

УДК 543.544.5:543.51

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УМИФЕНОВИРА И ЕГО МЕТАБОЛИТОВ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С КОМБИНИРОВАННЫМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

© 2023 г. С. А. Сыпалов^а, Н. В. Ульяновский^{а, *}, Д. С. Косяков^а, А. Т. Лебедев^а

^аСеверный (Арктический) федеральный университет имени М.В. Ломоносова, Центр коллективного пользования научным оборудованием “Арктика”

Набережная Северной Двины, 17, Архангельск, 163002 Россия

*e-mail: n.ulyanovsky@narfu.ru

Поступила в редакцию 11.04.2023 г.

После доработки 24.04.2023 г.

Принята к публикации 25.04.2023 г.

Разработан подход к высокочувствительному и селективному хромато-масс-спектрометрическому определению бромсодержащего противовирусного препарата умифеновира (Арбидол) и его метаболитов в природной и сточной водах, активном иле и донных отложениях, основанный на сочетании двух техник масс-спектрометрического детектирования — масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (МС-ИСП) и масс-спектрометрии высокого разрешения с ионизацией электро-распылением (МСВР-ЭРИ). Обращенно-фазовое хроматографическое разделение и детектирование на основе МСВР-ЭРИ обеспечивают надежное обнаружение и идентификацию аналитов в сложных матрицах, в то время как применение МС-ИСП с регистрацией сигнала ^{79}Br позволяет избежать матричных эффектов и использовать единый аналитический стандарт для количественного анализа. Применение твердофазной экстракции и жидкостной экстракции под давлением в качестве методов пробоподготовки позволило достичь пределов обнаружения на уровне 0.2 нг/л и 2 мкг/кг для жидких и твердых образцов соответственно. Разработанный подход успешно апробирован при анализе реальных объектов. Показано, что концентрации аналитов в городских сточных водах находятся в диапазоне 4.4–260 нг/л. Наибольшее содержание характерно для активного ила (до 3.7 мг/кг), который выступает эффективным сорбентом умифеновира и продуктов его трансформации.

Ключевые слова: умифеновир, арбидол, метаболиты, сточные воды, активный ил, ВЭЖХ-МС-ИСП, ВЭЖХ-МСВР.

DOI: 10.31857/S0044450223090153, EDN: ZYKEYI

Сезонные вирусные инфекции и особенно эпидемии (например, COVID-19) неизбежно приводят к резкому увеличению употребления противовирусных фармацевтических препаратов [1]. Среди значительного списка таких лекарств в Российской Федерации одним из наиболее распространенных и широко используемых является умифеновир (торговое название — Арбидол), который был лицензирован в 1993 г. как средство для борьбы с гриппом [2]. Благодаря широкому спектру действия и антиоксидантной активности умифеновир также нашел применение против вирусов герпеса человека, гепатитов В и С [3] и ряда других заболеваний.

Известно, что порядка 40% от суточной дозы умифеновира (200 мг — профилактическая, 800 мг — терапевтическая) выводится из организма в неизменном виде в первые сутки после примене-

ния [4], что приводит к поступлению значительных количеств данного соединения в муниципальные сточные воды. При этом относительно низкая токсичность для человека ($\text{LD}_{50} > 4 \text{ г/кг}$) не гарантирует безопасность умифеновира для водных экосистем. Так, имеющиеся в литературе оценки его биологической активности, сделанные с использованием QSAR-моделирования взаимосвязи структуры и свойств, относят умифеновир к группе соединений высокого риска для экологического состояния объектов окружающей среды и показывают потенциально низкую устойчивость к нему живых организмов [5]. Ситуация осложняется способностью умифеновира образовывать широкий спектр метаболитов, образующихся как в организме человека, так и в процессах очистки и дезинфекции сточных вод. В работе [6] нами показано, что благодаря высокой

антиоксидантной активности [7] ключевыми направлениями химических превращений умифеновира являются окисление по атому серы, гидроксилирование и деалкилирование. Образующиеся при этом продукты трансформации по биологической активности могут не только не уступать исходному соединению, но и существенно превосходить его. Это делает актуальной задачу организации систематического контроля умифеновира и его метаболитов в сточных водах и природных водных объектах, включая донные отложения. Ее решение существенно осложняется необходимостью проведения анализа на уровне следовых концентраций крайне сложных по химическому составу объектов, а также отсутствием стандартных образцов метаболитов. Преодоление указанных трудностей возможно при использовании современных методов хромато-масс-спектрометрии, обеспечивающих максимально высокую селективность и чувствительность анализа. Прежде всего, речь идет о высокоэффективной жидкостной хроматографии-тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения с электрораспылительной ионизацией (**ВЭЖХ-МСВР-ЭРИ**), позволяющей надежно выявлять и идентифицировать аналиты в сложных матрицах. Недостатком метода является его подверженность матричным эффектам в количественном анализе, эффективное устранение которых требует наличия труднодоступных изотопно-меченных аналитических стандартов. Благодаря наличию атома галогена в структуре умифеновира и его метаболитов, при решении задач нестандартного определения перспективно применение масс-спектрометрического детектирования с индуктивно связанной плазмой (**МС-ИСП**), отличающегося высокой чувствительностью по отношению к бром [8]. Широко известно применение **ВЭЖХ-МС-ИСП** для определения органических форм мышьяка и ртути в объектах окружающей среды и биологических тканях [9–11], а в последнее время и для изучения метаболизма лекарственных препаратов, содержащих такие гетероатомы, как селен, фосфор и галогены [12–14]. В работе [6] нами показана возможность использования комбинации двух техник масс-спектрометрического детектирования (**ИСП** и **МСВР**) для поиска и определения умифеновира и его метаболитов в сточных водах.

