

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

УДК 543

№ госрегистрации 01201064162

Инв.№ 0365-4

УТВЕРЖДАЮ

Зам. декана по научной работе

д-р хим. наук, профессор

_____ А.А.Бучаченко

« » 2012 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: «Разработка оригинальных аналитических методов
медицинской диагностики и оценки лекарственных препаратов»
(промежуточный, этап № 4)

Руководитель НИР
заведующий кафедрой аналитической химии
академик РАН

Ю.А.Золотов

Москва 2012

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, раздел 2.1)
Исполнители: проф.	_____	Дмитриенко Станислава Григорьевна	(разделы 1.1.1, 2.1, 2.2)
проф.	_____	Моросанова Елена Игоревна	разделы (1.1.1. и 2.2)
г.н.с.	_____	Цизин Григорий Ильич	(разделы 2.4 и 2.5)
с.н.с.	_____	Тихомирова Татьяна Ивановна	(разделы 1.1.4. и 2.2)
в.н.с.	_____	Плетнев Игорь Владимирович	разделы (1.1.2. и 2.3)
в.н.с.	_____	Ревельский Игорь Александрович	(разделы 1.1.4. и 2.5)
в.н.с.	_____	Ревельский Александр Игоревич	(разделы 1.1.4. и 2.5)
проф.	_____	Карякин Аркадий Аркадьевич	(разделы 1.1.3. и 2.4)
в.н.с.	_____	Беклемишев Михаил Константинович	(разделы 1.1.4. и 2.5)
в.н.с.	_____	Алов Николай Викторович	(разделы 1.1.4. и 2.5)
проф.	_____	Шпигун Олег Алексеевич	(разделы 1.1.3. и 2.4)
доц.	_____	Иванов Александр Вадимович	(разделы 1.1.3. и 2.5)
с.н.с.	_____	Ананьева Ирина Алексеевна	(разделы 1.1.3. и 2.5)
в.н.с.	_____	Пирогов Андрей Владимирович	(разделы 1.1.3. и 2.5)
в.н.с.	_____	Смоленков Александр Дмитриевич	(разделы 1.1.3. и 2.5)
с.н.с.	_____	Статкус Михаил Александрович	(разделы 1.1.2 и 2.4)
н.с.	_____	Апяри Владимир Владимирович	(разделы 1.1.1 и 2.2)
с.н.с.	_____	Родин Игорь Александрович	разделы (1.1.3. и 2.4)
н.с.	_____	Затираха Александра Валерьевна	(разделы 1.1.1. и 2.2)
м.н.с.	_____	Прохорова Александра Федоровна	(разделы 1.1.3. и 2.4)
ассистент	_____	Кубышев Сергей Сергеевич	(разделы 1.1.3. и 2.4)

инж.		Кочук Елена Валентиновна	(разделы 1.1.1. и 2.2)
асп.		Федосеева Марина Владиславовна	(раздел 2.5)
асп.		Гуляев Иван Владимирович	(разделы 1.1.4. и 2.5)
асп.		Самохин Андрей Сергеевич	(разделы 1.1.4. и 2.5)
асп.		Голубева Александра Владимировна	(разделы 1.1.4. и 2.5)
асп.		Терещенкова Анна Александровна	(разделы 1.1.2. и 2.3)
асп.		Беляков Михаил Владимирович	(разделы 1.1.2. и 2.3)
асп.		Ржевская Александра Вячеславовна	(разделы 1.1.3. и 2.4)
асп.		Буслова Татьяна Сергеевна	(разделы 1.1.2. и 2.3)
асп.		Мясникова Дина Андреевна	(разделы 1.1.2. и 2.3)
асп.		Федюнина Наталья Николаевна	(разделы 1.1.3. и 2.4)
асп.		Елфимова Яна Андреевна	(разделы 1.1.2. и 2.3)
асп.		Браун Аркадий Владимирович	разделы (1.1.1. и 2.2)
асп.		Кузнецова Ольга Игоревна	(разделы 1.1.2. и 2.3)
асп.		Соколова Лидия Сергеевна	(разделы 1.1.2. и 2.3)
асп.		Ставрианиди Андрей Николаевич	(разделы 1.1.2. и 2.3)
студ.		Бескорвайный Александр Васильевич	(разделы 1.1.4. и 2.5)
студ.		Копицын Дмитрий Сергеевич	(разделы 1.1.4. и 2.5)
студ.		Борисова Дина Рашидовна,	(разделы 1.1.1. и 2.2)
студ.		Дубенский Александр Сергеевич	(разделы 1.1.1. и 2.2)
студ.		Архипова Виктория Владиславовна	(разделы 1.1.1. и 2.2)
студ.		Атнагулов Айдар Газинурович	(разделы 1.1.1. и 2.2)
студ.		Толмачева Вероника Владимировна	(разделы 1.1.1. и 2.2)
студ.		Горбунова Мария Владимировна	(разделы 1.1.1. и 2.2)
студ.		Мухаринова Александра Игоревна	(разделы 1.1.1. и 2.2)
студ.		Костромских Анастасия Андреевна	(разделы 1.1.3. и 2.4)

студ.	_____	Назаренко Дмитрий Владимирович	разделы (1.1.1. и 2.2)
студ.	_____	Шаранов Павел Юрьевич	(разделы 1.1.1. и 2.2)
студ.	_____	Лазов Михаил Александрович	(разделы 1.1.3. и 2.4)
нормоконтролер	_____	Барбалат Юрий Александрович	

РЕФЕРАТ

Отчет 104 с., 27 рис., 22 табл., 98 источников.

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

Этап № 4. Разработка оригинальных аналитических методов медицинской диагностики и оценки лекарственных препаратов.

Ключевые слова: ИОННЫЕ ЖИДКОСТИ, БИОСЕНСОРЫ, ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА, МЕДИЦИНСКАЯ ДИАГНОСТИКА

Объектом исследования и разработки являются новые способы и устройства (в том числе на основе ионных жидкостей и биосенсоров) для определения физиологически активных органических веществ, а также методики определения этих веществ в разнообразных объектах.

Цель работы – разработка новых способов и устройств (в том числе на основе ионных жидкостей и биосенсоров) для определения физиологически активных органических веществ, их мониторинга; разработка современных методов анализа пищевых продуктов, косметической продукции, биологических жидкостей.

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

Разработана методика концентрирования сульфаниламидов и метилксантинов из растворов, биологических жидкостей и жидких пищевых продуктов, обеспечивающая степень извлечения целевых веществ не менее 95 %.

Разработаны методики определения ионогенных ПАВ в косметической продукции, органических кислот и катехоламинов в лекарственных препаратах, обеспечивающие определение целевых веществ с пределами обнаружения не выше 10^{-5} - 10^{-6} М.

Предложены биосенсоры для определения лактата в водных растворах. Разработана методика определения лактата в конденсате выдыхаемого воздуха, обеспечивающая определение целевого вещества с пределом обнаружения не более 1×10^{-7} М, относительное стандартное отклонение - не более 0,05.

Предложен способ регистрации воспроизводимых масс-спектров MALDI (с матричной лазерной десорбционной ионизацией) для низкомолекулярных фармацевтических веществ, обеспечивающий получение воспроизводимых спектров при содержании целевых компонентов не выше 10^{-7} г.

Степень внедрения – методики определения токсичных веществ в водах 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 защищена 1 докторская и 3 кандидатских диссертации, опубликована 21 статья в высокорейтинговых журналах, разработан новый лекционный курс «Тест методы анализа смесей органических соединений» и новая задача для спецпрактиума «Определение фенолов в сточных и природных водах с предварительным сорбционным концентрированием с амперометрическим детектированием» (для студентов IV курса химического факультета МГУ).

СОДЕРЖАНИЕ

	Страница
1. ВВЕДЕНИЕ	7
1.1. Оценка современного состояния решаемой проблемы (Разработка оригинальных аналитических методов медицинской диагностики и оценки лекарственных препаратов)	8
1.1.1. Разработка методики концентрирования сульфаниламидов и метилксантинов из растворов	8
1.1.2. Разработка методик определения ионогенных ПАВ в косметической продукции, органических кислот и катехоламинов в лекарственных препаратах	11
1.1.3. Разработка методики определения лактата в конденсате выдыхаемого воздуха	15
1.1.4. Разработка способа регистрации воспроизводимых масс-спектров MALDI (с матричной лазерной десорбционной ионизацией) для низкомолекулярных фармацевтических веществ	22
1.1.5. Выводы к обзору литературы	28
2. ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	29
2.1. Выбор направления исследований, методы решения задач	29
2.2. Разработка методики концентрирования сульфаниламидов и метилксантинов из растворов	37
2.3. Разработка методик определения ионогенных ПАВ в косметической продукции, органических кислот и катехоламинов в лекарственных препаратах	50
2.4. Разработка методики определения лактата в конденсате выдыхаемого воздуха	57
2.5. Разработка способа регистрации воспроизводимых масс- спектров MALDI (с матричной лазерной десорбционной ионизацией) для низкомолекулярных фармацевтических веществ	63
3. СТАТИСТИЧЕСКИЕ И ФАКТОГРАФИЧЕСКИЕ СВЕДЕНИЯ О НАУКОМЕТРИЧЕСКИХ РЕЗУЛЬТАТАХ	77

ВЫПОЛНЕНИЯ ГОСУДАРСТВЕННОГО КОНТРАКТА	
3.1. Статьи, опубликованные по результатам выполнения государственного контракта	77
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	80
3.5. Разработанные учебные курсы и задачи	82
3.6. Сравнение полученных результатов с техническими характеристиками, заявленными в Техническом задании государственного контракта	83
3.7. Индикаторы и показатели	83
4. ТЕХНИКО-ЭКОНОМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА РЫНОЧНОГО ПОТЕНЦИАЛА РЕЗУЛЬТАТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ НИР	85
5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	86
6. ЛИТЕРАТУРА	88
7. ПРИЛОЖЕНИЯ	97
7.1. Акты разработки методик, учебных курсов и учебных задач	98

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 методики концентрирования сульфаниламидов и метилксантинов из растворов

Анализ литературы указывает на то, что в последнее десятилетие идет активный поиск новых методов определения биологически активных веществ, таких, например, как сульфаниламиды и метилксантины в различных объектах: лекарственных препаратах, пищевых продуктах, биологических жидкостях, объектах окружающей среды.

Сульфаниламиды (СА) – производные *n*-аминобензолсульфаниловой кислоты, находят широкое применение в фармацевтической практике как эффективные химиотерапевтические антибактериальные средства. Благодаря широкому спектру фармакологического действия и низкой стоимости эти лекарственные препараты также широко используют в ветеринарии для профилактики и лечения различных заболеваний у животных. Так, например, в Европейском Союзе сульфаниламиды занимают второе место в ряду наиболее широко используемых ветеринарных антибиотиков [1]. Однако, попадая опосредованно в продукты питания (молоко, мясо, мед и др. продукты) остаточные количества сульфаниламидов при определенных концентрациях могут вызвать у людей дерматиты, нарушения обмена веществ, деятельности центральной нервной системы и другие заболевания [2].

В связи с неумеренным и часто неконтролируемым применением сульфаниламидных препаратов в животноводстве, в последнее время большое внимание уделяется разработке методов определения СА в продуктах питания [3 – 6]. Европейским Союзом утверждены предельно допустимые концентрации (ПДК) на остаточные количества сульфаниламидов в продуктах питания, которые составляют 100 нг/мл для жидких образцов (молоко) и 100 нг/г для твердых объектов (мясо, мед). Еще более жесткие требования к содержанию сульфаниламидов в продуктах питания в Японии: ПДК для этих веществ не должны превышать 20 нг/г [7]. Задачи обнаружения и определения СА возникают и при анализе объектов окружающей

среды на этапе контроля смывных вод, которому уделяется значительное внимание на современных фармацевтических предприятиях [8, 9], а также при анализе различных биологических образцов [10, 11].

Для определения сульфаниламидов используют хроматографические, иммунохимические, спектрофотометрические и другие методы анализа. Для повышения чувствительности определения и удаления мешающих компонентов матрицы в ряде работ предложено использовать твердофазную экстракцию (ТФЭ), однако эффективность концентрирования этих полярных соединений на "традиционных" сорбентах таких, например, как химически модифицированные кремнеземы, оказалась невысокой. Круг сорбентов, используемых для выделения и концентрирования СА, ограничен преимущественно гидрофильным полимерным сорбентом Oasis HLB – сополимером дивинилбензола и винилпирролидона [12 – 15]. В связи с этим представляется актуальным расширение ассортимента сорбентов, позволяющих количественно осуществлять групповое концентрирование сульфаниламидов.

Метилксантины, важнейшими представителями которых являются кофеин, теофиллин и теобромин, широко распространены в природе и играют важную роль в биологических процессах [16]. Интерес, проявляемый в последние пятнадцать лет к разработке методов определения метилксантинов в различных объектах, объясняется важностью этих соединений для пищевой промышленности, фармакологии, клинической и спортивной медицины, токсикологии, экологического контроля. Кофеин, теофиллин и теобромин часто определяют в продуктах питания, таких как кофе, чай, шоколад, различных тонизирующих напитках [17 – 19]. Среднее потребление кофеина взрослыми людьми составляет в сутки от 1 до 829 мг. Столь большое ежедневное потребление и обилие кофеина в пищевых продуктах привело к тому, правительства многих стран обратили внимание на эту небезопасную тенденцию. В США Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (the Food and Drug Administration) установило максимально допустимое содержание кофеина в энергетических напитках, равное 200 мг/л [20], что в значительной степени стимулировало появление соответствующих исследований.

Анализ биологических жидкостей на содержание метилксантинов проводят с целью оценки эффективности терапевтического лечения этими препаратами, поскольку диапазон между лечебной и токсической концентраций для них достаточно узок [21, 22]. Например, теофиллин оказывает лечебный эффект при содержании его в сыворотке крови 10 – 20 мкг/мл, а уже при его концентрации свыше 20 мкг/мл начинает оказывать токсическое действие. Международный олимпийский комитет считает, что спортсмен употребляет стимулятор, если концентрация кофеина в моче составляет более 12 мкг/мл, а его основного метаболита теофиллина – 5 мкг/мл.

Информация о концентрациях метаболитов кофеина и других метилксантинов в организме человека – важное звено в построении метаболомических профилей, позволяющих обнаружить врожденные и наследственные нарушения метаболизма и более точно диагностировать диабет, патологии печени и ряд других заболеваний [23, 24].

Очень важно определять низкие количества кофеина и в водах, поскольку он является своеобразным индикатором, позволяющим следить за качеством коммунально-бытовых сточных вод [25, 26].

Достоверность идентификации метилксантинов и правильность полученных количественных результатов во многом зависят от выбора метода пробоподготовки и рационального сочетания его с методом последующего определения. Сложная проблема, с которой часто сталкиваются в процессе пробоподготовки объектов, содержащих метилксантины, связана с высокой гидрофильностью этих соединений ($\lg P = -1.1 \div 0.3$), вследствие которой эффективность концентрирования оказывается невысокой. Среди различных методов, предложенных в последнее время для выделения и концентрирования метилксантинов, наиболее перспективным является твердофазная экстракция, однако большинство опубликованных работ ориентировано на решение чисто прикладных задач, а круг используемых сорбентов невелик и ограничивается в основном силикагелями, модифицированными гидрофобными алкильными группами [22, 26] и полимерным сорбентом Oasis HLB [21, 25]. Для обоснованного выбора сорбентов для ТФЭ таких полярных соединений, как метилксантины, необходимы количественные данные, характеризующие сорбционный процесс, которые практически отсутствуют. В связи с этим представляется актуальным как расширение круга сорбентов, позволяющих

количественно выделять и концентрировать метилксантины, так и поиск новых комбинаций сочетания сорбционного концентрирования этих соединений и их последующего определения.

1.1.2. Разработка методик определения ионогенных ПАВ в косметической продукции, органических кислот и катехоламинов в лекарственных препаратах

В последние годы наметилось повышенное внимание исследователей к поиску новых индивидуальных веществ и разнообразных композиционных материалов, обладающих комплексом физико-химических свойств, позволяющих разрабатывать новые подходы к определению различных веществ в широком круге объектов.

Особый интерес с этой точки зрения вызывают ионные жидкости (ИЖ) – расплавы солей, жидкие при комнатной или близкой температуре. Уникальность ИЖ как индивидуальных соединений обусловлена комплексом таких свойств, как сочетание гидрофобности и ионного характера, термической устойчивости и высокой электропроводности, причём подбор катиона и аниона позволяет регулировать данные свойства в широких пределах. Негорючесть, пренебрежимо малое давление паров и высокая гидрофобность ИЖ практически исключает их попадание в окружающую среду; нетоксичность обуславливает принадлежность ИЖ к классу растворителей, отвечающих современным экологическим требованиям, что позволяет использовать их в «зелёной» химии.

В последнее десятилетие отмечен возрастающий интерес к данному классу веществ, чаще появляются публикации, посвящённые использованию ИЖ в органическом синтезе, катализе, электрохимии, при разработке новых композиционных материалов. В то же время примеры использования ИЖ в аналитической химии, например, для определения ионогенных ПАВ в косметической продукции, органических кислот и катехоламинов в лекарственных препаратах, пока сравнительно немногочисленны.

Можно выделить ряд свойств, которые делают привлекательным использование ионных жидкостей в электрохимии. Сюда следует отнести ионную проводимость, вязкость, экстракционные и пластифицирующие свойства, гидрофобность и ширину электрохимического «окна».

Гидрофобность ИЖ, в основном, определяется анионом. Если в состав ИЖ входят гидрофильные анионы, то ИЖ могут смешиваться с водой в любых соотношениях, при этом наблюдается зависимость физических свойств ИЖ от количества воды, содержащейся в ИЖ. С другой стороны, такие анионы, как PF_6^- и Tf_2N^- , дают гидрофобные ИЖ, практически не смешивающиеся с водой, и удаление воды из них в меньшей степени влияет на их свойства.

Многие ИЖ, нерастворимые в воде, гигроскопичны и способны поглощать воду из атмосферы. Изучение ИЖ с различными анионами показало, что молекулы воды существуют в ИЖ в виде Н-связанных комплексов вида: анион – НОН – анион [27]. Присутствие воды оказывает определяющее влияние на реакционную способность субстратов при использовании ИЖ в качестве реакционной среды во многих процессах синтеза (например, в биотехнологии). Установлено, что на взаимную растворимость ИЖ и воды оказывает влияние, как длина алкильного радикала, так и температура [28, 29]. В ряде работ, выполненных в нашей научной группе, изучали растворимость имидазолиевых ИЖ. Отчетливо проявляется влияние на растворимость природы аниона. Так, гидрофобность анионов растет в ряду $\text{PF}_6^- < \text{Tf}_2\text{N}^- < (\text{CF}_3\text{CF}_2)_3\text{PF}_3^-$, в этой же последовательности понижается растворимость ИЖ. Например, замена Tf_2N^- на $(\text{CF}_3\text{CF}_2)_3\text{PF}_3^-$ при сохранении такого же катиона $\text{C}_1\text{C}_6\text{Im}^+$ приводит к понижению растворимости более чем в 20 раз.

Под электрохимическим «окном» принято понимать разницу между предельным анодным и катодным потенциалами окислительно-восстановительного процесса фонового электролита [30]. Данное свойство характеризует электрохимическую устойчивость катиона и аниона ИЖ, что, в свою очередь, определяет диапазон потенциалов, доступных для электрохимических измерений. Очевидно, что чем шире электрохимическое «окно», тем универсальнее ИЖ. Основное влияние на электрохимическое «окно» оказывает природа составляющих ионов. Также на значения предельных потенциалов влияют материал индикаторного электрода, условия измерения и чистота ионной жидкости.

Ионные жидкости могут играть роль пластификаторов для полимеров, тем самым улучшая их свойства: повышается термическую стабильность, снижается температура стеклования. Известно, что ИЖ на основе катиона имидазолия отлично пластифицируют полиметилметакрилат (ПММА). При этом по сравнению с

традиционными пластификаторами наблюдается более высокая термическая стабильность, температура стеклования снижается до 0⁰С, низкая летучесть, и как следствие, продлевается срок эксплуатации материала [31]. Установлены пластифицирующие свойства для ИЖ на основе катиона четвертичного фосфония $(C_{12}H_{25})(C_2H_5)(C_6H_5)_2P^+Tf_2N^-$ по отношению к поливинилхлориду и полиметилметакрилату [32]. По физическим характеристикам полимеры, пластифицированные ионными жидкостями, сопоставимы с полимерами, пластифицированными традиционными пластификаторами (например, диоктилфталатом), но следует отметить гораздо более высокую термическую стабильность таких материалов.

Можно выделить следующие направления использования ИЖ в электроанализе:

- в качестве органических электролитов, в том числе и для изучения электрохимических процессов, реализовать которые в обычных растворителях затруднительно;
- при разработке композиционных материалов, для создания электрохимических сенсоров (токопроводящие полимеры, полупроницаемые мембраны, проводящие гели и т.д.);
- для модифицирования электродов ионными жидкостями или материалами на их основе.

В последнее время появляется все больше публикаций по применению ионных жидкостей в вольтамперометрии благодаря целому ряду ценных свойств. В одной из ранних работ [33] электропревращения редокс-пары $[Fe^{III}(CN)_6]^{3-} / [Fe^{II}(CN)_6]^{4-}$ были осуществлены в среде 1-метил-3-[2,6-(S)-диметилпикто-2-ил]имидазолия тетрафторбората для изучения перераспределения гидрофильных ионов между водой и ионной жидкостью. Было найдено, что распределение зависит от типа иона, силы его взаимодействия с ионной жидкостью и концентрацией фонового электролита.

В настоящее время проводятся исследования по использованию ИЖ в аналитических методах в качестве сред для изучения сложных электрохимических процессов. В литературе описан метод циклической вольтамперометрии на графитовом электроде для определения бис-фталоцианина лютеция в среде ионной жидкости [34]. Бромид тетраоктилфосфония использовался в качестве органического электролита. Показано, что восстановление бис-фталоцианина лютеция

сопровождается образованием ионных пар между восстановленной формой фталоцианина Lu(III) и катиона ИЖ, и окислительных форм Lu(III) фталоцианина с анионом галогенида. В результате подобных ассоциаций повышается реакционная способность частиц, а также исключаются возможности взаимодействия с водой.

ИЖ также используются в качестве матриц в сочетании с различными соединениями: полимерами, целлюлозой, углеродными нанотрубками.

Использование ионных жидкостей в потенциометрии не столь широко, как в случае вольтамперометрии.

Была показана возможность применения ионной жидкости в ионометрии. Гексафторфосфат 1-бутил-3-метилимидазолия использовали в качестве ионногенной добавки пластифицированной мембраны ПВХ-электрода на сульфат-ион, улучшающей диэлектрическую проводимость [35].

В работах, выполняемых в нашей научной группе, ионные жидкости использовались в качестве электродноактивных компонентов [32, 36, 37] мембран жидкостной и твердотельной конструкции. В работе [32] предложили использовать ИЖ $\text{BMIIm}^+\text{PF}_6^-$, $\text{BDMIIm}^+\text{Tf}_2\text{N}^-$ и додецилдифенилэтлфосфония бистрифлиламид $\text{DEDPP}^+\text{Tf}_2\text{N}^-$ в качестве компонентов пластифицированных полимерных мембран ИСЭ с жидкостным заполнением. Изучено 18 различных комбинаций ИЖ и полимеров. Показано, что многие сенсоры на основе ИЖ обладают широким интервалом pH-функционирования, хорошей воспроизводимостью, малым временем отклика (менее 20 с). Мембрана на основе $\text{BDMIIm}^+\text{Tf}_2\text{N}^-$ - ПММА демонстрировала чувствительность к катионным ПАВ. Так в растворах хлорида цетилпиридиния был получен близкий к теоретическому катионный отклик (56 ± 3 мВ/рС). Мембрана $\text{DEDPP}^+\text{Tf}_2\text{N}^-$ - ПВХ демонстрирует близкий к нернстовскому отклик и к катионам, и к анионам с поверхностно-активными свойствами.

Продолжением предыдущего исследования является работа [36], в которой гели на основе вышеприведенных ИЖ наносили на поверхность планарного печатного электрода. Но, к сожалению, во всех случаях полученные датчики отличались от соответствующих ИСЭ с жидкостным заполнением в худшую сторону. Тем не менее, полученные твердоконтактные датчики обладали малым временем отклика, высокой чувствительностью и хорошей селективностью. Пределы

обнаружения цетилпиридиний хлорида и додецилсульфата составляют 5,8 и 1,2 мкг/мл, соответственно.

Исследовали ИЖ с катионами замещенных имидазолия, пиридиния, пирролидиния и гидрофобными фторсодержащими анионами в качестве электродноактивных компонентов пластифицированных мембран ИСЭ на катионные ПАВ. Предложенные ИСЭ проявляют потенциометрический отклик к катионам бензиламмония, тетрадецилтриметиламмония, цетилтриметиламмония, при этом крутизна электродной функции близка к теоретической, предел обнаружения не выше $n \cdot 10^{-6} \text{M}$.

Твердотельные планарные электроды обладают рядом преимуществ по сравнению с традиционными ИСЭ с пластифицированными ПВХ-мембранами, наиболее часто используемыми потенциометрии:

миниатюрность конструкции (10×28 мм)

малые объемы анализируемых проб (до 50 мкл)

не нужны: полимерное связующее, пластификатор, летучий растворитель

простой процесс получения ИСЭ на их основе (занимает 5 – 10 минут)

ИЖ может играть роль инертной матрицы, позволяя иммобилизовать электродноактивный компонент.

В работе [37] изучены ионные жидкости TOA^+BSB^- , TNA^+BSB^- и $\text{TOMA}^+\text{BSB}^-$, твердые при комнатной температуре, как электродноактивные соединения ИСЭ для определения ионов в водных растворах. Было проведено сравнение электрохимических характеристик жидкостного и твердотельного ИСЭ на основе данных ИЖ, которое показало, что твердотельные электроды ничуть не уступают по характеристикам электродам с пластифицированной мембраной. Характерны малое время отклика (~ 10 с), хорошая воспроизводимость. Для улучшения селективности твердотельного электрода на иодид-ион ИЖ TOA^+BSB^- использовали как матрицу для активного компонента тетра-трет-бутил-фталоцианин хлорид алюминия(III). В результате наблюдалась анти-Гофмейстерская селективность по отношению к иодиду.

1.1.3. Разработка методики определения лактата в конденсате выдыхаемого воздуха

Лактат, соль молочной кислоты ($CH_3CHOHCOOH$), участвует в обмене веществ у практически всех живых организмов и является конечным продуктом тканевого обмена глюкозы при нехватке кислорода [38, 39]. Уровень лактата в крови и тканях организма изменяется во время физической нагрузки или при наличии ряда заболеваний, например, гипоксии тканей, дыхательной недостаточности, диабета или при возникновении и развитии опухолевых тканей. Таким образом, разработка высокочувствительных, надёжных и экспрессных методов мониторинга лактата представляет большой интерес для клинической диагностики. Особое внимание привлекает возможность определения лактата в конденсате выдыхаемого воздуха (КВВ), как неинвазивного метода исследования, появившегося относительно недавно вследствие тенденции перехода от анализа крови к неинвазивной диагностике, во время которой на ткани и сосуды не оказывается никакого воздействия с помощью хирургических инструментов, что исключает травматизм.

Для прямого определения уровня лактата в различных образцах было предложено множество методов, но большинство из них требуют долгого времени анализа, а другие слишком дороги и поэтому не используются широко. Биосенсоры же занимают одну из лидирующих позиций, так как специфичность фермента к своему субстрату позволяет проводить измерения непосредственно в образце без предварительной пробоподготовки, несмотря на сложность его состава, что значительно сокращает время анализа и повышает точность определения [40]. Кроме того, биосенсоры легко поддаются миниатюризации, их массовое производство обеспечивает высокую воспроизводимость и низкую стоимость.

