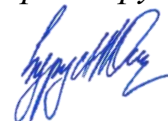


На правах рукописи



Сыпалов Сергей Александрович

Определение умифеновира, амброксола, бромгексина и продуктов их трансформации в объектах окружающей среды методами высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием

Специальность 1.4.2 - Аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Архангельск
2024

Работа выполнена в Центре коллективного пользования научным оборудованием «Арктика» ФГАОУ ВО Северного (Арктического) федерального университета имени М.В. Ломоносова.

Научный руководитель: **Ульяновский Николай Валерьевич** – доктор химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории химии природных соединений и биоаналитики Центра коллективного пользования научным оборудованием «Арктика» ФГАОУ ВО «Северный (Арктический) федеральный университет имени М.В. Ломоносова»

Официальные оппоненты: **Ставрианиди Андрей Николаевич**, доктор химических наук, доцент кафедры аналитической химии химического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Апполонова Светлана Александровна, кандидат химических наук, руководитель Центра биофармацевтического анализа и метаболомных исследований Института трансляционной медицины и биотехнологии ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация: Федеральное государственное унитарное предприятие **«Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека»** Федерального медико-биологического агентства Российской Федерации

Защита диссертации состоится 21 ноября 2024 г. в 15 часов 45 минут на заседании диссертационного совета 24.2.320.05, созданного на базе ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет», по адресу: 350040, г. Краснодар, ул. Ставропольская, д. 149, ауд. 3030Л.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет», на сайтах ВАК Минобрнауки РФ <https://vak.minobrnauki.gov.ru> и ФГБОУ ВО «КубГУ» <http://www.kubsu.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Киселева Наталия
Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Отводимые от населенных пунктов через систему канализации сточные воды в значительной степени загрязнены не только органическими соединениями, но и патогенными организмами. СанПин 2.1.5.980–00 не допускает их сбрасывания в природные водные объекты без соответствующей очистки и обеззараживания. В этом аспекте значительными преимуществами обладают технологии с применением хлорсодержащих реагентов. Несмотря на доступность и высокую эффективность подавления патогенов, такие технологии имеют ряд недостатков, ключевым из которых является образование побочных продуктов дезинфекции (ППД) в результате взаимодействия растворенного органического вещества с активным хлором.

Большое внимание специалистов привлекают новые (эмерджентные) загрязнители – потенциальные прекурсоры ППД, присутствующие в сточных водах, важной особенностью которых является способность образовывать с активным хлором более токсичные и опасные для окружающей среды соединения. Одними из источников такого рода органических загрязнителей выступают фармацевтические препараты, потребление которых напрямую зависит от эпидемиологической ситуации и сезонных заболеваний. В период пандемии COVID-19, вызванной коронавирусом SARS-CoV-2, наибольшее распространение получили антибиотики, противовирусные препараты, противокашлевые и муколитические средства. На территории Российской Федерации и ряде других стран многократно увеличилось потребление таких препаратов, как умифеновир, амброксол и бромгексин. Наличие в их структурах как минимум одного атома брома может способствовать образованию бромсодержащих побочных продуктов дезинфекции, которые зачастую более токсичны относительно их хлорсодержащих аналогов. Но сведения об этих соединениях, путях трансформации, контроле их содержаний в ходе водного хлорирования практически отсутствуют.

Поиск, идентификация и определение фармацевтических препаратов, их метаболитов, побочных продуктов дезинфекции в сточных водах в основном проводится методами жидкостной и газовой хромато-масс-спектрометрии. Имеющиеся подходы к количественной оценке существенно ограничены из-за отсутствия коммерчески доступных стандартных образцов, в первую очередь, для определения метаболитов и ППД. При этом для оценки реального уровня загрязнения и потенциального воздействия на окружающую среду необходим контроль максимально широкого круга образующихся загрязнителей, наряду с исходными прекурсорами. Поэтому актуальной является задача по разработке новых методов и методик определения бромсодержащих фармацевтических препаратов и продуктов их трансформации в сточных водах. Наличие атома галогена в структурах умифеновира, амброксола и бромгексина позволяет рассматривать возможным решение проблемы их определения методом индуктивно связанной плазмы с масс-спектрометрическим детектированием (ИСП-МС), имеющей высокую чувствительность по бром. Задачу контроля бромсодержащих компонентов в сточных водах можно решить за счет

сочетания методов высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с ИСП-МС (количественный анализ) и масс-спектрометрией высокого разрешения (МСВР, идентификация).

Работа выполнена в рамках выполнения проекта Госзадания Министерства образования и науки РФ FSRU-2024-0007 с использованием оборудования ЦКП НО “Арктика” САФУ.

Цель диссертационного исследования – разработка новых подходов для определения бромсодержащих фармацевтических препаратов и продуктов их трансформации в объектах окружающей среды методами высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

Для достижения поставленной цели решали следующие задачи:

1. Обоснование и реализация условий детектирования бромсодержащих фармацевтических препаратов и продуктов их трансформации методами высокоэффективной жидкостной хроматографии с комбинированным масс-спектрометрическим детектированием;

2. Изучение трансформации умифеновира, бромгексина, амброксола в условиях водного хлорирования, идентификация основных образующихся побочных продуктов дезинфекции и мониторинг их содержания в объектах окружающей среды;

3. Разработка методики определения умифеновира и его метаболитов в природной и сточной водах, активном иле и донных отложениях;

4. Апробация разработанной методики определения умифеновира и его метаболитов в реальных образцах методами ВЭЖХ-МСВР И ВЭЖХ-ИСП-МС.

Научная новизна диссертационного исследования. Предложен научно-методический подход по определению бромсодержащих фармацевтических препаратов и продуктов их трансформации в объектах окружающей среды с использованием единого аналитического стандарта с пределами обнаружения (в пересчете на бром) на уровне концентраций 0,2 нг/л для жидких образцов и 2 мкг/кг – твердых.

Получены новые знания о трансформации умифеновира, амброксола и бромгексина в условиях водного хлорирования, идентифицированы продукты их превращений.

Практическая значимость. На примере городской агломерации (Архангельск-Новодвинск-Северодвинск) субарктической территории РФ проведена апробация предложенных подходов для оценки уровня негативного воздействия бромсодержащих фармацевтических препаратов и продуктов их трансформации. Результаты исследования могут найти применение для определения амброксола, бромгексина, умифеновира и продуктов их трансформации в технологических процессах очистных сооружений канализации города.

Впервые проведена оценка содержания умифеновира, амброксола, бромгексина и побочных продуктов их трансформации в реальных объектах сточных вод и окружающей среды.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Новый подход к поиску, идентификации и определению бромсодержащих фармацевтических препаратов, а также продуктов их трансформации в сточных водах и объектах окружающей среды методом ВЭЖХ с комбинированным масс-спектрометрическим детектированием ИСП-МС и МСВР;

2. Методика определения умифеновира и трех его метаболитов в природной и сточной воде, активном иле и донных отложениях, основанная на сочетании возможностей техник ИСП-МС и МСВР.

3. Результаты исследования трансформации умифеновира, амброксола, бромгексина в условиях дезинфекции воды и оценки уровней содержания препаратов, а также их продуктов трансформации в реальных объектах.

Степень достоверности результатов. Значительный объем экспериментальных исследований с получением новых данных подтверждает достоверность результатов, согласующихся с теоретическими данными. Применение в работе аттестованных стандартных образцов фармацевтических препаратов, обработка данных хемометрическими методами, а также использование современных методов исследования и хромато-масс-спектрометрии. Публикацией обсуждений результатов исследования в высокорейтинговых научных журналах. На период проведения измерений все используемое оборудование имело актуальное свидетельство о периодической поверке.

Апробация работы. Основные результаты исследования были представлены и обсуждены на научных мероприятиях: VI всероссийский симпозиум «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» с международным участием, 26 сентября – 2 октября 2021 г., г. Краснодар; IX всероссийская конференция с международным участием «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы», 18–22 октября 2021 г., г. Москва; 7 th International Symposium Socratic Lectures, 7 мая 2022 г., г. Любляна, Словения; IV съезд аналитиков России «Аналитика России», 25 сентября – 1 октября г., г. Москва; XII Всероссийская научная конференция «Химия и технология растительных веществ», 29 ноября – 2 декабря 2023 г., г. Киров; X Всероссийская конференция с международным участием «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы», 30 октября–3 ноября 2023 г., г. Москва.

Публикации. По результатам научно-исследовательской работы опубликованы 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ и индексируемых в международных базах данных Scopus и Web of Science, а также 7 тезисов докладов в материалах профильных научных конференций.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждений, списка использованных источников. Работа изложена на 114 страницах, содержит 26 рисунков, 13 таблиц и 185 источников.

Личный вклад автора заключается в проработке темы диссертации, планировании и проведении экспериментальных исследований. Автором обобщены, систематизированы литературные данные по теме диссертации, сформулированы цели

и задачи исследования, выполнены экспериментальные и теоретические исследования по определению умифеновира, амброксола, бромгексина и идентификации побочных продуктов их дезинфекции, проведена интерпретация и обсуждение полученных результатов. Подготовлены доклады для выступления на профильных научных конференциях. В совместно опубликованных по научной теме работах, значительный вклад принадлежит соискателю.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность диссертационной работы, сформулированы ее цели и задачи, научная новизна и практическая значимость.

В литературном обзоре рассмотрены проблемы образования побочных продуктов дезинфекции фармацевтических препаратов, обостряющиеся в периоды сезонных заболеваний и эпидемий, и их аналитического контроля. Проведен анализ методов и подходов применяемых для определения уже известных препаратов и побочных продуктов их трансформации, а также используемых для идентификации и нецелевого скрининга новых (неизвестных) химических загрязнителей. Обсуждается возможность применения сочетания методов ВЭЖХ с комбинацией техник ИСП-МС и МСВР для решения задачи обнаружения, идентификации и количественного определения бромсодержащих фармацевтических препаратов и побочных продуктов их дезинфекции.

В экспериментальной части описаны оборудование, реактивы и материалы, объекты исследования, использованные в работе. Описаны процедуры модельного хлорирования исследуемых препаратов. Методы и параметры, используемые для извлечения, идентификации и количественного определения исследуемых препаратов и продуктов их трансформации.

