивается время эксперимента при незначительном изменении полноты извлечения.

Оценку влияния конструкционных особенностей стеклянных колонок, используемых в системе с СК на степень извлечения проводили на примере меди и цинка с использованием сорбента Дасорб-130-ИДК (6 мкм) из водного раствора с концентрацией металлов 0,4 мкг/л.

Проведенные исследования показали, что количественное извлечение металлов наблюдается в колонках с радиусом сечения 0,25 мм и длиной от 1 до 5 мм (табл. 3.4).

Таблица 3.4. Влияние параметров суспензионных колонок на степень извлечения меди и цинка

Длина, см	Радиус, см	Объем, см ³	Площадь сечения, см ²	Максимальная удерживаемая масса сорбента, мг	Извлечение, % n=3; P=0.95	
					Cu	Zn
1	0,25	0,2	0,20	10	99±10	98±10
3	0,25	0,6	0,20	15	97±10	98±10
5	0,25	1,0	0,20	20	100±15	99±20
3	0,35	1,0	0,36	19	80±15	82±15
1	1	0,8	0,79	18	70±10	68±10

Изучение разных стадий процесса свидетельствует о возможности возникновения вихревых и циркуляционных потоков, что связано с геометрией камеры и эффектами ультразвукового поля. Вышеперечисленные явления способствуют созданию «мертвых зон» в колонке в которых концентрируются и удерживаются частицы сорбента. Однако, из-за гидродинамических течений

пропускаемый анализируемый раствор может не контактировать с частью сорбента, находящегося в колонке; по этой причине в колонке с диаметром 0,35 мм и 1 см степень извлечения снижается.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3

Масса сорбента, удерживаемая в ультразвуковом поле с частотой 2,65 МГц и интенсивностью 10 Вт/см² в применяемых стеклянных ячейках составляет от 10-20 мг при скорости потока 1 мл/мин. При скорости потока выше 1 мл/мин происходит вымывание части сорбента из колонки.

Проведен выбор оптимальной ячейки с диаметром 5 мм и высотой 50 мм для максимального удерживания сорбента в потоке жидкости и эффективного сорбционного извлечения.

Для проведения сорбционных экспериментов необходим выбор сорбента, сохраняющий свою устойчивость к агрегации в ультразвуковом поле стоячей волны в течение всего времени процесса.

В целом, для планирования сорбционных экспериментов с использованием сорбентов в суспензионной колонке, необходимо учитывать ряд факторов, влияющих как на удерживание сорбента, так и на эффективность извлечения веществ из исследуемых образцов.

ГЛАВА 4 СОРБЦИОННОЕ ВЫДЕЛЕНИЕ МЕТАЛЛОВ ИЗ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ И ВИН В СУСПЕНЗИОННЫХ КОЛОНКАХ

Сорбционные методы широко используются в науке и технологии для выделения и концентрирования растворенных веществ. В аналитической химии большое распространение получили зернистые сорбенты различной природы, которые обычно используются в виде набивных колонок, удерживаемых в колонке или патроне с помощью фильтров из пропилена, стеклянной ваты или другого пористого материала, что позволяет избежать потерь сорбента при пропускании через колонку потока жидкой пробы, промывного раствора и элюента [30,61]. В сорбционных методах, в большинстве случаев применяют зерна сорбента диаметром от 40 мкм и более. Колонки или патроны, заполненные такими большими частицами сорбента, позволяют проводить сорбционные процессы при низком давлении, что дает возможность использовать перистальтический или другой насос низкого давления и другие простые компоненты всей проточной системы.

Эффективность колонки может быть улучшена за счет уменьшения размера зерен, поскольку удельная площадь поверхности у более мелкозернистых сорбентов, а значит и поверхность контакта фаз больше и скорость массопереноса аналитов между жидкой фазой и фазой сорбента может быть выше [30]. Поэтому в колонках для высокоэффективной жидкостной хроматографии применяют материалы с размером частиц от около 2 до 10 мкм. Гидравлическое сопротивление набивной колонки обратно пропорционально квадрату диаметра частиц сорбционного материала, из-за чего при использовании зерен диаметром менее 10 мкм требуются давления от нескольких сотен до тысяч бар [62]. Представляется интересным применение колонок, содержащих сорбент в виде суспензии (суспензионная колонка, далее СК), вместо набивных колонок, для того чтобы, с одной стороны, можно было работать с более мелкозернистыми сорбентами и, с другой стороны, обойтись без использования насосов, кранов и линий высокого давления. Перепад

давления вдоль суспензионной колонки должен быть значительно ниже, чем вдоль набивной колонки.

Однако, сорбент в виде суспензии может быть использован только если он удерживается в колонке в потоке жидкой фазы без применения каких-либо фильтров, в присутствии которых из суспензии получится набивной слой, как это имеет место при приготовлении сорбционных и хроматографических колонок [62]. Указанная задача может быть решена, если частицы суспензии удерживаются в ограниченном объеме проточной системы за счет действия внешнего силового поля (гидродинамического, термического, теплового, акустического и др.). Такие поля используются для разделения частиц в методах проточного фракционирования в поперечном поле (ПФПП) [63], основанных на различном удерживании частиц разного размера и плотности. При полном удерживании частиц в разделительном объеме проточной системы под действием силового поля могут быть созданы условия, при которых разделяются не сами частицы, а растворенные аналиты, сорбируемые на выбранных частицах сорбента в виде удерживаемой суспензии.

Важным является также то, чтобы удерживаемые частицы не агрегировали и не образовывали более крупные частицы, а, следовательно, частицы должны быть распределены и структурированы в объеме колонки. При этом образующиеся структуры в колонке («столбики») должны быть воспроизводимы.

Помимо возможности использовать зерна сорбента размером в несколько микрон и при низком давлении, суспензионные колонки могут иметь еще одно преимущество. В отличие от классических набивных колонок, взвешенные в объеме зерна сорбента позволяют работать с образцами, содержащими растворимые высокомолекулярные вещества. Известны биотехнологические методы, в которых зерна сорбента переводятся во взвешенное состояние за счет восходящего потока раствора, содержащего целевые компоненты [64].

Благодаря увеличенной, по сравнению с набивными колонками, порозности сорбционной системы удастся работать с макромолекулами.

Возникающие в УЗ поле микроакустические течения создают необходимые условия для ускоренного протекания сорбционного процесса благодаря интенсификации массопереноса в системе сорбат-сорбент. Известно также, что УЗ воздействие может оказывать значительное влияние на кинетику сорбции ионов металлов из водных растворов комплексообразующими и ионообменными материалами, используемыми в аналитической химии [30,65].

Таким образом, УЗ поле может играть две роли в сорбционных процессах: удерживать мелкие зерна сорбента в ячейке или колонке низкого давления и одновременно ускорять сорбционный процесс. Второе обстоятельство может быть важным при переходе от набивной к суспензионной колонке с большей порозностью, т.е. с большими расстояниями между зернами сорбента, из-за чего могут возникать кинетические проблемы.

Наиболее перспективным является применение УЗ полей в некавитирующем УЗ мегагерцового диапазона. Это дает возможность формировать слои частиц сорбента с периодичностью в половину длины УЗ волны.

4.1 Выделение металлов из водных растворов

Ранее было показано, что сорбент Диасорб-130-ИДК удерживается в СК при действии ультразвуковой стоячей волны. Сорбент полностью удерживается при скорости 1 мл/мин и массе сорбента 20 мг.

При концентрировании элементов через СК пропускали 100 мл раствора с общим стандартным содержанием металлов 0,4 мкг/л со скоростью 1 мл/мин. Затем фильтрат собирали и отбирали по 5 мл на анализ.

Десорбцию металлов проводили 6 мл 1 М раствора азотной кислоты, собирая по 2 мл на анализ.

Было изучено влияние рН раствора на сорбцию элементов (рис. 4.1). Показано, что кремнезем, химически модифицированный группами

иминодиуксусной кислоты в УЗ поле эффективно извлекает ионы тяжелых металлов при $pH > 3-4,5$ и все РЗЭ при $pH > 6$. Количественное извлечение практически всех изученных элементов наблюдается при $pH 8$.

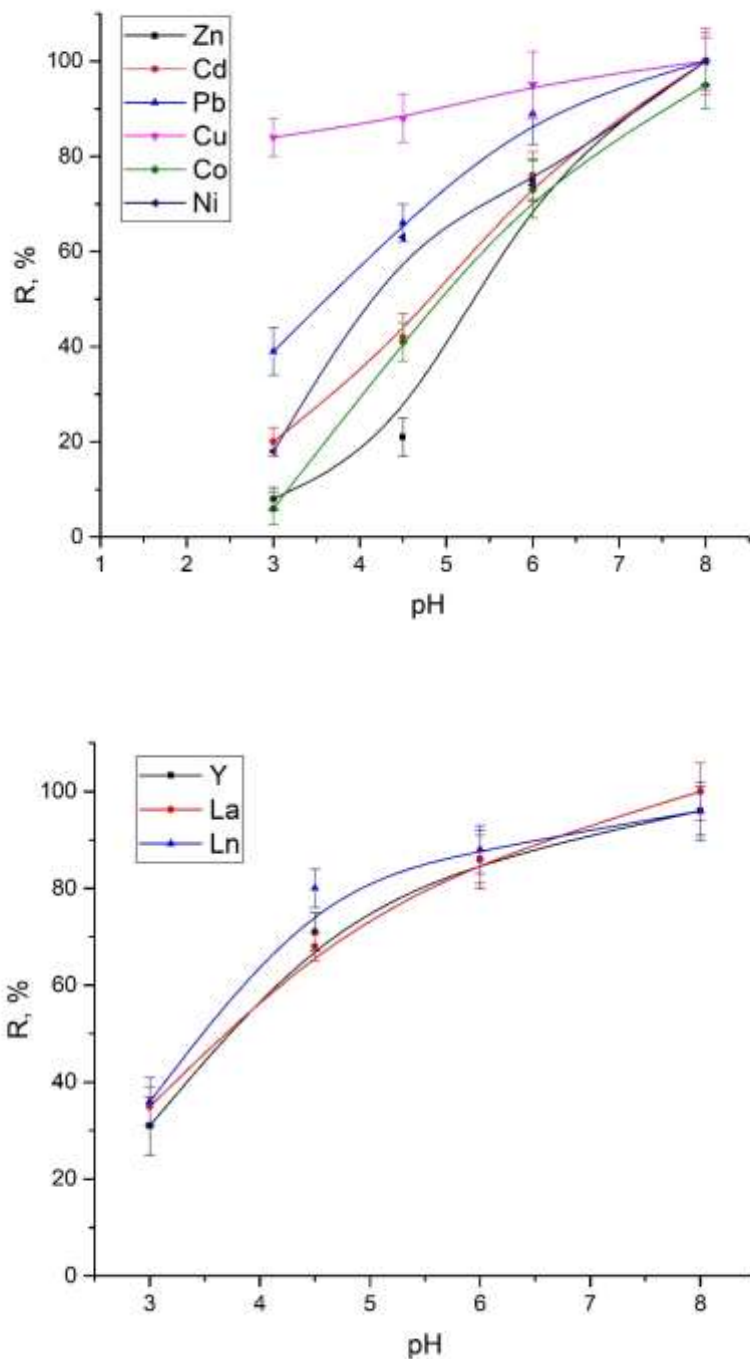


Рисунок 4.1. Степень извлечения некоторых металлов сорбентом ДИАСОРБ-130-ИДК при различных pH из водного раствора в суспензионной колонке (масса сорбента 20 мг, скорость потока 1 мл/мин)

Была изучена возможность концентрирования металлов из больших объемов пробы и последующая десорбция их с сорбента. Количественная (>90%) сорбция при рН 8 и десорбция элементов при использовании 1 М раствора азотной кислоты наблюдается для Co, Ni, Cu, Zn, Pb, Fe, Y и всех РЗЭ.

Проведенные исследования с различными массами сорбента (10 и 20 мг) и объемами аналита позволяют говорить об эффективном извлечении РЗЭ из водных растворов (табл. 4.1.) и возможном применении данного способа концентрирования РЗЭ из образцов с более сложной матрицей.

Таблица 4.1. Степень извлечения (R, %) элементов из стандартного водного раствора с концентрацией каждого элемента 0,4 мг/л (рН = 7.3, m = 10 и 20 мг) в динамическом режиме из 10 мл / 100 мл аналита с использованием суспензионной колонки (n = 5, P = 0.95, R ± 10%)

Элемент	R, %			
	Масса сорбента			
	10 мг	10 мг	20 мг	20 мг
	Объем аналита			
	10 мл	100 мл	10 мл	100 мл
Y	96	92	98	96
La	100	93	97	97
Ce	96	93	100	96
Pr	95	93	98	97
Nd	92	93	96	97
Sm	96	93	98	95
Eu	96	93	99	95

Элемент	R, %			
	Масса сорбента			
	10 мг	10 мг	20 мг	20 мг
	Объем аналита			
	10 мл	100 мл	10 мл	100 мл
Gd	95	92	97	95
Tb	95	91	98	93
Dy	96	93	99	97
Ho	96	92	97	95
Er	96	92	96	95
Tm	96	93	97	96
Yb	97	93	98	94
Lu	96	93	97	95

Для извлечения РЗЭ из образцов природной воды был выбран сорбент Диасорб-130-ИДК, т.к. он не сорбирует ионы натрия, калия и магния. Концентрирование РЗЭ из природной воды (придонная вода озера Имандра, Кольский Полуостров) проводилось при скорости 1 мл/мин, массе сорбента 20 мг, объем пробы составлял 100 мл. Полученные результаты показывают, что суспензионная колонка может применяться для извлечения следов металлов из природных вод (Таб. 4.2). В исследовании было установлено, что более 90% сорбированных металлов элюировалось с помощью 6 мл 1 М HNO₃.