Настоящее исследование посвящено развитию данного направления и имеет целью разработку нового подхода к высокочувствительному и селективному определению умифеновира и его важнейших метаболитов в сточных водах, активном иле и донных отложениях, основанного на применении метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с комбинированным масс-спектрометрическим детектированием с использованием техник **МС-ИСП** и **МСВР-ЭРИ**.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты и материалы. Для приготовления подвижной фазы, буферных растворов и в качестве растворителей при экстракции использовали следующие реактивы: метанол (HPLC grade, Merck, Германия), муравьиную кислоту ($\geq 96\%$, Sigma-Aldrich, США) деионизованную воду с удельным сопротивлением 18.2 МОм·см (Тип 1), полученную с использованием системы Milli-Q (Millipore, Франция), ацетонитрил (0 сорт, Кριοхром, Россия), аммиак водный ос. ч., $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ х. ч., кислоту ортофосфорную ос. ч., гидроксид натрия х. ч. (Компонент-Реактив, Россия), тиосульфат натрия 5-водный стандарт-титр (Уралхиминвест, Россия). Для проведения модельного хлорирования использовали гипохлорит натрия, полученный в лабораторных условиях пропусканием газообразного хлора через раствор гидроксида натрия по известной процедуре [15]. По данным иодометрического титрования, содержание активного хлора в полученном растворе составило 110 г/л.

В работе использовали стандартный образец умифеновира гидрохлорида $\geq 98.0\%$ (Sigma-Aldrich, Германия).

Объекты исследования и подготовка проб. В качестве модельного, применяемого для оптимизации хроматографического разделения, выбрали раствор умифеновира после хлорирования, полученный способом, приведенным в работе [6]. Для этого в 10 мл 50 мМ фосфатного буферного раствора с pH 5, содержащего 20 мг/л умифеновира, добавляли гипохлорит натрия до достижения концентрации “активного” хлора, равной 4 мг/л. Спустя 10 мин с начала взаимодействия в реакционную смесь вносили 500 мкл 0.1 н раствора тиосульфата натрия для остановки реакции. Полученную смесь вводили в хроматографическую систему.

Образцы сточной воды и смеси осадка сточных вод с активным илом отбирали на городских очистных сооружениях канализации города Архангельска в ноябре 2022 г. Образец **СВ-1** представлял собой исходные сточные городские воды, поступающие на очистные сооружения. Образец **СВ-2** — сточная вода после этапа обработки гипохлоритом натрия (дезинфекции). Образец **РВ** — природная вода из реки Хаторица, отобранная на расстоянии ~2 км ниже по течению от места сброса очищенных сточных вод. Пробоподготовку и анализ образцов воды проводили непосредственно в день отбора. Образец **АИ** — смесь осадка сточных вод с активным илом массой ~2 кг с влажностью 65% отбирали из последнего отстойника после стадии биологической очистки. Образец массой 1 кг помещали в пластиковый контейнер, герметично закрывали, хранили при -20°C и размораживали непосредственно перед анализом.

Умифеновир и его метаболиты извлекали из сточной и речной вод методом твердофазной

экстракции (ТФЭ) с применением системы автоматической твердофазной экстракции Sepaths UP (LabTech, Италия). Использовали картриджи для ТФЭ, заполненные 200 мг функционализированного стирол-дивинилбензольного полимерного сорбента BondElut PPL (Agilent Technologies, США). Перед проведением процедуры экстракции картриджи предварительно кондиционировали путем последовательного пропускания через них 10 мл метанола и 10 мл деионизованной воды. Образцы сточной и природной воды объемом 1 л предварительно отфильтровывали через фильтр “синяя лента” и доводили до заданного значения pH 50 мМ фосфатным буферным раствором с добавкой серной кислоты или гидроксида натрия и пропускали через подготовленный сорбент со скоростью 10–15 мл/мин. После этого сорбент промывали 1 мл деионизованной воды, высушивали в потоке высокочистого азота (99.99%) и элюировали органическим растворителем объемом 10 мл. Полученный экстракт упаривали в токе азота до 500 мкл, центрифугировали и проводили хроматографический анализ.