Амперометрические биосенсоры на основе оксидаз. Сущность метода амперометрии состоит в измерении тока окисления или восстановления электроактивных частиц, то есть тока электролиза. В большинстве случаев в ходе эксперимента на единичном рабочем электроде (или на пучке электродов), задаётся постоянный потенциал относительно электрода сравнения, при котором происходит поляризация рабочего электрода. Наблюдаемый ток оказывается пропорционален либо объёмной концентрации электроактивных частиц, либо скорости её изменения в биокаталитическом слое. В качестве примера можно привести глюкозный биосенсор на основе берлинской лазури (рис. 1), обладающий на сегодняшний день наилучшими

аналитическими характеристиками [41]. Отклик биосенсора, включенного в проточно-инжекционную систему, представлен на рис. 2.

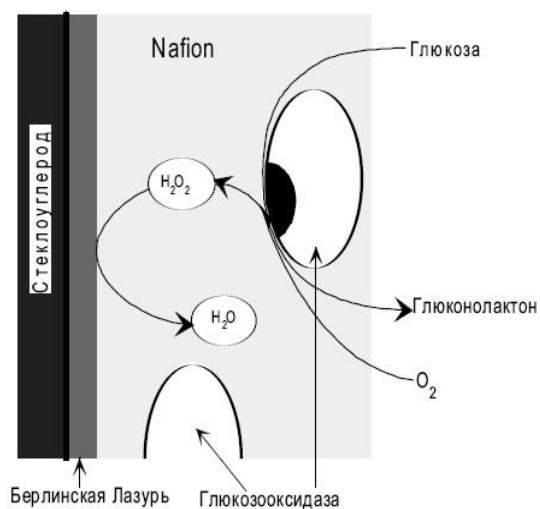


Рисунок 1 – Схема действия глюкозного биосенсора [41].

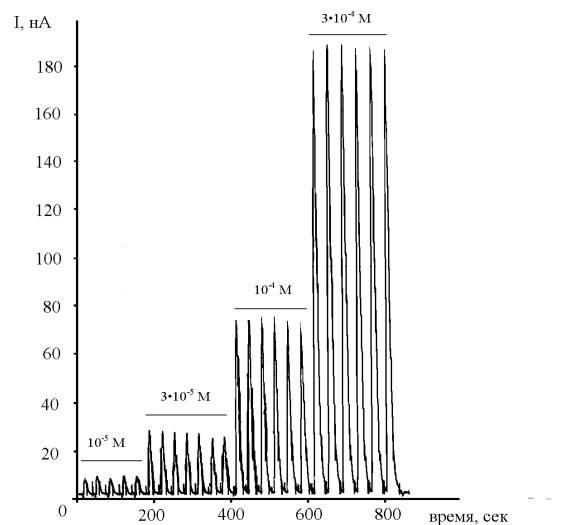
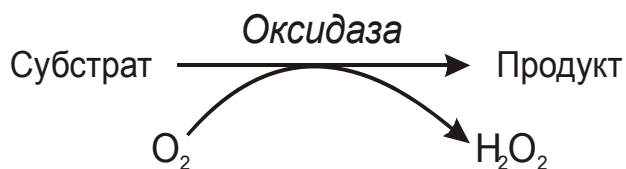


Рисунок 2 – Проточно-инжекционный анализ глюкозы [41].

Как и данный глюкозный биосенсор, более 90% всех биосенсоров с иммобилизованными ферментами основаны на действии оксидаз, которые окисляют свой специфический субстрат кислородом воздуха по следующей реакции:



При этом кислород восстанавливается до пероксида водорода. В основе действия биосенсоров на основе оксидаз лежит принцип детекции либо субстрата ферментативной реакции – кислорода, либо продукта – пероксида водорода. Это биосенсоры I поколения. Существуют также биосенсоры II поколения, в которых субстрат ферментативной реакции кислород заменяется на низкомолекулярный переносчик электронов – медиатор [42]. Таким образом, на сегодняшний день известно четыре принципа действия амперометрических глюкозных биосенсоров на основе оксидаз:

- 1) восстановление кислорода,
- 2) окисление пероксида водорода,
- 3) восстановление пероксида водорода,

4) использование медиатора.

Наиболее эффективным из перечисленных принципов действия биосенсоров является восстановление образующегося в ходе ферментативной реакции пероксида водорода. Благодаря низкому потенциалу такого способа детекции H_2O_2 удается снизить мешающее влияние восстановителей на отклик биосенсоров [43]. При конструировании аналитических устройств, действующих по данному принципу, важными задачами являются:

- 1) выбор трансдьюсера пероксида водорода, позволяющего селективно восстанавливать пероксид водорода в присутствии кислорода при низком потенциале;
- 2) иммобилизация фермента на поверхности трансдьюсера.

Согласно имеющимся данным [44, 45], берлинская лазурь, осажденная на поверхности рабочего электрода, превосходит по характеристикам другие известные катализаторы восстановления пероксида водорода.

Берлинская лазурь. Берлинская лазурь или феррицианид(II) железа(III) ($Fe_4^{III} [Fe^{II} (CN)_6]_3$) – высокоэффективный электрохимический катализатор восстановления пероксида водорода – одно из первых изученных координационных соединений, упоминания о котором относятся к началу 18 века. Однако исследования, опубликованные Неффом в 1978 г. [46], положили начало новому направлению - использованию берлинской лазури для электрохимических приложений. Было показано, что берлинская лазурь может образовывать электроактивные пленки после электрохимического осаждения на поверхности электродов. В последние 20 лет активно ведутся фундаментальные исследования пленок берлинской лазури и ее аналогов с точки зрения их синтеза и структуры.

Химический синтез берлинской лазури может быть проведен путем смешивания железа(II) или (III) и ионов гексацианоферрата с различной степенью окисления атомов железа, т.е. в смеси: $Fe^{3+} + [Fe^{II} (CN)_6]^{4-}$ или $Fe^{2+} + [Fe^{III} (CN)_6]^{3-}$, либо самопроизвольно, либо при протекании катодного тока. Впервые электрохимическое осаждение берлинской лазури было осуществлено японскими учеными в 1982 г. из водных растворов, содержащих Fe^{3+} и $[Fe^{III} (CN)_6]^{3-}$ ионы, в гальваностатическом режиме [47]. Полученные кристаллы были охарактеризованы методом циклической вольтамперометрии.

В биосенсорах берлинская лазурь может быть использована в роли трансдьюсера, если рецептор представляет собой иммобилизованный фермент класса оксидаз.

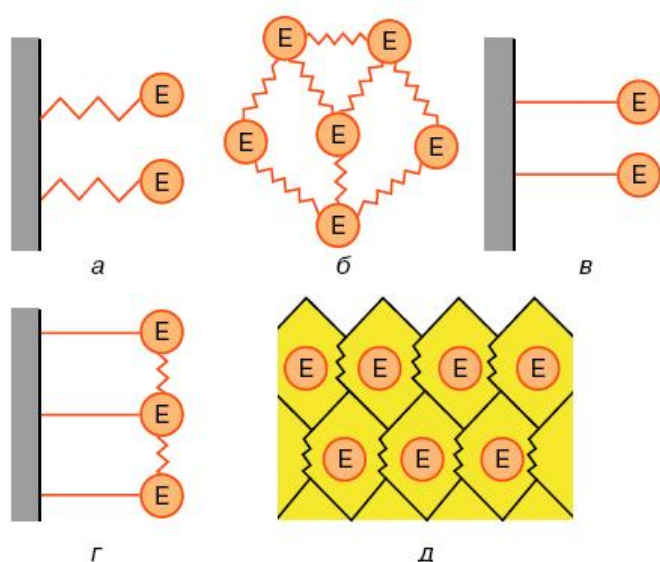
Способы иммобилизации ферментов в биосенсорах. Под иммобилизацией понимают любое ограничение свободы движения ферментов (или их фрагментов), клеточных органелл, клеток и других биологических элементов. Впервые термин «иммобилизация» был узаконен на первой конференции по инженерной энзимологии в Хенникере (США) для обозначения препаратов ферментов, связанных на нерастворимых носителях, то есть гетерогенных катализаторов [48].

Основными требованиями к методам иммобилизации ферментов являются адаптируемость, надежность, а также возможность связывания биологического компонента с сенсором через молекулы, которые проводят электроны [49]. Чем чище биологический компонент, тем выше надежность. Для обеспечения надежности также требуются:

- 1) высокая специфичность биологического компонента;
- 2) устойчивость системы к колебаниям температуры, ионной силы, рН, окислительно-восстановительного потенциала и химического состава окружающей среды;
- 3) встроенное приспособление, ограничивающее деградацию биокомпонента, или способ его присоединения;
- 4) отсутствие возможности инфицирования пациента [49].

Под адаптируемостью методов иммобилизации понимают применимость их к ферментам, полифункциональным ферментам и кофакторам, микроорганизмам и так далее. Метод иммобилизации можно считать пригодным, если после его присоединения к носителю компоненты сохраняют стабильность и активность.

Существует несколько основных методов иммобилизации ферментов (рис. 3), как например физическая адсорбция на твердой поверхности, захват в полимерном геле или микрокапсулах, поперечное связывание с помощью бифункциональных агентов либо ковалентное связывание с нерастворимой подложкой. Наибольший интерес, с точки зрения сохранения активности фермента, представляет захват фермента в гелевый носитель. При формировании геля в содержащем фермент растворе последний захватывается в образующийся гелевый носитель.



- а – ковалентное связывание с поверхностью электрода;
- б – сшивание;
- в – адсорбция на носителе (электроде);
- г – ковалентное связывание и пришивание к подложке (электроду);
- д – захват носителем (в пленке полимера).

Рисунок 3 – Схематическое изображение способов иммобилизации ферментов [50].

Таблица 1 позволяет сравнить различные методы иммобилизации фермента.

При разработке лактатных биосенсоров иммобилизации подвергаются лактатоксидаза или лактатдегидрогеназа. Вариант с ЛОД распространён шире вследствие более простой конструкции биосенсоров на основе оксидаз.

Лактатоксидаза. Водорастворимый фермент ЛОД катализирует реакцию превращения лактата в пируват и широко используется при производстве биосенсоров. Трёхмерная структура фермента до сих пор не изучена по нескольким причинам: во-первых, фермент всегда связан с некоторым переменным количеством кофактора ФМН и воды, во-вторых, его трудно стабилизировать. Однако известно, что его активный центр заряжен положительно. Молекула фермента состоит из 4 – 8 субъединиц с массой 43500 Да [44]. Оптимальными условиями для работы фермента являются рН 7,00 и температура 25⁰С. Механизм действия фермента не изучен окончательно и, предположительно, выглядит следующим образом (рис. 4):

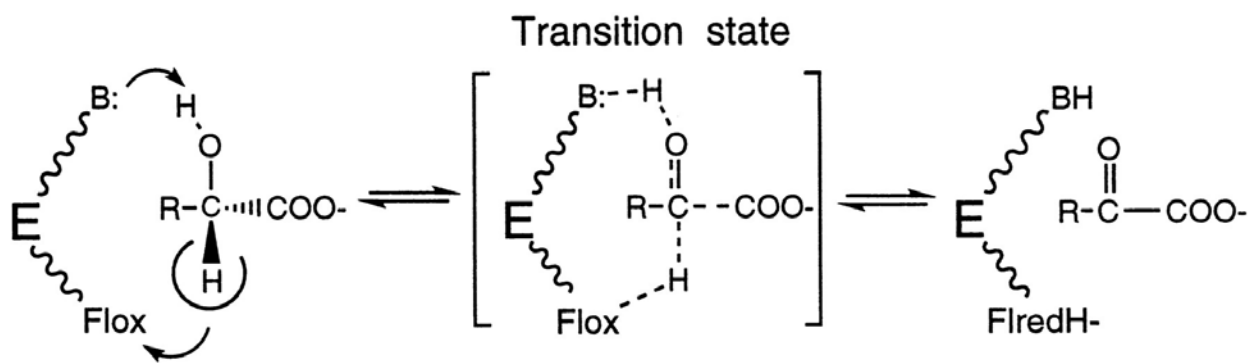


Рисунок 4 – Предполагаемый механизм действия лактатоксидазы.

Таблица 1 – Обзор методов иммобилизации фермента на примере лактатоксидазы.

Метод иммобилизации и использовавшиеся материалы	Линейный диапазон	Чувствительность	Предел обнаружения	Стабильность	Комментарии
Прямая адсорбция на золотой подложке [49]	От 10 мкМ до 0,3 мМ	0,77±0,08 мкА/мМ	10 мкМ	-	Обычная адсорбция на поверхности подложки
Ковалентное связывание со сложным эфиром сукцинимидила (3,3-дитиодипропановая кислота-2) [49]	От 40 мкМ до 0,2 мМ	0,69±0,08 мкА/мМ	40 мкМ	-	Подготовка подложки – выдерживание ее в растворе пропановой кислоты в течение трёх часов
Иммобилизация с помощью альбумина и мицина, поперечное связывание глутаральдегидом в полимерной матрице и захват между двумя поликарбонатными мембранами [50]	От 0,7 мкМ до 1,5 мМ	0,79 мкА/мМ	0,7 мкМ	Снижение активности на 0,1 ед. за 30 дней	Относительно быстрая подготовка: приготовление ЛОД-матрицы, захват матрицы и глутаральдегида мембранами и выдерживание на поверхности электрода до окончания связывания сами по себе занимают 11 минут.
Иммобилизация на полианилиново-фтороанилиновых пленочных отложениях на оксидах индия и олова, покрывающих стеклянный лист [51]	От 0,1 мМ до 0,6 мМ	18 мкА/мМ	0,1 мМ	Снижение активности наполовину за 26 дней	Приготовление биосенсора занимает более суток.
Иммобилизация внутри полостей матрицы агарозном геле и запечатывание полуналипающей полиэтерной фольгой [52]	От 0,1 мМ до 2,5 мМ	0,078 мкА/мМ	0,1 мМ	-	Возможность контроля диффузии вещества к поверхности электрода, как следствие, повышение верхней границы определяемых содержаний.

1.1.4. Разработка способа регистрации воспроизводимых масс-спектров MALDI (с матричной лазерной десорбционной ионизацией) для низкомолекулярных фармацевтических веществ.

Впервые метод матрично-ативированной лазерной десорбции/ионизации, МАЛДИ (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI) описан во второй половине 80-х годов XX века [53, 54]. Одним из первооткрывателей метода является Кончи Танака, получивший за это открытие в 2002 г. Нобелевскую премию.

Метод заключается в облучении короткими лазерными импульсами (УФ- или ИК-лазера) образца, представляющего собой твердый раствор анализируемого соединения в органической матрице. В результате над поверхностью образца образуется плотная высокотемпературная плазма, в которой одновременно с молекулами и ионами матрицы присутствуют молекулы анализируемого соединения. Ионизация этих молекул путем поглощения энергии фотонов или за счет ионно-молекулярных реакций приводит к образованию положительных и отрицательных ионов. Полученные положительные и отрицательные ионы вытягиваются высоким потенциалом из области реакции и направляются в масс-анализатор. Метод характеризуется низкой фрагментацией и интенсивными пиками молекулярных ионов [53].

Метод MALDI обладает следующими основными преимуществами [53]:

- > позволяет определять как простые, так и сложнейшие биологические молекулы (молекулярные ионы которых имеют массы от нескольких Дальтон до 2000000 Дальтон)
- > низкая фрагментация анализируемых соединений и высокая интенсивность пиков молекулярных ионов;
- > возможность анализа наиболее термолабильных, труднолетучих, высокомолекулярных соединений, которые нельзя исследовать другими методами.

Метод MALDI обладает и рядом недостатков, среди которых сложность выбора матрицы, подбора количественного соотношения матрица/исследуемое соединение, мощности лазерного излучения.

Основные требования. На количество ионов в плазме влияют три важнейших фактора: энергия лазера, матрица и пробоподготовка [53, 55]. Эти три фактора рассмотрим более подробно в разделе *МАЛДИ в анализе низкомолекулярных веществ*.

Проведение анализа. Ионизация образца.

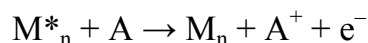
Десорбция с поверхности. Во время высушивания системы матрица - анализируемое соединение - растворитель происходит кристаллизация матрицы с включением молекул анализируемого вещества в кристаллическую решетку матрицы или же молекулы анализируемого вещества располагаются по поверхности быстро образующихся кристаллов матрицы. Скорость образования и размер кристаллов в значительной степени зависят от природы матрицы и растворителя и практически не зависят от природы анализируемого вещества, ввиду того, что матрица и растворитель находятся в большом избытке.

Короткий световой импульс лазера поглощается молекулами матрицы и разрушает её структуру. При этом часть молекул отрывается от поверхности и переходит в высокотемпературный суперплотный газ (зона шлейфа), который содержит молекулы, ионы и ассоциаты матрицы и молекулы анализируемого соединения. Молекулы анализируемого соединения не ионизируются напрямую лазерным излучением, поскольку энергия лазера поглощается матрицей, и молекулы анализируемого соединения почти не получают приращения внутренней энергии, т.к. протекает мягкая химическая ионизация за счет матрицы-реагента, а следовательно сохраняют исходную структуру. В масс-спектрах наблюдаются в основном пики однозарядных молекулярных ионов (A^{+}) и протонированных молекул (AH^{+}) исследуемого соединения. Катионы и анионы могут регистрироваться при простой смене полярности выталкивающего электрода. Также часто наблюдаются пики однозарядных протонированных кластеров исследуемого соединения (типа A_nH^{+}), депротонированных молекул исследуемого соединения ($[A-H]^{-}$), продуктов взаимодействия определяемого соединения с примесью ($[A+\text{катион}]^{+}$) (кластерных ионов).

Механизм ионизации исследуемого соединения. Спектры образцов оказываются похожими даже при использовании столь разных лазеров, как УФ и ИК, на основании чего можно предполагать общность механизма ионизации для

обоих вариантов, но в целом механизмы ионизации в MALDI пока недостаточно изучены. Ионизация происходит при возникновении заряда у молекулы исследуемого вещества в момент её перехода в газовую фазу. Заряд может возникнуть по нескольким причинам, среди которых, в частности:

1. Взаимодействие с кластером возбужденной матрицы M_n^*



2. Протонирование молекулы исследуемого соединения возбужденной молекулой матрицы



3. Если в образец добавить соль (обычно щелочного металла) [55], одновременно с переходом образца в газовую фазу может осуществляться её взаимодействие с катионом соли. Качество спектров при этом, как правило, не ухудшается, а иногда чувствительность возрастает за счет образования кластерных ионов исследуемого соединения с катионом.

Разделение и детектирование ионов. Самым распространенным в коммерческих приборах является времяпролетный (time-of-flight, TOF) масс-анализатор, ввиду ряда его достоинств полезных именно для метода MALDI:

- > практически неограниченный диапазон масс (основная задача MALDI - анализ высокомолекулярных веществ);
- > хорошо работает с импульсными методами генерирования ионов (в т.ч. MALDI);
- > обладает более высокой чувствительностью при регистрации масс-спектров, чем сканирующие приборы (до 10^{-15} моль) ввиду того, что все образовавшиеся в результате ионизации ионы достигают детектора;
- > разрешающая способность более 10000;
- > очень высокая скорость записи спектра (до нескольких сотен спектров в секунду).

В настоящее время метод MALDI используется для решения многих задач, связанных с исследованием и анализом органических и неорганических веществ. На сегодняшний день он является важнейшим методом анализа высокомолекулярных органических соединений (полипептидов, белков [56 – 58], нуклеотидов, полисахаридов [55], синтетических полимеров [56, 59], гуминовых

кислот, органических комплексных соединений). Большинство работ в литературе посвящено исследованию именно этих веществ. В качестве масс-анализатора используется времяпролетный масс-анализатор.

Метод MALDI эффективен для установления молекулярной массы соединения при исследовании неизвестных соединений. К числу подобных задач относится изучение олигомерных компонентов растворов и сложных кластерных структур. Метод MALDI позволяет надежно установить молекулярную массу изучаемых кластеров.

В некоторых случаях (например, при анализе изомерных олигосахаридов) возникает необходимость установления структурных фрагментов. Тогда необходимо использовать спектры метастабильных ионов, получаемые с помощью рефлектрона. Времяпролетный анализатор с рефлектроном обладает тем свойством, что обеспечивает задержку в детектировании ионов, что позволяет произойти диссоциации метастабильных ионов. В сочетании с Фурье-преобразованием, обеспечивающим сверхвысокое разрешение и точность измерения масс, данная задача решается особенно эффективно [55]. Процессы диссоциации кластерных ионов и образования структурных фрагментов возможны при изучении кластеров масс-спектрометрическим методом с ионизацией лазером [60], поэтому способность метода MALDI выявлять протекание данных процессов важна при проведении подобных исследований.

Несомненным преимуществом MALDI при анализе сложных смесей пептидов и белков является возможность определения очень низких концентраций. Метод MALDI оказался полезен при исследовании взаимодействий белок-белок, белок-ДНК [58] благодаря чувствительности, селективности и способности работать с биополимерами очень большой молекулярной массы. При этом первым и самым важным шагом является идентификация аминокислот в молекуле белка. Здесь метод MALDI дает очень хорошие результаты, предоставляя высокую чувствительность, высокое разрешение и точность. Для облегчения обнаружения пептидных фрагментов использовали изотопную метку ^{15}N .

Такие характеристики метода, как чувствительность, селективность, точность, способность работать с веществами любой молекулярной массы, подтверждаемые успешным анализом смесей биополимеров, позволяют провести

анализ сложных смесей неорганических соединений, выяснить их кластерный и олигомерный состав.

Иногда для упрощения расшифровки спектров производят предварительное выделение интересующей группы соединений и лишь затем проводят MALDI-анализ [57].

Также MALDI применяют при исследовании неорганических соединений, таких как неорганические полимеры (поликислоты, силикаты, гетерополисоединения и др.) [53]. Здесь немаловажную роль играет способность регистрировать низкофрагментированные однозарядные ионы большой массы.

Классы определяемых низкомолекулярных соединений. Метод матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ) широко применяют для анализа высокомолекулярных веществ, таких как пептиды, протеины, синтетические полимеры, полисахариды, олигосахариды, олигонуклеатиды [61 – 63]. Метод МАЛДИ длительное время не получал широкого применения для анализа низкомолекулярных веществ из-за мешающего влияния ионов матрицы в низкомолекулярной области. Однако в настоящее время растет интерес к применению метода МАЛДИ для анализа низкомолекулярных соединений [64]. Известны работы по применению этого метода для определения модифицированного азотистого основания аденина [65], аминокислот, сахаров и витаминов [66], жирных кислот [67], желчных кислот (стероидов) [68], красителей (карминовой кислоты) [69], антоцианов (природных веществ, красящих веществ растений, из группы флавоноидов) [70], поверхностно-активных веществ (четвертичных соединений аммония [71], оксиэтилированных алкилфенолов [72, 73]),

Метод МАЛДИ применяли для определения низкомолекулярных соединений, содержащихся в винограде Falanghina и винах, получаемых из этого сорта винограда, для оценки подлинности вин [74].

Метод МАЛДИ также применяют для анализа наркотических средств в различных биологических объектах. В работе [75] метод МАЛДИ использовали для анализа кокаина и его метаболитов в волосах,

В работе [76] для анализа ядовитых алкалоидов в семени тропического листопадного дерева Чилибúха (Чилибúха обыкновенная, или Рвóтный

орех (лат. *Strychnos nux-vomica*), вид рода Стрихнос (*Strychnos*) также использовали метод МАЛДИ. Также исследуется компонентный состав вытяжек, предварительно выделенный из различных трав и растений (жимолости и псоралеи), используемых в традиционной китайской медицине [77, 78].

Определение фармацевтических средств методом МАЛДИ. В настоящее время во многих фармацевтических лабораториях сегодня низкомолекулярные полярные соединения обычно анализируют при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в сочетании с масс-спектрометрией с ионизацией при атмосферном давлении (ИАД). Кроме того, часто используется сочетание ионизации электрораспылением (ИЭР) или химической ионизации при атмосферном давлении (ХИАД) с жидкостной хроматографией/масс-спектрометрией (ЖХ/МС) с разными масс-анализаторами [79].

Одной из первых работ по применению метода МАЛДИ для определения фармацевтических средств стала работа по прямому определению 30 антибиотиков (сульфагуанидин, сульфадиазин, сульфадиметоксин, нитрофураим, фуразолидон, налидиксовая кислота, хлорамфеникол (левомицитин), оксолиновая кислота, гентамицин С1, стрептомицин, бензатина бензилпенициллин, линкомицин, тетрациклин, хлортетрациклин, эритромицин и др.) [80]. Антибиотики являются популярными объектами исследования методом МАЛДИ [80, 81]. Исследуются различные группы антибиотиков, такие как фторхинолоны, олеандомицин (природного антибиотика из группы макролидов) [81].

При использовании метода МАЛДИ были исследованы различные фармацевтические соединения, такие как синтетические аналоги празозина, который является гипотензивным α -адреноблокирующим препаратом, применяемым при гипертонической болезни и застойной сердечной недостаточности [82]; гуперзин А (естественное алкалоидное соединение, антиоксидант, защищающий нервную систему, улучшающий память и мышление) [83]; антиретровирусные средства (нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы – абакавир, диданозин, ставудин, ламивудин, эмтрицитабин, зидовудин; нунуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы – невирапин и эфавиренз; ингибиторы протеазы – ампренавир, лопинавир, ритонавир) [84, 85]; противораковый цитостатический препарат – паклитаксел [86]; трициклические

антидепрессанты – амитриптилин, нортриптилин, имипрамин; тримепразин, хинин – основной алкалоид коры хинного дерева, обладающий жаропонижающим и обезболивающим свойствами, а также выраженным действием против малярийных плазмодиев [87]; верапамил, тетрагидрозолин, галоперидол [88]; пироксикам [89]; гетероциклические 1,2,3-триазолы [90].

В одной из работ ученые использовали метод МАЛДИ-МС/МС для определения неизвестной примеси при производстве лекарственного препарата эптифибатида (синтетический циклический гептапептид, содержащий 6 аминокислот и меркаптопропиононовый остаток). Благодаря полученному соотношению m/z удалось определить структуру неизвестной примеси [91]. Успешное применение МАЛДИ в анализе разнообразных веществ связано с его способностью регистрировать молекулярные и квазимолекулярные ионы термически неустойчивых молекул, используя матрицы, поглощающие ультрафиолетовое излучение. Правильный выбор матрицы является важнейшим фактором, определяющим успех анализа методом МАЛДИ. Основные требования к материалу матрицы заключаются в их высокой способности поглощать лазерное излучение, кристаллизоваться с включением в структуру анализируемого вещества, переносить протоны в ходе процесса ионизации, инертности по отношению к анализируемому веществу, хорошей растворимостью в растворителях, используемых для пробоподготовки, низкой летучести в условиях вакуума.

Так как большинство таких матриц имеют молекулярную массу ниже 500 Да, ионы матрицы могут стать помехой в определении аналита. Если матрица обеспечивает эффективность ионизации, минимальную или контролируемую фрагментацию и ионы матрицы незначительно интерферируют с ионами определяемого вещества, то ее можно использовать для анализа.

1.1.5. Выводы к обзору литературы

Рассмотрено современное состояние вопросов, связанных с разработкой методов концентрирования сульфаниламидов и метилксантинов из растворов, методик определения ионогенных ПАВ, органических кислот, катехоламинов и лактата в различных объектах, а также использования метода МАЛДИ для

определения низкомолекулярных фармацевтических веществ. Обсуждены области применения методов концентрирования и определения веществ, их основные недостатки. Показана актуальность и перспективность новых решений указанных вопросов.

2. ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Выбор направления исследований, методы решения задач

Направлением исследований четвертого этапа работ была разработка оригинальных аналитических методов медицинской диагностики и оценки лекарственных препаратов.

В рамках направления 4.1 календарного плана с целью расширения ассортимента сорбентов, позволяющих количественно осуществлять групповое концентрирование сульфаниламидов и метилксантинов, в рамках проекта предложено использовать сверхсшитый полистирол, впервые синтезированный проф. Даванковым с сотр. [92].

Как показали исследования последних лет, в том числе и проводимые в нашей научной группе, сверхсшитые полистиролы оказались весьма перспективными сорбентами для твердофазной экстракции полярных органических соединений. Эти сорбенты отличаются высокоразвитой удельной поверхностью, относительно малыми порами и выраженным сродством к различным органическим соединениям. Благодаря сверхсшитой природе эти сорбенты устойчивы к физическим и химическим воздействиям, они легко регенерируются. С применением сверхсшитых полистиролов разработаны методики сорбционного выделения и концентрирования фенолов [93], первичных алифатических аминов [94], фенолкарбоновых кислот [95].