В обсуждении результатов приведены результаты модельных экспериментов хлорирования исследуемых фармацевтических препаратов, проведена предположительная идентификация образующихся побочных продуктов дезинфекции и предложены схемы трансформации. Разработан подход определения умифеновира и его метаболитов, основанный на сочетании методов ВЭЖХ-МСВР и ВЭЖХ-ИСП-МС.

Трансформация умифеновира в условиях водного хлорирования

Для установления путей трансформации умифеновира в условиях водного хлорирования и надежной идентификации образующихся продуктов без введения дополнительных стадий предварительного концентрирования проводили модельные эксперименты с относительно высокой исходной концентрацией исходного соединения (20 мг/л). Соотношение массовых концентраций активного хлора и умифеновира варьировали при рН 4,3; 5,0; 6,0 и 7,0, близких к реальным значениям для муниципальных сточных вод (5–7,5), в диапазоне 0–500 %.

Реакция умифеновира с гипохлоритом протекает чрезвычайно быстро (менее чем за 30 с), что делает практически невозможным кинетические исследования. Основным параметром, определяющим трансформацию умифеновира, является дозировка гипохлорита. Максимальное число бромсодержащих продуктов (16 соединений, включая бромид-анион и умифеновир) наблюдается при соотношении концентраций противовирусного препарата к активному хлору 2:1 (рис. 1). Дальнейшее повышение концентрации гипохлорита натрия в реакционной смеси приводит к резкому снижению перечня продуктов.

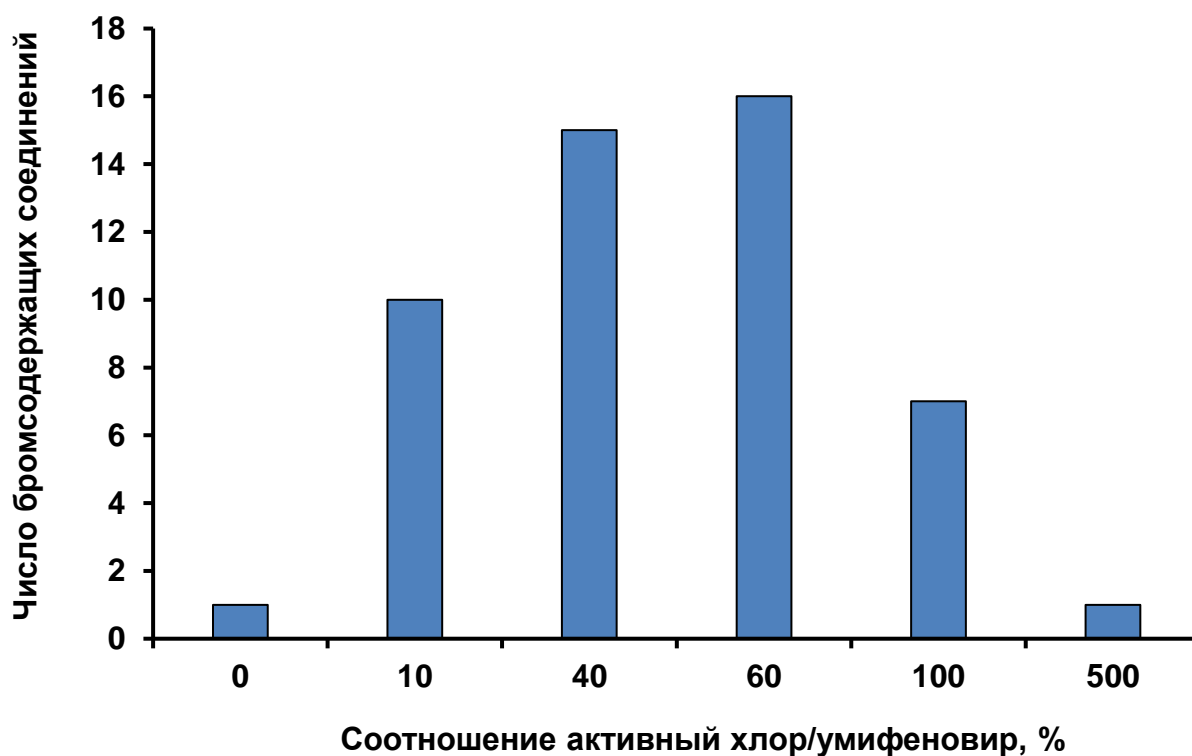


Рисунок 1. Число бромсодержащих соединений, обнаруженных в реакционных смесях при разных соотношениях активный хлор/умифеновир

Важно отметить отсутствие значимых количеств соединений, не содержащих в своей структуре брома, что подтверждается практически идентичным видом хроматограмм, полученных методами ВЭЖХ-ИЭР-МСВР и ВЭЖХ-ИСП-МС (рис. 2). Это свидетельствует о том, что потеря брома происходит только на поздних стадиях деградации умифеновира с предполагаемым образованием простейших и высокополярных неударживаемых продуктов, элюируемых с мертвым временем. Наличие брома в образующихся на начальных стадиях всех продуктов превращения умифеновира позволяет надежно их обнаружить методом ИСП-МС. Рассчитанные на основе точных масс и изотопного распределения (метод МСВР) элементные составы обнаруженных продуктов, а также их тандемные масс-спектры, позволили провести предварительную идентификацию обнаруженных метаболитов и предложить схему их образования при взаимодействии с активным хлором (рис. 3).

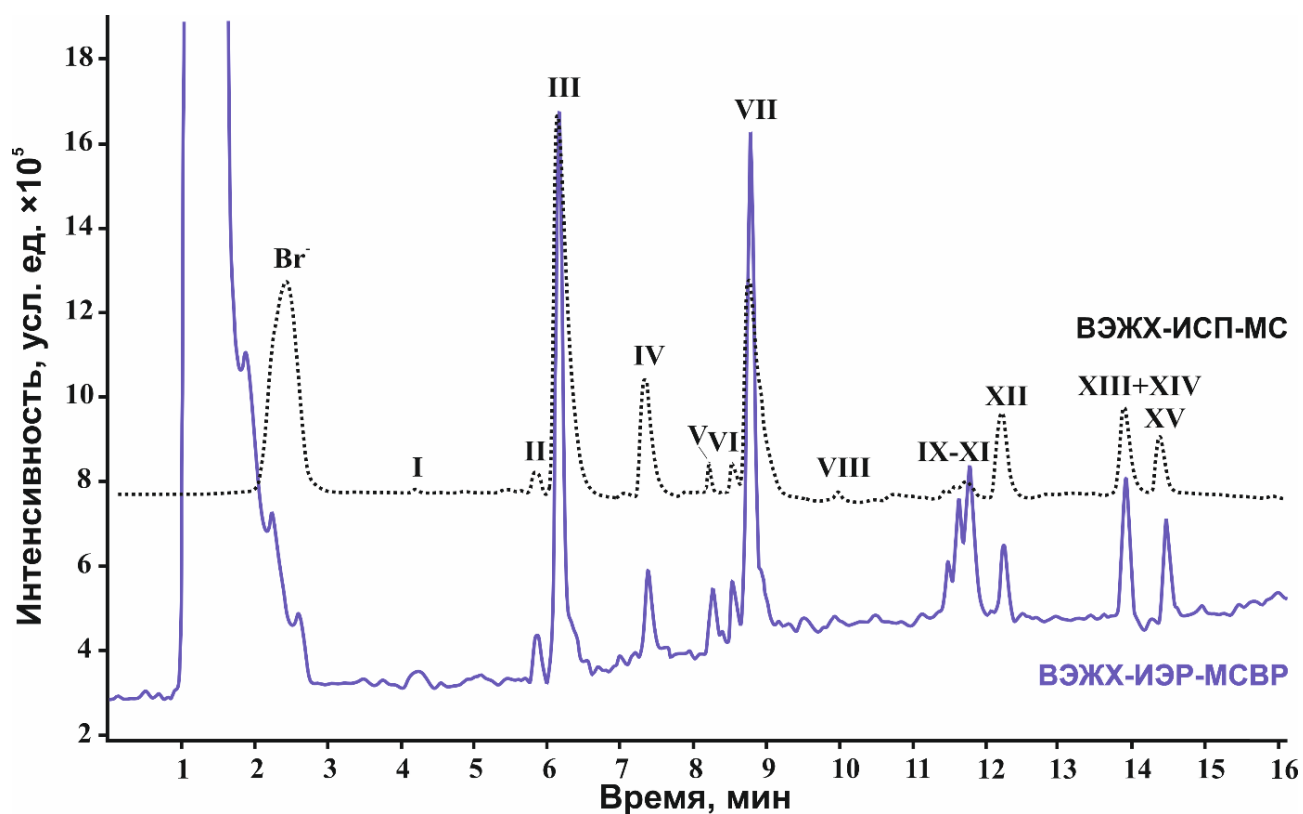


Рисунок 2. Хроматограммы реакционных смесей модельного хлорирования умифеновира полученные методами ВЭЖХ-ИЭР-МСВР и ВЭЖХ-ИСП-МС

В качестве ключевых процессов трансформации умифеновира выступают электрофильное замещение и перенос одного электрона. При этом список обнаруживаемых продуктов хлорирования отличается от такового для метаболитов умифеновира, образующихся в организме человека. Вместо многочисленных конъюгатов с углеводами, сульфатированных и ацелированных производных водное хлорирование приводит к образованию значительного массива соединений без тиофенольного фрагмента. Тем не менее четыре соединения (III – (этил-6-бром-4-((диметиламино)метил)-5-гидрокси-2-(гидроксиметил)-1-метил-1H-индол-3-карбоксилат), VI – (этил-6-бром-5-гидрокси-1-метил-4-(метиламино)метил), VII – (этил-6-бром-5-гидрокси-1-метил-4-(диметиламино)метил)-2-фенилсульфоксидметил-индол-3-карбоксилат), VIII – (этил-6-бром-5-гидрокси-1-метил-4-(диметиламино)-метил)-2-фенилсульфонметилиндол-3-карбоксилат), в том числе основные обнаруженные продукты трансформации III и VII, образуются как при хлорировании, так и под действием ферментов организма человека и могут поступать в природные воды из этих двух источников.

