

# ЭКОЛОГИЯ

## НОВЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ В ОБЛАСТИ СПЕКТРОСКОПИИ ЯМР В РУДН

**В.В. Подгорский, Б.Р. Садыков, А.В. Чертков,  
Л.А. Боронина, Н.Г. Баканова, Л.И. Куркиева,  
Г.А. Калабин**

Экологический факультет  
Российский университет дружбы народов  
*Подольское шоссе, 8/5, Москва, Россия, 113093*

В статье представлены некоторые новые направления проводимых в РУДН исследований по количественной спектроскопии ЯМР сложных водно-органических объектов: метаболический анализ биофлюидов человека, сертификация гуминовых препаратов и предсказание их физиологической активности, идентификация состава и подлинности парфюмерно-косметической продукции.

**Ключевые слова:** безопасность жизнедеятельности, контроль качества, ядерный магнитный резонанс, гуматы, парфюмерно-косметическая продукция, биофлюиды.

Созданный в 2009 г. Центр коллективного пользования со статусом научно-образовательного центра (РУДН ЦКП (НОЦ)) располагает уникальным оборудованием для анализа органических веществ, в частности, двумя современными мультядерными спектрометрами ЯМР высокого разрешения со сверхпроводящими магнитами JNM-ECA 600 и JNM-ECX 400 (JEOL, Япония). Впервые в России приборы укомплектованы автоматом для смены образцов диаметром до 10 мм, имеют программно-технические возможности автоматической оптимизации условий эксперимента и выбора его алгоритма на основе гибкого меню.

Приоритетным направлением эффективного использования метода ЯМР в РУДН является количественная спектроскопия ЯМР высокого разрешения сложных органических систем природного происхождения, среди них биофлюиды человека и животных, фармпрепараты (медицина, ветеринария), сельскохозяйственное сырье и продукция (агронауки), природное органическое сырье, т.е. нефть, уголь, лигнины, торф, почвы, водно-органические системы (химия, экология, технические науки), не менее важные области — криминалистика, сертификация пищевой и парфюмерно-косметической продукции, объектов бытовой химии и т.д.

Главное преимущество спектроскопии ЯМР перед другими универсальными методами изучения органических веществ (хроматография, масс-спектрометрия, оптическая спектроскопия) возможность получения строгой количественной информации без использования специфических стандартов и эталонов на ядрах большинства элементов, в первую очередь органогенных (H, C, N, O, P, S) [1]. Сведения о сложных органических системах в любой матрице (почва, вода, растворы, газы и т.п.) могут быть получены в виде дескрипторов состава и строения любого уровня: изотопного, элементного, фрагментного, компонентного. Используется информация по положению, интенсивности и мультиплетности сигналов в спектре (компонентный анализ), интегральным интенсивностям специфических областей спектра (фрагментный или структурно-групповой анализ), наконец, образ или профиль всего спектра в цифровом виде. Цели использования этих подходов весьма разнообразны: идентификация состава и строения объекта, степени соответствия некоему эталонному образцу, предсказание практических свойств объекта, его сырьевой, географической и технологической предыстории, диагностика патологий, метаболизма фармпрепаратов в организме человека.

Располагая значительным практическим опытом исследования нефтей и нефтепродуктов [2; 3], углей [4], коксов [5], лигнинов [6], гуминовых веществ [7; 8], пищевой продукции и напитков [9; 10], в настоящем сообщении мы представляем примеры некоторых новых направлений наших исследований многокомпонентных систем.

**Биофлюиды.** Ядерный магнитный резонанс является хорошим методом для анализа сложных смесей и, даже не смотря на его не слишком высокую чувствительность, имеет ряд важных преимуществ перед другими методами: не разрушает образец, не требует сложной пробоподготовки, позволяет проводить анализ сравнительно быстро и получать значительное количество информации сразу обо всех компонентах смеси.

