

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова  
ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МОСКОВСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО  
УНИВЕРСИТЕТА имени М.В. Ломоносова

УДК 543

№ госрегистрации 01201064162

Инв.№ 0365-2

УТВЕРЖДАЮ

Зам. декана по научной работе

Д-р хим. наук, профессор

\_\_\_\_\_ А.В.Анисимов

« » 2011 г.

ОТЧЕТ  
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

В рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы

по Государственному контракту от 20 сентября 2010 г. № 14.740.11.0365  
Шифр заявки «2010-1.1-132-132-001»

по теме

«РАЗРАБОТКА ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ МЕТОДОВ  
ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ В  
ОБЪЕКТАХ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ, МЕДИЦИНЫ И  
МАТЕРИАЛОВЕДЕНИЯ»

Наименование этапа: «Создание эффективных сорбентов, в том числе наноструктурированных, для селективного выделения органических веществ из сложных природных смесей»  
(промежуточный, этап № 2)

Руководитель НИР  
заведующий кафедрой аналитической химии  
академик РАН

Ю.А.Золотов

Москва 2011

## Список

исполнителей по государственному контракту № 14.740.11.0365

в рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические

кадры инновационной России»:

Руководитель темы, докт. хим. наук, академик РАН	Золотов Юрий Александрович, зав. кафедрой	Введение, заключение
Исполнители:	Дмитриенко Станислава Григорьевна, проф.	(разделы 1.1.1, 1.1.2, 2.2, 2.3)
	Моросанова Елена Игоревна, проф.	разделы (1.1.1. и 2.2)
	Цизин Григорий Ильич, в.н.с.	(разделы 1.1.3. и 2.5)
	Тихомирова Татьяна Ивановна, с.н.с.	(разделы 1.1.5. и 2.5)
	Плетнев Игорь Владимирович, в.н.с.	разделы (1.1.5. и 2.5)
	Ревельский Игорь Александрович, в.н.с.	(разделы 1.1.6. и 2.7)
	Ревельский Александр Игоревич, в.н.с.	(разделы 1.1.6. и 2.7)
	Карякин Аркадий Аркадьевич, проф.	(разделы 1.1.2. и 2.4)
	Беклемишев Михаил Константинович, в.н.с.	(разделы 1.1.4. и 2.5)
	Алов Николай Викторович, в.н.с.	(разделы 1.1.4. и 2.5)
	Шпигун Олег Алексеевич, проф.	(разделы 1.1.3. и 2.7)
	Иванов Александр Вадимович, доц.	(разделы 1.1.2. и 2.3)
	Ананьева Ирина Алексеевна, с.н.с.	(разделы 1.1.6. и 2.7)
	Пирогов Андрей Владимирович, в.н.с.	(разделы 1.1.5. и 2.6)
	Смоленков Александр Дмитриевич, в.н.с.	(разделы 1.1.5. и 2.6)
	Статкус Михаил Александрович, с.н.с.	(разделы 1.1.1, 2.2)
	Апяри Владимир Владимирович, н.с.	(разделы 1.1.1, 2.2)
	Родин Игорь Александрович, н.с.	разделы (1.1.1. и 2.2)
	Ланская Светлана Юрьевна, ст. преп.	(разделы 1.1.5. и 2.6)
	Прохорова Александра Федоровна, м.н.с.	(разделы 1.1.5. и 2.6)

Кубышев Сергей	(разделы
Сергеевич, м.н.с.	1.1.5. и 2.6)
Яшина Евгения	(разделы
Ивановна, м.н.с.	1.1.5. и 2.6)
Андреева Елена	(разделы
Юрьевна, асп.	1.1.8. и 2.9)
Поляков Алексей	(разделы
Евгеньевич, вед. инж.	1.1.1. и 2.2)
Малинина Любовь	(разделы
Игоревна, м.н.с.	1.1.2. и 2.4)
Хрычева Анастасия	(разделы
Дмитриевна, м.н.с.	1.1.5. и 2.6)
Волков Антон	(разделы
Иванович, асп.	1.1.3. и 2.3)
Федосеева Марина	(разделы
Владиславовна, асп.	1.1.2. и 2.4)
Затираха Александра	(разделы
Валерьевна, асп.	1.1.3. и 2.3)
Смирнов Константин	(разделы
Николаевич, асп.	1.1.2. и 2.4)
Воронин Олег	(разделы
Геннадьевич, м.н.с.	1.1.3. и 2.3)
Борисова Анастасия	(разделы
Владимировна, м.н.с.	1.1.2. и 2.4)
Федюнина Наталья	(разделы
Николаевна, асп.	1.1.2. и 2.3)
Сохраняева Александра	(разделы
Сергеевна, асп.	1.1.4. и 2.5)
Бурмыкин Дмитрий	(разделы
Александрович, асп.	1.1.6. и 2.7)
Самохин Андрей	(разделы
Сергеевич, асп.	1.1.6. и 2.7)
Крившенко Галина	(разделы
Александровна, асп.	1.1.5. и 2.7)
Афанасьева Евгения	(разделы
Леонидовна, асп.	1.1.4. и 2.7)
Смирнов Роман	(разделы
Сергеевич, асп.	1.1.5. и 2.4)
Елфимова Яна	разделы
Андреевна, асп.	(1.1.2. и 2.3)
Браун Аркадий	(разделы
Владимирович, асп.	1.1.6. и 2.5)
Буслова Татьяна	(разделы
Сергеевна, студ.	1.1.3. и 2.3)
Мясникова Дина	(разделы
Андреевна, студ.	1.1.2. и 2.5)
Борисова Дина	(разделы
Рашидовна, студ.	1.1.4. и 2.4)
Облезова Александра	(разделы
Владимировна, студ.	1.1.6. и 2.4)
Волков Павел	(разделы
Александрович, студ.	1.1.2. и 2.3)

_____	Архипова Виктория Владиславовна, студ.	(разделы 1.1.2. и 2.3)
_____	Толмачева Вероника Владимировна, студ.	(разделы 1.1.3 и 2.4)
_____	Ставрианиди Андрей Николаевич, студ.	(разделы 1.1.3 и 2.4)
_____	Русакова Екатерина Сергеевна, студ.	(разделы 1.1.2. и 2.3)
_____	Назаренко Дмитрий Владимирович, студ.	(разделы 1.1.4. и 2.5)
_____	Дубенский Александр Сергеевич, студ.	(разделы 1.1.5 и 2.4)
_____	Барбалат Юрий Александрович, доц, нормоконтролер	

## РЕФЕРАТ

Отчет 106 с., 15 рис., 25 табл., 113 источников.

Разработка высокочувствительных методов определения содержания органических веществ в объектах окружающей среды, медицины и материаловедения.

Этап № 2. Создание эффективных сорбентов, в том числе наноструктурированных, для селективного выделения органических веществ из сложных природных смесей.

Ключевые слова: **НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫЕ СОРБЕНТЫ, КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ, БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА.**

Объектом исследования и разработки являются новые наноструктурированные полимерные сорбенты для концентрирования биологически активных органических веществ из растворов, методики определения веществ, в том числе особо токсичных, в разнообразных объектах.

Цель работы - создание новых сорбентов, в том числе наноструктурированных, для высокоселективного извлечения и разделения биологически активных и токсичных соединений, их мониторинга; разработка современных методов анализа объектов окружающей среды, пищевых продуктов.

В результате исследований разработаны новые материалы, обеспечивающие разработку эффективных методов анализа важнейших объектов.

Синтезированы 11 лабораторных образцов новых наноструктурированных сорбентов массой 3 г каждого на основе акриламида с отпечатками кверцетина для концентрирования этого соединения и других флавоноидов. Эти сорбенты обеспечивают селективное извлечение целевых компонентов из растворов на 90 – 95%.

С использованием этих сорбентов, а также других материалов и устройств, предложенных авторским коллективом ранее, разработаны методики определения 4-диметиламинобензальдегида, 4-диметиламинокоричного альдегида и ванилина в фармпрепаратах и пищевом сырье; полупрепаративного разделения изоформ формиатдегидрогеназы для получения очищенных активной формы формиатдегидрогеназы; автоматизированного проточного сорбционно-жидкостно-хроматографического определения фенола и хлорофенолов в питьевой и природных водах; суммарного содержания галоид-, серо- и фосфорсодержащих соединений в воде.

Степень внедрения – методики определения токсичных веществ в почвах прошли метрологическую аттестацию и в настоящее время внедряются на предприятиях Роскосмоса. Остальные разработанные методики проходят метрологическую аттестацию с целью последующего внедрения.

В рамках выполнения работ по этапу защищено 3 докторских и 4 кандидатских диссертаций, опубликованы 12 статей в высокорейтинговых журналах, подано 3 заявки на патент, разработан новый лекционный курс «Биоэлектродкатализ, электроаналитические системы, электроактивные полимеры» и новая задача для спецпрактиума «Проточное сорбционно-атомно-абсорбционное определение элементов и их форм в водах» (для студентов IV курса Химического факультета МГУ).

## СОДЕРЖАНИЕ

	Страница
1. ВВЕДЕНИЕ	8
1.1. Оценка современного состояния решаемой проблемы (Создание эффективных сорбентов, в том числе наноструктурированных, для селективного выделения органических веществ из сложных природных смесей)	8
1.1.1. Разработка путей синтеза наноструктурированных сорбентов для концентрирования биологически активных веществ	8
1.1.2. Разработка методики сорбционно-спектрофотометрического определения 4-диметиламинобензальдегида, 4-диметиламинокоричного альдегида и ванилина в фармпрепаратах и пищевом сырье	10
1.1.3. Проведение исследований по концентрированию фенола и хлорофенолов	12
1.1.4. Разработка методики полупрепаративного разделения изоформ формиатдегидрогеназы для получения очищенной активной формы формиатдегидрогеназы, при содержании в исходной смеси на уровне 0,5 – 1 мг/мл	14
1.1.5. Разработка автоматизированного метода определения фенола и хлорофенолов в водах	16
1.1.6. Разработка методики определения суммарного содержания галоид-, серо- и фосфорорганических соединений в водах	18
1.1.7. Выводы к обзору литературы	20
2. ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	20
2.1. Выбор направления исследований, методы решения задач	20
2.2. Разработка путей синтеза наноструктурированных сорбентов для концентрирования биологически активных веществ	24
2.3. Разработка методики сорбционно-спектрофотометри-	33

ческого определения 4-диметиламинобензальдегида, 4- диметиламинокоричного альдегида и ванилина в фармпрепаратах и пищевом сырье	
2.4. Проведение исследований по концентрированию фенола и хлорфенолов	39
2.5. Разработка методики полупрепаративного разделения изоформ формиатдегидрогеназы для получения очищенной активной формы формиатдегидрогеназы, при содержании в исходной смеси на уровне 0,5 – 1 мг/мл	49
2.6. Проведение патентных исследований	55
2.7. Разработка автоматизированного метода определения фенола и хлорфенолов в водах	56
2.8. Разработка методики определения суммарного содержания галоид-, серо- и фосфорорганических соединений в водах	64
<b>3. СТАТИСТИЧЕСКИЕ И ФАКТОГРАФИЧЕСКИЕ СВЕДЕНИЯ О НАУКОМЕТРИЧЕСКИХ РЕЗУЛЬТАТАХ ВЫПОЛНЕНИЯ ГОСУДАРСТВЕННОГО КОНТРАКТА</b>	<b>78</b>
3.1. Статьи, опубликованные по результатам выполнения государственного контракта	78
3.2. Докторские диссертации, защищенные по результатам выполнения государственного контракта	79
3.3. Кандидатские диссертации, защищенные по результатам выполнения государственного контракта	80
3.4. Список молодых специалистов, принимавших участие в выполнении государственного контракта	81
3.5. Разработанные учебные курсы и задачи	83
3.6. Поданные заявки на патенты	83
3.7. Сравнение полученных результатов с техническими характеристиками, заявленными в Техническом задании государственного контракта	83
3.8. Индикаторы и показатели	84

4. ТЕХНИКО-ЭКОНОМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА РЫНОЧНОГО ПОТЕНЦИАЛА РЕЗУЛЬТАТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ НИР	86
5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	87
6. ЛИТЕРАТУРА	89
7. ПРИЛОЖЕНИЯ	99
7.1. Акты изготовления лабораторных образцов и методик	100
7.2. Акты внедрения результатов НИР в учебный процесс	105

## 1. ВВЕДЕНИЕ

Разработка новых материалов важна не только для развития эффективных промышленных технологий, но и для разработки принципиально новых, экспрессных и высокочувствительных методов химического анализа. Создание новых прорывных технологий, наноматериалов, способов диагностики и лечения заболеваний, развитие других важнейших отраслей науки и промышленности фактически невозможно без соответствующих методов и средств химического анализа. Настоящий проект направлен на разработку новых материалов, в том числе наноструктурированных, для создания комплекса современных методов и средств химического анализа большого числа важнейших объектов.

### 1.1. Оценка современного состояния решаемой проблемы

#### 1.1.1. Разработка путей синтеза наноструктурированных сорбентов для концентрирования биологически активных веществ.

Анализ литературы указывает на то, что в последнее десятилетие идет активный поиск новых методов определения биологически активных веществ, таких, например, как кверцетин и другие флавоноиды, в различных объектах растительного происхождения, пищевых продуктах, биологически-активных добавках, лекарственных препаратах и биологических объектах [1, 2]. Во многом это связано с большим и всевозрастающим интересом к проблеме определения антиоксидантной активности, а также антиокислительного статуса у больных.

Флавоноиды блокируют вредное воздействие на организм свободных радикалов, ингибируют перекисное окисление липидов, обладают разнообразной физиологической активностью: антиканцерогенной, антисклеротической, противовоспалительной, антиаллергической, антигипертонической [3, 4].

Работы по определению антиоксидантной активности относятся к приоритетным: организовано Международное общество по антиоксидантам, во многих странах мира существуют национальные ассоциации, в 2008 г. вышло Распоряжение Правительства РФ № 233-р “Об утверждении программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2008 – 2012 годы”. В эту программу входит “выявление новых природных антиоксидантов, средств, предотвращающих патологические последствия стресса” (раздел 50) [5].

Согласно литературным данным [1, 2] для определения кверцетина и других флавоноидов, в основном, применяют ВЭЖХ, причем определение проводят после предварительной пробоподготовки, для осуществления которой чаще всего используют метод твердофазной экстракции (ТФЭ). Круг сорбентов, используемых для этой цели, ограничен преимущественно силикагелями, модифицированными гидрофобными алкильными группами. В связи с этим представляется актуальным расширение ассортимента сорбентов, позволяющих осуществлять как групповое концентрирование флавоноидов, так и селективное извлечение кверцетина.

В рамках поиска сорбентов для селективного извлечения кверцетина значительный интерес представляют наноструктурированные сорбенты – полимеры с молекулярными отпечатками кверцетина (ПМО) [6 – 8]. Эти полимеры можно рассматривать в качестве синтетических рецепторов, принцип действия которых основан на эффекте молекулярного распознавания. От более сложных биологических рецепторов ПМО отличаются высокой устойчивостью к химическим и физическим воздействиям: их можно хранить в течение нескольких лет без потери памяти сайтов молекулярного распознавания. Эти материалы отличаются простотой получения и относительно низкой стоимостью.

В последнее десятилетие опубликовано несколько работ по синтезу полимеров с отпечатками кверцетина и использованию полученных материалов для сорбционного выделения и концентрирования этого соединения [9 – 15]. Эти

работы указывали на принципиальную возможность получения полимеров с отпечатками кверцетина, однако в них практически не обсуждались факторы, изменение которых на стадии синтеза сорбентов могло бы существенно повлиять на сорбционные характеристики полимеров и, что немаловажно, на их селективность. Между тем, в последние годы в различных научных группах, включая и нашу [16 – 20], были выполнены исследования, указывающие на то, что изменение на стадии синтеза соотношения функциональный мономер – темплат, количества и природы растворителя, а также ряда других факторов существенным образом влияет на сорбционные свойства ПМО и их селективность. В связи с этим в настоящей работе в рамках подхода нековалентного импринтинга предполагалось осуществить направленный синтез ряда новых полимеров с молекулярными отпечатками кверцетина и провести комплексное исследование их сорбционных свойств. В рамках конкретной решаемой задачи – выявления закономерностей связывания кверцетина полимерами с молекулярными отпечатками – основной акцент был сделан на выявление связей между составом реакционной смеси, используемой для получения ПМО, и способностью ПМО к молекулярному распознаванию кверцетина. Кроме того, представлялось интересным выявить основные факторы, влияющие на сорбционную способность ПМО не только на стадии синтеза этих сорбентов, но и на этапе повторного связывания кверцетина, а также оценить возможность аналитического использования этих материалов для сорбционного концентрирования этого соединения.

#### 1.1.2. Разработка методики сорбционно-спектрофотометрического определения 4-диметиламинобензальдегида, 4-диметиламинокоричного альдегида и ванилина в фармпрепаратах и пищевом сырье

Ароматические альдегиды находят широкое применение в качестве исходных соединений для синтеза разнообразных органических веществ: спиртов, карбоновых кислот и их ангидридов, лекарственных препаратов, полимерных продуктов. Кроме того, отдельные представители ароматических альдегидов применяют в пищевой и парфюмерной промышленности. Так, например, ванилин широко используют в пищевой промышленности в качестве ароматической

добавки в кондитерские изделия. Бензальдегид применяют в пищевых ароматических эссенциях и в парфюмерных композициях. 4-диметиламинобензальдегид и 4-диметиламинокоричный альдегид нашли применение в аналитической химии в качестве спектрофотометрических реагентов для определения ароматических аминов и других органических соединений [21 – 23]. В связи с этим актуальной остается проблема определения ароматических альдегидов в самых разнообразных объектах.

Для определения ароматических альдегидов используют спектрофотометрию [24, 25], хроматографию [26, 27], и капиллярный электрофорез [28]. Самым простым и доступным методом определения ароматических альдегидов остается спектрофотометрический метод, однако чувствительность разработанных методик оказалась невысокой. Кроме того, спектрофотометрическим методом невозможно проводить определение в мутных растворах, а также в присутствии других окрашенных компонентов. Одним из возможных повышений чувствительности определения и устранения мешающего влияния сопутствующих веществ, на наш взгляд, может оказаться применение сорбционного концентрирования с последующим определением непосредственно в матрице сорбента с применением спектроскопии диффузного отражения. Такую задачу можно решить при помощи твердофазных аналитических реагентов.

Как показали исследования, выполненные на кафедре аналитической химии химического факультета МГУ в качестве полимерных хромогенных реагентов можно использовать пенополиуретаны (ППУ), которые образуют интенсивно окрашенные соединения при взаимодействии с активным хлором, нитритом натрия, тетрафторборатом 4-нитрофенилдиазония и формальдегидом [29 – 32]. Возможность использования ППУ в качестве полимерных хромогенных реагентов обусловлена наличием в их структуре химически активных концевых толуидиновых групп, проявляющих свойства первичных ароматических аминов. К достоинствам ППУ в качестве твердофазных аналитических реагентов можно отнести химическую и гидролитическую устойчивость, отсутствие собственной окраски, относительную доступность и дешевизну, легкость отделения от других компонентов реакционной смеси. Ранее мы впервые обнаружили, что ППУ вступает в реакции конденсации с ароматическими альдегидами с образованием

интенсивно окрашенных полимерных оснований Шиффа [33]. В рамках настоящей работы мы предлагаем использовать ППУ для концентрирования и определения ароматических альдегидов с применением спектроскопии диффузного отражения.

### 1.1.3. Проведение исследований по концентрированию фенола и хлорфенолов.

Фенол, ряд его алкил-, хлор- и нитропроизводных являются распространенными загрязнителями окружающей среды, прежде всего гидросферы [34]. Агентство по охране окружающей среды США (US EPA) утвердило список из 11 производных фенола, которые являются приоритетными органическими загрязнителями вод; общие ПДК не установлены, но для контроля за содержанием этих соединений в водах рекомендован метод [35] с пределами обнаружения 0,3 – 10 мкг/л. Согласно законодательству Европейского союза, производные фенола (алкилфенолы, пентахлорфенол) также входят в список приоритетных органических загрязнителей вод [36]; концентрации индивидуальных фенолов не должны превышать 0,1 мкг/л [34, 37], суммарное содержание производных фенола (в пересчете на фенол) должно быть не более 0,5 мкг/л [38]. В России, согласно [39], ПДК фенола и его производных составляют 1 – 10 мкг/л.

Как правило, фенолы в водах определяют с использованием газовой или жидкостной хроматографии, однако прямое определение на уровне ПДК (0,1 – 1 мкг/л) часто осложнено недостаточной чувствительностью этих методов; в связи с этим фенолы часто концентрируют экстракционными или сорбционными методами [34, 40]. В последнее время чаще применяют сорбционное концентрирование, более технологичное и обеспечивающее более высокие коэффициенты концентрирования. Фенолы традиционно концентрируют из водных растворов на химически модифицированных силикагелях или на полистирольных сорбентах [34, 37]. Однако при использовании сорбентов этих типов отмечают несколько проблем.

Во-первых, часто не удается достичь высоких степеней извлечения гидрофильных фенолов (незамещенного фенола, нитрофенолов) из больших объемов водных образцов [41, 42]; во-вторых, не всегда достигается количественная десорбция гидрофобных фенолов (три- и пентахлорфенола) [42] –

из-за необратимой адсорбции фенолов на участках силикагелей с остаточными силанольными группами или за счет слишком сильного удерживания на гидрофобных полимерных сорбентах. Один из способов решения подобных проблем – разработка новых полимерных сорбентов для извлечения фенолов. Такие сорбенты кроме гидрофобных участков должны содержать полярные группы для увеличения смачиваемости поверхности сорбента, а также для увеличения степени извлечения гидрофильных фенолов и степени десорбции гидрофобных фенолов. Синтезирован ряд таких сорбентов на основе поли-N-метиламина, полианилина и полидифениламина [43]; полипиррола [44]; винилпиридина [45]; ацетилированного [46] и бензоилированного [47] сополимера стирола и дивинилбензола. Эти сорбенты использовали для концентрирования фенола и его производных в *on-line* [44 - 46] и *off-line* [43] режимах; показано, что в сходных условиях эксперимента степени извлечения фенола и гидрофильных фенолов на этих сорбентах выше, чем на сорбентах на основе сополимера стирола и дивинилбензола различной степени сшивки.

Известны и коммерческие сорбенты сходной химической природы. Сорбент Oasis (Waters, США) по данным производителя [48] представляет собой сополимер дивинилбензола и N-винил-2-пирролидона; сорбент Strata-X (Phenomenex, США) – химически модифицированный полистирол с привитыми группировками N-винил-2-пирролидона [49]. Наличие в структуре этих полимеров участков с различной гидрофобностью приводит к тому, что на них эффективно извлекаются и гидрофобные, и гидрофильные вещества [50, 51], а сами сорбенты смачиваются водой даже после высушивания.

Сорбент Oasis применяли в проточной сорбционно-ВЭЖХ системе для концентрирования фенолов [42, 52]; показано, что в выбранных условиях на сорбенте достигается более высокая степень извлечения фенола, чем на сорбентах на основе полистирола — 90 – 95% для Oasis по сравнению с 40 – 80% для Hysphere.

Сорбент Strata-X использовали для *off-line* извлечения пестицидов из вод [51], фторхинолонов из молока [53], фенолокислот из меда [54]; в *on-line* варианте — для извлечения изофлавонов из экстрактов соевых бобов [55]. Отмечено, что сорбент Strata-X в большинстве случаев не уступает аналогам (в т.ч. Oasis) по

эффективности и селективности извлечения, а в некоторых случаях и превосходит их. Для сорбционного извлечения фенолов из вод в *off-line* и *on-line* вариантах сорбент Strata-X не использовали. Целью работы на данном этапе являлось изучение сорбции фенолов на сорбенте Strata-X.

1.1.4. Разработка методики полупрепаративного разделения изоформ формиатдегидрогеназы для получения очищенной активной формы формиатдегидрогеназы, при содержании в исходной смеси на уровне 0,5 – 1 мг/мл.

Название "формиатдегидрогеназа" (ФДГ) объединяет несколько групп ферментов, которые кардинально отличаются друг от друга по четвертичной структуре и по субстратной специфичности. ФДГ принадлежат к семейству D-специфичных дегидрогеназ 2-гидроксикислот. Одну из групп ФДГ представляют  $\text{NAD}^+$ -зависимые формиатдегидрогеназы, катализирующие окисление формиат-иона до углекислого газа при сопряженном восстановлении  $\text{NAD}^+$  до  $\text{NADH}$  [56, 57]. ФДГ этой группы состоят из двух идентичных субъединиц, не содержат ни ионов металлов, не способны в качестве окислителей использовать одноэлектронные переносчики и характеризуются высокой специфичностью как к формиат-иону, так и к  $\text{NAD}^+$ .

Реакция, катализируемая ФДГ, является удобной моделью для изучения механизма переноса гидрид-иона в активном центре дегидрогеназ. ФДГ широко используется для регенерации  $\text{NADH}$  в ферментативных процессах синтеза оптически активных соединений с помощью дегидрогеназ [56]. Практическая необратимость формиатдегидрогеназной реакции и активность ФДГ в широком pH-интервале делают этот фермент универсальным биокатализатором, способным эффективно работать при значениях pH, оптимальных для данного процесса [57]. Однако у ФДГ, особенно – растительного происхождения, существуют как минимум две изоформы с различными сигнальными пептидами, имеющими наибольшую длину и не гомологичным остальным пептидам в составе ФДГ. Структура ФДГ содержит несколько сульфидных мостиков, которые при хранении фермента, особенно в растворе, способны окисляться до сульфогрупп, также образуя изоформы ФДГ. Природа обратимого перехода ФДГ из одной формы в

другую не всегда ясна. Наличие изоформ может определяться состоянием растения – например, по разнице в изоферментном составе ФДГ в нормальных и больных пальмах отбирают деревья при селективной вырубке. Кроме того, каталитическая активность некоторых изоформ формиатдегидрогеназы может быть существенно снижена [57], поэтому важно отделять наиболее каталитически активные изоформы ФДГ.

В изократическом варианте ионообменной хроматографии отделение изоформ ФДГ практически невозможно из-за невысокой селективности ионообменных групп. Создание градиента ионной силы (при применении 1 – 2 М растворов NaCl) позволяет разделить каталитически активную и неактивные изоформы ФДГ, однако для дальнейшего использования каталитически активную форму ФДГ требуется дополнительно отделить от избытка подвижной фазы, содержащей высокую концентрацию NaCl. Кроме того, столь значительное повышение ионной силы подвижной фазы может привести к денатурации ФДГ, что крайне нежелательно [58, 59].

Для решения проблемы представляется целесообразным использовать полупрепаративный вариант хроматофокусирования с восходящими градиентами pH на катионообменных сорбентах, т.к. биполярные соединения (как ФДГ) заряжены положительно (и, соответственно, могут сорбироваться на катионообменнике) только при pH ниже значений их изоэлектрических точек, т.е. в кислой области [59]. С другой стороны, при очень низком pH элюента слабый катионообменный сорбент полностью переходит в незаряженную (протонированную) форму, неактивную для сорбции. Поэтому на слабых катионообменниках приходится формировать градиент от значений pH не ниже 2,5 – 3. Конечное значение градиента pH определяется максимальным значением  $pI$  разделяемых биполярных соединений и обычно не превышает 7 – 8 (у изоформ ФДГ значения  $pI$  лежат не выше 7,1 [56]).

Первые публикации по формированию и применению в хроматофокусировании восходящих градиентов pH на слабокислотных катионообменниках появились еще в 1981-82 гг. [60 – 62], когда было показано, что такие градиенты перспективны для разделения биполярных макромолекул. В настоящее время в каталогах фирмы "Amersham Biosciences" [63, 64],

производящей оборудование, ионообменники и полиамфолиты для хроматофокусирования, традиционно приводят один-два примера полупрепаративного разделения модельных смесей белков на карбоксиметилцеллюлозе с восходящим внутренним градиентом рН. Тем не менее, несмотря на перспективность применения восходящих внутренних градиентов рН, их изучению до сих пор уделялось мало внимания. Для создания восходящих градиентов рН используют полиамфолитные элюенты (т.н. "полибуферы"), уравновешенные до рН 7 – 8. В качестве компонентов стартовых растворов обычно применяют слабые органические кислоты (из-за низкого значения рН начальной области градиента), реже – те же полибуферы при более низком рН за счет добавления HCl [63]. Синтетические полиамфолитные элюенты - "Polybuffer", "Buffalyte", "Servalyte", "Pharmalyte" и др. - легко подвергаются биodeградации под действием бактерий; из-за высокого собственного светопоглощения затрудняют УФ детектирование компонентов ниже 280 нм. Синтез полиамфолитов достаточно сложен и дорог [64]. Кроме того, в ряде случаев при препаративном разделении ферментов требуется последующая очистка компонента от полибуферного элюента с помощью гель-электрофореза и других методов [65, 66]. Таким образом, в хроматофокусировании для восходящих градиентов рН также актуален поиск простых элюирующих систем, позволяющих надежно детектировать разделяемые ферменты в УФ-области.