В литературе отмечается, что высокая эффективность сорбции полярных ароматических соединений на ССПС обусловлена тем, что наряду с гидрофобными взаимодействиями при сорбции на этих сорбентах реализуются и π - π -взаимодействия между π -системами молекул сорбатов и ССПС. В связи с этим представляло интерес на примере метилксантинов сопоставить сорбцию на ССПС

и на других сорбентах, которые, согласно литературным данным, используют для извлечения полярных органических соединений. В рамках данной работы для этой цели были выбраны Диасорбы, а также поверхностно-модифицированный сополимер стирола и дивинилбензола Strata-X и углеродный наноматериал Таунит. Следует отметить, что последние два сорбента для сорбции метилксантинов также практически не применялись.

Объекты исследования и аппаратура. В качестве сорбента использовали сверхсшитый полистирол, используемый в патронах Диапак П-3 (ЗАО БиоХимМак, Россия) (удельная поверхность $1020 \text{ м}^2/\text{г}$, степень сшивки 100%, размер частиц 50-100 мкм, диаметр пор 10-1000 Å). Кроме того, использовали силикагели, модифицированные алкильными группами: Диасорб-100- C_{16} , Диасорб-100- C_1T , Диасорб-100- C_8T , Диасорб-100- C_{16}T (ЗАО «БиоХимМак СТ», $S_{\text{уд}} = 250 - 330 \text{ м}^2/\text{г}$, размер частиц 63 – 200 мкм), поверхностно-модифицированный сополимер стирола и дивинилбензола Strata-X («Phenomenex», $S_{\text{уд}} = 800 \text{ м}^2/\text{г}$, размер частиц 33 мкм) и наноуглеродный материал Таунит (ООО «НаноТехЦентр», г. Тамбов, $S_{\text{уд}} = 120 \text{ м}^2/\text{г}$)

Объектами исследования сорбции служили сульфаниламиды (сульфаниламид, сульфаметоксипиридазин, сульфаметазин, сульфаметоксазол, сульфаклорпиридазин) и метилксантины (кофеин, теofilлин, теобромин, дипрофиллин, пентоксифиллин). Исходные растворы сульфаниламидов (0,01 М) готовили растворением их точных навесок в ацетонитриле. Исходные растворы метилксантинов (0.001 – 0.005 М) готовили растворением их точных навесок в воде. Рабочие растворы соединений готовили разбавлением исходных непосредственно перед использованием.

Спектры поглощения и оптические плотности растворов регистрировали на спектрофотометре СФ-103 («Аквилон», Россия), значения рН контролировали на иономере «Эксперт 001» (Россия). Сорбцию в динамическом режиме проводили с использованием перистальтического насоса ЛАБ-НП-1-20М (Россия).

Методика изучения сорбции соединений в статических условиях. Для изучения сорбции соединений в статическом режиме точные навески сорбента (0,010 г) помещали в пробирки с притертыми пробками, затем добавляли 5 мл водного раствора исследуемого вещества и встряхивали на электромеханическом

вибросмесителе до установления сорбционного равновесия. Время контакта составляло 20 мин. После этого сорбент отделяли от раствора фильтрованием через складчатый бумажный фильтр и определяли концентрацию исследуемого соединения в равновесной водной фазе спектрофотометрическим методом по их собственному поглощению в УФ-области (260 – 270 нм).

Значения степеней извлечения ($R, \%$) рассчитывали по уравнению:

$$R, \% = \frac{c_0 - c}{c_0} \cdot 100\%,$$

где c_0 – концентрация определяемого соединения в водном растворе перед сорбцией, c – концентрация в растворе после сорбции.

Значения коэффициентов распределения (D) рассчитывали по уравнению:

$$D = \frac{R, \%}{(100 - R, \%)} \cdot \frac{V}{m},$$

где V – объем анализируемого раствора (мл), m – масса навески сорбента (г).

Методика изучения сорбции соединений в динамических условиях. Для изучения сорбции веществ в динамическом режиме использовали концентрирующую микроколонку размером 25×2.7 мм, заполненную ССПС (0,06 г) и перистальтический насос ЛАБ-НП-1-20М (Россия). Скорость пропускания раствора через колонку составила 0.7 – 0.8 мл/мин. После проведения сорбции и десорбции колонку промывали 3 мл этанола и 10 мл воды. Кроме того, использовали картриджи, заполненные 30 мг перечисленных выше сорбентов.

Как следует из приведенной выше оценки состояния решаемой проблемы, ионные жидкости – перспективные материалы для создания электрохимических сенсоров, необходимых для разработки методик определения ионогенных ПАВ в косметической продукции, органических кислот и катехоламинов в лекарственных препаратах (раздел 4.2 календарного плана).

На наш взгляд, весьма интересны ионообменные свойства ИЖ и их способность пластифицировать полимерные материалы. Это сочетание позволяет прогнозировать привлекательность ИЖ и как компонентов пластифицированных полимерных мембран ионселективных электродов (ИСЭ) и как материалов, формирующих ион-чувствительный слой на рабочей поверхности в отсутствие полимера (матрицы). Кроме того, ионная проводимость в комплексе с

экстракционной активностью позволяет использовать ИЖ в составе модифицирующих композиций при разработке вольтамперометрических сенсоров (электродов).

В соответствии с этим были разработаны основанные на ионных жидкостях ион-селективные электроды для потенциометрического анализа и модифицированные ионными жидкостями электроды для вольтамперометрического анализа; их использование позволило разработать методики определения ионогенных ПАВ в косметической продукции, органических кислот и катехоламинов в лекарственных препаратах с пределами обнаружения на уровне $10^{-5} - 10^{-6}$ М.

Использованные ионные жидкости показаны на рис. 5.

В рамках направления 4.3 календарного плана выбраны системы для определения лактата в конденсате выдыхаемого воздуха.

Альтернативные методы определения лактата. Для определения лактата в крови возможно использовать ряд колориметрических методов (табл. 2). Наиболее широко в исследовании нарушений углеводного метаболизма применяют метод Баркера-Саммерсона [51], основанный на том, что из лактата в присутствии серной, фосфорной кислот и солей меди образуется уксусный альдегид, который реагирует с п-оксидифенилом с образованием окрашенного в фиолетовый цвет соединения. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации лактата в пробе.

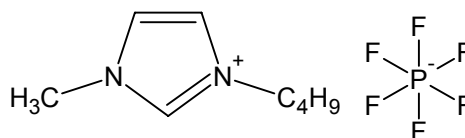
В статье [39] описан метод определения, основанный на высокоэффективной жидкостной хроматографии с разделением оптических изомеров D- и L-лактата при помощи флуоресцирующего детектора, расположенного за колонкой. Чувствительность этих методов лучше, чем других ВЭЖХ методов, которые вместо флуоресцирующего используют УФ-детектор; к тому же, это отвечает требованиям определения следовых количеств D-лактата в биологических образцах.

Работой [52] представлен точный, простой и быстрый метод капиллярного зонного электрофореза с прямой УФ регистрацией для определения важнейших органических кислот в виноградных соках и винах.

BMImPF₆

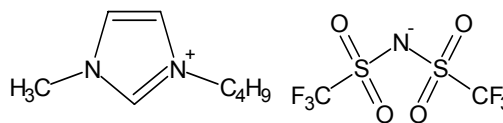
1-Бутил-3-метилимидазолия

гексафторфосфат



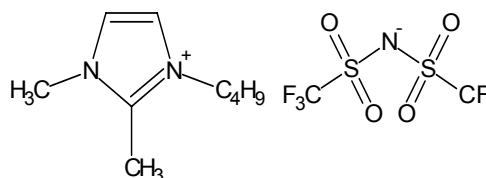
BMImTf₂N

Бис-трифлилимид 1-бутил-2,3-метилимидазолия



BDMImTf₂N

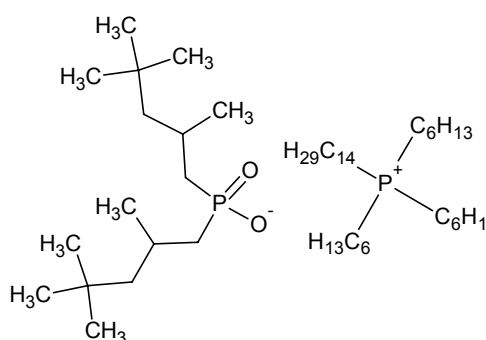
Бис-трифлилимид 1-бутил-2,3-метилимидазолия



TDTHP-BTMPP

Бис(2,4,4-триметилпентил) фосфинат

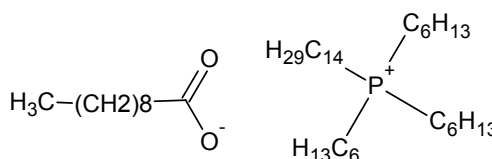
тетрадецилтригексилфосфония



TDTHP-DA

Деканоат

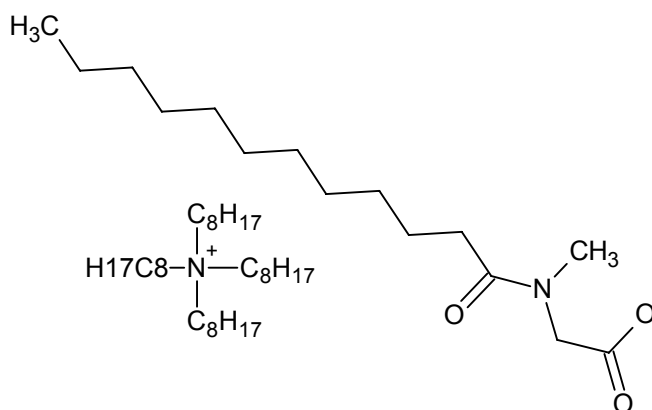
тетрадецилтригексилфосфония



TOALS

N-Лауроилсаркозинат

тетраоктиламмония



TOMAS

Салицилат триоктилметиламмония

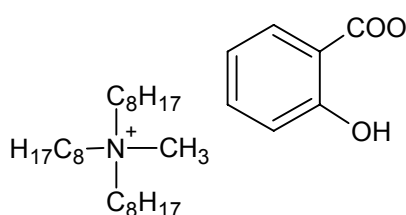


Рисунок 5 – Используемые в работе ионные жидкости.

Таблица 2 – Сравнение альтернативных методов определения лактата.

Метод определения	Линейный диапазон определяемых концентраций	Комментарии
Колориметрический метод Баркера-Саммерсона [51]	-	Интенсивность окраски пропорциональна концентрации лактата в пробе. Расчет выполняют по градуировочной зависимости.
ВЭЖХ с флуоресцентным детектором [39]	-	Чувствительность выше, чем у методов, которые используют УФ-детектор; разделение лактата на оптические изомеры
Ион-эксклюзионная ВЭЖХ	0-0,55 М	Увеличивается эффективность по сравнению с остальными видами ВЭЖХ, но увеличивается время анализа
ВЭЖХ (ОФ)	0,55-2,20 М	-
Газовая хроматография	3,30-7,70 М	-
КЗЭ с прямой УФ-регистрацией [52]	До 0,37 М в соке, до 0,09 М в вине	Время анализа ниже, чем у опубликованных ранее КЗЭ методов в два, четыре или даже шесть раз.
Флуоресцентный капиллярный анализ	0,5-2,0 мМ	Специально создан иммобилизованный ферментный лактатный капиллярный биореактор.
Флуориметрия	1,1-5000 мкМ	Определение в смеси 21 органической кислоты
Спектрофотометрия	0-1,7 мМ	Подходит для рутинных анализов

Определение молочной кислоты в винах может быть выполнено менее чем за три минуты, при этом одновременно возможно определение также винной, янтарной, уксусной, молочной и лимонной кислот. Предложенный метод снижает время анализа и дает возможность быстрого контроля зрелости винограда и процессов производства вина.

Анализ конденсата выдыхаемого воздуха. В настоящее время в клинической диагностике и спортивной диагностике все больше внимания уделяется неинвазивным методам, в частности, анализу КВВ.

КВВ является объектом, сложный качественный и количественный состав которого изменяется под влиянием большого числа факторов. Повышающееся с каждым годом количество статей, посвящённых анализу КВВ, свидетельствует о ценности и полезности этого объекта в респираторной медицине. Анализ КВВ может служить для оценки степени воспаления дыхательных путей, а также будет способствовать врачам в наблюдении за протеканием болезней, таких как астма или ХОБЛ, во время терапии [96].

Следует также упомянуть, что интенсивные физические упражнения связаны с повышением лёгочного кровотока и, вследствие этого, с увеличением транспорта продуктов клеточного метаболизма в лёгочный круг кровообращения. Часть этих продуктов обмена веществ летуча, что приводит к повышению во время и после тренировки диффузии летучих и полуметучих веществ в альвеолярный газ, а следовательно, и к изменению состава КВВ, в том числе по уровню лактата. Поэтому неинвазивный мониторинг уровня лактата в тканях организма через состав КВВ представляет интерес для спортивной медицины.

Анализ КВВ исключает травматизм, связанного с воздействием хирургических инструментов на ткани и сосуды при анализе крови, и обладает рядом других преимуществ, таких, как безопасность, простота и портативность аппаратуры, возможность осуществления анализа у детей (начиная с 4 лет) и у тяжелобольных пациентов и возможность повторения анализа несколько раз подряд с небольшими интервалами между сбором образца.

Таким образом, неинвазивные методы исследования обладают явным преимуществом перед инвазивными. Анализируемые при этом объекты, однако, обладают сложным качественным и количественным составом, зависящим от многих факторов. Для точного и быстрого определения одного интересующего компонента лучше всего подходят биосенсоры, так как они в большинстве случаев обладают абсолютной специфичностью. Например, для определения лактата можно использовать модифицированный берлинской лазурью в качестве трансдьюсера амперометрический биосенсор с иммобилизованным в полимерную незаряженную мембрану ферментом ЛОД. На основании существующих данных, такой сенсор будет обладать наилучшими характеристиками по сравнению с другими известными сенсорами на лактат.

Как следует из обзора литературы, метод масс-спектрометрии с MALDI (раздел 4.4 календарного плана) обладает целым рядом достоинств. Особенно перспективным является его применение для быстрого скрининга проб лекарственных средств на присутствие в образце заявленного активного вещества. Эта задача является особенно актуальной для быстрого обнаружения фальсификации, основанной на замене активного вещества (полного или частичного) на неактивное вещество (например, глюкозу). Обнаружение такой фальсификации в блистере в целом (когда подмена производится только одной или двух таблеток) позволила бы существенно увеличить достоверность и производительность контроля на фальсификаты.

Решение такой задачи методами, получившими наиболее широкое распространение в фармакопее (ВЭЖХ, ТСХ), невозможно в связи с необходимостью использования специфических условий определения для каждого лекарственного средства.

В последнее время для быстрого обнаружения фальсификатов лекарственных средств без разрушения пробы получил метод ИК спектроскопии в ближней ИК области (БИК). Разработаны портативные анализаторы. Однако для применения этого метода требуется длительная градуировка анализатора с использованием большого числа образцов препаратов, содержащих одно и то же активное вещество. При использовании этого метода может быть осуществлен скрининг проб образцов ограниченного числа лекарственных средств.

Нами было решено изучить возможность применения масс-спектрометрии с MALDI для анализа низкомолекулярных фармацевтических веществ, обладающего высокой чувствительностью и селективностью.

Преимуществом метода MALDI является возможность высокопроизводительного автоматизированного анализа образцов не только индивидуальных веществ, но и смесей, осуществление анализа образцов в гораздо более универсальных условиях, по сравнению с ВЭЖХ и ВЭЖХ/МС с электрораспылением и химической ионизацией при атмосферном давлении. Возможен анализ лекарственных средств на содержание активного вещества (исследование на подлинность) напрямую либо с минимальной пробоподготовкой.

Для решения задачи универсального, высокочувствительного и в то же время селективного определения активного вещества необходимо было изучить влияние на состав ионов масс-спектра следующих параметров эксперимента с масс-спектрометрией MALDI: поверхность мишени и добавка к ней матрицы, материал матрицы, различные варианты нанесения матрицы на мишень, содержание матрицы на мишени, соотношение матрица/аналит.

Это исследование было необходимо для выбора таких условий эксперимента, которые бы обеспечили возможность регистрации высоковоспроизводимых масс-спектров MALDI и высокую чувствительность определения. Необходимо было также изучить возможность обнаружения самого активного вещества в таблетированном фармпрепарате.

В качестве объекта исследования нами была выбрана фармацевтическая субстанция пентоксифилин, являющаяся действующим веществом различных фармпрепаратов, улучшающих реологические свойства крови и применяющихся в лечении нарушений периферического и цереброваскулярного кровообращения, болезни Рейно, последствий инсультов и инфарктов миокарда, расстройств памяти. Выбор этой субстанции для исследования был обусловлен и по причине минимальной сорбции из раствора на стеклянных и кварцевых поверхностях (по сравнению с рядом ранее изученных нами субстанций фармпрепаратов методом ГХ/МС).

2.2. Разработка методики концентрирования сульфаниламидов и метилксантинов из растворов

Сульфаниламиды. В статических условиях изучена сорбция сульфаниламида, сульфаметоксипиридазина, сульфаметазина, сульфаметоксазола и сульфаклорпиридазина на ССПС. Перечень и некоторые физико-химические свойства изученных веществ представлены в табл. 3. Эти соединения – производные *n*-аминобензолсульфаниловой кислоты – различаются заместителями в положении N1 и гидрофобностью (параметром Ханша – логарифмами констант их распределения в системе *n*-октанол – вода) (табл. 3). Условия сорбционного извлечения оптимизировали, варьируя время контакта фаз и pH водной фазы.

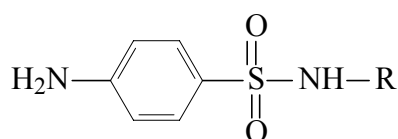
Интерпретацию полученных результатов проводили, сравнивая изотермы сорбции СА и рассчитанные из них физико-химические параметры сорбции.

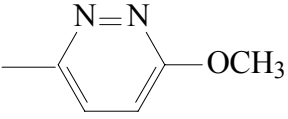
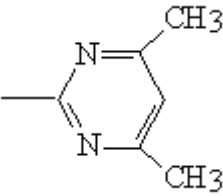
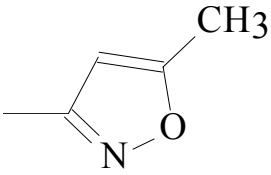
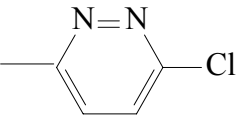
Установлено, что время достижения сорбционного равновесия для всех изученных СА не превышает 20 мин (рис. 6). Эти соединения могут находиться в растворе как в молекулярной, так и в ионизованной форме, поэтому одним из основных факторов, влияющих на их сорбцию, является рН раствора. Характер зависимости степени извлечения от рН (рис. 7) свидетельствует о том, что сульфаниламиды сорбируются на ССПС в молекулярной форме: степень извлечения максимальна в интервале рН от 3 до 10 и составляет 43 и 87 – 96 % для сульфаниламида и остальных СА соответственно. При увеличении кислотности раствора (рН<3) сульфаниламиды переходят в протонированную форму, что сопровождается снижением их степеней извлечения. Во всех дальнейших исследованиях сорбцию проводили из растворов с рН~5.

Изотермы сорбции сульфаниламида, сульфаметоксипиридазина, сульфаметазина, сульфаметоксазола и сульфаклорпиридазина приведены на рис. 8. Обращает внимание сходство изотерм сорбции, относящихся к изотермам Ленгмюра. Ранее такой тип изотерм наблюдали при сорбции на ССПС фенокарбоновых кислот [24], а также пирокатехина, резорцина и гидрохинона [25]. Начальные участки изотерм линейны в диапазоне 0,01 – 0,1 и 0,002 – 0,025 мМ равновесных концентраций сульфаниламида и остальных СА соответственно. Расположение начальных участков изотерм сорбции и их наклон коррелируют с приведенными в табл. 3 параметрами гидрофобности, что указывает на важную роль гидрофобных взаимодействий при сорбции соединений этого класса на ССПС. Максимальным сродством к ССПС среди изученных соединений обладает наиболее гидрофобный сульфаклорпиридазин.

Таблица 3 – Сульфаниламиды, изученные в работе.

Общая структура сульфаниламидов



Вещество	Структура заместителя (R- группы)	ММ	IgP*
Сульфаниламид (САМ)	H	172	-0,72±0,22
Сульфаметоксипири- дазин (СМП)		280	0,32±0,67
Сульфаметазин (СМТ)		246	0,80±0,26
Сульфаметоксазол (СМЗ)		253	0,89±0,42
Сульфаклорпиридазин (СХП)		284,5	1,02±0,62

*Значения параметров гидрофобности рассчитаны с помощью программы IgP(@ACD, Toronto, Canada)

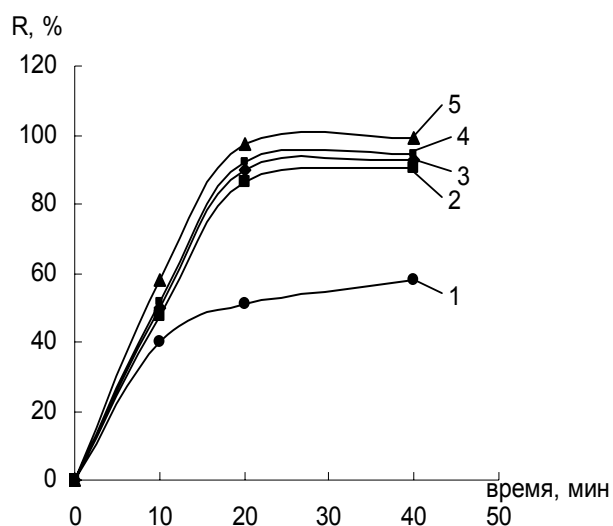


Рисунок 6. Зависимость степени извлечения сульфаниламида (1), сульфаметоксипиридазина (2), сульфаметазина (3), сульфаметоксазола (4) и сульфаклорпиридазина (5) на сверхшитом полистироле от времени контакта фаз

$$C_{CA} = 2 \cdot 10^{-5} \text{ М, } V = 5 \text{ мл, } m_{\text{СССП}} = 0,010 \pm 0,001 \text{ г}$$

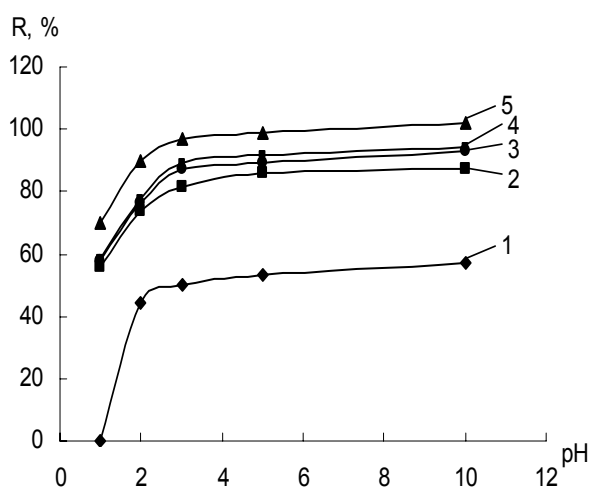


Рисунок 7 – Зависимость степени извлечения сульфаниламида (1), сульфаметоксипиридазина (2), сульфаметазина (3), сульфаметоксазола (4) и сульфаклорпиридазина (5) на сверхшитом полистироле от pH.

$$C_{CA} = 2 \cdot 10^{-5} \text{ М, } V = 5 \text{ мл, } m_{\text{СССП}} = 0,010 \pm 0,001 \text{ г}$$

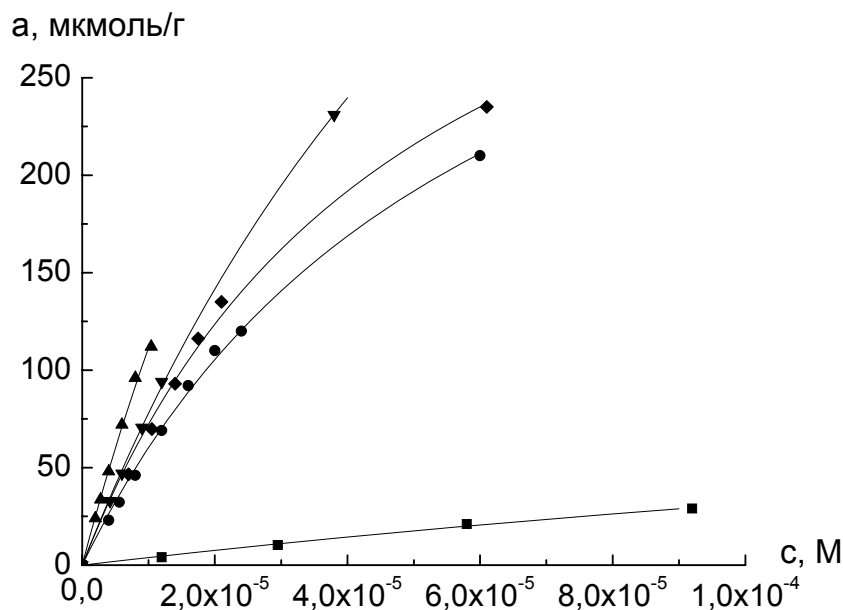


Рисунок 8 – Изотермы сорбции сульфаниламида (1), сульфаметоксипиридазина(2), сульфаметазина (3), сульфаметоксазола (4) и сульфахлорпиридазина (5) из водных растворов на сверхсшитом полистироле.

pH ~ 5, V = 5 мл, m_{ССПС} = 0,010 ± 0,001 г, t = 20 мин

Значения степеней извлечения и коэффициентов распределения СА в области линейности изотерм (табл. 4) возрастают с увеличением их параметров гидрофобности в ряду: сульфаниламид < сульфаметоксипиридазин < сульфаметазин, сульфаметоксазол < сульфахлорпиридазин. Наличие линейной корреляционной зависимости между логарифмом коэффициента распределения (lgD) и параметром гидрофобности (lgP) сорбируемого СА, описываемой уравнением $y = 0.8234x + 3.2036$ ($R^2 = 0.9918$), указывает на то, что и другие сульфаниламиды, lgP которых больше 0.8, должны сорбироваться на ССПС количественно.

Таблица 4 – Степени извлечения (R, %) и логарифмы коэффициентов распределения (lgD) сульфаниламидов на ССПС в статических условиях.

$C_{CA} = 1 \cdot 10^{-4} M$, pH ~ 5, V = 5 мл, m_{ССПС} = 0,010 ± 0,001 г, t = 20 мин (n = 3, P = 0,95)

Вещество	R, %	lgD
Сульфаниламид	43 ± 2	2,6
Сульфаметоксипиридазин	87 ± 3	3,52
Сульфаметазин	92 ± 3	3,8
Сульфаметоксазол	94 ± 2	3,9
Сульфахлорпиридазин	96 ± 4	4,1

В табл. 5 приведены физико-химические параметры сорбции: значения величин предельной сорбции и рассчитанных констант сорбции.

Таблица 5 – Значения предельной сорбции и констант сорбции изученных в работе сульфаниламидов.

Вещество	a _m , мкмоль/г	K, л/моль
Сульфаниламид	150,4	2,64·10 ³
Сульфаметоксипиридазин	423,1	1,66·10 ⁴
Сульфаметазин	428,1	2,03·10 ⁴
Сульфаметоксазол	779,5	1,10·10 ⁴
Сульфахлорпиридазин	782,7	1,66·10 ⁴

Сорбция в динамических условиях. Сорбцию сульфаниламидов в динамических условиях проводили на микроколонке, заполненной ССПС. Для минимизации объема элюента оказалось целесообразным использование микроколонки размером 15×5 мм, заполненной 60 мг ССПС, скорость пропускания СА через колонку при этом составила 0,8 мл/мин.

Как видно из данных, приведенных в табл. 6, из 50 мл водной фазы все изученные СА сорбируются на 98 – 100 %. Сорбированные сульфаниламиды

количественно десорбируются с микроколонки 1.5 мл ацетонитрила при десорбции в противотоке (табл. 7).

Таблица 6 – Степени извлечения (R,%) сульфаниламидов на ССПС в динамических условиях. $C_{CA}=1 \times 10^{-4}$ М, pH~5, V = 50 мл, m ССПС = 0,06 г.

