

6. Патент РФ № 2260900 Милонов М.В., Кузнецов Л.А., Ермолаева Т.Н. Кварцевый генератор, заявл. 21.05.2005, опубл. 20.09.2005.

7. Киселев А.В., Пошкус Д.П., Яшин Я.И. Молекулярные основы адсорбционной хроматографии. М.: Химия, 1986. 272 с.

8. Кучменко Т.А. Применение метода пьезокварцевого микровзвешивания в аналитической химии. Воронеж: Воронеж. гос. технол. акад., 2001. 280 с.

9. Коренман Я.И., Мельникова Е.И., Нифталиев С.И., Боева С.Е. Определение органических ароматобразующих веществ с применением мультисенсорной системы // Журн. аналит. химии. 2007. Т. 62, № 6. С. 655 – 659.

---

**Нифталиев Сабухи Ильич** – д.х.н., зав. кафедрой общей и неорганической химии, Воронежская государственная технологическая академия, Воронеж

**Niftaliev Sabukhi I.** – Doctor of Chemistry head of chair of the general and inorganic, Voronezh State Technological Academy, Voronezh

**Мельникова Елена Ивановна** – д.т.н., профессор кафедры технологии молока и молочных продуктов, Воронежская государственная технологическая академия, Воронеж, Тел. (4732) 53-13-09

**Melnikova Elena I.** – Doctor of Technical Science, professor of chair of technology of milk and diary products, Voronezh State Technological Academy, Voronezh

**Селиванова Анна Александровна** аспирант кафедры общей и неорганической химии, Воронежская государственная технологическая академия, Воронеж

**Selivanova Anna A.** – post-graduate student of chair of the general and inorganic chemistry, Voronezh State Technological Academy, Voronezh, e-mail: sanna130485@rambler.ru

УДК 543.38:543.9

## **Определение аминогликозидных антибиотиков в пищевых продуктах с помощью пьезокварцевых иммуносенсоров**

Воронежцева О.В., Ермолаева Т.Н.

*Липецкий государственный технический университет, Липецк*

Поступила в редакцию 8.09.2010 г.

---

### **Аннотация**

Разработаны методики определения аминогликозидных антибиотиков в продуктах животного происхождения с помощью пьезокварцевых иммуносенсоров. Изучены условия иммобилизации конъюгатов антибиотиков с белковыми молекулами на подложках, полученных методом самоорганизующихся тиольных (стрептомицин) монослоев. Оценка качества покрытий проводили методами атомной силовой микроскопии и пьезокварцевым микровзвешиванием. Сенсоры апробированы при определении стрептомицина и гентамицина в курином мясе.

**Ключевые слова:** пьезокварцевый иммуносенсор, самоорганизующиеся монослои, алкилтиолы, антибиотики, антитела, атомная силовая микроскопия

The methodic for aminoglycoside antibiotics determination in food by piezoquarts immunosensors is developed. Studied immobilization conditions of hapten-protein conjugates molecules on wafers, obtained by self-assembled monolayers on the the basis of thiol (streptomycin) substrates. Assessment of the coatings quality was performed by microbalance and atomic force microscopy methods. Method was tested on streptomycin and gentamycin identification in chicken.

**Keywords:** piezoquarts immunosensor, self-assembled monolayer, alkiltioly, antibiotics; antibodies, atomic force microscopy

## Введение

Неконтролируемое использование антибиотиков для лечения и профилактики инфекционных заболеваний крупного рогатого скота, птицы и пчёл приводит к их накоплению в пищевой продукции и негативному влиянию на здоровье человека. Широкое распространение получили аминогликозидные антибиотики - стрептомицин, гентамицин, как наиболее эффективные и имеющие невысокую стоимость. Содержание аминогликозидных антибиотиков в продукции животноводства строго нормируется (ПДК гентамицина в пище 100 мкг/кг, стрептомицина 500 мкг/кг в мясе и печени, 1000 мкг/кг в почках, 200 мкг/л в молоке, 20 мкг/кг в меде. Еще более низкие значения ПДК установлены для детского питания) [1, 2].