1.1.5. Разработка автоматизированного метода определения фенола и хлорофенолов в водах.

Комбинированные методы анализа включают концентрирование в off-line или on-line режимах. Методы концентрирования в режиме off-line трудно автоматизировать. Off-line концентрирование широко используют в сочетании с хроматографическими методами анализа; эта область хорошо освещена в ряде обзоров и монографий, например, в [67].

Последние 20 лет интенсивно развиваются проточные методы анализа, включающие стадию on-line концентрирования [68], в том числе проточные сорбционно-ВЭЖХ методы [69]. Отличительной особенностью такого варианта

сочетания концентрирования и определения является то, что извлеченные на стадии сорбции микрокомпоненты десорбируют в неравновесных условиях и доставляют в хроматографическую колонку в потоке растворителя. Эти методы, как правило, автоматизированы и характеризуются высокой воспроизводимостью, обусловленной использованием замкнутых систем и точным дозированием растворов [68, 69].

В базовом варианте цикл анализа включает сорбцию заданных веществ – микрокомпонентов из растворов на колонке с сорбентом, их десорбцию, перенос десорбированных микрокомпонентов в потоке растворителя в хроматографическую колонку, последующее хроматографическое разделение и определение [69 – 75]. Оборудование для проточного сорбционно-ВЭЖХ анализа в базовом варианте отличается от обычного жидкостного хроматографа наличием колонки для концентрирования и дополнительного насоса для пропускания раствора пробы через эту колонку. В качестве колонки для концентрирования весьма часто используют так называемые защитные хроматографические колонки (guard column), отличающиеся от обычных колонок для ВЭЖХ разделения только длиной — 10 – 20 мм вместо 150 – 250 мм [69].

Колонку для концентрирования подключают к инжектору вместо дозирующей петли. После проведения сорбции извлеченные вещества десорбируют подвижной фазой, пригодной для дальнейшего хроматографического разделения, и переносят потоком элюента в хроматографическую колонку. При использовании такой схемы можно пропускать раствор на стадии десорбции как в прямом направлении (то есть в том же направлении, в котором пропускали раствор пробы), так и с обращением потока.

Многие предложенные комбинированные методы, включающие стадию концентрирования, являются усовершенствованными вариантами соответствующих разработанных ранее прямых ВЭЖХ методов, т.е. условия собственно хроматографического разделения и определения одинаковы для прямого и комбинированного варианта [76, 77]. С одной стороны, это упрощает разработку комбинированного метода, но, с другой, является его ограничением, так как макросостав концентрата после десорбции должен соответствовать составу элюента для хроматографического разделения веществ.

Базовая схема проточного сорбционно-ВЭЖХ анализа позволяет решать практические задачи: ее применяли для определения пестицидов [74, 78], биологически активных веществ [70, 79 – 82]; антрацена, пирена и других ПАУ [83] в различных объектах. Более сложные варианты могут включать различные дополнительные процедуры, направленные на повышение чувствительности и селективности всего анализа в целом (перечислены в обычном порядке их проведения):

1. Подготовка пробы к концентрированию, изменение макросостава пробы (разбавление, фильтрация, осаждение белков и т.д.) — как правило, эту стадию проводят в off-line режиме.
2. Изменение химической формы извлекаемых микрокомпонентов (дериватизация) [84, 85].
3. Подготовка сорбента к концентрированию – т.н. кондиционирование.
4. Стадия сорбции – пропускание пробы через колонку с сорбентом.
5. Промывка сорбента с целью удаления остатков раствора пробы из мертвого объема колонки для концентрирования, десорбция мешающих слабоудерживаемых компонентов пробы с сорбента.
6. Десорбция концентрируемых микрокомпонентов.
7. Отделение концентрируемых микрокомпонентов в потоке десорбирующего раствора от мешающих компонентов пробы (т.н. «вырезание в потоке», «heart-cutting») [86 – 89].
8. Дериватизация микрокомпонентов после десорбции [90].

Изменение макросостава концентрата после десорбции достигают разбавлением в потоке [79, 91 – 94].

#### 1.1.6. Разработка методики определения суммарного содержания галоид-, серо- и фосфорорганических соединений в водах.

В эколого-аналитическом контроле одно из важнейших мест принадлежит анализу вод [95]. Постоянно увеличивается число соединений, которые приходится определять в водах. Особенно важное значение имеет определение соединений, присутствие которых нежелательно или недопустимо. На сегодняшний день в мире

используется около 500 тысяч соединений, из которых большую часть составляют органические. Более 40 тысяч из них являются опасными, а около 12 тысяч - токсичными [96, 97]. Образование этих соединений возможно в результате трансформации безопасных соединений в окружающей среде, либо в результате водоподготовки, применяемой при получении питьевой воды. Существует большое количество используемых соединений, физиологические свойства которых известны не полностью. Постоянно синтезируются все новые и новые органические соединения, влияние которых на окружающую среду и человека практически не изучено [98]. Определение общего содержания этих соединений может обеспечить быстрый скрининг вод на содержание нормируемых и ненормируемых опасных соединений и осуществлять благодаря этому действенный контроль за источниками загрязнения вод. Таким образом, актуальной проблемой является разработка новых и совершенствование уже известных методов, позволяющих определять общее содержание галоген-, серо- и фосфорсодержащих органических соединений, особенно среднелетучих, входящих в число наиболее опасных экотоксикантов.

Методология контроля за загрязнениями окружающей среды предусматривает определение лишь ограниченного числа нормируемых соединений (для которых были установлены предельно допустимые концентрации (ПДК)), главным образом органических, методами газовой хроматографии, хромато-масс-спектрометрии и реже - жидкостной хроматографии, требующих существенных затрат времени на анализ. Кроме того, ненормируемые соединения, многие из которых относятся к опасным, и число которых много больше тех, для которых установлены ПДК, не подлежат определению вообще. Среди нормируемых и ненормируемых соединений наиболее опасными являются галоген-, серо- и фосфорсодержащие соединения, особенно среднелетучие [95]. Низкая производительность анализов в соответствии с этой методологией не позволяет обеспечить действенный и экономически эффективный контроль вод даже на заданные соединения. Известно также, что до 80% проб вод, поступающих на анализ, не содержат соединений, подлежащих определению. Требуются методы и средства для быстрого анализа (скрининга) вод на содержание всех присутствующих опасных соединений.

Определенное внимание уделяется определению в воде общего содержания адсорбируемых (метод АОХ) галогенорганических соединений из воды. Предел обнаружения этого метода составляет  $10^{-6}$ - $10^{-4}\%$ . Актуальным является снижение предела обнаружения до  $10^{-8}\%$  и ниже. Сопоставимых с методом АОХ по пределу обнаружения методов определения общего содержания фтор-, бром-, серо- и фосфорсодержащих органических соединений в воде неизвестно. Отсутствуют методы и одновременного высокочувствительного обнаружения в воде галоген-, серо- и фосфорсодержащих соединений. Поэтому актуальным является как снижение предела обнаружения, так и обеспечение одновременного и быстрого определения общего содержания галоген-, серо- и фосфорсодержащих органических соединений при их совместном присутствии в воде, с целью обеспечения возможностей осуществления быстрого скрининга проб на содержание таких соединений на уровне следов.

#### 1.1.7. Выводы к обзору литературы

Рассмотрено современное состояние вопросов синтеза высокоэффективных сорбентов, в том числе наноструктурированных, для разделения и концентрирования веществ, методов определения токсичных и биогенных веществ в объектах окружающей среды, фармпрепаратах, пищевых продуктах. Обсуждены области применения этих методов, их основные недостатки. Показана актуальность и перспективность разработки новых сорбентов и методик определения конкретных соединений.

## 2. ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

### 2.1. Выбор направления исследований, методы решения задач

Направлениями исследований второго этапа работ была разработка методов получения новых высокоселективных сорбентов, а также методов выделения и определения биологически активных, в том числе особо токсичных, веществ в объектах окружающей среды, фармпрепаратах, пищевых продуктах.

Цель работы по направлению 2.1. календарного плана состояла в разработке и синтезе новых наноструктурированных сорбентов – материалов с молекулярными отпечатками кверцетина (КВ), исследовании и сопоставлении свойств сорбентов, синтезированных с применением различных способов; оценке возможности применения этих материалов для сорбционного концентрирования кверцетина.

Достижение поставленной цели предусматривало решение следующих задач:

- оптимизацию методик синтеза нековалентно импринтированных ПМО с отпечатками кверцетина;
- оценку удельной поверхности синтезированных ПМО и соответствующих полимеров сравнения (ПС);
- изучение особенностей сорбции кверцетина и некоторых структурно родственных соединений на полимерах с отпечатками этих соединений в зависимости от факторов, варьируемых как на стадии синтеза новых материалов, так и на этапе сорбции;
- оценку селективности и сравнение сорбционных свойств новых материалов, синтезированных с использованием различных подходов.

По направлению 2.2. календарного плана для разработки соответствующей методики было необходимо выбрать оптимальные условия взаимодействия пенополиуретана с ароматическими альдегидами, далее – выбрать условия детектирования полученных продуктов взаимодействия методом спектроскопии диффузного отражения.

По направлению 2.3. календарного плана целью было проведение исследований по концентрированию фенола и хлорофенолов. Решение этой задачи требовало выбора сорбента, извлекающего как гидрофильные, так и гидрофобные фенолы, а также выбор условий десорбции этих веществ. В качестве метода контроля за концентрацией фенолов до и после их концентрирования выбран метод ВЭЖХ.

По направлению 2.4. календарного плана в качестве сорбентов выбрали *a*) MacroPrep 50 CM (BioRad, США) на основе полиметилметакрилата с карбоксиметильными группами; *б*) MN KS/R 527 (Purolite, Великобритания) на основе сверхсшитого полистирола с карбоксильными группами (табл. 1). Ионообменная емкость сорбента MN KS/R 527 производителем не указаны,

поэтому ее находили из данных потенциометрического кислотно-основного титрования. В качестве исследуемого объекта использовали образец рекомбинантной формиатдегидрогеназы (с содержанием в исходном растворе 0,5 – 1 мг/мл), полученной из клеточного лизата растений.

Таблица 1 – Карбоксильные сорбенты, применявшиеся в эксперименте.

Сорбент	MacroPrep 50 CM	MN KS/R 527
Производитель	Biorad (США)	Purolite (Великобритания)
Матрица	ПММА	ССПС
Функциональные группы	-CH <sub>2</sub> COOH	-COOH
Размер частиц (мкм)	50	5
рН-диапазон гидролитической стабильности матрицы	3-13	1-14
Ионообменная емкость	0,21±0,04 ммоль/мл	< 0,10 ммоль/г

В качестве компонентов стартовых растворов выбрали уксусную, щавелевую, винную, лимонную кислоты, обладающие буферной емкостью в кислой области. Исходя из систем, подобранных для формирования нисходящих градиентов, элюенты простого состава (не более двух компонентов) готовили из слабого основания (например, Трис) и карбоновой кислоты. Трис ( $pK_b = 5,9$ ) широко применяют для многих задач в хроматофокусировании не только в качестве компонента стартовых растворов, но иногда – в составе элюента [99].

Задача исследования – разработать методику полупрепаративного отделения активной изоформы формиатдегидрогеназы на катионообменных сорбентах в условиях градиентного элюирования с использованием простых элюентов, содержащих не более одного-двух рН-определяющих компонентов.

Целью работы по направлению 2.6. календарного плана была разработка автоматизированного метода определения фенола и хлорофенолов в водах.

Конкретные задачи исследования были следующими:

- изучение сорбционных свойств полистирола, химически модифицированного N-винил-2-пирролидоном (Strata-X);
- выбор оптимальных условий концентрирования фенолов из водных растворов;
- разработка оптимальной схемы сочетания сорбционного концентрирования и хроматографического определения;
- разработка проточного автоматизированного сорбционно-хроматографического метода определения фенола и хлорфенолов в водах различных типов.

Целью работы в направлении 2.7. календарного плана являлось изучение возможности разработки способов одновременного высокочувствительного определения общего содержания фтор-, хлор-, бром-, серо- и фосфорсодержащих органических соединений в водных и органических растворах, основанных на извлечении этих соединений из раствора, их высокотемпературной окислительной конверсии, поглощении продуктов конверсии и анализе абсорбата методом ионной хроматографии (ИХ) на содержание образовавшихся анионов (фторида, хлорида, бромида, фосфата и сульфата), соответствующих определяемым элементам.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Выбрать условия быстрого прямого и высокочувствительного определения фторида, хлорида, нитрита, нитрата, бромида, фосфата и сульфата в водных растворах методом ИХ.
2. Выбрать условия быстрого определения следовых содержаний фторида, хлорида, нитрита, нитрата, бромида, фосфата и сульфата в больших пробах водных растворов методом ИХ с использованием предварительного концентрирования с целью обеспечения возможности анализа всего абсорбата.
3. Изучить условия высокотемпературной окислительной конверсии водных и органических растворов модельных галоген-, серо- и фосфорсодержащих органических соединений различной летучести и относящихся к различным классам и выбрать условия, обеспечивающие количественную конверсию и поглощение продуктов конверсии водой из газового потока независимо от структуры соединения, состава элементов и растворителя.

4. Разработать способ прямого высокочувствительного определения общего содержания фтор-, хлор-, бром-, серо- и фосфорсодержащих органических соединений в водных и органических растворах, основанный на окислительной конверсии, поглощении продуктов конверсии и анализе абсорбата на содержание образовавшихся анионов методом ИХ.
5. Разработать способы одновременного и высокочувствительного определения общего содержания фтор-, хлор-, бром-, серо- и фосфорсодержащих органических соединений в водных и органических растворах, основанный на выделении этих соединений из раствора, окислительной конверсии концентрата определяемых соединений, поглощении продуктов конверсии и анализе всего абсорбата на содержание образовавшихся анионов, соответствующих определяемым элементам, методом ИХ.
6. Определить общее содержание галоген-, серо- и фосфорсодержащих органических соединений в водах различного происхождения.

2.2. Разработка путей синтеза наноструктурированных сорбентов для концентрирования биологически активных веществ.

*Синтез наноструктурированных сорбентов.* Полимеры с молекулярными отпечатками (ПМО) кверцетина (КВ) синтезировали методом нековалентного импринтинга. Синтез осуществляли по механизму радикальной блочной полимеризации В качестве функциональных мономеров (ФМ) при синтезе ПМО и полимеров сравнения (ПС) применяли акриламид (АА, ч.д.а.), 2-(диметиламино)-этилметакрилат (ДМАЭМА, “Acros”, 99%) и метакриловую кислоту (МАК, ч.д.а.). Сшивающим агентом (СА) служил этиленгликольдиметакрилат (ЭГДМА, “Acros”, 98%). Инициатором реакции полимеризации был 2,2'-азобисизобутиронитрил (АИБН, ч.д.а.). В качестве растворителей при синтезе ПМО и соответствующих ПС использовали ацетон (о.с.ч.), диметилсульфоксид (ДМСО, х.ч.), тетрагидрофуран (ТГФ, х.ч.) и ионную жидкость этилсульфат 1-этил-3-метилимидазолия (ЭСЭМИ, “Merck”, 99%).

Условия синтеза полимеров были оптимизированы путем варьирования природы ФМ, соотношения функциональный мономер – темплат (Т) и количества сшивающего агента в реакционной смеси, природы растворителя.

*Методика синтеза.* Для синтеза ПМО к раствору кверцетина (1; 0,5; 0,25; 0,125 ммоль) в соответствующем количестве выбранного растворителя (табл. 1) прибавляли функциональный мономер (АА, ДМАЭМА или МАК) и помещали раствор в холодильник на 1 час. Затем в раствор добавляли ЭГДМА и АИБН. Мешающее воздействие кислорода исключали, проводя синтез в инертной атмосфере аргона (реакционную смесь продували аргоном в течение 15 мин). Полимеризацию проводили в течение 24 часов в термостате “MLW U2c” при температуре 60°C. Полимер сравнения получали аналогично, но в отсутствие кверцетина. Полученные полимеры растирали в агатовой ступке, просеивали на лабораторных ситах и отбирали фракцию с размером частиц 250 – 400 мкм. Для удаления кверцетина из сорбентов использовали ацетон и смеси 0,1 М гидроксид натрия – метанол (9:1 и 1:9) или уксусная кислота – метанол (1:9); контроль над удалением кверцетина из ПМО осуществляли спектрофотометрически.

В табл. 2 перечислены компоненты, использованные при синтезе ПМО и соответствующих ПС, масса которых составляла 3 г.

*Оценка удельной поверхности синтезированных сорбентов.* Удельную поверхность полимеров определяли из низкотемпературной адсорбции азота методом тепловой десорбции. Анализ экспериментальных данных, представленных в табл. 2, показал, что во всех случаях полимеры с отпечатками кверцетина имеют более развитую поверхность по сравнению с соответствующими ПС.

На примере полимеров, при синтезе которых использовали одинаковый состав реакционной смеси (соотношение ФМ:КВ = 1:0,5, растворитель ацетон), а варьировали только природу ФМ установлено, что удельная поверхность (указана в скобках, м<sup>2</sup>/г) уменьшается в рядах: МАК (591; ПМО<sub>2</sub>) > АА (395; ПМО<sub>3</sub>) > ДМАЭМА (364; ПМО<sub>1</sub>) для ПМО и, соответственно, для ПС: МАК (573) > АА (389) > ДМАЭМА (321).

Таблица 2 – Компоненты, использованные для синтеза полимеров с отпечатками кверцетина и ПС, и значения удельных поверхностей синтезированных материалов.

Полимер	Растворитель, мл	Кверцетин, ммоль	ФМ, ммоль	ЭГДМА, ммоль	АИБН, ммоль	$S_{уд}$ , м <sup>2</sup> / г
ПМО <sub>1</sub>	Ацетон,	1	ДМАЭМА,	10	0,12	364
ПС <sub>1</sub>	17	–	2	10	0,12	321
ПМО <sub>2</sub>	Ацетон,	1	МАК,	10	0,12	591
ПС <sub>2</sub>	17	–	2	10	0,12	573
ПМО <sub>3</sub>	Ацетон,	1	АА,	10	0,12	395
ПС <sub>3</sub>	17	–	2	10	0,12	389
ПМО <sub>4</sub>	Ацетон,	1	АА,	20	0,12	330
ПС <sub>4</sub>	17	–	2	20	0,12	319
ПМО <sub>5</sub>	Ацетон,	1	АА,	5	0,12	214
ПС <sub>5</sub>	17	–	2	5	0,12	201
ПМО <sub>6</sub>	Ацетон,	0,5	АА,	10	0,12	400
ПС <sub>6</sub>	17	–	2	10	0,12	389
ПМО <sub>7</sub>	Ацетон,	0,25	АА,	10	0,12	524
ПС <sub>7</sub>	17	–	2	10	0,12	389
ПМО <sub>8</sub>	Ацетон,	0,125	АА,	10	0,12	470
ПС <sub>8</sub>	17	–	2	10	0,12	389
ПМО <sub>9</sub>	ДМСО,	1	АА,	10	0,72	916
ПС <sub>9</sub>	8,5	–	2	10	0,72	527
ПМО <sub>10</sub>	ТГФ,	1	АА,	10	0,72	934
ПС <sub>10</sub>	10	–	2	10	0,72	591
ПМО <sub>11</sub>	ЭСЭМИ,	1	АА,	10	0,36	180
ПС <sub>11</sub>	17	–	2	10	0,36	172

Показано, что величина удельной поверхности зависит от соотношения АА:КВ в реакционной смеси: при изменении соотношения от 1:0,0625 (ПМО<sub>8</sub>) до

1:0,125 (ПМО<sub>7</sub>) она возрастает от 470 до 524 м<sup>2</sup>/г; а затем, при уменьшении соотношения до 1:0,25 (ПМО<sub>6</sub>), уменьшается до 400 м<sup>2</sup>/г; и практически не изменяется при изменении соотношения до 1:0,5 (395 м<sup>2</sup>/г; ПМО<sub>3</sub>). По-видимому, кверцетин в реакционной смеси наряду с растворителем выступает в качестве порообразователя.

Удельная поверхность ПМО зависит и от степени сшивки ПМО (количества сшивающего агента, введенного в реакционную смесь). Степень сшивки полимеров (% , вес.) определяли по содержанию сшивающего агента в реакционной смеси. Обнаружено, что наиболее развитая поверхность (указана в скобках, м<sup>2</sup>/г) формируется при степени сшивки, равной 92% (395; ПМО<sub>3</sub>). Уменьшение степени сшивки до 86% (ПМО<sub>5</sub>), как и увеличение до 96% (ПМО<sub>4</sub>), приводит к уменьшению  $S_{уд}$  до 214 и 330 м<sup>2</sup>/г соответственно. Установлено, что удельная поверхность ПМО и соответствующих ПС зависит от природы растворителя, используемого на стадии синтеза этих полимеров (табл. 2), что, вероятно, связано с их различной порообразующей способностью.

*Исследование сорбционных свойств материалов с молекулярными отпечатками кверцетина.* Исследование сорбционных свойств новых материалов проводили с привлечением результатов изучения распределения веществ в системе твердое тело – жидкость. Поскольку важными ожидаемыми свойствами ПМО являются эффективность извлечения и способность распознавать молекулу-темплат, при оценке их сорбционных свойств сравнивали не только степени извлечения (коэффициенты распределения), но и значения импринтинг-факторов (IF). Импринтинг-факторы рассчитывали на линейных участках изотерм сорбции как отношение коэффициента распределения сорбируемого соединения при использовании полимера с отпечатками к коэффициенту распределения этого соединения в случае полимера сравнения. Интерпретацию полученных результатов проводили, сравнивая физико-химические параметры сорбции кверцетина на соответствующих парах полимеров (табл. 3).

Изучено влияние на селективность и эффективность ПМО различных факторов, варьируемых как на стадии их синтеза (природа ФМ, количество сшивающего агента, природа растворителя, соотношение ФМ:КВ в реакционной

смеси), так и на стадии сорбции (природа растворителя, рН раствора, время контакта фаз). Рассмотрим влияние этих факторов более детально.

Таблица 3 – Степень извлечения ( $R$ , %) и коэффициенты распределения ( $D$ ) кверцетина на полимерах с молекулярными отпечатками этого соединения и полимерах сравнения и значения импринтинг-факторов ( $IF$ ).

$c_{KB} = 2 \cdot 10^{-5}$  М, растворитель – ацетон:вода = 1:4 (об.),  $V = 5$  мл,  
 $m = 0,020 \pm 0,001$  г,  $t = 60$  мин,  $n = 3$ ,  $P = 0,95$

Сорбент	$R$ , %	$D \cdot 10^{-2}$	$IF$
ПМО <sub>1</sub>	89 ± 1	20,2 ± 0,3	1,1
ПС <sub>1</sub>	88 ± 1	18,3 ± 0,3	
ПМО <sub>2</sub>	77 ± 3	8,9 ± 0,7	1,2
ПС <sub>2</sub>	74 ± 3	7,5 ± 0,6	
ПМО <sub>3</sub>	80 ± 5	10,0 ± 0,7	6,0
ПС <sub>3</sub>	40 ± 5	1,7 ± 0,3	
ПМО <sub>4</sub>	84 ± 3	13,1 ± 0,8	1,4
ПС <sub>4</sub>	79 ± 2	9,4 ± 0,5	
ПМО <sub>5</sub>	80 ± 2	10,0 ± 0,7	1,2
ПС <sub>5</sub>	77 ± 2	8,4 ± 0,5	
ПМО <sub>6</sub>	73 ± 4	6,8 ± 0,4	4,1
ПС <sub>6</sub>	40 ± 5	1,7 ± 0,3	
ПМО <sub>7</sub>	71 ± 1	6,10 ± 0,09	3,7
ПС <sub>7</sub>	40 ± 5	1,7 ± 0,3	
ПМО <sub>8</sub>	61 ± 1	3,90 ± 0,07	2,3
ПС <sub>8</sub>	40 ± 5	1,7 ± 0,3	
ПМО <sub>9</sub>	80 ± 3	10,0 ± 0,4	1,3
ПС <sub>9</sub>	76 ± 3	7,9 ± 0,4	
ПМО <sub>10</sub>	80 ± 5	10,0 ± 0,7	1,0
ПС <sub>10</sub>	80 ± 5	10,0 ± 0,7	
ПМО <sub>11</sub>	65 ± 5	4,6 ± 0,4	1,1
ПС <sub>11</sub>	63 ± 5	4,3 ± 0,4	

Характер зависимости степени извлечения кверцетина от рН свидетельствует о том, что это соединение извлекается на ПМО и ПС в молекулярной форме:

максимальная сорбция наблюдается в интервале рН 2 – 6 ( $pK_{KB}^{a1} = 6,90$ ), сорбционное равновесие устанавливается в течение 60 мин.

*Влияние природы ФМ.* При выборе ФМ на стадии синтеза ПМО учитывают природу донорных атомов, входящих в состав ФМ, и возможность образования устойчивого ассоциата мономер:темплат за счет нековалентных взаимодействий самых различных типов. Были синтезированы три пары полимеров с отпечатками кверцетина с использованием в качестве функциональных мономеров 2-(диметиламино)-этилметакрилата, метакриловой кислоты и акриламида и проведена оценка их сорбционных свойств. Как видно из сравнения изотерм сорбции, приведенных на рис. 1, природа ФМ влияет как на эффективность синтезированных сорбентов, так и на способность ПМО к молекулярному распознаванию целевых молекул.

Установлено, что способностью к повторному связыванию кверцетина обладают только ПМО, синтезированные с использованием АА в качестве ФМ. Значения импринтинг-факторов (указаны в скобках) увеличиваются при переходе от ДМАЭМА (1,1; ПМО<sub>1</sub>) к МАК (1,2; ПМО<sub>2</sub>) и, далее, к АА (6,0; ПМО<sub>3</sub>).

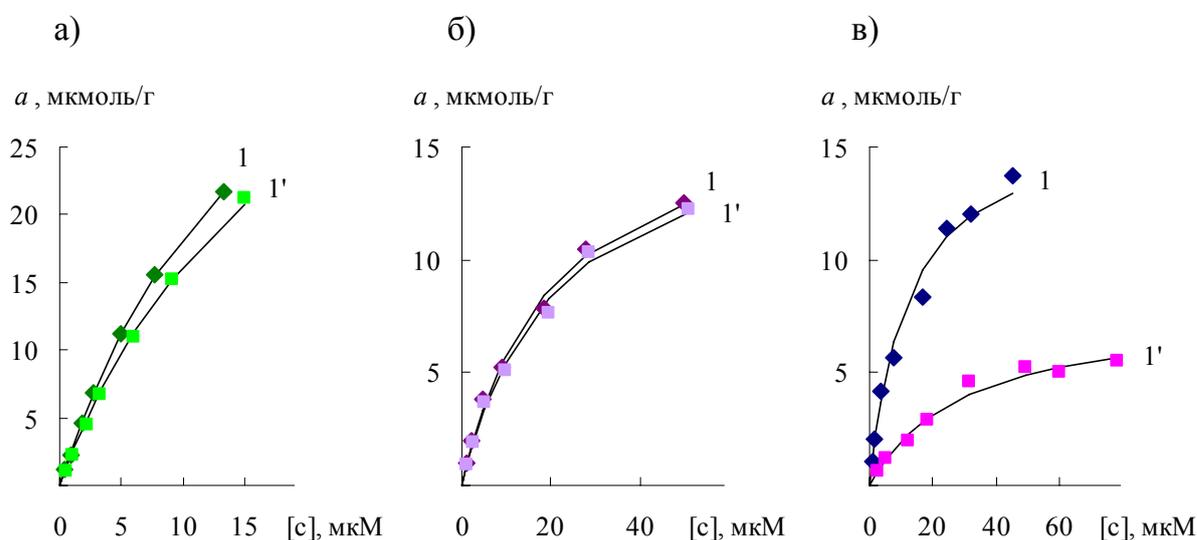


Рисунок 1 – Изотермы сорбции кверцетина

на полимерах с отпечатками этого соединения (1) и полимерах сравнения (1'), синтезированных с использованием в качестве функциональных мономеров 2-(диметиламино)-этилметакрилата (а), метакриловой кислоты (б) и акриламида (в).  $V = 5$  мл,  $m_s = 0,020 \pm 0,001$  г,  $t = 60$  мин. Сорбенты: ПМО<sub>1</sub>, ПС<sub>1</sub> (а); ПМО<sub>2</sub>, ПС<sub>2</sub> (б); ПМО<sub>3</sub>, ПС<sub>3</sub> (в).