Эти факторы делают применение ЯМР очень выгодным, в частности, при исследовании биологических объектов, прежде всего биологических жидкостей. Из спектров ЯМР легко определить соотношение компонентов биофлюидов, используется ЯМР и для лабораторного изучения химического состава биожидкостей, отдельным направлением таких исследований с целью последующей рутинной медицинской диагностики по статистически значимым изменениям в спектрах, является метабономика.

Существуют сотни работ по метабономике мочи, крови, лимфы, цереброспинального флюида, состава мочи новорожденных, липидной части мочи и крови (liposcience). По амниотической жидкости (АЖ) работ не так много, хотя ее исследование представляет для медиков большой фундаментально научный и практический интерес.

Это коллоидный раствор, в котором имеются мукопротеиды с высоким содержанием углеводов, большое количество липидов и белков. В довольно высоких концентрациях представлены различные биологически активные вещества — адреналин, норадреналин, тироксин и эстрадиол. Амниотическая жидкость богата гистамином, содержит профибринолизин и тромбокиназоподобные вещества, продукты белкового и жирового метаболизма, биологически активные вещества, в том

числе цитокины и эйкосаноиды, а также различные механические примеси — чешуйки эпидермиса, лануго, сыровидную смазку.

В стандартной медицинской практике в АЖ определяют уровень альфа-фетопротеина, общий белок, общий билирубин, отношение лецитин/сфингомиелин, при амниоцентезе производят также цитогенетический анализ, который занимает от одной до трех недель, поскольку для его необходимо увеличение количества клеток, полученных при амниоцентезе, до приемлимого для анализов.

Метод ядерного магнитного резонанса АЖ, например, полученной при амниоцентезе, помимо быстрого измерения ряда биохимических показателей, может позволить при анализе спектров статистическими методами диагностировать многие возможные отклонения в развитии плода без длительного цитогенетического анализа, информация о соотношении уровней различных соединений в амниотической жидкости может давать и другую полезную медикам информацию.

Однако анализ АЖ методом ЯМР сопряжен с несколькими проблемами, так как она может содержать в себе механические примеси, которые затрудняют настройку разрешения, ухудшая однородность магнитного поля; содержит большое количество воды, сигнал которой перекрывает большую часть полезных сигналов в спектре. Существует несколько подходов, позволяющих сделать данную задачу выполнимой:

- экстракция интересной для изучения части образца;
- удаление из образца механических и белковых примесей центрифугированием на высоких скоростях и воды лиофилизацией;
- редактирование спектра различными ЯМР-методами.

Нами избран подход минимальной обработки исходного образца и подавления сигнала растворителя методами ЯМР.

Для подавления сигналов растворителя в ЯМР применяют несколько типов методик, которые представляют собой модификации трех подходов:

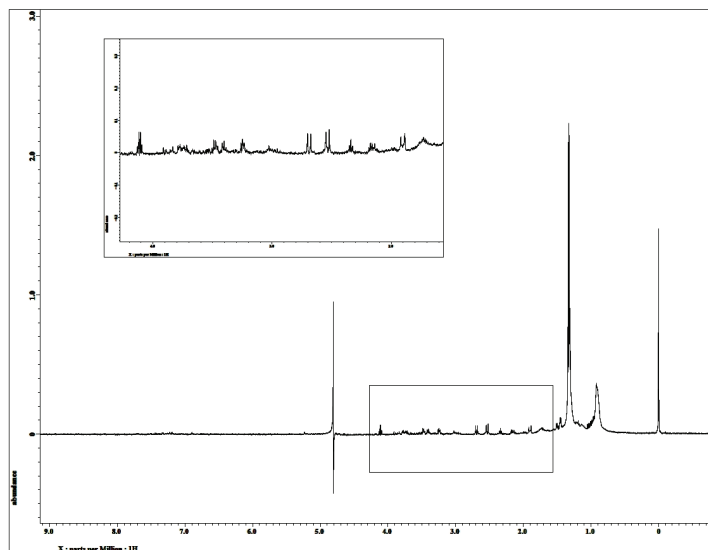
- методы насыщения сигнала воды;
- методы, дающие нулевое возбуждение сигнала воды;
- методы, нарушающие резонансные условия протонов воды.