Вещество	R, %
Сульфаниламид	95
Сульфаметоксипиридазин	98
Сульфаклорпиридазин	99
Сульфаметоксазол	98

Таблица 7 – Степени десорбции (R,%) сульфаниламидов с микроколонки, заполненной 0,06 г ССПС в динамических условиях.

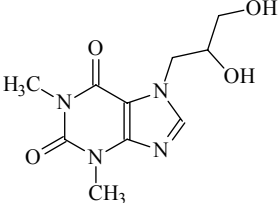
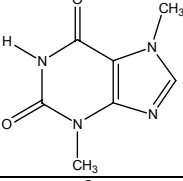
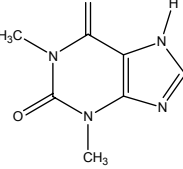
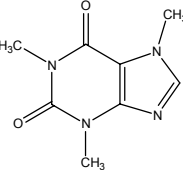
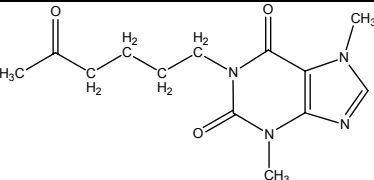
Объемная скорость элюирования 1 мл/мин.

Вещество	V _{AcN} , мл		
	0,25	0,75	1,5
Сульфаниламид	27	99	100
Сульфаметоксипиридазин	41	98	99
Сульфаклорпиридазин	45	88	97
Сульфаметоксазол	42	96	99

Таким образом, в соответствии с ТЗ, разработана методика концентрирования сульфаниламидов на сверхсшитом полистироле. Методика обеспечивает степень извлечения целевых веществ из растворов не менее 95%.

Метилксантины. В статических условиях изучена сорбция кофеина, теофиллина, теобромина, дипрофиллина и пентоксифиллина на сверхсшитом полистироле (ССПС), поверхностно-модифицированном сополимере стирола и дивинилбензола Strata-X, наноуглеродном материале Таунит и силикагелях Диасорб-100-С₁₆, Диасорб-100-С₁Т, Диасорб-100-С₈Т и Диасорб-100-С₁₆Т. Перечень и некоторые физико-химические свойства изученных метилксантинов представлены в табл. 8.

Таблица 8 – Перечень и некоторые физико-химические свойства метилксантинов, изученных в работе.

Соединение	Структурная формула	Мол. масса	lgP*	pK _a **	pK _b **
Дипрофиллин (7-(2,3-дигидрокси-пропил)теофиллин, Д)		254	-1.10	–	–
Теобромин (3,7-диметилксантин, ТБ)		180	-0.7	10.0	13.9
Теофиллин (1,3-диметилксантин, ТФ)		180	-0.2	8.8	14.2
Кофеин (1,3,7-триметилксантин, К)		194	-0.1	14.0	14.2
Пентоксифиллин (3,7-диметил-1-(5-оксогексил)-ксантин, П)		278	0.3	–	–

*Значения параметров гидрофобности lgP рассчитаны с помощью программы lgP(@ACD, Toronto, Canada); **Значения pK_a и pK_b взяты из М.С. Gennaro, С. Abrigo, Р. Biglino. // *Analyst*. 1992. V. 117. P. 1071–1074.

Методом низкотемпературной адсорбции азота при 77 К на установке ASAP 2010 N проведено исследование пористой структуры и определена удельная поверхность сорбентов (табл. 9). Изотермы сорбции-десорбции азота для изученных сорбентов (рис. 9) существенно различаются друг от друга, на всех изотермах наблюдаются петли гистерезиса. Согласно классификации ИЮПАК по форме изотерм сорбции и петли гистерезиса ССПС (II, H₄-тип) принадлежит к микропористым сорбентам, Strata-X и Диасорб-100-С₁₆Т (IV, H₂-тип) – к мезопористым сорбентам, в составе которых содержатся поры в форме «бутылочного горлышка», а УНМ Таунит (IV, H₃-тип) – к мезопористым

сорбентам, содержащим поры по форме ближе к щелевидным. Как следует из табл. 7, все исследованные сорбенты заметно отличаются друг от друга и по $S_{уд}$, $V_{п}$ и $d_{п}$.

Таблица 9 – Характеристики пористой структуры сорбентов, рассчитанные по изотермам низкотемпературной адсорбции азота.

Сорбент	ССПС	Strata-X	Диасорб-100-С ₁₆ Т	УНМ Таунит
$S_{уд}$, м ² /г	912	575	204	139
$V_{п}$, см ³ /г	0.53	1.06	0.49	0.20
$d_{п}$, Å	23.3	73.5	95.5	56.8
$S_{уд\text{мк}}$, м ² /г	513	0	0	7
$V_{мк}$, см ³ /г	0.23	0	0	0.01
Доля, % (Рассматриваемый диаметр пор 1.7 – 300 нм)				
макропоры (более 50 нм)	10	7	0.3	21
мезопоры (от 2 до 50 нм)	79	91	99.7	78
микропоры (менее 2 нм)	11	2	0	1

Анализ полученных из изотерм дифференциальных кривых распределения объема пор по диаметрам (рис. 10) показал, что в образцах Strata-X и Диасорб-100-С₁₆Т присутствуют в основном мезопоры (на них приходится 91% и 99.7% от общего объема пор) диаметром около 15 и 7.5 нм соответственно. В УНМ Таунит присутствуют мезопоры (78%) диаметром около 4 нм и макропоры (21%) разного диаметра. В ССПС, помимо мезо- (79%) и макропор (10%) диаметром около 50 нм, содержится много микропор (11%) с диаметром менее 2 нм.

На выбранных сорбентах изучена сорбция метилксантинов в зависимости от времени контакта фаз, рН раствора и концентрации извлекаемых соединений. В качестве примера на рис. 11 приведены экспериментальные зависимости для кофеина. Для остальных метилксантинов они носят аналогичный характер. Установлено, что природа сорбента оказывает существенное влияние как на время установления сорбционного равновесия, так и на эффективность сорбции. Быстрее всего сорбционное равновесие устанавливается на сорбентах, в структуре которых содержатся макропоры: УНМ Таунит (10 мин) и ССПС (30 мин). Для сорбентов

Strata-X и Диасорб-100-С₁₆Т, в структуре которых макропоры отсутствуют, время установления сорбционного равновесия увеличивается до 60 мин. Характер зависимостей степеней извлечения от рН свидетельствует о том, что метилксантины сорбируются на всех изученных сорбентах в молекулярной форме; максимальная сорбция наблюдается в широком интервале рН 2 – 8. Начальные участки изотерм сорбции линейны до равновесных концентраций метилксантинов 0.3 мМ; в диапазоне 0.1 – 15 мМ равновесных концентраций изотермы описываются уравнением Ленгмюра.

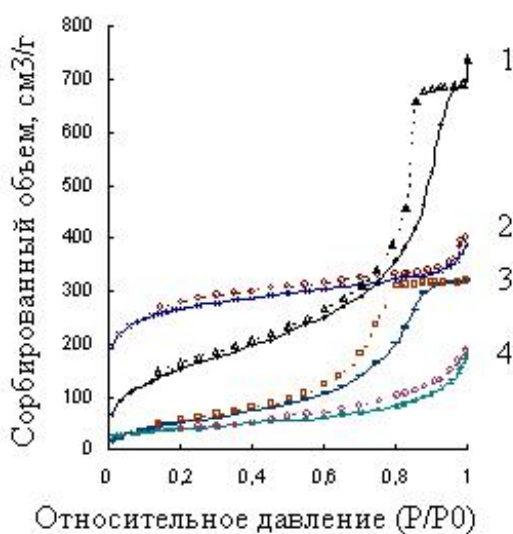


Рисунок 9 – Изотермы сорбции-десорбции азота на сорбентах Strata-X (1), ССПС (2), УНМ Таунит (4) и Диасорб-100-С₁₆Т (3).

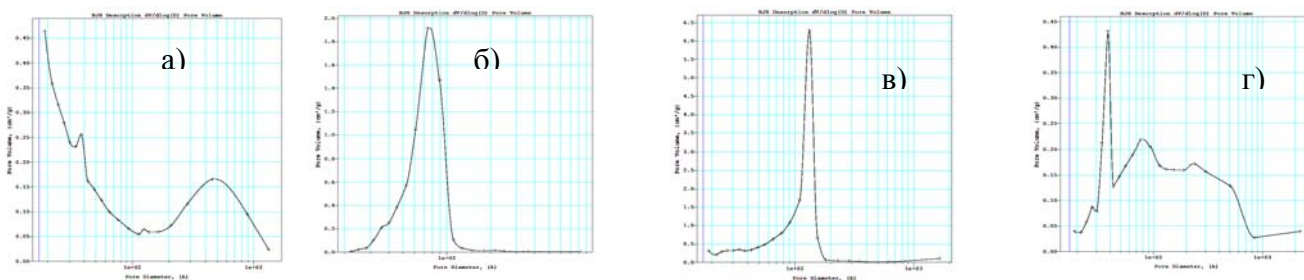


Рисунок 10 – Распределение пор по размерам для сорбентов ССПС (а), Strata-X (б), Диасорб-100-С₁₆Т (в) и УНМ Таунит (г).

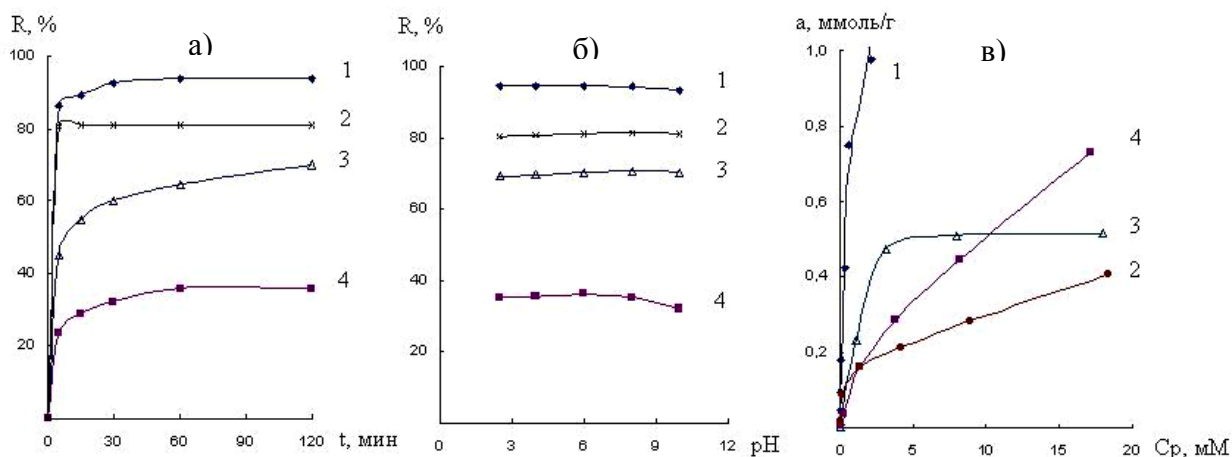


Рисунок 11 – Зависимости степеней извлечения кофеина на ССПС (1), УНМ Таунит (2), Strata-X (3) и Диасорб-100-С₁₆Т (4) от времени контакта фаз (а), рН раствора (б) и концентрации кофеина (в). $c = 1 \times 10^{-4}$ М, $V = 5$ мл, $m_{\text{сорб}} = 0.020 \pm 0.001$ г, $\text{pH} \sim 6$ (а, в).

Сопоставление степеней извлечения и коэффициентов распределения (табл. 10) показывает, что в целом сорбция метилксантинов растет по мере увеличения гидрофобности соединений в рядах: дипрофиллин, теобромин < теофиллин < кофеин < пентоксифиллин (ССПС и УНМ Таунит) и теобромин < дипрофиллин, теофиллин < кофеин < пентоксифиллин (Strata-X и Диасорб 100-С₁₆Т).

Таблица 10 – Степени извлечения (R, %) и коэффициенты распределения (lgD) метилксантинов на изученных сорбентах в статических условиях.

($c = 1 \times 10^{-4}$ М, $V = 5$ мл, $m_{\text{сорб}} = 0.020$ г, $t = 60$ мин, $n = 3$, $P = 0.95$)

Соединение	ССПС		Strata-X		Диасорб-100-С ₁₆ Т		УНМ	
	R, %	lgD	R, %	lgD	R, %	lgD	R, %	lgD
Пентоксифиллин	97 ± 2	3.9	95 ± 6	3.7	80 ± 4	3.0	90 ± 3	3.4
Кофеин	94 ± 3	3.6	70 ± 2	2.8	36 ± 3	2.1	81 ± 6	3.0
Теофиллин	91 ± 3	3.4	55 ± 6	2.5	27 ± 2	2.0	78 ± 5	2.9
Теобромин	84 ± 2	3.1	20 ± 2	1.8	10 ± 1	1.4	66 ± 6	2.7
Дипрофиллин	84 ± 3	3.1	40 ± 4	2.2	27 ± 1	2.0	61 ± 5	2.6

Для всех метилксантинов, за исключением дипрофиллина, наблюдается линейная зависимость $\lg D - \lg P$ (в скобках указаны значения коэффициентов корреляции, R^2):

$$\text{ССПС: } \lg D = 0.8 \times \lg P + 3.6 \quad (0.9723);$$

$$\text{Strata-X: } \lg D = 1.9 \times \lg P + 3.0 \quad (0.9746);$$

УНМ Таунит: $\lg D = 0.7 \times \lg P + 3.1$ (0.9811);

Диасорб-100-С₁₆Т: $\lg D = 1.5 \times \lg P + 2.4$ (0.9530).

Расположение и разный наклон этих зависимостей (рис. 12) указывают на то, что наряду с гидрофобными взаимодействиями, которые сильнее всего проявляются на сорбентах *Strata-X* и *Диасорб-100-С₁₆Т*, при сорбции метилксантинов реализуются и специфические взаимодействия. Уменьшение наклона линейных зависимостей в ряду *Strata-X* > *Диасорб-100-С₁₆Т* > *ССПС* > *УНМ Таунит* косвенно указывает на то, что в этой последовательности вклад гидрофобных взаимодействий нивелируется на фоне более сильных специфических: π - π - взаимодействий между сорбируемым соединением и матрицей сорбента и донорно-акцепторных взаимодействий между атомами кислорода и азота в составе метилксантинов и акцепторными фрагментами сорбентов.

Для выяснения вклада в сорбцию остаточных силанольных групп поверхности химически модифицированных кремнеземов (ХМК) проведено сопоставление сорбционного поведения метилксантинов на *Диасорбе 100-С₁₆Т*, дополнительно силанизированном триметилхлорсиланом, и *Диасорбе 100-С₁₆*, содержащем остаточные силанольные группы. Из данных, приведенных в табл. 11, видно, что все метилксантины из водных растворов сорбируются на этих двух сорбентах одинаково. На примере *Диасорбов* серии Т с привитыми гексадецильными (100-С₁₆Т), октильными (100-С₈Т) и метильными (100-С₁Т) группами изучено влияние на сорбцию длины алкильного радикала. Характер зависимостей сорбции от длины алкильного радикала ХМК, с одной стороны, и от гидрофобности молекул метилксантинов, с другой (табл. 11), указывает на то что основной вклад при сорбции метилксантинов из воды на ХМК вносят гидрофобные взаимодействия. Сорбция метилксантинов возрастает по мере увеличения длины алкильного радикала, а максимальным сродством ко всем изученным ХМК среди метилксантинов обладает наиболее гидрофобный пентоксифиллин.

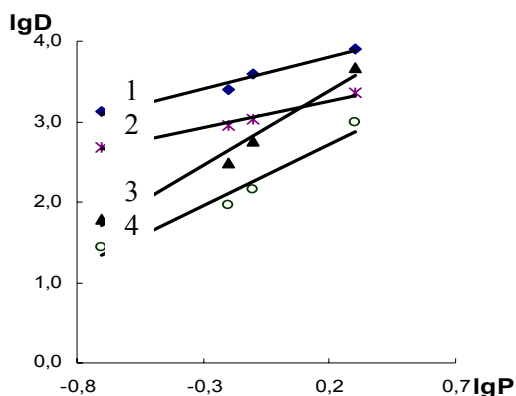


Рисунок 12 – Зависимости логарифмов коэффициентов распределения метилксантинов (lgD) на ССПС (1), УНМ Таунит (2), Strata-X (3) и Диасорб-100-С₁₆Т (4) от lgP.

Таблица 11 – Степени извлечения (R, %) и коэффициенты распределения (lgD) метилксантинов на ХМК в статических условиях ($c = 1 \times 10^{-4}$ М, pH ~ 6, V = 5 мл, $m_{\text{сорб}} = 0.020 \pm 0.001$ г, t = 60 мин, n = 3, P = 0.95)

Соединение	100-С ₁₆		100-С ₁₆ Т		100-С ₈ Т		100-С ₁ Т	
	R, %	lgD	R, %	lgD	R, %	lgD	R, %	lgD
Пентокси-филлин	83 ± 2	3.1	80 ± 4	3.0	79 ± 3	3.0	46 ± 2	2.3
Кофеин	32 ± 2	2.1	36 ± 3	2.1	22 ± 1	1.8	5 ± 1	1.1
Теофиллин	25 ± 1	1.9	27 ± 2	2.0	11 ± 1	1.5	2 ± 1	0.7
Теобромин	17 ± 1	1.7	10 ± 1	1.4	7 ± 1	1.3	3 ± 1	0.8

На картриджах, заполненных 30 мг сорбентов, изучена сорбция метилксантинов в динамическом режиме (табл. 12).

Из сравнения данных видно, что на ССПС и Strata-X все метилксантины сорбируются и десорбируются метанолом (одним из лучшим из изученных элюентов) количественно. Степени извлечения метилксантинов на УНМ Таунит высоки, но с этого сорбента метилксантины десорбируются 1 мл метанола всего на 18 – 48 %. При увеличении объема элюента до 5 мл десорбция возрастает до 75 – 89 %. На Диасорбе 100-С₁₆Т количественно сорбируются лишь кофеин и пентоксифиллин, тогда как другие метилксантины извлекаются в значительно меньшей степени.

Таблица 12 – Степени извлечения метилксантинов ($R_{\text{сорб}}$, %) на картриджах, заполненных 30 мг сорбентов, и степени их десорбции ($R_{\text{дес}}$, %) 0.5 и 1 мл метанола ($c = 1 \times 10^{-4}$ М, $V = 5$ мл, $U = 2$ мл/мин, $n = 3$, $P = 0.95$)

Сорбент	$R_{\text{сорб}}$ и $R_{\text{дес}}$	Пентокси-филлин	Кофеин	Теofilлин	Теобромин	Дипро-филлин
ССПС	$R_{\text{сорб}}$, %	100 ± 1	100 ± 1	100 ± 1	100 ± 1	100 ± 1
	$R_{\text{дес}0.5}$, %	62 ± 5	71 ± 5	96 ± 4	95 ± 5	96 ± 4
	$R_{\text{дес}1}$, %	92 ± 6	95 ± 4	100 ± 4	100 ± 5	100 ± 3
Strata-X	$R_{\text{сорб}}$, %	100 ± 1	100 ± 1	100 ± 1	100 ± 1	100 ± 1
	$R_{\text{дес}0.5}$, %	96 ± 6	97 ± 3	94 ± 3	93 ± 5	98 ± 4
	$R_{\text{дес}1}$, %	98 ± 4	100 ± 3	97 ± 4	96 ± 5	100 ± 3
Диасорб-100-С ₁₆ Т	$R_{\text{сорб}}$, %	92 ± 5	95 ± 6	66 ± 6	47 ± 5	78 ± 5
	$R_{\text{дес}0.5}$, %	95 ± 5	91 ± 4	92 ± 6	91 ± 4	95 ± 4
	$R_{\text{дес}1}$, %	97 ± 4	95 ± 5	97 ± 3	95 ± 5	99 ± 3
УНМ Таунит	$R_{\text{сорб}}$, %	95 ± 4	86 ± 2	84 ± 2	82 ± 3	79 ± 4
	$R_{\text{дес}0.5}$, %	11 ± 3	30 ± 5	22 ± 4	19 ± 3	36 ± 4
	$R_{\text{дес}1}$, %	18 ± 4	44 ± 5	31 ± 5	27 ± 4	48 ± 4

Установлено, что на микроколонке, заполненной 0.055 г ССПС, все метилксантины сорбируются на 97 – 100% ($V = 25$ мл, $U = 0.7$ мл/мин). На примере кофеина показано, что степень извлечения изменяется незначительно и составляет $95 \pm 4\%$ при увеличении объема анализируемой пробы до 100 мл. При осуществлении десорбции в противотоке метилксантины количественно элюируются с микроколонки 1 мл метанола, 1 мл смеси этанол-вода (1:1), 1.5 мл смеси метанол-вода (1:1) или 5 мл смеси ацетонитрил-вода (1:1).

Таким образом, в соответствии с ТЗ, разработана методика концентрирования метилксантинов на сверхсшитом полистироле. Методика обеспечивает степень извлечения целевых веществ из растворов не менее 95%.

2.3. Разработка методик определения ионогенных ПАВ в косметической продукции, органических кислот и катехоламинов в лекарственных препаратах

Определение ионогенных ПАВ (лауроилсаркозинат натрия) в косметической продукции. Среди огромного многообразия поверхностно-активных веществ

широко используют саркозиновые ПАВ. Произведённые из природной аминокислоты – глицина и натуральных жирных кислот, они являются экологически чистыми продуктами. Лауроилсаркозинат натрия относится к семейству биоразлагаемых анионных поверхностно-активных веществ, входящих в состав высококачественных моющих средств, зубных паст и ополаскивателей. Лауроилсаркозинат (LS^-) включают вместо более вредного додецилсульфата натрия (ДДС) в рецептуры различных косметических средств, например, в зубные пасты, шампуни, а также моющие средства. В отличие от ДДС он не обладает раздражающим и сенсibiliзирующим действием. Поэтому контроль содержания лауроилсаркозината в современных гигиенических средствах является важной задачей.

Для определения данного аниона желательно иметь ион-селективный электрод (ИСЭ), отличающийся хорошей воспроизводимостью, селективностью и высокой чувствительностью. В настоящее время в литературе отсутствует информация об использовании ионометрии для определения лауроилсаркозината.

Получен и исследован ряд ион-селективных электродов (ИСЭ) на основе ионных жидкостей. Обнаружено, что ИСЭ на основе ИЖ TDTNP-BTMPP и TOALS дают потенциометрический отклик на органические анионы, в том числе - ионогенных ПАВ.

Установлено, что ИЖ TDTNP-BTMPP проявляет исключительно анионообменные свойства. Результаты измерений потенциометрического отклика по отношению к органическим анионам представлены в табл. 13.

Таблица 13 – Электродные характеристики мембраны на основе ИЖ TDTNP-BTMPP.

Анион	S, мВ/дек	C _{min} , М	Интервал линейности, М
Sal ⁻	-27,6	$2,9 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-1} - 1 \cdot 10^{-3}$
Benz ⁻	-52,8	$2,2 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-1} - 1 \cdot 10^{-4}$
DDS ⁻	-56,9	$4,6 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-2} - 1 \cdot 10^{-5}$
LS ⁻	-59,6	$4,4 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-2} - 1 \cdot 10^{-5}$

В селективности по отношению к лауроилсаркозинату наблюдается отклонение от классической гофмейстеровской зависимости (рис. 13), которое выражается в отсутствии влияния салцилат- и бензоат-анионов.

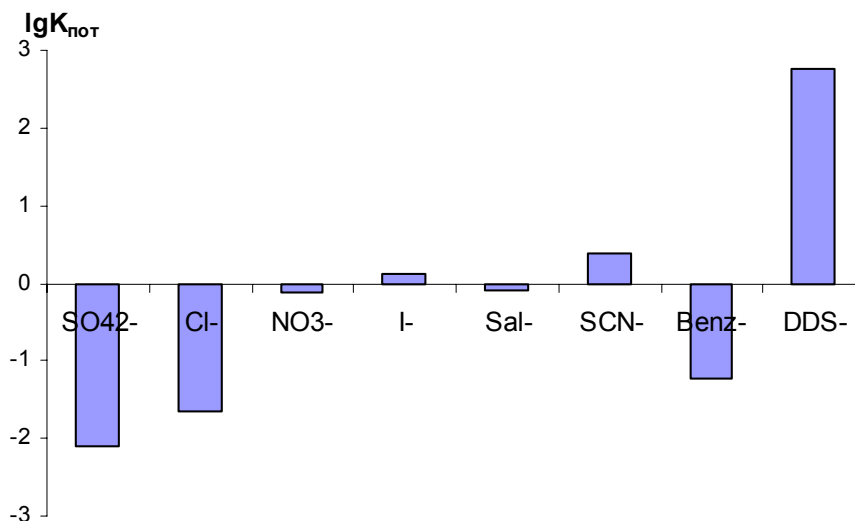


Рисунок 13 – Селективность мембраны на основе ИЖ TDTHP-ВТМРР по отношению к лауроилсаркозинату в присутствии посторонних анионов.

В состав ИЖ TOALS входит лауроилсаркозинат, т.е. она представляет собой уже готовое электродноактивное соединение для ионометрического определения этого аниона. Мы сравнили электрохимические характеристики мембран на основе 2-х разных ИЖ. Полученные данные представлены в табл. 14 и на рис. 14.

Таблица 14 – Метрологические характеристики определения лауроилсаркозината с разработанными ИСЭ на основе ионных жидкостей.

ИЖ	S, мВ/дек	C _{min} , М	Интервал линейности, М
TDTHP-ВТМРР	-58,7	$4,0 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-2} - 1 \cdot 10^{-5}$
TOALS	-43,7	$3,7 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-2} - 1 \cdot 10^{-4}$

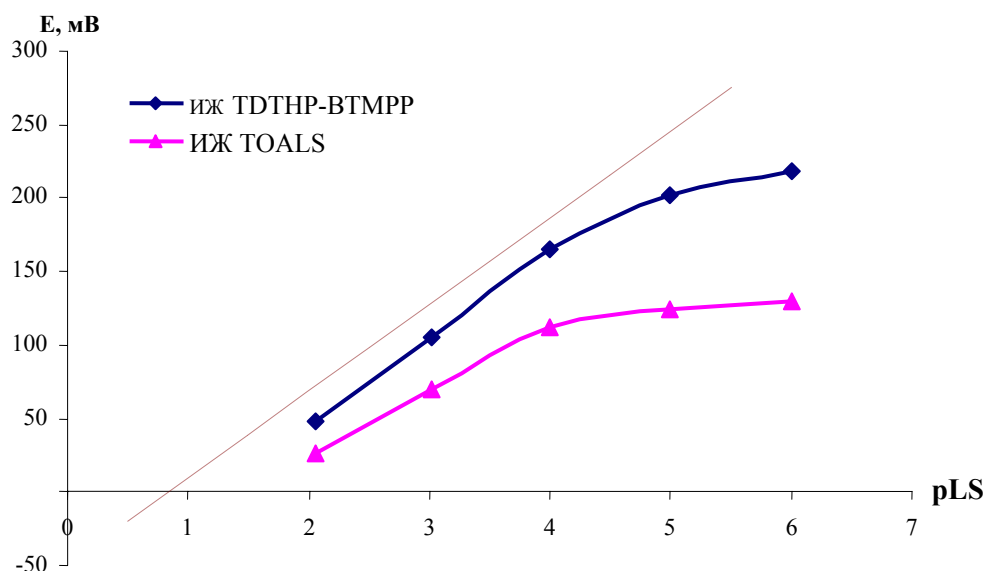


Рисунок 14 – Электродные функции мембран на основе ИЖ TDTHP-BTMPP и TOALS в растворах лауроилсаркозината натрия.

Мембрана на основе фосфониевой ИЖ обладает лучшим откликом на лауроилсаркозинат. Данная ионная жидкость TDTHP-BTMPP содержит более гидрофобный катион, что обеспечивает более эффективное связывание целевого иона. Кроме того, наличие крупных объемных заместителей при атоме азота ИЖ TOALS, очевидно, снижает доступность её анионообменного центра. Отметим также, что растворимость этих ИЖ в воде значительно различается – $1,1 \cdot 10^{-4}$ М для ИЖ TOALS и $1,5 \cdot 10^{-5}$ М для ИЖ TDTHP-BTMPP, что говорит о большей привлекательности последней как электродноактивного компонента мембраны ИСЭ.