*Влияние количества сшивающего агента.* Для выяснения связи между степенью сшивки ПМО и их способностью к повторному связыванию кверцетина были синтезированы три пары полимеров на основе АА с использованием ЭГДМА в качестве сшивающего агента со степенями сшивки 86 (ПМО<sub>5</sub>), 92 (ПМО<sub>3</sub>) и 96 (ПМО<sub>4</sub>) %, вес. Экспериментальные результаты указывают на то, что способностью к молекулярному распознаванию кверцетина обладает только ПМО<sub>3</sub>, при синтезе которого степень сшивки была равна 92%. При увеличении степени сшивки до 96% и уменьшении ее до 86% способность к молекулярному распознаванию кверцетина уменьшается (рис. 2, табл. 3).

*Влияние соотношения функциональный мономер – темплат в реакционной смеси* на сорбционные свойства ПМО изучено на примере четырех пар полимеров (ПМО<sub>3</sub>, ПМО<sub>6</sub> – ПМО<sub>8</sub> и ПС<sub>3</sub>, ПС<sub>6</sub> – ПС<sub>8</sub>). Важно отметить, что в каждой из изученных систем соотношения компонентов и условия синтеза ПС не отличались. Содержание компонентов в реакционной смеси поддерживали постоянным, варьировали только количество кверцетина (табл. 2). Из сравнения изотерм сорбции кверцетина (рис. 2, а) видно, что сорбционная способность ПМО зависит от соотношения ФМ:КВ: наклон изотерм сорбции возрастает при уменьшении соотношения ФМ:КВ от 1:0,0625 до 1:0,5.

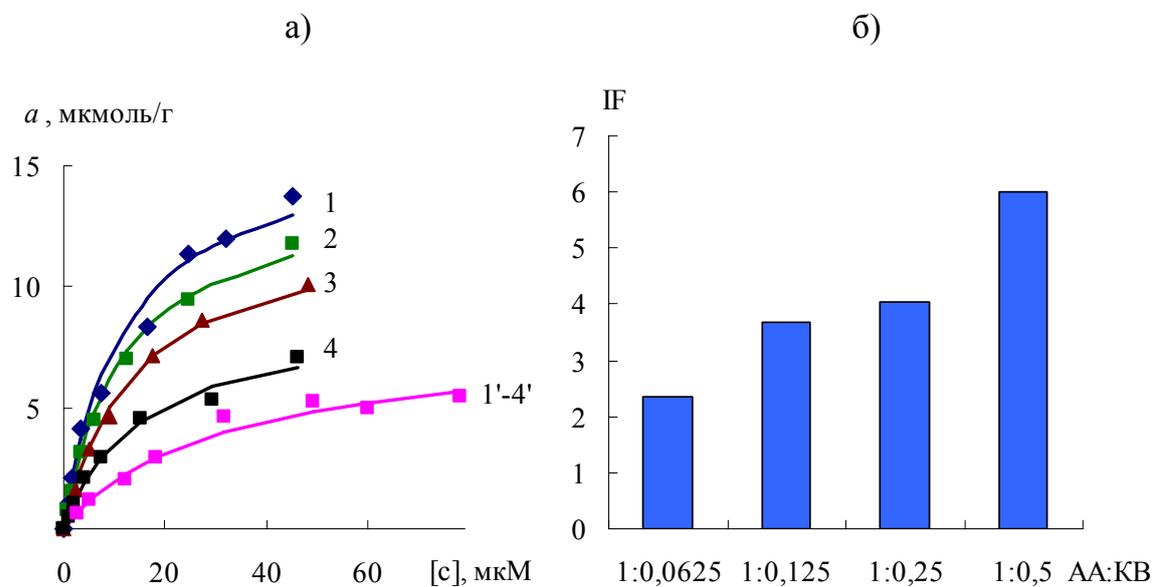


Рисунок 2 – Изотермы сорбции кверцетина

на полимерах с отпечатками этого соединения и полимерах сравнения, синтезированных с различным соотношением функциональный мономер (АА) – темплат (а) и значения импринтинг-факторов (б).  $c_{KB} = 2 \cdot 10^{-5}$  М,  $V = 5$  мл,  $m = 0,020$

$\pm 0,001$  г,  $t = 60$  мин. Сорбенты: ПМО<sub>3</sub>, ПС<sub>3</sub> (1, 1'); ПМО<sub>6</sub>, ПС<sub>6</sub> (2, 2'); ПМО<sub>7</sub>, ПС<sub>7</sub> (3, 3'); ПМО<sub>8</sub>, ПС<sub>8</sub> (4, 4').

Для соответствующих ПС, синтезированных в разное время, но с одинаковым соотношением компонентов в реакционной смеси, изотермы сорбции практически совпадают. Изменение соотношения ФМ:КВ в реакционной смеси решающим образом влияет и на распознавательную способность ПМО: значения  $IF$  только за счет изменения этого параметра возрастают от 2,3 до 6,0 при уменьшении соотношения до 1:0,5. Дальнейшее увеличение количества кверцетина в реакционной смеси не представлялось возможным вследствие его малой растворимости в ацетоне.

*Влияние растворителя на стадии синтеза ПМО.* Известно, что селективность и эффективность ПМО зависят от природы растворителя, использованного при их синтезе. Наиболее подходящими растворителями для молекулярного импринтинга считаются растворители с низкой диэлектрической проницаемостью (толуол, дихлорметан, хлороформ, ацетонитрил, метанол). Однако в случае использования кверцетина в качестве темплата применение традиционных растворителей для синтеза ПМО оказывается невозможным вследствие его низкой растворимости в них. Поэтому в данной работе для выявления связи между природой растворителя компонентов реакционной смеси и способностью ПМО к повторному связыванию темплата были синтезированы четыре пары полимеров на основе акриламида с использованием ацетона, диметилсульфоксида (ДМСО), тетрагидрофурана (ТГФ) и ионной жидкости этилсульфата 1-этил-3-метилимидазолия (ЭСЭМИ) в качестве растворителей (табл. 2).

Из сравнения данных, приведенных в табл. 3, видно, что лучшей способностью к молекулярному распознаванию кверцетина обладает ПМО<sub>3</sub>, синтезированный в ацетоне ( $IF = 6,0$ ). Полимеры, синтезированные в ДМСО и ТГФ, извлекают кверцетин так же эффективно, как и полимер, синтезированный в ацетоне, но не способны к молекулярному распознаванию кверцетина (значения  $IF$  равны 1,3 и 1,0 соответственно). Полимер, синтезированный в ионной жидкости, менее эффективно извлекает кверцетин, чем полимеры, синтезированные в других растворителях, и не способен к молекулярному распознаванию кверцетина ( $IF = 1,1$ ). Вероятно, в этих растворителях нековалентные взаимодействия мономер –

темплат оказываются более слабыми, чем в ацетоне, что, в конечном итоге, приводит к получению полимеров, обладающих худшей способностью к молекулярному распознаванию.

*Влияние растворителя на стадии сорбции.* Изучена сорбция кверцетина из растворов, содержащих разное количество ацетона (табл. 4). Установлено, что эффективность ПМО<sub>3</sub> и его способность к распознаванию кверцетина возрастают с уменьшением содержания ацетона в растворе. По-видимому, это можно объяснить тем, что в повторное связывание кверцетина с полимером существенный вклад вносят гидрофобные взаимодействия.

Таблица 4 – Степень извлечения ( $R$ ), коэффициенты распределения ( $D$ ) кверцетина на полимере с молекулярными отпечатками этого соединения (ПМО<sub>3</sub>) и соответствующем полимере сравнения (ПС<sub>3</sub>) и значения импринтинг-факторов ( $IF$ ) при сорбции кверцетина из смесей ацетон – вода.  $c_{KB} = 2 \cdot 10^{-5}$  М,  $V = 5$  мл,  $m = 0,020 \pm 0,001$  г,  $t = 60$  мин,  $n = 3$ ,  $P = 0,95$

$c(\text{ацетон}), \text{ об. } \%$	$R_{\text{ПМО}}, \%$	$R_{\text{ПС}}, \%$	$D_{\text{ПМО}} \cdot 10^{-2}$	$D_{\text{ПС}} \cdot 10^{-2}$	$IF$
100	$4,0 \pm 0,5$	$0,80 \pm 0,05$	$0,10 \pm 0,02$	$0,020 \pm 0,002$	5,0
20	$80 \pm 5$	$40 \pm 5$	$10,0 \pm 0,7$	$1,7 \pm 0,3$	6,0
2,5	$91 \pm 6$	$60 \pm 5$	$25 \pm 2$	$3,8 \pm 0,4$	6,7
1	$97 \pm 6$	$73 \pm 5$	$81 \pm 5$	$6,8 \pm 0,5$	12,0

*Оценка селективности сорбции.* Для оценки селективности был выбран ПМО<sub>3</sub>, обладающий лучшей распознавательной способностью по отношению к кверцетину. На этом сорбенте в статическом режиме изучена сорбция кверцетина и некоторых структурно родственных ему соединений: производных флавона (хризина, морины и рутина) и флавана (нарингенина и нарингина). Из данных, приведенных в табл. 5, видно, что ПМО<sub>3</sub> лучше всего распознает кверцетин. Более гидрофобные флавоноиды хризин и нарингенин сорбируются лучше и на ПМО<sub>3</sub>, и на ПС<sub>3</sub>, но ПМО<sub>3</sub> распознает эти соединения хуже. Напротив, более гидрофильное, чем кверцетин, соединение – морин, а также рутин и нарингин – вещества, содержащие в своей структуре объемные дисахаридные заместители, – сорбируются на ПМО<sub>3</sub> менее эффективно и практически так же, как и на ПС<sub>3</sub>.

Экспериментальные данные указывают на то, что ПМО<sub>3</sub> содержит в своей структуре центры селективного связывания кверцетина, которые имеют преимущественно гидрофобный характер. Такое сорбционное поведение синтезированных полимеров можно объяснить вовлечением гидрофобных участков молекул ФМ и, возможно, молекул сшивающего агента в образование предполимеризационного комплекса. Ниже приведен ряд селективности сорбции структурно родственных флавоноидов на этом полимере (ПМО<sub>3</sub>), построенный в соответствии с уменьшением значений импринтинг-факторов (указаны в скобках): кверцетин (6,0) > хризин (3,3) > рутин (2,1) > нарингенин (2,0) > нарингин (1,3) > морин (1,2).

Таблица 5 – Параметры гидрофобности ( $\lg P$ ), степени извлечения ( $R$ , %) и значения импринтинг-факторов ( $IF$ ) флавоноидов на ПМО<sub>3</sub> и ПС<sub>3</sub>.

$c_{KB} = 2 \cdot 10^{-5}$  М, растворитель – ацетон:вода = 1:4 (об.),  $V = 5$  мл,  $m_S = 0,020 \pm 0,001$  г,  $t = 60$  мин,  $n = 3$ ,  $P = 0,95$

Соединение	$\lg P$	$R$ , %		$IF$
		ПМО <sub>3</sub>	ПС <sub>3</sub>	
Нарингенин	$3,2 \pm 0,4$	$80 \pm 5$	$67 \pm 4$	2,0
Хризин	$2,9 \pm 0,5$	$84 \pm 4$	$62 \pm 5$	3,3
<i>Кверцетин</i>	$2,1 \pm 0,7$	$80 \pm 5$	$40 \pm 5$	6,0
Морин	$1,6 \pm 0,7$	$38 \pm 5$	$33 \pm 4$	1,2
Нарингин	$2,7 \pm 0,7$	$18 \pm 1$	$15 \pm 1$	1,3
Рутин	$2,0 \pm 0,9$	$12 \pm 1$	$6 \pm 1$	2,1

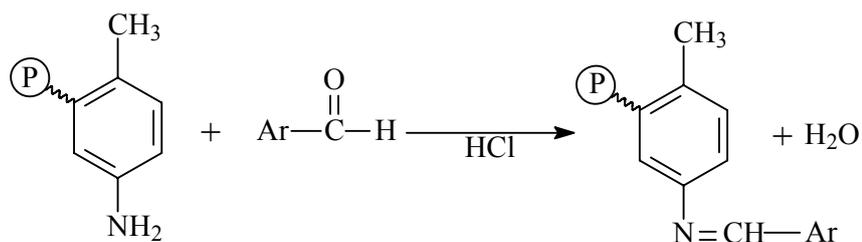
Таким образом, в соответствии с ТЗ, синтезирована серия из 11-ти (в ТЗ – не менее 5-ти) лабораторных образцов новых наноструктурированных сорбентов массой 3 г (в ТЗ – не менее 2 г) каждого на основе акриламида с отпечатками кверцетина для концентрирования этого соединения и других флавоноидов. Эти сорбенты обеспечивают селективное извлечение целевых компонентов из растворов на 90 – 95% (в ТЗ – на 90 – 95%).

2.3. Разработка методики сорбционно-спектрофотометрического определения 4-диметиламинобензальдегида, 4-диметиламинокоричного альдегида и ванилина в фармпрепаратах и пищевом сырье.

*Выбор оптимальных условий взаимодействия пенополиуретана с ароматическими альдегидами.* Реакцию конденсации ППУ с ароматическими альдегидами проводили следующим образом: к 5 мл водного раствора альдегида в кислой среде добавляли по одной таблетке ППУ (диаметр 16 мм, высота 2,5 мм,  $m_{\text{ППУ}} \sim 0,017 \pm 0,003$  г), прожимали стеклянной палочкой до полного удаления пузырьков воздуха, встряхивали на механическом вибросмесителе. Исследование реакций конденсаций с участием ППУ проводили с привлечением результатов распределения веществ в системе твердое тело-жидкость. О выходе окрашенных продуктов судили, измеряя функцию Кубелки-Мунка  $F$  при длине волны максимального поглощения.

О протекании реакции судили по изменению цвета таблеток и спектров диффузного отражения (рис.3). Как видно из данных, представленных на рис. 3, по сравнению с исходным образцом ППУ в спектрах диффузного отражения продуктов его конденсации с ароматическими альдегидами наблюдаются изменения, проявляющиеся в появлении четко выраженных полос. Значения длин волн в максимуме поглощения продуктов взаимодействия ППУ с различными альдегидами приведены в табл. 6.

На основании анализа спектров диффузного отражения, ИК-спектров и химических свойств образующихся продуктов высказано предположение, что в результате этих взаимодействий в фазе ППУ образуются полимерные основания Шиффа:



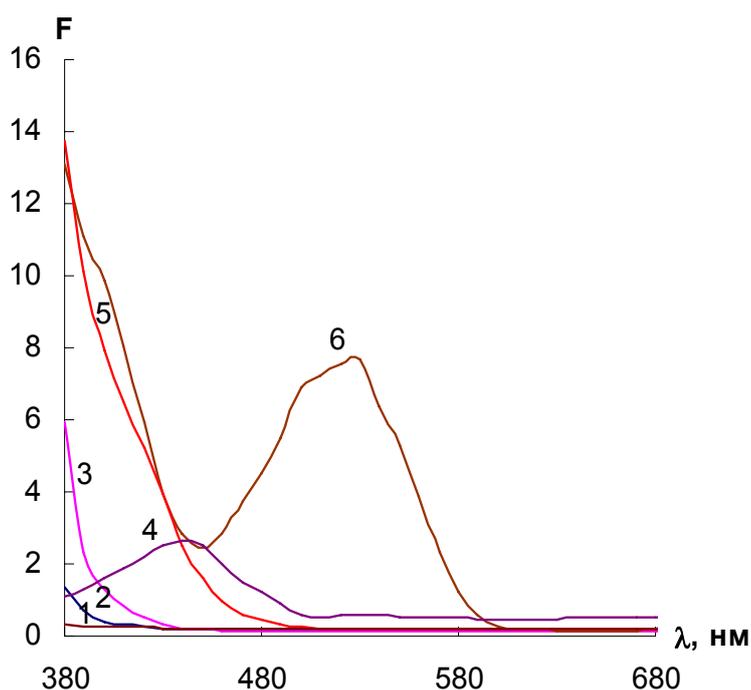


Рисунок 3 – Спектры диффузного отражения ППУ (1) и продуктов его взаимодействия с бензальдегидом (2), 3-нитробензальдегидом (3), 4-(N,N-диметиламино)бензальдегидом (4), 4-нитробензальдегидом (5), 4-(N,N-диметиламино)коричный альдегидом (6). Условия проведения реакции:  $c_{\text{альд}}=0,2$  мг/мл,  $V=5$  мл,  $c_{\text{HCl}}=0,1$  М,  $t=30$  мин, вибросмеситель,  $25^{\circ}\text{C}$

Таблица 6 – Значения  $\lambda_{\text{max}}$  продуктов взаимодействия ППУ с ароматическими альдегидами.

Ароматический альдегид	$\lambda_{\text{max}}$ , нм
Бензальдегид (БА)	380
3-Нитробензальдегид (ЗНБА)	380
4-Нитробензальдегид(4НБА)	380
4-(N,N-Диметиламино)бензальдегид (ДМАБА)	440
4-(N,N-Диметиламино)коричный альдегид (ДМАКА)	530
Ванилин(4-гидрокси-3-метоксибензальдегид) (В)	380

С целью оптимизации условий протекания реакции конденсации изучено влияние кислотности раствора, времени контакта фаз, концентрации компонентов. Поскольку взаимодействие ППУ с ароматическими альдегидами протекает

медленно (от 30 мин до нескольких суток), представляло интерес ускорить реакцию конденсации. Для этого было изучено влияние ультразвука (УЗ) и нагревания на скорость образования и выход продуктов. Показано, что совместное воздействие этих двух факторов приводит к увеличению, иногда в несколько раз, выхода полимерного основания Шиффа (рис. 4), а равновесие устанавливается в течение 30 – 80 мин.

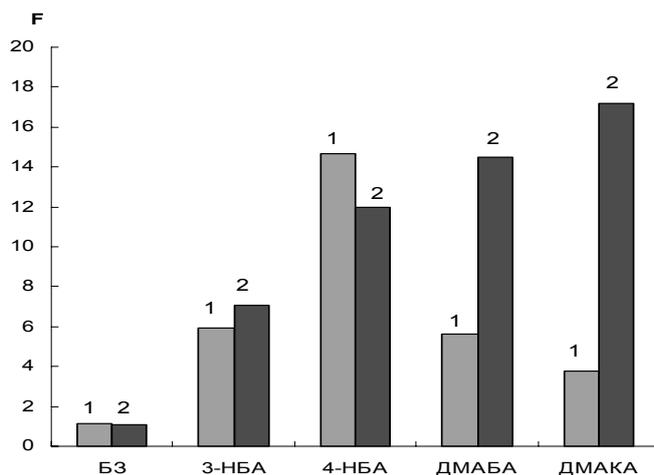


Рисунок 4 – Значения функции Кубелки-Мунка в максимуме поглощения продуктов взаимодействия ППУ с ароматическими альдегидами при проведении реакции на вибросмесителе (1;  $t=30$  мин,  $25^{\circ}\text{C}$ ) и в ультразвуковой ванне (2;  $t=30$  мин,  $50^{\circ}\text{C}$ ).  $c_{\text{АА}}$ , мг/мл: 0,1 (ДМАКА), 0,2 (БЗ, 3-НБА, 4-НБА), 0,4 (ДМАБА).

Максимальный выход полимерных оснований Шиффа достигается в 0,1 – 0,2 М растворе HCl для всех изученных ароматических альдегидов, кроме ванилина, для которого оптимальной средой для проведения реакции является 1 – 1,5 М HCl.

Установлено, что между значением функции Кубелки-Мунка при  $\lambda_{\text{max}}$  и концентрацией ароматических альдегидов в водном растворе наблюдается линейная зависимость, что и было положено в основу разработки методики определения этих соединений с применением спектроскопии диффузного отражения.

*Методика определения ароматических альдегидов.* Для построения градуировочных графиков в сосуды для встряхивания с притертыми пробками, содержащие различные количества определяемого альдегида, вводили оптимальное количество соляной кислоты и добавляли воду до общего объема 5

мл. В каждый сосуд помещали по одной таблетке ППУ ( $m_{\text{ППУ}} \sim 0,017 \pm 0,003$  г), прожимали ее стеклянной палочкой для удаления пузырьков воздуха и выдерживали в ультразвуковой ванне (а в случае 4-НБА встряхивали на вибросмесителе) в течение времени, необходимого для достижения хемосорбционного равновесия, после чего таблетки ППУ, вынимали, высушивали фильтровальной бумагой и измеряли их диффузное отражение в максимуме поглощения. Градуировочные графики строили в координатах  $\Delta F - c$ , где  $c$  – концентрация ароматических альдегидов в растворе, мг/мл,  $\Delta F$  – разность функций Кубелки-Мунка полимерного основания Шиффа и контрольного образца ППУ. В табл. 7 приведены метрологические характеристики разработанных методик. Правильность методики подтверждена методом «введено - найдено» (табл. 8).

Таблица 7 – Характеристики определения ароматических альдегидов с помощью пенополиуретана.

Ароматический альдегид	Оптимальные условия взаимодействия	Уравнение градуировочного графика ( $c$ , мг/мл)	ДОС, мкг/мл	$c_{\text{min}}$ , мкг/мл
БЗ	0,1 М HCl, 25°C, 30 мин	$\Delta F = 4,36c$ , $R=0,9967$	30 – 700	10
3-НБА	0,1 М HCl, 50°C, 30 мин	$\Delta F = 33,4c$ , $R=0,9971$	6 – 700	2
4-НБА	0,1 М HCl, 25°C, 30 мин	$\Delta F = 72,6c$ , $R=0,9951$	2 – 200	0,7
ДМАБА	0,1 М HCl, 50°C, 60 мин	$\Delta F = 40,2c$ , $R=0,9953$	3 – 400	1
ДМАКА	0,1 М HCl, 50°C, 60 мин	$\Delta F = 218c$ , $R=0,9996$	0,6 – 100	0,2
В	1,2 М HCl, 50°C, 80 мин	$\Delta F = 29,6c$ , $R=0,9975$	5 – 250	1,8

Таблица 8 – Проверка правильности определения ароматических альдегидов методом «введено - найдено» на фоне дистиллированной воды (n=3, P=0,95).

Ароматический альдегид	Введено, мг/мл	Найдено, мг/мл	$s_r$
ДМАБА	0,4	0,38±0,05	0,05
ДМАКА	0,1	0,09±0,02	0,05
БЗ	0,2	0,24±0,02	0,04
3-НБА	0,2	0,19±0,03	0,05
4-НБА	0,2	0,19±0,01	0,02
Ванилин	0,1	0,096±0,003	0,01

*Определение ванилина.* Разработанная методика применена для определения ванилина в пяти образцах пищевого ванилина различных фирм-изготовителей (табл. 9). Навеску вещества 0,25 г растворяли в 25 мл дистиллированной воды, помещали аликвоту объемом 2 мл в сосуды с притертыми пробками, добавляли 1,2 мл 5 М HCl и воду до общего объема 5 мл. В каждый сосуд помещали таблетки ППУ, прожимали стеклянной палочкой для удаления пузырьков воздуха. Проводили реакцию в ультразвуковой ванне при температуре 50<sup>0</sup>С в течение 80 мин. После реакции таблетки сушили фильтровальной бумагой и измеряли значение функции Кубелки-Мунка при 380 нм. Полученные результаты приведены в табл. 9.

Таблица 9 – Результаты определения ванилина в образцах пищевого ванилина различных фирм-изготовителей (n=3, P=0,95).

№ образца	Фирма-изготовитель	Содержание ванилина, %	$s_r$
1	ЗАО «Агроимпорт»	80 ± 10	0,05
2	ООО «Вега-ТУ»	54 ± 7	0,05
3	ООО «Компания Ин Чай»	21 ± 3	0,05
4	ООО «ПрофАгроТехника»	33 ± 2	0,03

Таким образом, в соответствии с ТЗ, с применением спектроскопии диффузного отражения разработана методика сорбционно-спектрофотометрического определения 4-диметиламинобензальдегида, 4-диметиламинокоричного альдегида и ванилина в фармпрепаратах и пищевом сырье с пределом обнаружения на уровне 0,2 – 1,8 мкг/мл, обеспечивающая определение

целевых веществ с величиной относительной погрешности 3 – 5 % (в ТЗ – не превышающей 5 %).

#### 2.4. Проведение исследований по концентрированию фенола и хлорофенолов.

Среди методов концентрирования, применяемых для снижения пределов обнаружения фенолов, наиболее перспективны методы динамического сорбционного концентрирования, при этом эффективно использование полимерных сорбентов.

Фенолы концентрировали из растворов при рН 2,0 – 2,5 в условиях существования молекулярных форм. Как известно из литературы, при сорбции фенола, вследствие его небольшого размера, кинетическое равновесие устанавливается быстро. Действительно на всех изученных сорбентах время установления сорбционного равновесия не превышало 15 мин.

Из литературных данных известно, что изотермы сорбции фенола на полимерных сорбентах XAD-2, XAD-4, PLRP-S 100, Amberchrom CG-161, Envi-Chrom P, LiChrolut EN, MN-100, MN-150 и ХМК-С<sub>16</sub> имеют участок близкий к линейному, в области равновесной концентрации фенола в растворе менее 20 мг·л<sup>-1</sup> [100 – 102]. Изотермы сорбции фенола Меррифилд-полимером и Stygosorb MN-200 получены в настоящей работе. Изотермы сорбции фенола на этих сорбентах, а также на сорбентах XAD-4, MN-100, MN-150, и ХМК-С<sub>16</sub> представлены на рис. 5 и 6. Изотермы сорбции фенола на полистиролах серии MN и XAD – ленгмюровского типа, они имеют участок близкий к линейному при равновесной концентрации фенола в растворе, меньшей 20 мг·л<sup>-1</sup>. Изотермы сорбции фенола на химически модифицированном силикагеле и Меррифилд-полимере линейны в широком диапазоне концентраций. Сорбция фенола на этих сорбентах характеризуется низкими коэффициентами распределения. Значения коэффициентов распределения фенола на всех сорбентах в области Генри, а также параметры уравнения Ленгмюра  $a = \frac{a_m kc}{1 + kc}$ , приведены в табл. 10.

*Концентрирование фенола в динамическом режиме.* Для оптимизации условий концентрирования и выбора эффективных сорбентов с использованием

линейной модели динамики сорбции в настоящей работе были рассчитаны параметры сорбции: коэффициенты распределения и массопереноса. Для этого получены динамические выходные кривые фенола на кремнеземе, модифицированном гексадецильными радикалами ХМК-С<sub>16</sub>, сверхсшитых полистиролах - Styrosorb MN-100, MN-150, MN-200, полистирол-дивинилбензолных сорбентах с низкой степенью сшивки - Amberlite XAD-2, XAD-4 и Меррифилд-полимере.

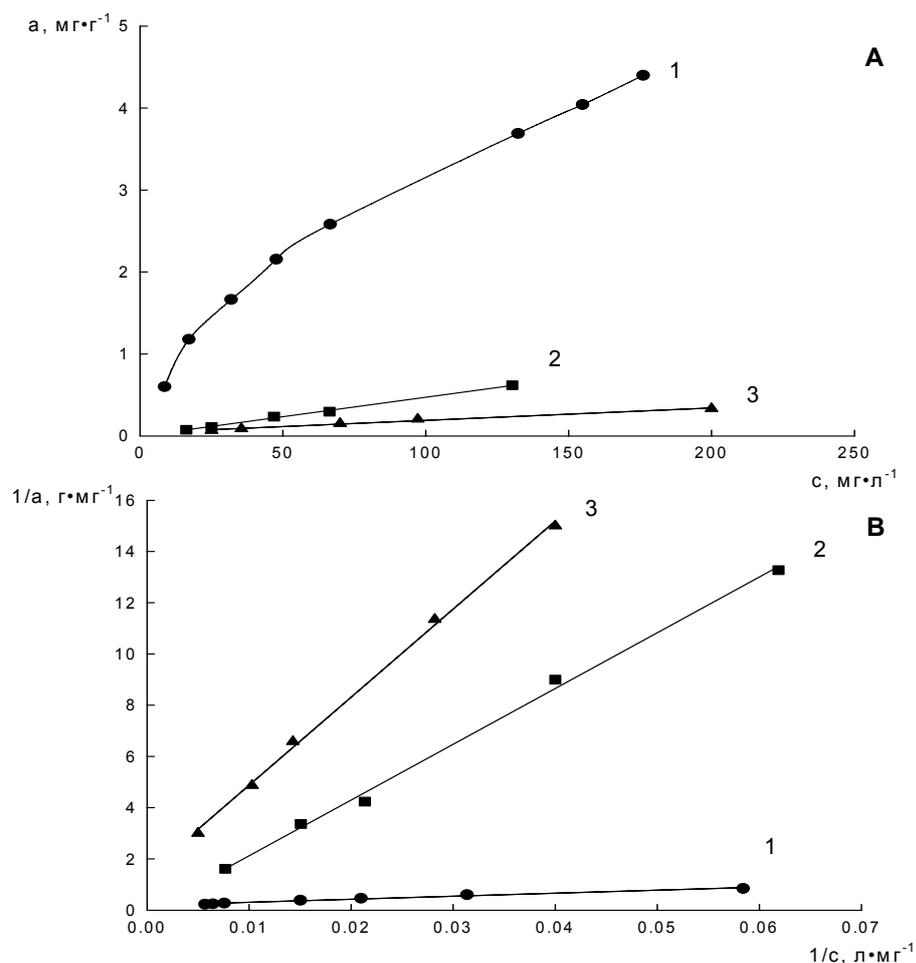


Рисунок 5 – Изотермы сорбции фенола на XAD-2 (1), Меррифилд-полистироле (2) и ХМК-С<sub>16</sub> (3) (А), и их спрямление в координатах уравнения Ленгмюра (В).  $m_{\text{сорбента}}=500$  мг,  $\text{pH}=2$ .