Как наиболее эффективная выбрана методика WATERGATE с биномиальной последовательностью W5.

Методы подавления сигналов макромолекул в нашем случае были признаны неэффективными, поэтому коррекция базовой линии производилась математическими методами. Кроме того, крайние точки окна предсказывались методом обратного линейного предсказания для компенсации фазовой ошибки при быстром Фурье-преобразовании.

Спектры выравнивались по остаточному сигналу воды и нормировались. Была получена серия спектров с целью анализа изменений образца при хранении в условиях лаборатории ( $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Их анализ показал, что в условиях лаборатории образцы хранятся не более 4 часов, т.е. время от отбора АЖ до получения спектра должно быть максимально коротким.

Во всех образцах сигнал воды имеет один и тот же химический сдвиг, рН приведен к одному значению с помощью фосфатного буфера.



**Рис. 1.** ЯМР  $^1\text{H}$  (600 МГц, WATERGATE W5) спектр амниотической жидкости

Полученные результаты позволяют утверждать, что по крайней мере для тех задач, для которых достаточен статистический анализ спектров ЯМР околоплодной жидкости, такие спектры можно получать без какой-либо специальной пробоподготовки, хотя удаление механических примесей простым центрифугированием образца остается все же желательным для получения более высокого разрешения в спектрах.

**Лигногуматы.** Важность гуминовых веществ (ГВ) как рост-симулирующих, детоксицирующих препаратов общеизвестна, хотя методология их сертификации и контроля качества количественными методами отсутствует. В отличие от методов масс-спектрологии, оптической спектроскопии и хроматографии спектроскопия ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  позволяет на строго количественной основе получать информацию о распределении атомов водорода и углерода по всем функциональным группам и фрагментам ГВ для целей идентификации их сырьевого происхождения и, что более важно, предсказания на этой основе методами многопараметрических корреляций вида «строение—свойства» их физиологической активности.

В качестве примера на рис. 2 представлен количественный спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$  лигногумата ОАО «РЭТ» и соотношение в нем различных фрагментов (%), сделанное по методике [11—13]. Таблица (табл. 1) этих характеристик, обработанная по найденной экспериментальной зависимости прорастания семян пшеницы от строения стимулятора роста позволяет оценивать относительную эффективность конкурирующих препаратов из спектров ЯМР  $^{13}\text{C}$  без проведения трудоемких лабораторных и тем более полевых испытаний. В частности, для представленной серии наиболее предпочтительными являются препараты № 4 и № 6, произведенные из лигнина и окисленного бурого угля.

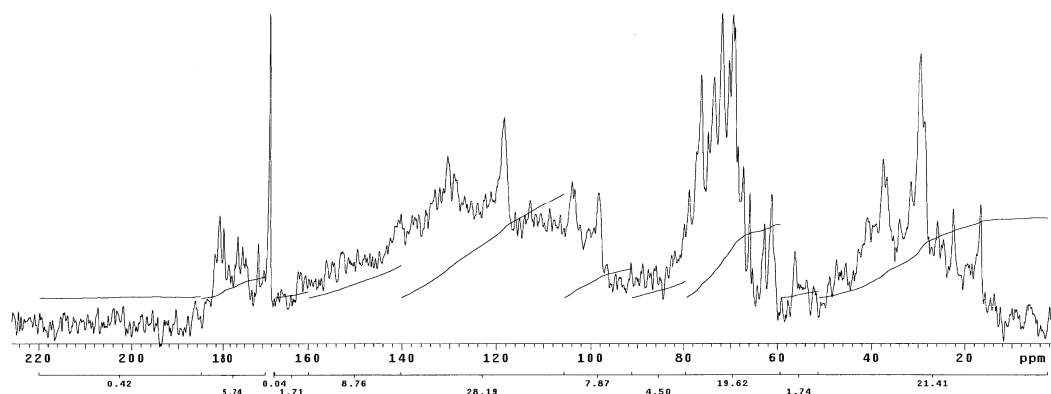


Рис. 2. Количественный спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$  (600 МГц) лигногумата ОАО «РЭТ»