Доля каждого побочного продукта дезинфекции зависит в основном от двух важнейших параметров – pH раствора и соотношения умифеновир/активный хлор. Первый фактор существенно влияет на реактивность противовирусного препарата, определяя как равновесное между молекулярным хлором и гипохлорит-ионом, а также протолитические равновесия с участием кислой фенольной группы и алкиламинового заместителя с высоким сродством к протону в структуре умифеновира. Результаты

анализа реакционных смесей методом ВЭЖХ-ИСП-МС (рис. 4) демонстрируют быстрое увеличение концентрации неорганического брома с увеличением pH.

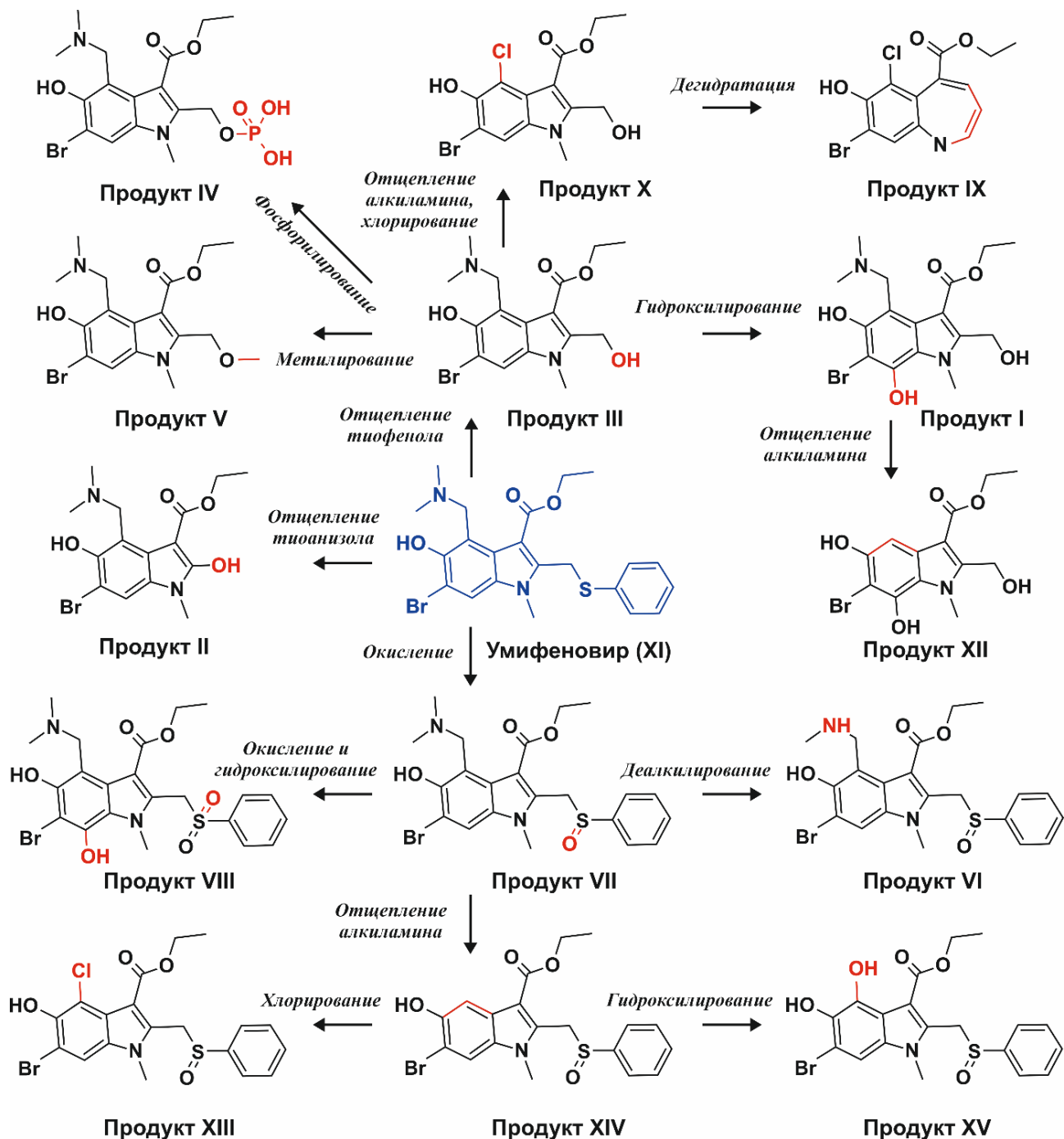


Рисунок 3. Схема предполагаемой трансформации умифеновира при взаимодействии с активным хлором

Аналогичная тенденция наблюдается при увеличении дозы гипохлорита, так как концентрация неорганического брома быстро возрастает и достигает 70 % от общего содержания всех продуктов превращения при достижении соотношения активный хлор/умифеновир 100 % (pH 5). Таким образом, наибольшее содержание ППД наблюдается при существенном недостатке дезинфицирующего агента и низких значениях pH.

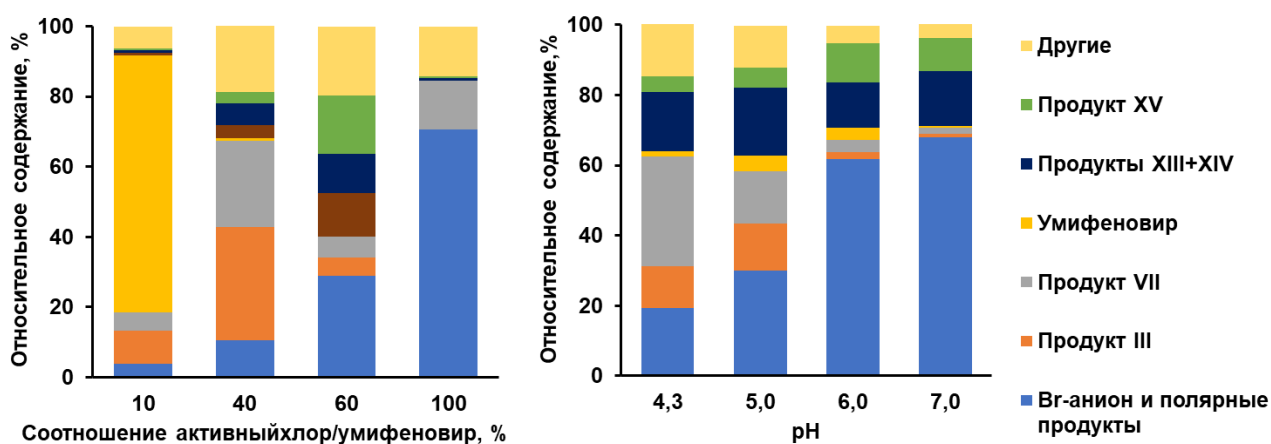


Рисунок 4. Влияние соотношения активный хлор/умифеновир (слева) и величины рН (справа) на относительное содержание бромсодержащих продуктов трансформации умифеновира

Учитывая высокую антиоксидантную активность умифеновира, значительный вклад в образование метаболитов может оказывать окисление кислородом воздуха. Однако анализ водных растворов умифеновира с разным уровнем рН, находившихся в контакте с воздухом, показал низкую скорость трансформации препарата. Даже через 90 дней в реакционной смеси обнаруживается только три продукта превращения, два из которых (VII и III) наблюдаются при обработке активным хлором.

Дополнительно были проведены исследования по изучению состава продуктов глубокой деградации умифеновира, не обнаруживаемых методом ВЭЖХ-МС. С этой целью использован метод газовой хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения (ГХ-МСВР). Суммарно было идентифицировано четырнадцать соединений, подавляющее большинство которых относятся галометанам, галоацетонитрилам, галогенированным бензолам, а также эфирам галоуксусной кислоты. Данные компоненты являются широко известными побочными продуктами дезинфекции. Высокие уровни содержания полибромированных соединений (например, трибромметан) свидетельствуют о том, что в образовании ППД на поздних стадиях реакций задействованы многочисленные механизмы с участием бромидин-ионов и гипобромит-анионов, образующихся за счет окисления бромидов гипохлоритом. Бромсодержащие низкомолекулярные продукты глубокой трансформации в условиях ВЭЖХ практически не удерживаются на неподвижной фазе и элюируются одновременно с бромид-анионом, что ограничивает возможности ИСП-МС для их детектирования.

Тем не менее, продукты трансформации умифеновира, образующиеся на ранних стадиях, могут представлять серьезную угрозу живым организмам и экологическому состоянию объектов окружающей среды, в которые поступают сточные воды. Это требует разработки новых селективных и чувствительных подходов к их определению.

Трансформация бромгексина и амброксола в условиях водного хлорирования

Для муколитических препаратов (бромгексина и амброксола) также были проведены модельные эксперименты по взаимодействию с активным хлором с целью установления ключевых промежуточных побочных продуктов дезинфекции.

Амброксол характеризуется меньшей реакционной способностью по сравнению с бромгексином. Для последнего процессы трансформации протекают менее чем за 5 минут при доле активного хлора 0–100% от фармацевтического препарата. В случае амброксола содержание ППД и исходного прекурсора в реакционной смеси перестает изменяться спустя 1 час с начала реакции. Применение разработанного подхода для обнаружения и идентификации бромсодержащих побочных продуктов дезинфекции, основанного на сочетании методов ВЭЖХ-ИСП-МС и ВЭЖХ-МСВР позволило установить влияние дозировки дезинфектанта на количество образующихся метаболитов. Полученные результаты (рис. 5) демонстрируют сопоставимую с умифеновиром способность муколитических препаратов давать широкий спектр продуктов трансформации, достигая максимальных значений (21 для бромгексина и 6 для амброксола) при соотношении активного хлора на уровне 40%.