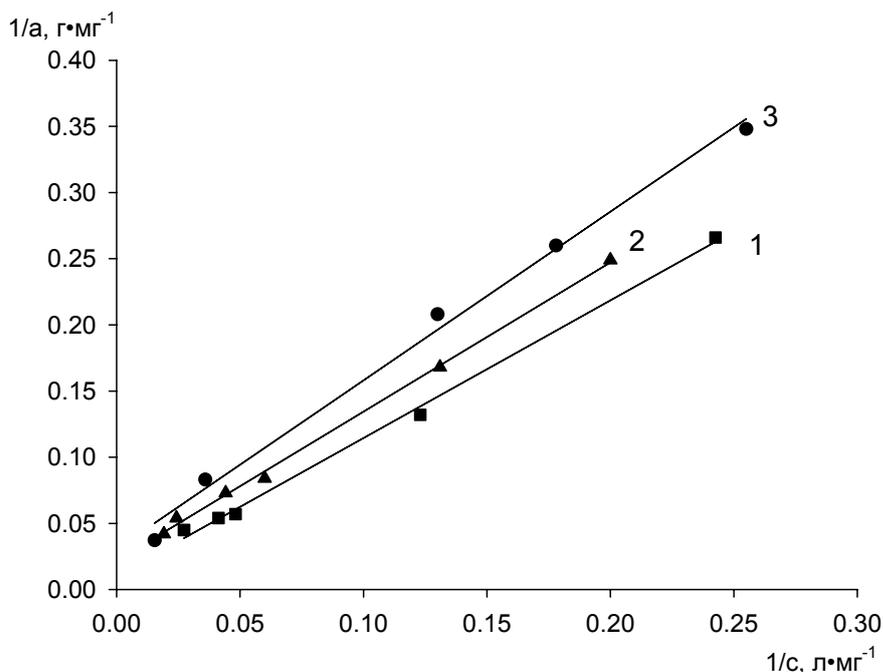


Рисунок 6 – Изотермы сорбции фенола на MN-100(1), MN-150 (2) и MN-200 (3) в координатах уравнения Ленгмюра.  $m_{\text{сорбента}}=20$  мг, pH=2.

Таблица 10 – Параметры уравнения Ленгмюра при сорбции фенола (n=7; P=0.95).

Сорбент	$a_m$ , мг·г <sup>-1</sup>	$k$ , мл·мг <sup>-1</sup>	$K_d = a_m \cdot k$ , мл·г <sup>-1</sup>	Граница области линейности, мг·л <sup>-1</sup>
ХМК-С <sub>16</sub>	0.7±0.1	4.18±0.09	2.9±0.3	>200
Меррифилд-полимер	4.1±0.5	1.27±0.09	5.2±0.8	>150
Amberlite XAD-2	5.2±0.4	16.1±0.8	84±7	80
Amberlite XAD-4	10.8±0.6	16.9±1.1	182±7	65
Styrosorb MN 100	96±6	9.9±0.7	960±100	30
Styrosorb MN 150	46±4	21±1	940±50	25
Styrosorb MN 200	32±2	24±1	780±30	20

Полученные динамические выходные кривые сравнивали с расчетными, полученными с помощью линейных моделей динамики сорбции. Показано, что динамические выходные кривые фенола на сверхсшитых полистиролах (MN-100, MN-150, MN-200) и ХМК-С<sub>16</sub> удовлетворительно описываются линейными моделями как внешнедиффузионной, так и внутридиффузионной динамики

сорбции. Как видно из данных на рис. 7 и 8, в обоих случаях наблюдается удовлетворительное совпадение экспериментальных данных с теоретическими кривыми. Для уточнения механизма массопереноса при сорбции фенола на полистироле MN-200 (полимер из серии MN с наименьшим размером пор) и ХМК-С<sub>16</sub> применяли метод прерывания сорбции. При пропускании раствора фенола через колонку с этими сорбентами, остановке потока на два часа и последующим возобновлении пропускания раствора перегибов на динамической кривой не наблюдали. Это свидетельствует об отсутствии заметного вклада диффузии фенола в фазу сорбента в кинетику массообмена. Поскольку остальные сорбенты серии MN имеют больший размер пор по сравнению с MN-200 то, очевидно, что при сорбции фенола на этих сорбентах также должен реализовываться механизм внешней диффузии.

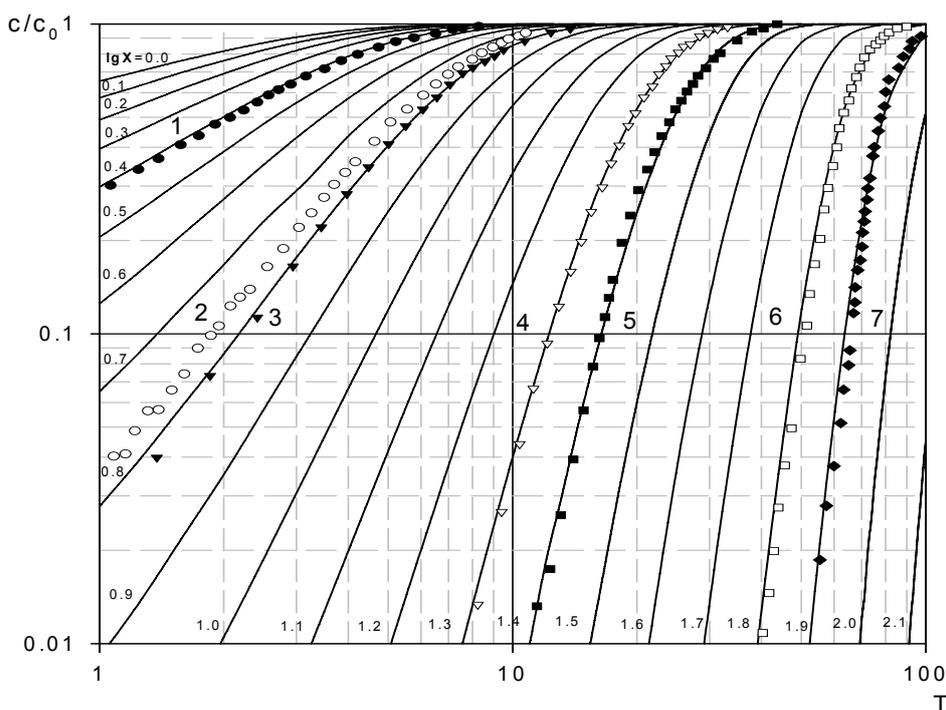


Рисунок 7 – Динамические выходные кривые фенола

на неполярных сорбентах при внешнедиффузионной кинетике сорбции.

Сорбция фенола на: XAD-2 (1), XAD-4 (2), Меррифилд-полистироле (3), ХМК-С<sub>16</sub> (4), MN-100 (5), MN-200 (6), MN-150 (7);  $v = 1.5$  (1),  $0.7$  (2 - 4);  $3.0$  (5),  $2.5$  (6),  $2.0$  (7) мл·мин<sup>-1</sup>; масса сорбента: 112 (1), 132 (2), 144 (3), 141 (4), 54.1 (5), 69.8 (6), 80.7 (7) мг; размеры колонки: 70×2 мм.

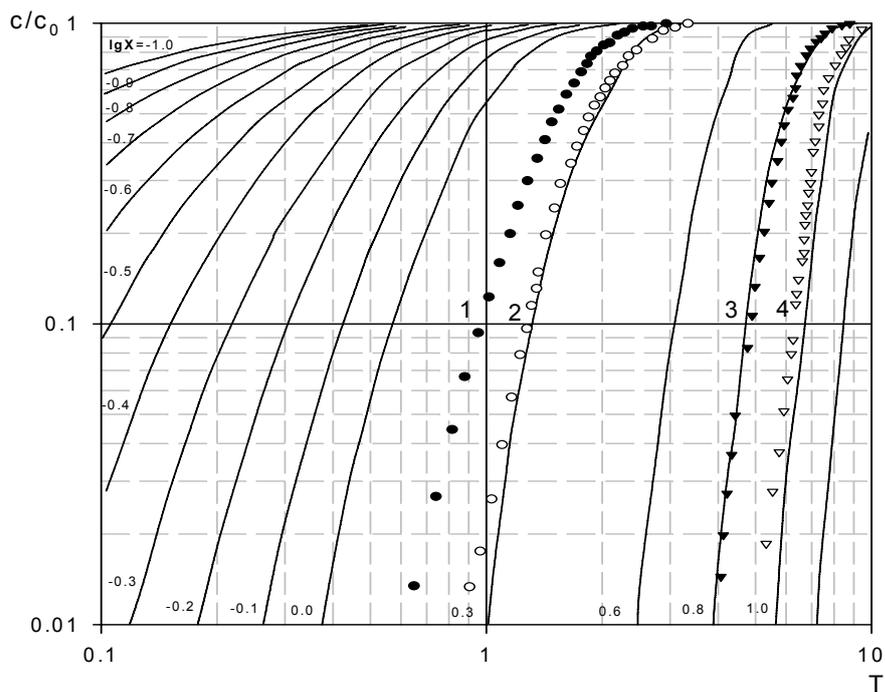


Рисунок 8 – Динамические выходные кривые сорбции фенола

на неполярных сорбентах при внутридиффузионной кинетике массопереноса.

Сорбция фенола на: XMK-C<sub>16</sub> (1), MN-100 (2), MN-200 (3), MN-150 (4);  $v = 0.7$  (1); 3.0 (2), 2.5 (3), 2.0 (4) мл·мин<sup>-1</sup>; масса сорбента: 141 (4), 54.1 (5), 69.8 (6), 80.7 (7) мг; размеры колонки: 70×2 мм.

Динамические выходные кривые фенола на полистирол-дивинилбензольных сорбентах с высокой степенью сшивки PLRP-S 100, Amberchrom CG-161, Envi-Chrom P и LiChrolut EN, полученные авторами [100] в тех же условиях, что и в настоящей работе, использовали для расчета параметров модели. Для этих сорбентов массоперенос также описывается внешнедиффузионной моделью.

Коэффициент распределения  $K_d$  отражает термодинамику сорбции фенола и определяется силой взаимодействия сорбента и сорбируемого вещества. Из данных табл. 11, следует, что коэффициенты распределения фенола при сорбции на высокосшитых и сверхсшитых полистирол-дивинилбензольных сорбентах, в которых степень сшивки превышает 100%, существенно выше, чем на химически модифицированном кремнеземе и полистирол-дивинилбензольных сорбентах с низкой (2-16%) степенью сшивки. При сорбции фенола на сорбенте PLRP-S 100 (степень сшивки 60%) получено промежуточное значение  $K_d$ . Из этого можно

сделать вывод об изменении энергии взаимодействия сорбат-сорбент при изменении степени сшивки полимерного сорбента. При рассмотрении термодинамики сорбции необходимо учитывать то, что энергия взаимодействия органических молекул с поверхностью сорбента в микропорах, размеры которых сравнимы с размером молекул сорбата, несколько выше, чем на поверхности мезо- и макропор [103]. Этим частично объясняется увеличение значений коэффициента распределения при переходе от мезопористых сополимеров полистирола с дивинилбензолом к сорбентам с высокой степенью сшивки, в структуре которых имеются также микропоры.

Таблица 11 – Значения расчетных параметров динамики сорбции фенола.

	Сорбент	$R \cdot 10^{-3}$ , см	$\Gamma$ , мл·мл <sup>-1</sup>	$\beta$ , с <sup>-1</sup>	$K_d$ , мл·г <sup>-1</sup>
1	ХМК-С <sub>16</sub>	7.1	30.1±1.9	1.06±0.05	47±3
2	Меррифилд-полимер	3.0	20.5±1.3	0.37±0.02	31±2
3	Amberlite XAD-2	18.9	24.4±2.1	0.39±0.02	46±4
4	Amberlite XAD-4	23.9	39.6±0.6	0.31±0.01	66±1
5	PLRP-S 100*	1.0	129±6	19.4±0.5	430±20
6	Amberchrom CG-161*	3.8	249±21	4.7±0.5	1080±90
7	Envi-Chrom P*	6.0	242±16	3.6±0.2	1050±70
8	LiChrolut EN*	4.0	575±37	7.3±0.5	2500±160
9	Styrosorb MN-100	3.0	197±2	5.5±0.3	800±10
10	Styrosorb MN-150	3.0	326±4	13.6±0.8	880±10
11	Styrosorb MN-200	5.0	250±7	15.5±0.2	780±20

\*Рассчитано с использованием данных, приведенных в [100]

Высокие коэффициенты распределения фенола на сверхсшитых полистиролах, по-видимому, объясняется более сильными, чем у других сорбентов  $\pi$ - $\pi$  взаимодействиями ароматических колец сорбента и сорбата. Сверхвысокая степень сшивки этих сорбентов достигается за счет сшивания бензольных колец полистирола метиленовыми мостиками. Это приводит к образованию сопряженных ароматических систем. В таких системах можно ожидать высоких коэффициентов

распределения за счет более сильных  $\pi$ - $\pi$  взаимодействий.

Полученные результаты согласуются с опубликованными данными. Влияние структуры сополимеров стирола и дивинилбензола на извлечение фенола была изучена в работах [104, 105]. Было показано, что степень извлечения фенола для сорбентов со степенью сшивки 43% ( $S_{y\phi}=910 \text{ м}^2\cdot\text{г}^{-1}$ ) в 3 раза больше чем для сорбентов со степенью сшивки 25% ( $S_{y\phi}=330 \text{ м}^2\cdot\text{г}^{-1}$ ). Наблюдалась пропорциональная зависимость степени извлечения от величины удельной поверхности полимера. Для сверхсшитых сорбентов ( $S_{y\phi}=1500 \text{ м}^2\cdot\text{г}^{-1}$ ) степень извлечения возрастала в 6 – 7 раз. Аналогично степени извлечения, с увеличением удельной поверхности возрастала и емкость сорбента.

Различия в коэффициентах распределения фенола на сорбентах XAD-2 и XAD-4, определенных из статического эксперимента и рассчитанных с помощью модели, по-видимому, связаны с большим размером частиц этих сорбентов ( $\sim 0.2$  мм) сравнимого с диаметром используемых для концентрирования колонок. В этом случае не соблюдается одно из требований используемой модели, что, вероятно, приводит к неправильному описанию динамики сорбции фенола на этих сорбентах.

Повышение  $K_d$  фенола на ХМК-С<sub>16</sub> и Меррифилд-полимере при переходе в динамический режим связано, очевидно, с геометрической структурой этих сорбентов: эти сорбенты имеют тенденцию к поглощению больших количеств органических растворителей. Как отмечалось в [106], кондиционирование органическим растворителем приводит к уменьшению сорбционной емкости, за счет удерживания молекул растворителя на поверхности сорбента. В динамических условиях этот эффект, по-видимому, минимален, за счет лучшего вымывания растворителя потоком водного раствора пробы.

*Сорбция малых количеств фенола на сорбенте MN-200.* С использованием тритий-меченого фенола получены данные для построения изотермы сорбции в области равновесных концентраций фенола в растворе  $0.1$ - $1000 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$  (рис. 9). Установлено, что в диапазоне  $0.1$ - $10 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$  наблюдается область линейности ( $K_d = 4920 \pm 20 \text{ мл}\cdot\text{г}^{-1}$ ,  $R^2 = 0.99996$ ). В области концентраций  $0.1$ - $1000 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$  изотерма хорошо описывается уравнением Фрейндлиха  $a=k_f c^n$ , использование уравнение Ленгмюра в этом случае дает меньшую сходимость результатов. Уравнением Фрейндлиха также можно описать изотерму вплоть до концентраций

$10^5 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$  ( $k_f = 4.9 \pm 0.1$ ,  $n = 0.91 \pm 0.03$ ,  $R^2 = 0.9969$ ).

Динамические выходные кривые фенола на MN-200 при концентрации  $c_0 = 3 \text{ мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ , описываются внешнедиффузионной моделью (рис. 10). На основании полученных данных определены термодинамические и кинетические параметры сорбции, которые составили  $(0.94 \pm 0.05) \cdot 10^3$ ,  $0.48 \pm 0.06$  и  $(9.1 \pm 0.1) \cdot 10^{-4}$  для  $\Gamma$ ,  $m$  и  $b_0$  соответственно, и рассчитаны оптимальные скорости пропускания раствора и размеры колонок. Эти данные приведены в табл. 12. Видно, что в данном случае результаты, полученные с использованием модели, не противоречат приведенным в литературе (табл. 11).

Для концентрирования выбраны параметры:  $l = 2 \text{ см}$ ,  $d = 0.2 \text{ см}$ ,  $w = 2 \text{ мл}\cdot\text{мин}^{-1}$ ,  $V_{\text{пробы}} = 30 \text{ мл}$ . Эти условия близки к одной из систем в табл. 12, они получены при округлении рассчитанных параметров. В этих условиях на стадии сорбции для незамещенного фенола достигается  $K_{\text{конц}} = 350$  при  $R = 75\%$ . Следует отметить, что задаваемый коэффициент концентрирования учитывает только стадию сорбции, реально достигаемый  $K_{\text{конц}}$  будет зависеть также от условий десорбции.

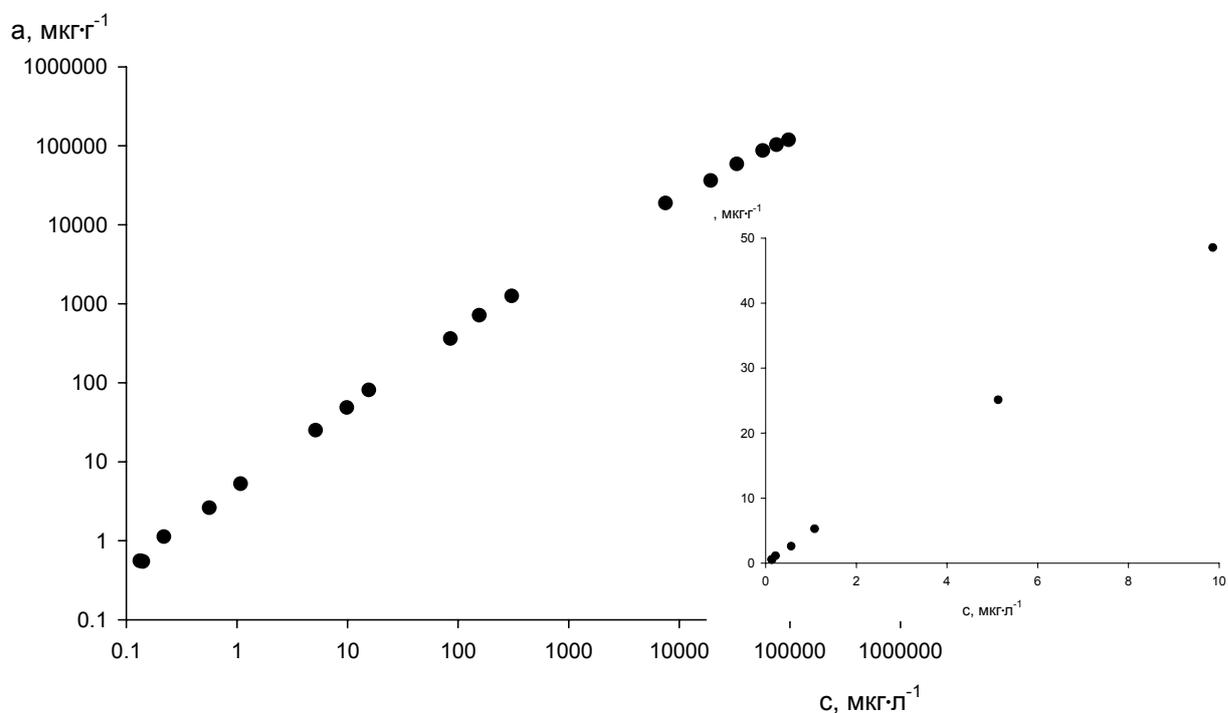


Рисунок 9 – Изотерма сорбции фенола на MN-200 из водного раствора и ее начальный участок.

$$m_{\text{сорбента}} = 50 \text{ мг}, V_{\text{г}} = 50 \text{ мл}, \text{pH} 2.5.$$

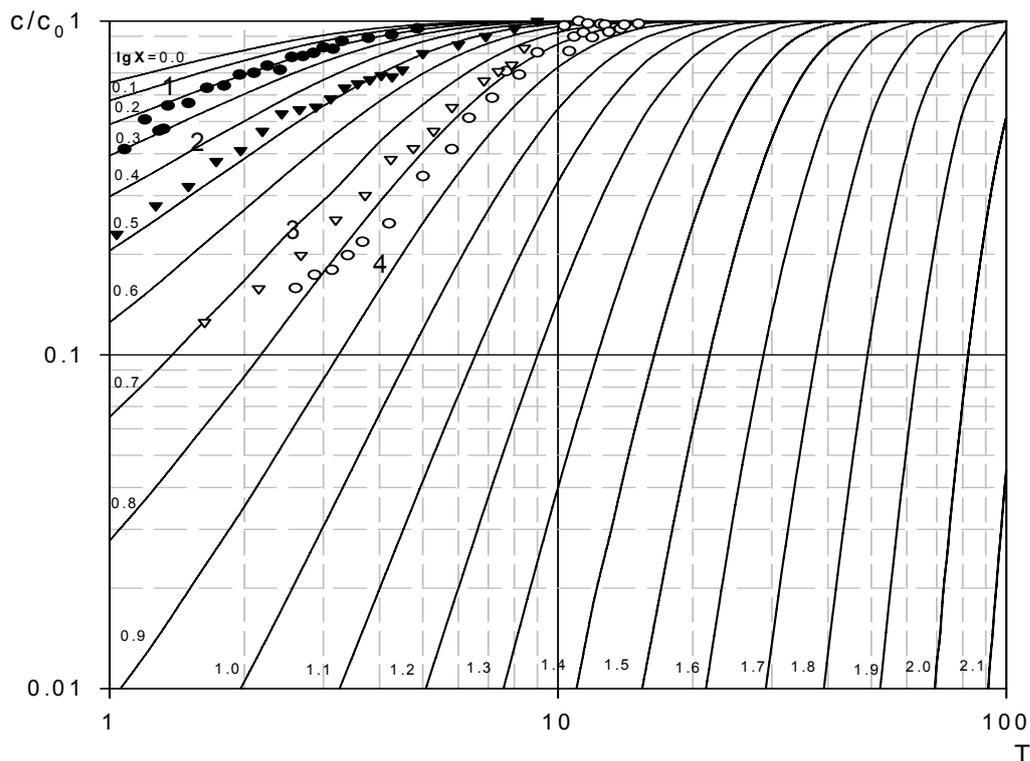


Рисунок 10 – Динамические выходные кривые сорбции фенола на сорбенте MN-200.

Теоретические кривые – сплошные линии. Экспериментальные данные:  $w=1.8$  мл·мин<sup>-1</sup> (1);  $w=1.6$  мл·мин<sup>-1</sup> (2);  $w=0.5$  мл·мин<sup>-1</sup> (3);  $w=0.35$  мл·мин<sup>-1</sup> (4).

Колонка:  $l=18$  мм,  $d=3$  мм,  $c_0=5$  мкг·л<sup>-1</sup>.

*Концентрирование и определение фенола в рассчитанных условиях.* При определении добавок 50 и 150 нг <sup>3</sup>H-фенола в 30 мл дистиллированной воды в выбранных оптимальных условиях раствора найдено ( $n=3$ ;  $P=0.95$ ), соответственно,  $36\pm 2$  нг и  $115\pm 4$  нг. Рассчитанная из этих результатов степень извлечения фенола составила  $74\pm 3\%$  и соответствовала заданной при расчете оптимальных условий сорбции, что свидетельствует о возможности применения данной модели для описания сорбции фенола на сверхсшитом полистироле MN-200.

Таким образом, использование моделирования динамики сорбции позволило оценить эффективность сорбентов для концентрирования фенола. На основании расчетов, проведенных в настоящей работе, можно сделать вывод о том, что химически модифицированные силикагели и сополимеры стирол-дивилбензола с низкой (2 – 16%) степенью сшивки не обеспечивают эффективного

концентрирования фенола из водных растворов (достигаемый  $K_{\text{конц}} < 100$ ). В ряду изученных сорбентов наилучшими характеристиками концентрирования обладают высокосшитые сополимеры стирола с дивинилбензолом (степень сшивки  $>60\%$ ), с помощью которых можно достичь коэффициентов концентрирования  $3 \cdot 10^2$ .

Таблица 12 – Оптимальные параметры сорбционных систем при извлечении фенола на MN-200 ( $K_{\text{конц}} = 400$ ).

Заданные параметры			Рассчитанные параметры			
Размеры колонки		Степень извлечения	Коэффициент массопереноса,	Скорость пропускания	Объем пробы	Время концентрирования
$l$ , см	$d$ , см	$R, \%$	$\beta$ , с <sup>-1</sup>	$w$ , мл·мин <sup>-1</sup>	$V_{\text{пробы}}$ , мл	$t$ , мин
1	0.1	95	0.18	0.01	3.3	265.3
2	0.2	95	0.35	0.20	26.5	138.5
4	0.4	95	0.67	2.93	211.9	72.3
1	0.1	85	0.34	0.05	3.7	81.7
2	0.2	85	0.65	0.69	29.6	42.7
4	0.4	85	1.25	10.63	236.6	22.3
1	0.1	75	0.51	0.10	4.2	40.9
2	0.2	75	0.97	1.57	33.5	21.4
4	0.4	75	1.86	24.03	268.0	11.2

С использованием модели также можно оптимизировать условия динамического сорбционного концентрирования. Рассчитанные нами условия показывают, что концентрирование фенола с  $K_{\text{конц}} = 350$  возможно из 30 мл пробы с использованием микроколонки со сверхсшитым полистиролом объемом всего 60 мкл, в то время как большинство существующих методик, для достижения тех же значений с  $K_{\text{конц}}$  предполагают извлечение фенолов из проб больших объемов (до 1 литра) на колонках объемом 1 мл.

Таким образом, выбраны сорбенты и условия концентрирования фенола и его производных, необходимые для разработки автоматизированного проточного

сорбционно-жидкостно-хроматографического определения этих веществ в водах (см. раздел 2.6).

2.5. Разработка методики полупрепаративного разделения изоформ формиатдегидрогеназы для получения очищенной активной формы формиатдегидрогеназы, при содержании в исходной смеси на уровне 0,5 – 1 мг/мл

*Методика эксперимента.* Хроматографическую колонку 150×4,6 мм, заполненную карбоксильным сорбентом, уравнивали стартовым раствором до pH 2,8 – 3,3 до совпадения величин pH на входе и выходе колонки, а затем меняли стартовый раствор на элюент (pH 7,0 – 7,5) и регистрировали изменение кислотности и оптическую плотность (при 254 – 280 нм) эфлюента. При полупрепаративном разделении изоформ ФДГ вводили 20 – 50 мкл раствора ФДГ с содержанием 0,5 – 1 мг/мл и регистрировали сигнал УФ-детектора при 280 нм (рис. 11).

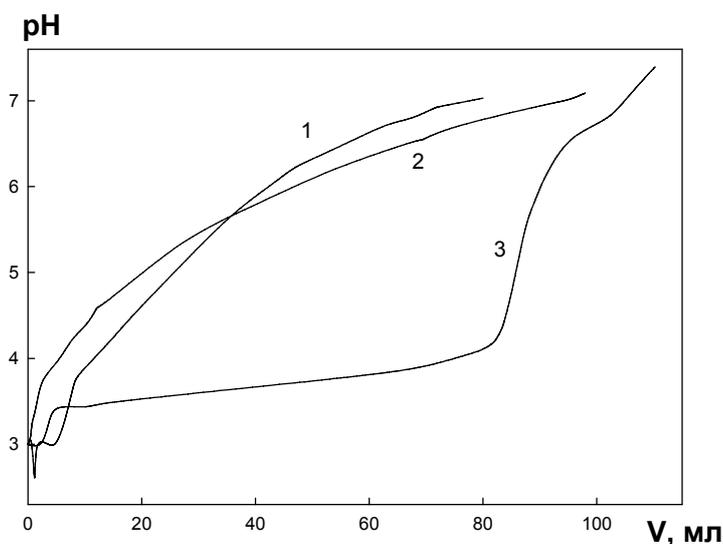


Рисунок 11 – Сравнение градиентов pH, полученных с использованием полиамфолитного и однокомпонентного элюентов. Колонка: MacroPrep 50 CM (150×4,6), 50 мкм. Стартовый раствор: 12,5 мМ уксусная кислота + HCl (pH 3,0); элюент: 1 – Полибуфер 96 (1:15) (pH 7,0), 2 – Полибуфер 96 (1:25) (pH 7,0), 3 – 12,5 мМ Трис + HCl (pH 7,5). Скорость 1 мл/мин.