Таблица 4.2. Степень извлечения микроэлементов из придонной воды озера Имандра, Кольский Полуостров (сорбент ДИАСОРБ-130-ИДК, масса сорбента 20 мг, скорость потока 1 мл/мин, объем пробы 100 мл) n=3, P = 0,05

Элемент	Прямое определение нг/л	Конц. в колонке нг/л	Элемент	Прямое определение нг/л	Конц. в колонке нг/л
La	62±7	610±100	Tb	0,8±0,1	7±2
Ce	80±10	790±200	Dy	2,4±0,4	22±7
Pr	12±2	110±20	Ho	н.о.	7±1
Nd	40±6	380±80	Er	1,6±0,3	15±3
Sm	5±1	43±10	Tm	н.о.	4±1
Eu	1,0±0,2	95±30	Yb	1,2±0,3	11±3
Gd	8±2	75±20	Lu	н.о.	5±1

н.о. - не обнаружено

Проведенные исследования показали, что применение суспензионных колонок при концентрировании РЗЭ позволяет снизить в десять раз предел обнаружения.

В продолжение исследований концентрирования элементов из водных растворов нами изучена возможность сорбционного концентрирования в суспензионных колонках металлов платиновой группы (МПГ).

МПГ широко используют в различных отраслях промышленности благодаря их уникальным физическим, химическим и каталитическим свойствам [66]. Незаменимость МПГ в ряде практических приложений, например, палладия и платины в автомобилестроении и водородной энергетике, обуславливает растущий спрос на эти металлы и, соответственно, необходимость совершенствования методов их извлечения и переработки [67,68].

Важнейшую роль в процессах получения аффинированных металлов как из первичного, так и вторичного сырья играют методы аналитического определения МПГ. Учитывая низкие концентрации МПГ, сложный матричный состав объектов и высокий солевой фон, прямое определение МПГ в технологических растворах затруднено даже при использовании современных инструментальных методов [69,70]. В связи с этим обязательной стадией пробоподготовки является предварительное концентрирование МПГ и отделение матричных компонентов (меди, никеля, алюминия, железа и др.). Для этих целей эффективно использование методов твердофазной экстракции.

Ранее в работах продемонстрированы преимущества применения ионных жидкостей в твердофазной экстракции МПГ, показана возможность использования ионных жидкостей фосфониевого и имидазолиевого типа в качестве модифицирующих соединений твердых полимерных, углеродных и магнитных носителей [71–74].

Нами был предложен способ твердофазной экстракции платины и палладия в суспензионной колонке с использованием фосфониевой ионной жидкости Cyphos®IL-101 и микрочастиц кремнезема Kromasil® 100-5-Sil. На примере модельных многокомпонентных растворов показана возможность количественного извлечения платины и палладия и их последующего определения методом АЭС-ИСП.

Основными характеристиками сорбентов, используемых для концентрирования МПГ, являются их кинетические свойства, сорбционная способность в широком интервале кислотности, избирательность извлечения в присутствии макроэлементов, таких как железо(III), медь(II), никель(II) и др. Для исследования этих и других сорбционных свойств, прежде всего, было важно выбрать оптимальное содержание ионной жидкости на твердом носителе. По полученным экспериментальным данным (рис. 4.2) оптимальное содержание Cyphos®IL-101 на кремнеземе Kromasil® 100-5-Sil составляет 0.2–0.3 ммоль/г.

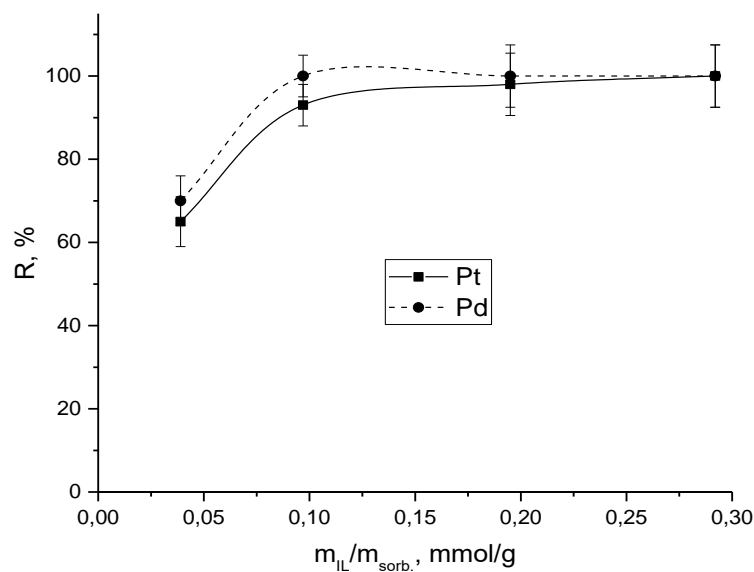


Рисунок 4.2. Степень извлечения Pt(IV) и Pd(II) в зависимости от количества ионной жидкости на твердом носителе (1 М HCl, V = 5 мл, $m_{сорб.}$ = 20 мг, время контакта фаз 30 мин)

На рис. 4.3 представлены данные по степени извлечения платины и палладия в зависимости от времени контакта фаз в обычных условиях и при воздействии ультразвукового излучения.

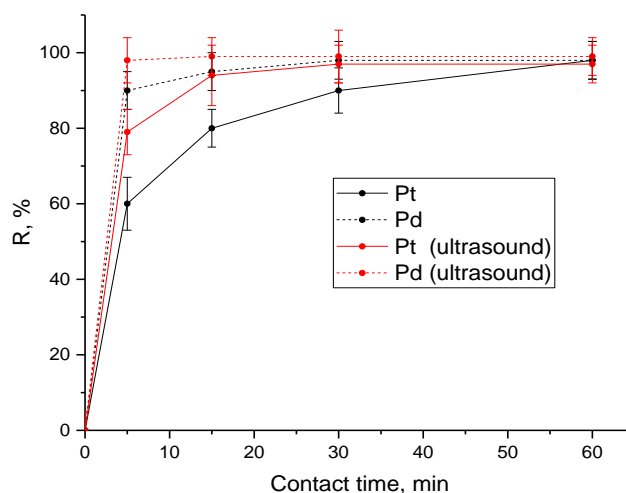


Рисунок 4.3. Степень извлечения Pt(IV) и Pd(II) в зависимости от времени контакта фаз (1 М HCl, V = 5 мл, $m_{сорб.}$ = 20 мг, [IL] = 0.2 ммоль/г)

Как можно видеть, для установления равновесия в сорбционной системе достаточно 5 мин в случае палладия, в то время как для платины необходимо более длительное контактирование раствора с сорбентом – более 30 мин. Установлено, что при воздействии на сорбционную систему УЗ излучения возможно сокращение времени контакта фаз, необходимого для полного извлечения обоих металлов до 10 мин.

Технологии получения платиносодержащих растворов, таких как гидрохлорирование, обуславливают их высокую кислотность и высокое содержание хлорид-ионов. В связи с этим выбор в качестве твердой матрицы кремнезема целесообразен благодаря его гидролитической стабильности в кислых средах и ненабухаемости. На рис. 4.4 представлены данные по сорбционной способности полученного сорбента в зависимости от концентрации соляной кислоты.

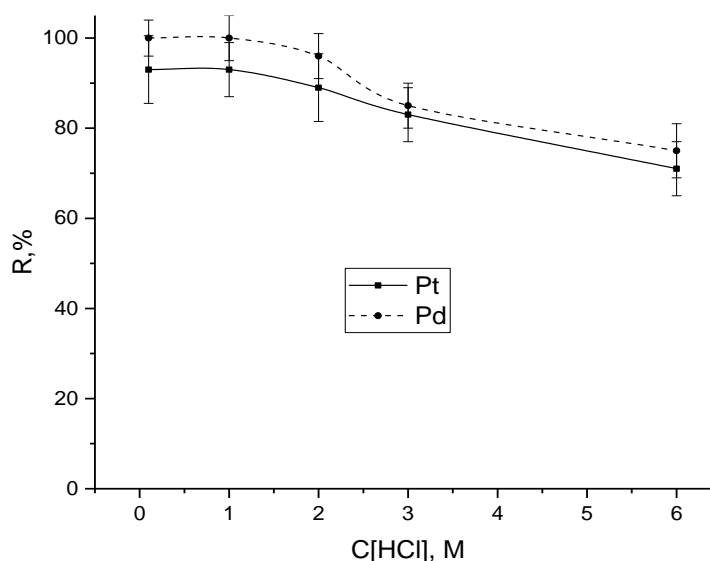


Рисунок 4.4. Степень извлечения Pt(IV) и Pd(II) в зависимости от концентрации соляной кислоты ($V = 5$ мл, $m_{\text{сорб.}} = 20$ мг, время контакта фаз 30 мин, $[IL] = 0.2$ ммоль/г)

Установлено, что полученный сорбент характеризуется высокой химической устойчивостью во всем изученном интервале кислотности, однако

из данных рис. 3 видно, что при концентрации соляной кислоты больше 3 М степень извлечения платины и палладия несколько снижается. Вероятно, извлечение металлов осуществляется по механизму ионообменного взаимодействия и при высокой концентрации кислоты возможно конкурирующее влияние хлорид-ионов. Это согласуется с литературными данными по экстракции платиновых металлов фосфониевыми ионными жидкостями [75,76]. Таким образом, в качестве оптимальной кислотности раствора выбрана концентрация HCl 0,1-1 М, при этом содержание хлорид-ионов не должно превышать 100 г/л.

Селективность полученного сорбента изучали при извлечении платины и палладия ($n \cdot 10^{-6}$ г/л) в присутствии Fe(III), Cu(II) и Ni(II) ($n \cdot 10^{-1}-10^{-3}$ г/л) из растворов 0,1-1 М HCl. Показано, что в данных условиях цветные металлы полностью остаются в водной фазе, в то время как платиновые металлы количественно извлекаются в фазу сорбента. Это позволяет использовать сорбент для селективного извлечения платиновых металлов из растворов сложного состава.

Как было показано выше, ультразвуковая интенсификация процесса извлечения платиновых металлов позволяет улучшить кинетические характеристики сорбента и увеличить эффективность извлечения. В условиях УСК возможно проведение твердофазной экстракции в динамических условиях под действием ультразвукового излучения.

Определены оптимальные скорость пропускания раствора и соотношение массы сорбента к объему раствора. Показано (рис. 4.5), что при скорости потока 0,1-0,2 мл/мин достигается количественное извлечение платины и палладия из растворов объемом 2-50 мл при массе сорбента 20 мг. Увеличение скорости потока раствора до 1,0 мл/мин приводит к снижению степени извлечения металлов.

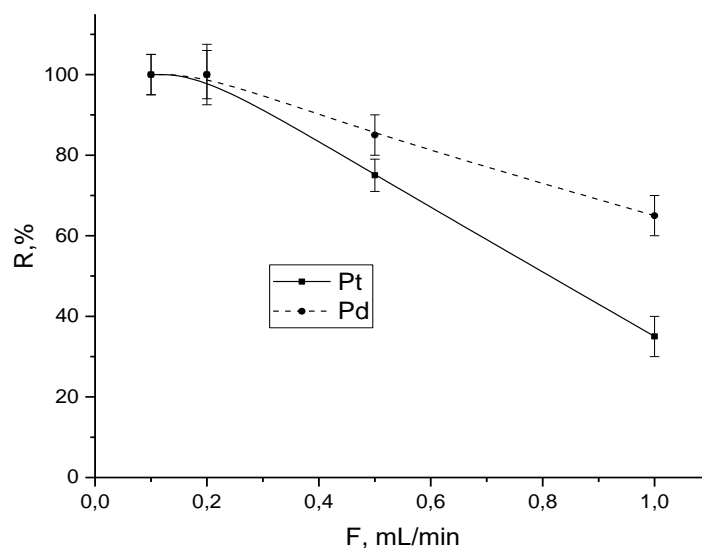


Рисунок 4.5. Степень извлечения Pt(IV) и Pd(II) в зависимости от скорости пропускания раствора через УСК (1 М HCl, V = 2-50 мл, $m_{\text{сорб.}} = 20$ мг, [IL] = 0.2 ммоль/г)

Установлено, что при использовании растворов 2 М HNO₃ и 5%-й тиомочевины в 0,01 М HCl в качестве элюентов происходит количественная десорбция ионов платины и палладия. Степень извлечения при элюировании 1 М NaClO₄ составляет 99% для платины и 80% для палладия (рис. 4.6).