Таблица 1

**Фрагментами состав ГВ (№) и их относительная ФА**  
**(всхожесть семян пшеницы при замачивании в водном растворе 0,05%)**  
**относительно контроля (замачивание в дистилляте)**

Наименование препарата	C=O	COO	CarO	CarC,H	СалкО	Салк	Спмц, (СПИН/ г × 10 <sup>16</sup> )	ФА теор.
ГК Химреактив	0,4	6,6	7,4	38,3	25,8	21,4	33,55	0,65
ГК Плодородие	1,8	12,0	9,0	51,4	3,8	21,7	12,16	0,86
Оксигумат	3,7	6,3	9,9	54,6	13,2	12,3	12,56	0,82
Лигногумат	01,0 4,09	6,3	21,5	38,4	21,9	8,4	39,47	1,66
Гумистар	1,2	8,3	5,6	32,9	17,3	33,9	9,5	0,55
Гумат-80 Урожай	2,4	8,5	11,8	51,6	2,0	23,9	29,41	1,00
Row-Humus	1,4	8,9	8,4	49,6	4,2	27,4	23,04	0,76
Энергум	0,8	9,2	8,8	50,2	10,8	20,1	29,4	0,80
Гель (Торф)	1,1	9,7	5,5	31,9	21,3	30,5	28	0,57
ИHSS St	4,1	9,9	10,0	48,5	5,7	21,9	28	0,89
Энерген	2,0	10,0	8,8	55,7	1,7	18,4	Нет данных	0,81
Агрокор	10	11	2	11	12	54	Нет данных	0,34
Теравита	3,0	7,7	7,7	60,7	2,4	18,1	Нет данных	0,69
Энерген-2	3,1	8,7	9,0	43,2	14,4	21,2	Нет данных	0,80
Орггум	13,8	7,7	10,8	29,0	13,8	21,5	9,5	0,91

**Продукты молекулярного дизайна.** Лицензированные парфюмерно-косметические средства обычно проходят контроль качества только в стране выпуска и до попадания продукции в продажу. Эффективная схема защиты потребителя в этом случае — сличительный контроль продукта со стандартом или образцом, уже зарекомендовавшим себя удовлетворительно. Большинство стандартизованных методов химического анализа требует значительного времени и трудозатрат, обеспечивают контроль качества сырья и продукции на этапе производства и первичной реализации, но не контроль готовой продукции непосредственно у конечного потребителя.

Сличительный эксперимент с помощью спектроскопии ЯМР  $^1\text{H}$  с Фурье-преобразованием занимает несколько минут, требует минимальной пробоподготовки.

Исследована серия образцов одноименного парфюмерного средства (Amor Amor, Chacharel) от фирмы-производителя и от ряда дистрибьюторов, т.е. образцов, купленных в торговых организациях Москвы разного уровня достоверности.

Образцы были охлаждены в холодильнике до  $3\text{ }^\circ\text{C}$ , вскрыты и перенесены в ампулы для ЯМР-экспериментов диаметром 5 мм, для них осуществлена регистрация спектров ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  в идентичных условиях в трех повторениях. Дополнительная серия экспериментов с одним образцом осуществлена с целью изучения его поведения при длительном хранении (до 14 дней).

Оригинальный образец духов содержит, помимо воды и этанола, сложную эфирную смесь и следовые количества гетероциклических соединений (рис. 3, 4). Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  указывает на наличие протонного обмена.