Извлечение умифеновира и его метаболитов из осадков сточных вод, активного ила и донных отложений проводили методом жидкостной экстракции под давлением (ЖЭД) с использованием системы ASE-150 (Thermo Scientific, США). К исследуемому образцу массой 5 г добавляли диатомовую землю в соотношении 5 : 1 (по массе) и помещали смесь в ячейку из нержавеющей стали объемом 10 мл. Экстракцию проводили в атмосфере аргона высокой чистоты (99.99%) в течение 3 циклов по 10 мин каждый при температуре 100°C. По завершении процедуры ячейку промывали свежей порцией экстрагента, объем которого составлял 60% от объема ячейки. Полученный экстракт (~25–35 мл) упаривали до объема 10 мл в токе азота высокой чистоты (99.99%), фильтровали через нейлоновый мембранный фильтр (размер пор 0.2 мкм) и проводили хромато-масс-спектрометрический анализ.

Хромато-масс-спектрометрический анализ. Хроматографическое разделение проводили с использованием ВЭЖХ системы LC-30 Nexera (Shimadzu, Япония), состоящей из вакуумного дегазатора DGU-5A, двух хроматографических насосов LC-30AD, автодозатора SIL-30AC, термостата колонки CTO-20A и системного контроллера CBM-20A. Использовали хроматографическую колонку Nucleodur PFP 150 × 2 мм, размер частиц 1.8 мкм (Macherey-Nagel, Германия) с пентагидрофильной неподвижной фазой. Градиентное элюирование проводили при 40°C растворами 0.1%-ной муравьиной кислоты в воде и метаноле или ацетонитриле. Скорость потока подвижной фазы составляла 0.25 мл/мин, объем ввода — 5 мкл.

Обнаружение и количественный анализ бромсодержащих аналитов проводили методом МС-ИСП с использованием в качестве детектора системы Aurora Elite (Bruker, Германия), оснащенной квадрупольным масс-анализатором и коллизионно-реакционным интерфейсом (КРИ). Использовали следующие параметры: мощность ВЧ-генератора — 1.6 кВт, глубина отбора — 5 мм, скорость потока плазмообразующего, вспомогательного, дополнительного и распыляющего газа (Ar) 18.0; 1.65; 0.23 и 0.8 л/мин соответственно, время сканирования — 500 мс. Детектирование проводили в режиме мониторинга выделенных ионов (m/z 79). Водород и гелий высокой чистоты (20–50 мл/мин) использовали в качестве реагентов в КРИ. Управление масс-спектрометром, сбор и анализ данных осуществляли с использованием программного обеспечения Quantum и Compass CDS (Bruker, Германия).

Установление элементного состава и идентификацию обнаруживаемых аналитов проводили методом ВЭЖХ-МСВР с использованием квадруполь-времяпролетного масс-спектрометра TripleTOF 5600+ (AB Sciex, Канада), оснащенного источником ионов Duospray. Масс-спектрометрическое детектирование проводили в режиме генерации положительно заряженных ионов в условиях электрораспыления (ЭРИ(+)). Использовали следующие параметры ионного источника: давление распыляющего и осушающего газов 40 psi, давление газа завесы 30 psi, напряжение 5500 В и температура источника 300°C. Для повышения надежности идентификации аналитов записывали масс-спектры диссоциации, активированной соударениями, в режиме информационно-зависимого эксперимента с энергией соударений 40 эВ и спредом 20 эВ. Критерием для записи МС/МС-спектров являлось пороговое значение интенсивности сигнала иона-предшественника, равное 100 имп/с. Масс-спектры записывали в диапазонах масс 200–1000 Да (МС) и 20–1000 Да (МС/МС). Элементный состав определяли на основе точных масс и изотопного распределения ионов с использованием следующих ограничений: максимальное число атомов C — 100, H — 300, O — 20, N — 5, Br — 1, S — 1, Cl — 5, P — 2, погрешность определения массы <5 м.д. (МС) и <10 м.д. (МС/МС), отношение сигнал/шум ≥ 10. Калибровку шкалы масс в режимах МС и МС/МС выполняли непосредственно перед анализом в автоматическом режиме с использованием в качестве эталона раствора формиата натрия. Управление масс-спектрометром, сбор и анализ данных осуществляли с использованием программного обеспечения Analyst, PeakView, MasterView и FormulaFinder (AB Sciex, Канада).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

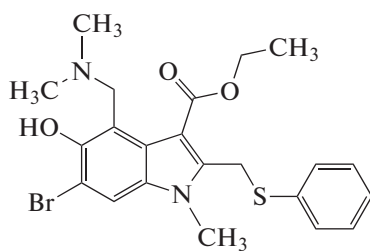
Определение умифеновира и его метаболитов методами ВЭЖХ-МСВР и ВЭЖХ-МС-ИСП. Иссле-