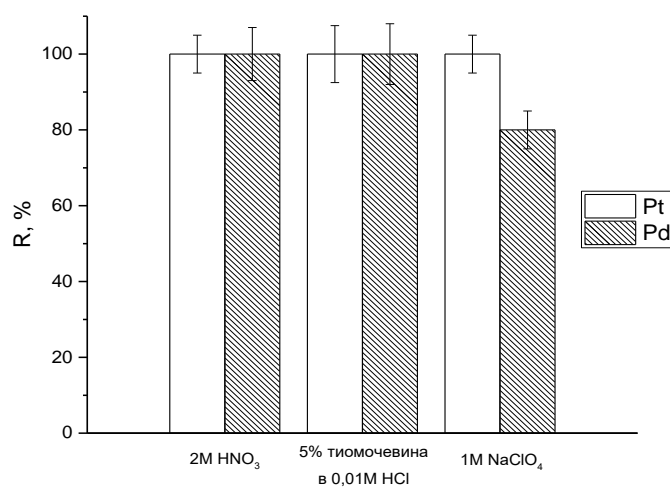


Рисунок 4.6. Степень извлечения платины и палладия при элюировании

На основании полученных экспериментальных данных разработан способ твердофазной экстракции платины и палладия в СК из модельных растворов и их последующего инструментального определения в растворах элюатов. В табл. 4.3 приведены результаты АЭС-ИСП определения платины и палладия после концентрирования в СК сорбентом на основе Kromasil® 100-5-Sil, модифицированным Cyphos® IL-101, и элюирования раствором 2 М HNO₃.

Таблица 4.3. Результаты определения ионов металлов в модельном растворе методом АЭС-ИСП (n = 3, P = 0.95)

Условия сорбции: состав раствора, мкг/мл: Pt 0.2, Pd 0.2, Fe 250, Cu 300, Ni 300; 1 М HCl, V = 25 мл, m_{сорб.} = 20 мг, [IL] = 0,2 ммоль/г, F=0,2 мл/мин

Условия элюирования: 2 М HNO₃, V=2 мл, F=0.2 мл/мин

Металлы	Введено		Найдено	
	мкг/мл	мкг	мкг/мл	мкг
Pt	0,2	5	2,5±0,3	5,0±0,5
Pd	0,2	5	2,5±0,2	5,0±0,5

Таким образом, продемонстрированы возможности СК для селективного выделения и концентрирования ионов Pt(IV) и Pd(II) с целью последующего АЭС-ИСП определения.

4.2 Выделение РЗЭ из вин

Сложность идентификации виноградных вин обусловлена многими факторами – агротехникой, почвой, сортом винограда, технологией переработки и составами применяемых вспомогательных материалов.

Вино относится к числу продуктов, в которых географическое происхождение считается знаком качества. С химической точки зрения вино можно рассматривать как сложную смесь, содержащую воду, этиловый спирт и сахара, другие неорганические и органические соединения [77]. Также в вине присутствуют микроэлементы [78]. Различные металлы могут поступать в

виноград из почвы, на которой он произрастает и соответственно попадать в вино. Также металлы могут попадать путем антропогенного воздействия на почву и растения. Попадая в растения металлы аккумулируются и в последствии могут быть обнаружены на разных этапах винодельческого процесса, как в урожае, так и в бутылках готового вина [79].

Элементный состав вина дает важную информацию о его качестве, физико-химических характеристиках и географическом происхождении [80]. По содержанию микроэлементов можно проводить территориальную идентификацию исходного виноматериала, которая во многом определяет цену и качество вин [81–84]. Такая идентификация или установление профиля испытуемого образца вина возможна по содержаниям элементов-маркеров–редких элементов, поскольку на содержание широко распространенных элементов заметное влияние могут оказывать различные артефакты.

Концентрация элементов во многом определяет устойчивость, органолептические и пищевые характеристики вина. Например Cu, Fe, Mn, Ni и Zn, в основном влияют на органолептические характеристики вина (т.е. свежесть, аромат, цвет и вкус) из-за образования осадков, помутнения при брожении, созревания и хранения. Что касается взаимосвязи между содержанием металлов в винах и их географическим происхождением, в ряде публикаций сделан вывод о том, что элементный состав может быть полезным инструментом для определения происхождения вин [85]. В частности, РЗЭ использовались для определения географического происхождения вин из разных регионов Италии [86,87], Испании [88], некоторых регионов Европы [89–91], Калифорнии [90], Австралии [90] и Южной Америки [92]. Содержание РЗЭ используется в качестве инструмента для географической идентификации может проводится потому, что их состав на каждом этапе винодельческого процесса показывает исходное распределение в почве [93]. Но следует отметить, что изменение содержания РЗЭ в винах от первичного может быть вызвано использованием некоторых процедур для интенсификации процессов

брожения или добавкой удобрений содержащих значительное количество РЗЭ [94].

Само по себе определение элементов в образцах вин является сложной задачей. В последние годы масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой (МС-ИСП) является основным аналитическим методом для определения РЗЭ в винах [92,95–97]. Тем не менее, введение органических образцов в плазму является проблемой, поскольку в методах использующих индуктивно связанную плазму, возникают помехи, вызванные сложными органическими матрицами (матричный эффект, деградация плазмы, осаждение сажи на наконечнике инжектора и конусах) [98]. Поэтому для удаления матрицы было разработано несколько подходов к пробоподготовке: разбавление, минерализация, кислотное разложение с помощью микроволнового или ультрафиолетового излучения, деалкоголизация и экстракция аналитов. Однако все эти методы имеют некоторые недостатки, вызванные потенциальным загрязнением образца и снижением пределов обнаружения из за использования добавок других реактивов [99].

В проведенных исследованиях показана возможность использования суспензионных колонок с мелкозернистым сорбентом для извлечения РЗЭ из образцов натуральных вин, органические компоненты которых не дают возможности прямого анализа с применением аналитических методов, использующих аргоновую плазму как источник эмиссии или ионный источник, получивших широкое распространение в последние годы. Как показали предварительные эксперименты, при анализе белых вин необходимо их разбавление по крайней мере в 10 раз для устойчивого горения аргоновой плазмы. Однако содержание РЗЭ и иттрия в изученных образцах таково, что после разбавления возможно надежное прямое определение только некоторых легких РЗЭ.

Методы пробоподготовки вин были рассмотрены в работах [83,100]. Показано, что при определении следовых количеств металлов в винах с использованием методов, основанных на применении индуктивно-связанной

плазмы, требуется пробоподготовка, связанная с разбавлением пробы (её минерализация или кислотная обработка, часто в автоклаве). Для определения редкоземельных элементов, ввиду их низких содержаний, может потребоваться их предварительное выделение и концентрирование [100,101], которое возможно с применением сорбентов для этих элементов.

К таким сорбентам относятся модифицированные силикагели, содержащие иминодиацетатные группы, успешно использованные Тихомировой и соавт. [102,103] для извлечения Fe, Cu, Mn, Ni, Co, Zn, Cd, Pb из различных водных растворов с применением набивных колонок с зернами размером около 100 мкм. Опираясь на эти работы и исследования описанные выше, была показана возможность применения сорбента указанного типа для извлечения из различных вод большого числа элементов, в том числе редкоземельных, с использованием ультразвуковой суспензионной колонки [104].

Для того чтобы показать необходимость более сложной пробоподготовки образцов вина с использованием суспензионной колонки и других способов была проверена возможность анализа вина методом МС-ИСП с применением техники разбавления образца 2%-ным раствором азотной кислоты в 10 раз. Даже при таком, минимально необходимом разбавлении, содержание ряда элементов (Y, Eu, Tb, Tm) находятся ниже пределов обнаружения, а остальные РЗЭ определяются с большой погрешностью из-за их низкого содержания. Дальнейшие эксперименты проводились с использованием динамической сорбции и десорбции в ультразвуковой суспензионной колонке, а также с применением статического варианта сорбции с тем же сорбентом и кислотного разложения образцов вина перед их определением методом МС-ИСП. Динамический вариант сорбционного извлечения и концентрирования РЗЭ в традиционных колонках, набитых зернами размером около 6 мкм, при низком давлении реализовать невозможно.

Использованный способ кислотного разложения предусматривает разрушение органической матрицы вина в азотной кислоте при кипячении.

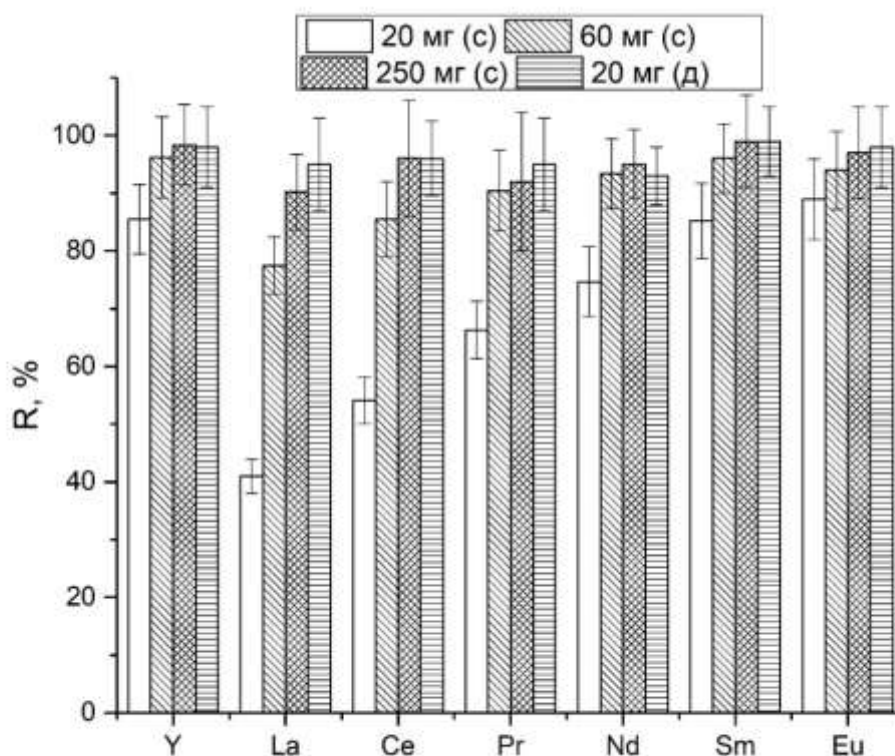
Недостатками примененного способа явилось осмоление неразложившихся органических веществ в процессе выпаривания смеси, а также длительность и трудоемкость данного метода. Такой способ пробоподготовки занимает около 10 часов. Тем не менее, анализ вина с использованием кислотного разложения позволяет сравнить правильность результатов с данными, полученными с применением сорбционных способов пробоподготовки – динамического и статического (табл. 4.4).

Таблица 4.4. Результаты масс-спектрометрического определения редкоземельных элементов (мкг/л) в белом вине (Chantarel 2010, Chandonnay, Франция) с применением различных способов пробоподготовки ($V_{\text{пробы}}$ 10 мл).

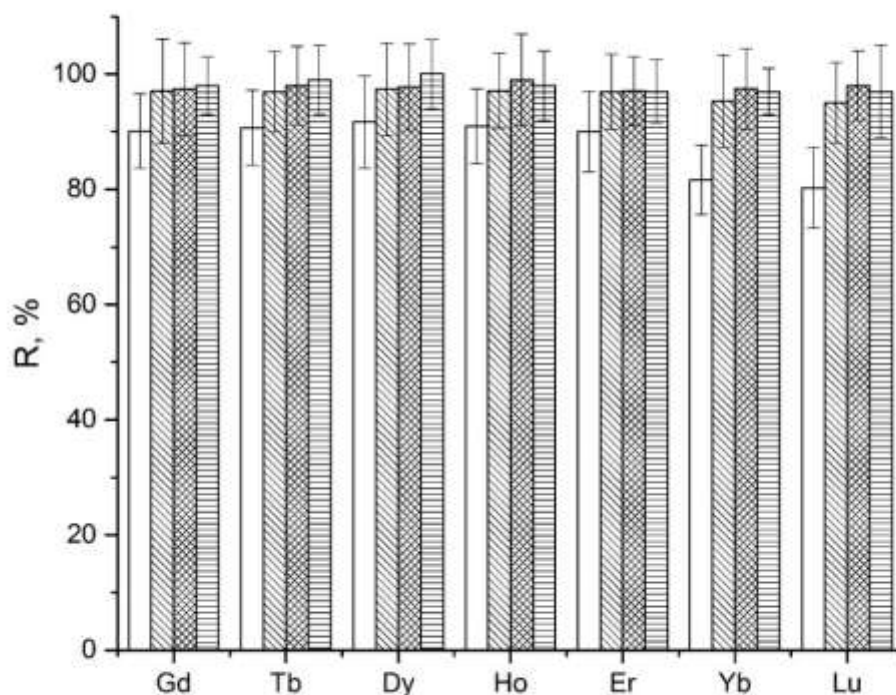
Элемент	Разбавление 2% HNO ₃ в 10 раз n = 3; P=0,95	Кислотное разложение n = 5; P=0,95	Статическая сорбция n = 6; P=0,95 m _{сорб} = 250 мг	Динамическая сорбция (УСК) n = 6; P=0,95 m _{сорб} = 20 мг
Y	н.о.	0,27±0,05	0,22±0,05	0,23±0,05
La	н.о.	0,018±0,002	0,015±0,002	0,017±0,002
Ce	0,2±0,1	0,26±0,04	0,22±0,03	0,23±0,03
Pr	0,05±0,03	0,073±0,008	0,061±0,005	0,072±0,005
Nd	0,02±0,01	0,18±0,02	0,20±0,02	0,22±0,01
Sm	0,07±0,03	0,08±0,01	0,069±0,008	0,075±0,006
Eu	н.о.	0,044±0,005	0,036±0,002	0,040±0,003
Gd	0,05±0,03	0,060±0,007	0,062±0,005	0,067±0,004
Tb	н.о.	0,044±0,004	0,042±0,005	0,048±0,003
Dy	0,05±0,03	0,068±0,007	0,070±0,006	0,072±0,006
Ho	0,03±0,02	0,035±0,004	0,028±0,002	0,032±0,004
Er	н.о.	0,060±0,008	0,053±0,006	0,055±0,005
Tm	н.о.	0,033±0,002	0,030±0,002	0,033±0,005
Yb	0,05±0,03	0,069±0,009	0,063±0,007	0,06±0,01
Lu	0,03±0,01	0,033±0,004	0,023±0,005	0,027±0,003