Пьезокварцевые иммуносенсоры являются удобным инструментом для выявления и определения низких концентраций антибиотиков в сложных пробах. Чувствительность детектирования токсикантов в значительной степени определяется качеством рецепторного слоя, удобным и доступным расположением биомолекул для последующего комплементарного взаимодействия. Поскольку при непосредственном закреплении белковых молекул на золотой поверхности образуются неустойчивые биослои, позволяющие осуществлять лишь один или два цикла измерения, в процедуру иммобилизации включают предварительную модификацию поверхности металлического электрода сенсора.

Известны различные приемы создания подложки с помощью белковых слоев из конканавалина А, авидин-биотинового комплекса, полимерных пленок на основе полиэтиленгликолей или поливинилового спирта [3]. Однако такие модификаторы не способствуют получению покрытия, устойчивого в жидких средах – рецепторный слой быстро разрушается и выдерживает не более 5 – 10 циклов измерений.

Наиболее перспективной является модификация поверхности электродов с помощью тиолов и силанов методом самоорганизованных монослоев. В этом случае происходит не только плотное сцепление с металлической поверхностью электрода, но и уплотнение пленки вследствие поперечной сшивки с образованием прочных наноструктурированных слоев. При этом молекулы, участвующие в самоорганизации монослоя, ориентируются определенным образом к поверхности металлического электрода, обеспечивая высокую адгезию, и по отношению к анализируемому раствору, что позволяет использовать такую поверхность для эффективной иммобилизации гаптен-белковых конъюгатов. Более подробно исследованы условия образования самоорганизующихся монослоев на основе силанов и тиолов линейной структуры [4 – 8]. Однако влияние строения тиосоединений, наличие в молекулах гетероциклов, присутствие нескольких функциональных групп не изучалось, хотя такие факторы могут оказывать как положительное, так и отрицательное влияние на толщину или массу покрытия.

Цель настоящего исследования - проведение сравнительного анализа способов формирования подложки на золотом электроде пьезокварцевого резонатора с помощью силанов и тиолов, изучение влияния различных условий формирования рецепторного слоя на чувствительность и устойчивость пьезокварцевого иммуносенсора, разработка методики определения следовых концентраций антибиотиков в пищевых продуктах.

## Эксперимент

**Реактивы и оборудование:** Объекты исследования: аминогликозидные антибиотики - стрептомицин и гентамицин ("Sigma", США). В работе применяли следующие иммунореагенты: стрептомицин – белковый конъюгат (STP-cc-BSA), гентамицин-белковый конъюгат (GENT-BSA), полученные сшивкой антибиотика с бычьим сывороточным альбумином (BSA), кроличьи и овечьи сыворотки, содержащие поликлональные антитела к стрептомицину, гентамицину (предоставлены профессором Р. Абукнешей (Королевский колледж, Великобритания)).

Для получения покрытий использовали  $\gamma$ -аминопропилтриэтоксисилан ("Reanal", Венгрия), меркаптопропионовую кислоту, 11-меркаптоундеканол; 1-циклогексил-3(2-морфолиноэтил)карбодиимид; S-Acetylmercatosuccinic Anhydrite; цистамин (Sigma, США); кросс-реагенты: глутаровый альдегид (GA) ("Reanal", Венгрия), цианур хлорид (CC) ("Sigma", США), 1-этил-3-(3-диметиламинопропилкарбодиимид) (EDAC) и N-гидросукцинимид (NHC) (Sigma, США). Химические реагенты: гидрофосфат, гидроксид и азид натрия (ч.д.а., Россия), хлорид, дигидрофосфат и роданид калия (ч.д.а., Россия), этиловый спирт, ректификат, 96 % (Россия), солянокислый гидроксилламин, мочевиная, фенол, диэтиламин гидрохлорид и хлорид магния, соляная кислота, азотная кислота, ацетон (х.ч., Россия), ацетонитрил ("Quimica", Испания). В работе применяли фосфатный буферный физиологический раствор [8, 10].