В целом пределы обнаружения лауроилсаркозината находятся на уровне $10^{-6} - 10^{-5}$ М.

Ниже приведена разработанная методика определения лауроилсаркозината в зубной пасте.

Навеску зубной пасты массой 1,0000 г растворили в 1 л воды. Для анализа отбирали аликвоту объемом 15,00 мл, к которой последовательно добавляли 0,50 мл стандартного раствора. Определение лауроилсаркозината при помощи ИСЭ на основе ИЖ TDTHP-BTMPP проводили методом двойной стандартной добавки, позволяющем проводить определение в растворах где крутизна электродной

функции не установлена. В качестве стандарта использовался 0,0100 М раствор лауроилсаркозината натрия. Полученные результаты представлены в табл. 15.

Таблица 15 – Определение содержания лауроилсаркозината в реальном объекте (n=3, P=0,95)

Название объекта	Найдено	s_r	Содержание по рецептуре
Зубная паста «Brilard»	0,17±0,01 М	0,02	0,17 М

Как видно, содержание лауроилсаркозината соответствует заявленному в рецептуре, относительное стандартное отклонение не превышает 0,02 что позволяет рекомендовать предложенный ИСЭ для определения лауроилсаркозината в реальных объектах.

Определение органических кислот в лекарственных препаратах. ИЖ TOALS также использована в качестве электродноактивного компонента мембран ИСЭ, обратимых к органическим кислотам (анионы аминокислот, салициловой и ацетилсалициловой кислот). Кондиционирование мембран на основе этих ИЖ в растворах солей меди и свинца приводит к существенному улучшению основных характеристик ИСЭ: снижается предел обнаружения, повышаются чувствительность и воспроизводимость определения. Предполагается, что связанный с анионом ИЖ ион металла в дальнейшем служит для дополнительного связывания аналита – аминокислоты.

ИСЭ на основе ИЖ TOMAS проявляют близкий к теоретическому отклик в растворах салицилата натрия, при этом уменьшение содержания ИЖ в мембране приводит к заметному снижению предела обнаружения. Наилучшие характеристики получены для ПВХ-мембраны, содержащей 0.5 масс. % ИЖ - крутизна электродной функции составляет 57.0 мВ/дек, C_{min} равен $5.2 \cdot 10^{-5}$ М, а время отклика не превышает 30 секунд даже в разбавленных растворах. Сродство электрода по отношению к посторонним ионам в наибольшей степени определяется их гидрофобностью и соответствует ряду липофильности Гофмейстера - мешающее влияние возрастает в ряду $SO_4^{2-} \ll F^- < CH_3COO^- < Cl^- < Br^- < NO_3^- < I^- < ClO_4^-$.

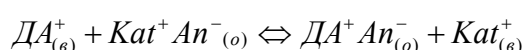
Фталоцианаты Co(III) и Sn(IV) в сочетании с ИЖ TDTNP-DA эффективны как анионные рецепторы в электродах, обратимых к салицилату и ацетилсалицилату. Печатный электрод, модифицированный TDTNP-DA и фталоцианатом Co(III)I проявляет близкий к нернстовскому отклик в широком диапазоне концентраций (10^{-1} – 10^{-5} М) салицилата и ацетилсалицилата.

Разработанные ИСЭ применены для определения ацетилсалициловой кислоты в препарате «Кардиомагнил» и триптофана в растворе, моделирующем препарат «Инфузамин». Полученные результаты соответствуют рецептурам препаратов.

В целом, пределы обнаружения анионов изученных аминокислот, салицилата и ацетилсалицилата находятся на уровне 10^{-6} – 10^{-5} М.

Определение катехоламинов в лекарственных препаратах. Катехоламины являются нейротрансмиттерами и выполняют ряд важных регулятивных функций в организме. Повышенное содержание данных соединений ведет к сердечно-сосудистым и нервно-психическим заболеваниям. Определение содержания и динамики катехоламинов в плазме крови, спинномозговой жидкости и в моче имеет огромное значение для диагностики и лечения больных в нейрохирургической практике. Очень важно применение катехоламинов в лекарственных препаратах. Адреналин часто используется в смеси с анестетиками (прилокаин, лидокаин, новокаин и др.). Добутамин является синтетическим аналогом природных катехоламинов и используется в качестве лекарственного препарата как кардиотоническое средство, поэтому контроль его содержания не менее важен, чем контроль адреналина и допамина. Ввиду широкого применения катехоламинсодержащих препаратов и их низкой стабильности, контроль содержания в них катехоламинов играет важную роль.

Наши предварительные исследования показали возможность экстракции катехоламинов в ионные жидкости. Экстракция катехоламинов отличается высокой эффективностью и происходит по катионообменному механизму:



Это открывает возможность экстракционно-вольтамперометрического определения катехоламинов и создания соответствующих модифицированных электродов для вольтамперометрии.

Мы использовали гидрофобные ИЖ различной природы (BMImPF_6 , BMImTf_2N и $\text{BDMImTf}_2\text{N}$) в составе графитовых паст для модифицирования индикаторной поверхности миниатюрных планарных электродов конструкции «3 в 1», полученных методом трафаретной печати. Такие сенсоры позволяют, по существу, выполнять экстракционно-вольтамперометрический анализ, но имеют ряд достоинств по сравнению с классической процедурой: простоту анализа (работа с водными растворами); экспрессность (отсутствует отдельная стадия экстракции); используются малые количества ионных жидкостей ($\approx 0,5$ мг). Электроды отличает миниатюрность (10 x 28 мм), дешевизна и доступность.

Изучено окисление природных (адреналин, допамин) и синтетических (добутамин) катехоламинов на модифицированных планарных электродах в режиме циклической вольтамперометрии и установлено, что процесс окисления необратим, скоростьопределяющей стадией является диффузия деполяризатора. Обнаружено, что предварительное накопление катехоламинов при нулевом потенциале приводит к существенному увеличению аналитического сигнала.

Для получения модифицированного ИЖ электрода наиболее перспективно использовать графитовые пасты, в которых ИЖ может выступать одновременно в роли связующего и экстрагента. Протекает экстракция протонированных форм катехоламинов в ИЖ по катионообменному механизму. Установлено, что оптимальное время накопления аналита составляет 4 мин; чем гидрофобнее катехоламин, тем лучше извлечение его в ИЖ и выше ток окисления, наилучшие результаты получены для добутамина.

Изучено влияние природы используемой ИЖ на параметры работы электродов; установлена связь между гидрофобностью ИЖ, аналитическими характеристиками и эксплуатационным ресурсом сенсоров на их основе. Подобраны оптимальные условия определения катехоламинов.

Установлено, что введение тетраакис-трет-бутилзамещенного фталоцианина Co(III) в состав модифицирующей пасты приводит к существенному увеличению аналитического сигнала; на примере допамина показана возможность определения в широком интервале концентраций, $C_{\min} = (6,3 \pm 0,1) \cdot 10^{-8}$ М. Показано, что введение катионообменника Nafion в модифицирующую композицию улучшает

эксплуатационные свойства электрода и позволяет определять катехоламины в присутствии 100-кратного избытка аскорбиновой кислоты.

Разработаны соответствующие методики определения катехоламинов в лекарственных препаратах. Так, планарный электрод, модифицированный BDMImTf₂N, использован для определения адреналина в лекарственной форме «Ксилокаин адреналин»; методом «введено-найдено» показано отсутствие систематической погрешности определения.

Метрологические характеристики методик определения катехоламинов при помощи электрода на основе ИЖ BDMImTf₂N и Nafion приведены в табл. 16.

Таблица 16 – Метрологические характеристики определения катехоламинов на электроде, модифицированном пастой на основе BDMImTf₂N+Nafion. Фон 0,01M H₂SO₄, 0,01M KCl; V=100 мВ/сек (P=0,95; n=3).

Катехоламин	Диапазон линейности (М)	Предел обнаружения C _{min} , М
Адреналин	$2,9 \cdot 10^{-7} - 1,0 \cdot 10^{-4}$	$(1,31 \pm 0,06) \cdot 10^{-7}$
Допамин	$6,1 \cdot 10^{-7} - 1,0 \cdot 10^{-4}$	$(4,72 \pm 0,08) \cdot 10^{-7}$
Добутамин	$1,7 \cdot 10^{-7} - 1,0 \cdot 10^{-4}$	$(0,81 \pm 0,05) \cdot 10^{-7}$

Как видно, пределы обнаружения катехоламинов находятся на уровне ниже 10^{-6} М, обычно - 10^{-7} М (в ТЗ - не выше $10^{-5} - 10^{-6}$ М).

2.4. Разработка методики определения лактата в конденсате выдыхаемого воздуха.

Измерение остаточной активности фермента. Иммуобилизация ферментов является важнейшей стадией разработки биосенсора, так как необходимой составной частью биосенсора является биоузнающий элемент, иммобилизованный на рабочую поверхность трансдьюсера. Согласно литературным данным, для этой цели широко используют принцип включения фермента в полимерные мембраны. При этом предпочтительно использовать раствор уже готового полимера, избегая проведения реакции полимеризации в ферментсодержащей рабочей смеси. Упрощение процесса получения биосенсоров позволяет добиться высокой

воспроизводимости, что является необходимым условием для их массового производства.

Так как биосенсоры используют для работы в водной среде, то для иммобилизации необходимо применять мембраны, нерастворимые в воде. Полимеры, образующие такие мембраны, растворяются только в органических растворителях. Таким образом, при смешивании фермента и полимера нельзя избежать контакта белка с органическим растворителем. Детальное исследование поведения ферментов в средах с низким содержанием воды началось около 15 лет назад и получило название «неводная энзимология». Было показано, большинство ферментов довольно стабильны в смесях с содержанием воды 10 – 15% [97].

В нашей лаборатории был разработан способ иммобилизации ферментов в пленки нерастворимого полимера на поверхности трансдьюсера, состоящий из нескольких стадий (экспонирование фермента в водно-органическую смесь, смешивание с истинным раствором полимера, нанесение на поверхность трансдьюсера и высушивание) [97]. Формирование мембраны происходит из истинного раствора полимера, что является преимуществом данного способа, так как при этом повышается однородность, активность и стабильность мембран.

Растворитель, изопропиловый спирт, быстро испаряется (в течение нескольких минут) из нанесённой на поверхность рабочего электрода смеси с силоксаном и ферментом. Вся дальнейшая работа с биосенсором проходит в среде водного буферного раствора. Следовательно, необходимо выяснить, не инактивируется ли фермент во время непродолжительного контакта (примерно 10 минут) с водно-органической смесью с малым содержанием воды.

Для этого была исследована зависимость остаточной активности фермента ЛОД от состава мембраны. Необходимо заметить, что при приготовлении водно-органических растворов фермента в первую очередь смешивали растворитель с водой, а затем к полученной смеси добавляли водный раствор фермента. Именно такой порядок смешивания реагентов обеспечивал высокую остаточную активность фермента.

На рис. 15 приведены данные об остаточной активности фермента ЛОД из *Pediococcus species* после инкубирования в течение 10 минут в смесях вода-изопропанол и при последующем тестировании в водном буферном растворе.

Величины активности указаны относительно исходной активности водного раствора фермента (100%). Каждую точку на графике измеряли по 5 раз.

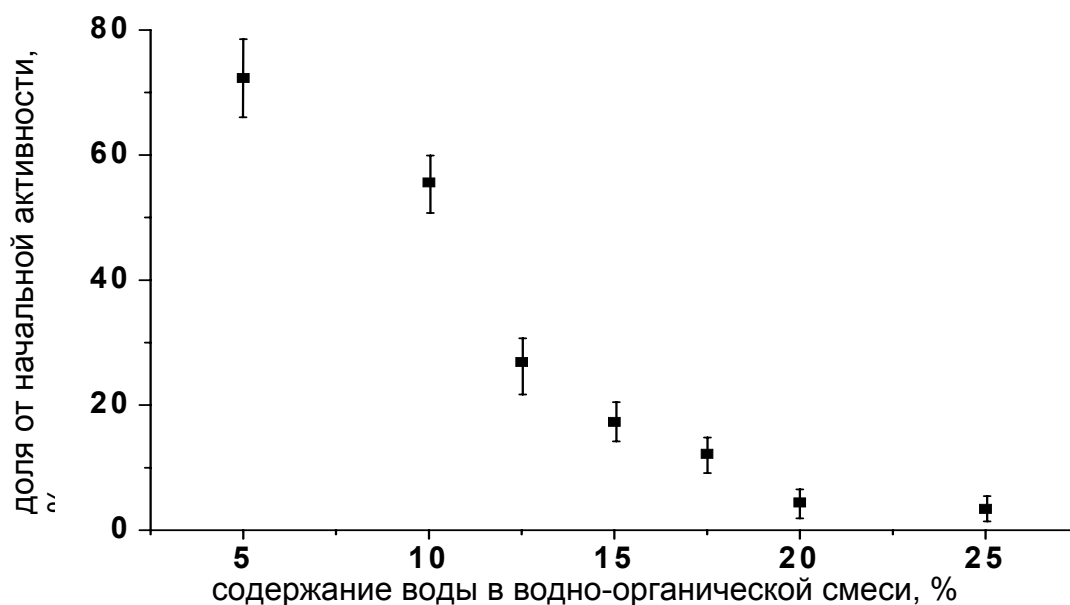


Рисунок 15 – Остаточная активность лактатоксидазы в смесях вода-изопропанол после инкубирования в течение 10 минут.

Зависимость остаточной активности лактатоксидазы от содержания воды в водно-органической смеси представляет собой сигмовидную кривую с высоким плато активности в районе 5-10% с постепенным снижением активности от 10 до 20%. Для дальнейшей работы было выбрано содержание воды в мембране 10%, так как в этом случае сохраняется довольно высокая активность фермента и можно включить в мембрану достаточное его количество, избегая больших погрешностей при отборе пипеткой нужного объёма водного раствора.

Тестирование разработанного лактатного биосенсора. Для оценки аналитических характеристик биосенсоры тестировали в системе ПИА. После установления фонового тока для получения градуировочной зависимости осуществляли инъектирование модельных растворов лактата (диапазон концентраций лактата $1,0 \cdot 10^{-7} \pm 1,0 \cdot 10^{-3}$ М). Среднее значение отклика лактатного биосенсора на каждый модельный раствор рассчитывали по результатам четырёх единичных измерений. Участок амперограммы, зарегистрированной при анализе модельных растворов, представлен на рис. 16.

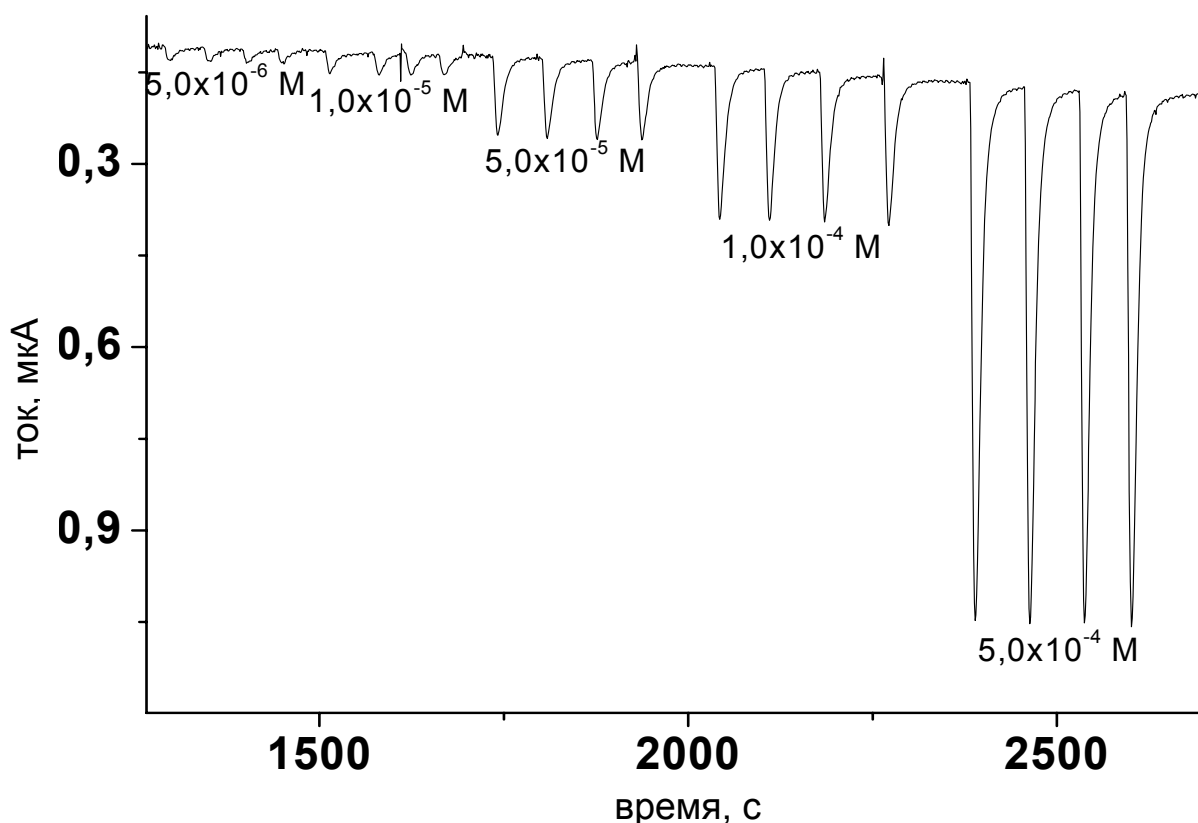


Рисунок 16 – Отклик включенного в систему ПИА биосенсора на модельные растворы лактата при построении градуировочной зависимости.

Градуировочная зависимость (рис. 17) описывается следующим уравнением:

$$I = (2,60 \pm 0,03) \cdot 10^3 C + (0,004 \pm 0,003), (P = 0,95, n = 5, r = 0,998),$$

где ток I выражен в микроамперах, а концентрация C лактата в М.

Разработанные биосенсоры обладают следующими аналитическими характеристиками: чувствительность $(8,5 \pm 0,3) \cdot 10^{-2} \text{ А} \cdot \text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$, предел обнаружения $1 \cdot 10^{-7}$ М, линейный диапазон определяемых концентраций $5 \cdot 10^{-7} \div 2 \cdot 10^{-4}$ М, относительное стандартное отклонение не более 3%

Анализ конденсата выдыхаемого воздуха. Главным условием широкого использования биосенсора является возможность его применения в анализе реальных объектов. Одной из задач данной работы было определение лактата с помощью разработанных биосенсоров в биологических жидкостях, собираемых неинвазивными методами.

Образцы КВВ были предоставлены ФГУ НИИ Пульмонологии Росздрава (группа пациентов) и Всероссийским НИИ физической культуры (группа спортсменов-членов российской сборной по кёрлингу). КВВ собирали по

стандартной методике, хранили в замороженном состоянии, размораживали непосредственно перед анализом. Размороженные образцы разбавляли буферным раствором и полученные пробы анализировали в системе ПИА.

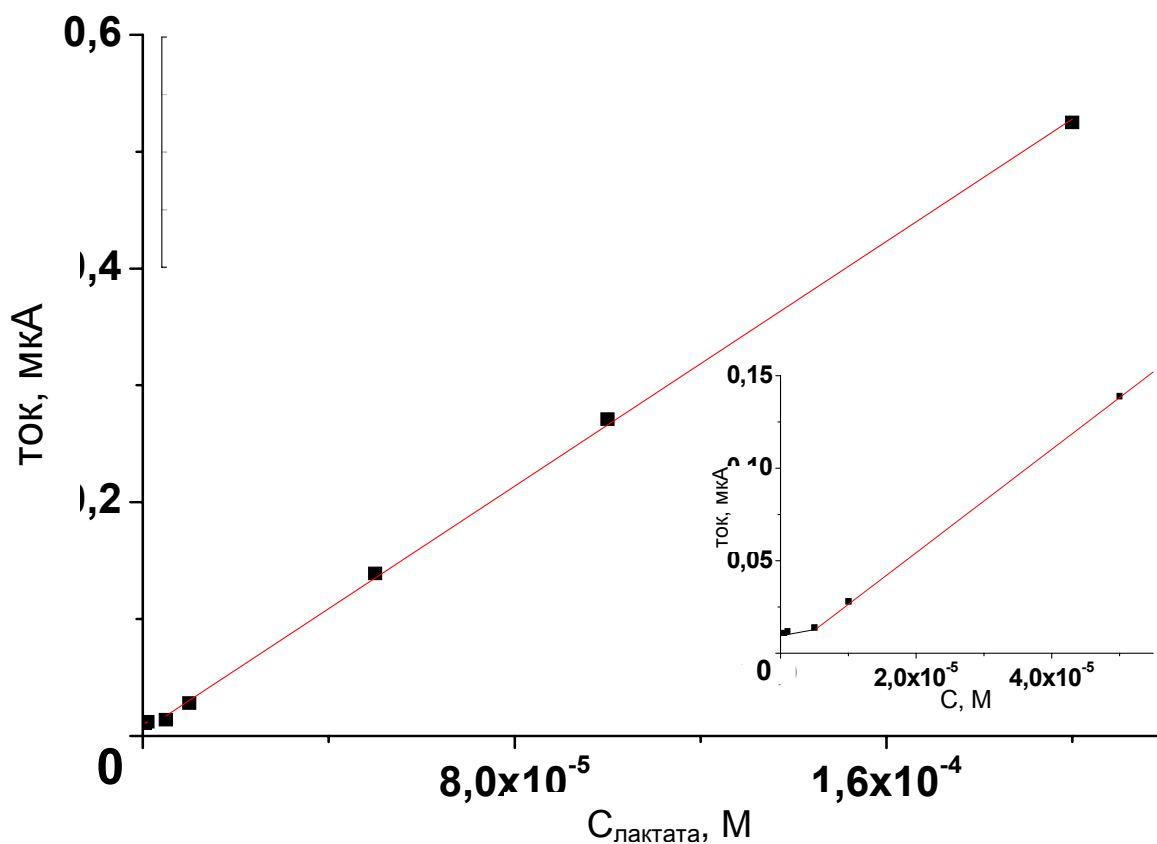


Рис. 17. Градуировочная зависимость для определения лактата в системе ПИА.

Результаты анализа КВВ у пациентов с пульмонологическими заболеваниями представлены в табл. 17.

Таблица 17 – Концентрация лактата в КВВ у группы пациентов с пульмонологическими заболеваниями.

№ пациента	Возраст	Диагноз	Концентрация лактата в исходном образце, М ($P = 0,95, n = 4$)
1	45	пневмония	$(1,8 \pm 0,1) \cdot 10^{-4}$
2	34	пневмония	$(3,0 \pm 0,4) \cdot 10^{-4}$
3	36	пневмония	$(1,6 \pm 0,1) \cdot 10^{-4}$
4	40	пневмония	$(2,4 \pm 0,3) \cdot 10^{-4}$
5	54	пневмония	$(1,2 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$

Примечание. Для анализа образцы были разбавлены буферным раствором в 10 раз. Значения концентрации представлены для неразбавленного образца.

Результаты анализа КВВ, собранного у группы спортсменов-добровольцев, представлены в табл. 18 и на рис. 18.

Таблица 18 – Концентрация лактата в КВВ у спортсменов до и после физической нагрузки.

№ спортсмена	Возраст	Концентрация лактата в КВВ, М ($P = 0,95, n = 4$)		Возрастание уровня лактата в КВВ во время физической нагрузки, раз
		До физической нагрузки	После физической нагрузки	
1	24	$(4,1 \pm 0,1) \cdot 10^{-5}$	$(4,9 \pm 0,2) \cdot 10^{-5}$	1,2
2	22	$(3,9 \pm 0,3) \cdot 10^{-5}$	$(5,2 \pm 0,1) \cdot 10^{-5}$	1,3
3	22	$(4,0 \pm 0,2) \cdot 10^{-5}$	$(5,8 \pm 0,2) \cdot 10^{-5}$	1,5
4	20	$(3,8 \pm 0,1) \cdot 10^{-5}$	$(5,9 \pm 0,1) \cdot 10^{-5}$	1,6
5	18	$(3,7 \pm 0,1) \cdot 10^{-5}$	$(6,1 \pm 0,2) \cdot 10^{-5}$	1,6

Примечание. Для анализа образцы были разбавлены буферным раствором в 5 раз. Значения концентрации представлены для неразбавленного образца. Физическая нагрузка представляла собой тест на отказ на беговой дорожке с линейно повышающейся скоростью.

По обоим выборкам получены следующие данные: среднее значение концентрации лактата в КВВ у пациентов с пульмонологическими заболеваниями составляет $(2,0 \pm 0,5) \cdot 10^{-4}$ М; у профессиональных спортсменов до физической нагрузки $(4,2 \pm 0,4) \cdot 10^{-5}$ М, после физической нагрузки $(5,0 \pm 0,7) \cdot 10^{-5}$ М, концентрация лактата повышается в среднем на 40%. В работе [98] были проведены исследования, доказывающие, что концентрация лактата в КВВ коррелирует с концентрацией лактата в артериальной крови. Таким образом, в будущем анализ артериальной крови на лактат можно будет заменить на неинвазивный анализ КВВ. Кроме того, концентрация лактата в КВВ у

профессиональных спортсменов как минимум в два раза ниже, чем у пациентов с диагнозом пневмония.

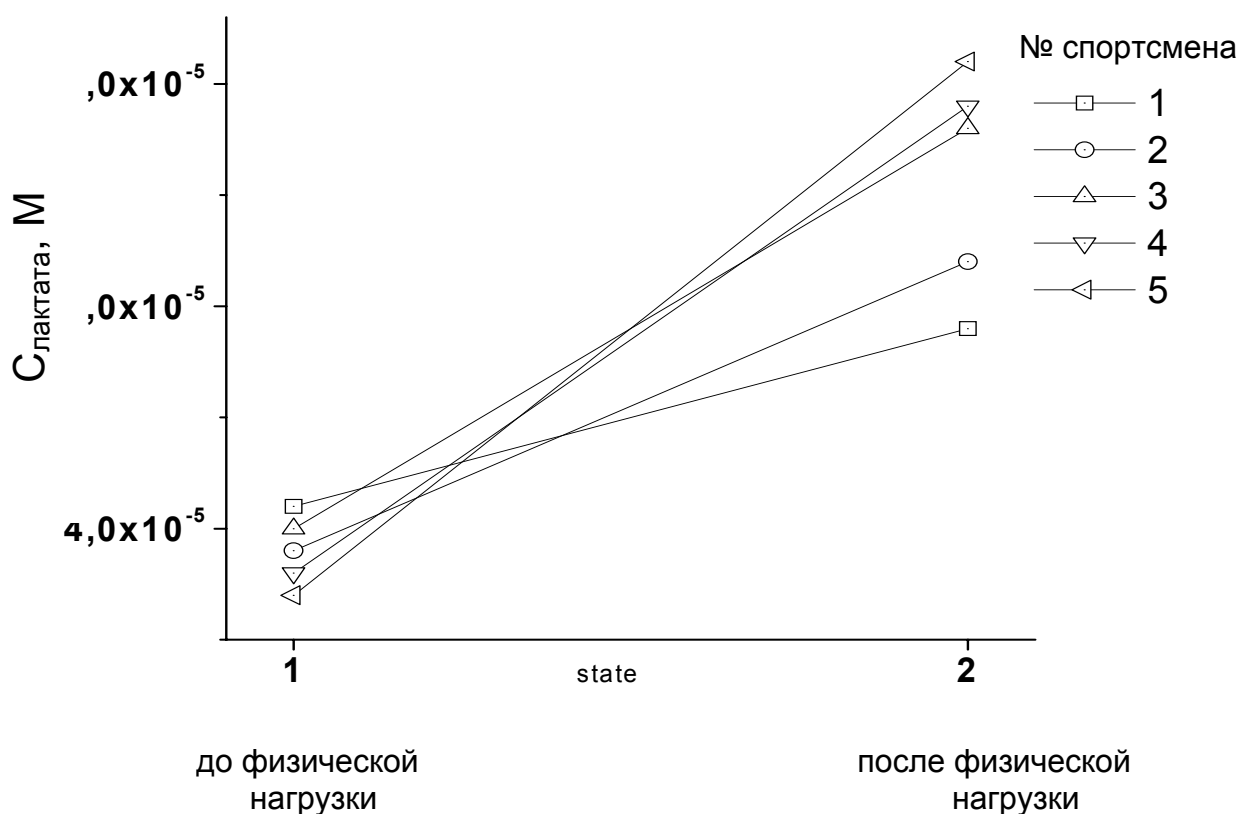


Рисунок 18 – Возрастание концентрации лактата в КВВ у спортсменов в течение физической нагрузки.