н.о. – не обнаружено

При разработке методики пробоподготовки, основанной на статической сорбции и десорбции РЗЭ перед их определением методом МС-ИСП, была изучена зависимость получаемых результатов от массы сорбента Диасорб-130-ИДК. Масса изменялась от 20 до 250 мг, кислотность образца доводилась до pH 7, а десорбция осуществлялась с помощью 1 М HNO₃ (рис. 4.7). Было показано, что результаты определения элементов, сопоставимые с данными, полученными после кислотного разложения и динамического выделения аналитов в суспензионной колонке, достигались при массе сорбента 250 мг (что косвенно свидетельствует о количественном извлечении РЗЭ на стадии пробоподготовки). Недостатки статического режима по сравнению с динамическим хорошо известны – большая трудоемкость и трудности в автоматизации метода. Пробоподготовка с применением статического способа занимает около 1 часа.



A



Б

Рисунок 4.7. Степень извлечения (%) РЗЭ сорбентов ДИАСОРБ-130-ИДК из белого вина Chantarel 2010, Chandonnay, Франция (для статического режима (А): время контакта 30 мин., объем аналита 10 мл, массы сорбента 20, 60, 120 мг; для динамического режима (Б): масса сорбента 20 мг, скорость потока 1 мл/мин)

Динамический вариант с применением ультразвуковой суспензионной колонки был реализован при тех же условиях, что и статический. Применялся тот же сорбент Диасорб-130-ИДК со средним размером зерен около 6 мкм, рН исходного образца вина 7, элюирование проводилось с помощью 1 М HNO_3 . Различие по сравнению со статической сорбционной методикой пробоподготовки заключалось в массе используемого сорбента (20 мг вместо 250 мг), времени стадий сорбции/десорбции (25 мин вместо 1 часа) и более удобном проточном методе выделения элементов перед их определением методом МС-ИСП. Правильность полученных результатов подтверждается удовлетворительной сходимостью данных, полученных с применением

динамического и статического сорбционного выделения аналитов и принципиально иного способа пробоподготовки, основанного на предварительном кислотном разложении образцов вина (табл. 4.4.). Воспроизводимость результатов для динамического способа несколько лучше, хотя и не на много, по сравнению с двумя другими способами пробоподготовки.

В работе также были определены РЗЭ в различных образцах вин (Алиготе, Легенда Крыма, Крым, 2014; Алиготе разливное; Красное сухое, Испания) с использованием суспензионных колонок (табл. 4.6).

Таблица 4.5. Результаты масс-спектрометрического определения редкоземельных элементов (мкг/л) в винах с применением суспензионных колонок (объем аналита 10 мл).

Элемент	Белое сухое, Вино Алиготе, 2014, ЗАО «Софьи Перовской», Крым n = 5; P=0,95	Белое сухое, Вино Алиготе, 2016, «Легенда Крыма», Крым n = 6; P=0,95	Красное сухое, Вино Racimo De Uva, 2014, Испания n = 6; P=0,95
Y	3,5±0,5	6,0±1,2	0,30±0,07
La	1,4±0,3	2,4±0,5	0,6±0,2
Ce	3,0±0,7	5,8±1,2	1,2±0,2
Pr	0,5±0,1	0,20±0,05	0,14±0,03
Nd	2,0±0,5	3,4±0,7	0,5±0,1
Sm	0,56±0,10	0,85±0,20	0,14±0,03
Eu	0,25±0,05	0,23±0,05	0,03±0,01
Gd	0,6±0,2	0,88±0,20	0,12±0,03
Tb	0,21±0,05	0,15±0,03	0,03±0,01
Dy	0,68±0,14	0,79±0,16	0,10±0,02
Ho	0,26±0,05	0,19±0,04	0,020±0,005

Элемент	Белое сухое, Вино Алиготе, 2014, ЗАО «Софьи Перовской», Крым n = 5; P=0,95	Белое сухое, Вино Алиготе, 2016, «Легенда Крыма», Крым n = 6; P=0,95	Красное сухое, Вино Racimo De Uva, 2014, Испания n = 6; P=0,95
Er	0,6±0,2	0,66±0,13	0,06±0,02
Tm	0,20±0,05	0,11±0,02	0,015±0,002
Yb	0,75±0,20	0,75±0,15	0,050±0,015
Lu	0,22±0,05	0,325±0,065	0,020±0,005

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4

Показана принципиальная возможность извлечения РЗЭ и иттрия из водных растворов и образцов натурального вина с помощью сорбента Диасорб-130-ИДК в ультразвуковой суспензионной колонке, а также извлечения платины и палладия из солянокислых растворов сорбентом, модифицированным ионной жидкостью. Определены оптимальные параметры извлечения платины и палладия из солянокислых растворов с использованием суспензионной колонки. Проведено сравнительное изучение сорбции РЗЭ двумя различными методами, основанными на стандартной статической сорбции и на способе с использованием суспензионной колонки с мелкозернистым сорбентом, удерживаемым в колонке ультразвуковым полем. Показано, что удастся более чем в десять раз уменьшить навеску сорбента для количественного извлечения РЗЭ при использовании ультразвукового поля. Предложен способ определения РЗЭ в вине, основанный на их выделении и последующем определением методом МС-ИСП.

ГЛАВА 5 ВЫДЕЛЕНИЕ И КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ ДНК В СУСПЕНЗИОННЫХ КОЛОНКАХ ИЗ ПРИРОДНЫХ ОБРАЗЦОВ

В работах [34,104] было указано на возможность эффективного извлечения макромолекул с использованием акустического поля в статическом и динамическом вариантах. А также показана возможность извлечения нуклеиновых кислот из объектов окружающей среды и последующие их определение методом ПЦР-анализа.

Загрязнение объектов окружающей среды патогенными организмами представляют серьезную проблему для здоровья людей во всем мире. Своевременное обнаружение и количественное определение патогенных организмов в воде и почве является основной задачей в решении этой проблемы.

На данный момент не существует единого подхода, который бы позволил обнаружить все патогенные организмы, присутствующие в воде и почве, т.к. обнаружение патогенных организмов в почве и природных водах может быть затруднено малым количеством организмов в пробе, высокой скоростью их гибели, большими объемами проб, которые необходимо проанализировать, наличие ингибиторов, а также трудоемкостью и высокой стоимостью методов исследования. Достаточно хороший метод анализа должен характеризоваться хорошей точностью, селективностью, чувствительностью, воспроизводимостью результатов, низкой стоимостью, быстротой в получении результатов и безопасностью исследователя.

Большинство человеческих патогенов, обнаруженных в воде и почве, существует в жизнеспособной, но некультуральной форме [105]. Поэтому процедуры для их определения сложны. Это привело к тому, что для индикации загрязнения используют только некоторые организмы [106]. Эти индикаторные организмы являются показателем теоретического риска для здоровья населения и ухудшения качества воды и почв. Однако в настоящее время признано, что отсутствие бактериальных индикаторов в воде и почве не гарантирует

отсутствие более устойчивых форм организмов, таких как вирусы или простейшие, способных сохраняться в окружающей среде дольше, чем бактерии.

Почвы и воды сами по себе не являются необходимым звеном в цикле развития патогенных организмов, поэтому эти объекты представляют собой скорее среду их переноса от одного хозяина к другому различными путями (выделения инфицированных людей и животных, трупы павших от болезни животных, сточные воды, контакт с заболевшими животными или вирусоносителями).

Следует отметить, что наибольшую опасность представляют скотомогильники, в которых были зарыты трупы животных, умерших от опасных инфекционных или паразитарных заболеваний. Из-за природных факторов, а также по причине отсутствия контроля данных мест может происходить вымывание из земли и попадание в природные воды возбудителей опасных заболеваний.

Для идентификации и количественного определения организмов часто используют клеточные культуры, подсчет колоний, микроскопический анализ, полимеразную цепную реакцию и иммунологический анализ. Методы культивирования для подсчета колоний могут давать неправильные результаты при оценке высокоагрегированных микробных клеток. Кроме того, не все микробные культуры можно выращивать в лабораторных условиях. Микроскопический анализ требует окрашивания относительно большого количества микробных клеток и не является точным при идентификации патогенных организмов. ПЦР как молекулярный метод специфичен и чувствителен, но метод требует больших затрат времени. В тоже время как метод ПЦР в реальном времени может быть более специфичным, но он включает сложные этапы пробоподготовки и требует предварительных данных о нуклеотидной последовательности нуклеиновых кислот [107].

Выделение и обнаружение патогенных микроорганизмов в матрицах окружающей среды, таких как почва или вода, является сложной задачей также из-за присутствия в них гуминовых кислот, органических веществ, химических компонентов или других микроорганизмов, которые могут препятствовать реализации методов обнаружения [108–110]. При этом в окружающей среде могут быть распространены высоковирулентные микроорганизмы, что делает задачу их своевременного обнаружения крайне важной при контроле эпидемиологической обстановки. Поэтому в настоящее время особенно актуальна задача эффективного выделения и концентрирования нуклеиновых кислот возбудителей различных заболеваний, и последующего качественного и количественного определения. Под эффективностью извлечения нуклеиновых кислот понимают отношение их выделенного количества к общему количеству нуклеиновых кислот в исходной пробе. Процедура идентификации патогенного организма состоит из этапа выделения очищенной нуклеиновой кислоты патогенного организма из объекта окружающей среды (рис. 5.1) и этапа идентификации нуклеиновой кислоты ПЦР-анализом.

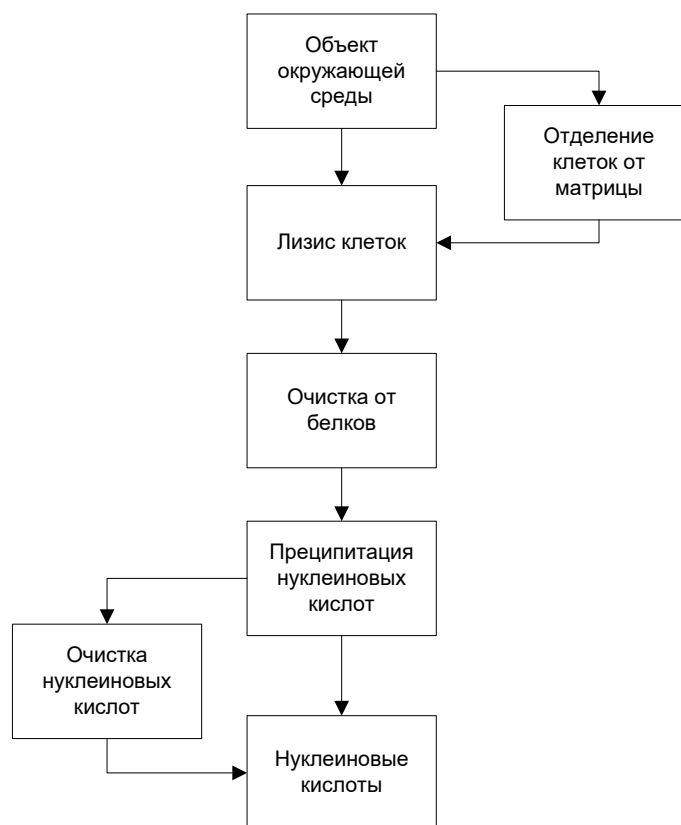


Рисунок 5.1. Схема выделения нуклеиновых кислот из объектов окружающей среды

Наиболее распространенный способ выделения ДНК из клинических образцов основан на использовании немодифицированного силикагеля. Данный метод основан на взаимодействии ДНК с поверхностью силикагеля. ДНК сорбируется на поверхности сорбента в присутствии хаотропных агентов в щелочной среде. Затем проводят отмывку сорбента от примесей с последующим элюированием ДНК. Данный метод является многостадийным и широко используется для выделения генетического материала, но немодифицированный силикагель обладает низкой сорбционной емкостью (0,5 мкг/г); элюируется около 50-60% ДНК, сорбированной на поверхности. За счет большого количества стадий выделения также возможны потери ДНК на каждой из этих стадий.