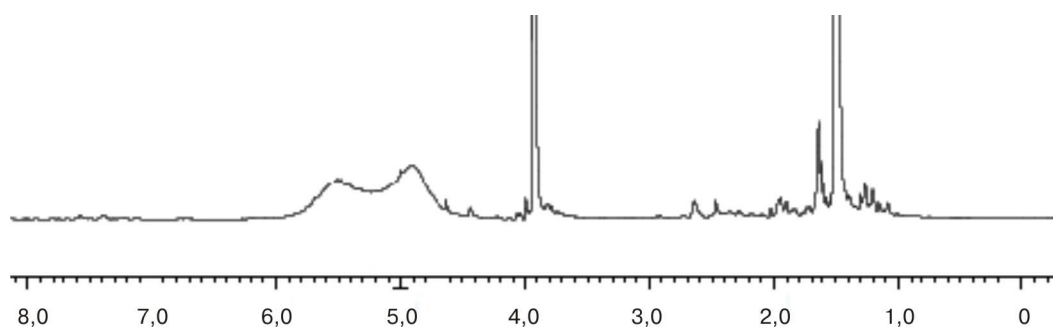


Рис. 3. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (600 МГц) оригинальных духов

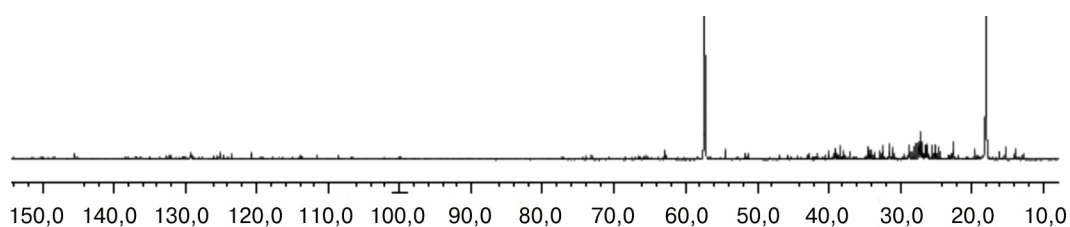
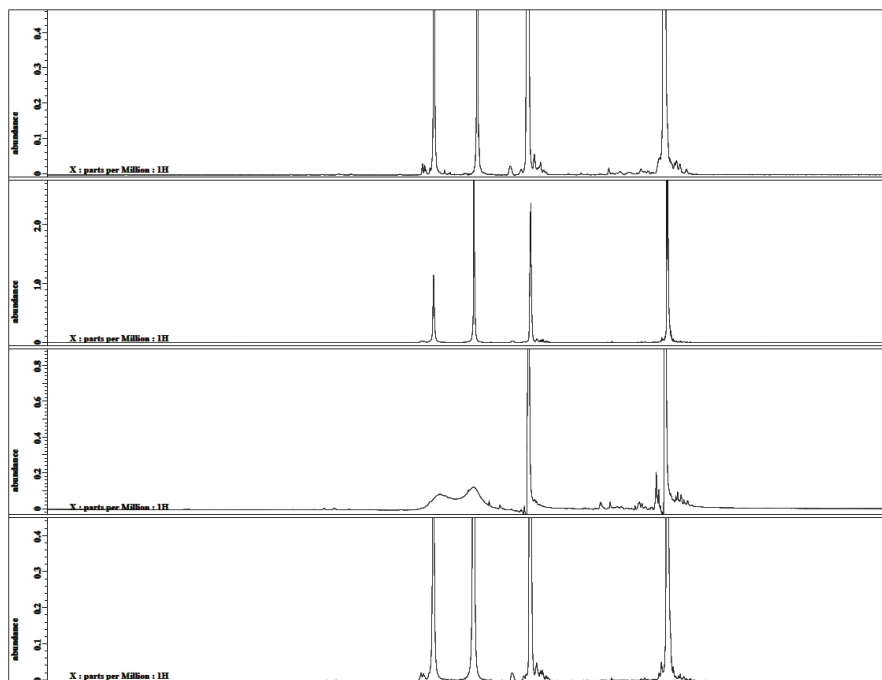