В качестве сенсоров использовались пьезокварцевые резонаторы отечественного производства АТ – среза с золотыми электродами, диаметром 5 мм и собственной частотой 10 МГц  $\pm$  1 Гц («Этна», Россия). Аналитический сигнал аффинного пьезокварцевого сенсора ( $\Delta f$ ) измеряли на установке, описанной ранее [9].

Таблица 1. Способы иммобилизации

Способ	Тиосоединение (объем, мкл)	Концентрация тиосоединения	Кросс-реагент (объем, мкл)	Концентрация кросс-реагента	Продолжительность иммобилизации, ч
1	Меркаптопропионовая кислота (1)	0,01%; 0,02%, 0,03%, 0,05%	NHS (5-10)	2 мМ	12
2	Меркаптопропионовая кислота (1)	0,01%, 0,02%, 0,03%	NHS и EDAC (1)	2 мМ	0,5
3	11-Меркаптоундеканол (5)	0,01%; 0,02%, 0,03%, 0,05%	глутаровый альдегид (5)	2,5%	0,5
4	Ангидрид S-меркаптоянтарной кислоты (7)	0,03%	глутаровый альдегид (5)	2,5%	0,5
5	Цистамин (1)	0,01%	цианур хлорид или глутаровый альдегид (5-10)	2 мМ	12

Иммобилизация рецепторного слоя. Иммобилизацию антибиотик-белковых конъюгатов осуществляли на предварительно очищенную соляной кислотой (0,1 н),

а затем ацетоном поверхность золотых электродов сенсоров. На металлическую поверхность наносили раствор тиосоединений различных концентраций в этиловом спирте (табл. 1), выдерживали в течение фиксированного времени при 298 К, добавляли кросс-реагент и через 20 мин помещали в холодильник при температуре 277 К (24 ч). Подложку промывали буферным раствором и наносили 5-10 мкл конъюгата (0,5 мкг/мл).

Перед проведением первого измерения сенсор промывали с помощью фосфатного буферного раствора от несвязавшихся иммунореагентов до стабилизации частоты колебаний. При создании нового покрытия использованный тиослой удаляли соляной кислотой (0,1 М раствор и конц. HCl ( $\rho = 1,198 \text{ г/см}^3$ )).

**Атомно-силовая микроскопия.** АСМ изображение поверхности получали с помощью атомно-силового микроскопа SOLVER P47 Pro (ЗАО «Нанотехнология-МДТ», Зеленоград, Россия) в режиме прерывистого контакта на воздухе с использованием кантилеверов NSGO 1/20 (Зеленоград, Россия) из кремния с номинальной жесткостью 5 Н/м, резонансной частотой сканирования в диапазоне 120–180 кГц и радиусом закругления 2 нм. Получены 2D, 3D – изображения поверхности и рассчитаны средние коэффициенты шероховатости ( $R_a$ ) с применением программного обеспечения NOVA.

**Метод пьезокварцевого микровзвешивания.** Качество полученных покрытий оценивали по следующим параметрам:

- массе биослоя (мкг), рассчитанной по уравнению:  $\Delta m_{\text{пл}} = 1,23 \cdot \Delta f'$ , где  $\Delta f'$  – разность частот колебания сенсора до и после иммобилизации,
- числу устойчивых циклов измерений  $N$  (аналитический сигнал не снижается более чем на 5%),
- концентрационной чувствительности ( $A$ ,  $\text{Гц} \cdot \text{мл} \cdot \text{мкг}^{-1}$ ) сенсора, показывающей изменение частоты колебаний иммуносенсора:  $A = \Delta f / c_{\text{Ag}(A_T)}$ .

## Обсуждение результатов

Поскольку для определения низкомолекулярных антибиотиков с помощью пьезокварцевого иммуносенсора применяется конкурентный формат анализа, на поверхности золотых электродов иммобилизовали определяемое соединение, сконъюгированное с белковой молекулой. Процесс иммобилизации включал получение подложки методом самоорганизации на основе тиолов. Для формирования монослоев использованы моно- и дитиосоединения с различными концевыми функциональными группами, влияющими на длину линкерного мостика (рис. 1).