*Обсуждение результатов.* Возможность формирования плавного градиента pH простыми элюентами, содержащими не более двух pH-определяющих компонента, проверяли на колонке с карбоксиметильными группами MacroPrep 50

СМ. Данный сорбент ранее не применяли в полупрепаративном варианте хроматофокусирования. Градиенты, полученные с использованием растворов "Полибуфера 96", имеют несколько выгнутую форму на начальном участке, но в целом – практически линейны, их можно считать оптимальными для хроматофокусирования. Простой элюент, содержащий только один компонент – слабое основание Трис, не позволяет сформировать градиент приемлемой формы (рис. 10, кривая 3). Сначала наблюдается продолжительное плато с минимальным изменением рН до 4,1, а затем, напротив, происходит очень резкое повышение рН до 6,5, после чего градиент выходит на плато.

Один из существенных недостатков стартовых растворов на основе уксусной кислоты - необходимость использования более концентрированных растворов или добавления в стартовый раствор сильной кислоты, чтобы получать градиенты в интервале от рН 3 и ниже. Сравнили градиенты рН, полученные с уксусной, щавелевой, винной и лимонной кислотами в качестве стартовых растворов. Природа слабой кислоты в составе стартового раствора практически не сказывается на профиле градиента, за исключением начального участка: более плавным этот участок становится в случае использования лимонной или винной кислот, а при  $\text{pH} > 3,5$  профиль градиента остается неизменным. В зависимости от природы стартового раствора незначительно увеличивается только протяженность плато в области рН 3,5 – 4. Варьирование концентрации лимонной или винной кислот (1 – 6,5 мМ) также не привело к существенному изменению профиля градиента. Таким образом, можно использовать в качестве стартового раствора любую из кислот более сильных, чем уксусная, при этом в значительно меньшей концентрации (2 мМ). В дальнейшем использовали стартовые растворы на основе 2 мМ лимонной кислоты (рис. 12).

Элюент на основе одного компонента (Трис) не позволяет сформировать градиент приемлемой формы (рис. 12, кривая 2): в области рН 3 – 4 наблюдается очень медленное повышение рН, затем, напротив, в течение нескольких минут рН повышается на 3,5 ед. Подобную форму градиента можно объяснить тем, что на начальном участке сказываются буферные свойства лимонной кислоты, а Трис при  $\text{pH} < 7$  практически не обладает буферной емкостью. Другой недостаток градиента – слишком продолжительное время выхода (до 2 ч). Для улучшения формы

градиента в элюент добавили лимонную кислоту ( $pK_a$  3,10; 4,76; 6,40), что наиболее существенно сказалось на участке градиента с продолжительным плато, и в результате градиент рН стал более плавным, т.е. без участков со значительно отличающимся углом наклона. Градиент, полученный при содержании в элюенте 1 мМ лимонной кислоты, состоит из двух практически линейных участков, плавно переходящих из одного в другой при рН 5,5 (рис. 12, кривая 3). Повышение концентрации лимонной кислоты в элюенте до 6 мМ и Трис до 25 мМ позволяет получить достаточно плавный градиент (рис. 12, кривая 4), совпадающий с градиентом, полученным для "Полибуфера-96" в области рН 4,5 – 6,3 (кривая 1). Сокращается и время выхода градиента (до 80 мин). Итак, система Трис – лимонная кислота является удачной заменой синтетического "Полибуфера".

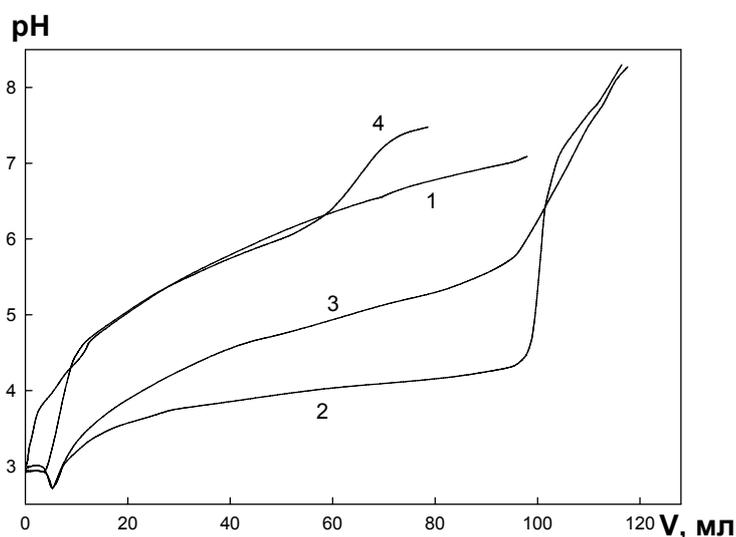


Рисунок 12 – Влияние состава элюента на профиль восходящих градиентов рН. Стартовый раствор: 2 мМ лимонная кислота (рН 3,0). элюент: 1:25 "Полибуфер-96" (рН 7,0) (1), 12,5 мМ Трис - HCl (рН 7,5) (2), 12,5 мМ Трис - HCl + 1 мМ лимонная кислота (рН 7,5) (3), 25 мМ Трис - HCl + 6 мМ лимонная кислота (рН 7,5) (4).

При использовании простых элюентов в хроматофокусировании одним из параметров, существенно влияющим на профиль градиентов рН, является ионная сила. Этот эффект хорошо изучен для анионообменных систем [99], но для катионообменных ранее его не рассматривали.

Изучили влияние ионной силы подвижных фаз на профиль градиентов рН, полученных на карбоксильном сорбенте с малым (5 мкм) размером частиц и невысокой ионообменной емкостью - где вклад функциональных групп сорбента в процесс формирования градиента снижается. В качестве такого сорбента выбрали

MN KS/R 527 на основе свёрнутого полистирола. По результатам потенциометрического кислотно-основного титрования, ионообменная емкость MN KS/R 527 более чем в 2 раза ниже, чем емкость сорбента MacroPrep 50 CM (таблица). В таком случае следует ожидать сокращения времени формирования градиента, что важно при решении аналитических задач. Компоненты для стартового раствора и элюента выбрали на основе экспериментальных данных по формированию восходящих градиентов pH на сорбенте MacroPrep 50 CM: в качестве стартового раствора использовали 2 мМ лимонную кислоту, а элюентом служила буферная смесь Трис и лимонной кислоты.

При отсутствии сильного электролита в подвижных фазах форма градиента аналогична полученной на колонке MacroPrep 50 CM в подобных условиях, однако время достижения конечного значения pH сокращается до 35 – 40 мин за счет меньшей ионообменной емкости сорбента (рис. 13, кривая 1). Создание ионной силы (до 0,05 – 0,1) в элюенте способствует сглаживанию отдельных участков градиента, диапазон линейного участка увеличивается до 2,5 ед. pH, но вместе с тем увеличивается до 50 – 60 мин общее время выхода градиента (рис. 13, кривая 3). Добавление сильного электролита в стартовый раствор незначительно увеличивает время выхода градиента pH, но при этом градиент становится практически линейным в диапазоне pH 3 – 7, без перегибов и участков с различными углами наклона (рис. 13, кривая 2). Наклон выходной кривой  $\Delta\text{pH}/\Delta V$  равен 0,16. В этом случае в системе формируется и практически линейный градиент ионной силы от 0 до 0,05, выходящий за время, соизмеримое с формированием градиента pH внутри колонки [107]. Концентрация сильного электролита изменяется внутри колонки плавно, что приводит к постепенному изменению констант диссоциации функциональных групп сорбента и, соответственно, к расширению интервала буферной емкости данного сорбента.

Добавление одинакового количества NaCl как в стартовый раствор, так и в элюент не приводит к заметному изменению формы градиента по сравнению с добавлением сильного электролита только в элюент (рис. 13, кривые 3 и 4). В данном случае градиент ионной силы отсутствует, и через 7 – 8 мин после начала пропускания элюента обе системы становятся одинаковыми – из-за быстрого переуравновешивания колонки до значения ионной силы элюента (0,05). Для всех

приведенных градиентов характерен начальный участок (~ 8 мин) без изменения pH: видимо, здесь происходит вытеснение стартового раствора из пор сорбента и межчастичного пространства, а для системы с высокой ионной силой в элюенте (кривая 3) за это время успевает произойти и насыщение сорбента сильным электролитом. Таким образом, наиболее линейный градиент pH, полученный при создании ионной силы в стартовом растворе (кривая 2), представляется оптимальным для использования в хроматофокусировании, что и было проверено в следующем эксперименте.

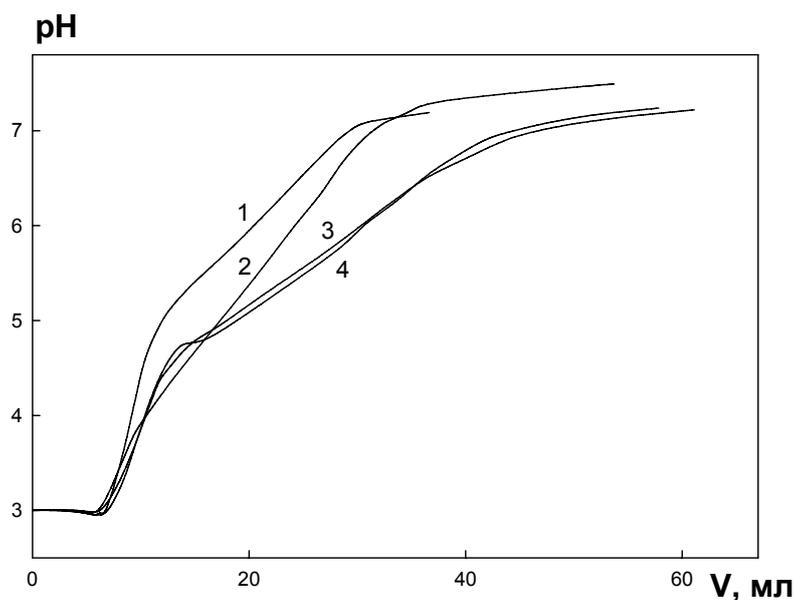


Рисунок 13 – Оптимизация ионной силы подвижных фаз для формирования линейного градиента pH. Колонка: MN KS/R 527 (150x4,6 мм), 5 мкм. Стартовый раствор: 2 мМ лимонная кислота (pH 3,0), ионная сила: 0 (1, 3), 0,05 (2, 4). Элюент: 10 мМ Трис + лимонная кислота (pH 7,3), ионная сила (NaCl): 0 (1, 2), 0,05 (3, 4). Скорость 1 мл/мин.

*Полупрепаративное хроматофокусирование изоформ ФДГ.* В качестве объекта исследований выбрали образец рекомбинантной формиатдегидрогеназы, выделенной из клеточного лизата растений. Предварительная очистка фермента, проведенная методом гель-электрофореза, гарантирует чистоту образца не менее 90%, однако при хранении количество неактивной изоформы ФДГ может увеличиваться за счет постепенного окисления сульфидных мостиков, особенно в растворе. Провели хроматофокусирование образца ФДГ с содержанием 0,5 – 1 мг/мл, в условиях градиента pH, полученного при создании более высокой ионной силы (0,05) в стартовом растворе, чем в элюенте (~0). Такое повышение ионной силы – до 0,05 – не приводит к денатурированию фермента и позволяет выделять

ФДГ и другие подобные ферменты в нативной форме. Во избежание преждевременного элюирования ФДГ за счет более высокой ионной силы стартового раствора пробу образца вводили одновременно с переключением стартового раствора на элюент (рис. 14).

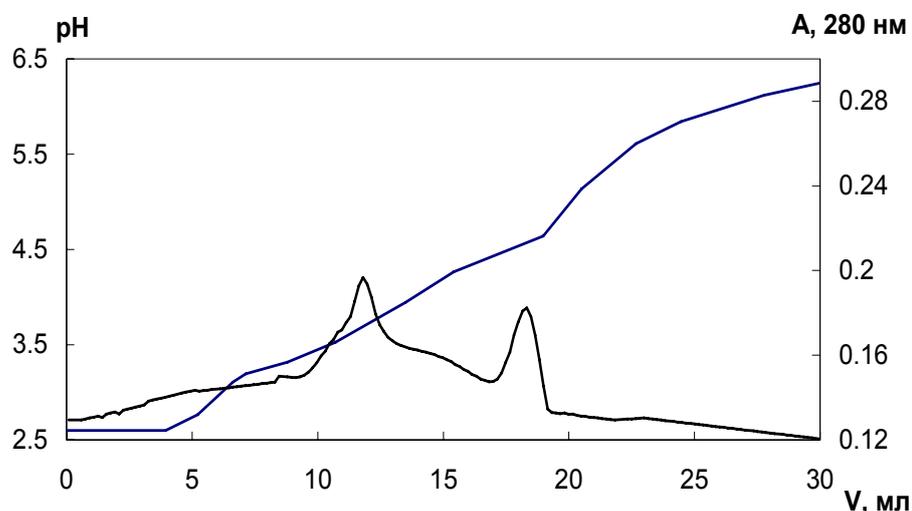


Рисунок 14 – Хроматофокусирование образца ФДГ (активность препарата 1 мг/мл). Стартовый раствор: 2 мМ лимонная кислота (pH 3,0), ионная сила (NaCl) 0,05; элюент: 10 мМ Трис + лимонная кислота (pH 7,5). Объем пробы 20 мкл.

Сорбент MacroPter 50 CM проявляет высокую селективность по отношению к изоформам ФДГ в градиентном режиме элюирования, однако его недостаточная эффективность, вызванная размерами частиц сорбента (50 мкм) не позволяет полностью отделить две изоформы. Сорбент MN KS/R 527 обладает большей эффективностью. Хроматограмма, показывающая полупрепаративное разделение изоформ ФДГ на сорбенте MN KS/R 527 с применением простых элюентов, представлена на рис. 14. Наблюдаемые пики соответствуют двум изоформам формиатдегидрогеназы, активная изоформа ФДГ (второй пик на хроматограмме) выходит при pH 4,5 – 4,6 (время выхода – 18 мин). После первого пика, соответствующего неактивной изоформе ФДГ (pH 3,7, время выхода – 12 мин), элюируются остатки клеточного лизата, присутствующие на уровне 10% в растворенном образце ФДГ (в области 13,5 – 15,5 мин, при pH ниже 4,3). За счет присутствия NaCl в подвижной фазе значения *pI* изоформ фермента сдвигаются в область более кислую область. Хроматографические пики изоформ ФДГ

соизмеримы по площади, что косвенно свидетельствует об их происхождении за счет образования изоформ в сопоставимых количествах при хранении образца [56]. На профиле базовой линии оптической плотности наблюдается незначительный дрейф, вызванный различием в оптической плотности стартового раствора и элюента, что подтвердили проведением контрольного опыта. Селективность разделения  $\alpha$  составляет более 1,6; разрешение пиков  $R_s$  равно 1,5, что позволяет количественно отделить активную изоформу ФДГ от неактивной формы и остатков клеточного лизата в полупрепаративных масштабах (при уровне концентраций ФДГ 0,5 – 1 мг/мл).

*Методика полупрепаративного разделения активного и неактивной изоформ формиатдегидрогеназы (ФДГ):* Хроматографическую колонку, заполненную катионообменным сорбентом MN KS/R 527 (5 мкм), уравнивают стартовым раствором (2 мМ раствор лимонной кислоты; рН 3,0,  $I_{\text{NaCl}}=0,05$  М) при скорости 1 мл/мин до совпадения рН эфлюента и стартового раствора, затем переключают стартовый раствор на элюент (10 мМ раствор Трис и лимонной кислоты; рН 7,5,  $I_{\text{NaCl}}=0$  М) и вводят в инжектор 20-50 мкл раствора образца ФДГ, содержащего активную и неактивную изоформы при суммарном содержании форм 0,5-1 мг/мл и остатки клеточного лизата. Детектирование – УФ, при 280 нм. Регистрируют профиль оптической плотности. Количественно отделяют активную изоформу формиатдегидрогеназы от неактивной изоформы и остатков клеточного лизата, собирая фракции эфлюента (0,3 мл) в коллектор при достижении рН 4,3. Разрешение пиков  $R_s = 1,85$  ( $n = 3$ ).

Таким образом, в соответствии с ТЗ, разработана методика полупрепаративного разделения изоформ формиатдегидрогеназы для получения очищенных активной формы формиатдегидрогеназы, при содержании в исходной смеси на уровне 0,5 – 1 мг/мл (в ТЗ – на уровне 0,5 – 1 мг/мл), обеспечивающая достижение разрешения хроматографических пиков не ниже 1,5 (в ТЗ – не ниже 1,5) и получение пиков шириной не более 0,3 ед. рН (в ТЗ – не более 0,3 ед. рН).

## 2.6. Проведение патентных исследований.

В соответствии с ТЗ контракта для определения технического уровня и тенденций развития в области разработки высокочувствительных методов определения содержания органических веществ в объектах окружающей среды, медицины и материаловедения проведены патентные исследования по ГОСТ Р 15.011-96. Отчет о патентных исследованиях оформлен в виде отдельного тома.

2.7. Разработка автоматизированного метода определения фенола и хлорфенолов в водах

*Прямое ВЭЖХ определение фенолов.* Условия ВЭЖХ определения фенолов выбирали, руководствуясь литературными данными. Известно [108], что для ВЭЖХ разделения на обращенно-фазных сорбентах одиннадцати производных фенола, внесенных в список ЕРА, как правило применяют градиентное элюирование, так как среди разделяемых фенолов, как уже говорилось, есть как гидрофильные соединения (фенол,  $\lg K_{o/w} = 1,5$ ), так и сильно гидрофобные (пентахлорфенол,  $\lg K_{o/w} = 5,0$ ). Для подавления диссоциации фенолов в растворы вводили 0,1 об. %  $H_3PO_4$ . Применяли следующую градиентную программу разделения: в качестве элюента А использовали смесь (30:69,9:0,1) ацетонитрил – вода –  $H_3PO_4$ ; в качестве элюента Б – смесь ацетонитрил – вода –  $H_3PO_4$  (95:4,9:0,1) – приведены объемные соотношения. Использовали следующую градиентную программу: 0 – 10 мин – от 100 до 54% элюента А, элюента Б – от 0 до 46%; 10 – 15 мин – от 46 до 100% элюента Б, элюента А – от 54 до 0%. Суммарная скорость пропускания элюентов А и Б составила 1 мл/мин. Вводили 20 мкл раствора фенолов в ацетонитриле. Использовали спектрофотометрический детектор (275 нм [109, 110]).

По полученным хроматограммам рассчитывали градуировочные зависимости, интервал определяемых содержаний различных фенолов составил от 0,1 до 10 мг/л. В качестве аналитического сигнала использовали площади пиков.

*Проточное сорбционно-ВЭЖХ определение фенолов.* Колонку для концентрирования кондиционировали, пропуская 5 мл 95%-ного ацетонитрила, затем промывали 5 мл 0,1%-ной  $H_3PO_4$  в деионизованной воде. Фенолы извлекали из 10 мл 0,1%-ной  $H_3PO_4$  в деионизованной воде. Первоначально для десорбции и

ВЭЖХ разделения веществ использовали описанную выше градиентную программу, однако в этих условиях не наблюдали десорбцию пентахлорфенола. Поэтому элюент Б заменен на 100%-ный ацетонитрил. Градиентная программа была следующей: 0 - 10 мин – от 100 до 57% элюента А, соответственно от 0 до 43% элюента Б; 10 - 15 мин – от 43 до 100% элюента Б, соответственно от 57 до 0% элюента А. Суммарная скорость пропускания элюентов А и Б составила 1 мл/мин. Схема соединения жидкостных магистралей и последовательность операций при концентрировании представлены в табл. 13.

Типичные хроматограммы, полученные при прямом ВЭЖХ разделении смеси из одиннадцати фенолов и при проточном сорбционно-ВЭЖХ определении тех же соединений представлены на рис. 15. После концентрирования незначительно (на 5 – 7%) увеличиваются времена удерживания всех веществ – за счет удерживания на колонке для концентрирования; однако это не мешает идентифицировать вещества по временам удерживания. Сопоставление хроматограмм, полученных при прямом вводе и после сорбционного концентрирования, показало (рис. 14), что включение стадии концентрирования не приводит к существенному уширению пиков по сравнению с прямым вводом.

Таблица 13 – Последовательность и продолжительность операций при проточном сорбционно-ВЭЖХ определении фенолов.

Время, мин	Описание стадии	Положение инжектора	Скорость прокачиваемых растворов, мл/мин	
			градиентный насос 1	насос 2
0 – 5	Промывка колонки для концентрирования 95%-ным ацетонитрилом	2	0	1
5 – 10	Промывка колонки для концентрирования 0,1%-ной Н <sub>3</sub> РO <sub>4</sub> в деионизованной воде	2	0	1
10 – 20	Сорбция	2	0	1
15 – 20	Кондиционирование хроматографической колонки элюентом А	2	1	1
20 – 35	Начало десорбции, хроматографическое разделение	1*	1	0

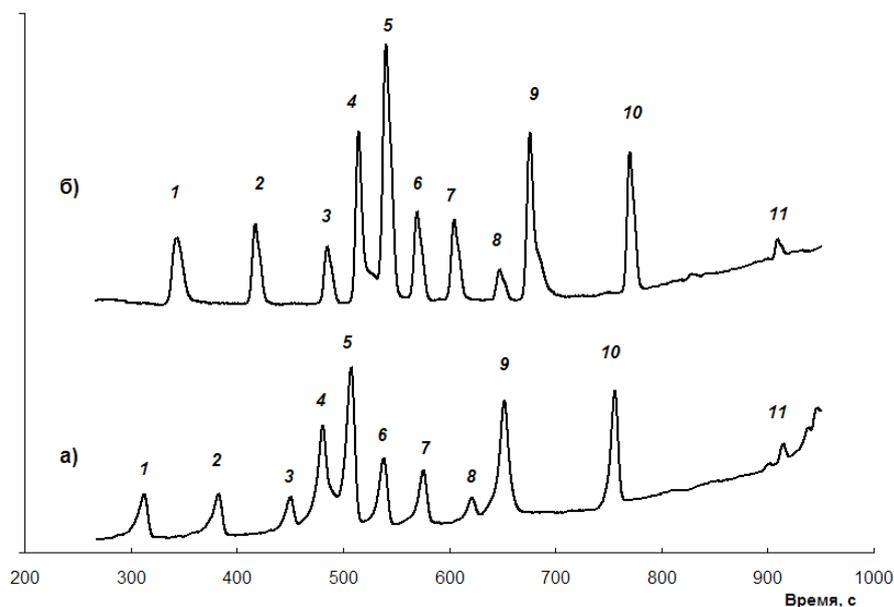


Рисунок 15 – Хроматограммы, полученные

при прямом ВЭЖХ определении (а), и проточном сорбционно-ВЭЖХ определении фенолов (б). Концентрации указаны в скобках после названия фенола (мкг/л) при прямом и проточном сорбционно-ВЭЖХ определении, соответственно.

1 – фенол ( $1,76 \times 10^3$ ; 5,28), 2 – 4-нитрофенол ( $1,05 \times 10^3$ ; 3,14), 3 – 2-хлорфенол ( $1,11 \times 10^3$ ; 3,34), 4 – 2,4-динитрофенол ( $1,63 \times 10^3$ ; 4,88), 5 – 2,4-дихлорфенол ( $1,28 \times 10^3$ ; 3,84), 6 – 2,4-диметилфенол ( $2,40 \times 10^3$ ; 7,20), 7 – 2-нитрофенол ( $1,76 \times 10^3$ ; 5,28), 8 – 4-хлор-3-метилфенол ( $2,66 \times 10^3$ ; 8,00), 9 – 2-метил-4,6-динитрофенол ( $0,97 \times 10^3$ ; 2,94), 10 – 2,4,6-трихлорфенол ( $8,24 \times 10^3$ ; 24,72), 11 – пентахлорфенол ( $2,35 \times 10^3$ ; 13,34).

В выбранных условиях проточного сорбционно-ВЭЖХ определения фенолов получены градуировочные зависимости (табл. 14). Показано, что в широком интервале определяемых содержаний относительное стандартное отклонение результатов определения фенолов находится в интервале 0,01 – 0,05 (табл. 15).

Таблица 14 – Параметры градуировочных зависимостей при проточном сорбционно-ВЭЖХ определении фенолов. Использовали уравнение вида:  $S=A+B \times c$ .

Определяемое соединение	$A$ , мВ $\times$ с	$B \times 10^7$ , мВ $\times$ с $\times$ л $\times$ г $^{-1}$	$R^2$
-------------------------	---------------------	---	-------

Фенол	18±2	1,71±0,06	0,94
4-Нитрофенол	- *	2,70±0,08	0,95
2-Хлорфенол	- *	1,90±0,06	0,96
2,4-Динитрофенол	- *	4,06±0,02	0,94
2,4-Дихлорфенол	- *	7,42±0,02	0,95
2,4-Диметилфенол	7±2	1,26±0,04	0,95
2-Нитрофенол	- *	1,60±0,05	0,95
4-Хлор-3-метилфенол	- *	0,42±0,01	0,96
2-Метил-4,6-динитрофенол	- *	6,9±0,2	0,95
2,4,6-Трихлорфенол	- *	0,57±0,02	0,96
Пентахлорфенол	-3,8±0,7	0,21±0,01	0,96

\* Коэффициент  $A$  статистически незначим, использовали уравнение вида  $S=B \cdot x \cdot c$ .

Таблица 15 – Относительные стандартные отклонения результатов проточного сорбционно-ВЭЖХ определения фенолов

Определяемое соединение	Концентрация, мкг/л	$s_r$
Фенол	0,66	0,10
	5,28	0,06
4-Нитрофенол	0,39	0,13
	3,14	0,01
2-Хлорфенол	0,42	0,18
	3,33	0,03
2,4-Динитрофенол	0,61	0,08
	4,88	0,01
2,4-Дихлорфенол	0,48	0,01
	3,84	0,03
2,4-Диметилфенол	0,90	0,19
	7,20	0,03
2-Нитрофенол	0,66	0,09
	5,28	0,02
4-Хлор-3-метилфенол	1,00	0,14
	8,00	0,02
2-Метил-4,6-динитрофенол	0,37	0,08
	2,94	0,01
2,4,6-Трихлорфенол	3,09	0,05
	24,72	0,04
Пентахлорфенол	4,20	0,30
	16,80	0,04

Пики на хроматограмме, полученной при максимальной концентрации фенолов в образце (5 – 15 мкг/л), достаточно хорошо разрешены, что позволяет определять малые количества одних фенолов (0,5 – 1,0 мкг/л) в присутствии 10 – 20-кратных количеств других.

*Пределы обнаружения фенолов при прямом и проточном сорбционно-ВЭЖХ определении.* Описано несколько различных способов расчета предела обнаружения при хроматографическом определении веществ [111, 112]. В настоящей работе предел обнаружения рассчитывали двумя способами.

В одном случае (способ А) предел обнаружения рассчитывали исходя из следующего соотношения:

$$c_{\min} = 3 \frac{S_{\text{фон}}}{S},$$

где  $c_{\min}$  – предел обнаружения,  $S_{\text{фон}}$  – стандартное отклонение фонового сигнала,  $S$  – коэффициент чувствительности (тангенс угла наклона градуировочной зависимости). Строгая методика расчета стандартного отклонения фона предполагает вычисление стандартного отклонения по обычной формуле

$$S_{\text{фон}} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}},$$
 где  $x_i$  – единичные результаты измерения фонового сигнала,  $n$  –

число таких измерений,  $\bar{x}$  – среднее значение фонового сигнала.

В качестве выборки значений фонового сигнала, используемой для расчета предела обнаружения, строго говоря, необходимо использовать участок базовой линии хроматограммы, при получении которой в пробу не вводили определяемое вещество (т.е., проводя контрольный опыт) [111]. Начало и конец этого участка выбирают так, чтобы они соответствовали положению и ширине пика определяемого вещества на хроматограмме. Эта процедура аналогична рекомендованной ИЮПАК для спектроскопических методов [113].

Недостатком этого способа расчета предела обнаружения является то, что он не учитывает случайного характера величины коэффициента чувствительности.

Альтернативным способом оценки пределов обнаружения является подход, основанный на расчете дисперсии параметров градуировочной зависимости (способ Б) [112].