Рис. 4. Фрагмент (10—150 м.д.) спектра ЯМР  $^{13}\text{C}$  (600 МГц) оригинальных духов

Часть одноименных духов (3 из 5 образцов) (рис. 5, 6) демонстрирует отсутствие протонного обмена с водой и этанолом, что предполагает отсутствие в смеси соединений с подвижными протонами. Соотношения этанола, воды и органики в этих образцах также различны, в них присутствует значительное количество ароматических соединений. Все они не соответствуют в полной мере оригиналу, то есть может не только не удовлетворять экологическим стандартам ЕС, но и содержать токсичные соединения.

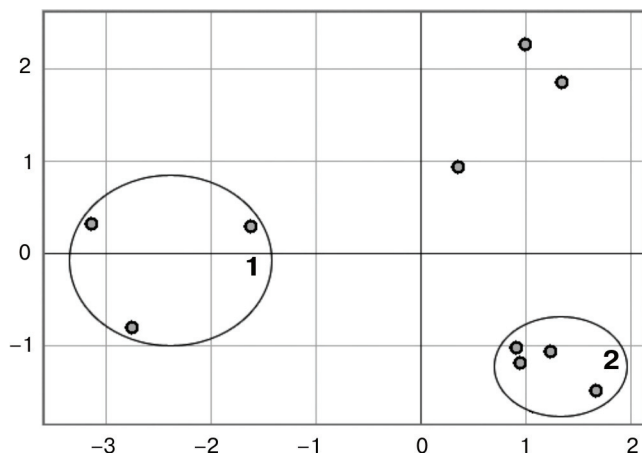


**Рис. 5.** Наложение спектров ЯМР  $^1\text{H}$ , 600 МГц оригинальных духов, произведенных по лицензии в наиболее характерной области



**Рис. 6.** Наложение спектров ЯМР  $^{13}\text{C}$ , 600 МГц оригинальных духов и трех образцов духов, произведенных по лицензии в наиболее характерной области

Сличительный анализ методом ЯМР не требует полной расшифровки спектра. Мерой различия может служить результат вычитания двух спектров или корреляция между ними. Различие образцов в серии можно видеть на диаграмме факторного анализа методом главных компонент, где факторами являются линейные комбинации интегральных интенсивностей наиболее характерных фрагментов спектра (рис. 7).



**Рис. 7.** Факторная диаграмма в координатах двух главных компонент с наибольшими весами: группа 1 — оригинальные образцы духов; группа 2 — пробы оригинальных духов с различным временем хранения; оставшиеся точки — образцы духов, которые, по-видимому, были фальсифицированы. Смещение группы 2 относительно группы 1 обусловлено нелинейной динамикой испарения легколетучих компонент

Согласно полученным расчетам по критерию Краскела-Уоллеса (многомерное обобщение критерия Манна-Уитни), различия между выборками являются статистически значимыми при высоком уровне достоверности.

Наибольший вклад в факторы, в координатах которых построена диаграмма, вносят области 1—2 м.д. и 4,5—6 м.д. протонных спектров образцов, в первой области лежат сигналы эфиров и простых углеводов, во второй — гетероцических и ароматических соединений, входящих в состав парфюмерного средства.

#### ЛИТЕРАТУРА

- [1] Калабин Г.А., Каницкая Л.В., Кушнарев Д.Ф. Количественная спектроскопия ЯМР природного органического сырья и продуктов его переработки. — М.: Химия, 2000.
- [2] Калабин Г.А. Кушнарев Д.Ф., Баженов Б.А., Дашицыренова А.Д. Количественный анализ многокомпонентных смесей нефтепродуктов совокупностью методов спектроскопии ЯМР и масс-спектрометрии // Нефтехимия. — 2005. — Т. 45. — № 6. — С. 1—12.
- [3] Калабин Г.А., Садыков Б.Р., Стариков В.П. Экологически чистые технологии анализа нефти и нефтепродуктов на основе методов спектроскопии ЯМР // Вестник РУДН. Серия «Экология и безопасность жизнедеятельности». — 2008. — № 2. — С. 14—17.
- [4] Пройдаков А.Г., Калабин Г.А. Расширение сырьевой базы для получения гуминовых кислот путем безреагентного механоокиеления бурых углей: Сб. научных трудов «Актуальные проблемы экологии и природопользования». — М.: Энергия, 2007.