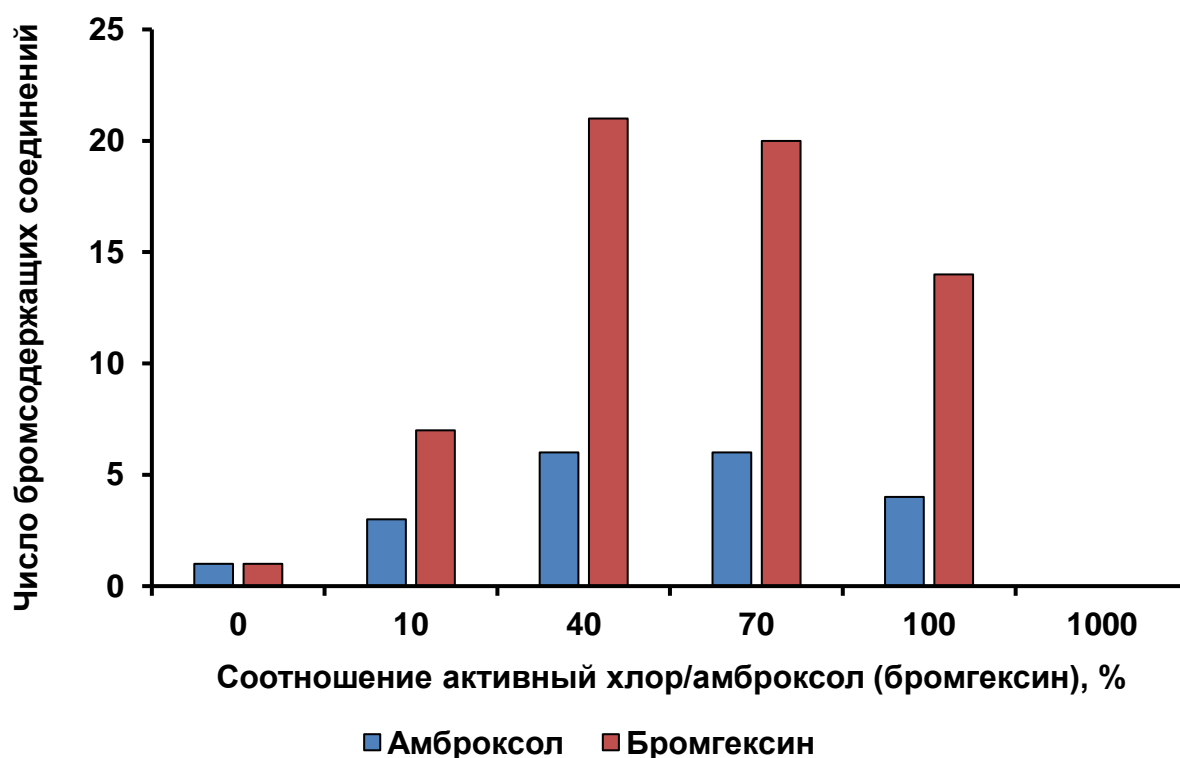
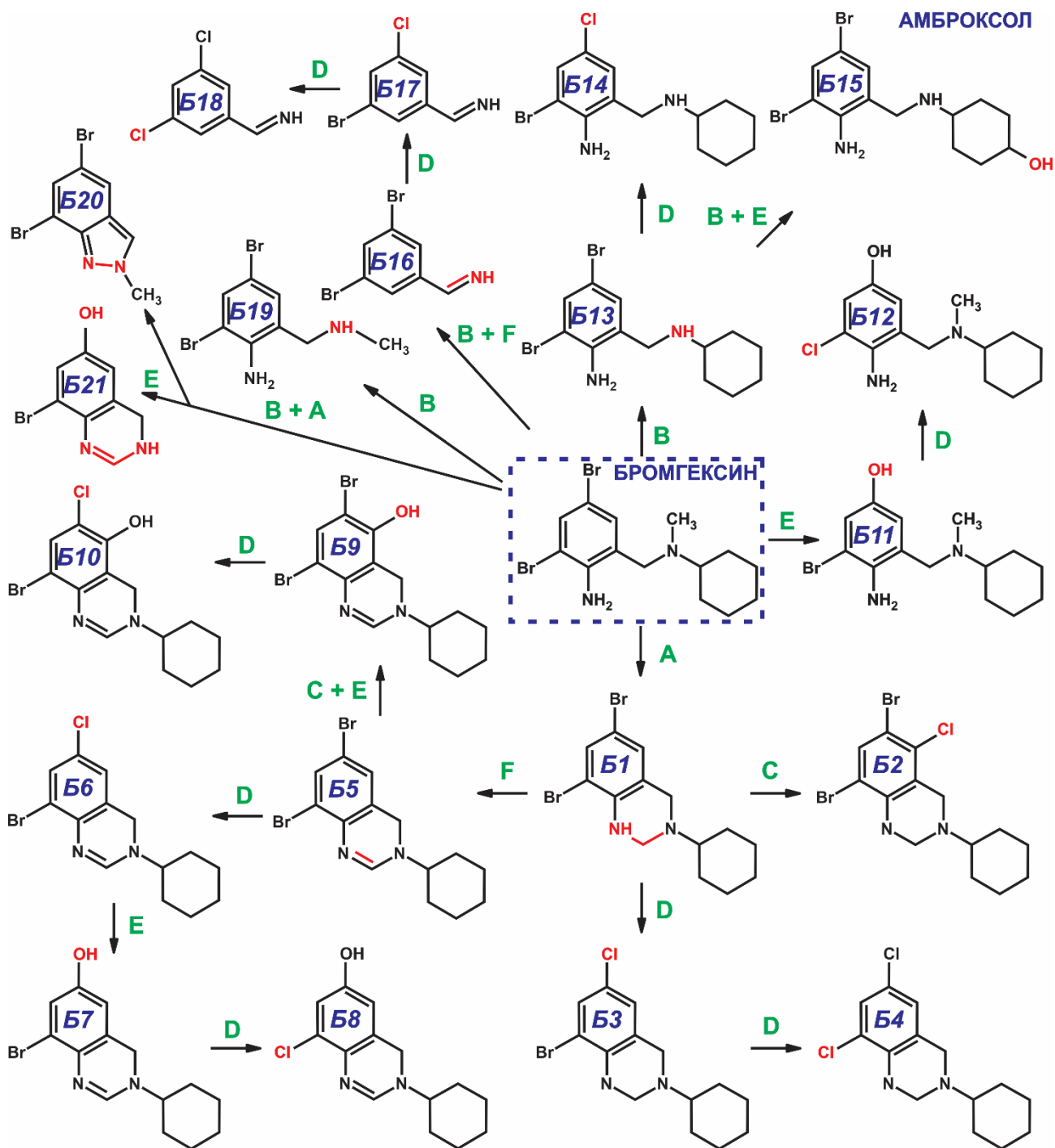


Рисунок 5. Число бромсодержащих продуктов, обнаруженных в реакционных смесях при разных соотношениях активный хлор/амброксол (бромгексин)

Следует отметить, что из всего набора обнаруженных ППД, лишь 4 не содержали бром в своей структуре, что открывает большие перспективы для применения метода ИСП-МС для их определения в сложных матрицах. На основе элементных составов обнаруженных метаболитов (расчет по точным массам и изотопному распределению), а также тандемных масс-спектров проведена предположительная идентификация каждого из продуктов, предложены схемы их образования (рис. 6).



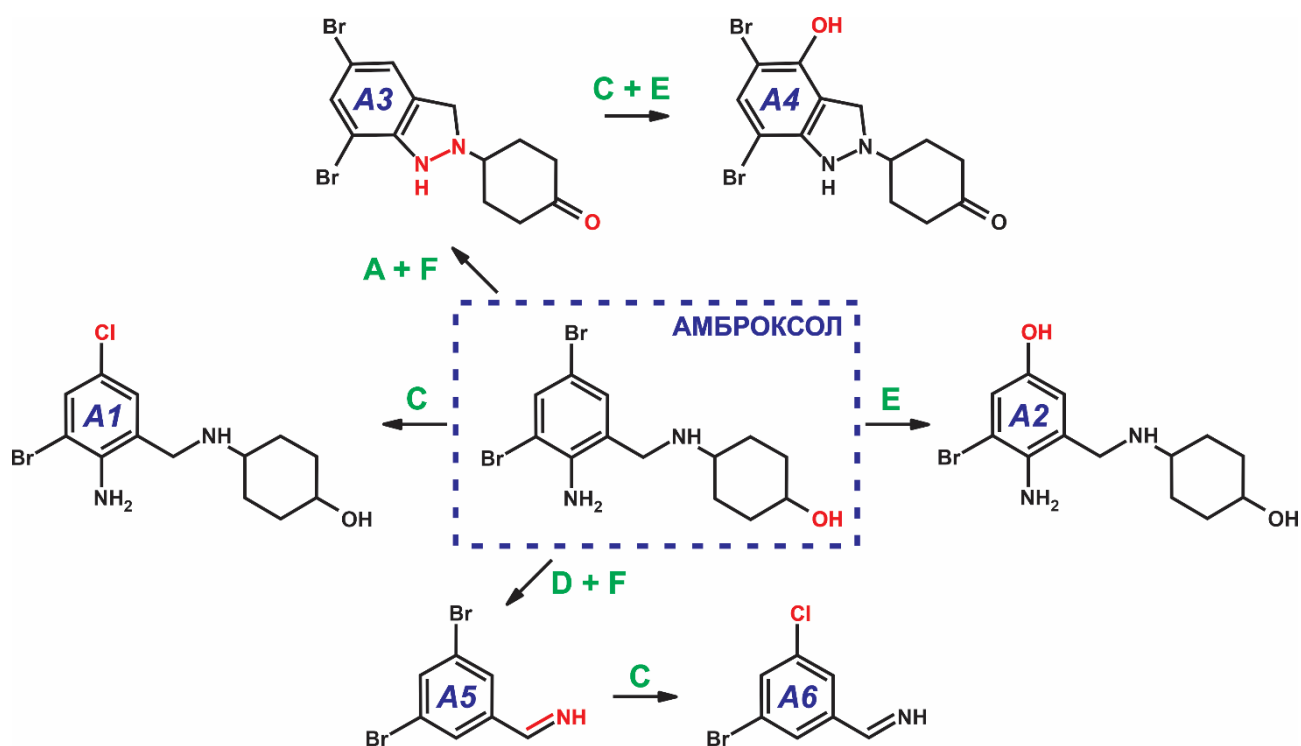
A - Циклизация; B - Деалкилирование; C - Хлорирование; D - Замещение; E - Гидроксилирование; F - Другие

Рисунок 6. Схема предполагаемой трансформации бромгексина при хлорировании

Ключевыми направлениями трансформации бромгексина являются циклизация за счет наличия в его структуре метильной группы и возможности образования C-N связи, а также деалкилирование аминогруппы. Последняя является известным для замещенных аминов в условиях водного хлорирования процессом. В случае бромгексина может отщепляться не только метильная или циклогексановая группа, но также наблюдается одновременная потеря обоих алкановых заместителей. Сочетание указанных реакций с последующим электрофильным замещением и гидролизом является основной причиной образования большого набора промежуточных

продуктов. Исходный муколитический препарат также учувствует в последовательном замещении галогена на гидроксильную группу, а затем оставшегося атома брома на хлор. Как и в случае метаболизма в живых организмах, одним из побочных продуктов бромгексина на начальных стадиях хлорирования выступает амброксол.