Пусть градуировочная зависимость имеет вид:

$$Y = A + B \cdot x,$$

где  $Y$  – рассчитанное значение аналитического сигнала,  $x$  – концентрация вещества в градуировочном образце.

При этом дисперсия рассчитываемой по градуировочному уравнению величины  $Y_k$  имеет следующий вид:

$$s_Y^2 = s_0^2 \left[ \frac{1}{m} + \frac{(x_k - \bar{x})^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2} \right], \quad (1)$$

где  $m$  – число экспериментальных измерений аналитического сигнала в ходе градуировки, а  $x_k$  – концентрация, соответствующая  $Y_k$ ,  $s_0^2$  – дисперсия разности между экспериментальными ( $y_k$ ) и рассчитанными ( $Y_k$ ) значениями аналитического сигнала.

Доверительный интервал величины  $Y_i$  рассчитывали по формуле:

$$\Delta Y_k = t(P, f) \sqrt{S_Y^2},$$

где  $t(P, f)$  – коэффициент Стьюдента для вероятности  $P$  и числа степеней свободы  $f = m - 2$ . Вероятность принимали равной 0.95.

Для каждого  $Y_k$  обозначим верхнюю и нижнюю границы доверительного интервала как  $Y_k + \Delta Y_k = Y_k^{\text{верхн}}$ ,  $Y_k - \Delta Y_k = Y_k^{\text{нижн}}$ . Найдем  $Y_k^{\text{верхн}}$  для  $x_k = 0$  (то есть рассчитаем максимальный аналитический сигнал, который возможно с заданной вероятностью  $P$  получить при отсутствии определяемого компонента в пробе):

$$Y_{\min} = A + t(P, f) \times \sqrt{s_Y^2} = A + t(P, f) \times s_0 \times \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{\bar{x}^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2}}. \quad (2)$$

Величина  $Y_{\min}$  является пороговым значением аналитического сигнала: если в результате анализа получен сигнал  $Y_k < Y_{\min}$ , то нельзя сделать вывод о наличии определяемого компонента в пробе, так как такой сигнал можно получить от пробы, не содержащей определяемого компонента. Найдем пороговую величину концентрации, связанную с  $Y_{\min}$  градуировочным уравнением (вопросы, связанные со сложностью обратной регрессии, здесь не обсуждаем):

$$x_{\min} = \frac{1}{B} \times t(P, f) \times S_0 \times \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{\bar{x}^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2}}. \quad (3)$$

Если в результате анализа получен аналитический сигнал, меньший чем  $Y_{\min}$  (уравнение 2), то концентрация определяемого компонента в пробе с заданной вероятностью ( $P$ ) не превышает  $x_{\min}$  (уравнение 3). Пределом обнаружения метода

является  $x_{\min}$ ,  $Y_{\min}$  – критической минимальной величиной аналитического сигнала, ниже которой количественная интерпретация результатов анализа невозможна.

В настоящей работе пределы обнаружения веществ рассчитывали двумя описанными способами (табл. 16). Как видно из представленных результатов, концентрирование обеспечивает снижение пределов обнаружения фенолов в среднем на два порядка по сравнению с прямым ВЭЖХ определением. Сравнивая пределы обнаружения, рассчитанные двумя способами, можно сказать, что для большинства фенолов они различаются незначительно – в 2 – 4 раза. При этом способ Б является менее трудоемким, так как предполагает только статистический анализ результатов построения градуировочной зависимости, а способ А требует проведения дополнительных экспериментов – получения хроматограмм «введено ноль».

Таблица 16 – Пределы обнаружения фенолов при прямом и сорбционно-ВЭЖХ определении ( $c_{\min}$ , мкг/мл). Фенолы извлекали из 10 мл 0,1%-ного раствора фосфорной кислоты в деионизованной воде.

Определяемое соединение	Прямое ВЭЖХ определение фенолов		Проточное сорбционно-ВЭЖХ определение фенолов	
	способ А	способ Б	способ А	способ Б
Фенол	110	66	0,64	0,54
4-Нитрофенол	43	33	0,04	0,27
2-Хлорфенол	48	98	0,12	0,27
2,4-Динитрофенол	15	73	0,29	0,50
2,4-Дихлорфенол	18	40	0,08	0,33
2,4-Диметилфенол	38	97	0,15	0,64
2-Нитрофенол	37	60	0,31	0,46
4-Хлор-3-метилфенол	262	183	0,72	0,65
2-Метил-4,6-динитрофенол	24	20	0,02	0,26
2,4,6-Трихлорфенол	288	100	1,2	2,1
Пентахлорфенол	957	238	2,9	1,3

Однако для некоторых соединений пределы обнаружения, рассчитанные двумя различными способами, различаются в 5 – 10 раз; соответствующие величины выделены в табл. 16 курсивом. Для этих соединений общим является то, что соответствующие им пики либо асимметричны (2,4-динитрофенол, 4-

нитрофенол, 2-метил-4,6-динитрофенол), либо не полностью разрешены с соседним асимметричным пиком (2,4-дихлорфенол).

В России, согласно нормативным документам [39], ПДК фенола и его производных установлено на уровне 1 – 10 мкг/л. Предложенная методика обеспечивает определение этих токсичных соединений на уровне ПДК и ниже (табл. 16). Дальнейшее снижение пределов обнаружения может быть достигнуто за счет увеличения объема пропускаемого образца на стадии сорбции или использования более чувствительных детекторов, например амперометрического.

Результаты определения фенолов в водопроводной и речной воде приведены в табл. 17. Полученные результаты в основном подтверждают правильность определения фенолов в указанных объектах.

Таблица 17 – Результаты определения фенолов в водопроводной и речной воде проточным сорбционно-ВЭЖХ методом. Фенолы извлекали из 10 мл пробы. ( $n = 3$ ,  $P = 0,95$ )

Определяемое соединение	Водопроводная вода		Речная вода	
	введено, мкг/л	найдено*, мкг/л	введено, мкг/л	найдено*, мкг/л
Фенол	1,32	1,1±0,2	2,64	2,9±0,7
	2,64	3,6±0,4	5,28	6,0±0,9
4-Нитрофенол	0,78	1,1±0,1	1,57	1,51±0,07
	1,57	1,74±0,06	3,14	3,0±0,3
2-Хлорфенол	0,83	0,5±0,1	1,67	1,3±0,2
	1,67	1,5±0,1	3,34	3,2±0,3
2,4-Динитрофенол	1,22	1,16±0,08	2,44	2,27±0,09
	2,44	2,4±0,2	4,88	4,9±0,4
2,4-Дихлорфенол	0,96	0,84±0,09	1,92	1,8±0,1
	1,92	1,78±0,09	3,84	3,9±0,5
2,4-Диметилфенол	1,80	1,9±0,2	3,60	3,3±0,2
	3,60	3,5±0,5	7,20	7,1±0,6
2-Нитрофенол	1,32	1,3±0,1	2,64	2,6±0,2
	2,64	2,6±0,2	5,28	5,3±0,5
4-Хлор-3-метилфенол	2,00	1,6±0,2	4,00	4,2±0,4
	4,00	3,7±0,5	8,00	8,1±0,8
2-Метил-4,6-динитрофенол	0,73	0,73±0,07	1,47	1,54±0,07
	1,47	1,4±0,2	2,94	3,1±0,2
2,4,6-Трихлорфенол	6,18	5,6±0,8	12,4	13,0±0,7
	12,4	11±1	24,8	25±2
Пентахлорфенол	8,06	7,5±1,3	11,9	11±1
	11,9	15±2	23,8	27±6

\*В образцах без введенных добавок фенолов не обнаружено.

Таким образом, в соответствии с ТЗ, разработана методика автоматизированного проточного сорбционно-жидкостно-хроматографического определения фенола и хлорофенолов в питьевой и природных водах, обеспечивающая определение целевых веществ с пределом обнаружения на уровне ПДК и ниже (в ТЗ – на уровне ПДК).

## 2.8. Разработка методики определения суммарного содержания галоид-, серо- и фосфорорганических соединений в водах.

При выполнении данной работы использовали следующее оборудование:

- Ионный хроматограф, схема которого представлена на рис. 1, модели «МС-2 Advanced» (Metrohm, Швейцария), включающий:

- Детектор по электропроводности с двумя кольцевыми стальными электродами, объем ячейки 1.5 мкл, модели «819 IC Detector» (Metrohm, Швейцария).

- Насос высокого давления, диапазон скоростей потока 0.2-2.5 мл/мин, максимальное давление 25 МПа, модели «818 IC Pump» (Metrohm, Швейцария).

- Систему подавления (схема представлена на рис. 2) «Metrohm Suppressor Module MSM» (Metrohm, Швейцария), которая состояла из трех переключаемых подавительных элементов, регенерируемых серной кислотой и промываемых водой.

- Двухканальный перистальтический насос, диапазон скоростей потока 0.5-0.6 мл/мин, «833 IC Liquid Handling Unit» (Metrohm, Швейцария).

- Разделительные колонки:

- «Star-Ion-A300» фирмы Phenomenex (100×4.60 мм).

- «Metrosep A Supp 5» фирмы Metrohm (250×4.0 мм).

- «Элсиан-6» фирмы Элсико (50×3.2 мм).

- Концентрирующая колонка фирмы Metrohm модели «Metrosep A PSS 1 HC» (12.5×4.0 мм).

- Ультразвуковая ванна модели «Bransonic» (Германия).

- Система для получения деионизованной воды модели «Milli-Q» (Millipore), сопротивление получаемой воды - 18.2 МОм.

- Блок конверсии, состоящий из кварцевого реактора, помещенного в высокотемпературную печь.

Пробу раствора органического модельного соединения отбирали посредством шприца и вводили в кварцевый реактор в непрерывный поток кислорода. Температура печи составляла 800-1000 °С. Объем пробы составлял 1 *мкл*. Скорость потока кислорода составляла 10-40 *мл/мин*. На выходе зауженный конец реактора вставляли в абсорбер, который представлял собой одноразовый пластиковый шприц, заполненный водой. Объем воды в абсорбере составлял 5 *мл*. Время разложения пробы и сбора в абсорбер полученных газов составляло 5-7 *мин*.

Исследование возможности извлечения органических соединений из водных растворов проводили при использовании жидкостной экстракции. В склянку помещали 10 *мл* водного раствора модельных соединений (или анализируемой пробы воды), добавляли метанол (свободный от серосодержащих органических соединений и с содержанием хлорсодержащих органических соединений около 10<sup>-7</sup>%) для исключения остаточной сорбции органических соединений на стенках стеклянной посуды (из расчета на 1 *мл* воды – 50 *мкл* метанола), затем добавляли хлорид натрия до получения насыщенного раствора, после добавляли 3 *мл* МТБЭ (свободного от хлорсодержащих органических соединений и с содержанием сероорганических соединений на уровне 5×10<sup>-7</sup>%) и интенсивно перемешивали в течение 5 *мин*. Затем в течение 2-3 *минут* происходило расслаивание образовавшейся эмульсии, после чего отбирали образовавшийся экстракт посредством шприца и проводили упаривание потоком гелия до объема 500 *мкл*.

Исследование возможности ввода больших проб проводили при использовании специального устройства (термодесорбера), которое представляло собой кварцевую трубку, в которую помещали небольшое количество сорбента (в нашем случае - СКВ), помещенную в металлический корпус. Пробу органического раствора исследуемых соединений вводили в потоке газа-носителя на сорбент через специальное отверстие в металлическом корпусе. Одновременно с этим проводили удаление растворителя вне аналитической системы потоком газа, подаваемого со скоростью 70 *мл/мин*, с одновременным выделением среднетлетучих

органических соединений на сорбенте. Затем устройство подсоединяли к реактору с помощью иглы, нагревали до температуры 270 °С и проводили термодесорбцию в потоке газа-носителя, скорость потока которого составляла 20 мл/мин.

Пробу водного раствора анионов вводили в хроматограф посредством кран-дозатора с объемом петли 20 и 200 мкл. В качестве элюента использовали раствор  $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$  в деионизованной воде в различных соотношениях. Скорость потока элюента варьировали в диапазоне 0.5-1.5 мл/мин. Время анализа составляло не более 20 мин. Регистрацию пиков проводили с помощью персонального компьютера. Количественные расчеты проводили с использованием высот или площадей хроматографических пиков.

Возможность снижения пределов обнаружения анионов изучали при использовании предварительного концентрирования с последующим удалением воды из концентрирующей колонки элюентом. Для этого была использована концентрирующая колонка, которая подсоединялась к крану-дозатору ионного хроматографа вместо петли. Объем пробы в этом случае составлял от 1 до 10 мл. Общее время анализа составляло 20-25 мин.

В остальных условиях были такие же, как в случае прямого ионно-хроматографического анализа.

*Исследование условий, необходимых для окислительной конверсии ультрамикрочастиц галоген-, серо- и фосфорсодержащих органических соединений и определения соответствующих продуктов конверсии методом ИХ.* Для решения основной задачи – разработки способа определения одновременного, высокочувствительного и быстрого определения общего содержания галоген-, серо- и фосфорсодержащих органических соединений в водных растворах на ультрамикроразмерном уровне необходимо было разработать условия полной конверсии рассматриваемых веществ в потоке кислорода и в присутствии различных растворителей, до соответствующих определяемым элементам продуктов конверсии, обеспечивающих исключение возможных потерь определяемых веществ до реактора, в реакторе и после него и обеспечить одновременную и быструю регистрацию продуктов конверсии.

Наиболее подходящим методом для одновременной и быстрой регистрации продуктов, образующихся при окислительной конверсии, соответствующих

определяемым элементам (F, Cl, Br, S, P), является метод ИХ, который обладает высокой чувствительностью и селективностью при регистрации анионов, соответствующих продуктам конверсии определяемых элементов.

Для достижения поставленной в работе цели было решено продукты конверсии на выходе из реактора поглощать из потока кислорода в абсорбере со сверхчистой водой и проводить анализ абсорбата методом ИХ. Для обеспечения возможности экспрессного определения анионов, соответствующих определяемым элементам, необходимо было прежде всего обеспечить отделение пика воды от пиков фторида и хлорида, разделение всех пиков определяемых анионов и минимальные пределы детектирования для этих анионов и соответствующие минимальные пределы обнаружения за счет анализа всего объема абсорбата, который мог составлять 10 мл.

В связи с этим исследование оптимальных условий разделения воды и соответствующих определяемым элементам анионов и разработка способа минимализации пределов обнаружения за счет анализа больших проб (всего объема абсорбата) методом ИХ предшествовала исследованию условий конверсии галоген-, серо- и фосфорсодержащих органических соединений, принадлежащих к различным классам веществ, до соответствующих продуктов конверсии.

При проведении исследования нами был выбран вариант ионной хроматографии с кондуктометрическим детектированием и подавлением фоновой электропроводности элюента, как наиболее чувствительный.

Мы проводили исследование таких условий определения анионов в водных растворах методом ИХ, которые обеспечивали бы быстрое разделение рассматриваемых анионов между собой, полное отделение пиков воды и фторида, минимальные пределы детектирования и возможность их достижения при анализе больших проб.

Исследование зависимости высоты пика определяемых анионов от их концентрации показало, что во всем диапазоне изученных количеств ( $10^{-11}$ - $10^{-6}$  г) зависимость высоты пика от концентрации соответствующего аниона была линейна. Для анионов  $F^-$ ,  $Cl^-$ ,  $NO_2^-$ ,  $Br^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $HPO_4^{2-}$ ,  $SO_4^{2-}$  зависимости высоты пика от их количества описывались уравнениями  $Y=0.04+1.3\times 10^{-8}\times X$  ( $R=0.99997$ ),  $Y=0.02+4.3\times 10^{-7}\times X$  ( $R=0.99997$ ),  $Y=0.11+6.3\times 10^{-7}\times X$  ( $R=0.99998$ ),  $Y=0.02+5.5\times 10^{-7}\times X$  ( $R=0.99997$ ).

$^6 \times X$  ( $R=0.99996$ ),  $Y=0.51+5.9 \times 10^{-7} \times X$  ( $R=0.99996$ ),  $Y=0.06+3.3 \times 10^{-6} \times X$  ( $R=0.99999$ ),  
 $Y=0.03+5.9 \times 10^{-6} \times X$  ( $R=0.99989$ ), соответственно.

Пределы детектирования в пересчете на анион в выбранных нами условиях составили  $1.1 \times 10^{-11}$  г,  $1.8 \times 10^{-11}$  г,  $3.1 \times 10^{-11}$  г,  $4.9 \times 10^{-11}$  г,  $4.8 \times 10^{-11}$  г,  $1.6 \times 10^{-10}$  г и  $2.3 \times 10^{-11}$  г, для  $F^-$ ,  $Cl^-$ ,  $NO_2^-$ ,  $Br^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $HPO_4^{2-}$ ,  $SO_4^{2-}$ , соответственно. Разработанная методика анализа обеспечивает снижение пределов обнаружения анионов и сокращение времени анализа (в 3 – 4 раза) по сравнению с литературными данными.

Для достижения цели нашего исследования – разработки способа одновременного определения общего содержания галоген-, серо- и фосфорсодержащих органических соединений в водных и органических растворах на ультрамикроруровне необходимо было обеспечение возможности детектирования соответствующих продуктов конверсии методом ИХ на минимальном уровне, так как этот уровень определяет предел детектирования при определении общего содержания соответствующих элементов. Проведенное нами исследование позволило решить эту задачу, и предел детектирования соответствующих анионов составил  $10^{-11}$ - $10^{-10}$  г, в зависимости от аниона. Предел детектирования по элементам для азота, серы и фосфора в 3 – 4 раза меньше, чем для соответствующих анионов. Однако для того, чтобы эти пределы были достигнуты при определении общего содержания соответствующих элементов, необходимо было анализировать весь объем абсорбата, который может составлять до 10 мл. В связи с этим нами была изучена возможность анализа больших проб водных растворов анионов как при прямом вводе на разделительную колонку, так и с предварительным концентрированием с последующим переводом всего концентрата в разделительную колонку методом ИХ в изократических условиях, оптимизированных в результате проведенного исследования, изложенного в предыдущем разделе.

С целью минимизации пика воды либо его практического исключения была изучена возможность предварительного удаления воды из концентрирующей колонки (после проведения концентрирования) раствором элюента. Для осуществления такого способа было необходимо выбрать объем элюента, который бы обеспечил вымывание основной массы воды из концентрирующей колонки без

вымывания сконцентрированных анионов, которые затем должны были быть переведены на разделительную колонку потоком элюента, поступающего в систему. Проведенные опыты показали, что для концентрирующей колонки, использованной в настоящей работе, объем элюента, необходимый для эффективного вымывания воды из нее без потери сконцентрированных анионов, составил около 0.5 мл. В результате найдены условия, при которых было исключено влияние пика воды на точность измерения пиков анионов фторида и хлорида.

В результате проведенных исследований обеспечена возможность достижения пределов детектирования по элементам при определении общего содержания рассматриваемых галоген-, серо- и фосфорсодержащих органических соединений на уровне  $10^{-11}$  г за счет анализа всего абсорбата на содержание всех рассматриваемых анионов (фторида, хлорида, нитрита, бромиды, нитрата, фосфата и сульфата). Пределы обнаружения этих анионов по концентрации при анализе 10 мл раствора составили  $1.3 \times 10^{-10}\%$ ,  $2.1 \times 10^{-10}\%$ ,  $4.2 \times 10^{-10}\%$ ,  $5.2 \times 10^{-10}\%$ ,  $7.0 \times 10^{-10}\%$ ,  $2.0 \times 10^{-9}\%$  и  $3.9 \times 10^{-10}\%$  для фторида, хлорида, нитрита, бромиды, нитрата, фосфата и сульфата, соответственно. Достигнутые пределы обнаружения примерно на порядок ниже, чем известные в литературе и они обеспечивают возможность решения другой важной задачи – контроля качества вод в энергетике и микроэлектронной промышленности, где требуется определение части рассматриваемых анионов на уровне  $2.5 \times 10^{-9}$  –  $2.5 \times 10^{-8}\%$ . Пределы обнаружения по таким элементам, как азот, фосфор и сера, в 3 – 4 раза ниже, чем по соответствующим анионам.

В то же время одновременное определение общего содержания рассматриваемых соединений в водных и органических растворах имеет важное значение для контроля различных вод на содержание различных нормируемых и ненормируемых галоген-, серо- и фосфорсодержащих органических соединений, которые являются наиболее опасными. На основании данных о ПДК, приведенных в литературе для 898 органических соединений, нами было изучено распределение всех приведенных соединений по ПДК в зависимости от числа соединений. Полученные данные приведены в табл. 18.

Таблица 18 – Распределение числа органических соединений по ПДК

Среднее значение ПДК, %	Доля соединений с данным ПДК, %	Среднее значение ПДК, мг/л
$10^{-3}$	7.1	0.75
$10^{-4}$	31.6	1.28
$10^{-5}$	34.9	0.22
$10^{-6}$	19.7	0.02
$10^{-7}$	4.9	0.002
$10^{-8}$	1.1	0.0002
$10^{-9}$ и ниже	0.7	0.000008

\* - Среднее значение ПДК по всем соединениям составляет 1.29 мг/л (около  $1.3 \times 10^{-4}\%$ ).

Следует отметить, что в перечень рассматриваемых соединений не входили ПХДД, ПХДФ и ПХБ, в связи с отсутствием для них данных в литературе.

Как видно из табл. 18, для большинства органических соединений (66%), нормируемых в воде, ПДК составляет  $10^{-5}$ - $10^{-4}\%$ . Для 24.3% ПДК составляет  $10^{-7}$ - $10^{-6}\%$  и для 1.1% -  $10^{-8}\%$ . Доля соединений, для которых ПДК составляет  $10^{-9}\%$  и ниже, составляет около 0.7%. Для 98.2% всех нормируемых в воде органических соединений ПДК составляет  $10^{-7}$ - $10^{-3}\%$ .

*Изучение степени конверсии хлор-, фтор- и бромсодержащих органических соединений.* Для изучения степени конверсии хлор-, фтор- и бромсодержащих органических соединений и ее зависимости от природы определяемого соединения и его количества, вводимого в реактор, нами были приготовлены растворы следующих соединений (табл. 19 – 21).

1 мкл раствора исследуемого соединения вводили в начальную зону реактора при скорости потока кислорода, равной 20 мл/мин. Время улавливания продуктов конверсии составляло 5-7 мин. Затем раствор из абсорбера анализировали с помощью метода ИХ с использованием предварительного концентрирования и анализа всего концентрата с удалением большей части воды из концентрирующей колонки.

Для изучения зависимости степени конверсии от количества вещества, вводимого в реактор, и для подтверждения возможности анализа следовых количеств данных соединений нами был приготовлен ряд растворов соединений с концентрацией определяемого элемента  $0.1 - 3.0 \times 10^{-6}$  г/мл и  $0.1 - 3.0 \times 10^{-8}$  г/мл. Анализ полученных растворов проводили описанным выше способом. Полученные данные также приведены в табл. 19 – 21.

Как видно из приведенных в табл. 19 – 21 данных, степень конверсии модельных соединений, существенно отличающихся по составу элементов, строению, летучести и термостабильности, в выбранных условиях эксперимента не зависела от свойств определяемого вещества и его количества, вводимого в реактор.

Таблица 19 – Степень конверсии фторсодержащих органических соединений (n=3, P=0.95).

Название соединения	Степень конверсии, %	
	$10^{-6}$ г	$10^{-8}$ г
Трифторуксусная кислота	95±6	95±6
Гептафторбутанол	97±5	95±6
Тетрафторбромбензол	95±6	97±5
Гептафторбутановая кислота	95±7	97±5
Гексафторбензол	99±6	96±5
5,5,6-трифтор-6-трифторметил-2,3-диокси бицикло [1,2,2]-гептан	97±5	101±4

Таблица 20 – Степень конверсии хлорсодержащих органических соединений (n=3, P=0.95).

Название соединения	Степень конверсии, %	
	$10^{-6}$ г	$10^{-8}$ г
Хлороформ	99±6	104±5
Четыреххлористый углерод	99±4	97±5
Дихлорэтан	95±6	96±5
Тетрахлорэтан	96±4	99±5
Пентахлорэтан	96±6	96±6
Гексахлорбензол (ГХБ)	96±8	102±6

Таблица 21 – Степень конверсии бромсодержащих органических соединений (n=3, P=0.95).

Название соединения	Степень конверсии, %	
	$10^{-6}$ г	$10^{-8}$ г
Дибромметан	97±5	98±5
Дибромэтилен	102±5	99±6
Дибромэтан	99±7	100±6
Тетрафторбромбензол	103±4	99±6
Бромформ	99±5	101±4
Тетрабромэтан	100±5	95±6

Из данных приведенных в табл. 19 – 21 видно, что степень конверсии различных по составу, строению и термостабильности галогенсодержащих органических соединений в выбранных нами условиях не зависела от природы и количества вещества и составляла около 100%. Поэтому можно считать, что выбранные нами условия окислительной конверсии должны быть применимы и к другим галогенсодержащим соединениям.

Для изучения степени конверсии фосфорсодержащих органических соединений и ее зависимости от природы определяемого соединения нами были приготовлены растворы следующих фосфорсодержащих соединений (табл. 5). Концентрация этих соединений составляла  $0.1-0.6 \times 10^{-6}$  г/мкл и  $0.1-0.6 \times 10^{-8}$  г/мкл. Полученные данные приведены в табл. 22.

Таблица 22 – Степень конверсии фосфорсодержащих органических соединений (n=3, P=0.95).

Название соединения	Степень конверсии, %	
	$10^{-6}$ г	$10^{-8}$ г
Триэтилфосфат	95±7	98±6
Трибутилфосфонат	95±6	95±5
Трипропилфосфат	98±5	96±5
Трибутилфосфат	105±6	95±7

Из данных, приведенных в табл. 22, видно, что степень конверсии изученных фосфорсодержащих органических соединений в выбранных нами условиях не зависела от природы и количества вещества и составляла около 100%.

Необходимо отметить, что среди изученных соединений был фосфонат. Соединения, относящиеся к классу фосфонатов, считаются наиболее устойчивыми к высокотемпературному окислению. Поэтому можно считать, что выбранные нами условия окислительной высокотемпературной конверсии должны быть приложимы и к другим классам фосфорсодержащих органических соединений.

Проведенные нами исследования показали, что в случае серосодержащих органических соединений после их высокотемпературной окислительной конверсии на хроматограммах, полученных при анализе поглотительного раствора, регистрировались два пика – сульфата и сульфита. Соотношения их высот зависело от природы и количества определяемого серосодержащего соединения. Для упрощения дальнейших расчетов содержания серы в анализируемой пробе нами было решено окислять сульфит до сульфата, в связи с чем в абсорбер добавляли пероксид водорода. Количество пероксида водорода, необходимое для полного превращения продуктов конверсии серосодержащих органических соединений в сульфат, было подобрано экспериментальным путем.

Для изучения степени конверсии серосодержащих органических соединений и ее зависимости от природы и количества определяемого соединения нами были приготовлены растворы следующих серосодержащих соединений (табл. 23), концентрация которых составляла  $10^{-9}$ - $10^{-6}$  г/мл.

Анализ полученных растворов проводили описанным выше способом. Полученные данные по конверсии также приведены в табл. 23.

Таблица 23 – Степень конверсии серосодержащих органических соединений (n=3, P=0.95).

Название соединения	Степень конверсии, %	
	$10^{-6}$ г	$10^{-8}$ г
Дибензилсульфид	96±7	95±6
Диметилсульфат	97±4	96±5
Диметилсульфоксид	95±6	101±5
Октилмеркаптан	96±7	96±6
Додекантиол	104±5	95±7
Дигексилсульфид	96±6	95±5
Дибензилдисульфид	103±5	95±6
Тиофен	98±4	95±6

Из данных приведенных в табл. 23 видно, что степень конверсии различных по составу, строению и термостабильности серосодержащих органических соединений в выбранных нами условиях не зависела от природы и количества вещества и составляла около 100%.

В результате проведенных исследований нами показана возможность прямого определения общего содержания рассматриваемых органических соединений в водных (содержание неорганического хлорида не более  $10^{-8}$  г/мл) растворах на уровне  $1 \times 10^{-9}$  –  $5 \times 10^{-9}$ % (объем пробы водного раствора 1 мл и ввод пробы непосредственно в реактор и анализ всего абсорбата).

В то же время, проведенные исследования показали, что прямой анализ водных растворов с большим содержанием неорганического хлорида на содержание хлорсодержащих органических соединений при прямом вводе пробы в реактор в выбранных условиях анализа, невозможен в связи с искажением результатов анализа за счет частичной регистрации хлорида, соответствующего хлориду натрия. В связи с этим следующим этапом наших исследований было изучение возможности определения общего содержания фтор-, хлор-, бром-, серо- и фосфорсодержащих органических соединений в водных растворах с использованием жидкостной экстракции для их выделения из водного раствора, удаления растворителя в присутствии сорбента вне аналитической системы и перевода всего концентрата в реактор за счет термодесорбции.