Полученные данные говорят о высокой эффективности разработанных лактатных биосенсоров на основе планарных электродов, модифицированных берлинской лазурью. Биосенсоры могут быть использованы для анализа реальных объектов, в частности, при неинвазивной диагностике в медицине и спорте.

Таким образом, разработана методика определения лактата в конденсате выдыхаемого воздуха со следующими характеристиками: чувствительность $(8,5 \pm 0,3) \cdot 10^{-2} \text{ A} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$, предел обнаружения $1 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ (в ТЗ – не более $1 \cdot 10^{-7} \text{ M}$), линейный диапазон определяемых концентраций $5 \cdot 10^{-7} \div 2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, относительное стандартное отклонение не более 0,03 (в ТЗ – не более 0,05).

2.5. Разработка способа регистрации воспроизводимых масс-спектров MALDI (с матричной лазерной десорбционной ионизацией) для низкомолекулярных фармацевтических веществ

Работу проводили на масс-спектрометре фирмы Bruker модели «Ultraflex II MALDI TOF» (Германия). Ионизацию проводили азотным лазером с рабочей длиной волны $\lambda=337$ нм, максимальной энергией 100 мкДж/импульс непосредственно на мишени с регистрацией положительных ионов. Частота выстрелов – 20 Гц, количество импульсов – 50, время между импульсами, дающими суммарный спектр – 1 мкс. Регистрацию масс-спектров проводили в диапазоне 50 - 500 Д. МС-МС спектры фрагментации протонированных молекул пентоксифиллина $[M+H]^+$ регистрировали с помощью метода FAST.

В МАЛДИ-МС экспериментах использовали мишень из нержавеющей стали на 384 образца («Bruker», Германия). Растворы образцов наносили микрошприцем на 1 мкл («Hamilton», США). Объем вводимой пробы составлял 1 мкл.

При исследовании состава ионов масс-спектра MALDI в зависимости от матрицы и способа нанесения на мишень в качестве объекта исследования была выбрана фармацевтическая субстанция - пентоксифиллин (3,7-дигидро-3,7-диметил-1-(5-оксогексил)-1H-пурин-2,6-дион), степень чистоты которой по данным ВЭЖХ и элементного анализа составляла свыше 99%. В качестве матрицы использовали α -циано-4-гидроксикоричную кислоту (α -CHCA) и 2,5-дигидроксibenзойную кислоту (DHB) (табл. 19). В качестве растворителя для приготовления растворов исследуемых соединений и матриц использовалась смесь ацетонитрила и дистиллированной воды в соотношении 1:1.

Исходные растворы пентоксифиллина, α -циано-4-гидроксикоричной кислоты и 2,5-дигидроксibenзойной кислоты были приготовлены растворением сухого вещества в смеси ацетонитрил:вода. Остальные растворы получали последовательным разбавлением первоначального раствора. Исходные концентрации растворов приведены в табл. 19.

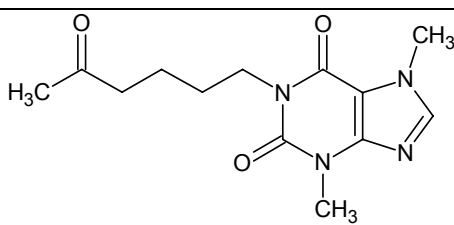
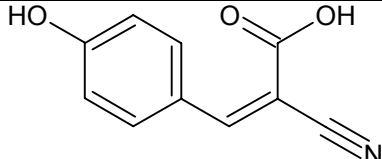
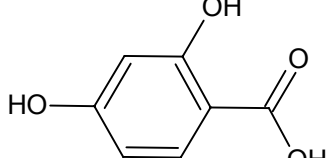
Образцы наносили на мишень следующими способами:

- наносили последовательно раствор матрицы, затем раствор аналита;
- наносили раствор, полученный предварительным смешением равных объемов растворов матрицы и аналита.

Нанесённые образцы высушивались досуха, затем мишень помещали в прибор и регистрировали масс-спектры.

При изучении влияния поверхности на масс-спектр MALDI пентоксифиллина в качестве поверхностей в работе использовались металлические мишени фирмы «Bruker» из нержавеющей стали и AnchorChip™. Планшеты AnchorChip – это мишени МАЛДИ, содержащие гидрофильные участки для образцов точно заданного размера 600 мкм в строго определенных позициях, окруженные гидрофобным покрытием.

Таблица 19 – Анализируемые вещества и матрицы, использованные в исследовании.

Название	М	Структурная формула	Исходная концентрация
Пентоксифиллин (3,7-дигидро-3,7-диметил-1-(5-оксогексил)-1Н-пурин-2,6-дион)	278,1		1 мкг/мл
α-циано-4-гидроксикоричная кислота	189,7		$2.13 \cdot 10^3$ мкг/мл
2,5-дигидроксibenзойная кислота	154,1		$1.17 \cdot 10^3$ мкг/мл

В качестве образцов использовали фармацевтическую субстанцию пентоксифиллина, степень чистоты которой по данным ВЭЖХ и элементного анализа составляла около 99,9%, и таблетированную форму лекарственного средства Трентал®, в котором в качестве активного вещества используется пентоксифиллин. В качестве матрицы использовали α-циано-4-гидроксикоричную кислоту («Bruker», Германия).

Для матрицы в качестве растворителя использовали раствор ацетонитрила и дистиллированной воды в соотношении 1:1. Концентрация раствора составляла 1 мг/мл. Образец фармацевтической субстанции пентоксифиллина готовили в виде раствора с содержанием 1 мг/мл в (ацетонитрил:вода (1:1 по объему)).

Раствор матрицы и вещества в объеме 1 мкл наносили последовательно на поверхность мишени, затем сушили на воздухе в течение 20 минут. После сушки мишени с образцами помещали в источник ионизации масс-спектрометра.

Обсуждение результатов. Одной из задач данной работы являлось исследование влияния параметров пробоподготовки и условий эксперимента на состав масс-спектра пентоксифиллина. Мы исследовали два варианта нанесения образца и матрицы на мишень, описанные выше. Обнаружено, что при различных способах нанесения образцов кристаллизация протекает по-разному. На рис. 19 представлены фотографии участков мишени с нанесенными на поверхность образцами.

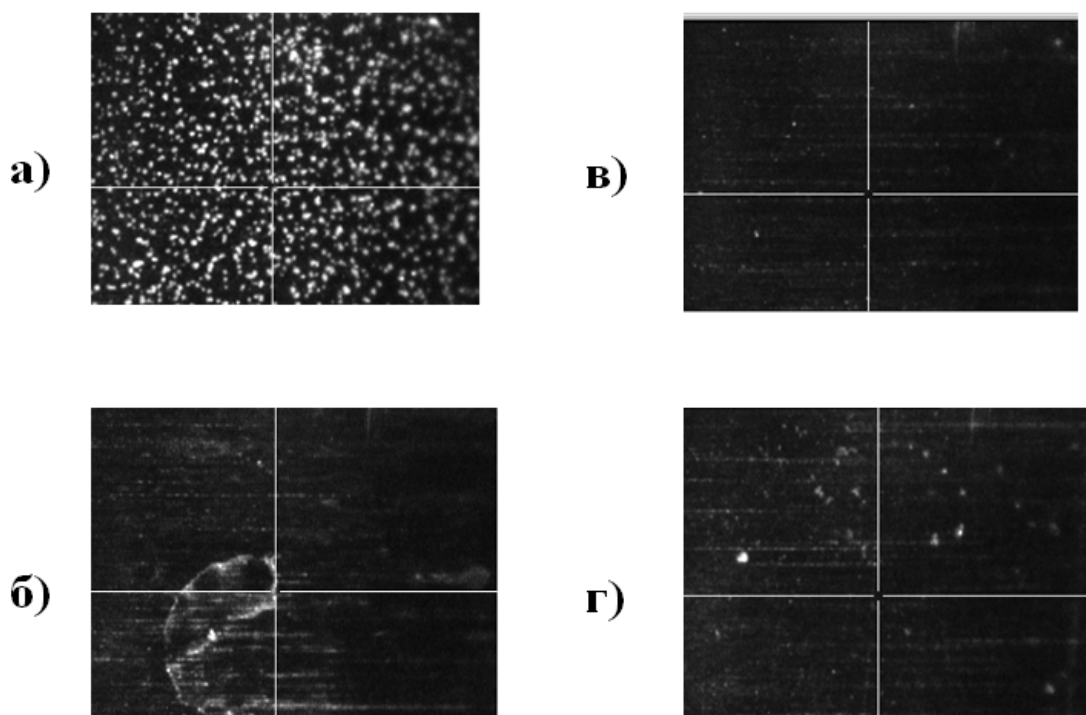


Рисунок 19 – Изображения поверхности мишени с нанесенными образцами пентоксифиллина (1 мкг/мл) с матрицами: а) α -СНСА, последовательное нанесение; б) α -СНСА, предварительное смешение; в) DHB, последовательное нанесение; г) DHB, предварительное смешение.

В случае последовательного нанесения с матрицей СНСА (а) наблюдается крупные практически равномерно распределенные кристаллы, тогда как в случае предварительного смешения (б) - мелкие кристаллы. При использовании матрицы –

DHB в обоих случаях кристаллизация приводит к образованию кристаллов едва заметных или незаметных на поверхности мишени (в, г) при данном увеличении камеры.

При этом в случае DHB для обоих способов нанесения пробы пики протонированных молекулярных ионов имеют крайне низкую интенсивность, или едва регистрируемые в масс-спектрах (рис. 20). При этом регистрируются пики ионов $[M+Na]^+$, имеющие более высокую интенсивность. Изменение соотношения матрица – аналит, мощность лазерного импульса не привело к увеличению интенсивности искоемых пиков ионов. В связи с этим дальнейшее изучение возможности применения DHB для данной фармацевтической субстанции не проводили.

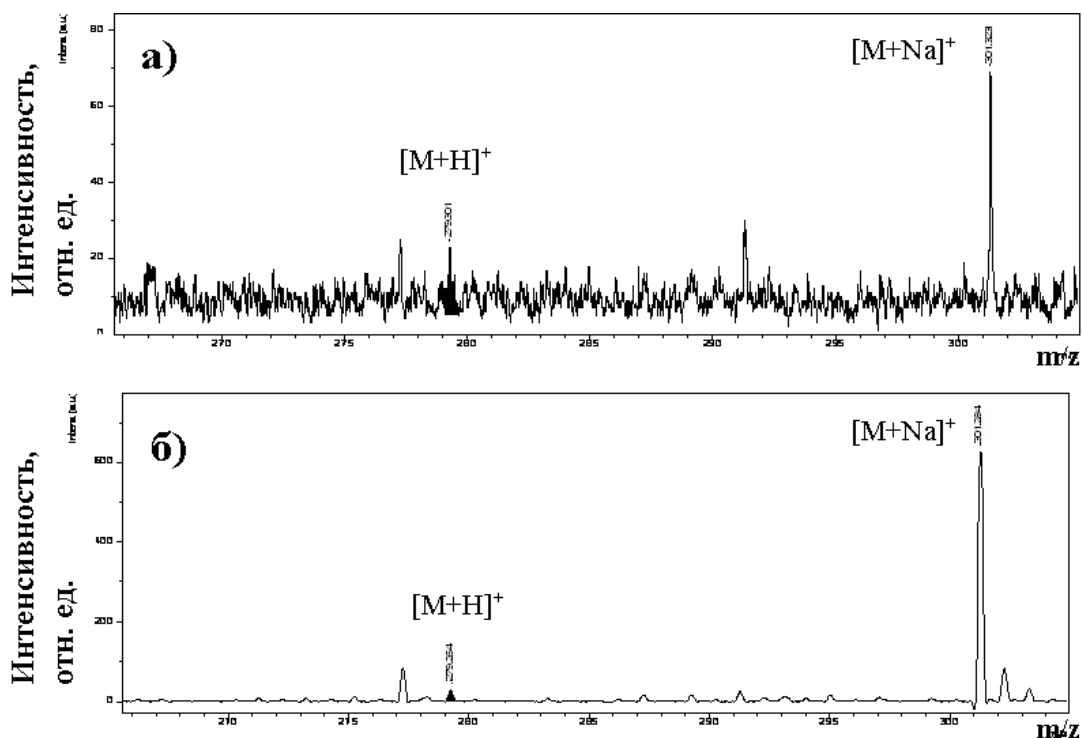


Рисунок 20. Масс-спектры МАЛДИ пентоксифиллина в присутствии матрицы DHB: а) предварительное смешение, б) последовательное нанесение.

Нанесение предварительно приготовленной смеси аналит – матрица для α -НСА также приводит к появлению в масс-спектрах МАЛДИ низкоинтенсивных пиков протонированных молекулярных ионов $[M+H]^+$ (рис. 21а). При последовательном нанесение матрицы и аналита наблюдается значительное

увеличение интенсивности пиков протонированных ионов пентоксифиллина (рис. 21б).

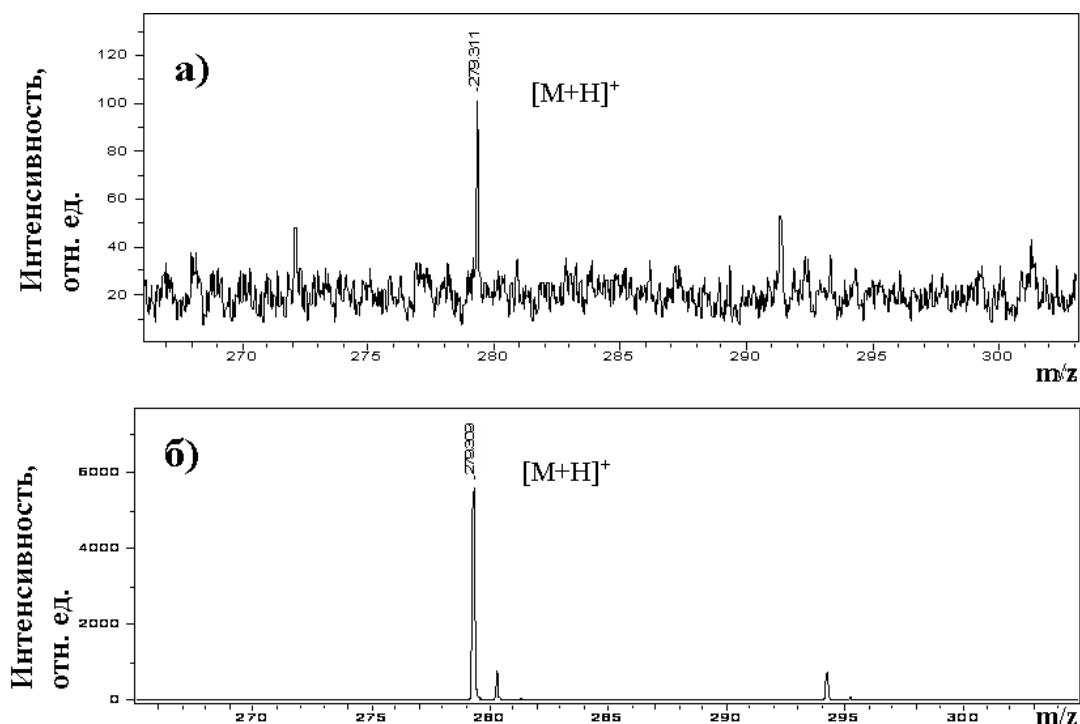


Рисунок 21 – Масс-спектры МАЛДИ пентоксифиллина в присутствии матрицы α -СНСА: а) предварительное смешение б) последовательное нанесение.

Таким образом, способ нанесения образца имеет критическое значение в анализе пентоксифиллина методом масс-спектрометрии МАЛДИ.

Известно, что величина рабочей энергии лазерного излучения существенным образом влияет на интенсивность пиков ионов, так и на уровень шума. При увеличении мощности лазерного излучения с 15 мкДж до 30 мкДж приводит к двукратному увеличению интенсивности сигнала иона $[M+H]^+$ аналита (рис. 21б и 22а). Дальнейшее увеличение мощности лазера приводит к увеличению уровня фона, при этом интенсивность сигнала аналита увеличивается в незначительной степени (рис. 22б). Следует отметить, что при энергии импульса 60 мкДж нарушается изотопное распределение, и пик протонированного молекулярного иона имеет тупую вершину, что указывает на насыщение детектора. Таким образом, оптимальной энергией лазерного излучения будет 28-44 мкДж/импульс.

Исследовали состав масс-спектров при соотношении матрица:аналит 1:1, 10:1 и 100:1 и более. Показано, что при соотношениях 100:1 и более

регистрируются высокоинтенсивные пики иона $[M+H]^+$ при высоком соотношении сигнал/шум.

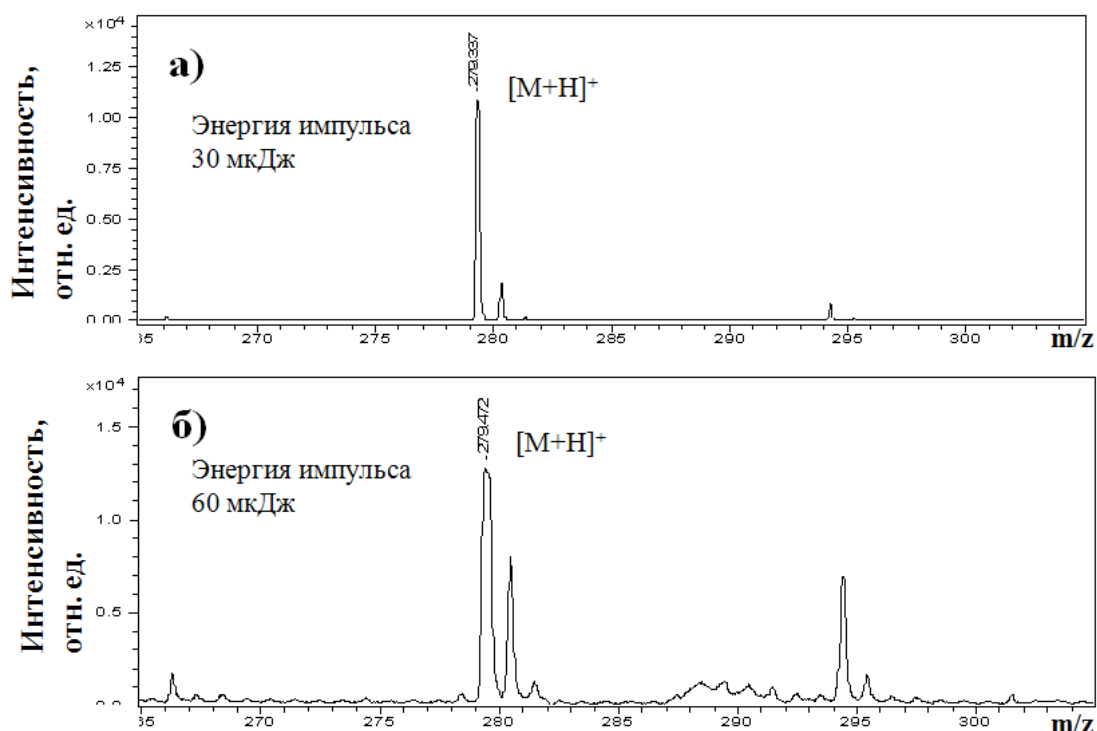


Рисунок 22 – Влияние мощности лазерного излучения на интенсивность ионов $[M+H]^+$ пентоксифиллина (матрица α -CHCA).

В выбранных условиях определили предел обнаружения пентоксифиллина методом МАЛДИ. Показано, что этим методом можно определять присутствие пентоксифиллина в растворах с использованием CHCA в качестве матрицы на уровне 8×10^{-15} моль, рис. 23.

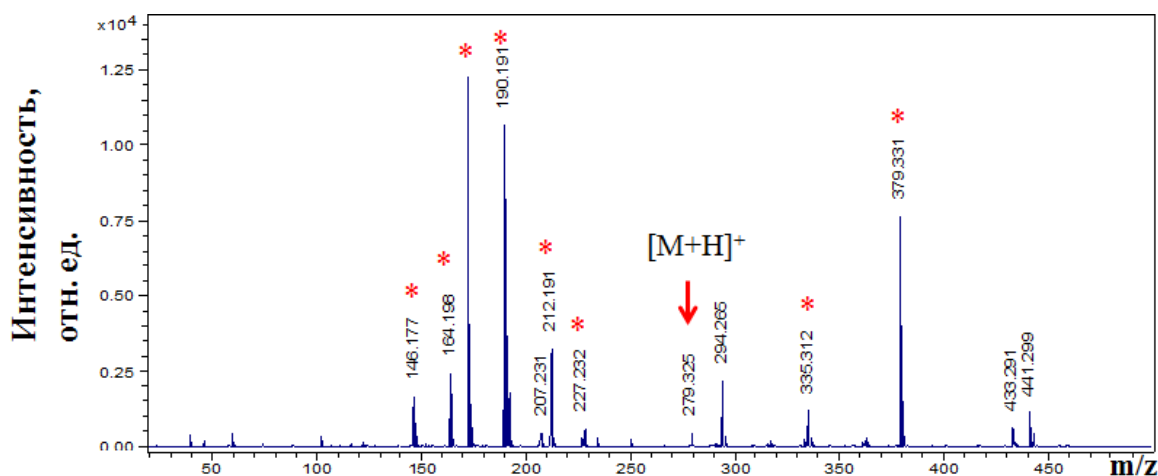


Рисунок 23 – Масс-спектр МАЛДИ пентоксифиллина в присутствии CHCA, количество вещества на мишени 2×10^{-12} г или 8×10^{-15} моль, * - пики ионов матрицы.

Предел обнаружения пентоксифиллина методом МАЛДИ, в выбранных условиях в 5 – 10 раз ниже, по сравнению с методами, использующими ионизацию электрораспылением.

Известно, что наличие пиков характеристических ионов в масс-спектрах ионизации электрораспылением или электронной ионизацией позволяет надежно идентифицировать определяемые соединения, что является важным для изучения фармакокинетики пентоксифиллина. В связи с этим нами исследованы процессы фрагментации метастабильных протонированных молекулярных ионов пентоксифиллина протекающие после ионного источника в условиях МАЛДИ-МС. Так в масс-спектрах фрагментации родительских ионов пентоксифиллина $[M+H]^+$ с $m/z = 279$ присутствуют пики характеристических ионов с $m/z = 43, 99, 138, 181$, (табл. 20).

Таблица 20 – Состав ионов вторичных масс-спектров, полученных при диссоциации иона $[M+H]^+$ пентоксифиллина в условиях ионизации МАЛДИ и электрораспыления.

Метод ионизации	Состав вторичного масс-спектра
МАЛДИ	43, 99, 138, 181, 279
Электрораспыление	99, 138, 181, 221, 279 [67]
	99, 138, 149, 181 [68]

Как видно из табл. 20, пути фрагментации оказываются схожими при этом в случае использования ионизации МАЛДИ наблюдается более глубокий распад до образования фрагментного иона с $m/z = 43$ обусловленного, по-видимому, отщеплением ацетильной группы (рис. 24).

Следует отметить, что в процессе фрагментации родительских ионов пентоксифиллина $[M+H]^+$ с $m/z = 279$ в условиях ионизации МАЛДИ не происходит образование фрагментного иона с $m/z = 221$, обусловленного элиминированием нейтральной молекулы ацетона. Видно, что в ряде случаев при ионизации электрораспылением во вторичном масс-спектре отсутствует пик иона $[M+H]$ пентоксифиллина.

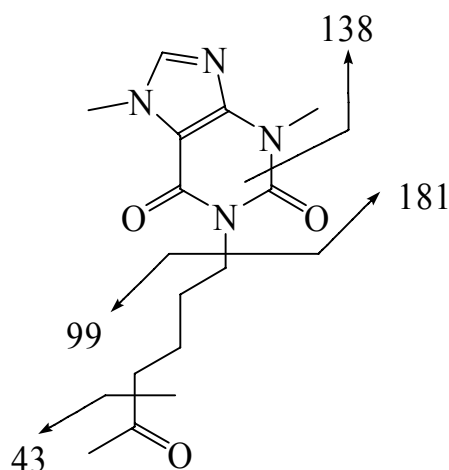


Рисунок 24. Схема фрагментации родительских ионов пентоксифиллина $[M+H]^+$ с $m/z = 279$. Ионизация методом МАЛДИ.

В масс-спектрах пентоксифиллина, нанесенного на поверхность мишени из нержавеющей стали (рис. 25а) присутствуют протонированные и катионизированные натрием и калием молекулы пентоксифиллина с m/z 279, 301 и 317 соответственно. Масс-спектры также характеризуются низкой интенсивностью пиков кластерных ионов, при этом изотопные пики ионов исследуемого вещества отсутствуют. С целью увеличения чувствительности на поверхность мишени наносили матрицу. Предварительное нанесение раствора матрицы позволило резко увеличить интенсивность пиков целевых ионов (рис. 25б). Наряду с указанными ионами в масс-спектрах присутствуют также интенсивные пики фрагментных ионов матрицы с m/z 146 и 172.

Наряду с мишенями с поверхностью из нержавеющей стали широко применяются мишени AnchorchipTM, на поверхности которых находятся участки с гидрофильными свойствами, использование которых позволяет повысить чувствительность масс-спектрометрического анализа. Нами обнаружено, что использование мишени AnchorchipTM в режиме ионизации ПАЛДИ приводит к масс-спектру, схожему с полученным при использовании стандартной мишени из нержавеющей стали.

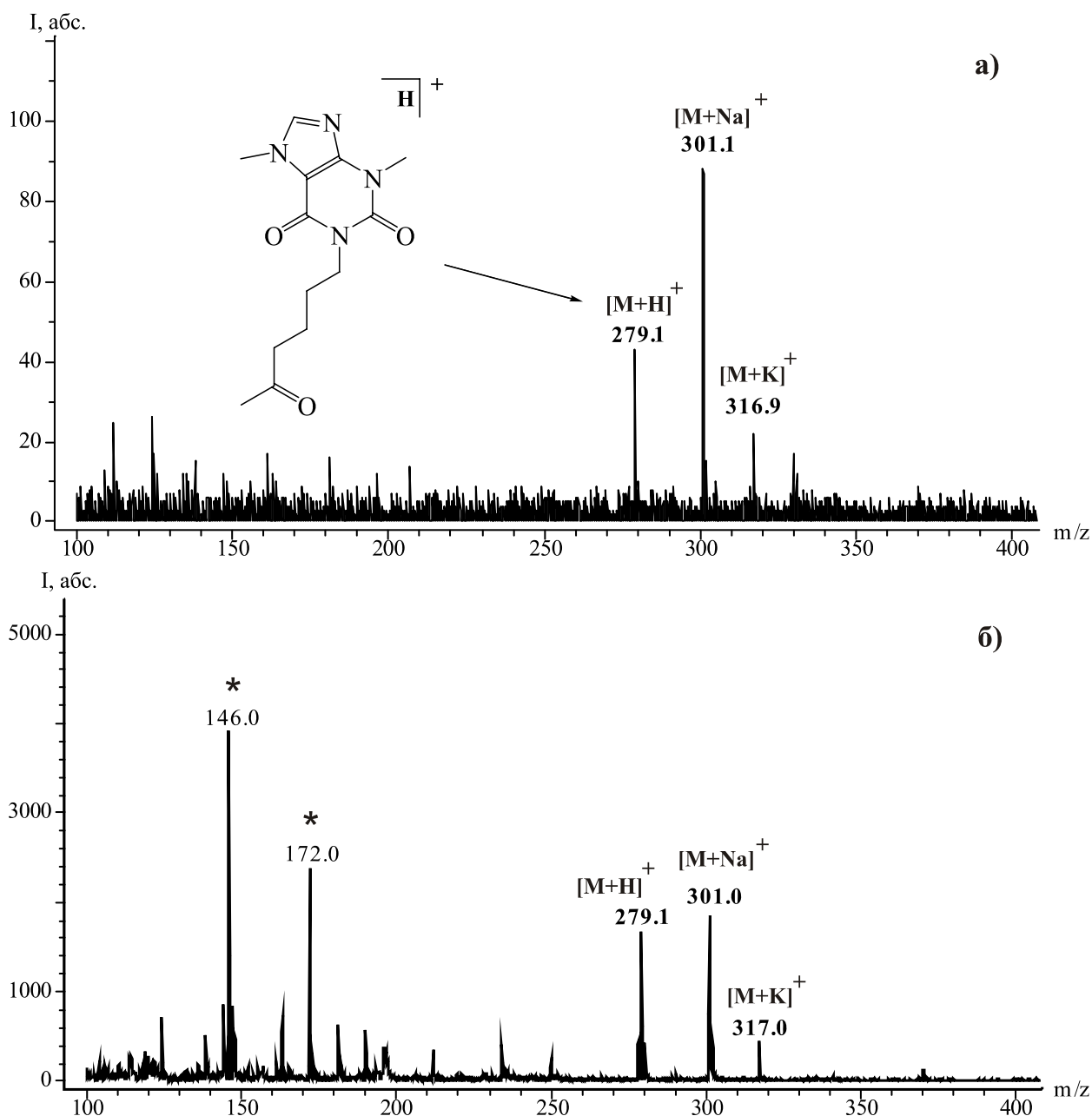


Рисунок 25. Масс-спектры субстанции пентоксифиллина, зарегистрированные в режиме положительных ионов а) с поверхности мишени (поверхность из нержавеющей стали) б) с предварительным нанесением на поверхность мишени матрицы (α -циано-4-гидроксикоричной кислоты), (содержание пентоксифиллина и матрицы на мишени по 1 мкг). *- Фрагментные ионы матрицы.