Выше и в работах [104,111,112] было показано, что применение ультразвуковых полей для сорбционных процессов способствует интенсификации сорбции и десорбции на сорбенте извлекаемого вещества, в

том числе нуклеиновых кислот [113]. Методы определения ДНК в больших объемах аналита, применимых для автоматизации процесса отсутствуют. Поэтому для решения данной задачи был предложен метод сорбции ДНК с использованием магнитных частиц. А для осуществления самого процесса применено устройство – СК с объемом 1 мл. Эта часть работы выполнялась совместно с Институтом аналитического приборостроения РАН.

Нами были проведены эксперименты по выделению плазмидной ДНК *M. tuberculosis* из модельных образцов, где матрица представляла собой реальные образцы воды и водные вытяжки из образцов почв. Образцы для анализа готовились путем добавления к воде и образцам почвы соответствующего количества ДНК (1000 копий/мл). В воде и водных почвенных вытяжках проводилась обработка лизирующим раствором (ЗАО Синтол). Каждый из полученных растворов вводился в систему СК со скоростью 1 мл/мин. В системе последовательно проводились процессы сорбции ДНК на магнитном сорбенте (набор M-Sorb Tub, ЗАО Синтол), отмывка сорбента, элюирование ДНК в 1 мл (для отмывки и элюирования использовались соответствующие растворы ЗАО Синтол).

Для определения концентрации ДНК отбирали по 10 мкл раствора, полученного при элюировании ДНК, и проводили анализ методом ПЦР-РВ с использованием калибровочных образцов на приборе АНК-32 (ИАП РАН, Россия).

В данной работе для извлечения ДНК предложено использование СК с покрытыми силикагелем магнитными сорбентами ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$) в комбинированном акустическом и магнитном полях. Применение ультразвуковой суспензионной колонки позволяет интенсифицировать сорбционный процесс за счет действия ультразвуковых полей, которые образуют в свою очередь вихревые потоки и тем самым ускоряют диффузию веществ. Создаваемое ультразвуковое поле также позволяет удерживать частицы сорбента размером 3-6 мкм во взвешенном состоянии в СК, создавая таким способом взвешенную суспензию, удерживаемую в потоке жидкости.

Использование магнитного «фильтра» дает возможность применять большую массу сорбента, количественно удерживаемую, даже когда акустическое поле не может полностью удержать в потоке пробы мелкие фракции сорбционного материала (менее 3 мкм). А использование СК позволяет интенсифицировать и автоматизировать сорбционный процесс. Использование магнитного поля дает возможность удерживать бóльшую массу сорбента, чем при использовании одного акустического поля.

Настоящая работа была направлена на разработку динамического способа выделения и концентрирования нуклеиновых кислот из объектов окружающей среды. Возможность автоматизации предлагаемого способа выделения позволит проводить безопасную работу с патогенными организмами, относящимися к I группе патогенности.

5.1 Выделение ДНК из водных растворов

В настоящее время для определения патогенных организмов в водах применяют ПЦР-анализ. Это приводит к быстрому, точному определению количественного переносимых водой бактерий [114–116]. Начальным этапом перед фактическим ПЦР-анализом является лизис клеток для экстракции нуклеиновых кислот. Одним из наиболее распространенных методов лизиса клеток для количественного определения микроорганизмов является химический лизис, при котором для разрушения клеточных стенок используется щелочной буфер или другие литические реагенты. Этот метод требует множество необходимых инструментов и многоэтапных добавок реагентов. Кроме того, удаление реагентов после лизиса клеток необходимо во избежание вмешательства в последующую идентификацию нуклеиновых кислот [117,118].

Для выделения ДНК из модельного раствора использовали магнитный сорбент с оболочкой силикагеля (ЗАО СИНТОЛ), используемый в наборах для выделения ДНК из биологических материалов. Проведенные эксперименты по выделению ДНК показали, что ее количественное выделение с использованием СК достигается при объемной скорости потока 1 мл/мин. При увеличении

скорости потока в системе происходит снижение степени выделения до 20% (достаточное для дальнейшего определения методом ПЦР-РВ) при скорости 5 мл/мин. Снижение степени выделения связано с уменьшением времени контакта ДНК с сорбентом и вымыванием частиц сорбента из объема СК, в котором действует ультразвук, но удерживаемом магнитным полем (рис. 5.2).

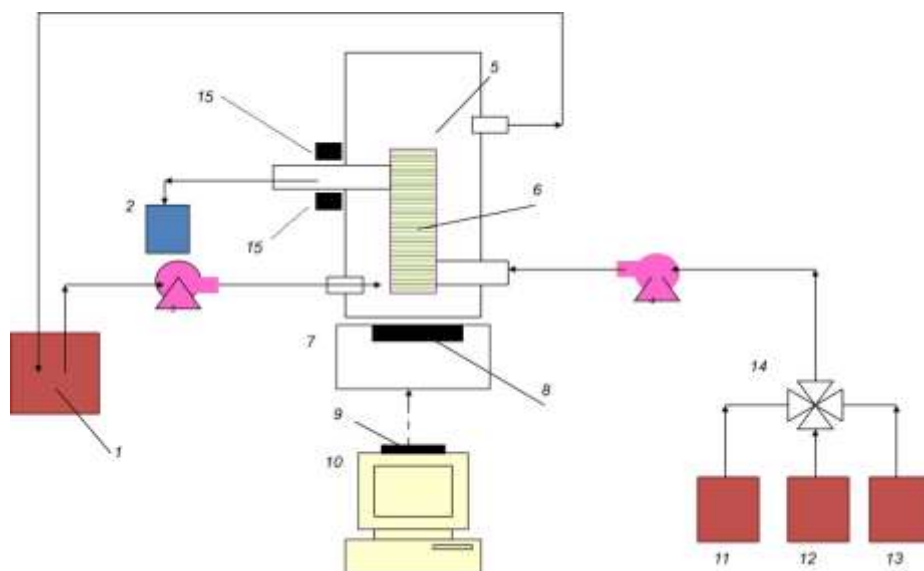


Рисунок 5.2. Схема суспензионной колонки при комбинированном действии ультразвукового и магнитного полей

термостат (1), коллектор для подачи элюента и раствора (2), насосы (3, 4), внешний охлаждающий кожух (5), УЗ колонка (6), УЗ излучатель (7), пьезоэлемент (8), bluetooth адаптер(9), компьютер (10), образец (11), промывной раствор (12), элюент(13), кран(14), магнит (15)

Проведенные исследования позволили выбрать условия выделения ДНК из водных растворов различных объемов (10–200 мл). Было установлено, что при увеличении скорости потока возможно повысить степень извлечения за счет создания циклического процесса в СК. Так, при скорости потока 2 мл/мин из модельного раствора на бидистиллированной воде за один цикл степень извлечения составляет около 70%, а на втором цикле достигает 90%.

Были проведены эксперименты по сравнению статического и динамического режимов выделения ДНК из водопроводной воды. Установлено, что при использовании СК в динамическом режиме удается сконцентрировать ДНК из 10–200 мл воды, что составило 80%. При использовании статического метода из исходного раствора удалось выделить только 3%, а применение поликапиллярных колонок позволило выделить до 17% ДНК (рис.5.3). Низкая степень выделения статическими методами обусловлена потерями, возникающим на различных этапах выделения, а также ограниченным объемом пробы, указанным в протоколах по выделению нуклеиновых кислот из образцов (200-500 мкл).

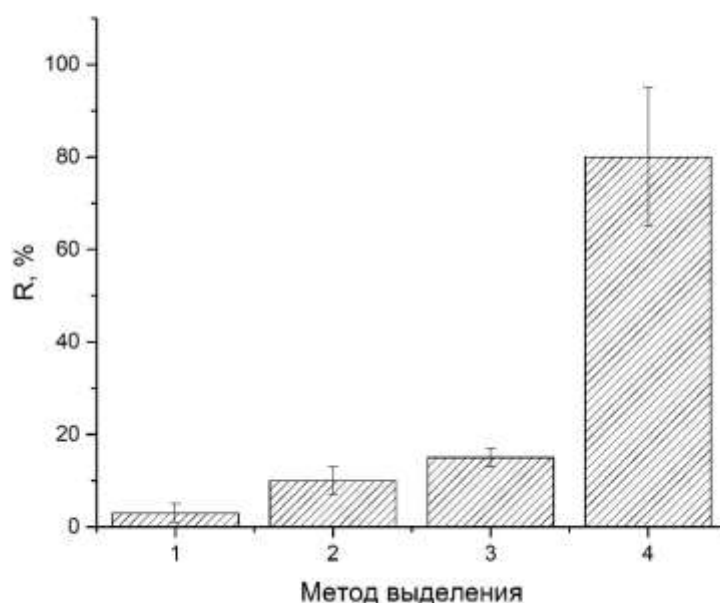


Рисунок 5.3. Сравнение методов выделения ДНК из водопроводной воды (1 – статический; 2 – с применением поликапиллярной колонки; 3 – с применением поликапиллярной колонки (-NH₂); 4 – динамический)

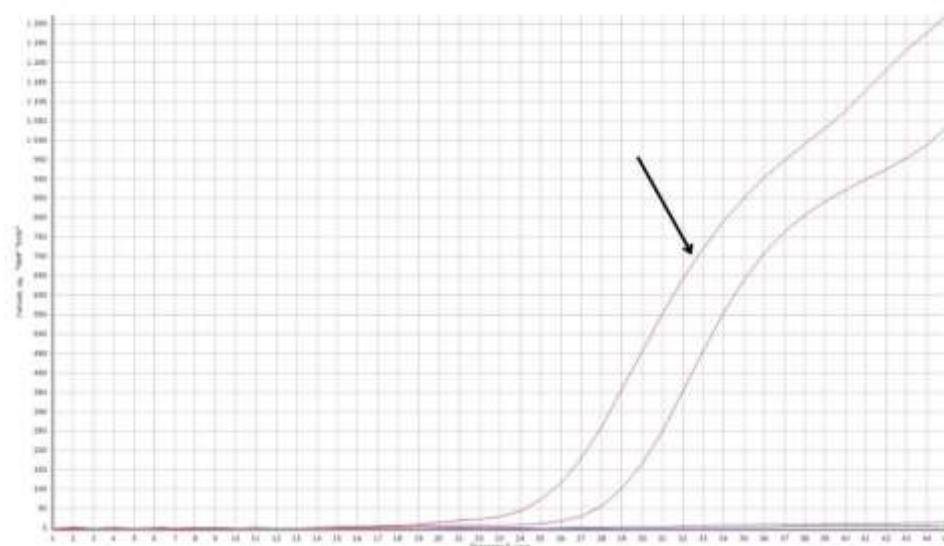


Рисунок 5.4. Результаты ПЦР-РВ, с использованием ДНК плазмиды *M.tuberculosis*, выделенной в статическом режиме из лизата водопроводный воды (объем 250 мкл). Стрелкой указана кривая для контрольного образца.

На рис. 5.4 представлен результат ПРЦ РВ проведенной с элюатом, полученным статическим методом из 250 мкл образца. Из графика видно, что амплификация снижена из-за низкого содержания ПЦР-фрагментов. Приведенные данные в табл 5.1 показывают, что при использовании суспензионной колонки чувствительность ПЦР-детектирования не снижается, а анализируемую ДНК удается определять при содержании в пробе 5 копий/мл.

Таблица 5.1. Степень выделения ДНК плазмиды *M. tuberculosis* различными методами из бидистиллированной и водопроводной воды (n=4, P=0,95)

Метод (тип колонки)	Бидистиллированная вода	Водопроводная вода
Статический	5±2	3±2
Динамический (суспензионная колонка)	90±10	80±20
Поликапиллярные колонки (стекло)	15±3	10±3
Поликапиллярные колонки (модифицированные группами -NH ₂)	17±3	15±2

Используемые поликапиллярные колонки применяются для выделения ДНК из образцов, но из-за малого объема, пропускаемого через них, показывают низкие значения степени выделения ДНК.

5.2 Выделение ДНК из почв

Почва является сложной средой, в которой обитают разнообразные природные микроорганизмы. Большинство микроорганизмов безвредны для человека и хорошо адаптированы к почвенной среде. Однако некоторые патогенные микроорганизмы могут попасть в почву в результате деятельности человека и могут представлять опасность для людей при попадании в пищевую цепь или в питьевую воду [119,120]. Эти патогены включают также кишечные вирусы, которые могут быть обнаружены в почве по ряду причин, включая определенные методы ведения сельского хозяйства (такие как внесение навоза и биосолидов с очистных сооружений или орошение загрязненными поверхностными водами) [121]. Данные патогены передаются фекально-оральным путем, а получаемая инфекционная доза может быть достаточна для возникновения инфекции у человека или животного [122]. Найденные в объектах окружающей среды или в продуктах питания патогенные организмы ведут себя как инертные частицы, т.е. не способные к размножению. Они реплицируются только в клетках хозяина. Когда почва загрязнена фекальными загрязнениями, энтеросолубильные вирусы могут присутствовать и сохраняться там из-за их способности противостоять условиям окружающей среды, а также таким факторам, как кислая среда почвы, потепление и похолодание. Данные факторы способствуют тому, что эти вирусы создают угрозу для здоровья человека [123].