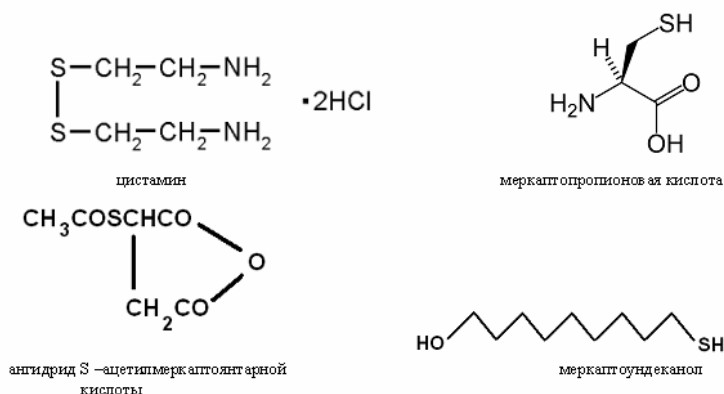


Рис. 1. Структурные формулы тиольных производных

При нанесении раствора тиосоединений на поверхность электродов образуются координационные связи S – Au (рис. 2а). Затем, вследствие самоориентирования молекул происходит упорядочивание структуры (в частности, при использовании тиосоединений линейного строения молекулы располагаются в плоскости перпендикулярно поверхности электрода и практически параллельно друг другу; рис. 2б). Поэтому качество покрытий на основе цистамина, меркаптопропионовой кислоты, ангидрида S-меркаптоянтарной кислоты сравнивали с характеристиками 11-меркаптоундеканола, регистрируя изменение массы и морфологии поверхности после формирования слоя модификатора, нанесения кросс-реактанта и закрепления биомолекул (табл. 2).

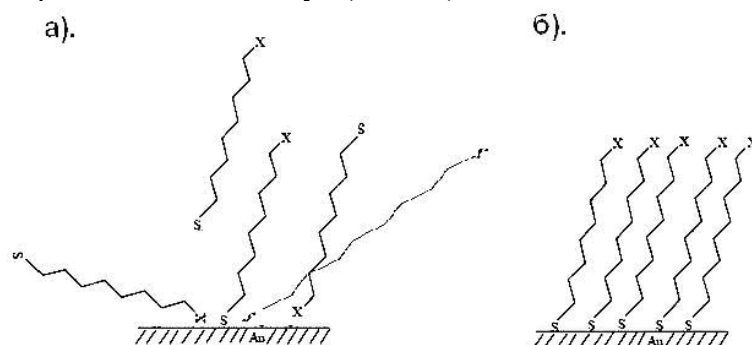


Рис. 2. Последовательное образование монослоя на основе тиосоединения линейного строения

Аналитический сигнал сенсора с подложками на основе различных тиосоединений измеряли при его погружении в раствор стрептомицина (50 нг/мл).

Поскольку поверхность золотого электрода, полученного магнетронным напылением, характеризуется высокой шероховатостью ( $R_a = 265 - 301$ ), затрудняющей формирование однородного рецепторного слоя сенсора, то главной задачей при модификации с помощью самоорганизованных монослоев являлось выравнивание поверхности и обеспечение высокой адгезии к металлическому электроду.

Покрытия на основе цистамина и меркаптопропионовой кислоты имеют близкую структуру, однако образование монослоя цистамина происходит за счет разрыва дисульфидной связи, в результате к поверхности сенсора присоединяется цепочка на основе двух углеродных атомов и образуется более короткая линкерная ножка. Достоинством покрытий на основе 11- меркаптоундеканола и цистамина является более длительный срок службы и продолжительность хранения - монослои устойчивы при соприкосновении с воздухом, водным или спиртовыми растворами в течение нескольких месяцев.

Меркаптопропионовая кислота, вследствие присутствия в ее молекуле активных атомов азота, карбонильного и гидроксильного кислорода, образует сверхсшитое, плотное, тонкое, устойчивое покрытие, однако минимальные значения концентрационной чувствительности и аналитического сигнала свидетельствуют о невысокой концентрации поверхностных функциональных групп, обеспечивающих связывание с биомолекулами.