Были выявлены различия в путях деградации исследуемых муколитических препаратов. Так, амброксол характеризуется отсутствием метильной группы в своей структуре, что кардинально влияет на возможность циклизации. Было обнаружено лишь 2 продукта, образование которых основано на образовании нового цикла за счет N-N связи. Помимо этого, амброксол способен подвергаться деалкилированию, а также вступать в реакции замещения и гидролиза (рис. 7).



A - Циклизация; **C** - Хлорирование; **D** - Замещение; **E** - Гидроксилирование; **F** - Другие

Рисунок 7. Схема предполагаемой трансформации амброксола при хлорировании

Помимо поиска ППД, образующихся на ранних стадиях, методом ГХ-МСВР изучены продукты глубокой деструкции муколитических препаратов. Суммарно были обнаружены не менее 24 легколетучих низкомолекулярных соединения, из которых лишь половина относится к классическим низкомолекулярным побочным продуктам дезинфекции (галометаны, галоацетонитрилы, а также метиловые эфиры галоуксусной кислоты). Особое внимание обращает на себя возможность образования галогензамещенных анилинов (из 11 обнаруженных представителей данного класса только 2 описаны ранее в литературе). Также впервые была показана возможность образования в качестве продуктов глубокой деструкции муколитических препаратов в условиях дезинфекции галогенированных индазолов. Как и в случае умифеновира, за счет наличия атомов брома в структуре бромгексина и амброксола в качестве ППД образуется больше количество бром и бромхлор замещенных соединений.

Мониторинг содержания фармацевтических препаратов и побочных продуктов дезинфекции в объектах окружающей среды

С целью оценки ориентировочного содержания в сточных водах и объектах окружающей среды фармацевтических препаратов и продуктов их трансформации, обнаруженных в ходе модельных экспериментов, проведен предварительный анализ реальных объектов.

Для анализа отбирали образцы на очистных городских сооружениях: смесь хозяйственно-бытовых и поверхностно-ливневых сточных вод, поступающих на очистку (СВ-1) и после дезинфекции (СВ-2); речная вода (РВ) – отобранная на 2 км ниже по течению от сброса очищенных стоков; смесь активного ила и донных отложений (АИ) из отстойника после биологической очистки; донные отложения (ДО) – отобранные из реки в месте отбора образца РВ. Пробоподготовка образцов воды заключалась в концентрировании на картриджах для твердофазной экстракции, в случае активного ила и донных отложений проводили ультразвуковую экстракцию ацетонитрилом с последующим упариванием экстрактов в токе азота.

Анализ экстрактов с применением селективного по отношению к бромсодержащим соединениям метода ВЭЖХ-ИСП-МС в сочетании с ВЭЖХ-МСВР позволил обнаружить и подтвердить присутствие умифеновира, трех его метаболитов (III, VI и VII) в исследуемых объектах. Несмотря на сложный химический состав и высокое содержание растворенного органического вещества, существенного влияния на результаты анализа со стороны матрицы не наблюдается. Остальные метаболиты умифеновира, так же как бромгексин, амброксол и побочные продукты их дезинфекции не были обнаружены ни в одном из экстрактов даже в следовых количествах.

Для оценки содержания обнаруженных аналитов применяли методы ВЭЖХ-ИСП-МС и ВЭЖХ-МСВР. В случае ВЭЖХ-МСВР использовали допущение, что эффективность ионизации в условиях электрораспыления у всех метаболитов сопоставима с умифеновиrom, по которому строились градуировочные зависимости. Оба метода показали близкие значения, подтверждающие большие перспективы ИСП-МС для решения задач мониторинга сточных вод и объектов окружающей среды.

Результаты определения умифеновира и его метаболитов в реальных объектах демонстрируют, что сточные воды (СВ-1) на очистных сооружениях г. Архангельска в марте 2021 г. содержали порядка 0,8 мкг/л умифеновира (табл. 1). Также обнаружили продукты VII и III, концентрации которых оказались в 10 и 100 раз ниже умифеновира. Эти данные соответствуют ежедневному поступлению в канализацию около 70 г противовирусного препарата и хорошо согласуются с количеством зарегистрированных новых случаев COVID-19 в период отбора проб (~30 человек/сутки).

Исследование очищенных сточных вод (СВ-2) показало, что применяемая технология очистки позволяет удалять лишь 40% поступающего противовирусного препарата. За счет непрерывных процессов трансформации и образования метаболитов степень очистки стоков от них не превышает 20–25%.

Таблица 1. Ориентировочное содержание умифеновира и его метаболитов в реальных объектах

Соединение	Содержание, мкг/кг		Концентрация, нг/л		
	АИ	ДО	СВ-1	СВ-2	РВ
Продукт III	1,3	0,027	8	6	-
Продукт VI	13	-	-	-	-
Продукт VII	270	0,53	65	52	-
Умифеновир	1260	3,2	780	460	13

* - ниже предела обнаружения

Резкое снижение уровня загрязнения умифеновира (в 35 раз) наблюдается лишь в природном водоеме на расстоянии 2 км от места сброса очищенных сточных вод (РВ). При этом концентрация продуктов трансформации находится ниже пределов обнаружения используемых методов. Это можно объяснить значительным разбавлением стоков, а также сорбцией и накоплением фармацевтического препарата и метаболитов природными экосистемами.

Значительный интерес представляют результаты исследования образцов активного ила. Содержание умифеновира в них оказалось чрезвычайно высоким (~1,3 мг/кг), что более чем на 3 порядка превышало его концентрацию в контактирующей с ним сточной воде. Этот факт свидетельствует о высокой сорбционной способности активного ила по отношению к противовирусному препарату и возможности его накопления, при котором могут быть достигнуты опасные уровни. Помимо умифеновира в значительном количестве (20% от исходного препарата) присутствует его сульфоксидное производное VII, а также III (в 100 раз меньше продукта VII). Активный ил является единственным образцом, в котором был в значительных количествах обнаружен метаболит VI (13 мкг/кг). Таким образом, вопрос безопасной утилизации активного ила является существенной проблемой. Распространенная практика размещения на иловых картах может сопровождаться выщелачиванием противовирусного препарата и его производных в подземные воды и вторичным загрязнением природных водоемов.

При поступлении умифеновира в речную воду происходит значительное снижение концентрации, однако донные отложения (ДО) характеризуются высокими уровнями его содержания (3,2 мкг/кг). Несмотря на то, что такие уровни на 2 порядка ниже по сравнению с активным илом, загрязнение донных отложений соединениями с высокой биологической активностью может оказать негативное влияние на донную фауну, а также создать вторичный источник загрязнения речных вод.

Полученные результаты предварительных экспериментов подтверждают необходимость мониторинга умифеновира и его продуктов трансформации в сточных водах и объектах окружающей среды. Это делает крайне востребованной разработку новых способов селективного и высокочувствительного определения бромсодержащих фармацевтических препаратов в сточных водах и природных объектах. Принимая во внимание проблему отсутствия стандартных образцов на каждый контролируемый

компонент, большими перспективами в решении данной задачи обладает метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с комбинированным масс-спектрометрическим детектированием с использованием техник ИСП-МС и МСВР.

Определение умифеновира и его метаболитов в объектах окружающей среды методами ВЭЖХ-МСВР и ВЭЖХ-ИСП-МС

При проведении исследований в качестве целевых аналитов, помимо умифеновира, были выбраны три продукта трансформации, присутствующие как в модельных реакционных смесях, так и обнаруживаемые в объектах окружающей среды (рис. 8). Они могут выступать в качестве маркеров уровня загрязнения муниципальных сточных вод и природных водных объектов противовирусным препаратом.