Вирусы человека, в том числе норовирусы, ротавирусы и вирус гепатита А, являются основной причиной небактериальных заболеваний и вспышек гепатита в мире [124]. Согласно исследованию, проведенному Центром по контролю и профилактике заболеваний в США, свежие продукты являются причиной 46% случаев пищевых инфекций в то же время мясо является

причиной 22% случаев [125]. Понимание распространенности и устойчивости вирусов в продуктах садоводства, в окружающей среде является одной из важнейших задач для мониторинга этих инфекций. В настоящее время нет однозначного мнения о роли почвы как потенциального источника загрязнения. Хотя имеются коммерческие наборы для работ с почвой, они были разработаны для обработки очень небольших объемов (0,2–5 г), а вирусы в окружающей среде обычно присутствуют в низких концентрациях. Кроме того, извлечение и очистка ДНК или РНК из проб окружающей среды, таких как почва, создают проблемы. Ряд органических веществ почвы может затруднять определение ДНК молекулярными методами, за счет ингибирования активности фермента *Taq*-полимеразы, отвечающего за амплификацию ДНК в ПЦР или путем прерывания процесса вследствие связывания органического вещества почвы с экстрагированной ДНК. Гуминовые и фульвокислоты являются основными веществами, приводящие ПЦР к ингибированию [126]. Фенольные соединения, которые образуются главным образом во время биоразложения органического вещества, связываются с ДНК и создают конкуренцию между ДНК и *Taq*-полимеразой во время ПЦР. Гуминовые и фульвокислоты часто совместно экстрагируются с нуклеиновыми кислотами из проб окружающей среды [127] и могут давать ложноотрицательные результаты. Кроме того, некоторые вирусы, очень трудно реплицировать *in vitro*, и молекулярный анализ для них является единственным способом обнаружения.

Для получения почвенных вытяжек, использовалась навеска почвы (0,5–10 г) с содержащейся в ней ДНК, она суспендировалась в дистиллированной воде объемом (10–200 мл) в течение 10 минут, затем центрифугированием твердый осадок отделялся от раствора. Полученную надосадоочную жидкость использовался в дальнейшем для выделения из него ДНК.

Водные вытяжки были получены из почв: дерново-подзолистой супесчаной (ДПС) и чернозема типичного легкосуглинистого (ЧТЛ). В процессе сорбционного извлечения ДНК с использованием СК было установлено, что для почв ДПС даже из больших объемов образца извлечение

составляет до 80%, а для ЧТЛ до 60%, что вполне достаточно для определения ДНК. Различная степень выделение ДНК из водных вытяжек почв, по всей видимости, связана с различным содержанием органического вещества в почве, которое могло привести к снижению сорбции для ЧТЛ (содержание органического вещества по методу Тюрина: для ДПС – 2,01%, для ЧТЛ – 7,44%). Определение ДНК из водных вытяжек стандартным способом (статическим) показало отрицательный результат. Это может быть связано с низкой концентрацией ДНК в определяемом объеме (250-500 мкл) (табл. 5.2).

Благодаря использованию суспензионных колонок удалось сократить потери выделяемых ДНК, время, необходимое на процедуру выделения, а также сконцентрировать ДНК из объемов в которых стандартными («ручными») методами невозможно выделить ДНК в количестве необходимом для идентификации.

При исследовании влияния органического вещества почв выявлена зависимость между количеством органического вещества в исследуемых образцах. Эффективность накопления флуоресценции в ПЦР анализе и результаты подсчета концентраций ДНК, а также снижение эффективности накопления флуоресценции внутреннего положительного контроля (ВПК) в исследуемых образцах относительно контрольных на 20% может указывать на наличие ингибиторов.

Высокая степень очистки выделяемой ДНК от ингибиторов ПЦР была подтверждена результатами ПЦР-анализа.

На рис. 5.5 и в табл. 5.2 представлены результаты ПЦР-РВ, проведенной с модельными образцами водных почвенных вытяжек. Из графиков ПЦР-РВ следует, что амплификация ПЦР-фрагментов с использованием ДНК из образцов почвенной вытяжки чернозема (А) занижена по сравнению с почвенной вытяжкой из дерново-подзолистой почвы (Б), это можно объяснить наличием в лизате ингибиторов.

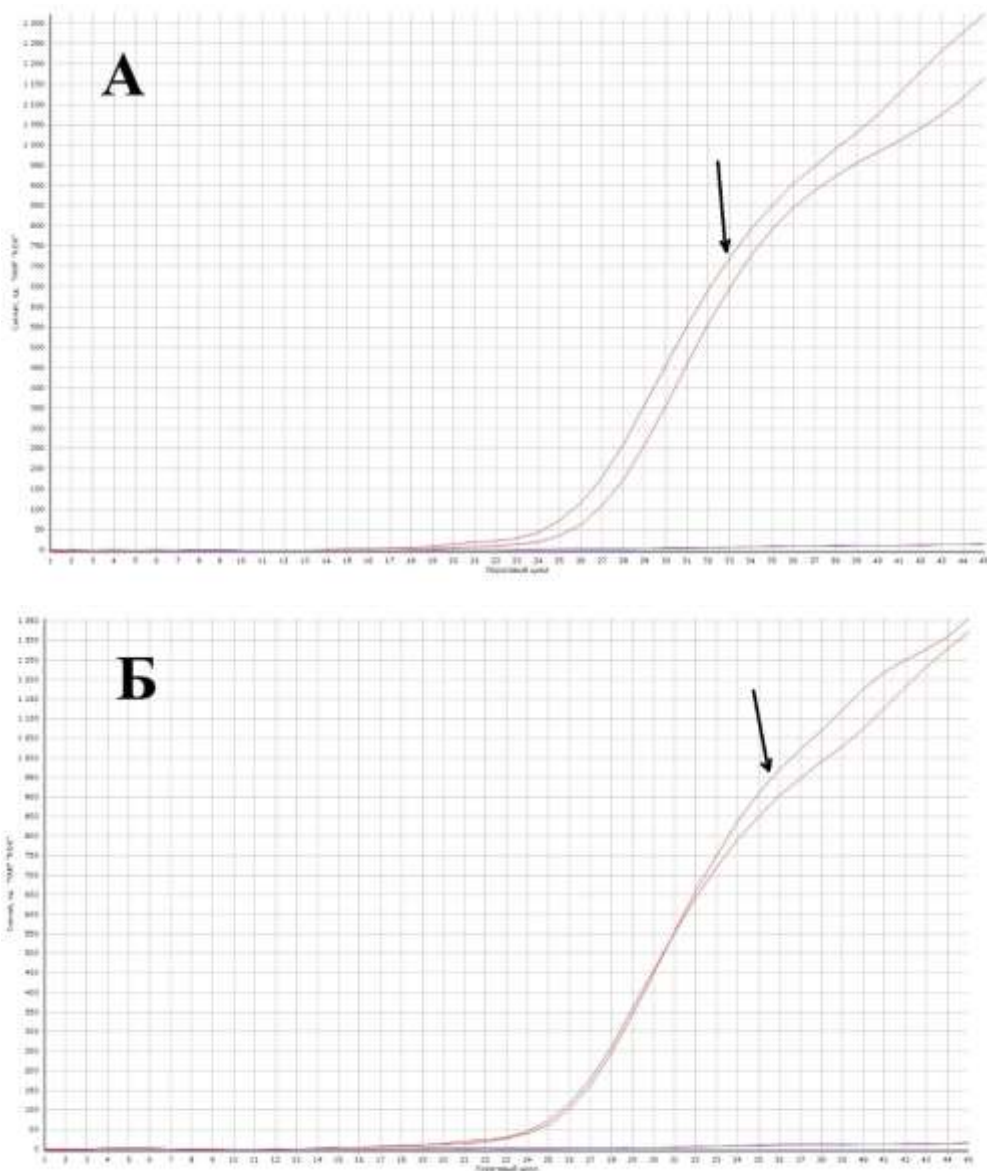


Рисунок 5.5. Результаты ПЦР в реальном времени с использованием ДНК плазмиды *M.tuberculosis*, выделенной с применением суспензионной колонки из лизата модельных образцов. А – водная вытяжка из чернозема, Б – водная вытяжка из дерново-подзолистой почвы. Стрелкой указаны кривые для контрольных образцов.

Таблица 5.2 Степень выделения ДНК плазмиды *M. tuberculosis* различными методами из водных вытяжек чернозема и дерново-подзолистой почвы (n=4, P=0,95)

Методы (тип колонки)	Водная вытяжка из чернозема	Водная вытяжка из дерново-подзолистой почвы
	Содержание органического вещества по методу Тюрина	
	2,01%	7,44%
Статический	-	-
Динамический (суспензионная колонка)	60±15	80±10
Поликапиллярные колонки (стекло)	10±3	20±5
Поликапиллярные колонки (модифицированные группами -NH ₂)	12±5	25±5

- Не определено

Таким образом, впервые предложен проточный способ сорбционного выделения и концентрирования ДНК из воды и водных почвенных вытяжек с последующим их элюированием и определением с помощью анализа методом ПЦР-РВ.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5

Предложен динамический способ выделения ДНК из воды и водных почвенных вытяжек объемом 10-200 мл и последующего количественного определения ДНК методом ПЦР-РВ. Способ опробирован при определении и выделении ДНК из водопроводной воды и почвенных вытяжек из дерново-подзолистой супесчанной почвы и из чернозема типичного легкосуглинистого. Полученные результаты показали эффективность концентрирования ДНК на магнитных сорбентах с использованием суспензионных колонок и комбинированного действия ультразвукового и магнитного полей. Использование предлагаемого способа позволяет сократить время концентрирования ДНК и увеличить объем анализируемой пробы.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Проведено теоретическое описание баланса сил, возникающих в суспензионной колонке с удерживаемыми ультразвуковым полем частицами сорбента для оптимизации условий удерживания частиц в суспензионной колонке. Определена масса сорбента, удерживаемого в суспензионных колонках в зависимости от рабочих (скорости потока, интенсивности ультразвука) и конструкционных (объем колонки, геометрические размеры) параметров.

2. На основании оптимизации условий удерживания суспензий различных мелкозернистых сорбентов в ультразвуковых проточных колонках и исследования возможностей выделения и концентрирования аналитов из растворов различной природы разработан способ их пробоподготовки с использованием сорбентов с размерами 5-6 микрон.

3. Выбраны условия концентрирования аналитов в суспензионных колонках в зависимости от скорости потока, интенсивности ультразвука, массы и степени дисперсности сорбента. Показано, что увеличение массы сорбента более 20 мг, дисперсности сорбента и скорости потока более 2 мл/мин в суспензионной колонке приводит к вымыванию сорбента, а в случае с полидисперсными сорбентами происходит их фракционирование по размеру с удерживанием ультразвуковым полем частиц размером 5-10 мкм. На основе экспериментальных и теоретических данных предложены оптимальные параметры работы суспензионной колонки для эффективного концентрирования веществ (масса сорбента (10-50 мг) с размером частиц не менее 5 мкм, объемная скорость потока в суспензионной колонке (1 мл/мин), интенсивность ультразвука (10 Вт/см²), частота ультразвука (2,65 МГц).

4. Показано, что суспензионные ультразвуковые колонки могут быть использованы для концентрирования в динамическом режиме ионов металлов из водных растворов и природных вод, а также редкоземельных металлов из вин с последующим спектрометрическим определением.