При применении ангидрида S-меркаптоянтарной кислоты, из-за участия атома кислорода и присутствия в молекуле гетероцикла, формируются более тяжелые покрытия, существенно снижающие интервал определяемых содержаний

антибиотиков. Поэтому ангидрид S-меркаптоянтарной кислоты может быть рекомендован для формирования только смешанных монослоев.

Таблица 2. Характеристики покрытий сенсоров для определения стрептомицина (P = 0,95, n=3)

Тиосоединение	Характеристика отдельных стадий	R <sub>a</sub> , нм	m <sub>подл.</sub> , мкг	Δf, Гц	A, Гц·мл·мкг <sup>-1</sup>	N
11-Меркаптоундеканол	Поверхность электрода	278	-	-	-	-
	Монослой (0,03%)	103	22,26	18,1±1,0	6,03	-
	Кросс-реагент (GA)	131	27,68	22,5±2,3	7,50	-
	Конъюгат	175	29,15	23,7±0,5	7,90	25
Меркаптопропионовая кислота	Поверхность электрода	295	-	-	-	-
	Монослой (0,02%)	180	10,12	8,2±1,0	2,73	-
	Кросс-реагент(NHS)	207	13,91	11,3±0,5	3,77	-
	Кросс-реагент(NHS+EDAC)	229	18,20	14,8±1,2	4,93	-
	Конъюгат (NHS)	215	28,30	23,0±2,4	7,67	10
	Конъюгат (NHS+EDAC)	197	19,50	16,3±1,0	5,43	6
Цистамин	Поверхность электрода	265	-	-	-	-
	Монослой (0,01%)	117	9,69	7,9±0,2	2,63	-
	Кросс-реагент (CC)	125	11,20	8,5±1,1	2,93	-
	Конъюгат	146	14,03	9,6±0,8	8,19	21
Ангидрид S-меркаптоянтарной кислоты	Поверхность электрода	301	270,00	219,5±8,1	73,17	-
	Монослой (0,03%)	315	282,40	229,6±3,7	76,53	-
	Кросс-реагент (GA)	349	289,30	235,5±6,1	78,40	-
	Конъюгат	392	-	-	-	1

При определении гентамицина использовали подложки на основе – аминопропилтриэтоксисилана [12].

Для детектирования низкомолекулярных антибиотиков применяли конкурентный формат анализа: к пробе, содержащей аналит, добавляли раствор антител с концентрацией, соответствующей 50 % - ному связыванию, и выдерживали в течение 2-3 минут до завершения реакции образования гомогенного иммунного комплекса антибиотика с антителами. Затем пробу вводили в поток раствора-носителя, и после попадания ее в ячейку детектирования, измеряли аналитический сигнал при взаимодействии несвязавшихся антител с гаптен-белковым конъюгатом, иммобилизованным на поверхности электрода сенсора. Применение концентрации антител, соответствующей 50% связыванию (рис. 3), позволяло достичь оптимального соотношения активных центров на поверхности иммуносенсора и количества молекул антител, не связавшихся в гомогенный иммунокомплекс с антибиотиком. Использование концентрации антител за пределами линейной зависимости, приводит к искажению сигнала сенсора из-за

неспецифического связывания в области малых концентраций и изменения массы в области больших концентраций.

Концентрация, соответствующая 50% связыванию антител к стрептомицину An-STP (10.11.01) и An-STP-BSA (Sheep) составляет 13 и 8 мкг/мл, к гентамицину An-G-KLH (27.09.02) и An-G-KLH (26.04.00) - 35 мкл/мл и 40 мкл/мл соответственно.

Возможность использования антител для молекулярного распознавания антибиотиков оценивалась по константе аффинности ( $K_{Аф}$ ), характеризующей сродство и специфичность иммунореагентов, рассчитанной по методике Скэтчарда как отношение констант скоростей образования ( $k_o$ ) и разрушения ( $k_p$ ) гетерогенного иммунокомплекса (табл. 3).