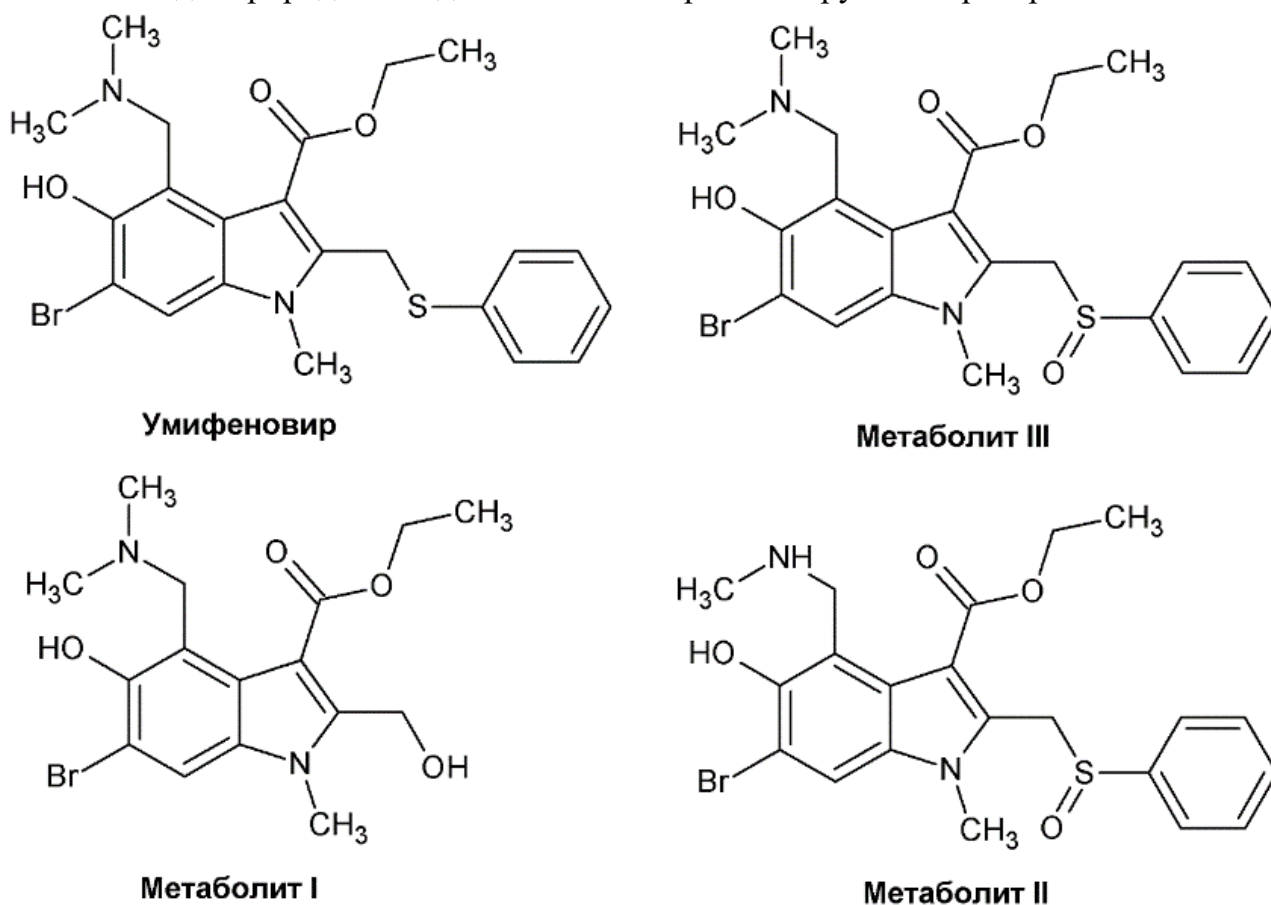


Рисунок 8. Структурные формулы умифеновира и важнейших его метаболитов

Подробные масс-спектрометрические характеристики аналитов, необходимые для поиска и надежной идентификации аналитов в реальных объектах представлены в таблице 2. Наличие в структуре всех целевых аналитов атома брома, представляет решение проблемы их количественного определения в сложных матрицах, применением масс-спектрометрического детектирования, селективного по отношению к бромю. Таким методом является ИСП-МС, который, в сочетании с хроматографическим разделением, обеспечивает отдельное определение бромсодержащих соединений при совместном присутствии. В таком варианте градуировка системы может быть реализована с использованием любых

бромсодержащих внешних стандартов. Для максимального учета возможных интерференций в аргоновой плазме, требованием к таким стандартам является близкое к аналитам удерживание на выбранной неподвижной фазе. В случае выбранных нами целевых аналитов, таким стандартом может выступать сам умифеновир.

В качестве неподвижной фазы для хроматографического разделения выбрали пентафторфенильный сорбент на основе силикагеля, обеспечивающий хорошее удерживание аналитов и отделение их от полярных компонентов матрицы (в том числе бромид-ионов), элюирующихся с фронтом. Проведена оптимизация параметров разделения, обеспечивающие полное разделение аналитов, повышение экспрессности анализа, а также устранение мешающих влияний при ионизации в условиях ИСП-МС.

Таблица 2. Характеристики аналитов, применяемые для идентификации при детектировании в режиме МСВР

Аналит	Элементный состав	m/z	Ошибка, млн ⁻¹	m/z ионов-продуктов (отн. интенсивность, %)
Метаболит I	C ₁₆ H ₂₁ BrN ₂ O ₄	385,0767	2,5	293,9763 (95); 295,9911 (100); 340,0188 (60); 385,0769 (15)
Метаболит II	C ₂₁ H ₂₃ BrN ₂ O ₄ S	479,0651	3,1	278,9887 (60); 293,9760 (30); 323,0157 (100); 354,0581 (25)
Метаболит III	C ₂₂ H ₂₅ BrN ₂ O ₄ S	493,0807	3,2	278,9874 (50); 293,9750 (25); 323,0144 (100); 368,0727 (60)
Умифеновир	C ₂₂ H ₂₅ BrN ₂ O ₃ S	477,0856	2,9	278,9888 (80); 293,9763 (70); 323,0155 (35); 432,0279 (100)

Органическим модификатором подвижной фазы был выбран метанол, который снижает образование отложений углерода на входном конусе масс-спектрометра и обеспечивает более высокую стабильность плазмы. В результате оптимизации предложена следующая программа градиентного элюирования: 0–1 мин: 25 % метанола, 1–20 мин: линейное повышение доли спирта до 100 %, 20–30 мин: 100 % метанола.

Аналитическим ионом выбран ⁷⁹Br (m/z 79), характеризующийся меньшим уровнем полиатомных интерференций со стороны реальных проб, подвижной фазы и компонентов плазмы по сравнению с изотопом ⁸¹Br. Тем не менее, при регистрации хроматограмм по выделенному иону с m/z 79 также наблюдаются интерференции со стороны кластеров аргона (³⁸Ar⁴⁰ArH⁺ и ³⁹K⁴⁰Ar⁺), при этом дрейф базовой линии усиливается при увеличении доли метанола в элюенте. Для устранения данного эффекта был применен коллизионно-реакционный интерфейс (КРИ) масс-спектрометра с подачей водорода и гелия в качестве реакционных газов (рис. 9). Лучшие результаты были достигнуты при подаче водорода, в результате селективного взаимодействия с аргоном в плазме. Применение КРИ позволило не только минимизировать полиатомные интерференции, но и повысить соотношение сигнал/шум более чем в 3 раза.

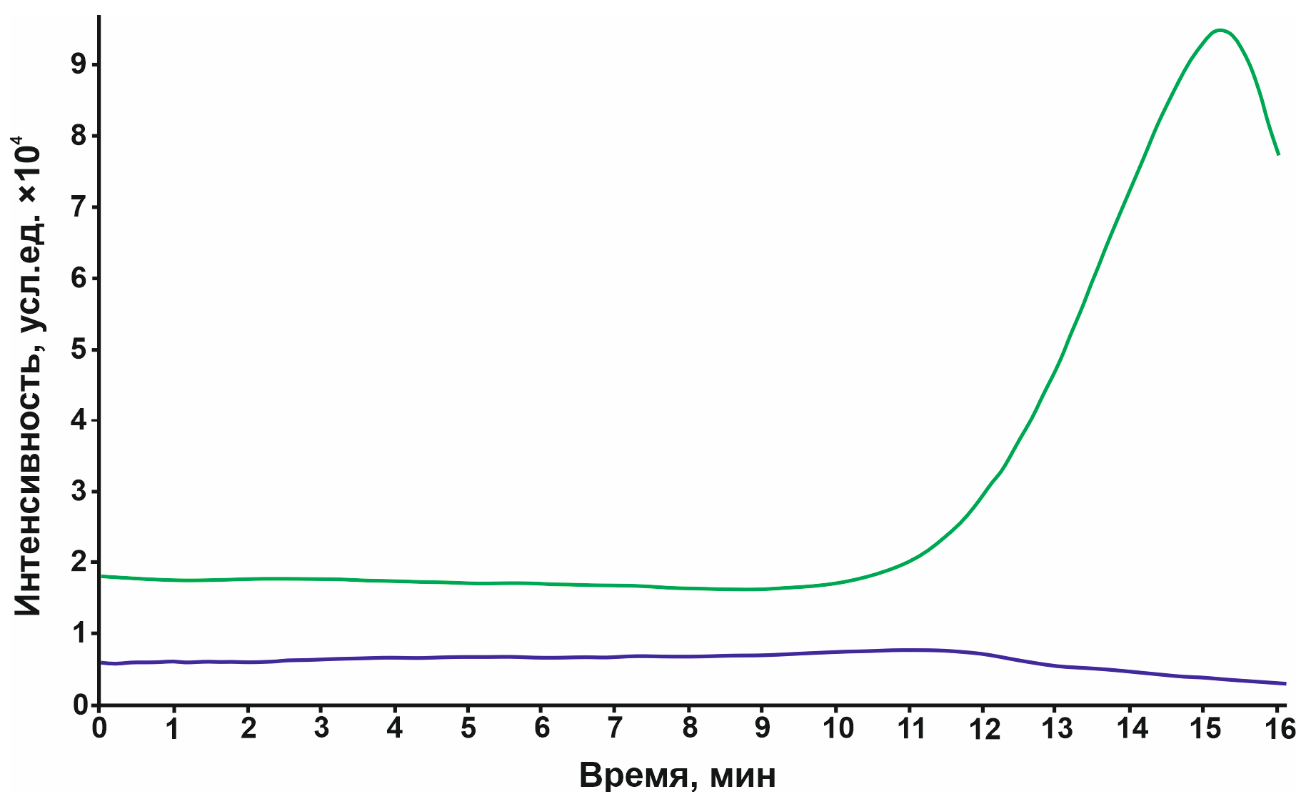


Рисунок 9. Хроматограммы деионизованной воды в режиме градиентной ВЭЖХ-МС-ИСП без (сверху) и с применением (снизу) коллизионно-реакционного интерфейса

Анализ стандартных растворов умифеновира в широком диапазоне концентраций позволил определить инструментальные пределы обнаружения (ПО) и нижние пределы определяемых концентраций (НПОК) на основании критериев 3σ и 10σ (соотношение сигнал/шум), а также линейные диапазоны концентраций аналитов (табл. 3). Градуировочные зависимости, полученные с использованием умифеновира в качестве стандартного образца, линейны в широком диапазоне концентраций (не менее 4 порядков) с коэффициентов корреляции R^2 более 0,99.

Достигнутая чувствительность ВЭЖХ-ИСП-МС анализа находится на уровне единиц мкг/л и обеспечивает решение практических задач. Это обеспечивает эффективное совместное применение обеих техник для поиска и идентификации аналитов (ВЭЖХ-МСВР) и селективного количественного их определения (ВЭЖХ-ИСП-МС). Расчет концентраций метаболитов умифеновира при этом производится по концентрации брома с использованием пересчетных коэффициентов (табл. 3), учитывающих молекулярные массы аналитов. Необходимо отметить, что такой комбинированный метод анализа может быть использован для поиска и количественного определения самых разных бромсодержащих соединений, элементный состав которых может быть установлен на основании точных масс по данным ВЭЖХ-МСВР.

Как и для любых других аналитов, определение умифеновира и его метаболитов в реальных образцах природных и сточных вод, а также донных отложений, требует предварительной подготовки образцов к анализу, включая их концентрирование, а также удаление компонентов матрицы. Для решения задачи концентрирования водных

образцов предложен подход, основанный на твердофазной экстракции (ТФЭ) аналитов на полимерном функционализированном сорбенте. Параметры проведения твердофазной экстракции (рН и состав элюента) оптимизировали на модельных растворах, содержащих 0,5 мкг/л умифеновира. Величину рН варьировали в диапазоне от 2 до 12 (шаг 2 ед. рН).