5. Установлена возможность использования колонок для выделения в динамическом режиме и последующего определения ДНК *M.tuberculosis* в сточных водах и почвах методом ПЦР-РВ. Сравнение со стандартными методами выделения ДНК (статический режим-«ручной», с применением поликапиллярных колонок) выявило, что использование суспензионных колонок позволяет сократить количество стадий выделения, увеличить объем анализируемого раствора до 200 мл, автоматизировать процесс выделения. Использование комбинированного действия ультразвукового и магнитного полей в суспензионных колонках при выделении ДНК позволяет увеличить массу магнитного сорбента, что повышает степень извлечения аналита по сравнению с существующими методами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Priego-Capote F., Luque De Castro M.D. Analytical uses of ultrasound I. Sample preparation // *TrAC - Trends Anal. Chem.* 2004. Vol. 23, № 9. P. 644–653.
2. Tekin T. Use of ultrasound in the dissolution kinetics of phosphate rock in HCl // *Hydrometallurgy.* 2002. Vol. 64, № 3. P. 187–192.
3. Чмиленко Ф.А., Бакланов А.Н. Ультразвук в аналитической химии. Теория и практика: Моногр. Днепропетровск: Вид-во Дніпропетр. ун-ту, 2001. 264 с.
4. Золотов Ю.А. Об использовании ультразвука в аналитической химии // *Журнал аналитической химии.* 1958. Т. 13, № 4. С. 408–416.
5. Чмиленко Ф.А. и др. Использование ультразвука в химическом анализе // *Журнал аналитической химии.* 1994. Т. 49, № 6. С. 550–556.
6. Santos H.M., Capelo J.L. Trends in ultrasonic-based equipment for analytical sample treatment // *Talanta.* 2007. Vol. 73, № 5. P. 795–802.
7. Priego Capote F., De Castro M.D.L. Ultrasound in analytical chemistry // *Anal. Bioanal. Chem.* 2007. Vol. 387, № 1. P. 249–257.
8. Seidi S., Yamini Y. Analytical sonochemistry; developments, applications, and hyphenations of ultrasound in sample preparation and analytical techniques // *Cent. Eur. J. Chem.* 2012. Vol. 10, № 4. P. 938–976.
9. Luque de Castro M.D., Priego-Capote F. Ultrasound assistance to liquid-liquid extraction: A debatable analytical tool // *Anal. Chim. Acta.* 2007. Vol. 583, № 1. P. 2–9.
10. Capote F.P., Luque de Castro M.D. *Analytical Applications of Ultrasound.* Elsevier Science, 2006. Vol. 26. 1–350 p.
11. Leonelli C., Mason T.J. Microwave and ultrasonic processing: Now a realistic option for industry // *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* Elsevier B.V., 2010. Vol. 49, № 9. P. 885–900.
12. Caballo-López A., Luque De Castro M.D. Continuous ultrasound-assisted

- extraction coupled to flow injection-pervaporation, derivatization, and spectrophotometric detection for the determination of ammonia in cigarettes // *Anal. Chem.* 2006. Vol. 78, № 7. P. 2297–2301.
13. Gu X. et al. Dynamic ultrasound-assisted extraction of polyphenols in tobacco // *J. Sep. Sci.* 2005. Vol. 28, № 18. P. 2477–2481.
 14. Luo X. et al. Phase separation technology based on ultrasonic standing waves: A review // *Ultrasonics Sonochemistry*. 2018. Vol. 48. P. 287–298.
 15. Mahzoon S., Haghghi M., Nowee S.M. Sonoprecipitation fabrication of enhanced electron transfer Cu(OH)₂/g-C₃N₄ nanophotocatalyst with promoted H₂-Production activity under visible light irradiation // *Renew. Energy*. Elsevier Ltd, 2020. Vol. 150. P. 91–100.
 16. Prasad R., Dalvi S. V. Sonocrystallization: Monitoring and controlling crystallization using ultrasound // *Chem. Eng. Sci.* Elsevier Ltd, 2020. Vol. 226.
 17. Kakumanu S., Schroeder A. Focused ultrasound - A novel tool for liposome formulation // *Drug Dev. Deliv.* 2012. Vol. 12, № 5. P. 47–52.
 18. Schroeder A., Kost J., Barenholz Y. Ultrasound, liposomes, and drug delivery: principles for using ultrasound to control the release of drugs from liposomes // *Chem. Phys. Lipids*. 2009. Vol. 162, № 1–2. P. 1–16.
 19. Fu X. et al. Sono-physical and sono-chemical effects of ultrasound: Primary applications in extraction and freezing operations and influence on food components // *Ultrason. Sonochem.* Elsevier B.V., 2020. Vol. 60.
 20. Luque de Castro M.D., Priego-Capote F., Peralbo-Molina A. The role of ultrasound in analytical derivatizations // *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* Elsevier B.V., 2011. Vol. 879, № 17–18. P. 1189–1195.
 21. Priego-Capote F., Luque De Castro M.D. Ultrasound-assisted continuous liquid-liquid extraction without phase separation and hydrolysis of paracetamol in suppositories // *Anal. Chim. Acta*. 2003. Vol. 489, № 2. P. 223–232.
 22. Torchilin V.P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2005. Vol. 4, № 2. P. 145–160.
 23. Nguyen T., McNamara K.P., Rosenzweig Z. Optochemical sensing by

- immobilizing fluorophore-encapsulating liposomes in sol-gel thin films // *Analytica Chimica Acta*. Elsevier, 1999. Vol. 400, № 1–3. P. 45–54.
24. Голямина И. П. Ультразвук. Маленькая энциклопедия. Москва: Советская энциклопедия, 1979. 400 p.
 25. Bathen D. Physical waves in adsorption technology—an overview // *Sep. Purif. Technol.* 2003. Vol. 33, № 2. P. 163–177.
 26. Breitbach M. et al. Stability of adsorber resins under mechanical compression and ultrasonication // *Polym. Adv. Technol.* 2002. Vol. 13, № 5. P. 391–400.
 27. Breitbach M., Bathen D. Influence of ultrasound on adsorption processes // *Ultrason. Sonochem.* 2001. Vol. 8, № 3. P. 277–283.
 28. Моросанова Е.И. и др. Микрофлюидная система для сорбционного концентрирования и разделения // *Научное приборостроение*. 2005. Т. 15, № 2. С. 21–26.
 29. Моросанова Е.И. Нековалентно иммобилизованные на кремнеземах аналитические реагенты для концентрирования, разделения и определения неорганических и органических соединений: диссертация ... доктора химических наук : 02.00.02 - . 2001. 462 p.
 30. Золотов Ю.А. и др. Сорбционное концентрирование микрокомпонентов из растворов: применение в неорганическом анализе. Москва: Наука, 2007. 320 с.
 31. Моросанова Е.И., Азарова Ж.М., Золотов Ю.А. Индикаторные трубки для экспрессного определения железа в водах // *Заводская лаборатория. Диагностика материалов*. 2003. Т. 69, № 7. С. 3–6.
 32. Breitbach M., Bathen D., Schmidt-Traub H. Desorption of a fixed-bed adsorber by ultrasound // *Ultrasonics*. 2002. Vol. 40, № 1–8. P. 679–682.
 33. Breitbach M., Bathen D., Schmidt-Traub H. Effect of Ultrasound on Adsorption and Desorption Processes // *Ind. Eng. Chem. Res.* 2003. Vol. 42, № 22. P. 5635–5646.
 34. Князьков Н.Н., Курочкин В.Е. Постановка иммунных реакций с использованием суспензий иммуносорбентов // *Бюллетень*

экспериментальной биологии и медицины. 1996. № 5. С. 568–570.

35. Yao L. et al. Ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction using a magnetic ionic liquid coupled with micro-solid phase extraction for the determination of cadmium and lead in edible vegetable oils // *Food Chem.* 2018. Vol. 256. P. 212–218.
36. Liang P., Wang F., Wan Q. Ionic liquid-based ultrasound-assisted emulsification microextraction coupled with high performance liquid chromatography for the determination of four fungicides in environmental water samples // *Talanta.* Elsevier B.V., 2013. Vol. 105. P. 57–62.
37. Picó Y. Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples // *TrAC - Trends Anal. Chem.* Elsevier B.V., 2013. Vol. 43. P. 84–99.
38. Albero B. et al. Ultrasound-assisted extraction of emerging contaminants from environmental samples // *TrAC - Trends Anal. Chem.* Elsevier B.V., 2015. Vol. 71. P. 110–118.
39. Albero B., Tadeo J.L., Pérez R.A. Ultrasound-assisted extraction of organic contaminants // *TrAC - Trends in Analytical Chemistry.* Elsevier B.V., 2019. Vol. 118. P. 739–750.
40. Tarigh G.D., Bakhtiari M., Shemirani F. Green chemicals-assisted dispersive magnetic solid-phase extraction: a prospect for speciation of Cr (III)/Cr (VI) in environmental water samples // *Int. J. Environ. Anal. Chem.* Taylor & Francis, 2020. Vol. 00, № 00. P. 1–17.
41. Parrilla Vázquez M.M. et al. Ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction coupled with liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry for simultaneous analysis of pharmaceuticals in wastewaters // *J. Chromatogr. A.* 2013. Vol. 1291. P. 19–26.
42. Arghavani-Beydokhti S., Rajabi M., Asghari A. Coupling of two centrifugeless ultrasound-assisted dispersive solid/liquid phase microextractions as a highly selective, clean, and efficient method for determination of ultra-trace amounts of non-steroidal anti-inflammatory drugs in complicated matrices // *Anal. Chim. Acta.* Elsevier B.V., 2018. Vol. 997. P. 67–79.

43. Yan H., Wang H. Recent development and applications of dispersive liquid-liquid microextraction // *Journal of Chromatography A*. 2013. Vol. 1295. P. 1–15.
44. Albero B. et al. Rapid determination of emerging contaminants in water and herbal infusions by in situ derivatization and gas chromatography-tandem mass spectrometry // *Anal. Methods. Royal Society of Chemistry*, 2015. Vol. 7, № 7. P. 3006–3014.
45. Cinelli G. et al. Ultrasound-vortex-assisted dispersive liquid-liquid microextraction coupled with gas chromatography with a nitrogen-phosphorus detector for simultaneous and rapid determination of organophosphorus pesticides and triazines in wine // *Anal. Methods*. 2014. Vol. 6, № 3. P. 782–790.
46. Montevecchi G. et al. Determination of phthalate esters in distillates by ultrasound-vortex-assisted dispersive liquid-liquid micro-extraction (USVADLLME) coupled with gas chromatography/mass spectrometry // *Food Chem. Elsevier Ltd*, 2017. Vol. 221. P. 1354–1360.
47. Avino P. et al. New protocol based on high-volume sampling followed by DLLME-GC-IT/MS for determining PAHs at ultra-trace levels in surface water samples // *Microchem. J. Elsevier Inc.*, 2017. Vol. 133. P. 251–257.
48. Vichapong J., Burakham R. Development and validation of an ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction method for liquid chromatographic determination of carbamate residues in fruit juices // *Acta Chromatogr. Akademiai Kiado Rt.*, 2015. Vol. 27, № 1. P. 127–145.
49. Xie J. et al. Simultaneous analysis of organophosphorus pesticides in water by magnetic solid-phase extraction coupled with GC-MS // *Chromatographia*. Springer, 2013. Vol. 76, № 9–10. P. 535–540.
50. Razmi H., Jabbari M. Development of graphene-carbon nanotube-coated magnetic nanocomposite as an efficient sorbent for HPLC determination of organophosphorus pesticides in environmental water samples // *Int. J. Environ. Anal. Chem. Taylor and Francis Ltd.*, 2015. Vol. 95, № 14. P. 1353–1369.

51. Soon Y.X., Tay K.S. n-Octylated Magnetic Nanoparticle-Based Microextraction for the Determination of Organophosphorus Pesticides in Water // *Anal. Lett.* Taylor and Francis Inc., 2015. Vol. 48, № 10. P. 1604–1618.
52. Abbasabadi M.K., Shirkhanloo H. Speciation of cadmium in human blood samples based on Fe₃O₄-supported naphthalene-1-thiol- functionalized graphene oxide nanocomposite by ultrasound-assisted dispersive magnetic micro solid phase extraction // *J. Pharm. Biomed. Anal.* Elsevier B.V., 2020. Vol. 189. P. 113455.
53. Tay K.S., Rahman N.A., Radzi Bin Abas M. Magnetic nanoparticle assisted dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of 4-n-nonylphenol in water // *Anal. Methods.* Royal Society of Chemistry, 2013. Vol. 5, № 12. P. 2933–2938.
54. Wang N. et al. Magnetic retrieval of an extractant: Fast ultrasound-assisted emulsification liquid-liquid microextraction for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples // *Anal. Methods.* 2013. Vol. 5, № 16. P. 3999–4004.
55. Akbarzade S. et al. Zero valent Fe-reduced graphene oxide quantum dots as a novel magnetic dispersive solid phase microextraction sorbent for extraction of organophosphorus pesticides in real water and fruit juice samples prior to analysis by gas chromatography-mass spectrometry // *Anal. Bioanal. Chem.* Springer Verlag, 2018. Vol. 410, № 2. P. 429–439.
56. Spivakov B.Y. et al. Suspension column for recovery and separation of substances using ultrasound-assisted retention of bead sorbents // *Talanta.* Elsevier B.V., 2012. Vol. 102. P. 88–92.
57. Князьков Н.Н. и др. Методологические основы применения ультразвукового поля стоячей волны для проточного фракционирования частиц различной природы. 2006. Т. 16, № 11. С. 23–34.
58. Шарфарец Б.П., Князьков Н.Н., Курочкин В.Е. Радиационное давление на сферу с потерями в квазистоячей плоской волне // *Акустический журнал.*

2012. Т. 58, № 2. С. 179–183.
59. Князьков Н.Н., Курочкин В.Е., Шарфарец Б.П. Радиационное давление на сферу в смешанном поле бегущей и стоячей плоских волн // Доклады академии наук. 2009. Т. 424, № 6. С. 751–754.
 60. Физическая энциклопедия / под Ред. Прохорова А.М. 1998.
 61. Mizuike A. Enrichment techniques for inorganic trace analysis // Enrichment techniques for inorganic trace analysis. Berlin: Springer-verlag, 1983. 1–144 p.
 62. Руденко Б.А., Руденко Г.И. Высокоэффективные хроматографические процессы / Изд. Наука. М., 2003. 287 с.
 63. Kowalkowski T. et al. Field-flow fractionation: Theory, techniques, applications and the challenges // Crit. Rev. Anal. Chem. Taylor & Francis Group, 2006. Vol. 36, № 2. P. 129–135.
 64. Voute N., Boschetti E. Highly dense beaded sorbents suitable for fluidized bed applications // Bioseparation. Kluwer Academic Publishers, 1999. Vol. 8, № 1–5. P. 115–120.
 65. Oliferova L.A. et al. On-Line coupling of sorption preconcentration to Liquid-Chromatographic methods of analysis // Journal of Analytical Chemistry. 2006. Vol. 61, № 5. P. 416–441.
 66. Mudd G., Jowitt S., Werner T. Global platinum group element resources, reserves and mining - A critical assessment // Sci. Total Environ. Sci Total Environ, 2018. Vol. 622–623. P. 614–625.
 67. Rao C.R.M., Reddi G.S. Platinum group metals (PGM); occurrence, use and recent trends in their determination // TrAC- Trends Anal. Chem. 2000. Vol. 19, № 9. P. 565–586.
 68. Komendova R. Recent advances in the preconcentration and determination of platinum group metals in environmental and biological samples // TrAC Trends Anal. Chem. Elsevier, 2020. Vol. 122. P. 115708.
 69. Grebneva-Balyuk O.N., Kubrakova I. V. Determination of Platinum Group Elements in Geological Samples by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Possibilities and Limitations // J. Anal. Chem. 2020 753.