Для проведения дальнейших исследований необходимо было изучить извлечение среднелетучих органических соединений из органических растворов в присутствии сорбента при удалении растворителя газовым потоком вне аналитической системы. Для этого пробы растворов модельных соединений объемом 500 мкл наносили на кварцевую вату и проводили удаление растворителя вне системы. В качестве модельных соединений использовали 5,5,6-трифтор-6-трифторметил-2,3-диокси бицикло-[1,2,2]-гептан, ГХБ, тетрабромэтан, додекантиол и трибутилфосфонат. В качестве растворителя на данном этапе исследований использовали метилтретбутиловый эфир. Проведенные исследования показали, что оптимальная скорость потока гелия при удалении растворителя вне системы составляла 70 мл/мин, при этом скорость подачи раствора во вкладыш с сорбентом составляла 2 – 3 мкл/сек. Раствор подавали с помощью шприцевого

микродозатора. Скорость потока гелия при термодесорбции составляла 20 мл/мин. Температура термодесорбции составляла 270°C. Полученные данные приведены в табл. 24.

Таблица 24 – Зависимость степени извлечения среднелетучих органических соединений из органических растворов в присутствии СКВ от объема пробы в выбранных условиях.

Концентрация модельных соединений составляла  $10^{-9} - 10^{-7}$  г/мл. (n=3, P=0.95).

Название соединения	Объем пробы органического раствора, мл	Степень извлечения, %
ГХБ	1	99±8
	500	100±9
5,5,6-трифтор-6-трифторметил-2,3-диокси бицикло-[1,2,2]-гептан	1	97±9
	500	95±7
Тетрабромэтан	1	99±8
	500	98±8
Додекантиол	1	98±8
	500	102±9
Трибутилфосфонат	1	100±9
	500	98±8

Данные в табл. 24 указаны с учетом степеней конверсии и термодесорбции, которые были приняты равными 100%.

На основании полученных данных можно заключить, что степень извлечения модельных фтор-, хлор-, бром-, серо- и фосфорсодержащих органических соединений из органических растворов не зависела от объема пробы раствора.

Пределы обнаружения предложенного способа по элементу составляют для пробы водного раствора, равного 10 мл,  $1 \times 10^{-10} - 5 \times 10^{-10}$ % по элементу, в зависимости от элемента.

Таким образом, в результате проведенных исследований разработан способ одновременного и высокочувствительного определения общего содержания среднелетучих фтор-, хлор-, бром-, серо- и фосфорсодержащих органических

соединений в водных растворах, основанный на высаливании, жидкостной экстракции МТБЭ, упаривании, удалении органического растворителя вне аналитической системы в присутствии сорбента и переводе концентрата в реактор за счет термодесорбции. Следует отметить, что к наиболее опасным нормируемым соединениям, как было нами рассмотрено выше, относятся среднелетучие галоген-, серо- и фосфорсодержащие органические соединения. Для ряда из них ПДК составляет  $10^{-9}$ - $10^{-8}\%$ .

На основании разработанных способов был проведен анализ проб различных вод (деионизованной, водопроводной, питьевой) на общее содержание фтор-, хлор-, бром-, серо- и фосфорсодержащих органических соединений.

Анализ проб воды с использованием жидкостной экстракции проводили следующим образом: пробу воды, объемом 10 мл помещали в склянку, добавляли метанол и хлорид натрия. Затем проводили экстракцию МТБЭ в течение 5 мин. После расслаивания органическую фазу отбирали, упаривали, удаляли растворитель в присутствии сорбента потоком гелия, концентрат термодесорбировали в реактор, где происходила конверсия рассматриваемых органических соединений до соответствующих продуктов, которые улавливались в абсорбере. Весь объем из абсорбера вводили в ионный хроматограф с использованием концентрирующей колонки и удалением большей части воды из нее. В табл. 25 приведены результаты анализа различных вод на содержание фтор-, хлор-, бром-, серо- и фосфорсодержащих органических соединений при использовании предложенного способа.

В результате проведенных исследований:

- Предложен способ определения анионов ( $F^-$ ,  $Cl^-$ ,  $NO_2^-$ ,  $Br^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $HPO_4^{2-}$ ,  $SO_4^{2-}$ ) в сверхчистых водах на уровне  $10^{-10}$ - $10^{-9}\%$ , в зависимости от аниона, основанный на концентрировании, удалении большей части воды из концентрирующей колонки и анализе концентрата методом ИХ.
- Разработан способ прямого определения общего содержания галоген-, серо- и фосфорсодержащих органических соединений в водных растворах на уровне  $1 \times 10^{-5}$ - $10^{-9}\%$  (проба – 1 мл) и органических растворах на уровне  $1 \times 10^{-6}$ - $5 \times 10^{-6}\%$  (проба – 1 мкл), основанный на вводе пробы водного или органического раствора непосредственно в реактор, ее конверсии в потоке кислорода, поглощении

продуктов конверсии из газового потока и определении образовавшихся фторида, хлорида, бромида, фосфата и сульфата методом ИХ.

- Разработан способ определения общего содержания фтор-, хлор-, бром-, серо- и фосфорсодержащих органических соединений в водных растворах, основанный на высаливании, микрожидкостной экстракции, извлечении определяемых соединений в присутствии сорбента из экстракта, при удалении растворителя вне аналитической системы, переводе концентрата в реактор термодесорбцией и последующем определении соответствующих продуктов конверсии методом ИХ. Предел обнаружения способа –  $1 \times 10^{-10}$ –  $5 \times 10^{-10}$ % (0,001 – 0,005 мкг/л), в зависимости от элемента, при объеме пробы воды, равном 10 мл.

Таблица 25. Результаты анализа различных вод на содержание фтор-, хлор-, бром-, серо- и фосфорсодержащих органических соединений при использовании предложенного способа ( $s_r \leq 0.15$ ).

Образец	Содержание определяемого элемента, %				
	F	Cl	Br	P	S
Деионизованная вода 1	$<1.1 \times 10^{-10}$	$0.8 \times 10^{-6}$	$<4.9 \times 10^{-10}$	$<5.1 \times 10^{-10}$	$1.3 \times 10^{-6}$
Деионизованная вода 2	$<1.1 \times 10^{-10}$	$1.8 \times 10^{-6}$	$<4.9 \times 10^{-10}$	$<5.1 \times 10^{-10}$	$3.9 \times 10^{-6}$
Водопроводная вода (Химический факультет МГУ)	$6.9 \times 10^{-8}$	$2.4 \times 10^{-6}$	$6.1 \times 10^{-7}$	$<5.1 \times 10^{-10}$	$4.9 \times 10^{-6}$
Водопроводная вода (г. Подольск)	$9.2 \times 10^{-8}$	$1.8 \times 10^{-6}$	$2.5 \times 10^{-7}$	$<5.1 \times 10^{-10}$	$4.1 \times 10^{-6}$
Питьевая вода «Вонаqua»	$6.7 \times 10^{-8}$	$1.2 \times 10^{-6}$	$3.1 \times 10^{-7}$	$<5.1 \times 10^{-10}$	$2.2 \times 10^{-6}$
Питьевая вода «Святой источник»	$5.1 \times 10^{-8}$	$1.6 \times 10^{-6}$	$0.5 \times 10^{-7}$	$<5.1 \times 10^{-10}$	$2.7 \times 10^{-5}$

Таким образом, в соответствии с ТЗ, разработана методика определения суммарного содержания галоид-, серо- и фосфорсодержащих соединений в воде, обеспечивающая определение суммарного содержания целевых веществ с пределом обнаружения 0,001 – 0,005 мкг/л (в ТЗ – не выше 0,1 мкг/л).

3. СТАТИСТИЧЕСКИЕ И ФАКТОГРАФИЧЕСКИЕ СВЕДЕНИЯ О  
НАУКОМЕТРИЧЕСКИХ РЕЗУЛЬТАТАХ ВЫПОЛНЕНИЯ  
ГОСУДАРСТВЕННОГО КОНТРАКТА

(в т.ч. о результатах достижения в 2010 г. индикаторов и показателей,  
установленных техническим заданием государственного контракта)

3.1. Статьи, опубликованные по результатам выполнения государственного  
контракта.

1. Чернецова Е.С., Ревельский И.А., Морлок Г.Е. Быстрый скрининг оксиметилфурфурола в меде методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии // Аналитика и контроль. 2011. Т. 15. №1. С. 19 – 24.
2. Чернецова Е.С., Морлок Г.Е., Ревельский И.А. Масс-спектрометрия DART и ее применение в химическом анализе // Успехи химии. 2011. Т. 80. С. 249 – 271.
3. Самохин А.С., Ревельский А.И., Чепелянский Д.А., Ревельский И.А.. Возможность достоверной идентификации неизвестных соединений при использовании программы MS Search и коммерческой базы данных масс-спектров электронной ионизации // Масс-спектрометрия. 2011. Т.8 (1). С. 65 – 72.
4. Кочук Е.В., Дмитриенко С.Г. Сорбция сульфаниламидов на сверхсшитом полистироле. // Журн. физич. химии. 2011. Т. 85. №1. С. 95 – 98.
5. Попов С.А., Чумичкина Ю.А., Е.Н. Шаповалова Е.Н., Дмитриенко С.Г., Золотов Ю.А. Концентрирование 2,4-дихлорфеноксисукусной кислоты на полимере с молекулярными отпечатками и ее последующее определение методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. // Журн. аналит. химии. 2011. Т. 66. №.1. С. 8 – 12.
6. Дмитриенко С.Г., Попов С.А., Чумичкина Ю.А., Золотов Ю.А. Сорбционные свойства полимеров с молекулярными отпечатками 2,4-дихлорфеноксисукусной кислоты, синтезированных различными способами. // Журн. физич. химии. 2011. Т.85. №3. С. 542 – 547.
7. Апяри В.В., Дмитриенко С.Г., Золотов Ю.А. Аналитические возможности цифровых цветометрических технологий. Определение нитрит-ионов с

использованием пенополиуретана. // Вестн. Моск. ун-та. Серия 2. Химия. 2011. Т. 52. №1, С. 36 – 42.

8. Апяри В.В., Дмитриенко С.Г., Батов И.В., Золотов Ю.А. Миниспектрофотометр Eye-One Pro как альтернатива спектрометру диффузного отражения. Журн. аналит. химии. 2011. Т. 66. №2. С.148 – 154.
9. Волков А.И., Алов Н.В. О влиянии расстояния между спектрометром и образцом на интенсивность рентгеновской флуоресценции. // Вестник Московского университета. Серия 2. Химия. 2011. Т. 52. № 1. С. 53 – 59.
10. Алов Н.В., Куцко Д.М. Ионно-лучевое восстановление поверхности высшего оксида тантала // Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования. 2011. № 3. С. 59 – 62.
11. Sitnikova N.A., Borisova A.V., Komkova M.A., Karyakin A.A. // Anal. Chem. 2001. V. 83. P. 2359 – 2363.
12. Родин И.А., Браун А.В., Шпигун О.А., Савельева Е.И., Рыбальченко И.В., Болотов С.Л., Родченков Г.М. "Обнаружение маркеров нервно-паралитических отравляющих веществ методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии" // Масс-спектрометрия. 2011. Т.8. № 1. С. 45 – 50.
13. Цизин Г.И. О коэффициенте концентрирования. // Журн. аналит. химии. 2011. Т. 66. № 5. С. 550.

### 3.2. Докторские диссертации, защищенные по результатам выполнения государственного контракта

1. Иванов Александр Вадимович «Хроматофокусирование: новые подходы в концентрировании и разделении ионов металлов и биологически важных макромолекул». Дата защиты – 2 марта 2011 г. Специальность 02.00.02 – Аналитическая химия. Диссертационный совет Д.501.001.88 по химическим наукам при Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова.
2. Беклемишев Михаил Константинович «Новые индикаторные системы в кинетических методах анализа. Сорбционно-кинетический метод». Дата защиты – 08 июня 2011 г. Специальность 02.00.02 – Аналитическая химия.

Диссертационный совет Д.501.001.88 по химическим наукам при Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова.

3. Тихомирова Татьяна Ивановна «Неорганические оксиды, модифицированные органическими реагентами, для концентрирования и разделения ионов элементов и органических соединений». Дата защиты – 22 июня 2011 г. Специальность 02.00.02 – Аналитическая химия. Диссертационный совет Д.501.001.88 по химическим наукам при Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова.

### 3.3. Кандидатские диссертации, защищенные по результатам выполнения государственного контракта

1. Волков Антон Иванович «Рентгенофлуоресцентный анализ железорудных смесей непосредственно в технологическом потоке». Дата защиты – 23 марта 2011 г. Специальность 02.00.02 – Аналитическая химия. Диссертационный совет Д.501.001.88 по химическим наукам при Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова.
2. Хрычева Анастасия Дмитриевна «Применение ИК-термолинзовой спектроскопии для определения углеводов, белков и растительных пигментов». Дата защиты – 2011 г. Специальность 02.00.02 – Аналитическая химия. Диссертационный совет Д.501.001.88 по химическим наукам при Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова.
3. Борисова Анастасия Владимировна «Электрохимические (био)сенсоры на основе Fe-Ni гексацианоферратов, полученных методом межфазного химического синтеза». Дата защиты – 29 марта 2011 г. Специальность 02.00.15 – кинетика и катализ; 03.01.06 – биотехнология. Диссертационный совет Д 501.001.59 по химическим наукам при Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова.
4. Воронин Олег Геннадьевич «Высокоэффективный электрокатализ гидрогенами для конверсии органических отходов в электричество». Дата защиты – 8 февраля 2011 г. Специальность 02.00.15 – кинетика и катализ;

03.01.06 – биотехнология. Диссертационный совет Д 501.001.59 по химическим наукам при Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова.

3.4. Список молодых специалистов, принимавших участие в выполнении государственного контракта

№ п.п.	Фамилия Имя Отчество	Дата рождения	Должность	Ученая степень	Место работы
1	Статкус Михаил Александрович	22.06.1983	снс	кхн	Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
2	Апяри Владимир Владимирович	30.04.1986	нс	кхн	Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
3	Родин Игорь Александрович	21.11.1983	нс	кхн	Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
4	Ланская Светлана Юрьевна	14.05.1979	ст. преп.	кхн	Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
5	Прохорова Александра Федоровна	01.04.1984	мнс	кхн	Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
6	Кубышев Сергей Сергеевич	28.12.1982	мнс	кхн	Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
7	Поляков Алексей Евгеньевич	25.03.1986	вед. инж.		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
8	Малинина Любовь Игоревна	18.10.1986	мнс		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
9	Хрычёва Анастасия Дмитриевна	05.09.1982	мнс		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
10	Яшина Евгения Ивановна	10.11.1984	мнс		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
11	Воронин Олег Геннадьевич	26.06.1982	мнс		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
12	Борисова Анастасия Владимировна	03.07.1985	мнс		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
13	Федюнина Наталья Николаевна	30.10.1988	аспирант		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
14	Сохраняева Александра Сергеевна	10.07.1988	аспирант		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
15	Бурмыкин Дмитрий Александрович	12.11.1987	аспирант		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
16	Самохин Андрей Сергеевич	02.06.1987	аспирант		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова

17	Крившенко Галина Александровна	17.09.1984	аспирант	Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
18	Афанасьева Евгения Леонидовна	12.03.1987	аспирант	Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
19	Смирнов Роман Сергеевич	12.11.1986	аспирант	Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
20	Елфимова Яна Андреевна	16.04.1987	аспирант	Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
21	Браун Аркадий Владимирович	06.10.1988	аспирант	Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
22	Андреева Елена Юрьевна	30.01.1986	аспирант	Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
23	Волков Антон Иванович	21.11.1984	аспирант	Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
24	Федосеева Марина Владиславовна	11.03.1985	аспирант	Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
25	Затираха Александра Валерьевна	14.05.1986	аспирант	Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
26	Смирнов Константин Николаевич	07.07.1986	аспирант	Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
27	Буслова Татьяна Сергеевна	02.04.1989	студент	Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
28	Мясникова Дина Андреевна	22.05.1989	студент	Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
29	Борисова Дина Рашидовна	12.01.1990	студент	Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
30	Облезова Александра Владимировна	11.09.1989	студент	Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
31	Волков Павел Александрович	02.03.1988	студент	Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
32	Архипова Виктория Владиславовна	09.08.1990	студент	Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
33	Толмачева Вероника Владимировна	30.06.1991	студент	Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
34	Ставрианиди Андрей Николаевич	13.07.1989	студент	Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
35	Русакова Екатерина Сергеевна	16.06.1988	студент	Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
36	Назаренко Дмитрий Владимирович	01.11.1991	студент	Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова

37	Дубенский Александр Сергеевич	31.01.1990	студент	Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
----	-------------------------------------	------------	---------	--

### 3.5. Разработанные учебные курсы и задачи.

В рамках специализации «аналитическая химия» разработан новый лекционный курс «Биоэлектрокатализ, электроаналитические системы, электроактивные полимеры», 10 ч, для студентов 4 курса Химического факультета МГУ.

В рамках специализации «аналитическая химия» разработана новая задача для спецпрактиума «Проточное сорбционно-атомно-абсорбционное определение элементов и их форм в водах», 4 ч, для студентов 4 курса Химического факультета МГУ.

### 3.6. Поданные заявки на патенты

1. Статкус М.А., Сохраняева А.С., Цизин Г.И., Золотов Ю.А. Способ определения хлорфенолов в водных растворах, включающий сорбционное концентрирование и высокоэффективное жидкостно-хроматографическое определение. Заявка на выдачу патента № 2011118213 от 10.05.2011.
2. Апяри В.В., Дмитриенко С.Г., Золотов Ю.А. Способ определения полигексаметиленгуанидина. Заявка на выдачу патента № 2011118211 от 10.05.2011.
3. Беклемишев М.К., Крившенко Г.А. Способ выделения кверцетина из водного раствора. Заявка на выдачу патента № 2011119249 от 16.05.2011.

3.7 Сравнение полученных результатов с техническими характеристиками, заявленными в Техническом задании государственного контракта.

Синтезирована серия из 11-ти (в ТЗ – не менее 5-ти) лабораторных образцов новых наноструктурированных сорбентов массой 3 г (в ТЗ – не менее 2 г) каждого на основе акриламида с отпечатками кверцетина для концентрирования этого

соединения и других флавоноидов. Эти сорбенты обеспечивают селективное извлечение целевых компонентов из растворов на 90 – 95% (в ТЗ – на 90 – 95%).

Разработана методика сорбционно-спектрофотометрического определения 4-диметиламинобензальдегида, 4-диметиламинокоричного альдегида и ванилина в фармпрепаратах и пищевом сырье с пределом обнаружения на уровне 0,2 – 1,8 мкг/мл, обеспечивающая определение целевых веществ с величиной относительной погрешности 3 – 5 % (в ТЗ – не превышающей 5 %).

Разработана методика полупрепаративного разделения изоформ формиатдегидрогеназы для получения очищенных активной формы формиатдегидрогеназы, при содержании в исходной смеси на уровне 0,5 – 1 мг/мл (в ТЗ – на уровне 0,5 – 1 мг/мл), обеспечивающая достижение разрешения хроматографических пиков не ниже 1,5 (в ТЗ – не ниже 1,5) и получение пиков шириной не более 0,3 ед. рН (в ТЗ – не более 0,3 ед. рН).

Разработана методика автоматизированного проточного сорбционно-жидкостно-хроматографического определения фенола и хлорофенолов в питьевой и природных водах, обеспечивающая определение целевых веществ с пределом обнаружения на уровне ПДК и ниже (в ТЗ – на уровне ПДК).

Разработана методика определения суммарного содержания галоид-, серо- и фосфорсодержащих соединений в воде, обеспечивающая определение суммарного содержания целевых веществ с пределом обнаружения 0,001 – 0,005 мкг/л (в ТЗ – не выше 0,1 мкг/л).

### 3.8. Индикаторы и показатели

№	Наименование индикатора	Ед. измер.	Требования ТЗ на 2011 г.	Фактическое выполнение
И.1.1.1	Количество кандидатов наук – исполнителей НИР, представивших докторские диссертации в диссертационный совет (нарастающим итогом)	чел.	2	3
И.1.1.2	Количество аспирантов – исполнителей НИР, представивших кандидатские диссертации в диссертационный совет (нарастающим итогом)	чел.	12	11

И.1.1.3	Количество студентов, аспирантов, докторантов и молодых исследователей закрепленных в сфере науки, образования и высоких технологий (зачисленных в аспирантуру или принятых на работу в учреждения высшего профессионального образования, научные организации, предприятия оборонно-промышленного комплекса, энергетической, авиационно-космической, атомной отраслей и иных приоритетных для Российской Федерации отраслей промышленности) в период выполнения НИР (нарастающим итогом)	чел.	12	11
И.1.1.4	Количество исследователей – исполнителей НИР, результаты работы которых в рамках НИР опубликованы в высокорейтинговых российских и зарубежных журналах	чел.	42	42
И.1.1.5	Наличие документов, подтверждающих внедрение результатов работ в образовательный процесс	ДА/НЕТ	да	да
	<b>Наименование показателя</b>			
П.1.1.1	Количество докторов наук – исполнителей НИР, работающих в научной или образовательной организации на полную ставку, принявших участие в работах в течение всего срока реализации НИР	чел.	8	9
П.1.1.2	Количество молодых кандидатов наук – исполнителей НИР, работающих в научной или образовательной организации на полную ставку, принявших участие в работах в течение всего срока реализации НИР (как правило, соискателей ученой степени доктора наук)	чел.	6	6
П.1.1.3	Количество аспирантов, принявших участие в работах в течение всего срока реализации НИР	чел.	12	14
П.1.1.4	Количество студентов, принявших участие в работах в течение всего срока реализации НИР	чел.	10	11
П.1.1.5	Доля привлеченных на реализацию НИР внебюджетных средств от объема средств федерального	%	20	20

	бюджета			
П.1.1.6	Доля фонда оплаты труда молодых участников НИР (молодых кандидатов наук, аспирантов и студентов) в общем объеме фонда оплаты труда по НИР	%	50	50,4

#### 4. ТЕХНИКО-ЭКОНОМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА РЫНОЧНОГО ПОТЕНЦИАЛА РЕЗУЛЬТАТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ НИР

На сегодняшний день отечественный рынок высокоселективных сорбентов, а также методик концентрирования и определения токсичных, биогенных и других важных компонентов в объектах окружающей среды, медицины и материаловедения практически не развит, несмотря на высокую актуальность этих разработок. Связано это с несколькими обстоятельствами. К ним следует отнести малочисленность подобных разработок (большинство полученных в результате выполнения работ по контракту материалов и устройств получены впервые) и недостаток информации по ним (опубликованы лишь первые работы). Следующая причина – необходимость строгой и относительно длительной метрологической аттестации методик химического анализа (в том числе тех, которые основаны на использовании предложенных материалов и устройств), особенно в таких областях, как анализ товарной продукции и фармацевтических препаратов. Для такой аттестации, без которой внедрение методик невозможно, необходимо с нашей точки зрения 1,5 – 2 года. Несмотря на это, ряд методик, разработанных в рамках данного проекта (методики определения токсичных компонентов в почвах), уже внедряются в нескольких организациях.

В результате выполнения этапа № 2 настоящего проекта разработаны и исследованы высокоселективные наноструктурированные сорбенты. С использованием этих, а также других материалов и устройств разработаны высокочувствительные комбинированные и гибридные методы химического анализа важнейших объектов, таких как воды, почвы, биологические жидкости, пищевые продукты.

Разработанные методики необходимы для контроля технологических процессов и совершенствования технологий предприятий пищевой и фармацевтической промышленности; для переоснащения многочисленных аналитических центров и лабораторий, осуществляющих экологический мониторинг объектов; медицинских учреждений для внедрения новых методов диагностики заболеваний.

Методики определения фенола и хлорфенолов в водах (разделы 1.1.3, 1.1.5, 2.4, и 2.6), а также методики определения суммарного содержания галоид-, серо- и фосфорсодержащих соединений в воде (разделы 1.1.6 и 2.7) необходимы ориентировочно в 300 организациях (эколого-аналитических службах, промышленных предприятиях при необходимости контроля сточных вод и др.). Стоимость одной методики – не менее 30 000 руб. Потенциальный экономический эффект – не менее 9 млн. руб.

## 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках работ по этапу № 2 государственного контракта от 20 сентября 2010 г № 14.740.11.0365 разработаны пути синтеза наноструктурированных сорбентов для концентрирования биологически активных органических соединений и синтезировано 11 таких сорбентов, разработаны методики определения 4-диметиламинобензальдегида, 4-диметиламинокоричного альдегида и ванилина в фармпрепаратах и пищевом сырье, определения фенола и хлорфенолов в водах, определения суммарного содержания галоид-, серо- и фосфорсодержащих соединений в водах, полупрепаративного разделения изоформ формиатдегидрогеназы для получения очищенных активной формы формиатдегидрогеназы.

Все работы выполнены на мировом уровне и в соответствии с требованиями Технического задания к контракту. В рамках выполнения работ по этапу защищено 3 докторских и 4 кандидатских диссертации, опубликовано 13 статей в высокорейтинговых журналах, подано 3 заявки на патент, разработан новый лекционный курс «Биоэлектрокатализ, электроаналитические системы,

электроактивные полимеры» и новая задача для спецпрактиума «Проточное сорбционно-атомно-абсорбционное определение элементов и их форм в водах».

## 6. ЛИТЕРАТУРА

1. Marian Naczek, Fereidoon Shahidi, Extraction and analysis of phenolics in food. Review. // *J. Chromatogr. A.* – 2004. – V. 1054. № 1 – 2. – P. 95–111.
2. Rijke E., Out P., Niessen W. M. A., Ariese F., Gooijer C., Brinkman U. A. Th. Analytical separation and detection methods for flavonoids. // *J. Chromatogr. A.* – 2006. – V. 1112. – № 1 – 2. – P. 31 - 36.
3. Chen C., Zhou J., Ji C. Quercetin: A potential drug to reverse multidrug resistance. // *Life Sciences.* – 2010. – V. 87. – P. 333.
4. Wach A., Pyrzyńska K., Biesaga M. Quercetin content in some food and herbal samples. // *Food Chem.* – 2007. – V. 100. – № 2. – P. 699 – 704.
5. Яшин Я.И., Рыжнев В.Ю., Яшин А.Я., Черноусова Н.И. Природные антиоксиданты. Содержание в пищевых продуктах и их влияние на здоровье и старение человека. М.: ТрансЛит. – 2009. – 212 с.
6. Andersson L.I. Selective solid-phase extraction of bio- and environmental samples using molecularly imprinted polymers. // *Bioseparation.* – 2001. – V. 10. – № 6. – P. 353 – 364.
7. Haginaka J. Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction. // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2004. – V. 379. – № 3. – P. 332 – 334.
8. Дмитриенко С.Г., Ирха В.В., Кузнецова А.Ю., Золотов Ю.А. Использование полимеров с молекулярными отпечатками в процессах разделения и концентрирования органических соединений. // *Журн. аналит. химии.* – 2004. – Т. 59. – № 9. – С. 902 – 912.
9. O'Mahony J., Molinelli A., Nolan K., Smyth M. R., Mizaikoff B. Anatomy of successful imprint: analyzing the recognition mechanisms of a molecularly imprinted polymer for quercetin. // *Biosens. Bioelectron.* – 2006. – V. 21. – № 7. – P. 1383 – 1392.
10. Xie J., Zhu L., Luo H., Zhou L., Li C., Xu X. Direct extraction of specific pharmacophoric flavonoids from ginkgo leaves using a molecularly imprinted polymer for quercetin. // *J. Chromatogr. A.* – 2001. – V. 934. – № 1 – 2. – P. 1 – 11.