Таблица 1. Характеристики аналитов, используемые для идентификации при детектировании в режиме масс-спектрометрии высокого разрешения

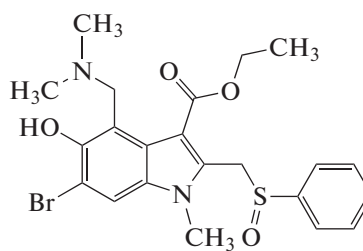
Аналит	Элементный состав	m/z	Погрешность, ppm	m/z ионов-продуктов (отн. интенсивность, %)
Метаболит I	$C_{16}H_{21}BrN_2O_4$	385.0767	2.5	293.9763 (95); 295.9911 (100); 340.0188 (60); 385.0769 (15)
Метаболит II	$C_{21}H_{23}BrN_2O_4S$	479.0651	3.1	278.9887 (60); 293.9760 (30); 323.0157 (100); 354.0581 (25)
Метаболит III	$C_{22}H_{25}BrN_2O_4S$	493.0807	3.2	278.9874 (50); 293.9750 (25); 323.0144 (100); 368.0727 (60)
Умифеновир	$C_{22}H_{25}BrN_2O_3S$	477.0856	2.9	278.9888 (80); 293.9763 (70); 323.0155 (35); 432.0279 (100)

дование модельного раствора продуктов трансформации умифеновира, полученного при действии гипохлорита натрия, демонстрирует присутствие как исходного соединения, так и трех важнейших метаболитов (схема 1), идентифицированных нами ранее в экспериментах по модельному хлорированию в различных условиях [6]. Указанные соединения выбраны нами в качестве целевых ана-

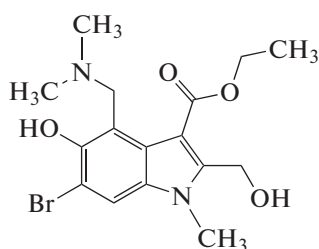
литов для контроля уровней загрязнения муниципальных сточных вод и природных водных объектов, находящихся под их воздействием, умифеновиром и продуктами его трансформации. Масс-спектрометрическая информация, необходимая для поиска и надежной идентификации четырех соединений в реальных образцах сточной воды и донных отложений, представлена в табл. 1.



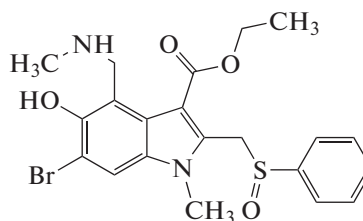
Умифеновир



Метаболит III



Метаболит I



Метаболит II

Схема 1. Структурные формулы умифеновира и важнейших его метаболитов.

Ввиду отсутствия стандартных образцов метаболитов умифеновира, а также крайней сложности исследуемых матриц, содержащих тысячи посторонних соединений, возможности для проведения количественного анализа методами жидкостной хромато-масс-спектрометрии существенно ограничены. Это в значительной степени относится и к исходному умифеновиру, поскольку надежное

устранение матричных эффектов при использовании масс-спектрометрического детектирования с ионизацией электрораспылением возможно лишь при наличии труднодоступных изотопно-меченных стандартов аналита. Тем не менее, благодаря наличию в структуре всех целевых аналитов атома брома, решением проблемы их надежного определения является применение масс-

спектрометрического детектирования, селективно-го по отношению к бром. Таким методом является масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой, которая в сочетании с хроматографическим разделением обеспечивает раздельное 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 аргонной плазме, требованием к таким стандартам является близкое к анализам 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 их отделение от полярных компонентов матрицы (в том числе бромид-ионов), элюирующихся с мертвым объемом хроматографической колонки. Оптимизация параметров хроматографического разделения ориентирована на обеспечение полного разделения пиков аналитов, минимизацию продолжительности анализа с целью сокращения потребления аргона и снижения себестоимости, а также устранение мешающих влияний при ионизации в условиях МС-ИСП. Сравнение ацетонитрила и метанола в качестве органических компонентов подвижной фазы показало несомненное преимущество последнего. В отличие от ацетонитрила, в условиях анализа метанол не дает существенных отложений углерода на входном конусе масс-спектрометра и обеспечивает высокую стабильность плазмы в течение длительного времени независимо от доли органического растворителя в подвижной фазе. В результате оптимизации выбрали следующую программу градиентного элюирования: 0–1 мин: 25% метанола, 1–20 мин: линейное повышение доли спирта до 100%, 20–30 мин: 100% метанола. Для снижения интенсивности образования нагара после элюирования всех компонентов с хроматографической колонки (16 мин) поток элюента автоматически перенаправляется в слив, минуя ионный источник масс-спектрометра.