- Springer, 2020. Vol. 75, № 3. P. 275–285.
70. Myasoedova G. V, Mokhodoeva O.B., Kubrakova I. V. Trends in sorption preconcentration combined with noble metal determination. // *Anal. Sci.* 2007. Vol. 23, № 9. P. 1031–1039.
 71. Mokhodoeva O.B. et al. New solid extractants for preconcentrating noble metals // *J. Anal. Chem.* 2010 651. Springer, 2010. Vol. 65, № 1. P. 12–16.
 72. Myasoedova G. V. et al. Application of Ionic Liquids for Solid-Phase Extraction of Trace Elements // *Anal. Sci. The Japan Society for Analytical Chemistry*, 2008. Vol. 24, № 10. P. 1351–1353.
 73. Mokhodoeva O.B. et al. Magnetic Nanoparticles Modified by Ionic Liquids in Environmental Analysis // *J. Anal. Chem.* 2021 766. Springer, 2021. Vol. 76, № 6. P. 675–684.
 74. Mokhodoeva O. et al. Recovery of platinum group metals using magnetic nanoparticles modified with ionic liquids // *Sep. Purif. Technol.* Elsevier, 2020. Vol. 248, № November 2019. P. 117049.
 75. Rzelewska-Piekut M., Regel-Rosocka M. Separation of Pt(IV), Pd(II), Ru(III) and Rh(III) from model chloride solutions by liquid-liquid extraction with phosphonium ionic liquids // *Sep. Purif. Technol.* Elsevier, 2019. Vol. 212. P. 791–801.
 76. Papaiconomou N. et al. Possibilities and limitations in separating Pt(IV) from Pd(II) combining imidazolium and phosphonium ionic liquids // *Dalton Trans.* Dalton Trans, 2015. Vol. 44, № 46. P. 20131–20138.
 77. Aceto M. et al. Determination of metals in wine with atomic spectroscopy (flame-AAS, GF-AAS and ICP-AES); a review // *Food Addit. Contam. Food Addit Contam*, 2002. Vol. 19, № 2. P. 126–133.
 78. Pérez-Álvarez E.P. et al. Classification of wines according to several factors by ICP-MS multi-element analysis // *Food Chem.* Elsevier, 2019. Vol. 270. P. 273–280.
 79. Pohl P. What do metals tell us about wine? // *TrAC Trends Anal. Chem.* Elsevier, 2007. Vol. 26, № 9. P. 941–949.

80. Tariba B. Metals in Wine—Impact on Wine Quality and Health Outcomes // *Biol. Trace Elem. Res.* 2011 1441. Springer, 2011. Vol. 144, № 1. P. 143–156.
81. González A. et al. Elemental fingerprint of wines from the protected designation of origin Valencia // *Food Chem.* Elsevier, 2009. Vol. 112, № 1. P. 26–34.
82. Gómez M.E. et al. Lipid composition of lees from Sherry wine // *J. Agric. Food Chem.* American Chemical Society, 2004. Vol. 52, № 15. P. 4791–4794.
83. Almeida C.M.R. et al. ICP-MS multi-element analysis of wine samples - A comparative study of the methodologies used in two laboratories // *Anal. Bioanal. Chem.* Springer, 2002. Vol. 374, № 2. P. 314–322.
84. Fabani M.P. et al. Evaluation of elemental profile coupled to chemometrics to assess the geographical origin of Argentinean wines // *Food Chem.* Elsevier Ltd, 2010. Vol. 119, № 1. P. 372–379.
85. Paneque P. et al. Metal content in southern Spain wines and their classification according to origin and ageing // *Microchem. J.* Elsevier, 2010. Vol. 94, № 2. P. 175–179.
86. Aceto M. et al. A traceability study on the Moscato wine chain // *Food Chem.* Elsevier, 2013. Vol. 138, № 2–3. P. 1914–1922.
87. Bronzi B. et al. Geographical identification of Chianti red wine based on ICP-MS element composition // *Food Chem.* Elsevier Ltd, 2020. Vol. 315.
88. Baxter M.J. et al. The determination of the authenticity of wine from its trace element composition // *Food Chem.* Elsevier, 1997. Vol. 60, № 3. P. 443–450.
89. Jakubowski N. et al. Analysis of wines by ICP-MS: Is the pattern of the rare earth elements a reliable fingerprint for the provenance? // *Fresenius. J. Anal. Chem.* 1999. Vol. 364, № 5. P. 424–428.
90. Augagneur S. et al. Determination of rare earth elements in wine by inductively coupled plasma mass spectrometry using a microconcentric nebulizer // *J. Anal. At. Spectrom.* The Royal Society of Chemistry, 1996. Vol. 11, № 9. P. 713–721.
91. Sjöqvist A.S.L. et al. Modification of a rare-earth element deposit by low-

- temperature partial melting during metamorphic overprinting: Norra Kärr alkaline complex, southern Sweden // *Chem. Geol.* Elsevier, 2020. Vol. 545. P. 119640.
92. Bentlin F.R.S. et al. Lanthanides determination in red wine using ultrasound assisted extraction, flow injection, aerosol desolvation and ICP-MS // *Anal. Chim. Acta.* Anal Chim Acta, 2012. Vol. 710. P. 33–39.
93. Aceto M. et al. Wine Traceability with Rare Earth Elements // *Beverages* 2018, Vol. 4, Page 23. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2018. Vol. 4, № 1. P. 23.
94. Catarino S. et al. Effect of Bentonite Characteristics on the Elemental Composition of Wine // *J. Agric. Food Chem.* American Chemical Society , 2007. Vol. 56, № 1. P. 158–165.
95. Cerutti C. et al. Determination of trace elements in undiluted wine samples using an automatized total sample consumption system coupled to ICP-MS // *J. Anal. At. Spectrom.* The Royal Society of Chemistry, 2019. Vol. 34, № 4. P. 674–682.
96. Grindlay G. et al. Atomic spectrometry methods for wine analysis: A critical evaluation and discussion of recent applications // *Anal. Chim. Acta.* Elsevier, 2011. Vol. 691, № 1–2. P. 18–32.
97. Bica A., Sánchez R., Todolí J.L. Evolution of the Multielemental Content along the Red Wine Production Process from Tempranillo and Grenache Grape Varieties // *Mol.* 2020, Vol. 25, Page 2961. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2020. Vol. 25, № 13. P. 2961.
98. Boom A.W., Browner R.F. Effects of Organic Solvents in Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry // *Anal. Chem.* American Chemical Society, 1982. Vol. 54, № 8. P. 1402–1410.
99. Gonzalez A., Armenta S., de la Guardia M. Trace-element composition and stable-isotope ratio for discrimination of foods with Protected Designation of Origin // *TrAC Trends Anal. Chem.* Elsevier, 2009. Vol. 28, № 11. P. 1295–1311.

100. Перекотий В.В. и др. Особенности подготовки вин для целей мультиэлементного анализа методом ИСП-АЭС // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. 2012. Т. 329–330, № 5–6. С. 101–105.
101. Дженлода Р.Х. и др. Суспензионные колонки с удерживаемыми в ультразвуковом поле зернистыми сорбентами для выделения и определения редкоземельных элементов в винах // Журнал аналитической химии. 2015. Т. 70, № 12. С. 1264–1270.
102. Тихомирова Т.И. и др. Концентрирование некоторых переходных металлов на кремнеземе с привитыми группами иминодиуксусной кислоты // Журнал аналитической химии. 1993. Т. 48, № 1. С. 73–77.
103. Тихомирова Т.И., Шепелева Е.Н., Фадеева В.И. Сорбционно-атомно-абсорбционное определение токсичных металлов в молокопродуктах // Журнал аналитической химии. 1999. Т. 54, № 4. С. 441–444.
104. Spivakov B.Y. et al. Suspension column for recovery and separation of substances using ultrasound-assisted retention of bead sorbents // Talanta. Elsevier, 2012. Vol. 102. P. 88–92.
105. Li L. et al. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens // Frontiers in Microbiology. Frontiers Research Foundation, 2014. Vol. 5, № JUN. P. 1–1.
106. Figueras M.J., Borrego J.J. New Perspectives in Monitoring Drinking Water Microbial Quality // Int. J. Environ. Res. Public Health. Molecular Diversity Preservation International, 2010. Vol. 7, № 12. P. 4179–4202.
107. Smith C.J., Osborn A.M. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology // FEMS Microbiology Ecology. 2009. Vol. 67, № 1. P. 6–20.
108. Zhou J., Bruns M.A., Tiedje J.M. DNA Recovery from Soils of Diverse Composition // APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. 1996. Vol. 62, № 2. 316–322 p.
109. Robe P. et al. Extraction of DNA from soil // Eur. J. Soil Biol. Elsevier Masson

- SAS, 2003. Vol. 39, № 4. P. 183–190.
110. Balestrazzi A. et al. DNA extraction from soil: Comparison of different methods using spore-forming bacteria and the swrAA gene as indicators // *Ann. Microbiol. BioMed Central*, 2009. Vol. 59, № 4. P. 827–832.
 111. Dzhenloda R.K. et al. Suspension columns with grain sorbents retained in an ultrasonic field for separation and determination of rare-earth elements in wines // *J. Anal. Chem.* 2015. Vol. 70, № 12. P. 1456–1462.
 112. Entezari M.H., Bastami T.R. Influence of ultrasound on cadmium ion removal by sorption process // *Ultrason. Sonochem.* 2008. Vol. 15, № 4. P. 428–432.
 113. Dai X. et al. Quantitative and qualitative validations of a sonication-based DNA extraction approach for PCR-based molecular biological analyses. // *Anal. Biochem.* Elsevier Ltd, 2016. № January.
 114. Xie X. et al. Sunlight-Activated Propidium Monoazide Pretreatment for Differentiation of Viable and Dead Bacteria by Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction // *Environ. Sci. Technol. Lett.* American Chemical Society, 2016. Vol. 3, № 2. P. 57–61.
 115. Heid C.A. et al. Real time quantitative PCR // *Genome Res.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996. Vol. 6, № 10. P. 986–994.
 116. Kim J., Lim J., Lee C. Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: Applications and considerations // *Biotechnology Advances.* 2013. Vol. 31, № 8. P. 1358–1373.
 117. Di Carlo D. et al. On-chip cell lysis by local hydroxide generation // *Lab Chip.* Royal Society of Chemistry, 2005. Vol. 5, № 2. P. 171–178.
 118. Lee H.J. et al. Electrochemical cell lysis device for DNA extraction // *Lab Chip.* Royal Society of Chemistry, 2010. Vol. 10, № 5. P. 626–633.
 119. Bradford S.A. et al. Transport and Fate of Microbial Pathogens in Agricultural Settings // *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* Informa UK Limited, 2013. Vol. 43, № 8. P. 775–893.
 120. Santamaría J., Toranzos G.A. Enteric pathogens and soil: A short review // *International Microbiology.* Springer-Verlag GmbH Co. KG, 2003. Vol. 6, №

1. P. 5–9.
121. Wong K., Harrigan T., Xagorarakis I. Leaching and ponding of viral contaminants following land application of biosolids on sandy-loam soil // *J. Environ. Manage.* 2012. Vol. 112. P. 79–86.
 122. Rzezutka A., Cook N. Survival of human enteric viruses in the environment and food // *FEMS Microbiology Reviews.* 2004. Vol. 28, № 4. P. 441–453.
 123. Rodríguez-Lázaro D. et al. Virus hazards from food, water and other contaminated environments // *FEMS Microbiology Reviews.* 2012. Vol. 36, № 4. P. 786–814.
 124. Ahmed S.M. et al. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: A systematic review and meta-analysis // *Lancet Infect. Dis.* Lancet Publishing Group, 2014. Vol. 14, № 8. P. 725–730.
 125. Painter J.A. et al. Attribution of foodborne illnesses, hospitalizations, and deaths to food commodities by using outbreak data, United States, 1998-2008 // *Emerg. Infect. Dis.* 2013. Vol. 19, № 3. P. 407–415.
 126. Rajendhran J., Gunasekaran P. Strategies for accessing soil metagenome for desired applications // *Biotechnology Advances.* 2008. Vol. 26, № 6. P. 576–590.
 127. Dong D. et al. Removal of humic substances from soil DNA using aluminium sulfate // *J. Microbiol. Methods.* 2006. Vol. 66, № 2. P. 217–222.