Таблица 3. Метрологическая характеристика подхода к определению умифеновира и его метаболитов методом ВЭЖХ-ИСП-МС

Аналит	t_R , мин	Коэффициент $a_{Br} \times 10^4$ уравнения вида $y = a \cdot x$ (градуировка по V_B)	Коэффициент $a \times 10^4$ уравнения вида $y = a \cdot x$ (градуировка по умифеновиру)	ПО, мкг/л (по V_B)	ПО, мкг/л	Линейный диапазон, мкг/л
Метаболит I	6,2	5,76	1,21	0,4	1,5	НПОК - 50000
Метаболит II	8,7		1,04		1,8	
Метаболит III	8,9		0,92		2,1	
Умифеновир	11,8		0,98		2,0	

Представленные на рисунке 10 данные демонстрируют, что во всем исследуемом диапазоне рН степень извлечения находится на уровне не менее 75 %, при этом среднеквадратичное отклонение полученных величин не превышает 7 %. Тем не менее, максимальные значения степени извлечения достигаются в щелочной среде (рН 12) вследствие перевода аналита в молекулярную форму за счет депротонирования третичной амино группы в его структуре.

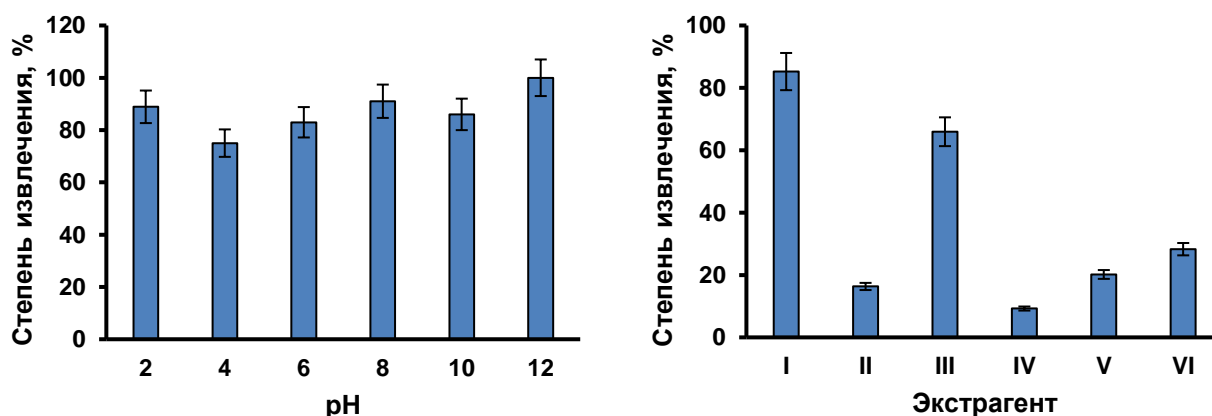


Рисунок 10. Степень извлечения умифеновира в зависимости от рН водного образца при твердофазной экстракции (слева) и типа применяемого органического экстрагента при экстракции донных отложений методом жидкостной экстракции под давлением (справа): I – ацетонитрил с 1 % муравьиной кислоты, II – ацетонитрил, III – ацетонитрил с 1 % аммиака, IV – метанол с 1 % муравьиной кислоты, V – метанол, VI – метанол с 1 % аммиака

Значительное влияние на эффективность ТФЭ также оказывает природа органического растворителя, применяемого для элюирования аналитов с сорбента.

Эксперименты показали, что применение чистого ацетонитрила или метанола не позволяет эффективно десорбировать умифеновир – получаемые степени извлечения не превышают 1 %. Данная проблема была решена путем перевода аналита в протонированную форму за счет добавления в элюент 0,5 % (об.) муравьиной кислоты, что повышает эффективность элюирования до 100 ± 6 % и 84 ± 4 % для метанола и ацетонитрила, соответственно. Таким образом, с учетом чувствительности метода ВЭЖХ-ИСП-МС и степени концентрирования в ходе пробоподготовки ($\times 2000$) достигаемый предел обнаружения и нижние границы определяемых концентраций в пересчете на бром составляют 0,2 и 0,7 нг/л, соответственно.

В случае анализа осадков сточных вод, активного ила и донных отложений для извлечения аналитов разработан подход, основанный на применении жидкостной экстракции под давлением (ЖЭД). Изучена возможность применения в качестве экстрагентов ацетонитрила и метанола, в том числе с добавками кислоты и щелочи (рис. 10). При проведении процедуры экстракции при 100°C ни один из вариантов с метанолом (IV–VI) не позволяет достичь степени извлечения более 30 %, что может обуславливаться протеканием побочных процессов алкоголиза сложноэфирной связи, а также метилированием фенольной гидроксильной группы при повышенных температуре и давлении. Как и в случае элюирования с полимерного сорбента для ТФЭ, перевод умифеновира в протонированную форму путем добавки в экстрагент кислоты позволяет достичь максимальных величин степени экстракции (85 ± 4 % в случае ацетонитрила). Повышение температуры экстракции до 120°C приводит к снижению степени извлечения в 2,5 раза, что обусловлено термолабильностью умифеновира. Таким образом, предложенные условия ЖЭД донных отложений в сочетании с определением целевых аналитов методом ВЭЖХ-ИСП-МС обеспечивает достижение предела обнаружения и нижней границы определяемых концентраций на уровне 2 и 6,6 мкг/кг, соответственно.

В результате валидации установлено, что метод ВЭЖХ-ИСП-МС не подвержен матричным влияниям со стороны исследуемых объектов, и правильность определения умифеновира находится в диапазоне от 91 % до 109 %, внутрисуточная повторяемость и промежуточная прецизионности составили не более 8 % и 13 %, соответственно.

Разработанная методика определения умифеновира и трех важнейших его метаболитов в сточных и природных водах, а также осадках сточных вод и донных отложениях была апробирована на реальных образцах, отобранных в период пандемии COVID-19 на станции очистки муниципальных сточных вод г. Архангельска на различных стадиях. Образцы сточных вод СВ-1 и СВ-2 были отобраны на этапе механической очистки стоков и после этапа обработки гипохлоритом натрия, соответственно. Речная природная вода РВ и донные отложения ДО отобрана из реки Хаторица на расстоянии ~ 2 км ниже по течению от места сброса очищенных сточных вод. Смесь осадка сточных вод с активным илом (АИ) отобраны из отстойника после стадии биологической очистки. Примеры хроматограмм экстракта активного ила представлены на рисунке 11.

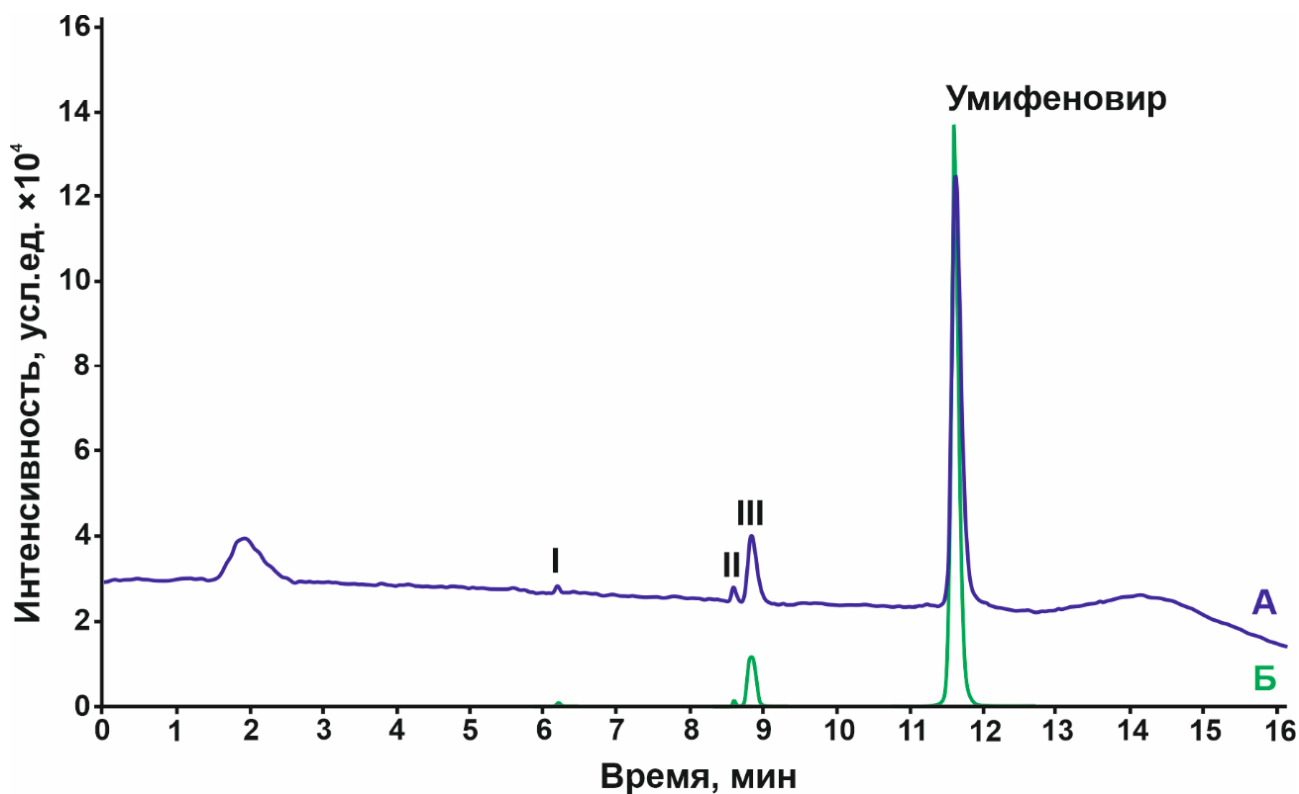


Рисунок 11. Хроматограммы, ацетонитрильного экстракта активного ила, полученные методом ВЭЖХ с детектированием в режиме ИСП-МС (А) и МСВР в режиме мониторинга выбранных ионов (Б)

Результаты анализа, приведенные в табл. 4, демонстрируют, что в поступающих на очистные городские сооружения сточных водах присутствуют как сам умифеновир, так и один из важнейших его метаболитов (метаболит III), образование которого обусловлено окислением атома серы с образованием сульфоновой группы.