В качестве аналитического иона выбрали $^{79}\text{Br}^+$ (m/z 79), поскольку использование изотопа ^{81}Br оказалось затруднительным вследствие существенно более высокого уровня полиатомных интерференций со стороны реальных проб, подвижной фазы и компонентов плазмы, в том числе за счет образования кластеров $^{40}\text{Ar}_2\text{H}^+$ [16]. Регистрация хроматограмм по иону с m/z 79 также показывает наличие интерференций со стороны кластеров аргона ($^{38}\text{Ar}^{40}\text{ArH}^+$ и $^{39}\text{K}^{40}\text{Ar}^+$), при этом наблюдается значительный дрейф базовой линии при увеличении доли метанола в элюенте. Для устране-

ния данного эффекта использовали коллизионно-реакционный интерфейс масс-спектрометра с подачей водорода и гелия в качестве реакционных газов. Как и ожидалось, наилучшие результаты дает использование водорода благодаря его способности к селективному взаимодействию с аргоном в плазме, оптимальный расход газа-реагента при этом составил 40 мл/мин. Применение КРИ позволило не только минимизировать полиатомные интерференции, но и повысить соотношение сигнал/шум более чем в 3 раза (рис. 1).

Анализ стандартных растворов умифеновира в широком диапазоне концентраций позволил определить инструментальные пределы обнаружения (ПО) и нижние границы определяемых концентраций (НГОК) на основании критериев 3σ и 10σ (соотношение сигнал/шум), а также линейные диапазоны концентраций аналитов (табл. 2). Градуировочные зависимости, полученные с использованием стандартного образца умифеновира, линейны в широком диапазоне концентраций (не менее четырех порядков величины) с коэффициентами корреляции R^2 более 0.99. Достигнутая чувствительность ВЭЖХ-МС-ИСП-анализа находится на уровне единиц мкг/л, близком к достигаемому в методе ВЭЖХ-МСВР, без предварительного концентрирования исследуемых образцов и обеспечивает решение практических задач. Это допускает эффективное совместное применение обеих техник для поиска и идентификации аналитов (ВЭЖХ-МСВР) и их селективного определения (ВЭЖХ-МС-ИСП). Концентрации метаболитов умифеновира при этом рассчитывают по концентрации брома с использованием пересчетных коэффициентов (табл. 2), учитывающих молекулярные массы аналитов. Необходимо отметить, что такой комбинированный метод анализа может быть использован для поиска и определения самых разных бромсодержащих соединений, элементный состав которых установлен на основании точных масс по данным ВЭЖХ-МСВР.

Оптимизация условий пробоподготовки образцов. 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 мы использовали подход, основанный на твердофазной экстракции аналитов с применением полимерного функционализированного сорбента BondElute PPL, обладающего сродством как к неполярным, так и к умеренно полярным анализам [17]. Параметры проведения твердофазной экстракции (pH и состав элюента) оптимизировали на модельных растворах, содержащих 0.5 мкг/л умифеновира. Величину pH варьировали в диапазоне от 2 до 12 (шаг 2 ед. pH).

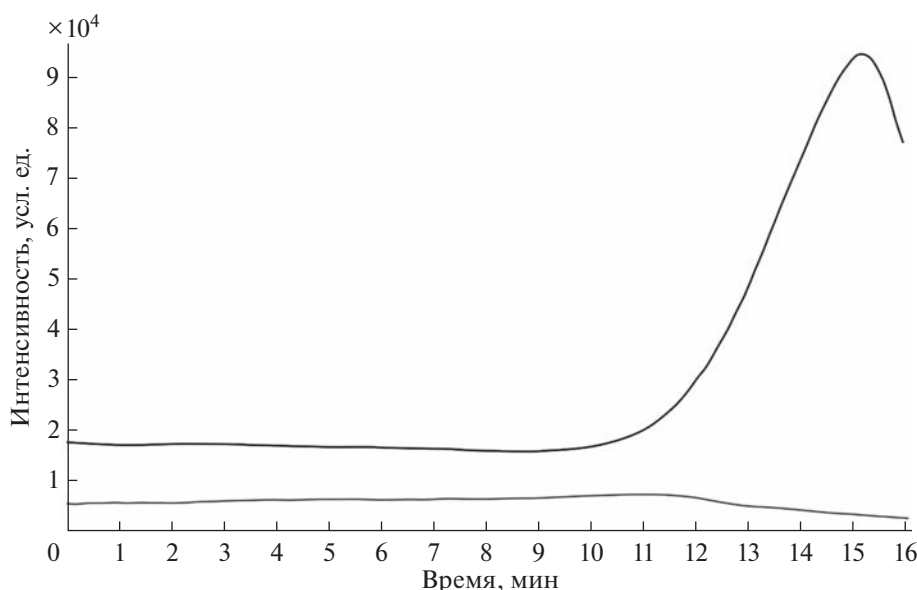


Рис. 1. Хроматограммы деионизованной воды в режиме градиентной ВЭЖХ-МС-ИСП без (сверху) и с применением (снизу) коллизионно-реакционного интерфейса.