В масс-спектре, полученном в режиме ПАЛДИ с мишенью Anchorchip™ (рис. 26а), присутствуют пики ионов $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$. Интенсивность указанных ионов существенно выше по сравнению с результатами, полученными с мишенью из нержавеющей стали (табл. 21).

При переходе к методу ионизации МАЛДИ с предварительным нанесением на мишень матрицы наблюдается значительное увеличение интенсивности пиков ионов-ассоциатов пентоксифиллина (табл. 21) и целевых ионов (более значительное по сравнению с мишенью из нержавеющей стали).

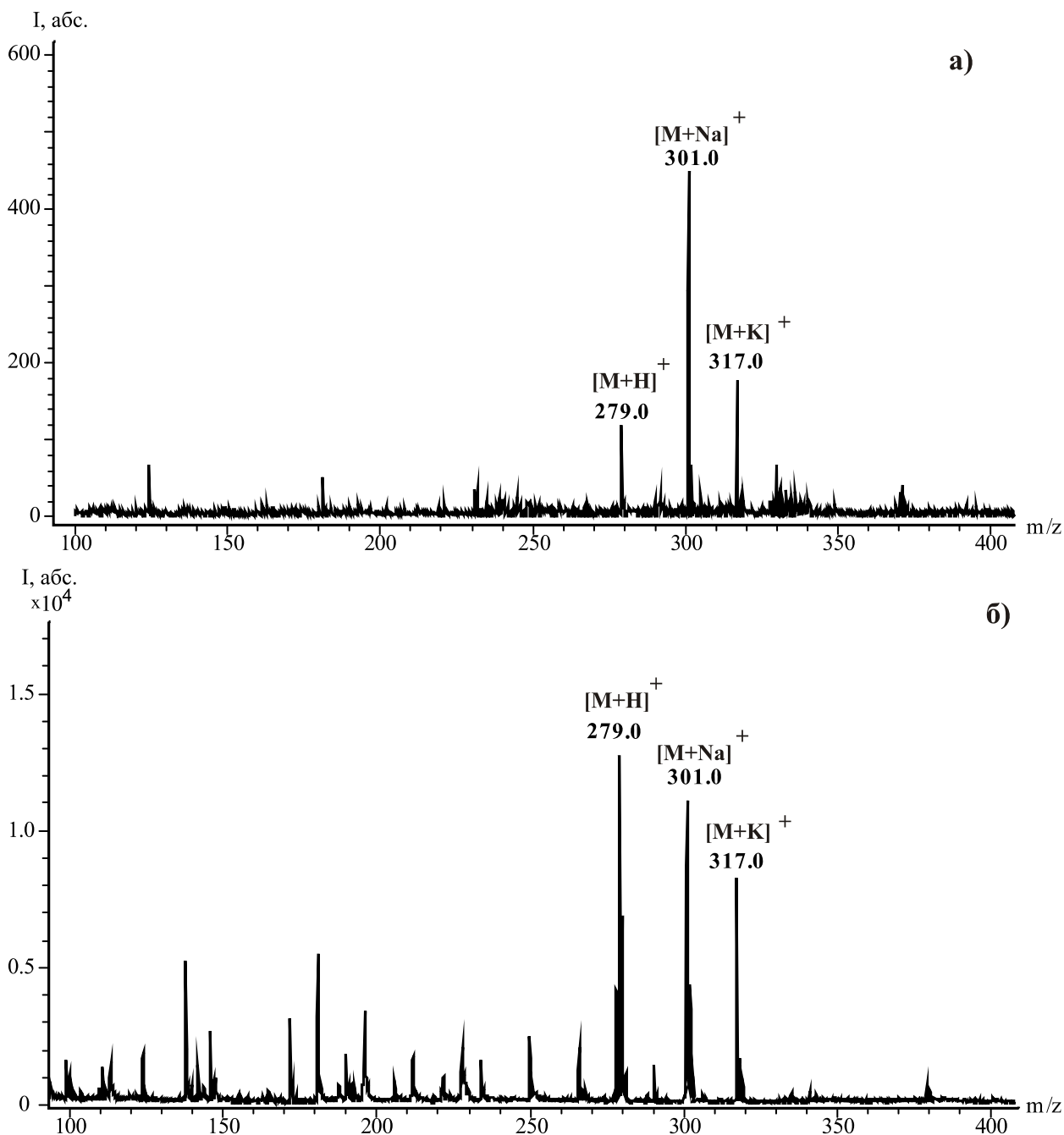


Рисунок 26 – Масс-спектры субстанции пентоксифиллина, зарегистрированные в режиме положительных ионов а) с поверхности мишени (AnchorchipTM) б) с предварительным нанесением на поверхность мишени матрицы (α -циано-4-гидроксикоричной кислоты), (содержание пентоксифиллина и матрицы на мишени по 1 мкг).

Таблица 21 – Состав масс-спектров пентоксифиллина, нанесенного на различные поверхности.

Ион	Поверхность из нержавеющей стали		Anchorchip™		Таблетка	
	без матрицы	с матрицей	без матрицы	с матрицей	без матрицы	с матрицей
$[M+H]^+$	+	+	+	+	–	+
$[M+Na]^+$	+	+	+	+	+	+
$[M+K]^+$	+	+	+	+	–	–

Данное обстоятельство может быть объяснено более высоким содержанием полярного пентоксифиллина в гидрофильной области поверхности мишени Anchorchip™. Наблюдается также изменение соотношения пиков ионов $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$ (Рисунок 26б).

Существенные изменения в интенсивностях пиков ионов пентоксифиллина при переходе от метода ионизации ПАЛДИ к МАЛДИ связано по-видимому с низким поглощением молекулами пентоксифиллина УФ-излучения, соответствующего 337 нм и более выраженной кислотностью матрицы по сравнению с самим пентоксифиллином.

На рис. 27а приведен масс-спектр размолотой таблетки, содержащей пентоксифиллин, зарегистрированный без добавления матрицы, из которого видно, что присутствует только пик иона $[M+Na]^+$, а пик протонированного иона отсутствует.

Напротив, нанесение матрицы на поверхность размолотой таблетки приводит к увеличению интенсивности пика иона $[M+Na]^+$ и регистрации высокоинтенсивного протонированного молекулярного иона (рис. 27б). Следует отметить, что при данном способе анализа пики ионов матрицы, а также пики ее фрагментных ионов зарегистрированы не были. При этом соотношение сигнал/шум для пика протонированного молекулярного иона значительно выше, чем для мишени из нержавеющей стали и мишени Anchorchip™ (табл. 22).

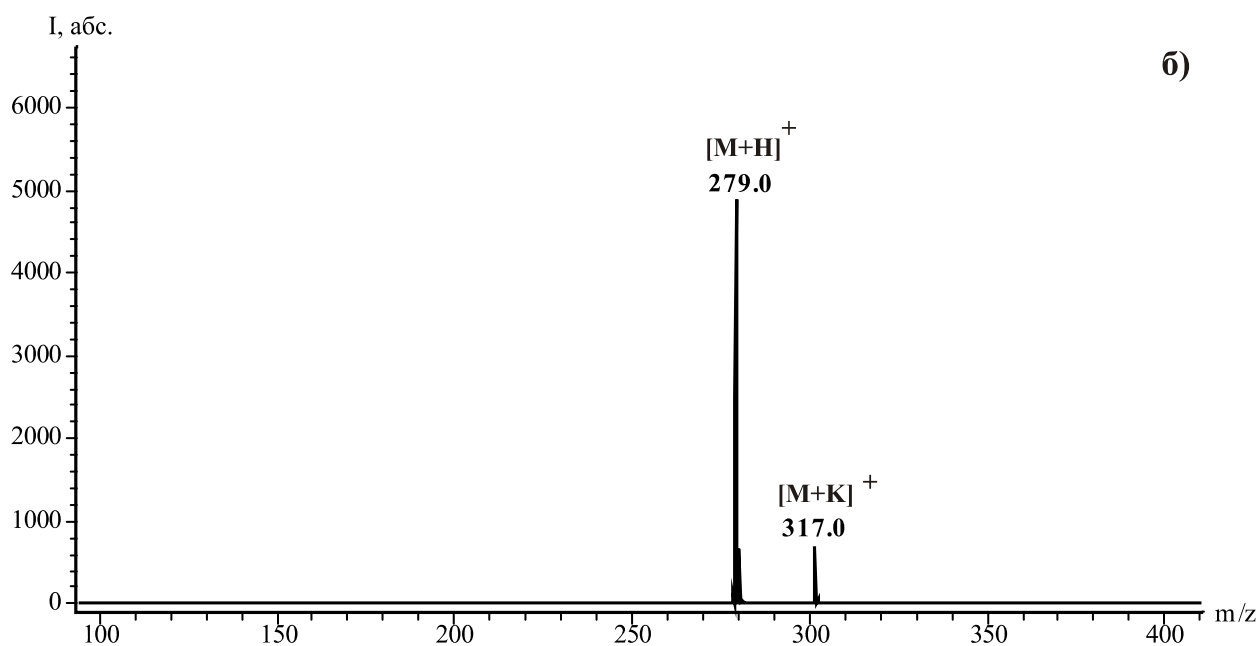
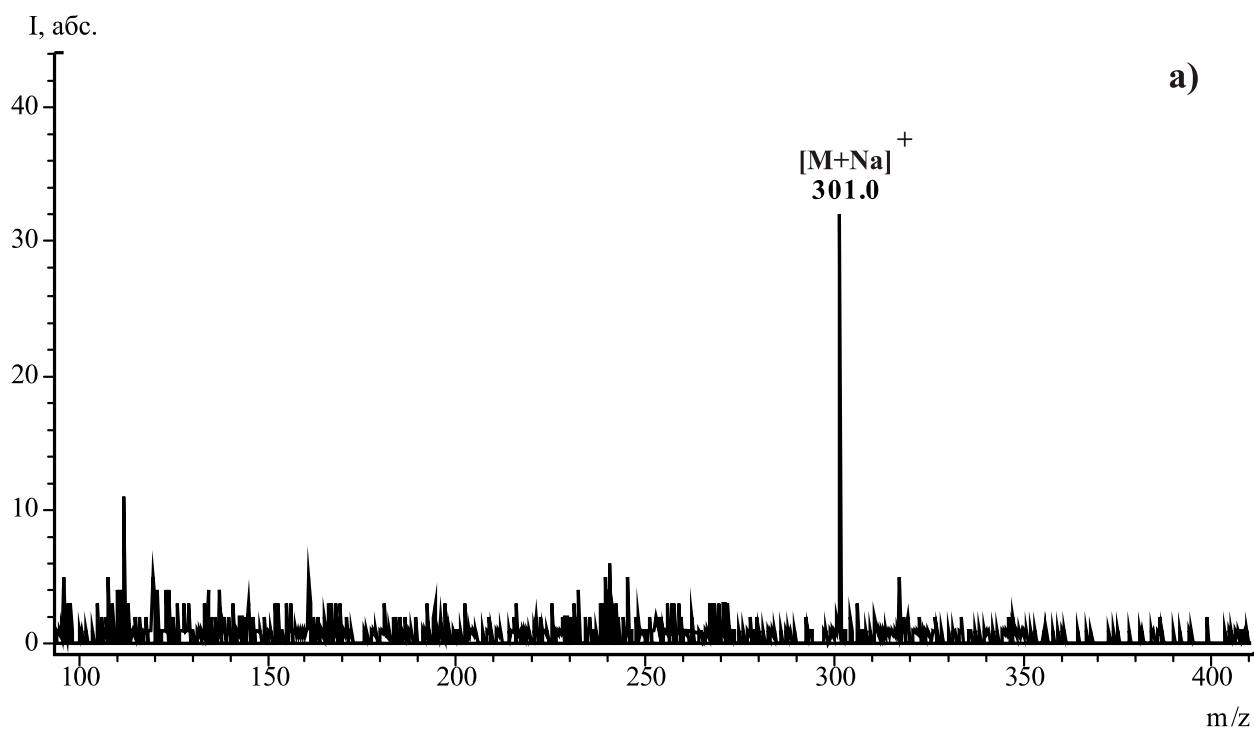


Рисунок 27 – Масс-спектры пентоксифиллина в таблетированной форме, зарегистрированные в режиме положительных ионов а) с поверхности мишени (поверхность из нержавеющей стали) б) с предварительным нанесением на поверхность мишени матрицы (α -циано-4-гидроксикоричной кислоты), (содержание пентоксифиллина и матрицы на мишени по 1 мкг).

Таблица 22 – Масс-спектрометрические характеристики пентоксифиллина относительная интенсивность (I,%), абсолютная интенсивность (I,абс), соотношение сигнал/шум (S/N) и разрешение ($m/\Delta m$), регистрируемые на исследованных поверхностях для протонированного иона пентоксифиллина $[M+H]^+$.

Характеристика	Поверхность из нержавеющей стали		Anchorchip™		Таблетка	
	без матрицы	с матрицей	без матрицы	с матрицей	без матрицы	с матрицей
I, %	49	43	27	100	–*	100
I, абс.	43	1676	120	12750	–	4877
S/N	14	141	20	227	–	8144
$m/\Delta m$	1893	1794	1927	738	–	1953

Таким образом, исследованы различные варианты нанесения матрицы и вещества на мишень. Исследован состав ионов в масс-спектре МАЛДИ в зависимости от матрицы и соотношения матрица/аналит для данной фармацевтической субстанции. Показано, что матрица α -циано-4-гидроксикоричная кислота является более подходящей для определения пентоксифиллина, подобрано соотношение матрица/аналит, при котором достигается наилучшее соотношение сигнал/шум. Установлено что данным методом можно определять пентоксифиллин с матрицей СНСА до уровня $8 \cdot 10^{-15}$ моль. Изучен состав ионов вторичного масс-спектра пентоксифиллина, полученного в результате фрагментации иона с $m/z=279$, образованного при ионизации методом МАЛДИ. Проведено сопоставление этого масс-спектра и вторичных масс-спектров, полученных в результате ионизации электрораспылением.

Выводы. Показано, что масс-спектральный анализ субстанций пентоксифиллина в режиме ионизации ПАЛДИ на всех исследованных поверхностях характеризуется низкой чувствительностью анализа. Переход к МАЛДИ позволяет увеличить интенсивность целевых ионов. Добавка матрицы на поверхность размельченной таблетки позволяет, как повысить интенсивность пиков ионов пентоксифиллина, так и устранить пики ионов, соответствующих матрице и обеспечивает возможность обнаружения пентоксифиллина в таблетках благодаря регистрации воспроизводимых масс-спектров MALDI.

Разработан способ регистрации воспроизводимых масс-спектров MALDI (с матричной лазерной десорбционной ионизацией) для низкомолекулярных фармацевтических веществ, обеспечивающий получение воспроизводимых спектров при содержании целевых компонентов не выше 10^{-7} г (в ТЗ – не выше 10^{-7} г).

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

(в т.ч. о результатах достижения в 2011 г. индикаторов и показателей,
установленных техническим заданием государственного контракта)

3.1. Статьи, опубликованные по результатам выполнения государственного контракта.

1. Золотов Ю.А. Разделение и концентрирование веществ: место в химическом анализе. Заводск. лаб. Диагностика материалов. 2012. Т. 78. № 1. Ч. 1. С. 5 – 6.
2. Золотов Ю.А. Вступительное слово председателя Научного совета РАН по аналитической химии на годичной сессии совета. Журн. аналит. химии. 2012. Т. 67. № 2. С. 223 – 224.
3. Золотов Ю.А. Озоновая дыра. Журн. аналит. химии. 2012. Т. 67. № 1. С. 3.
4. Золотов Ю.А. Пил или не пил. Журн. аналит. химии. 2012. Т.67. № 2. С. 115.
5. Золотов Ю.А. Идентификация микроорганизмов аналитическими методами. Журн. аналит. химии. 2012. Т. 67. № 3. С. 227.
6. Золотов Ю.А. Съезды, конференции, симпозиумы... Журн. аналит. химии. 2012. Т. 67. № 4. С. 339.
7. Золотов Ю.А. Ионные жидкости. Журн. аналит. химии. 2012. Т. 67. № 4. С. 451 – 452.
8. Моросанова Е.И., Беляков М.В., Золотов Ю.А. Кремний-титановые ксерогели: твердофазно-спектрофотометрическое и тест-определение

- пероксида водорода в дезинфицирующих средствах. Журн. аналит. химии. 2012. Т. 67. № 2. С. 186 – 190.
9. Моросанова Е.И., Беляков М.В., Золотов Ю.А. Кремний-титановые ксерогели: получение и использование для определения аскорбиновой кислоты и полифенолов. Журн. аналит. химии. 2012. Т. 67, № 1. С. 17 – 23.
 10. Ставрианиди А.Н., Родин И.А., Браун А.В., Шпигун О.А., Попик М. В. Одновременное определение салидрозида, розарина и розавина в экстрактах из *Rhodiolarosea* методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием. Масс-спектрометрия. 2012. Т.9. № 1. С. 61 – 66.
 11. Родин И.А., Шпигун О.А. Современные тенденции развития метода жидкостной хроматографии. Заводская лаборатория. 2012. Т. 78. № 1. С. 6 – 17.
 12. Родин И.А., Смоленков А.Д., Шпигун О.А. Спектрофотометрические и флуориметрические методы определения гидразина и его метилированных аналогов. Журн. аналит. химии. 2012. Т.67. № 2. С. 133 – 149.
 13. Смирнов Р.С., Смоленков А.Д., Родин И.А., Татаурова О.Г., Шпигун О.А. Влияние условий пробоподготовки на определение валовой концентрации несимметричного диметилгидразина в почвах. Журн. аналит. химии. 2012. Т.67. № 1. С. 9 – 16.
 14. Родин И.А., Смирнов Р.С., Смоленков А.Д., Кречетов П.П., Шпигун О.А. Трансформация несимметричного диметилгидразина в почвах. Почвоведение. 2012. №4. С. 439 – 444.
 15. Шаповалова Е.Н., Ананьева И.А., Елфимова Я.А., Гринева Л.А., Мажуга А.Г., Шпигун О.А. Разделение азотсодержащих соединений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на силикагеле, модифицированном наночастицами золота, стабилизированными хитозаном. Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2012. Т. 53. № 2. С. 108 – 114.
 16. Темердашев З.А., Цизин Г.И. Третий Всероссийский симпозиум «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии». Журн. аналит. химии. 2012. Т. 67. № 6. С. 666 – 668.

17. Вахрушев М.К., Ревельский А.И., Оленин А.Ю., Белобородова Н.В. Разработка условий дериватизации фенолкарбоновых кислот, выделенных из сыворотки крови, с использованием метода газовой хроматографии/масс-спектрометрии. // Масс-спектрометрия. 2012. Т. 9. № 1. С. 36 – 43.
18. Самохин А.С., Ревельский И.А. Интенсивность пика молекулярного иона в масс-спектрах электронной ионизации. // Масс-спектрометрия. 2012. Т. 9. № 1. С. 58 – 60.
19. Леднева А.В., Федосеева М.В., Голубева А.В., Ревельский А.И., Чепелянский Д.А., Ревельский И.А. Быстрый скрининг проб растительных масел на содержание F-, Cl, Br-, S- органических соединений. // Заводская лаборатория. 2012. Т. 78. № 3. С. 19 – 21.
20. Алов Н.В., Куцко Д.М.. Изменение состава поверхности высшего оксида вольфрама при бомбардировке ионами He⁺. Поверхность. 2012. № 3. С. 38 – 41.
21. Fedyunina N.N., Seregina I.F., Bolshov M.A., Okina O.I., Lyapunov S.M. Investigation of the efficiency of the sample pretreatment stage for the determination of the Rare Earth Elements in rock samples by inductively coupled plasma mass spectrometry technique Anal. Chim. Acta. 2012. V. 713. P.97 – 102.

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

1. Ревельский Александр Игоревич «Методология анализа объектов различного происхождения методами газовой хроматографии-масс-спектрометрии и элементного анализа на содержание следов среднелетучих органических веществ». Дата защиты – 14 марта 2012 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. Федосеева Марина Владиславовна «Новый подход к контролю качества чистых органических веществ и фармацевтических препаратов, основанный на элементном анализе». Дата защиты – 15 февраля 2012 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. Беляков Михаил Владимирович «Синтез и применение кремнийтитановых золь-гель материалов для твердофазно-спектрофотометрического и тест-определения аскорбиновой кислоты, полифенолов, дофамина и пероксида водорода». Дата защиты – 30 мая 2012 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. Гуляев Иван Владимирович «Анализ фармацевтических веществ методами газовой хромато-масс-спектрометрии и капиллярной хроматодистилляции-масс-спектрометрии». Дата защиты – 30 мая 2012 г. Специальность 02.00.02 – Аналитическая химия. Диссертационный совет Д.501.001.88 по химическим наукам при Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова.

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

№ п. п.	Фамилия Имя Отчество	Дата рождения	Должность	Учебная степень	Место работы
1	Статкус Михаил Александрович	22.06.1983	снс	кхн	Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
2	Апери Владимир Владимирович	30.04.1986	нс	кхн	Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
3	Родин Игорь Александрович	21.11.1983	снс	кхн	Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
4	Затираха Александра	14.05.1986	н.с.	кхн	Химический факультет МГУ им.

	Валерьевна				М.В.Ломоносова
5	Прохорова Александра Федоровна	01.04.1984	мнс	кхн	Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
6	Кубышев Сергей Сергеевич	26.12.1982	мнс	кхн	Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
7	Кочук Елена Валентиновна	01.07.1985	инж		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
8	Федосеева Марина Владиславовна	11.03.1985	аспи- рант		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
9	Гуляев Иван Владимирович	03.05.1986	аспи- рант		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
10	Самохин Андрей Сергеевич	02.06.1987	аспи- рант		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
11	Голубева Александра Владимировна	11.09.1989	аспи- рант		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
12	Терещенкова Анна Александровна	06.08.1989	аспи- рант		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
13	Беляков Михаил Владимирович	14.02.1987	аспи- рант		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
14	Ржевская Александра Вячеславовна	26.02.1989	аспи- рант		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
15	Буслова Татьяна Сергеевна	02.04.1989	аспи- рант		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
16	Мясникова Дина Андреевна	22.05.1989	аспи- рант		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
17	Федюнина Наталья Николаевна	30.10.1988	аспи- рант		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
18	Елфимова Яна Андреевна	16.04.1987	аспи- рант		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
19	Браун Аркадий Владимирович	06.10.1988	аспи- рант		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
20	Кузнецова Ольга Игоревна	29.07.1989	аспи- рант		Химический факультет МГУ им.

					М.В.Ломоносова
21	Соколова Лидия Сергеевна	18.11.1989	аспи-рант		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
22	Ставрианиди Андрей Николаевич	13.07.1989	аспи-рант		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
23	Бескоровайный Александр Васильевич	18.07.1990	студент		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
24	Копицын Дмитрий Сергеевич	12.01.1990	студент		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
25	Борисова Дина Рашидовна	12.01.1990	студент		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
26	Дубенский Александр Сергеевич	31.01.1990	студент		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
27	Архипова Виктория Владиславовна	09.08.1990	студент		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
28	Атнагулов Айдар Газинурович	30.09.1990	студент		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
29	Толмачева Вероника Владимировна	30.06.1991	студент		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
30	Горбунова Мария Владимировна	13.08.1992	студент		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
31	Мухаринова Александра Игоревна	05.06.1993	студент		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
32	Костромских Анастасия Андреевна	26.09.1990	студент		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
33	Назаренко Дмитрий Владимирович	01.11.1991	студент		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
34	Шаранов Павел Юрьевич	11.04.1992	студент		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
35	Лазов Михаил Александрович	26.10.1990	студент		Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова

3.5. Разработанные учебные курсы и задачи.

В рамках специализации «аналитическая химия» разработан новый лекционный курс «Тест методы анализа смесей органических соединений», 6 ч, для студентов 4 курса Химического факультета МГУ.

В рамках специализации «аналитическая химия» разработана новая задача для спецпрактикума «Определение фенолов в сточных и природных водах с предварительным сорбционным концентрированием с амперометрическим детектированием», 4 ч, для студентов 4 курса Химического факультета МГУ.

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

Разработаны методики концентрирования сульфаниламидов и метилксантинов из растворов, биологических жидкостей и жидких пищевых продуктов, обеспечивающие степень извлечения целевых веществ не менее 95 % (в ТЗ – не менее 95 %).

Разработаны методики определения ионогенных ПАВ в косметической продукции, органических кислот и катехоламинов в лекарственных препаратах, обеспечивающие определение целевых веществ с пределами обнаружения 10^{-6} - 10^{-7} М (в ТЗ - не выше 10^{-5} - 10^{-6} М).

Разработана методика определения лактата в конденсате выдыхаемого воздуха со следующими характеристиками: чувствительность $(8,5 \pm 0,3) \cdot 10^{-2}$ А·М⁻¹·см⁻², предел обнаружения $1 \cdot 10^{-7}$ М (в ТЗ – не более $1 \cdot 10^{-7}$ М), линейный диапазон определяемых концентраций $5 \cdot 10^{-7} \div 2 \cdot 10^{-4}$ М, относительное стандартное отклонение не более 0,03 (в ТЗ – не более 0,05).

Разработан способ регистрации воспроизводимых масс-спектров MALDI (с матричной лазерной десорбционной ионизацией) для низкомолекулярных фармацевтических веществ, обеспечивающий получение воспроизводимых спектров при содержании целевых компонентов не выше 10^{-7} г (в ТЗ – не выше 10^{-7} г).

3.7. Индикаторы и показатели

№	Наименование индикатора	Ед. измер.	Требования ТЗ на 2012 г.	Фактическое выполнение
И.1.1.1	Количество кандидатов наук – исполнителей НИР, представивших докторские диссертации в диссертационный совет (нарастающим итогом)	чел.	3	4
И.1.1.2	Количество аспирантов – исполнителей НИР, представивших кандидатские диссертации в диссертационный совет (нарастающим итогом)	чел.	18	16
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.	20	18
И.1.1.4	Количество исследователей – исполнителей НИР, результаты работы которых в рамках НИР опубликованы в высокорейтинговых российских и зарубежных журналах	чел.	63	58
И.1.1.5	Наличие документов, подтверждающих внедрение результатов работ в образовательный процесс	ДА/НЕТ	да	да
	Наименование показателя			
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	11
П.1.1.2	Количество молодых кандидатов наук – исполнителей НИР, работающих в научной или образовательной организации на полную ставку, принявших участие в	чел.	6	7

	работах в течение всего срока реализации НИР (как правило, соискателей ученой степени доктора наук)			
П.1.1.3	Количество аспирантов, принявших участие в работах в течение всего срока реализации НИР	чел.	12	15
П.1.1.4	Количество студентов, принявших участие в работах в течение всего срока реализации НИР	чел.	10	13
П.1.1.5	Доля привлеченных на реализацию НИР внебюджетных средств от объема средств федерального бюджета	%	20	22,7
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	51,8

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 № 4 настоящего проекта разработаны новые методы химического анализа для медицинской диагностики, а также оценки качества лекарственных препаратов, косметической продукции, пищевых продуктов.