Таблица 4. Результаты определения умифеновира и его метаболитов в реальных объектах

Аналит	Метаболит I	Метаболит II	Метаболит III	Умифеновир	
t_R , мин	6,2	8,7	8,9	11,8	
Брутто формула	$C_{16}H_{21}BrN_2O_4$	$C_{21}H_{23}BrN_2O_4S$	$C_{22}H_{25}BrN_2O_4S$	$C_{22}H_{25}BrN_2O_3S$	
Молекулярная масса	385,2578	447,3287	493,4216	477,4222	
Массовая доля (Br), %	21	18	16	17	
Концентрация, нг/л	СВ-1	-*	-	43 ± 3	260 ± 20
	СВ-2	-	-	$7,6 \pm 0,5$	$4,4 \pm 0,3$
	РВ	-	-	-	-
Содержание, мкг/кг	АИ	27 ± 3	98 ± 8	600 ± 50	3700 ± 400
	ДО	-	-	-	-

* – ниже НПОК

После прохождения всех стадий очистки (механическая, биологическая и дезинфекция активным хлором), содержание противовирусного препарата снижается на 2 порядка, что свидетельствует об эффективности используемой технологии подготовки воды в отношении данного загрязнителя. Необходимо отметить, что в период с 2021 по 2022 год на центральных очистных сооружениях города Архангельска

проводилась реконструкция, в результате которой было введено в эксплуатацию дополнительное количество отстойников, а также произведен переход с периодического дозирования гипохлорита натрия на этапе дезинфекции, на непрерывную подачу. В результате, в речной воде и донных отложениях не удалось обнаружить контролируемые соединения, что может так же объясняться значительным разбавлением очищенных стоков после сброса. Обращает на себя внимание изменение соотношения умифеновир/ метаболит III до и после очистки. На выходе с очистных сооружений доля метаболита значительно увеличивается, что может быть вызвано интенсификацией окислительных процессов с участием умифеновира в аэротенках с активным илом или в ходе дезинфекции. Наибольшие концентрации умифеновира были обнаружены в экстрактах активного ила, которые достигают $3,7 \pm 0,4$ мг/кг. Помимо этого, были обнаружены все контролируемые продукты, среди которых доминирует метаболит III (600 ± 50 мкг/кг), а минимальными содержаниями характеризуется метаболит I (27 ± 3 мкг/кг). Несмотря на очевидную эффективность удаления умифеновира при очистке сточных вод, значительная доля данного фармацевтического препарата и его метаболитов способна накапливаться активным илом. Последний, после выведения их технологического процесса, вывозится и складывается на иловых площадках, где может выступать в качестве источника вторичного загрязнения объектов окружающей среды. Это обуславливает необходимость проведения контроля за содержанием умифеновира и его метаболитов не только в сбрасываемых очищенных водах, но и в местах хранения отработанного активного ила и прилегающих водоемах.

ВЫВОДЫ

1. Предложен подход к высокочувствительному и селективному определению амброксола, бромгексина, умифеновира и бромсодержащих побочных продуктов их дезинфекции методом ВЭЖХ с комбинированным масс-спектрометрическим детектированием ИСП-МС и МСВР, без предварительной пробоподготовки на уровне концентрации $0,4$ мкг/л (в пересчете на бром).

2. Изучена трансформация исследуемых фармацевтических препаратов в условиях водного хлорирования. Установлено, что умифеновир образует 14 промежуточных продуктов трансформации, а бромгексин и амброксол – 21 и 6 продуктов, соответственно. При глубокой трансформации муколитических препаратов наряду с прогнозируемыми ППД образуются галоанилины (идентифицировано 9 новых представителей), а также впервые показана возможность образования галоиндазолов.

3. Проведена экоаналитическая оценка содержания умифеновира, бромгексина, амброксола и продуктов их трансформации в сточных и природных водах, активном иле и донных отложениях. Идентифицированы и определены умифеновир и три продукта его трансформации, которые в значительных количествах накапливаются в активном иле очистных сооружений на уровне концентраций: умифеновир

(1260 мкг/кг), продукт III (метаболит I; 1,3 мкг/кг), продукт VI (метаболит II; 13 мкг/кг) и продукт VII (метаболит III; 270 мкг/кг).

4. Разработана методика определения умифеновира и трех его метаболитов в объектах окружающей среды: метаболит I – (этил-6-бром-4-((диметиламино)метил)-5-гидрокси-2-(гидроксиметил)-1-метил-1H-индол-3-карбоксилат), метаболит II – (этил-6-бром-5-гидрокси-1-метил-4-(метиламино)метил)-2-фенилсульфоксидметилиндол-3-карбоксилат), метаболит III (этил-6-бром-5-гидрокси-1-метил-4-(диметиламино)метил)-2-фенилсульфоксидметилиндол-3-карбоксилат). Обращено-фазовое хроматографическое разделение и детектирование методом МСВР обеспечило надежное обнаружение и идентификацию аналитов в сложных матрицах. Метод ИСП-МС с регистрацией сигнала ^{79}Br позволил устранить матричные эффекты и использовать единый аналитический стандарт для их количественного определения. Твердофазная и жидкостная экстракции под давлением в методе пробоподготовки позволили достичь пределов обнаружения аналитов (в пересчете на бром) 0,2 нг/л в сточных и природных водах, и 2 мкг/кг в активном иле и донных отложениях.

5. Проведена апробация разработанной методики на реальных образцах сточной воды, активного ила и объектов окружающей среды. В муниципальных сточных водах определили умифеновир в концентрациях от 4,4 до 260 нг/л и его метаболит III от 23 до 7,6 нг/л. Наибольшее содержание исходного фармацевтического препарата – $3,7 \pm 0,4$ мг/кг, а также трех контролируемых метаболитов выявили в активном иле: метаболит I – 27 ± 3 мкг/кг, метаболит II – 98 ± 8 мкг/кг и метаболит III – 600 ± 50 мкг/кг.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Sypalov, S.A. Mucolytic drugs ambroxol and bromhexine: transformation under aqueous chlorination conditions / S.A. Sypalov, I.S. Varsegov, N.V. Ul'yanovskii, A.T. Lebedev, D.S. Kosyakov // International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – V. 25. – No. 10. – 5214.

2. Сыпалов, С.А. Определение умифеновира и его метаболитов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с комбинированным масс-спектрометрическим детектированием / С.А. Сыпалов, Н.В. Ульяновский, Д.С. Косяков, А.Т. Лебедев // Журнал аналитической химии. – 2023. – Т. 78. – No. 9. – С. 856-864.

3. Ul'yanovskii, N.V. Antiviral drug Umifenovir (Arbidol) in municipal wastewater during the COVID-19 pandemic: Estimated levels and transformation / N.V. Ul'yanovskii, D.S. Kosyakov, S.A. Sypalov, I.S. Varsegov, I.S. Shavrina, A.T. Lebedev // Science of The Total Environment. – 2022. – V. 805. – 150380.

4. Sypalov, S.A. Occurrence and Transformation of Antiviral Drug Umifenovir (Arbidol) in Municipal Wastewater / S.A. Sypalov, N.V. Ul'yanovskii, I.S. Varsegov, D.S. Kosyakov, A.T. Lebedev // Book of abstract 21st European Meeting on Environmental Chemistry. Serbia, Novi Sad. – 2021. – P. 105.

5. Сыпалов, С.А. Применение ВЭЖХ-МСВР и ВЭЖХ-ИСП-МС для скрининга умифеновира (Арбидола) и продуктов его трансформации / С.А. Сыпалов, Н.В. Ульяновский, И.С. Варсегов, Д.С. Косяков // В книге: «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» материалы VI Всероссийского симпозиума. Краснодар. – 2021. – С. 133.

6. Сыпалов, С.А. Определение умифеновира (Арбидола) и продуктов его трансформации в сточных водах г. Архангельска / С.А. Сыпалов, Н.В. Ульяновский, И.С. Варсегов, Д.С. Косяков, А.Т. Лебедев // В книге: «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы» тезисы докладов IX Всероссийской конференции с международным участием. Москва. – 2021. – С. 41

7. Сыпалов, С.А. Идентификация побочных продуктов трансформации амброксола и бромгексина при процессах водного хлорирования / С.А. Сыпалов, И.С. Варсегов, Н.В. Ульяновский, Д.С. Косяков, А.Т. Лебедев // Тезисы докладов, представленных на IV Съезде аналитиков России. Москва – 2022. – С. 261.

8. Сыпалов, С.А. Определение лекарственных препаратов в отходах очистных сооружений канализации города / С.А. Сыпалов, Н.В. Ульяновский, Д.С. Косяков, А.Т. Лебедев // В книге: «Химия и технология растительных веществ» тезисы докладов XII Всероссийской научной конференции с международным участием и школой молодых ученых. Киров. – 2022. – С. 189.

9. Сыпалов, С.А. Новый подход к нецелевому скринингу бромсодержащих побочных продуктов дезинфекции в водопроводной воде / С.А. Сыпалов, Н.В. Ульяновский, Д.С. Косяков, А.Т. Лебедев // В книге: «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы» тезисы докладов X Всероссийской конференции с международным участием. Москва. – 2023. – С. 65.

10. Сыпалов, С.А. Оптимизация условий извлечения амброксола и бромгексина из сточных вод и донных отложений для последующего хромато-масс-спектрометрического анализа / С.А. Сыпалов, Н.В. Ульяновский, Д.С. Косяков, А.Т. Лебедев // В книге: «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы» тезисы докладов X Всероссийской конференции с международным участием. Москва. – 2023. – С. 66.

Автор выражает глубокую признательность директору ЦКП НО «Арктика», к.х.н. Косякову Д.С., а также коллективу Центра за помощь в работе и поддержку.

Подписано в печать _____. Формат 60×84/22/
Усл. печ. л. 1,0. Тираж 100 экз. Заказ № ____.

Отпечатано с готового оригинал-макета
В издательском доме им. В.Н. Булатова САФУ
163060, г. Архангельск, ул. Урицкого, д. 56