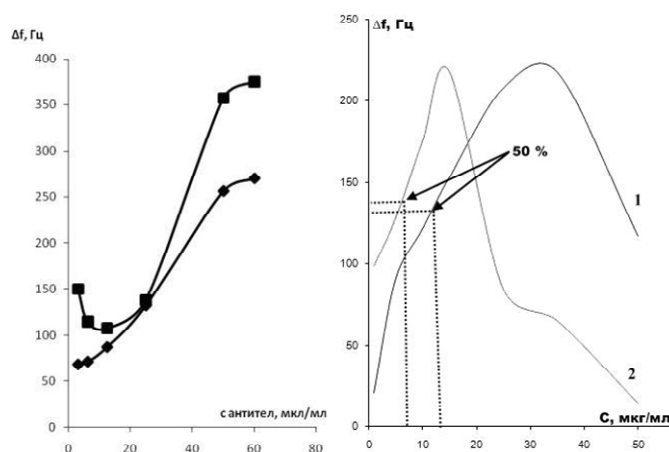


Рис.3. Зависимость изменения частоты колебаний сенсора от концентрации антител: а) 1 - An-G-KLH (27.09.02); 2 – An-G-KLH (26.04.00); б) 1- An-STP (10.11.01), 2 - An-STP (Sheep) к стрептомицину

Таблица 3. Константы скорости прямой и обратной иммунохимической реакции и  $K_{Аф}$  антител к стрептомицину и гентамицину

Применяемые антитела	$k_o * 10^{-4}$ , моль <sup>-1</sup> ·л·с <sup>-1</sup>	$k_p * 10^5$ , моль <sup>-1</sup> ·л·с <sup>-1</sup>	$K_{Аф} * 10^{-9}$ , М <sup>-1</sup>
Anti-STP	15,18	0,45	33,73
An-STP-BSA	25,00	1,20	20,83
An-G-KLH (35мкл/мл)	3,50	720,00	0,05
An-G-KLH (25мкл/мл)	20,70	16,00	1,30
An-G-KLH (35мкл/мл)	5,02	0,26	19,00

Константы аффинности для всех исследованных пар иммунореагентов находятся в диапазоне  $5,0 \cdot 10^7$  -  $3,4 \cdot 10^{10}$ , что свидетельствует о специфичности иммунореагентов и о возможности их применения для определения аминогликозидных антибиотиков

**Определение антибиотиков в курином мясе.** Изучены способы пробоподготовки куриного мяса перед определением антибиотиков. Мясо предварительно гомогенизировали, а затем вводили фиксированное количество антибиотика. Сопоставление степени извлечения (R, %) лекарственных препаратов различными способами показало, что при использовании в качестве экстрагента водного раствора  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  для осаждения белковых компонентов удается достичь максимального значения R, % (93 % и выше). Определение стрептомицина и гентамицина осуществлялось непосредственно в экстракте.

Методика была апробирована при анализе модельных растворов куриного мяса различных производителей ( табл. 4, 5).

Таблица 4. Метрологические характеристики методики определения стрептомицина и гентамицина с помощью аффинного пьезокварцевого сенсора

Пара иммунореагентов	$C_{\min}$ , нг/мл	Диапазон определяемых содержаний, нг/мл	Уравнение градуировочной функции
An-STP + STP-cc-BSA	6,5	9 - 80	$y = -1,5x + 69,3$
An-STP-BSA+ STP-cc-BSA	0,5	1 - 100	$y = -1,1 x + 34,2$
An-G-KLH+GENT-BSA	22,3	28 - 90	$y = -0,7 x + 186,0$

При проведении анализа определения стрептомицина и гентамицина в мясе не выявлено превышения нормируемых показателей. Продолжительность анализа не превышала 20 мин.