- [5] *Рохин А.В., Каницкая Л.В., Кушнарев Д.Ф., Калабин Г.А.* Химическая структура макромолекулы лигнина ели по результатам исследования методами количественной спектроскопии ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  и  $2\text{D}$  ЯМР-экспериментов // *Научное обозрение*. — 2006. — № 1. — С. 36—47.
- [6] *Калабин Г.А., Лазуткина Е.В., Садыков Б.Р.* Влияние вермигумусовых соединений на свойства дерново-подзолистой почвы и урожайность культур // *Вестник РУДН*. — 2009. — № 3. — С. 6.
- [7] *Dashitsyrenova A.D., Kalabin G.A., Kuschnarev D.F., Proydakov A.G., Rokhin A.V.* NMR spectroscopy in identification of humic substances and prediction its properties // *Studia Universitatis Babeş-Bolyai. Physica. 4b*. — 2005. — P. 591—594.
- [8] *Калабин Г.А., Кулагина Н.В., Рыков Р.С., Козлов Ю.Л., Кушнарев Д.Ф., Рохин А.В.* Идентификация сырьевой природы этанола методом спектроскопии ЯМР  $2\text{H}$  // *Вестник РУДН. Серия «Экология и безопасность жизнедеятельности»*. — 2003. — № 7. — С. 87—98.
- [9] *Калабин Г.А., Козлов Ю.Л., Рыков Р.С., Кулагина Н.В., Кушнарев Д.Ф., Рохин А.В.* Новый алгоритм идентификации натуральных вин Грузии методом спектроскопии ЯМР // *Вестник РУДН. Серия «Экология и безопасность жизнедеятельности»*. — 2004. — № 9. — С. 77—83.
- [10] *Batista L.A., Goncalves M.I., Singh A.K., Hackman E.R., Santoro M.I.J.* Quantitative determination of dimethylaminoethanol in cosmetic formulations by nuclear magnetic resonance spectroscopy. AOAC Inc. 2008.
- [11] *Holzgrabe U., Waver I., Diehl B.* NMR Spectroscopy in Drug development and Analysis WHLEY-VCH. — 1999.
- [12] *Graham A. Webb, M.J. McCarthy, P.S. Belton* Annual reports on NMR spectroscopy. — 1995. — Vol. 31.
- [13] *DetlefEmeis, Willem Anker, Klaus-Peter Wittern* Quantitative  $^{13}\text{C}$  NMR Spectroscopic Studies on the Equilibrium of Formaldehyde with Its Releasing Cosmetic Preservatives // *Anal. Chem.* — 2007.

## **NEW DIRECTIONS OF RESEARCH IN THE FIELD OF NMR SPECTROSCOPY IN PFUR**

**V.V. Podgorsky, B.R. Sadykhov, A.V. Chertkhov,  
L.A. Boronina, N.G. Bakhanova, L.I. Khurkhieva,  
G.A. Khalabin**

Ecological Department  
The Peoples' Friendship University of Russia  
*Podolskoye shosse, 8/5, Moscow, Russia, 133093*

This article presents some new research directions in the PFUR on quantitative NMR spectroscopy of complex water and organic objects: a metabolic analysis of biofluids, certification of humic preparation and prediction of their physiological activity, identification and authentication of the perfume and cosmetic products.

**Key words:** life safety, quality control, nuclear magnetic resonance, humates, perfume products, biofluids.