11. Weiss R., Molinelli A., Jakusch M., Mizaikoff B. Molecular imprinting and solid phase extraction of flavonoid compounds. // *Bioseparation*. – 2002. – V. 10. – № 6. – P. 379 – 387.
12. Song X., Li J., Wang J., Chen L. Quercetin molecularly imprinted polymers: preparation, recognition characteristics and properties as sorbent for solid-phase extraction. // *Talanta*. – 2009. – V. 80. – № 2. – P. 694 – 702.
13. Molinelli A., Weiss R., Mizaikoff B. Advanced solid phase extraction using molecularly imprinted polymers for the determination of quercetin in red wine. // *J. Agric. Food. Chem.* – 2002. – V. 50. – № 7. – P. 1804 – 1808.
14. Theodoridis G., Lasáková M., Škeříková V., Tegou A., Giantsiou N., Jangera P. Molecular imprinting of natural flavonoid antioxidants: application in solid-phase extraction for the sample pretreatment of natural products prior to HPLC analysis. // *J. Sep. Sci.* – 2006. – V. 29. – № 15. – P. 2310 – 2321.
15. Xia Y.-q., Guo T.-y., Song M.-d., Zhang B.-h., Zhang B.-l. Selective separation of quercetin by molecular imprinting using chitosan beads as functional matrix. // *React. Func. Polym.* – 2006. – V. 66. – № 12. – P. 1734 – 1740.
16. Дмитриенко С.Г., Ирха В.В., Дуйсебаева Т.Б., Михайлик Ю.В., Золотов Ю.А. Синтез и исследование сорбционных свойств полимеров с отпечатками 4-гидроксibenзойной кислоты. // *Журн. аналит. химии*. – 2006. – Т. 61. – № 1. – С. 18 – 23.
17. Dmitrienko S.G., Irkha V.V., Apyari V.V., Klokoва E.V., Zolotov Yu.A. Recognition of hydroxybenzoic acids and their esters by molecularly imprinted polymers: a comparative study. // *Mendeleev Commun.* – 2008. – V. 18. – № 6. – P. 315 – 317.
18. Попов С.А., Дмитриенко С.Г., Чумичкина Ю.А., Золотов Ю.А. Сорбционные свойства полимеров с молекулярными отпечатками хлорсодержащих пестицидов. // *Журн. физ. химии*. – 2009. – Т. 83. – № 4. – С. 649 – 654.
19. Дмитриенко С.Г., Ирха В.В., Михайлик Ю.В., Клокова Е.В. Влияние соотношения функциональный мономер – темплат в предполимеризационной смеси на сорбционные свойства полимеров с молекулярными отпечатками органических соединений. // *Вестн. Моск. ун-та. Серия 2. Химия*. – 2006. – Т. 47. – № 3. – С. 210 – 217.

20. Дмитриенко С.Г., Попов С.А., Чумичкина Ю.А., Золотов Ю.А. Сорбционные свойства полимеров с молекулярными отпечатками 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, синтезированных различными способами. // Журн. физич. химии. – 2011. – Т. 85. – № 3. – С. 542-547.
21. Доронин С.Ю., Чернова Р.К., Гусакова Н.Н. п-Диметиламинокоричный альдегид как фотометрический реагент на первичные ароматические амины. // Журн. аналит. химии. – 2004. – Т. 59. – № 4. – С. 377 – 387.
22. Доронин С.Ю., Гусакова Н.Н., Чернова Р.К. Тест-метод определения анилина в воздухе. // Завод. лаб. – 2002. – Т. 68. – № 7. – С. 7 – 10.
23. Чернова Р.К., Гусакова Н.Н., Еременко С.Н., Доронин С.Ю. Фотометрическое определение анилина и его моонитропроизводных с п-диметиламинокоричным альдегидом. // Изв. ВУЗов. Химия и хим. технология. – 1996. – Т. 39. – № 6. – С. 33 – 35.
24. Staden J.F., Britz H.E. // Anal. Chim. Acta. – 1997. – V. 351. – P. 281.
25. Bajaj K.L., Ahuja K.L. // Analysis. – 1980. – V. 8. – P. 35
26. Герасимов А.В., Горнова Н.В., Рудометова Н.В. Определение ванилина и этилванилина в пищевых ароматизаторах ванинольного направления методом планарной (тонкослойной) хроматографии. // Журн. аналит. химии. – 2003. – Т. 58. – № 7. – С. 758 – 766.
27. Traore F., Pianetti G.A., Dallery L., Tod M., Chalom J., Farinotti R., Mahuzier G. // Chromatographia. – 1993. – V.36. – P. 96.
28. Паносян А.Г., Мамикопян Г., Торосян М., Абрямян А., Оганесян А., Gabrielyan Э.С., Григорянц А., Мхитарян С., Лопатин В.В. Определение фенольных альдегидов в коньяках и винах методом капиллярного электрофореза: новые маркеры качества коньяка. // Журн. аналит. химии. – 2002. – Т. 57. – № 4. – С. 422 – 428.
29. Dmitrienko S.G., Sviridova O.A., Pyatkova L.N., Myshak E.N., Shelmenkova O.V., Zolotov Yu.A. Chemical reactions of terminal groups in polyurethane foams. // Mendeleev. Comm. – 2000. – № 6. – P. 244 – 245.
30. Dmitrienko S.G., Sviridova O.A. Pyatkova L.N. Zhukova V.A. Zolotov Yu.A. Rapid determination of free active chlorine in water by diffuse reflectance spectroscopy

after reaction with polyurethane foams. // *Anal. Chim. Acta.* – 2000. – V. 405. – № 1 – 2. – P. 231.

31. Dmitrienko S.G., Sviridova O.A. Pyatkova L.N., Senyavin V.M. Polyurethane foams as solid chromogenic reagents for diffuse reflectance spectroscopy. // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2002. – V. 374. – № 3. – P. 361 – 368.

32. Дмитриенко С.Г., Апяри В.В. Пенополиуретаны. Сорбционные свойства и применение в химическом анализе. М.: URSS. – 2009. – 261 с.

33. Апяри V.V., Dmitrienko S.G., Zolotov Y.A. Assessment of condensation of aromatic aldehydes with polyurethane foam for their determination in waters by diffuse reflectance spectroscopy and colorimetry. // *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* – 2009. – V. 89. – № 8 – 12. – P. 775 – 783.

34. Quintana M., Ramos L. // *Trends Anal. Chem.* – 2008. – V. 27. – P. 418.

35. Environmental Protection Agency (EPA), Federal Register, EPA Method 604, Phenols, Part VIII, 40 CFR Part 136, EPA, Washington, DC, USA. – 1984. – P. 58.

36. Decision № 2455/2001/EC of the European Parliament and of the Council of 20 November 2001 establishing the list of priority substances in the field of water policy.

37. Rodríguez I., Llompart M. P., Cela R. // *J. Chromatogr. A.* – 2000. – V. 885. – P. 291.

38. European Council directive 80/778/EEC of 15 July 1980 relating to the quality of water intended for human consumption.

39. Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества. СанПиН 2.1.4.1074-0.

40. Puig D., Barcelo D. // *Trends Anal. Chem.* – 1996. – V. 15. – P. 362.

41. Verdu-Andres J., Reig F. B., Campins-Falco P. // *Chromatographia.* – 1996. – V. 42. – P. 283.

42. Wissiack R., Rosenberg E., Grasserbauer M. // *J. Chromatogr. A.* – 2000. – V. 896. – P. 159.

43. Bagheri H., Saraji M. // *J. Chromatogr. A.* – 2003. – V. 986. – P. 111.

44. Bagheri H., Mohammadi A., Salemi A. // *Anal. Chim. Acta.* – 2004. – V. 513. – P. 445.

45. Caro E., Marcé R. M., Cormack P. A. G., Sherrington, D. C., Borrull, F. // *J. Chromatogr. A.* – 2003. – V. 995. – P. 233.
46. Masque N., Galia M., Marce R. M., Borrul F. // *J. Chromatogr. A.* – 1997. – V. 771. – P. 55.
47. Masque N., Galia M., Marce R. M., Borrul F. // *Analyst.* – 1997. – V. 122. – P. 425.
48. Waters Chromatography Columns and Supplies Catalog. – 2009-2010. – P. 15.
49. Phenomenex Product Guide: SPE, HPLC, GC. – 2009-2010. – P. 35.
50. de Almeida Azevedo D., Lacorte S., Vinhas T., Viana, P., Barceló, D. // *J. Chromatogr. A.* – 2000. – V. 879. – P. 13.
51. D'Archivio A. A., Fanelli M., Mazzeo P., Ruggieri F. // *Talanta.* – 2007. – V. 71. – P. 25.
52. Wissiack R., Rosenberg E. // *J. Chromatogr. A.* – 2002. – V. 963. – P. 149.
53. Marazuela M. D., Moreno-Bondi M. C. // *J. Chromatogr. A.* – 2004. – V. 1034. – P. 25.
54. Michalkiewicz A., Biesaga M., Pyrzyńska K. // *J. Chromatogr. A.* – 2008. – V. 1187. – P. 18.
55. Rostagno M. A., Palma M., Barroso C. G. // *J. Chromatogr. A.* – 2005. – V. 1076. – P. 110.
56. Тишков В.И., Попов В.О. Механизм действия формиатдегидрогеназы и ее практическое применение. // *Биохимия.* – 2004. – Т.69. – № 11. – С. 1537 – 1554.
57. Кнорре Д.Г., Мызина С.Д. Биологическая химия. М.: Высшая школа. – 2003. – 480 с.
58. Mirzaei H., Regnier F. Enrichment of carbonylated peptides using Girard P reagent and strong cation exchange chromatography. // *Anal. Chem.* – 2006. – V.78. – P.770 – 778.
59. Иванов А.В., Вакштейн М.С. Хроматофокусирование биполярных соединений на катионообменных колонках с помощью простых подвижных фаз. // *Молекулярные технологии.* – 2007. – Т. 1. – №1. – С. 15 – 38.
60. Sluyterman L.A.A.E., Wijdenes J. Chromatofocusing. III. The properties of DEAE-agarose anion exchanger and its suitability for protein separations. // *J. Chromatogr.* – 1981. – V.206. – P. 429 – 440.

61. Sluyterman L.A.AE., Wijdenes J. Chromatofocusing. IV. Properties of an agarose polyethyleneimine ion exchanger and its suitability for protein separations. // *J.Chromatogr.* – 1981. – V.206. – P. 441 – 447.
62. Sluyterman L.A.A., Kooistra C. Ten years of chromatofocusing: a discussion. // *J. Chromatogr.* – 1989. – V.470. – P.317 – 326.
63. Amersham Biotechnology BioDirectory (Catalogue). Sweden, Uppsala. – 2003. – P. 500 – 527.
64. Ion Exchange Chromatography and Chromatofocusing: Principles and Methods. Uppsala: Amersham Biosciences. – 2004. – P. 126 – 165.
65. Andersen T., Pepaj M., Trones R., Lundanes E., Greibrokk T. Isoelectric point separation of proteins by capillary pH-gradient ion-exchange chromatography. // *J. Chromatogr. A.* – 2004. – V. 1025. – P. 217 – 226.
66. Kang X., Frey D.D. Chromatofocusing using micropellicular column packings with computer-aided design of the elution buffer composition. // *Anal. Chem.* – 2002. – V. 74. – №5. – P.1038 – 1045.
67. Thurman E.M., Mills M.S. Solid-phase extraction — Principles and practice. – 1998. N.-Y.: Wiley. – 344 p.
68. Fang Z. Flow Injection Separation and Preconcentration. – 1993. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH. – 259 p.
69. Hennion M.-C. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. // *J. Chromatogr. A.* – 1999. – V. 856. – P. 3 – 54.
70. Wang S., Huang W., Fang G., He J., Zhang Y. On-line coupling of solid-phase extraction to high-performance liquid chromatography for determination of estrogens in environment. // *Anal. Chim. Acta.* – 2008. – V. 606. – P. 194 – 201.
71. Ansermot N., Fathi M., Veuthey J.-L., Desmeules J., Hochstrasser D., Rudaz S. Quantification of cyclosporine A in peripheral blood mononuclear cells by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry using a column-switching approach. // *J. Chromatogr. B.* – 2007. – V. 857. – P. 92 – 99.
72. Capka V., Carter S.J. Minimizing matrix effects in the development of a method for the determination of salmeterol in human plasma by LC/MS/MS at low pg/mL concentration levels. // *J. Chromatogr. B.* – 2007. – V. 856. – P. 285 – 293.

73. Dettmer K., Hanna D., Whetstone P., Hansen R., Hammock B.D. Autism and urinary exogenous neuropeptides: Development of an on-line SPE-HPLC-tandem mass spectrometry method to test the opioid excess theory. // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2007. – V. 388. – P. 1643 – 1651.

74. Sambe H., Hoshina K., Haginaka, J. Molecularly imprinted polymers for triazine herbicides prepared by multi-step swelling and polymerization method. Their application to the determination of methylthiotriazine herbicides in river water. // *J. Chromatogr. A.* – 2007. – V. 1152. – P. 130 – 137.

75. Saber A. L., Elmosallamy M. A. F., Wilson S. R., Lundanes E., Greibrokk T. Determination of oxomemazine in human plasma by capillary LC-ESI-MS. // *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* – 2007. – V. 30. – P. 393 – 403.

76. Barcelo D., Hennion M.-C. On-line sample handling strategies for the trace-level determination of pesticides and their degradation products in environmental waters. // *Anal. Chim. Acta.* – 1995. – V. 318. – P. 1 – 41.

77. Brouwer E.R., Kofman S., Brinkman U.A.T. Selected procedures for the monitoring of polar pesticides and related microcontaminants in aquatic samples. // *J. Chromatogr. A.* – 1995. – V. 703. – P. 167 – 190.

78. Kataoka H., Lord H., Yamamoto S. Development of automated in-tube SPME/LC/MS method for drug analysis. // *J. Microcol. Sep.* – 2000. – V. 12. – P. 493 – 500.

79. Koivunen M. E., Dettmer K., Vermeulen R., Bakke B., Gee Sh. J., Hammock B. D. Improved methods for urinary atrazine mercapturate analysis- Assessment of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and a novel liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) method utilizing online solid phase extraction (SPE). // *Anal. Chim. Acta.* – 2006. – V. 572. – P. 180 – 189.

80. Segura P.A., Gagnon C., Sauve S. A fully automated on-line preconcentration and liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the analysis of anti-infectives in wastewaters. // *Anal. Chim. Acta.* – 2007. – V. 604. – P. 147 – 157.

81. Zang X., Luo R., Song N., Chen T.K., Bozigian H. A novel on-line solid-phase extraction approach integrated with a monolithic column and tandem mass spectrometry for direct plasma analysis of multiple drugs and metabolites. // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 2005. – V. 19. – P. 3259 – 3268.

82. Friedrich G., Rose T., Wawkuszewski A., Kafert-Kasting S., Laube B., Arseniev L., Rissler K. Determination of Testosterone Metabolites in Rat Hepatocytes with and without Cryopreservation by On-Line SPE Column-Switching LC and MS Detection. // *Chromatographia*. – 2008. – V. 67. – P. 31 – 39.

83. Hongzhe T., Bingcheng Y., Wenna G., Yafeng G. Microcolumn Solid-phase Extraction Coupled Online to Capillary Liquid Chromatography Using a Valve Switching Technique. // *Chin. J. Anal. Chem.* – 2006. – V. 34. – P. 759 – 763.

84. Yin X., Frech W., Hoffmann E., Ludke C., Skole J. Mercury speciation by coupling cold vapour atomic absorption spectrometry with flow injection on-line preconcentration and liquid chromatographic separation. // *J. Anal. Chem.* – 1998. – V. 361. – P. 761 – 766.

85. Alonso M.C., Barcelo D. Stability study and determination of benzene- and naphthalenesulfonates following an on-line solid-phase extraction method using the new programmable field extraction system. // *Analyst*. – 2002. – V. 127. – P. 472 – 479.

86. Okuda T., Yamada S. High-performance liquid chromatography using on-line solid-phase extraction: determination of furosemide in human serum. // *J. Chromatogr. B*. – 1996. – V. 682. – P. 343 – 348.

87. Villasenor S.R. Matrix elimination in ion chromatography by "heart-cut" column-switching techniques. // *J. Chromatogr.* – 1992. – V. 602. – P. 155 – 161.

88. Supko J.G., Soglia J.R., Nair R.V. Assay for the quinocarmycin analog DX-52-1 in human plasma using high-performance liquid chromatography with automated column switching and low wavelength ultraviolet detection. // *J. Chromatogr. B*. – 1998. – V. 714. – P. 341 – 353.

89. Okuda T., Nakagawa Y., Motohashi M. Complete two-dimensional separation for analysis of acidic compounds in plasma using column-switching reversed-phase liquid chromatography. // *J. Chromatogr. B*. – 1999. – V. 726. – P. 225 – 236.

90. Cobo M., Silva M. Continuous solid-phase extraction and dansylation of low-molecular-mass amines coupled on-line with liquid chromatography and peroxyoxalate chemiluminescence-based detection. // *J. Chromatogr. A*. – 1999. – V. 848. – P. 105 – 115.

91. Ou J., Hu L., Hu L., Li X., Zou H. Determination of phenolic compounds in river water with on-line coupling bisphenol A imprinted monolithic precolumn with high performance liquid chromatography. // *Talanta*. – 2006. – V. 69. – P. 1001 – 1006.

92. Ye X., Kuklennyik Z., Needham L.L., Calafat A.M. Automated on-line column-switching HPLC-MS/MS method with peak focusing for the determination of nine environmental phenols in urine. // *Anal. Chem.*. – 2005. – V. 77. – P. 5407 – 5413.

93. Petrovic M., Tavazzi S., Barcelo D. Column-switching system with restricted access pre-column packing for an integrated sample cleanup and liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of alkylphenolic compounds and steroid sex hormones in sediment. // *J. Chromatogr. A*. – 2002. – V. 971. – P. 37 – 45.

94. van der Hoeven R.A.M., Hofte A.J.P., Frenay M., Irth H., Tjarden U.R., van der Greef J., Rudolphi A., Boos K.-S., Varga G.M., Edholm L.E. Liquid chromatography — mass spectrometry with on-line solid-phase extraction by a restricted access C18 precolumn for a direct plasma and urine injection. // *J. Chromatogr. A*. – 1997. – V. 762. – P. 193 – 200.

95. Другов Ю.С., Березкин В.Г. Газохроматографический анализ загрязненного воздуха. М.: Химия. – 1981. – 256 с.

96. Шпигун О.А., Золотов Ю.А. Ионная хроматография. М.: Издательство МГУ. – 1990. – 199 с.

97. Золотов Ю.А., Кимстач В.А., Кузьмин Н.М., Нейман Е.Я., Попов А.А., Ревельский И.А. Концепция химико-аналитического контроля объектов окружающей среды // *Росс. Хим. Журн.* – 1993. – Т. 37. – С. 20 – 29.

98. Ревельский И.А., Йорк Х., Золотов Ю.А. Методология экспрессного эколого-аналитического контроля органических соединений / Международный Симпозиум «Хроматография и масс-спектрометрия в анализе окружающей среды», Ст. Петербург, Россия, 3-7 октября 1994 г. – С. 44.

99. Тессман А.Б., Иванов А.В., Вакштейн М.С., Нестеренко П.Н. Влияние ионной силы и присутствия слабого основания на профиль градиента рН в хроматофокусировании. // *Журн. физич. химии*. – 2001. – Т. 75. – № 2. – С. 342 – 347.

100. Masque N., Marce R.M., Borrull F. New polymeric and other types of sorbents for solid phase extraction of polar organic micropollutants from environmental water. // Trends Anal. Chem. – 1998. – V. 17. – № 6. – P. 384 – 394.
101. Mijangos K., Navarro A. Parametric analysis of phenol adsorption onto polymeric adsorbents. // J. Chem. Eng. Data. – 1995. – V. 40. – P. 875 – 879.
102. Tsyurupa M.P., Ilyin M.M., Andreeva A.I., Davankov V.A. Use of the hypercrosslinked polystyrene "Styrosorb" for solid phase extraction of phenols from water. // Fresenius J. Anal. Chem. – 1995. – V. 352. – P.672 – 675.
103. Когановский А.М., Клименко Н.А., Левченко Т.М., Рода И.Г. / Адсорбция органических веществ из воды. Л.: Химия. – 1990. – 256 с.
104. Белякова Л.Д., Волочук А.М., Воробьева Л.М., Ларионова О.А., Ларионов О.Г. // Журн. физ. химии. – 1995. – Т. 69. – № 3. – С. 501 – 505.
105. Белякова Л.Д., Василевская О.В., Цюрупа М.П., Даванков В.А. Адсорбционные и хроматографические свойства микросферических полимерных сорбентов типа «Стиросорб». // Журн. физ. химии. – 1996. – Т. 70. №8. – С. 1476.
106. Филиппов О.А., Тихомирова Т.И., Цизин Г.И., Золотов Ю.А. Динамическое концентрирование органических веществ на неполярных сорбентах // Журн. аналит. химии. – 2003. – № 5. – С. 454.
107. Иванов А.В., Курек Д.В., Вакштейн М.С., Баюнов А.П. Градиент ионной силы при хроматофокусировании в карбоксильных колонках. // Вестн. Моск. ун-та. Серия 2. Химия. – 2007. – Т. 48. – № 4. – С. 250 – 256.
108. Puig D., Barcelo D. // Trends Anal. Chem. – 1996. – V. 15. – P. 362.
109. Caro E., Marcé R. M., Cormack P. A. G., Sherrington D. C., Borrull F. // J. Chromatogr. A. – 2003. – V. 995. – P. 233.
110. Masque N., Galia M., Marce R. M., Borrull F. // J. Chromatogr. A. – 1997. – V. 771. – P. 55.
111. Foley J., Dorsey J.G. // Chromatographia. – 1984. – V. 18. – P. 503.
112. Hubaux A., Vos G. // Anal. Chem. – 1970. – V. 42. – P. 849.
113. Inczedy J., Lengyel T., Ure A. IUPAC Compendium of Analytical Nomenclature: Definitive Rules 1997. Blackwell Science, Inc.; 3rd edition. – 1998. – 964 p.

## 7. ПРИЛОЖЕНИЯ

**УТВЕРЖДАЮ**  
Зам. декана Химического факультета  
МГУ им. М.В.Ломоносова  
\_\_\_\_\_ А.В.Анисимов  
20 мая 2011 г.

**АКТ № 1**  
изготовления лабораторных образцов  
в рамках работ по государственному контракту  
от 20 сентября 2010 г № 14.740.11.0365

Мы, нижеподписавшиеся, профессор кафедры аналитической химии Дмитриенко Станислава Григорьевна и заведующий кафедрой аналитической химии Золотов Юрий Александрович

составили настоящий акт о том, что

в рамках работ по государственному контракту от 20 сентября 2010 г. № 14.740.11.0365 синтезированы одиннадцать лабораторных образцов новых наноструктурированных сорбентов массой 3 г каждого на основе акриламида с отпечатками кверцетина для концентрирования этого соединения и других флавоноидов. Эти сорбенты обеспечивают селективное извлечение целевых компонентов из растворов на 90 – 95%.

Профессор кафедры  
аналитической химии

\_\_\_\_\_ С.Г.Дмитриенко

Заведующий кафедрой  
аналитической химии

\_\_\_\_\_ Ю.А.Золотов

**УТВЕРЖДАЮ**  
Зам. декана Химического факультета  
МГУ им. М.В.Ломоносова  
\_\_\_\_\_ А.В.Анисимов  
20 мая 2011 г.

**АКТ № 2**  
разработки методики  
в рамках работ по государственному контракту  
от 20 сентября 2010 г № 14.740.11.0365

Мы, нижеподписавшиеся, профессор кафедры аналитической химии Дмитриенко Станислава Григорьевна и заведующий кафедрой аналитической химии Золотов Юрий Александрович

составили настоящий акт о том, что

в рамках работ по государственному контракту от 20 сентября 2010 г. № 14.740.11.0365 разработана методика сорбционно-спектрофотометрического определения 4-диметиламинобензальдегида, 4-диметиламинокоричного альдегида и ванилина в фармпрепаратах и пищевом сырье с пределом обнаружения на уровне 0,2 – 1,8 мкг/мл, обеспечивающая определение целевых веществ с величиной относительной погрешности 3 – 5 %.

Профессор кафедры  
аналитической химии

\_\_\_\_\_ С.Г.Дмитриенко

Заведующий кафедрой  
аналитической химии

\_\_\_\_\_ Ю.А.Золотов

**УТВЕРЖДАЮ**  
Зам. декана Химического факультета  
МГУ им. М.В.Ломоносова  
\_\_\_\_\_ А.В.Анисимов  
20 мая 2011 г.

**АКТ № 3**  
разработки методики  
в рамках работ по государственному контракту  
от 20 сентября 2010 г № 14.740.11.0365

Мы, нижеподписавшиеся, доцент кафедры аналитической химии Иванов Александр Вадимович и заведующий кафедрой аналитической химии Золотов Юрий Александрович

составили настоящий акт о том, что

в рамках работ по государственному контракту от 20 сентября 2010 г. № 14.740.11.0365 разработана методика полупрепаративного разделения изоформ формиатдегидрогеназы для получения очищенных активной формы формиатдегидрогеназы при содержании в исходной смеси на уровне 0,5 – 1 мг/мл, обеспечивающая достижение разрешения хроматографических пиков не ниже 1,5 и получение пиков шириной не более 0,3 ед. рН.

Доцент кафедры  
аналитической химии

\_\_\_\_\_ А.В.Иванов

Заведующий кафедрой  
аналитической химии

\_\_\_\_\_ Ю.А.Золотов

**УТВЕРЖДАЮ**  
Зам. декана Химического факультета  
МГУ им. М.В.Ломоносова  
\_\_\_\_\_ А.В.Анисимов  
20 мая 2011 г.

**АКТ № 4**  
разработки методики  
в рамках работ по государственному контракту  
от 20 сентября 2010 г № 14.740.11.0365

Мы, нижеподписавшиеся, ведущий научный сотрудник лаборатории концентрирования кафедры аналитической химии Цизин Григорий Ильич и заведующий кафедрой аналитической химии Золотов Юрий Александрович

составили настоящий акт о том, что

в рамках работ по государственному контракту от 20 сентября 2010 г. № 14.740.11.0365 разработана методика автоматизированного проточного сорбционно-жидкостно-хроматографического определения фенола и хлорофенолов в питьевой и природных водах, обеспечивающая определение целевых веществ с пределом обнаружения на уровне ПДК и ниже.

Ведущий научный сотрудник  
лаборатории концентрирования  
кафедры аналитической химии

\_\_\_\_\_ Г.И.Цизин

Заведующий кафедрой  
аналитической химии

\_\_\_\_\_ Ю.А.Золотов

**УТВЕРЖДАЮ**

Зам. декана Химического факультета  
МГУ им. М.В.Ломоносова

\_\_\_\_\_ А.В.Анисимов

20 мая 2011 г.

**АКТ № 5**

разработки методики  
в рамках работ по государственному контракту  
от 20 сентября 2010 г № 14.740.11.0365

Мы, нижеподписавшиеся, ведущий научный сотрудник лаборатории концентрирования кафедры аналитической химии Ревельский Игорь Александрович и заведующий кафедрой аналитической химии Золотов Юрий Александрович

составили настоящий акт о том, что

в рамках работ по государственному контракту от 20 сентября 2010 г. № 14.740.11.0365 разработана методика определения суммарного содержания галоид-, серо- и фосфорсодержащих соединений в воде, обеспечивающая определение суммарного содержания целевых веществ с пределом обнаружения 0,001 – 0,005 мкг/л.

Ведущий научный сотрудник  
лаборатории концентрирования  
кафедры аналитической химии

\_\_\_\_\_ И.А.Ревельский

Заведующий кафедрой  
аналитической химии

\_\_\_\_\_ Ю.А.Золотов

**УТВЕРЖДАЮ**

Зам. декана Химического факультета  
МГУ им. М.В.Ломоносова  
\_\_\_\_\_ Н.Е.Кузьменко  
20 мая 2011 г.

**АКТ № 6**

внедрения результатов НИР в учебный процесс  
в рамках работ по государственному контракту  
от 20 сентября 2010 г № 14.740.11.0365

Мы, нижеподписавшиеся, профессор кафедры аналитической химии Шеховцова  
Татьяна Николаевна и заведующий кафедрой аналитической химии Золотов  
Юрий Александрович

составили настоящий акт о том, что

в рамках работ по государственному контракту от 20 сентября 2010 г. №  
14.740.11.0365 по специализации «аналитическая химия» разработан новый  
лекционный курс «Биоэлектрокатализ, электроаналитические системы,  
электроактивные полимеры» объемом 10 ч для студентов IV курса Химического  
факультета МГУ имени М.В.Ломоносова.

Профессор  
кафедры аналитической химии

\_\_\_\_\_ Т.Н.Шеховцова

Заведующий кафедрой  
аналитической химии

\_\_\_\_\_ Ю.А.Золотов

**УТВЕРЖДАЮ**

Зам. декана Химического факультета  
МГУ им. М.В.Ломоносова  
\_\_\_\_\_ Н.Е.Кузьменко  
20 мая 2011 г.

**АКТ № 7**

внедрения результатов НИР в учебный процесс  
в рамках работ по государственному контракту  
от 20 сентября 2010 г № 14.740.11.0365

Мы, нижеподписавшиеся, профессор кафедры аналитической химии Шеховцова  
Татьяна Николаевна и заведующий кафедрой аналитической химии Золотов  
Юрий Александрович

составили настоящий акт о том, что

в рамках работ по государственному контракту от 20 сентября 2010 г. №  
14.740.11.0365 в рамках специализации «аналитическая химия» разработана новая  
задача для спецпрактикума «Проточное сорбционно-атомно-абсорбционное  
определение элементов и их форм в водах» объемом 4 ч для студентов IV курса  
Химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова.

Профессор  
кафедры аналитической химии

\_\_\_\_\_ Т.Н.Шеховцова

Заведующий кафедрой  
аналитической химии

\_\_\_\_\_ Ю.А.Золотов