Таблица 5. Результаты определения стрептомицина в курином мясе

Объект исследования	Найдено		$S_r$
	нг/мл	мг/кг	
Грудки куриные Канада	45,00±0,05	0,03±0,01	0,01
Грудки куриные Москва	50,00±0,10	0,02±0,01	0,02
Грудки куриные Липецк	28,00±0,02	0,02±0,01	0,01

## Заключение

Проведенные исследования показали, что разработанные способы иммобилизации позволяют создать иммуносенсоры, для определения антибиотиков в пищевых продуктах, характеризующиеся высокой воспроизводимостью, селективностью и правильностью, и поэтому могут быть рекомендованы для контроля безопасности пищевой продукции в лабораториях пищевых предприятий и санэпиднадзора и выявления следовых концентраций аминогликозидных антибиотиков в мясе.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и администрации Липецкой области (грант № 09-03-97566\_p\_центр\_a).*



## Список литературы

1. СанПиН 2.3.2.1078-01 Гигиенические требования к безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов.
2. Bruijnsvoort M., Ottink S.J.M., Jonker K.M., Boer E. Determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in milk and honey by liquid chromatography with tandem mass spectrometry // *J.Chromatogr.* 2004. V. 1–2. P. 137–142.
3. Ермолаева Т.Н., Калмыкова Е.Н., Нартова Ю.В. Аналитические возможности пьезокварцевых биосенсоров // М: Наука, Т. 12: Биохимические методы анализа / Под ред. Б.Б. Дзантиева. – 2010. - С. 277-302
4. Lima J., Delerue – Martos C., Vaz C. Enzymatic determination of choline in milk using a FIA system with potentiometric detection // *Analyst.* 2000. V. 125. P. 1281 – 1284.
5. Sara A. DiBenedetto, Antonio Facchetti, Mark A. Ratner, Tobin J. Marks Molecular Self-Assembled Monolayers and Multilayers for Organic and Unconventional Inorganic Thin-Film Transistor Applications// WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Adv. Mater. 2009. V. 21. P. 1407–1433
6. Kaufmann A., Maden K. Determination of 11 Aminoglycosides in Meat and liver by liquid chromatography with tandem mass spectrometry // *Journal of AOAC International.* 2005. V. 88. P. 1118–1125.
7. Xueping Ji, Jujie Ren, Ruixing Ni and Xiaohong Liu A stable and controllable Prussian blue layer electrodeposited on self-assembled monolayers for constructing highly sensitive glucose biosensor // *Analyst.* 2010. V. 135. P. 2092 - 2098
8. Мелихова Е.В., Калмыкова Е.Н., Ермолаева Т.Н. Оценка методов иммобилизации иммунореагентов на поверхности пьезокварцевых сенсоров для определения сульфопрепаратов в жидких средах // Сорбционные и хроматографические процессы. 2006. Т.6. Вып 1. С. 99-107.
9. Ермолаева Т.Н., Калмыкова Е.Н., Еремин С.А. Разработка пьезокварцевого иммуносенсора для проточно-инжекционного анализа высоко- и низкомолекулярных соединений // Вест. Моск. университета. 2002. Т. 43. Вып 6. С. 391-403.
10. Воронежцева О.В., Еремин С.А., Ермолаева Т.Н. Определение аминогликозидных антибиотиков в пищевых продуктах методом поляризационного флуоресцентного иммуноанализа // Вестник ВГУ: серия химия, биология, фармация, Воронеж. 2009. №2 (июль-декабрь). С.11-18
11. Nuzzo R.G., Allara D.L. Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces // *J. Am. Chem. Soc.* 1983. V. 105. P. 4481-4483
12. Воронежцева О.В., Нартова Ю.В., Еремин С.А., Ермолаева Т.Н. Иммунохимические реакции, протекающие на поверхности пьезокварцевого сенсора при определении стрептомицина в пищевых продуктах // Сорбционные и хроматографические процессы, Воронеж. 2009. Т. 9. № 5. С. 694-702

---

**Ермолаева Татьяна Николаевна** – д.х.н., профессор Липецкого государственного технического университета; тел.: (4742)328155,

**Воронежцева Ольга Вячеславовна** – аспирант кафедры химии Липецкого государственного технического университета; тел.: (4742)328131

**Ermolaeva Tatyana N.** – D.Sc (Chemistry), professor, Lipetsk State Technical University; e-mail: [ermolaeva@stu.lipetsk.ru](mailto:ermolaeva@stu.lipetsk.ru)

**Voronezhstseva Olga V.** – post-graduate, chair of Chemistry Department, Lipetsk State Technical University; e-mail: [voronezkaya@mail.ru](mailto:voronezkaya@mail.ru)