Представленные на рис. 2а данные демонстрируют, что во всем исследуемом диапазоне pH 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 (pH 12) вследствие перевода аналита в молекулярную форму за счет депротонирования третичной аминной группы в его структуре. Значительное влияние на эффективность ТФЭ может оказывать природа растворителя, применяемого для элюирования аналитов с сорбента. Предварительные эксперименты показали, что применение чистого ацетонитрила или метанола не позволяет эффективно десорбировать умифеновир — степени извлечения не превышают 1%. Данную проблему решили путем перевода аналита в протонированную форму за счет добавления в элюент 0.5% (по объему) муравьи-

ной кислоты, что повышает эффективность элюирования до $100 \pm 6\%$ и $84 \pm 4\%$ для метанола и ацетонитрила соответственно. Таким образом, с учетом чувствительности метода ВЭЖХ-МС-ИСП 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. Изучена возможность применения в качестве экстрагентов ацетонитрила и метанола, в том числе с добавками кислоты и щелочи: I — ацетонитрил с 1% муравьиной кислоты, II — ацетонитрил, III — ацетонитрил с 1% аммиака, IV — метанол с 1% муравьиной кислоты, V — метанол, VI — метанол с

Таблица 2. Метрологические характеристики определения умифеновира и его метаболитов методом ВЭЖХ-МС-ИСП

Аналит	t_R , мин	Коэффициент $a_{Br} \times 10^4$ уравнения вида $y = ax$ (градуировка по брому)	Коэффициент $a \times 10^4$ уравнения вида $y = ax$ (градуировка по умифеновиру)	ПО, мкг/л (по брому)	НГОК, мкг/л (по брому)	ПО, мкг/л	НГОК, мкг/л	Линейный диапазон, мкг/л
Метаболит I	6.2	5.76	1.21	0.4	0.7	1.5	5.0	НГОК—50000
Метаболит II	8.7		1.04			1.8	5.9	
Метаболит III	8.9		0.92			2.1	6.9	
Умифеновир	11.8		0.98			2.0	6.6	

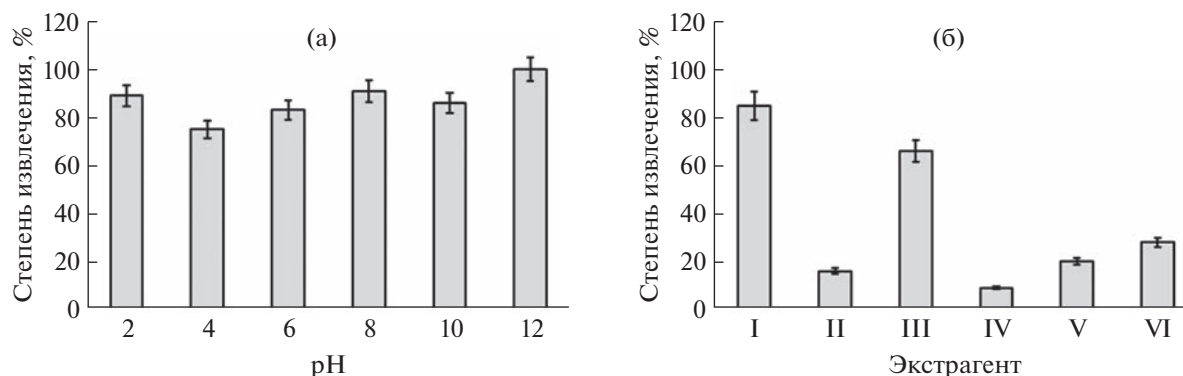


Рис. 2. Степень извлечения умифеновира в зависимости от величины pH водного образца (слева) при твердофазной экстракции и типа применяемого органического экстрагента (справа) при экстракции донных отложений методом жидкостной экстракции под давлением.

1% аммиака. При проведении процедуры экстракции при 100°C ни один из вариантов с метанолом (IV–VI) не позволяет достичь степени извлечения более 30% (рис. 2б). Это может быть обусловлено протеканием побочных процессов алкоголиза сложноэфирной связи, а также метилированием фенольной гидроксильной группы при повышенных температуре и давлении. Чистый ацетонитрил (II) также характеризуется крайне низкой эффективностью — извлечение находится на уровне 15–20%. Как и в случае элюирования с полимерного сорбента для ТФЭ, перевод аналита в протонированную форму путем добавки в экстрагент кислоты позволяет достичь максимальных величин степени экстракции, которые составили $85 \pm 4\%$. Увеличение температуры экстракции не привело к повышению эффективности извлечения. Наоборот, при 120°C наблюдается снижение степени извлечения в 2.5 раза, что обусловлено термолabileностью умифеновира. Таким образом, предложенные условия ЖЭД донных отложений в сочетании с определением целевых аналитов методом ВЭЖХ-МС-ИСП обеспечивают достижение предела обнаружения и нижней границы определяемых концентраций на уровне 2 и 6.6 мкг/кг соответственно.