Разработанные методики концентрирования сульфаниламидов и метилксантинов из растворов, биологических жидкостей и жидких пищевых продуктов (раздел 2.2), определения ионогенных ПАВ в косметической продукции, органических кислот и катехоламинов в лекарственных препаратах (раздел 2.3), определения лактата в конденсате выдыхаемого воздуха (раздел 2.4), способ регистрации воспроизводимых масс-спектров MALDI (с матричной лазерной десорбционной ионизацией) для низкомолекулярных фармацевтических веществ (раздел 2.5) 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 № 4 государственного контракта от 20 сентября 2010 г № 14.740.11.0365 разработаны методики концентрирования сульфаниламидов и метилксантинов из растворов, биологических жидкостей и жидких пищевых продуктов, обеспечивающие степень извлечения целевых веществ не менее 95 %, методики определения ионогенных ПАВ в косметической продукции, органических кислот и катехоламинов в лекарственных препаратах, обеспечивающие определение целевых веществ с пределами обнаружения 10^{-6} - 10^{-7} М, методика определения лактата в конденсате выдыхаемого воздуха со следующими характеристиками: чувствительность $(8,5 \pm 0,3) \cdot 10^{-2}$ А·М⁻¹·см⁻², предел обнаружения $1 \cdot 10^{-7}$ М, линейный диапазон определяемых концентраций $5 \cdot 10^{-7} \div 2 \cdot 10^{-4}$ М, относительное стандартное отклонение не более 0,03, способ регистрации воспроизводимых масс-спектров MALDI (с матричной лазерной десорбционной ионизацией) для низкомолекулярных фармацевтических веществ,

обеспечивающий получение воспроизводимых спектров при содержании целевых компонентов не выше 10^{-7} г.

Кроме того, в рамках специализации «аналитическая химия» разработан новый лекционный курс «Тест методы анализа смесей органических соединений», 6 ч, а также новая задача для спецпрактикума «Определение фенолов в сточных и природных водах с предварительным сорбционным концентрированием с амперометрическим детектированием», 4 ч, для студентов 4 курса Химического факультета МГУ.

Все работы выполнены на мировом уровне и в соответствии с требованиями Технического задания к контракту. В рамках выполнения работ по этапу защищена 1 докторская и 3 кандидатских диссертации, опубликована 21 статья в высокорейтинговых журналах.

6. ЛИТЕРАТУРА

1. Garcia-Galan M.J., Silvia Diaz-Cruz M., Barcelo D. Identification and determination of metabolites and degradation products of sulfonamide antibiotics. // *Trends Anal. Chem.* – 2008. – V. 27. – № 11. – P. 1008 – 1022.
2. Нестеренко И.С., Нокель М.А., Еремин С.А. Иммунохимические методы определения сульфаниламидных препаратов. // *Журн. аналит. химии.* – 2009. – Т. 64. – №5. – С. 453 – 462.
3. Wen Y., Zhang M., Zhao Q., Feng Y-Q. Monitoring of five sulfonamide antibacterial residues in milk by in-tube solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. // *J. Agric. Food. Chem.* – 2005. – V. 53. – P. 8468 – 8473.
4. Su S., Zhang M., Li B., Zhang H., Dong X. HPLC determination of sulfamethazine in milk using surface-imprinted silica synthesized with iniferter technique. // *Talanta.* – 2008. – V. 76. – P. 1141 – 1145.
5. Lu K.-H., Chen C.-Y., Lee M.-R. Trace determination of sulfonamides residues in meat with a combination of solid-phase microextraction and liquid chromatography-mass spectrometry. // *Talanta.* – 2007. – V. 72. – P. 1082 – 1087.
6. Huang J., Liu J., Zhang C., Wei J., Mei L., Yu S., Li G., Xu L. Determination of sulfonamides in food samples by membrane-protected micro-solid phase extraction coupled with high performance liquid chromatography. // *J. Chromatogr. A.* – 2012. – V. 1219. – P. 66 – 74.
7. Pastor-Navarro N., Garcia-Bover C., Maquieira A., Puchades R. Specific polyclonal-based immunoassays for sulfathiazole. // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2004. – V. 379. – № 7/8. – P. 1088 – 1099.
8. Li J-D., Cai Y-Q., Shi Y-L., Mou S-F., Jiang G-B. Determination of sulfonamide compounds in sewage and river by mixed hemimicelles solid-phase extraction prior to liquid chromatography-spectrophotometry. // *J. Chromatogr. A.* – 2007. – V. 1139. – P. 178 – 184.
9. Balakrishnan Vimal K., Terry Ken A., Toito J. Determination of sulfonamide antibiotics in wastewater: a comparison of solid phase microextraction and solid phase extraction methods. // *J. Chromatogr. A.* – 2006. – V. 1131. – P. 1 – 10.

10. Haasnoot W., Bienenmann-Ploum M., Kohen F. Biosensor immunoassay for the detection of eight sulfonamides in chicken serum. // *Anal. Chim. Acta.* – 2003. – V. 483. – P. 171 – 180.
11. Buick R. K., Greer N. M., Elliott C. T. A microtitre plate assay for the detection of antibiotics in porcine urine. // *Analyst.* – 2000. – V. 125. – P. 395 – 396.
12. McClure E.L., Wong C.S. Solid phase microextraction of macrolide, rimethoprim, and sulfonamide antibiotics in wastewaters. // *J. Chromatogr. A.* – 2007. – V. 1169. – P. 53 – 62.
13. Raich-Montiu J., Folch J., Compano R., Granados M., Prat M.D. Analysis of trace levels of sulfonamides in surface water and soil samples by liquid chromatography-fluorescence. // *J. Chromatogr. A.* – 2007. – V. 1172. – P. 186 – 193.
14. Koesukwiwat U., Jayanta S., Leepipatpiboon N. Validation of a liquid chromatography–mass spectrometry multi-residue method for the simultaneous determination of sulfonamides, tetracyclines, and pyrimethamine in milk. // *J. Chromatogr. A.* – 2007. – V. 1140. – P. 147 – 156.
15. Babic S., Asperger D., Mutavdzic D., Horvat A.J.M., Kastelan-Macan M. Solid phase extraction and HPLC determination of veterinary pharmaceuticals in wastewater. // *Talanta.* – 2006. – V. 70. – P. 732 – 738.
16. Ashihara H., Sano H., Crozier A. Review. Caffeine and related purine alkaloids: Biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. // *Phytochemistry.* – 2008. – № 69. – P. 841 – 856.
17. Marchei E., Pellegrini M., Pacifici R., Palmi I., Pichini S. Development and validation of a high-performance liquid chromatography – mass spectrometry assay for methylxanthines and taurine in dietary supplements. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2005. – V. 37. – P. 499 – 507.
18. Андреева Е.Ю., Тан Цзянань, Дмитриенко С.Г., Золотов Ю.А. Определение кофеина, теобромина и теофиллина в чае методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2010. – Т. 10. – № 6. – С. 805 – 812.
19. Theodoridis G., Zacharis C.K., Tzanavaras P.D., Themelis D.G., Economou A. Automated sample preparation based on the sequential injection principle. Solid-phase

extraction on a molecularly imprinted polymer coupled on-line to high-performance liquid chromatography. // *J. Chromatogr. A.* – 2004. – V. 1030. – P. 69 – 76.

20. Lucena R., Cardena S., Gallego M., Valcarcel M. Continuous flow autoanalyzer for the sequential determination of total sugars, colorant and caffeine contents in soft drinks. // *Anal. Chim. Acta.* – 2005. – V. 530. – P. 283 – 289.

21. Georga K. A., Samanidou V. F., Papadoyannis I. N. Use of novel solid-phase extraction sorbent materials for high-performance liquid chromatography quantitation of caffeine metabolism products methylxanthines and methyluric acids in samples of biological origin. // *J. Chromatogr. B.* – 2001. – V. 759. – P. 209 – 218.

22. Kanazawaa H., Atsumia R., Matsushimaa Y., Kizub J. Determination of theophylline and its metabolites in biological samples by liquid chromatography–mass spectrometry. // *J. Chromatogr. A.* – 2000. – V. 870. – P. 87 – 96.

23. Лохов П.Г., Арчаков А.И. Масс-спектрометрические методы в метаболомике. // *Биомедицинская химия.* – 2008. – Т. 54. – № 5. – С. 497 – 511.

24. Ryan D., Robards K., Prenzler P.D., Kenda M. Recent and potential developments in the analysis of urine: A review. // *Anal. Chim. Acta.* – 2011. – V. 684. – P. 17 – 29.

25. Pitarch E., Portolés T., Marín J.M., Ibáñez M., Albarrán F., Hernández F. Analytical strategy based on the use of liquid chromatography and gas chromatography with triple-quadrupole and time-of-flight MS analyzers for investigating organic contaminants in wastewater. // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2010. – V. 397. – P. 2763 – 2776.

26. Togola A., Budzinski H. Analytical development for analysis of pharmaceuticals in water samples by SPE and GC–MS. // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2007. – V. 388. – P. 627 – 635.

27. Cammarata L., Kazarian S.G., Salter P.A., Welton T. // *Phys.Chem.Chem.Phys.* – 2001. – V.3. – P.5192 – 5200.

28. Koel M. // *Proc. Est. Acad. Sci. Chem.* – 2000. – No. 3. – P. 145 – 155.

29. Н. В. Шведене, Д. В. Чернышёв, И. В. Плетнев. // *Российский Химический Журнал.* – 2008. – Т. LII. № 2. – С. 80 – 91.

30. Wilkes J.S., Levisky J.A., Wilson R.A. // *Inorg. Chem.* – 1982. – V.21. – P. 1263 – 1264.

31. Scott M.P., Brazel C.S., Benton M.G. // Chem. Commun. – 2002. – P. 1370 – 1371.
32. Shvedene N.V., Chernyshov D.V., Khrenova M.G. // Electroanalysis. – 2006. – V. 18. – No. 13– 14. P. 1416 – 1421.
33. Wadhawan J.D., Schroder U., Neudeck A. // J. Electroanal. Chem. – 2000. – V. 493. – P. 75 – 83.
34. Nassi A., Ebelle C., Njanja E., Ngameni E. // Electroanalysis. – 2011. – V. 23. No. 2. – P.424 – 432.
35. Coll C., Labrador R.H., Manez R.M. Ionic liquids promote selective responses towards the highly hydrophilic anion sulfate in PVC membrane ion-selective electrodes.// Chem. Comm. – 2005. – I. 24. – P. 3033 – 3035.
36. Chernyshov D.V., Khrenova M.G., Pletnev I.V. Screen-printed ion-selective electrodes covered with membranes containing ionic liquids. // Mend.Comm. – 2008. – V. 18. – I. 2. – P. 88 – 89.
37. Chernyshov D.V., Egorov V.M., Shvedene N.V. Pletnev I.V. // ACS Appl. Mater. Interfaces. – 2009. – V. 1. – No. 9. – P. 2055 – 2059.
38. Smutok O., Gayda G., Gonchar M., Schuhmann W. A novel l-lactate-selective biosensor based on flavocytochrome b2 from methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. // Biosensors and Bioelectronics. – 2005. – № 20. – P. 1285 – 1290.
39. Lee J.-A., Tsai Y.-C., Chen H.-Y., Wang C.-C., Chen S.-M., Fukushima T., Imai K. Fluorimetric determination of d-lactate in urine of normal and diabetic rats by column-switching high-performance liquid chromatography. // Anal. Chim. Acta. – 2005. – № 534. – P. 185 – 191.
40. Gamero M., Pariente F., Lorenzo E., Alonso C. Nanostructured rough gold electrodes for the development of lactate oxidase-based biosensors. // Biosensors and Bioelectronics. – 2010. – № 25. – P. 2038 – 2044.
41. Карякин А.А., Уласова Е.А., Вагин М.Ю., Карякина Е.Е. Биосенсоры: устройство, классификация и функциональные характеристики. // Сенсор. – 2002. – № 1. – С. 16 – 23.
42. Zhang Y., Wilson G.S. Electrochemical oxidation of H_2O_2 on Pt and Pt+Ir electrodes in physiological buffer and its applicability to H_2O_2 -based biosensors. // J. Electroanal. Chem. – 1993. – V. 345. – P. 253 – 271.

43. Clark L.; Lyons C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. // *Ann.NY Acad.Sci.* – 1962. – V. 102. – P. 29 – 45.
44. Karyakin A.A, Karyakina E.E. Application of Prussian Blue and its analogues in electroanalysis (review). // *Proceedings of Russian Acad. Sci.* – 2001. – № 10. – P. 1728 – 1734.
45. Karyakin A.A. Prussian Blue and its analogues: Electrochemistry and Analytical applications (review). // *Electroanalysis.* – 2000. – № 13. – P. 813 – 819.
46. Neff V. D. Electrochemical Oxidation and Reduction of Thin Films of Prussian Blue. // *J. Electrochem. Soc.* – 1978. – V. 128. – P. 886 – 887.
47. Itaya K.; Ataka T.; Toshima S. Spectroelectrochemistry and electrochemical preparation method of Prussian blue modified electrodes. // *J. Am. Chem. Soc.* 1982. V. 152. P. 243 – 250.
48. Kulys J.J, Cenas N.K. // *J. Electroanal. Chem.* – 1981. – V. 128. – P. 103 – 112.
49. Тернер Э., Краубе И., Уилсон Дж. Биосенсоры. М.: Мир. – 1992. – 604 с.
50. Будников Г.К. Биосенсоры как новый тип аналитических устройств. // *Соросовский образовательный журнал.* – 1996. – № 12. – С. 26 – 32.
51. www.nedug.ru.
52. Mato I., Suarez-Luque S., Huidobro J.F. Simple determination of main organic acids in grape juice and wine by using capillary zone electrophoresis with direct UV detection. // *Food Chemistry.* – 2007. – № 102. – P. 104 – 112.
53. Лебедев А.Т. Масс-спектрометрия в органической химии. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний. – 2003. – 493 с.
54. Karas M., Bachmann D., Hillenkamp F. Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules // *Analyt. Chem.* – 1985. – V.57. – № 14. – P. 2935 – 2939.
55. Cancilla M.T., Penn S.G., Carroll J.A., Lebrilla C.B. Coordination of alkali metals to oligosaccharides dictates fragmentation behavior in matrix-assisted laser desorption ionization/Fourier transform mass spectrometry // *J. Am. Chem. Soc.* – 1996. – V. 118. – № 28. – P. 6736 – 6745
56. Заикин В.Г., Варламов А.В., Микая А.И., Простаков Н.С. Основы масс-спектрометрии органических соединений. М.: МАИК "Наука/Интерпериодика". – 2001. – 286 с.

57. Girault S., Chassaing G., Blais J.C., Brunot A., Bolbach G. Coupling of MALDI-TOF mass analysis to the separation of biotinylated peptides by magnetic streptavidin beads // *Analyt. Chem.* – 1996. – V.68. – №13. – P. 2122 – 2126.
58. Sunner J., Dratz E., Chen Y-C. Graphite surface-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of peptides and proteins from liquid solutions // *Analyt. Chem.* – 1995. – V.67. – № 23. – P. 1335 – 1342.
59. Suddaby K.G., Hunt K.H., Haddleton D.M. MALDI-TOF mass spectrometry in the study of statistical copolymerizations and its application in examining the free radical copolymerization of methyl methacrylate and n-butyl methacrylate // *Macromolecules.* – 1996. – V. 29. – № 27. – P. 8642 – 8649.
60. Kerns K.P., Guo B.C., Deng H.T., Castleman Jr. A.W. Dissociation of vanadium- carbon cluster cations // *J. Phys. Chem.* – 1996. – V. 100. – № 38. – P. 16817 – 16821.
61. Chan T-W.D, Colburn A.W, Derrick P. Matrix-assisted laser desorption/ionization using a liquid matrix: Formation of high-mass cluster ions from protein // *J. Org. Mass Spectrom.* – 1992. – V. 27. – P. 53.
62. Danis P.O., Karr D.E., Mayer F., Holle A., Watson C.H. The analysis of water-soluble polymers by matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry // *J. Org. Mass Spectrom.* – 1992. – V. 27. – P. 843.
63. Hillenkamp F., Peter-Catalinit J. MALDI MS. WILEY-VCH. – 2007. – C. 363.
64. Cohen L. H., Gusev A. I. Small molecule analysis by MALDI mass spectrometry // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2002. – V. 373. – P.571 – 586.
65. Byun J., Gooden J., Ramanathan R., Li K.-M., Cavalieri E.L., Gross M.L. // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – 1997. – V. 8. – P. 977 – 986.
66. Zabet-Moghaddam M., Heinzle E., Tholey A. Qualitative and quantitative analysis of low molecular weight compounds by ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using ionic liquid matrices // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 2004. – V. 18. – P. 141 – 148.
67. Ayorinde F.O., Garvin K., Saeed K. Determination of the fatty acid composition of saponified vegetable oils using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 2000. – V. 14. – P. 608.

68. Mims D., Hercules D. Quantification of bile acids directly from urine by MALDI-TOF-MS // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2003. – V. 375. – P. 609 – 616.
69. Marta S. Maier, Sara D. Parera, Alicia M. Seldes. Matrix-assisted laser desorption and electrospray ionization mass spectrometry of carminic acid isolated from cochineal // *International Journal of Mass Spectrometry.* – 2004. – V. 232. – P. 225 – 229.
70. Grant D.C., Helleur R.J. Rapid screening of anthocyanins in berry samples by surfactant-mediated matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 2008. – V. 22. – P. 156 – 164.
71. Morrow A.P., Olakunle O., Folahan K., Ayorinde O. Detection of cationic surfactants in oral rinses and disinfectant formulation using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 2001. – V. 15. – P. 667 – 670.
72. Ayorinde O., Elhilo E. Determination of the Instrumental Detection Limits of Commercial Nonylphenol Ethoxylates with a Wide Range of Molecular Masses Using Matrix-assisted Laser Desorption/ionization Time-of-flight Mass Spectrometry Folahan // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 1999. – V. 13. – P. 2166 – 2173.
73. Ayorinde F. O., Hambright P., Porter T. N., Keith Q.L., Jr. Use of *meso*-Tetrakis(pentafluorophenyl)porphyrin as a Matrix for Low Molecular Weight Alkylphenol Ethoxylates in Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 1999. – V. 13. – P. 2474 – 2479.
74. Nasi A., Ferranti P., Amato S., Chianese L. Identification of free and bound volatile compounds as typicalness and authenticity markers of non-aromatic grapes and wines through a combined use of mass spectrometric techniques // *Food Chemistry.* – 2008. – V. 110. – P. 762 – 768.
75. Vogliardi S., Favretto D., Frison G., Ferrara S. D., Seraglia R., Traldi P. A fast screening MALDI method for the detection of cocaine and its metabolites in hair // *J. Mass Spectrom.* – 2009. – V. 44. – P. 18 – 24.
76. Wu W., Qiao C., Liang Z., Xu H., Zhao Z., Cai Z.. Alkaloid profiling in crude and processed *Strychnos nux-vomica* seeds by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2007. – V. 45. – P. 430 – 435.

77. Chen X., Hu L., Su X., Kong L., Ye M., Zou H. Separation and detection of compounds in *Honeysuckle* by integration of ion-exchange chromatography fractionation with reversed-phase liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometer and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis // *J. Pharmac. Biomed. Anal.* – 2006. – V. 40. – P. 559 – 570.

78. Chen X., Kong L., Su X., Pan C., Ye M., Zou H. Integration of ion-exchange chromatography fractionation with reversed-phase liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometer and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for isolation and identification of compounds in *Psoralea corylifolia* // *J. Chromatogr. A.* – 2005. – V. 1089. – P. 87 – 100.

79. LeRiche T., Osterodt J., Volmer D.A. An experimental comparison of electrospray ion-trap and matrix-assisted laser desorption/ionization post-source decay mass spectra for the characterization of small drug molecules // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 2001. – V. 15. – P. 608 – 614.

80. Ling Y.-C., Lin L., Chen Y.-T. Quantitative Analysis of Antibiotics by Matrixassisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 1998. – V. 12. – P. 317 – 327.

81. LeRiche T., Osterodt J., Volmer D.A. An experimental comparison of electrospray ion-trap and matrix-assisted laser desorption/ionization post-source decay mass spectra for the characterization of small drug molecules // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 2001. – V. 15. – P. 608 – 614.

82. Andalo C., Bocchini P., Pozzi R., Galletti G.C. Accurate mass measurement of synthetic analogous of prazosine by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 2001. – V. 15. P. – 665 – 669.

83. Ben Hameda A., Taborsky P., Pena-Mendez E.M., Havel J. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI TOF MS) study of Huperzine A, a natural anti-Alzheimer's disease product, its derivatization and its detection by highly sensitive laser induced fluorescence (LIF) // *Talanta.* – 2007. – V. 72. – P. 780 – 786.

84. Notari S., Mancone C., Tripodi M., Narciso P., Fasano M., Ascenzi P. Determination of anti-HIV drug concentration in human plasma by MALDI-TOF/TOF // *J. Chromatogr. B.* – 2006. – V. 833. – P. 109 – 116.

85. Notari S., Mancone C., Alonzi T., Tripodi M., Narciso P., Fasano M., Ascenzi P. Determination of abacavir, amprenavir, didanosine, efavirenz, evirapine and stavudine concentration in human plasma by MALDI-TOF/TOF // *J. Chromatogr. B.* – 2008. – V. 863. – P. 249 – 257.

86. Troendle F.J., Reddick C.D., Yost R.A. Detection of Pharmaceutical Compounds in Tissue by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization and Laser Desorption/Chemical Ionization Tandem Mass Spectrometry with a Quadrupole Ion Trap // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – 1999. – V. 10. – P. 1315– 1321.

87. Shrivastava K., Wu H.-F. Single drop microextraction as a concentrating probe for rapid screening of low molecular weight drugs from human urine in atmospheric-pressure matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 2007. – V. 21. – P. 3103 – 3108.

88. Donegan M., Tomlinson A.J., Nair H., Juhasz P. Controlling matrix suppression for matrix-assisted laser desorption/ionization analysis of small molecules // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 2004. – V. 18. – P. 1885 – 1888.

89. Anna Crecelius, Malcolm R. Clench, Don S. Richards, Vic Parr. Quantitative determination of Piroxicam by TLC–MALDI TOF MS // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2004. – V. 35. – P. 31 – 39.

90. Salo P.K., Salomies H., Harju K., Ketola R.A., Kotiaho T., Yli-Kauhaluoma J., Kostianen R. Analysis of Small Molecules by Ultra Thin-Layer Chromatography-Atmospheric Pressure Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – 2005. – V. 16. – P. 906 – 915.

91. Wang R., Feder D., Hsieh F. Characterization of eptifibatid during drug formulation stability assays // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* – 2003. – V. 33. – P. 1181 – 1187.

92. Даванков В.А., Волынская А.В., Цурюпа М.П. Сорбционные свойства макросетчатых изопористых полимеров стирола типа “Стиросорб”. // *Высокомолекулярные соединения. Серия Б.* – 1980. – Т. 22. – № 10. – С. 746 – 748.

93. Хрящевский А.В., Подловченко М.В., Нестеренко П.Н., Шпигун О.А. Применение сверхшихотого макросетчатого полистирола для концентрирования фенолов. // *Вестн. Моск. ун-та. Серия 2. Химия.* – 1998. – Т. 39. – № 3. – С. 196 – 204.

94. Хрящевский А.В., Нестеренко П.Н., Тихомирова Т.И., Фадеева В.И., Шпигун О.А. Патроны с макропористыми полимерными сорбентами для концентрирования первичных алифатических аминов при их определении методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. // Журн. аналит. химии. – 1997. – Т. 52. – № 15. – С. 485 – 489.

95. Медведева О.М. Куракина В.С., Дмитриенко С.Г., Шпигун О.А. Разделение и определение фенолкарбоновых кислот методом капиллярного зонного электрофореза с предварительным концентрированием на сверхсшитом полистироле. // Журн. аналит. химии. – 2004. – Т. 59. – № 7. – С. 752 – 759.

96. Gessner C., Wirtz H. Continuous exhaled breath condensate measurements in ventilated patients. // Respiratory Care. – 2006. – V. 51. – № 10. – P. 1118 – 1119.

97. Karyakin A.A., Karyakina E.E., Gorton L., Bobrova O.A., Lukachova L.V., Gladilin A.K., Levashov A.V. The improvement of electrochemical biosensors using enzyme immobilisation from water-organic mixtures with a high content of organic solvent. // Anal. Chem. – 1996. – № 68. – P. 4335 – 4341.

98. Marek M., Volkel L., Hawener I., Platen P., Muckenhoff K. and Marek W. Measurements of lactate in exhaled breath condensate at rest and after maximal exercise in young and healthy subjects. // Breath Res. – 2010. – № 17. – P. 8 – 24.

7. ПРИЛОЖЕНИЯ

УТВЕРЖДАЮ
Зам. декана химического факультета
МГУ им. М.В.Ломоносова
_____ А.А.Бучаченко
20 мая 2012 г.

АКТ № 1
разработки методик
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 разработаны методики концентрирования сульфаниламидов и метилксантинов из растворов, биологических жидкостей и жидких пищевых продуктов, обеспечивающие степень извлечения целевых веществ не менее 95 %.

Профессор _____ С.Г. Дмитриенко

Заведующий кафедрой
аналитической химии _____ Ю.А.Золотов

УТВЕРЖДАЮ
Зам. декана химического факультета
МГУ им. М.В.Ломоносова
_____ А.А.Бучаченко
20 мая 2012 г.

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

Мы, нижеподписавшиеся, ведущий научный сотрудник кафедры аналитической химии Плетнев Игорь Владимирович 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 разработаны методики определения ионогенных ПАВ в косметической продукции, органических кислот и катехоламинов в лекарственных препаратах, обеспечивающие определение целевых веществ с пределами обнаружения 10^{-6} - 10^{-7} М.

Ведущий научный сотрудник _____ И.В.Плетнев

Заведующий кафедрой
аналитической химии _____ Ю.А.Золотов

УТВЕРЖДАЮ
Зам. декана химического факультета
МГУ им. М.В.Ломоносова
_____ А.А.Бучаченко
20 мая 2012 г.

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

Мы, нижеподписавшиеся, профессор кафедры аналитической химии Карякин
Аркадий Аркадьевич 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 лактата в конденсате
выдыхаемого воздуха со следующими характеристиками: чувствительность
 $(8,5 \pm 0,3) \cdot 10^{-2} \text{ А} \cdot \text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$, предел обнаружения $1 \cdot 10^{-7} \text{ М}$, линейный диапазон
определяемых концентраций $5 \cdot 10^{-7} \div 2 \cdot 10^{-4} \text{ М}$, относительное стандартное
отклонение не более 0,03.

Профессор _____ А.А.Карякин

Заведующий кафедрой
аналитической химии _____ Ю.А.Золотов

УТВЕРЖДАЮ
Зам. декана химического факультета
МГУ им. М.В.Ломоносова
_____ А.А.Бучаченко
20 мая 2012 г.

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

Мы, нижеподписавшиеся, ведущий научный сотрудник 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 разработан способ регистрации воспроизводимых масс-спектров MALDI (с матричной лазерной десорбционной ионизацией) для низкомолекулярных фармацевтических веществ, обеспечивающий получение воспроизводимых спектров при содержании целевых компонентов не выше 10^{-7} г.

Ведущий научный сотрудник _____ 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 2012 г.

АКТ № 5

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 «Тест методы анализа смесей органических соединений»
объемом 6 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 2012 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 в рамках специализации «аналитическая химия» разработана новая
задача для спецпрактикума «Определение фенолов в сточных и природных водах с
предварительным сорбционным концентрированием с амперометрическим
детектированием» 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