Анализ реальных объектов. Предложенные подходы к определению умифеновира и трех важнейших его метаболитов в сточных и природных водах, а также осадках сточных вод и донных отложениях характеризуются высокой чувствительностью, что позволяет контролировать содержание данных аналитов на следовом уровне. Для апробации предложенного подхода проведен анализ образцов, отобранных в период пандемии COVID-19 на станции очистки муниципальных сточных вод г. Архангельска. Примеры хроматограмм экстракта активного ила представлены на рис. 3. При обнаружении целевых соединений рассчитывали их содержание на основе градуировочной зависимости, по-

лученной с использованием коммерчески доступного аналитического стандарта умифеновира.

Данные табл. 3 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. После прохождения всех стадий очистки (механическая, биологическая и дезинфекция активным хлором) содержание фармацевтического препарата снижается на два порядка, что свидетельствует об эффективности используемой технологии подготовки воды в отношении данного загрязнителя. Следует также отметить, что в речной воде не удалось обнаружить контролируемые соединения, что может объясняться как значительным разбавлением очищенных стоков после сброса, так и возможным накоплением остаточных количеств донными отложениями. 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 обнаружены в экстрактах активного ила, которые достигают 3.7 ± 0.4 мг/кг. Помимо этого обнаружены все контролируемые продукты, среди которых доминирует метаболит III (600 ± 50 мкг/кг), а минимально содержание метаболита 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 из технологического процесса вывозится и складировается на иловых площадках, где может выступать в

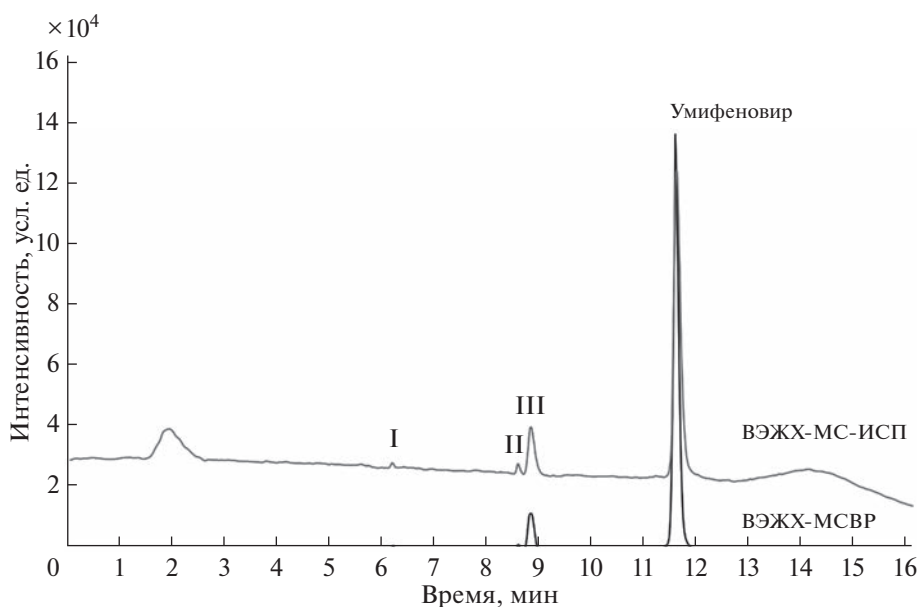


Рис. 3. Хроматограммы экстракта активного ила (образец АИ), полученные методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с детектированием в режиме масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (сверху) и масс-спектрометрии высокого разрешения (снизу).

Таблица 3. Результаты определения умифеновира и его метаболитов в реальных объектах

Параметр	Метаболит I ($t_R = 6.2$)	Метаболит II ($t_R = 8.7$)	Метаболит III ($t_R = 8.9$)	Умифеновир ($t_R = 11.8$)
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 ± 0.5	4.4 ± 0.3
РВ	—	—	—	—
Содержание, мкг/кг				
АИ	27 ± 3	98 ± 8	600 ± 50	3700 ± 400

* Ниже НГОК.

качестве источника вторичного загрязнения объектов окружающей среды. Это обуславливает необходимость проведения контроля содержания умифеновира и его метаболитов не только в сбрасываемых очищенных водах, но и в местах хранения отработанного активного ила и прилегающих водоемах.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП НО «Арктика» Северного (Арктического) федерального университета им. М.В. Ломоносова при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-13-00377).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Suda K.J., Hunkler R.J., Matusiak L.M., Schumock G.T. Influenza antiviral expenditures and outpatient prescriptions in the United States, 2003–2012 // *Pharmacotherapy*. 2015. V. 35. № 11. P. 991. <https://doi.org/10.1002/phar.1656>
2. Трофимов Ф.А., Цышкова Н.Г., Зотова С.А., Гринев А.Н. Синтез нового противовирусного препарата Арбидола // *Фармацевтический химический журнал*. 1993. Т. 27. № 1. С. 75. (Trofimov F.A., Tsyshkova N.G., Zotova S.A., Grinev A.N. Synthesis of a new antiviral agent, arbidole // *Pharm. Chem. J.* 1993. V. 27. № 1. P. 75.) <https://doi.org/10.1007/BF00772858>
3. Pécheur E.I., Borisevich V., Halfmann P., Morrey J.D., Smees D.F., Prichard M., Mire C.E., Kawaoka Y., Geisbert T.W., Polyak S.J. The synthetic antiviral drug arbidol inhibits globally prevalent pathogenic viruses // *J. Virol.* 2016. V. 90. № 6. P. 3086. <https://doi.org/10.1128/JVI.02077-15>

4. Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата Арбидол.
https://arbidol.ru/files/arbidol_maksimum_kapsuly_200_mg.pdf?v=20210224 (дата обращения 08.04.2023).
5. Kuroda K., Li C., Dhangar, K., Kumar M. Predicted occurrence, ecotoxicological risk and environmentally acquired resistance of antiviral drugs associated with COVID-19 in environmental waters // *Sci. Total Environ.* 2021. V. 776. Article 145740.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145740>
6. Ul'yanovskii N.V., Kosyakov D.S., Sypalov S.A., Varsegov I.S., Shavrina I.S., Lebedev A.T. Antiviral drug Umifenovir (Arbidol) in municipal wastewater during the COVID-19 pandemic: Estimated levels and transformation // *Sci. Total Environ.* 2022. V. 805. Article 150380.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150380>
7. Proskurnina E.V., Izmailov D.Y., Sozarukova M.M., Zhuravleva T.A., Leneva I.A., Poromov A.A. Antioxidant potential of antiviral drug umifenovir // *Molecules.* 2020. V. 25. № 7. P. 1577.
<https://doi.org/10.3390/molecules25071577>
8. Muller A.L., Mello P.A., Mesko M.F., Duarte F.A., Dressler V.L., Muller E.I., Flores E.M. Bromine and iodine determination in active pharmaceutical ingredients by ICP-MS // *J. Anal. At. Spectrom.* 2012. V. 27. № 11. P. 1889.
<https://doi.org/10.1039/C2JA30212H>
9. Xie R., Johnson W., Spayd S., Hall G.S., Buckley B. Arsenic speciation analysis of human urine using ion exchange chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry // *Anal. Chim. Acta.* 2006. V. 578. № 2. P. 186.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.06.076>
10. de Souza S.S., Campiglia A.D., Barbosa Jr F. A simple method for methylmercury, inorganic mercury and ethylmercury determination in plasma samples by high performance liquid chromatography–cold-vapor-inductively coupled plasma mass spectrometry // *Anal. Chim. Acta.* 2013. V. 761. P. 11.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.11.038>
11. McSheehy S., Pohl P., Łobiński R., Szpunar J. Investigation of arsenic speciation in oyster test reference material by multidimensional HPLC-ICP-MS and electrospray tandem mass spectrometry (ES-MS-MS) // *Analyst.* 2001. V. 126. № 7. P. 1055.
<https://doi.org/10.1039/B102225N>
12. Bierla K., Dernovics M., Vacchina V., Szpunar J., Bertin G., Lobinski R. Determination of selenocysteine and selenomethionine in edible animal tissues by 2D size-exclusion reversed-phase HPLC-ICP MS following carbamidomethylation and proteolytic extraction // *Anal. Bioanal. Chem.* 2008. V. 390. P. 1789.
<https://doi.org/10.1007/s00216-008-1883-5>
13. Klencsár B., Li S., Balcaen L., Vanhaecke F. High-performance liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma–Mass spectrometry (HPLC-ICP-MS) for quantitative metabolite profiling of non-metal drugs // *Trends Anal. Chem.* 2018. V. 104. P. 118.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.09.020>
14. Liu D., Chen G., Huo Z., Liu H., Ji W., Liu H. A study of bromine speciation in human serum and amroxol determination in rat plasma by liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry // *Chromatographia.* 2019. V. 82. P. 927.
<https://doi.org/10.1007/s10337-019-03730-z>
15. Brauer G. Handbook of Preparative Inorganic Chemistry. New York: Academic Press Inc., 1993. 1906 p.
16. Lyon T.D.B., Robin P.A., Watson W.S., Littlejohn D. Determination of elevated concentrations of bromine in serum by ICP-MS and ICP-OES // *J. Anal. At. Spectrom.* 2005. V. 20. № 8. P. 757.
<https://doi.org/10.1039/B417529H>
17. Kosyakov D.S., Ul'yanovskii N.V., Popov M.S., Latkin T.B., Lebedev A.T. Halogenated fatty amides – A brand new class of disinfection by-products // *Water Res.* 2017. V. 127. P. 183.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.10.008>